



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

PCB, immunosuppression och ökad mortalitet hos marina däggdjur

Johanna Grundin



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014:37

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

PCB, immunosuppression och ökad mortalitet hos marina däggdjur

PCB, immunosuppression and an increase in mortality in marine mammals

Johanna Grundin

Handledare:

Stefan Örn och Gunnar Carlsson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2014

Omslagsbild: Göran Billeson

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 37
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: PCB, Polyklorerade bifenyler, immunsystemet, immunosuppression, marina däggdjur

Key words: PCB, Polychlorinated biphenyls, immune system, Immunosuppression, Marine mammals

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
PCB	3
Egenskaper och användningsområden	3
Verkningsmekanism och effekter.....	4
Spridning i havsmiljön och ansamling i marina däggdjur.....	4
PCB och effekter på immunparametrar.....	6
Effekter på celler i det medfödda och förvärvade immunförsvaret	6
Fagocytos	8
Hypothyroidism och VitaminA-brist	9
Thymus – och mjältatrofi	10
Diskussion	11
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Epizootier som drabbat marina däggdjur och lett till storskaliga dödsfall har uppmärksammats runt om i världen de senaste decennierna. Höga halter av persistenta miljökontaminanter såsom DDT (diklordifenyltrikloretan) och PCB (polyklorerade bifenyler) har uppmätts hos djur som drabbats. Detta har lett till tankar om att miljökontaminanter, i den nivå de finns i våra akvatiska ekosystem idag, kan vara en bidragande orsak till den ökade mottagligheten för infektioner och den ökade mortaliteten hos marina däggdjur. I denna litteraturstudie sammanställs resultaten från försök, både på laboratoriedjur och marina däggdjur, som tyder på att kontaminanter med fokus på PCB kan orsaka immunosuppression och därmed vara en bakomliggande orsak till allvarligheten i dessa epizootier. Resultat från studier visar på att PCB kan orsaka immunosuppression genom att ge nedsatt proliferativt svar hos T-lymfocyter under stimulering med mitogener, minskad aktivitet hos NK-celler, nedsatt antikroppsproduktion, minskad antigen-specifik proliferation och minskat DTH (delayed-type hypersensitivity) svar. Studier har även visat på ett samband mellan höga PCB-nivåer och hypothyroidism, Vitamin-A brist samt atrofi av lymfoida organ. Dessa data tyder på att PCB, i de nivåer det finns i miljön idag, kan verka immunotoxiskt hos marina däggdjur som till följd av sin position högt upp i näringskedjan och sin långa livslängd samlar på sig höga nivåer av dessa persistenta toxiska kontaminanter.

SUMMARY

Epizootic diseases affecting marine mammals and which have led to large-scale mortalities have attracted attention around the world during recent decades. High levels of persistent environmental contaminants such as DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) have been detected in affected animals. This has led to concern if environmental contaminants, in the level which they exist in our aquatic ecosystems today, may be a contributing factor to the increased susceptibility to infection and increased mortality of marine mammals. In this study the results of experiments, both on laboratory animals and marine mammals, are compiled suggesting that contaminants focusing on PCBs can cause immunosuppression and thus be an underlying cause of the severity of these epidemics. Results from studies show that PCBs can cause immunosuppression by resulting in a reduced proliferative response of T-lymphocytes during stimulation with mitogens, decreased activity of NK-cells, impaired antibody production, decreased antigen-specific proliferation and decreased DTH (delayed -type hypersensitivity) response. Studies have also shown an association between high PCB levels and hypothyroidism, vitamin A deficiency and atrophy of lymphoid organs. These data suggest that PCBs in the levels they exist in our environment today may be immunotoxic to marine mammals which, because of their high trophic level and their long life span accumulate high levels of these persistent toxic contaminants.

INLEDNING

De senaste 30 åren har flertalet epizootier som lett till massdöd observerats hos marina däggdjur. Morbillivirus har påvisats som den primära orsaken i de allra flesta av dessa fall (Van Loveren *et al.*, 2000; Swart *et al.*, 1994). 1990-1992 och 2006-2008 drabbades strimmiga delfiner i Medelhavet av DMV (Dolphin Morbillivirus). 1987-1988 orsakade CDV (canine distemper virus) stor dödlighet hos sibiriska sälar i Bajkal sjön (Butina *et al.*, 2010). Mellan 1987 och 1988 drabbades populationen av flasknosdelfin utanför Nordamerika av en epizooti som tog död på över 740 individer (Scott, 1988). Allvarligheten i dessa utbrott har lett till ett intresse för immunotoxikologi hos drabbade arter. Flera studier har gjorts för att reda ut huruvida immunosuppression och därmed en ökad mottaglighet för infektioner orsakat av miljökontaminanter kan vara en bidragande orsak. Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka hur polyklorerade bifenyler (PCB) inverkar på immunförsvaret hos marina däggdjur, vilket orsakar ökad mottaglighet för infektion och mortalitet.

MATERIAL OCH METODER

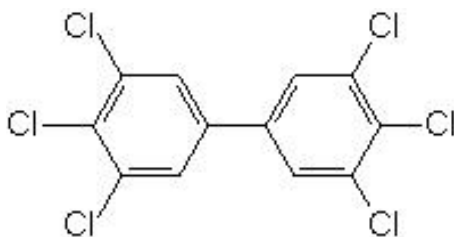
Databaser som använts i denna litteraturstudie är Web of Science och Google Scholar. Huvudsakliga sökord har varit (PCB OR Polychlorinated biphenyl*) AND (marine mammal*) AND (immunosuppression OR immunomodulation OR immunity OR immunotox*). Sökorden (AhR OR Aryl hydrocarbon receptor) AND (immunosuppression OR immunomodulation OR immunity OR immunotox*) AND (PCB OR Polychlorinated biphenyl*) användes för att hitta artiklar relaterade till verkningsmekanismen för PCB. Av de artiklar som klarade första granskningen användes referenslistorna för att hitta relaterade artiklar.

LITTERATURÖVERSIKT

PCB

Egenskaper och användningsområden

Polyklorerade bifenyler (PCB) hör till en stor klass Halogenerade Aromatiska Kolväten (Halogenated Aromatic Hydrocarbons, HAH) där TCDD (2,3,7,8-Tetraklordibenso-p-dioxin) är den mest toxiska medlemmen (Kerkvliet, 1995). PCB består av 209 kongener (varianter) med olika antal av kloratomer på olika positioner i två fenytringar (Figur 1) och med olika toxiska och biologiska egenskaper beroende på var dessa kloratomer sitter (Tanabe, 1988).



Figur 1. Exempel på struktur för PCB

PCB används inom många industriella områden p.g.a. dess unika fysiska och kemiska egenskaper. PCB-mixturer är bl.a. värmestabila, resistenta mot syror, baser och annan kemisk påverkan. De är även stabila mot oxidation och hydrolys, har en låg vattenlöslighet, låg antändningsrisk och en hög elektrisk resistens (De Voogt & Brinkman, 1989). De Voogt & Brinkman (1989) beskrev hur det finns öppna och slutna användningssystem för PCB. De öppna är användningsområden som leder till att PCB läcker ut i miljön t.ex. bläck, mjukgörare i plaster, impregneringsmedel, färger, flamskyddsmedel, pesticider och lim. De slutna är transformatorer, kondensatorer, hydraulvätskor och kylarvätskor.

Verkningsmekanism och effekter

Det finns plana och icke-plana PCB. De plana är strukturellt lika TCDD och binder till TCDD receptorn, också kallad Ah-receptorn, som finns i cytosolen, medan de icke-plana har liten eller ingen affinitet för denna receptor (Vos, 1997). Vos (1997) förklarade hur de flesta effekter av PCB förmedlas via Ah-receptorn och hur ligand-receptorkomplexet, vid bindning, förflyttar sig in i kärnan. Inne i kärnan kan det binda till specifika sekvenser i DNA s.k. DRE (dioxin responsive elements) och inducera transkription av olika gener (Whitlock, 1987). I sin översikt beskrev Whitlock (1987) att den effekt som är mest studerad är transkription av cytokrom P450 gener och genom detta en induktion av cytokrom P-450 enzymer. Ett av dessa enzymer är aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH), vars aktivitet är lätt att mäta och därför används induktion av AHH som ett mått för att bestämma om en viss vävnad kan svara på TCDD. AHH är involverad i metabolisk aktivering av kemikalier (såsom PCB) till aktiva carcinogener (Whitlock, 1987).

I samma översikt sägs det att det verkar finnas ett samband mellan struktur av olika kongener och potensen för induktion samt att AHH induktion, förutom bindning till Ah-receptorn, även kräver interaktion med DNA. Receptorn har alltså både en ligandbindande och en DNA-bindande domän. Via denna receptor påverkar TCDD och strukturellt lika HAHs transkription av gener vilket man tror leder till en över- eller underproduktion av proteinprodukter, vilket ger den toxiska effekten. (Kerkvliet, 1995). De effekter man har sett av PCB är bl.a. reproduktionstoxicitet, immunotoxicitet, cancer och utvecklingstoxicitet framför allt i CNS (Livsmedelsverket).

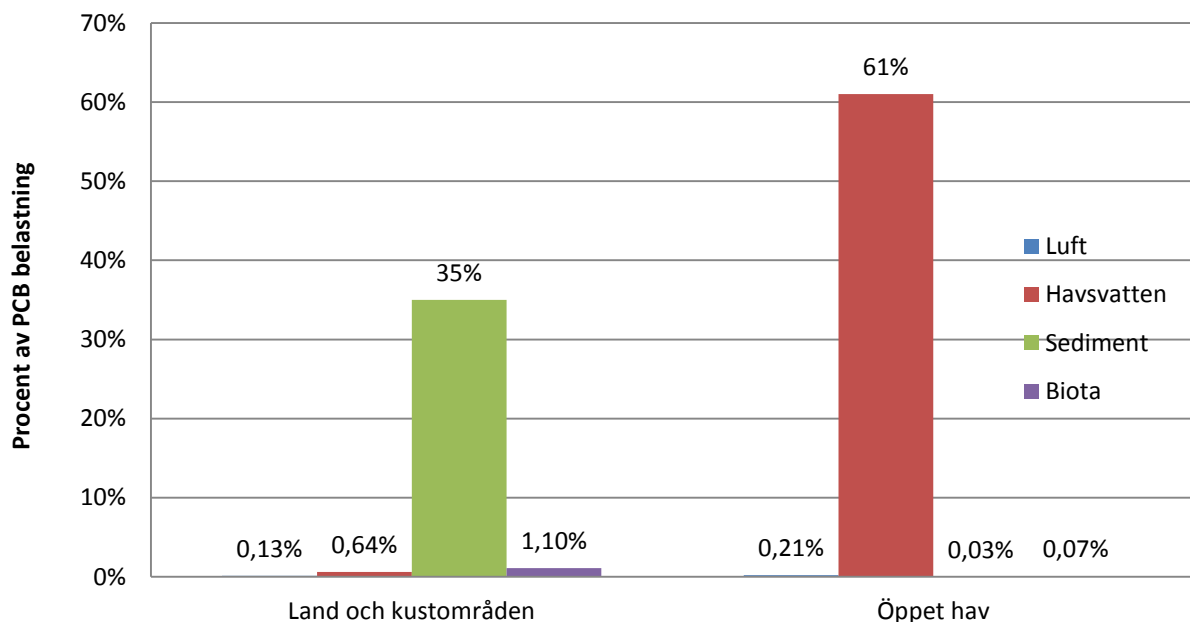
Spridning i havsmiljön och ansamling i marina däggdjur

Av de totala PCB nivåerna i miljön finns nästan allt i kustsediment och havsvatten, där över 60 % av den totala kontamineringen finns i havsvattnet (Figur 2) (Tanabe, 1988). Trots en låg koncentration i vatten kan större mängder hittas i akvatiska organismer till följd av PCBs hydrofobicitet och biologiska stabilitet. (Tanabe, 1988). Genom att mäta koncentrationerna av PCB i havsvatten, plankton, bläckfisk och delfiner drog Tanabe *et al.* (1984) slutsatsen att biokoncentrationsfaktorn ökar ju högre upp i näringskedjan man kommer. Nivåerna av PCB ökar alltså med ökande nivåer i näringskedjan. I de akvatiska ekosystemen är marina däggdjur högt upp i näringskedjan och ansamlar därför stora mängder PCB och löper därmed även stor risk för toxicitet. Bioackumuleringen av PCB i marina däggdjur är alltså ett resultat av amplifiering genom näringskedjan.

Flera studier har visat på att nivåerna av PCB är extremt höga i marina däggdjur. Detta beror delvis på att största mängden PCB finns i haven och att marina däggdjur tar upp dessa kontaminanter via födan. Men de höga nivåerna beror även på den långa livstiden hos marina däggdjur, organismer med en längre levnadstid ansamlar mer lipofila kontaminanter (Tanabe *et al.*, 1984). PCB har en mycket låg löslighet i vatten, men det är väldigt lipofilt (Ballschmiter *et al.*, 1989). De flesta marina däggdjur har ett tjockt späcklager som fungerar som en reservoar för PCB. En undersökning av distributionen av PCB i olika vävnader och organ hos delfiner visade att mer än 90 % av PCB återfanns i späcket (Tanabe *et al.*, 1981). Studier har även visat på att små *Cetaceans* (valar, delfiner och tumlare) ansamlar mer PCB än andra djur högt upp i näringskedjan, såsom fåglar och landlevande däggdjur (Tanabe *et al.*, 1988). Tanabe *et al.* (1988) beskrev hur *Cetaceans* har en annorlunda PCB-metabolism som gör att de har en sämre förmåga att bryta ner vissa PCB-komponenter. Samma studie visade även att de har en låg aktivitet i vissa enzymssystem som kan vara relaterade till möjliga skadliga effekter av PCB.

Marina däggdjur får alltså i sig dessa föroreningar i höga koncentrationer. De kan ansamlar stora mängder PCB via födan, de har lägre kapacitet att bryta ner PCB till följd av lägre aktivitet i vissa enzymssystem och med tanke på detta är marina däggdjur, speciellt *Cetaceans*, förmodligen de mest utsatta individerna när man talar om PCB-toxicitet (Tanabe, 1988). Detta har lett till oro om toxiska effekter hos marina däggdjur orsakade av dessa persistenta ämnen.

Uppskattad PCB belastning i miljön



Figur 2. Uppskattade PCB nivåer i miljön (modifierad från Tanabe (1988)).

PCB och effekter på immunparametrar

Effekter på celler i det medfödda och förvärvade immunförsvaret

Studier på marina däggdjur

Flera studier har utförts för att utvärdera effekten av PCB på T-lymfocyt proliferation under stimulering med mitogener (kemisk substans som stimulerar celledelning). Om T-lymfocytens förmåga att proliferera och differentiera till antingen en minnescell eller en effektorcell vid möte med en patogen minskar kan det leda till nedsatt förvärvat immunsvaret och då även ökad mottaglighet för smittoämnen. (Imanishi *et al.*, 1980).

Lahvis *et al.* (1995) utförde en studie med syfte att undersöka om ett samband fanns mellan exponering för kontaminanter och immunförsvaret hos flasknosdelfin. Blod togs från 15 delfinhannar på Floridas västkust och lymfocytproliferation undersöktes under stimulering med mitogener. Det proliferativa svaret hos lymfocyterna jämfördes med koncentrationen av kontaminanter i blodet. Slutsatsen som drogs var att minskad lymfocytproliferation var associerad med ökande nivåer av PCB. Denna studie hade en liten provstorlek (n=5) och ingen kontrollgrupp, vilket gör att det är svårt att dra trovärdiga slutsatser. Liknande studier har dock gjorts som tyder på samma sak. En av dessa studier utfördes av Swart *et al.* (1994) som utfodrade 2 grupper av knubbsälar med fisk från 2 olika områden; den relativt högkontaminerade Östersjön (grupp 1) och relativt okontaminerade Atlanten (grupp 2). Under en period på 2 år togs blodprov för att mäta immunologiska och hematologiska parametrar. Lymfocytproliferation under stimulering med mitogener undersöktes och svaret minskade vid stimulering med flertalet mitogener, vilket indikerar nedsatt T-lymfocyt funktion (Swart *et al.*, 1994). I samma studie undersöktes även andra immunparametrar med syftet att visa att immunosuppression spelar en viktig roll i utbrott utav virusinfektioner hos marina däggdjur. Antalet vita blodkroppar var högre hos sälarna i grupp 1 till följd av en ökning av antalet granulocyter. Detta kan tyda på en ökning av bakteriella infektioner då granulocyter, framförallt neutrofiler vilka är kroppens viktigaste fagocytiska celler, utgör ett första försvar mot invaderande partiklar, speciellt bakterier (van Oss, 1986). Aktiviteten hos NK-cellerna var lägre, vilket påverkar världens mottaglighet då NK-celler är viktiga i försvaret mot virusinfektioner (Swart *et al.*, 1994).

För att utöka *in vitro* resultaten från studien på knubbsäl av Swart *et al.* (1994) utförde Ross *et al.* (1995) en *in vivo* studie av immunförsvaret hos samma sälarna genom att mäta DTH (delayed -type hypersensitivity eller typ-4 överkänslighet) och antikroppssvaret mot ovalbumin (OVA) i båda grupperna. DTH är en cell-medierad överkänslighet som manifesterar sig som en svullnad bestående av makrofager, monocyter och T-lymfocyter och kan användas för att utvärdera den cell-medierade immuniteten *in vivo*. (Jyonouchi, 2013). Testerna visade att sälarna i grupp 1 (de som matats med fisk från Östersjön) hade signifikant lägre svar än sälarna i grupp 2 (de som matats med fisk från Atlanten). Ett negativt samband sågs även mellan DTH-svaret och kontaminantnivåer från späcket hos sälarna. Detta tyder på

en nedsatt T-cell funktion och cell-medierad immunitet (Ross *et al.*, 1995). Innan immuniseringen och DTH-testet kunde antikroppar inte påvisas i sälar från någon av grupperna. Blodprov 4 veckor efter immuniseringen påvisade antikroppar mot OVA i båda grupper, men nivåerna var 37 % lägre i grupp 1. Slutsatsen som drogs var att exponering för PCB försämrade förmågan hos sälarna i grupp 1 att sätta igång ett specifikt immunsvaret mot antigenet OVA (pga. minskat DTH och antikroppssvar). Dessa resultat tyder på att kontaminanter i fisken från Östersjön har immunosuppressiva egenskaper (Ross *et al.* 1995).

En slutsats av ovanstående är att nedsatt funktion hos både NK-celler och T-celler som är viktiga i försvaret mot virus kan ha bidragit till mottagligheten för Morbillivirus och allvarligheten i epizootierna observerade på marina däggdjur (Swart *et al.*, 1994).

Studier på labbdjur

Studierna av Swart *et al.* (1994) och Ross *et al.* (1995) på knubbsäl gav bevis på att kontaminanter var immunotoxiska. Det är svårt att sätta immunosuppressionen i samband med en ökad mottaglighet för infektioner då det inte är acceptabelt, varken etiskt eller legalt, att utsätta sälarna i studien för ett levande virus (Ross *et al.*, 1996). För utökade studier kan då laboratoriedjur användas istället.

För att få mer stöd bakom de erhållna resultaten av studierna på säl utfördes två studier på råttor (Ross *et al.*, 1997). I den första studien gavs vuxna råttor fisk från samma lager som användes i sälstudien. Detta gav inga tecken på förändringar i immunstatus för de två grupperna. Då immunologiska parametrar tydligt hämmades i sälstudien vid samma exponering kan slutsatsen dras att knubbsälarna kan vara känsligare än råttor mot kontaminanternas immunotoxiska effekter (Ross *et al.*, 1996). I den andra studien delade man in gravida råtthonor i 3 grupper och gav dem dagligen, under dräktighet och laktation, en oral dos med olja från fisk där en grupp fick fiskolja från Östersjön, en grupp från Atlanten och en grupp olja från Atlanten blandat med 2,3,7,8-TCDD (positiv kontrollgrupp). Några av råttungarna infekterades med RCMV (Rat Cytomegalo Virus) vid dag 34. Ungar från den positiva kontrollgruppen visade på minskad kroppsvikt, minskad levervikt och minskad thymusvikt, medan inga makroskopiska tecken på toxicitet sågs i Östersjö-gruppen eller Atlant-gruppen. Ungar från TCDD-gruppen visade även lägre proliferativa svar av lymfocyter vid stimulering med mitogener. Även ett minskat virusassocierat NK-cell och antikroppssvar påvisades. Liknande, men svagare effekter sågs i Östersjögruppen. Råttungarna i studien av Ross *et al.* (1997) visade alltså störningar i immunologiska parametrar som liknade de hos sälarna i studierna av Swart *et al.* (1994) och Ross *et al.* (1995), vilket gör det möjligt att göra en jämförelse mellan dessa arter. Enligt Ross *et al.* (1996) visar den minskade thymusvikten samt T-cellfunktionen hos perinatalt exponerade råttungar på att de nedsatta svaren hos T-lymfocyter hos sälarna kan vara relaterat till en toxisk effekt på thymusfunktionen. Resultaten tyder även på att immunsystemet hos unga däggdjur löper störst risk för immunotoxiska effekter av kontaminanter i de nivåer de finns i miljön idag (Ross *et al.*, 1997).

Tabell 1. Immunotoxiska effekter hos knobbsäl som matats med fisk från Östersjön (modifierad från Van Loveren *et al.*, (2000))

Parameter	Effekt
NK-cell aktivitet	↓
T-cellers svar på mitogener	↓
Antigen-specifik proliferation	↓
Blandat lymfocyt svar	↓
DTH	↓
Specifik antikropps produktion	-/↓
Neutrofiler i cirkulationen	↑

Fagocytos

Fagocytos är den viktigaste mekanismen för att eliminera främmande eller oönskade mikroorganismer eller partiklar ur kroppen (van Oss, 1986). De viktigaste fagocyterna i blodet är neutrofiler som tillhör de polymorfonukleära leukocyterna (granulocyter). Även monocyter, som blir till makrofager i vävnaden, kan fagocytera och de tillhör de mononukleära fagocyterna.

Flera studier har gjorts där resultaten visar att exponering för PCB kan leda till en minskad fagocytisk potential *in vitro*. Levin *et al.* (2004) gjorde en studie på flasknosdelfin och vitval och kom fram till att blandningar innehållande två eller fler icke-plana PCB minskade både neutrofil- och monocyt fagocytos *in vitro* hos båda arter. Levin *et al.* (2005) utförde en liknande studie på humana blodleukocyter där de immunotoxiska egenskaperna hos plana PCB 169 och TCDD samt icke-plana PCB utvärderades. Fagocytos *in vitro* minskade för neutrofiler och monocyter vid exponering för icke-plana PCB, medan PCB 169 och TCDD ensamma inte påverkade fagocytosen. Levin *et al.* (2005) såg även ett samband mellan den minskade fagocytosen och en minskad viabilitet, vilket tyder på en direkt toxicitet.

Hämmas cellers förmåga att fagocytera kan det leda till ökad mottaglighet för infektioner då celler inte kan ta upp och förstöra invaderande mikroorganismer (van Oss, 1986). Om skadan på monocyterna i cirkulationen inte repareras utan är kvar då de mognar till vävnadsmakrofager, som är en antigenpresenterande cell, kan upptag och presentation av antigen till T-celler störas, vilket kan påverka det förvärvade immunförsvaret och antikroppsproduktionen. (Levin *et al.*, 2004; van Oss, 1986). Det finns studier som visar på att även vävnadsmakrofagers förmåga att fagocytera störs av kontaminanter. Fournier *et al.* (2000) visade i en studie på mus att makrofagers förmåga att fagocytera hämmades av en diet bestående av späck från vitval från den till hög grad kontaminerade St Lawrence floden i Nordamerika.

Hypothyroidism och VitaminA-brist

Flera studier visar på att PCB kan ha ett samband med hypothyroidism och VitaminA-brist (Schwacke *et al.*, 2011; Brouwer *et al.*, 1989; Debier *et al.*, 2005). Genom att mäta blodkoncentrationen av PCB och nivåer av totalt thyroxin (TT4), fritt thyroxin (FT4) och trijodthyronin (TT3) i blodet har ett samband mellan ökande nivåer av PCB och lägre nivåer av thyroideahormoner setts. En negativ korrelation mellan vitamin A nivåer i blodet och blodkoncentrationen av PCB har också påvisats.

En tänkbar mekanism för denna effekt kan vara en påverkan av PCB metaboliter på vitamin A och T4 serumtransport, vilket leder till en förlust från cirkulationen via glomerulär filtration (Brouwer *et al.*, 1986). Komplexet T4–transthyretin (TTR)–retinol– retinol binding protein (RBP) är transporten för vitamin A och T4 i cirkulationen där retinol är en analog till vitamin A. Enligt Brouwer *et al.* (1986) kan PCB-metaboliter, p.g.a. dess likhet med T4, tävla med T4 om bildningsstället på TTR, vilket resulterar i förlust av fritt T4 ur cirkulationen via njuren. Bindning av PCB metaboliter till TTR kan enligt studien av Brouwer *et al.* (1986) även leda till minskad affinitet för RBP-retinol, vilket leder till förlust av retinol ur cirkulationen. PCB och andra HAHs kan även verka direkt på thyroidea genom att ge lesioner i follikelceller vilket påverkar syntes och frisättning utav T4 samt påverka metabolismen av thyroidhormoner via bl.a. ökad glukuronidering i levern, vilket ger en ökad frisättning av T4 via gallan och minskade plasmakoncentrationer av T4 (Brouwer *et al.*, 1998).

Thyroideahormoner är viktiga för metabolism och tillväxt, men det är oklart om hypothyroidismen är en orsak till minskat immunsvår (Schwacke *et al.*, 2011). Schwacke *et al.* (2011) fann att T-lymfocyt proliferation sjönk med ökande nivåer av PCB i blod, vilket stämmer överens med tidigare resultat som presenterats. Han fann även att T-lymfocyt proliferation visade ett positivt samband med TT3 och drog då slutsatsen att hypothyroidismen, som medför lägre TT3 nivåer, kan leda till ett minskat T-lymfocyt svar dvs. att immunosuppressionen kan vara thyroideamedierad. Detta antagande stämmer överens med resultaten från en studie gjord av Fabris (1973) då effekterna av thyroidektomi på immunparametrar studerades hos råttor. Operationen gav följande effekter; minskad antikroppssyntes vid stimulering med antigen, minskat antal av perifera vita blodceller p.g.a. färre perifera lymfocyter, T-lymfocytproliferation minskade vid stimulering med mitogener och man såg även en minskad vikt och storlek av thymus, mjälte och lymfknotor. Detta tyder på att thyroxin krävs för normal utveckling och underhåll av lymfvävnad och immunsystemet, vilket stöds av att injektioner med thyroxin kunde förhindra alla observerade immunologiska defekter (Fabris, 1973).

Förutom hypothyroidism verkar även vitaminA- brist bidra till en minskad immunitet. Vitamin A påverkar det epiteliala cellagret på slemhinnor, vilket ger en större möjlighet för bakterier, virus och parasiter att ta sig in i kroppen (Ross, 1992). Enligt Ross (1992) är det inte bara det lokala försvaret på slemhinnor som försvagas, utan även det systemiska försvaret, då receptorer för antigen, cytokiner och andra lösliga molekyler påverkas till följd av att membran förändras. Det syns även förändringar i bildning och utveckling av lymfatisk

vävnad och lymfocytmognad, onormal cytokinproduktion och att patogener elimineras i mindre utsträckning via cytotoxiska och fagocytiska mekanismer.

Vitamin A spelar alltså en viktig roll i motståndet mot infektioner och därför kan minskade Vitamin A-nivåer, följt av exponering för PCB, leda till en ökad infektionskänslighet (Brouwer *et al.*, 1989).

Thymus – och mjältatrofi

Thymusatrofi är enligt flera studier ett kännetecken för TCDD-toxicitet hos flertalet arter (Kerkvliet, 1995; Beineke *et al.*, 2005; Yap *et al.*, 2012). Genom analys av kontaminantnivåer och detaljerade patologiska undersökningar på strandade respektive infångade valar från högkontaminerade områden respektive lågkontaminerade, visade det sig att thymus- och mjältatrofi hörde samman med ökande nivåer av PCB (Beineke *et al.*, 2005).

Yap *et al.* (2012) gjorde en studie för att undersöka sambandet mellan PCB och thymusatrofi och lade stor vikt vid att utesluta konfunderande faktorer såsom könsmognad, näringsstatus och kön. Han fann att könsmognad var signifikant associerat med thymusatrofi dvs. minskad thymusvävnad hos könsmogna djur. Storleken på thymusvävnad visade även ett positivt samband med näringsstatus och ett negativt samband med PCB. Efter att ha kontrollerat för konfunderande faktorer fann han att PCB inte längre var självständigt korrelerat med storleken på thymusvävnad. Han valde ut de djuren med totala PCB nivåer > 17 mg/kg fettvikt (tröskelvärde för allvarliga hälsoeffekter föreslaget av Kannan *et al.*, (2000)) och fann, som tidigare, att storleken på thymus hade ett negativt samband med PCB och ett positivt samband med näringsstatus. PCB var då även självständigt associerat med storleken på thymus efter att ha kontrollerat för konfunderande faktorer. Sammantaget fann Yap *et al.* (2012) att thymusatrofi var signifikant associerat med PCB hos djur med totala PCB nivåer på >17mg/kg fettvikt och konfunderades inte av andra studerade faktorer. Detta samband kunde inte påvisas efter kontroll av konfunderande faktorer hos djur med totala PCB nivåer på <17mg /kg fettvikt. Minst mängd thymusvävnad fanns även hos de djur som dött utav infektiösa sjukdomar och störst hos de som dött av fysiskt trauma, vilket stödjer hypotesen om att PCB orsakar immunosuppression och ökad mortalitet (Yap *et al.*, 2012).

Mekanismen för thymus- och mjältatrofi är inte helt utredd men som tidigare refererat så kan atrofi till följd av störningar i det endokrina systemet, framförallt thyroideahormoner, vara en orsak. Effekten på thymus kan även vara ett resultat av höga nivåer av Ah-receptorn då thymusatrofi och nedsatt thymusberoende immunitet verkar orsakas av bindning till Ah-receptorn (Vos *et al.*, 1997). Vos *et al.* (1997) påstod att höga nivåer av Ah-receptorn har hittats i epitelcellerna i thymus så effekten kan vara resultatet av interaktion med epitelceller som leder till att epitelcellerna inte kan ge stöd för utmognad och differentiering av T-celler.

DISKUSSION

Då man studerar effekterna av PCB på immunsystemet är det viktigt att tänka på att det finns konfunderande faktorer såsom ålder, näringsstatus, geografiskt läge och kön vilka också kan påverka lymfatisk vävnad och därmed resultatet av studien. Studier finns som tyder på ett samband mellan höga PCB-nivåer och dödsfall hos marina däggdjur till följd av infektioner. Det är dock oklart om detta samband är kausalt, dvs. om de höga PCB-nivåer som uppmätts hos djur som dött i epizootier verkligen har varit orsaken till dödsfallen. Det är även oklart om det finns andra faktorer som kan förklara de höga PCB-nivåerna.

Kön, ålder och geografiskt läge, dvs. var man har sin studiepopulation, är viktiga faktorer att ha i åtanke vid utformning av studier om effekterna av kontaminanter. Hos marina däggdjur har köns mogna honor ofta lägre nivåer av kontaminanter i kroppen än vuxna hannar, vilket är en effekt av att en stor del av kontaminanterna överförs till ungen via mjölken pga. dess höga fetthalt. Enligt en Tanabe *et al.* (1981) överförs ca 90 % av PCB-halten hos honan till ungen via laktation hos strimmiga delfiner. I många studier väljer man därför att ha enbart hannar i samma ålder för att få ett så bra resultat som möjligt. Geografiskt läge påverkar också kontaminantnivåerna. I havet är PCB-nivåerna högre på norra halvklotet och hos marina däggdjur är det även här man ser de högsta nivåerna (Tanabe, 1988).

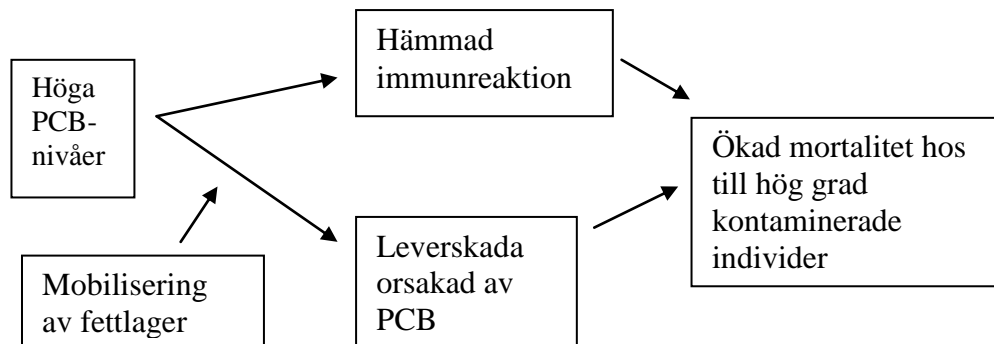
Benieke *et al.* (2005) kom fram till att atrofi av lymfatisk vävnad hade ett positivt samband med ökande PCB-nivåer, men samtidigt även med dålig hälsostatus och avmagring. Det är därför inte helt klart om atrofi av lymfoida organ är orsakat av PCB eller om det är sekundärt till sjukdom och avmagring. Avmagringen kan i sig leda till nedsatt immunförsvar pga. nedsatt funktion hos och förlust av T-celler. Samtidigt kan avmagringen vara ett resultat av de patologiska fynd man hittat (Benieke *et al.*, 2005). Avmagring kan även bidra till de höga PCB nivåerna associerade med tymusatrofi och nedsatt immunsvär genom att det leder till fettmobilisering, vilket ger ett minskat späcklager. Man har då funnit att kontaminanter koncentreras i späcket hos döda djur (Ross *et al.*, 1996; Benieke *et al.*, 2005). Hela sambandet, eller åtminstone en del av sambandet, mellan höga PCB-nivåer och ökad mottaglighet för infektion, vilket leder till ökad mortalitet, kan vara resultatet av förlust av fett pga. sjukdom, vilket har en koncentrerande effekt på PCB-nivåerna (Jepson *et al.*, 2005). Samtidigt kan en immunosuppression orsakad av PCB ligga i botten, vilket leder till infektion som leder till avmagring.

Immunosuppression orsakad av PCB kan vara en hypotes till sambandet mellan höga koncentrationer av PCB och de epizootier som drabbat marina däggdjur, men ytterligare hypoteser finns. Några togs upp av Aguilar & Borrell (1994). De fann PCB-koncentrationer i delfiner som dött under ett Morbillivirus-utbrott 1990-1991 i Medelhavet som var extremt höga. I samma studie hittades leverlesioner hos drabbade djur, vilket ledde till spekulationer om att dessa djur, under en period utan föda, mobiliserade fett som i sin tur ledde till ökande nivåer av PCB i blodet. När dessa nådde levern orsakade de en lesion, vilket försvårade

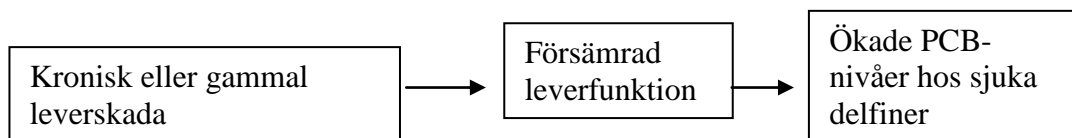
djurets förmåga att stå emot infektionen med Morbillivirus. Detta kan förklara den högre mortaliteten hos djur med höga PCB-nivåer (Aguilar & Borrell, 1994). De spekulerade även att leverlesionen kunde vara orsaken, vilket ledde till en sämre metabolism av PCB och då högre nivåer (Figur 2).

Ökade PCB-nivåer: orsak eller effekt?

Orsak:



Effekt:



Figur 2. Tänkbara mekanismer för att förklara sambandet mellan höga PCB-nivåer och mottaglighet för sjukdom hos strimmiga delfiner (modifierad från Aguilar & Borrell, (1994)).

Det finns dock studier som tyder på att om PCB-koncentrationen är över en viss nivå, så är den ensamt korrelerad till dödsfall orsakat av infektion. Jepson *et al.* (2005) kom fram till att endast dödsorsaken hade ett signifikant samband med PCB efter korregering för hälso- och näringsstatus. Sambandet mellan höga nivåer av PCB och dödsfall pga. infektion kunde alltså inte förklaras av en koncentrerande effekt på PCB till följd av avmagring.

Marina däggdjur har höga halter av PCB till följd av en lång livslängd och ackumulering genom näringskedjan, överföring via laktation samt en sämre förmåga till metabolism. Även om det enligt studier som gjorts inte är helt fastställt om ett kausalt samband finns mellan de höga nivåerna av PCB och ökad mortalitet, så kan de höga nivåerna ändå tyda på en potentiell immunotoxicitet. Kannan *et al.* (2000) kom fram till ett tröskelvärde för allvarliga hälsoeffekter inkluderat immunotoxicitet för alla marina däggdjur på 17 mg/kg fettvikt PCB i vävnader genom att studera toxicitetsstudier som gjorts på mink, säl och utter. I flera studier på marina däggdjur har man hittat koncentrationer av PCB som ligger över tröskelvärdet på 17 mg/kg fettvikt (Beineke *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 1988; Yap *et al.*, 2012). Hos dessa djur har man även sett ett signifikant samband mellan PCB-koncentrationen och effekter på immunparametrar. Yap *et al.* (2012) fann medelvärden hos hannar på 32,3 mg/kg fettvikt och studien visade på ett signifikant samband mellan PCB och tymusatrofi hos djur som låg över tröskelvärdet. Under tröskelvärdet fanns inte detta samband, vilket tyder på att PCB-

koncentrationer över 17 mg/kg fettvikt kan ha toxisk effekt på thymus. Jepson *et al.* (2005) fann ett medelvärde på 27,5 mg/kg fettvikt hos djur som dog av infektiös sjukdom och drog slutsatsen att tröskelvärdet på 17 mg/kg fettvikt ger en bra uppskattning om att sambandet mellan sjukdom och koncentrationen PCB är signifikant. Detta antagande stärks ytterligare av det faktum att hos djur som låg under tröskelvärdet fanns ingen skillnad i totala PCB nivåer mellan djuren som dog av infektiös sjukdom och de som dog av fysiskt trauma. Hos de djur som låg över tröskelvärdet var de totala PCB koncentrationerna signifikant än högre hos djuren som dog av infektiös sjukdom. Dessa studier talar för att tröskelvärdet skulle kunna användas som en riktlinje för om nivåer av PCB är troliga att ge en signifikant immunotoxisk effekt. Studierna är också gjorda med en exponering för kontaminanter i de nivåer de finns i djurens naturliga miljö, vilket tyder på att i de nivåer dessa kontaminanter finns i våra vatten idag, utgör de en hälsorisk för djuren som lever där.

Idag används en metod för riskbedömning för blandningar av HAHs som bygger på toxiska ekvivalensfaktorer (TEF) där TEF är toxiciteten av ett ämne relativt till TCDD (Van den Berg *et al.*, 1998). TEF kan användas för att beräkna toxiska ekvivalent (TEQ) koncentrationer (ng/g) som uttrycks som produkten av koncentration och TEF för varje individuell kongen i blandningen och speglar dess toxicitet. Enligt Van den Berg *et al.* (1998) måste vissa kriterier uppfyllas för att metoden ska kunna användas; ämnet måste vara strukturellt likt TCDD, binda till Ah-receptorn och även kunna starta ett Ah-receptor medierat svar. Denna riskbedömning kräver alltså att effekten är Ah-receptor medierad och ger därför inte en korrekt uppskattning av risken om effekten är Ah-receptor oberoende.

Studier har visat på att PCB påverkar olika immunparametrar via en mekanism som inte är förmedlad via Ah-receptorn (Levin *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2006). Levin *et al.* (2004 & 2005) studerade sambandet mellan fagocytos och PCB och kom fram till att endast plana PCB 169 och TCDD bidrog till TEQ. Blandningar med endast icke-plana PCB, dvs. med liten eller ingen affinitet för Ah-receptorn, fick ett TEQ-värde på 0 vilket inte tyder på någon toxicitet. Samtidigt var det dessa icke-plana PCB som hämmade fagocytos *in vitro* i dessa studier. Blandningar som enligt TEQ-värden var mest toxiska gav ingen effekt på fagocytos, medan de icke-toxiska blandningarna gav effekt. Detta tyder på att effekten på fagocytos är Ah-receptor oberoende. Även resultatet från en studie på sambandet mellan lymfocytproliferation och PCB gjord av Mori *et al.* (2006) tydde på att TEF metoden inte kunde förutsäga toxiciteten på T-cell proliferation hos marina däggdjur då endast icke-plana PCB gav en minskad proliferation, vilket tyder på att även denna immunotoxiska effekt kan vara Ah-receptor oberoende. Effekter som orsakas av icke-plana PCB kommer inte med i riskbedömningen och dessa effekter underskattas.

Utöver det faktum att vissa immunotoxiska effekter hos marina däggdjur kanske inte kommer med i riskbedömningen, är TEF värden som används för uppskattning av toxiciteten för HAH-blandningar framförallt baserade på studier på råttor (Ross *et al.*, 1996). Dessa kan ge en indikation på toxicitet, men art-specifika skillnader när det gäller metabolism och avgiftning av främmande ämnen måste beaktas vid extrapolering av data från andra djur till marina däggdjur. Exempel som tyder på att marina däggdjur kan vara känsligare än råttor är

studien av Ross *et al.* (1997) där råttor matades med fisk från samma områden som Swart *et al.* (1994) använde i sin studie på knobbsäl. Swart *et al.* (1994) fann att flera immunologiska parametrar hämmades av PCB hos knobbsäl, medan det i studien av Ross *et al.* (1997) inte sågs några skillnader i immunparametrar hos vuxna råttor. Detta kan tyda på att säl är känsligare än råttor för immunotoxicitet orsakad av PCB (Ross *et al.*, 1996). Ross *et al.* (1997) visade även att immunotoxiska effekter av PCB verkar vara åldersrelaterat då perinatalt exponerade råttor var känsligare än de som exponerades i vuxen ålder. De allvarliga effekterna av perinatal exponering kan ha att göra med effekten på thymus då thymus är viktig för utveckling utav T-celler och thymus är mer aktiv hos unga djur (Kerkvliet, 1995). För extrapolering måste man ta hänsyn till både art och åldersrelaterad känslighet. Detta gör att man kan tänka sig att fritt levande marina däggdjur som exponeras perinatalt, får i sig höga halter av kontaminanter via modersmjölken, samt lever länge vilket leder till en hög ackumulering av lipofila kontaminanter, är känsligare än vissa studiepopulationer för de immunotoxiska effekterna av PCB (Ross *et al.*, 1996). Den sämre förmågan för små *Cetaceans* att metabolisera PCB som leder till en större ansamling av vissa toxiska PCB-komponenter kan även göra dessa djur mer mottagliga för toxiska långtidseffekter än andra djurslag.

Efter att ha tittat på studier gjorda på både labbdjur och marina däggdjur kan man se ett samband mellan PCB, nedsatt immunfunktion och mortalitet. Detta tyder på att kontaminanter som PCB kan vara en bidragande orsak till de senaste årtiondenas epizootier som drabbat marina däggdjur. Det är en utmaning att utföra studier på marina däggdjur, speciellt frilevande, och därför är forskningen inom området bristfälligt. Mer studier krävs för att fastställa kausalitet mellan PCB och ökad mortalitet, samt för att undersöka känsligheten hos dessa arter för de höga nivåer av kontaminanter de utsätts för. Ett annat intressant forskningsområde är riskbedömning. TEQ-modellen som används för riskbedömning idag kräver bindning till Ah- receptorn för att korrekt uppskatta toxiciteten för en blandning av HAHs. Detta gör att effekter som är oberoende av binding till Ah-receptorn inte kommer med i riskbedömningen och därför är kanske inte TEQ-modellen lämpligast för att beräkna toxicitet för alla blandningar.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aguilar, A., Borrel, A. (1994). Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella-coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *The Science of the Total Environment*, vol. 154, ss. 237-247.
- Ballschmiter, K., Rappe, C., Buser, H. R. (1989). Chemical properties, analytical methods and environmental levels of PBCs, PCTs, PCNs and PBBs. I: Kimbrough R.D. & Jensen A.A. (red), *Halogenated biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related products*. 2nd edition. Amsterdam. Elsevier Science Publishers B.V, ss 47-67.
- Beineke, A., Siebert, U., McLachlan, M., Bruhn, R., Thron, K., Failing, K., Muller, G., Baumgartner, W. (2005). Investigations of the potential influence of environmental contaminants on the thymus and spleen of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Environmental Science & Technology*, vol. 39, ss. 3933- 3938.
- Brouwer, A., Morse, D. C., Lans, M. C., Gerlience Scuur, A., Murk, A. J., Klasson-Wehler, E., Bergman, Å., Visser, T. J. (1998). Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and Industrial Health*, vol. 14, ss. 59-84.
- Brouwer A., Reijnders P. J. H., Koeman J.H. (1989). Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin a and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*), *Aquatic Toxicology*, vol. 15, ss. 99-105.
- Brouwer, A., Vandenberg, K. J., Blaner, W. S., Goodman, D. S. (1986). Transthyretin (prealbumin) binding of PCBs, a model for the mechanism of interference with vitamin A and thyroid-hormone metabolism. *Chemosphere*, vol. 15, ss. 1699-1706.
- Butina, T. V., Denikina, N. N., Belikov, S. I. (2010). Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) population. *Veterinary Microbiology*, vol. 144, ss. 192-197.
- De Voogt, P., Th. Brinkman, U.A. (1989). Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. I: Kimbrough R.D. & Jensen A.A. (red), *Halogenated biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related products*. 2nd edition. Amsterdam. Elsevier Science Publishers B.V, ss. 3-30.
- Debier, C., Ylitalo, G. M., Weise, M., Gulland, F., Costa, D. P., Le Boeuf, B. J., de Tillesse, T., Larondelle, Y. (2005). PCBs and DDT in the serum of juvenile California sea lions: associations with vitamins A and E and thyroid hormones. *Environmental Pollution*, vol. 134, ss. 323-332.
- Fabris, N. (1973). Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 15, ss. 601-611.
- Fournier, M., Degas, V., Colborn, T., Omara, F. O., Denizeau, F., Potworowski, E. F., Brousseau, P. (2000). Immunosuppression in mice fed on diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence Estuary and the Arctic populations. *Toxicology Letters*, vol. 112, ss. 311-317.
- Jyonouchi, H.M.D. (2013-06-13). *Delayed-type Hypersensitivity*. <http://emedicine.medscape.com/article/886393-overview> (2014-03-21)
- Imanishi, J. H., Nomura, M., Matsubara, M., Kita, S., Won, T., Mizutani, Kishida, T. (1980). Effect of polychlorinated biphenyl on viral infections in mice. *Infection and Immunity*, vol. 29, ss. 275-277.
- Jepson, P. D., Bennett, P. M., Deaville, R., Allchin, C. R., Baker, J. R., Law, R. J. (2005). Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, ss. 238-248.

- Kannan, K., Blakenship, A.L., Jones, P.D., Giesy, J.P. (2000). Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 6, ss. 181-201.
- Kerkvliet, N. I. (1995). Immunological Effects of Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins. *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, ss. 47-53.
- Lahvis, G.P., Wells, R.S., Kuehl, D. W., Stewart, J. L., Rhinehart, H. L., Via, C. S. (1995). Decreased Lymphocyte Responses in Free-ranging Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Are Associated with Increased Concentrations of PCBs and DDT in Peripheral Blood. *Environmental Health Perspectives*, vol. 103, ss. 67-72.
- Levin, M., Morsey, B., Mori, C., De Guise, S. (2004). Specific non-coplanar PCB-mediated modulation of bottlenose dolphin and beluga whale phagocytosis upon in vitro exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, vol. 67, ss. 1517- 1535.
- Levin, M., Morsey, B., Mori, C., De Guise, S., Nambiar, P. R. (2005). Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: A new mechanism for immunotoxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, vol. 68, ss. 1977-1993.
- Livsmedelverket (2014-01-28). Dioxiner och PCB. <http://www.slv.se/sv/grupp1/Risker-med-mat/Kemiska-amnen/Dioxiner-och-PCB/Dioxiner-och-PCB/> (2014-03-03)
- Mori, C., Morse, B., Levin, M., Nambiar, P. R., De Guise, S. (2006). Immunomodulatory Effects of in Vitro Exposure to Organochlorines on T-Cell Proliferation in Marine Mammals and Mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 69, ss. 283-302.
- Ross, A. C. (1992). Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Experimental Biology and Medicine*, vol. 200, ss. 303-320.
- Ross, P. S., Swart, R. L., Reijnders, P. J. H., van Loveren, H., Vos, J. G., Osterhaus, A. D. M. E. (1995). Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 103, nr. 2, ss. 162-167.
- Ross, P., Swart, R. L., Addison, R., van Loveren, H., Vos, J., Osterhaus, A. (1996). Contaminant-induced immunotoxicity in harbor seals: wildlife at risk? *Toxicology*, vol. 112, ss. 157-169.
- Ross, P. S., Swart, R. L., van der Vliet, H., Willemsen, L., de Klerk, A., van Amerongen, G., Groen, J., Brouwer, A., Schipholt, I., Morse, D. C., van Loveren H., Osterhaus, A. D. M. E., Vos, J. G. (1997). Impaired cellular immune response in rats exposed perinatally to Baltic Sea herring oil or 2,3,7,8-TCDD. *Archives of Toxicology*, vol. 71, ss. 563-574.
- Scott, G.P., Burn, D.M., Hansen, L.J. (1988). The dolphin dieoff: longterm effects and recovery of the population. *Proceedings of the Oceans 88 Conference*, vol. 3, ss. 819-823.
- Schwacke, Lori H. Zolman, Eric S. Balmer, Brian C. De Guise, Sylvain George, R. Clay. Hoguet, Jennifer. Hohn, Aleta A. Kucklick, John R. Lamb, Steve Levin, Milton Litz, Jenny A. McFee, Wayne E. Place, Ned J. Townsend, Forrest I. Wells, Randall S. Rowles, Teresa K. (2011). Anaemia, hypothyroidism and immune suppression associated with polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, vol. 279, ss. 48-57.
- Swart, R. L., Ross, P. S., Vedder, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S., van Loveren, H., Vos, J. G., Reijnders, P. J. H., Osterhaus, A. D. M. E. (1994). Impairment of immune function in harbor seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. *Ambio*, vol. 23, nr. 2, ss. 155-159.

- Tanabe S. (1988). PCB Problems in the future: Foresight from Current Knowledge. *Environmental Pollution*, vol. 50, ss. 5-28.
- Tanabe, S., Tatsukawa, R., Tanaka, H., Maruyama, K., Miyazaki, N., Fujiyama, T. (1981). Distribution and total burdens of chlorinated hydrocarbons in bodies of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 45, ss. 2569-2578.
- Tanabe, S., Tanaka, H., Tatsukawa, M. (1984). Polychlorobiphenyls, Σ DDT, and Hexachlorocyclohexane Isomers in the Western North Pacific Ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 13, ss. 731-738.
- Tanabe, S., Watanabe, S., Kan, H. (1988). Capacity and mode of PCB metabolism in small cetaceans. *Marine Mammal Science*, vol. 4, ss. 103-124.
- Van Oss, C. J. (1986). Phagocytosis: an overview. *Methods in Enzymology*, vol. 132, ss. 3-15.
- Van den Ber, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 106, nr. 12, ss. 775-792.
- Van Loveren, H., Ross, P. S., Osterhaus, A. D. M. E., Vos, J. G. (2000). Contaminant-induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicology Letters*, vol. 112, ss. 319-324.
- Vos, J. G., De Heer, C., Van Loveren, H. (1997). Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, vol. 17, ss. 275-284.
- Whitlock, J. P. (1987). The regulation of gene expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Pharmacological Reviews*, vol. 39, no. 2, ss. 147-161.
- Yap, X., Deaville, R., Perkins, M. W., Penrose, R. Law, R. J. Jepson, P. D. (2012). Investigating links between polychlorinated biphenyl (PCB) exposure and thymic involution and thymic cysts in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). *Marine Pollution Bulletin*, vol. 64, ss. 2168-2176.

