



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp
Fakultet for Landskap og Samfunn

Arsen via morsmelk og diversitet i spedbarnets tarmflora

Ida Valstad

Master i Folkehelsevitenskap

Forord

Dette er en masteroppgave ved fakultetet for landskap og samfunn ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås. Oppgaven tar for seg sammenhengen mellom arsenkonsentrasjon i morsmelk og biodiversitet i tarmflora hos spedbarn ved 30 dagers alder. Jeg ble introdusert for betydning av ernæring etter et studieopphold blandt epilepsisyke barn som fikk effektiv anfallskontroll- og behandling med ketogen diett tidlig i mitt studieløp som bachelorstudent. Siden har nysgjerrigheten rundt kosthold og ernæring videre seg utviklet seg til å favne hvordan spesifikke næringsstoffer kan gi ulike helsekonsekvenser. Særlig har helsekonsekvenser vedrørende tarmflora fanget min interesse i takt med økende popularitet og fokus på tarmfloraens betydning for god vertshelse i samfunnet for øvrig. Drivkraften i mitt arbeid med denne oppgaven har vært å undersøke hvordan et stoff nordmenn hyppig eksponeres for har betydning for de mest sårbare i samfunnet, nemlig spedbarn og hvordan det videre vil påvirke folkehelsen på kort- og lang sikt. Spesielt interessant har det vært å gjøre denne studien mens jeg selv har vært gravid og ventet mitt andre barn.

En stor takk går til Marte Kjøllestad ved NMBU som har vært min hovedveileder under oppgaveprosessen. Marte stilte opp på kort varsel og har gitt god veiledning og motivasjon til arbeidet. Takk for din tålmodighet og veiledning i skriveprosessen En takk går også til biveileder Geir Aamodt ved NMBU, takk for hjelp til statistikk og alltid godt humør. En takk går også selvfølgelig til Merete Eggesbø ved Folkehelseinstituttet som har gjort det slik at denne studien kunne gjennomføres. Sist men ikke minst, takk til min samboer og kjæreste - Adrian Barone som har hjulpet meg med masterarbeidet ved å tilrettelegge for oppgaveskriving hjemme med små barn, jobb, graviditet, corona-hverdag og hverdagslogistikk.

Sammendrag

Formål: Studien har følgende problemstilling; *Er det sammenheng mellom eksponering for arsen via morsmelk og mangfold i norske spedbarns tarmflora?* Problemstillingen er en relevant del av det norske folkehelsearbeidet da høy biodiversitet i tarmflora er knyttet til god helse og å vite hva som kan påvirke denne er relevant. Nordmenn eksponeres ofte for arsenforurenset mat gjennom et kosthold med mye fisk og sjømat, derfor er det viktig å undersøke de mulige konsekvensene mors arseninnhold i morsmelk har på spedbarns biodiversitet i tarmflora. Dette er en artikkelbasert masteroppgave, hvor artikkelen har fått navnet “Arsen via morsmelk og diversitet i spedbarns tarmflora” og skal utgis i Tidsskriftet den norske Legeforeningen.

Metode: Studien anvender data fra en den prospektiv kohorten, NoMIC (Norwegian Microbiota cohort) ledet av Merete Eggesbø fra Folkehelseinstituttet. Vi undersøker sammenhengen mellom totalarsen (tAs) i morsmelk og biodiversitet i tarmflora på n=99 mor-barn-par. Mødrene i studien ble rekruttert ved Sykehuset i Østfold (2002-2005). For å svare på problemstillingen er det gjort lineær regresjonsanalyse, hvor den uavhengige variabelen er diversitet i tarmflora (Shannon H), den avhengige variabelen er tAs-konsentrasjon i morsmelk oppgitt som µg/kg. For å besvare problemstillingen har vi også inkludert potensielle confoundere fordi disse variablene på ulike måter er assosiert med både eksponering (arsen) og den avhengige variabelen (biodiversitet).

Resultat: I en lineær regresjonsmodell var ikke arsen assosiert med Shannon index, og heller ikke når det var justert for variabler og potensielle counfoudere.

Konklusjon: Vi fant ingen sammenheng med arsenkonsentrasjon i morsmelk og biodiversitet i tarmflora ved 30-dagers alder. En grunn til at vi ikke fant noen sammenheng kan være at konsentrasjonene av tAs i morsmelk var relativt lave, majoriteten av tAs i morsmelk hovedsaklig av de mindre farlige og organiske arsenforbindelsene fra fisk og sjømat og vi har kun sett på avføringsprøver fra ett tidspunkt i spedbarns liv - en periode hvor mikrobiomet fortsatt er veldig umodent. Selv om denne studien ikke kunne vise til en signifikant sammenheng arsen i morsmelk og biodiversitet i spedbarn vil fremtidige, mer grundige studier om arsens innflytelse på tarmmikrobiomet være viktige, særlig med tanke på nordmenns hyppige eksponering for arsen. Denne studien gir ingen indikasjon på at gjeldende råd om amming bør endres.

Innholdsfortegnelse

Forod

Sammendrag

2.0 Teori	5
2.1 Tarmflora	5
2.1.1 Etablering av tarmflora	5
2.1.2 Biodiversitet i tarmflora	6
2.2 Morsmelk	7
2.2.1 Helsekonsekvenser av amming	7
2.3 Arsen	8
2.3.1 Arseneksponering & mulige helsekonsekvenser	9
2.3.2 Tidligere forskning på arsen i morsmelk	9
2.3.3 Tidligere forskning på arsenisk påvirkning av tarmflora	10
3.0 Metode og materialer	11
3.1 NoMIC	12
3.3 Avhengig variabel	13
3.4 Uavhengig variabel	14
3.5 Potensielle Confoundere	15
2.6 Statistiske analyser	16
3.7 Etikk	16
4.0 Resultater	17
4.1 Oppsummering av hovedfunn	17
4.2 Tilleggsresultater	17
4.2.1 Shannon (H) ved 30 dager og arsenkonsentrasjon i morsmelk mot ulike forklaringsvariabler og confoundere	17
5.0 Diskusjon	19
5.1 Diskusjon av funn	19
5.3 Metodologiske betraktninger	24
5.4 Reliabilitet & validitet	25
6.0 Konklusjon og fremtidige perspektiver	26
Litteraturliste	27

Ord kappe: 7325

Ord artikkel: 4130

Forkortelser & ordforklaringer

WHO - Verdens Helseorganisasjon

FHI - Folkehelseinstituttet

B - Betakoeffesient

SD - Standard derivation

KI 95% - Konfidensintervall 95% lavt/høyt

BMI - Body mass index /Kroppsmasseindeks

NoMIC - Norwegian Microbiota cohort

As - Arsen

tAS - Total arsen

iAs - Uorganisk Arsen

OrgAs - Organisk Arsen

AB - Arsenobetain

AsL - Arsenolipider

Miljøgifter - miljøgifter er stoffer som kan utøve en trussel mot helse eller miljø.

Eksponeringskildene er mange, men mat og kosthold er den vanligste kilden. Det finnes tusenvis av miljøgifter. Miljøgifter hoper seg oppover i næringskjeden og akkumuleres ofte i kroppen på grunn av lang halveringstid. Fostre og barn er mer utsatt for helseskader av miljøgifter enn voksne (Caspersen, Knutsen, Brantsaeter, Haugen, Alexander & Meltzer, 2013).

1.0 Innledning

I 2007 startet det omfattende amerikanske forskningsprosjektet “Human Microbiome Project” (HMP) opp med mål om å kartlegge menneskelige mikrobiom fra fem ulike steder på kroppen og mikrobiomets betydning for humanhelsen. Prosjektet studerte blant annet det mikrobielle økosystemet i tarmen. Året etter startet et tilsvarende forskningsprosjekt opp i Europa; European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) som utelukkende studerte tarmens mikrobiom med mål om å katalogisere tilstedeværende gener og genomer i tarmens mikrobiom, samt lage et bioinformatisk verktøy som syntetiserer innsamlet informasjon og dermed sammenhenger mellom tarmmikrobiomet og vertshelse (Gut Microbiota for Health, 2012). Siden har det dukket opp mange andre forskningsprosjektet med samme målsetning. I Norge har vi tilsvarende pågående forskningsprosjekt, Norwegian Microbiome Cohort (NoMIC) - som startet i 2002 (Dahl, Stigum, Iszatt, Lenters, Peddada, Bjørnholt, Midtvedt, Mandal & Eggesbø, 2018).

Gjennom ovennevnte studier har det har vært stor suksess med å karakterisere mikrobiomets struktur og funksjonell interaksjon mellom mikrobiomet og dens vert. Flere studier har kunne knytte assosiasjoner mellom mikrobiomets funksjon med tilstedeværelse eller fravær av bakteriearter- og slekter, mot en eller flere spesifikke helseutfall, som menneskelig homeostase og sykdomspatogenese (Shreiner, Kao & Young, 2015). Tarmens økosystem har en betydelig rolle for det å opprettholde helse, fremme sykdomsprosesser (Kriss, Hazleton, Nusbacher, Martin & Lozuponed, 2018), utdanne immunforsvaret, fordøye mat, samt syntetisere vitaminer og aminosyrer. I tillegg har man sett en sammenheng mellom økt prevalens av langvarige og psykiske sykdommer i det moderne vestlige samfunnet, med endringer i mikrobiomet (Gut Microbiota for Health, 2012). Tarmflora har altså vist seg å være en kritisk determinant for å opprettholde god vertshelse (Shin, Whon & Bae, 2015).

Tema for denne oppgaven er arsen og diversitet i tarmflora. Studiens formål er å undersøke om det er korrelasjon mellom eksponering for total arsen (tAs) via morsmelk, og nyfødtes diversitet i tarmflora ved 30 dagers alder. Arsen er en miljøgift som potensielt kan skade mange organer, særlig uheldig er det med eksponering for barn i vekst og utvikling (Carignan, Karagas, Punshon, Gilbert-Diamond & Cottingham, 2015). I Norge skjer hovedeksponeringen for arsen gjennom konsumering av arsenforurenset fisk og sjømat (Molin, 2017). I en rapport fra European Food

Safety Authority (herved forkortet EFSA)(2009) kom det frem at nordmenn var det folkeslaget i Europa som fikk i seg høyest konsentrasjoner av arsen via kosten, mye på grunn av en diett med stort fiskeinntak. Studien er derfor relevant for bidrag til økt kunnskap om den norske folkehelsen og oppgaven har derfor fått følgende forskningsspørsmål:

“Er det sammenheng mellom eksponering for arsen via morsmelk og mangfold i norske spedbarns tarmflora?”

Masteroppgaven skrives i artikkelform og skal publiseres i *Tidsskriftet den norske Legeforening* i samarbeid med veiledere fra Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet og Folkehelseinstituttet. Kappen oppsummerer i første del generell teori om tarmflora, morsmelk og arsen. Deretter presenteres metoder, materiale og resultater, og avsluttes med en diskusjons- og konklusjonsdel.

2.0 Teori

2.1 Tarmflora

I menneskekroppen finnes det et stort kvantum av bakterier på kroppens ytre og indre overflater. Den kvantitative dominansen finnes i mage-tarmkanalen hvor det bor flere bakterier i tarmen enn det finnes celler i kroppen (Sender, Fuchs & Milo, 2016). I tarmfloraen finnes det et stort økosystem (mikrobiom) av bakterier, virus, sopp, eukaryoter og archaea (Coryell, Roggenbeck & Walk, 2019). Mikrobiomet i tarmen har gjennom tusenvis av år utviklet et intrikat symbiotisk nytteforhold med verten (Thursby & Juge, 2017).

2.1.1 Etablering av tarmflora

Den første utviklingen og etablering av det vi kjenner som tarmflora skjer under og etter fødsel (Thursby & Juge, 2017). Fosteret lever et tilnærmet bakteriefritt miljø i livmoren og spedbarnets sterile tarm koloniseres med de bakteriene spedbarnet først eksponeres for. Hos vaginalt fødte spedbarn finner man bakterier som ligner mors vaginale bakterier (hovedsakelig lactobacillus) og

hos barn forløst med keisersnitt mors hudbakterier (ofte stafylococcus) (Dominguez-Bello, Costello, Contreras, Margis, Hidalgo, Fierer & Knight, 2010).

Deretter er det to store overganger i barnets første leveår som er vesentlig for kolonisering av tarmen; konsumering av morsmelk og/eller morsmelkerstatning og overgang til fast føde.

Morsmelk og/eller morsmelkerstatning resulterer ofte i dannelse av Bifidobakterier. Når barnet begynner med fast føde resulterer det ofte i et komplekst mikrobiom dominert av Bacteroidetes og Firmicutes. Barnets tarmflora er dynamisk frem til barnet er rundt tre år, og vil være nokså stabilt videre inn i voksen alder (Tanaka & Nakayama, 2017).

Etter tre års alder vil hovedgruppene av bakterier være ganske uendret men sammensetning, balanse mellom arter og slekter, samt biodiversitet kan påvirkes av ulike miljøfaktorer (inkludert fødselsmetode; keisersnitt versus vaginal forløsning), antibiotikabruk og kosthold. Kosthold regnes som den viktigste driveren for å forme mikrobiomet (Thursby & Juge, 2017).

2.1.2 Biodiversitet i tarmflora

Biodiversitet/mikrobiotamangfold er summen på hvor mange ulike arter det finnes i tarmens økosystem, samt (avhengig av mangfoldsindeksene) hvor jevnt fordelt artene er i økosystemet (Valdes, Walter, Segal & Spector, 2018). Det mikrobielle mangfoldet i tarmen er et resultat av koevolusjon mellom mikrobielle samfunn og verter, samt miljøfaktorer som stadig påvirker det bakterielle økosystemet. Bakteriemangfoldet er ikke homogent fordelt i de ulike delene i tarmen, og størstedelen av bakteriesammensetningen finnes i tykktarmen (Scnipa & Conte, 2014).

Tarmens mikrobiom fungerer som en barriere for patogener og utøver svært viktige metabolske funksjoner som opprettholder kroppens immunhomeostase. Tarmmikrobiell ubalanse kalles dysbiose. Ved dysbiose er ugunstige bakterier overrepresentert og det er lav bakteriediversitet. Dysbiose med lav diversitet kan være drevet av mange faktorer som avviker etter sykdomssammenheng. Kjente bidragsyttere til dysbiose med lite mangfold er bredspektret antibiotika, høy alder og vertsgenetikk (Kriss, et al., 2018).

Den dysbiotiske tarmen er forbundet til mange ulike sykdommer inkludert autoimmune og autoinflammatoriske forstyrrelser (som irritabel tarmsyndrom), videre utvikling av eksisterende kronisk leversykdom (levercirrhose) (Kriss, et al., 2018), allergier, nevrologiske lidelser og metabolske forstyrrelser (som fedme, diabetes type 2) (Schnippa & Conte, 2014). Særlig har man sett sammenheng mellom dysbiose og fedme. Dyrestudier viser at bakteriefrie slanke mus som mottar fekale mikrober fra overvektige mennesker får høyere vekt enn mus som mottar mikrober fra normalt slanke mennesker når begge grupper går på en diett med samme kaloriinntak. Samme tendens har man sett i humane tvillingstudier (Valdes, et al., 2018).

2.2 Morsmelk

Morsmelk er individtilpasset og spesialisert ernæring som inneholder aktive biologiske komponenter, blant annet humane oligosakkarider, mRNA, miRNA, vekstfaktorer, proteiner og hormoner. Ovennevnte komponenter er særlig viktig for utvikling av immunsystem, tarmslimhinne og sammensetning av biodiversitet i tarmen, især de humane oligosakkaridene (også kjent som prebiotika) (Le Doare, Holder, Bassett & Pannaraj, 2018). Morsmelk overfører i tillegg elementer av mors eget mikrobiom og immunresponser, slik at spedbarnet får spesifikk prebiotika som vekstgrunnlag til fordelaktige bakterier til eget mikrobiom og utvikling av immunapparatet. Morsmelkerstatning inneholder varierende aktive komponenter, avhengig av produsent og kvalitet. Verdens helseorganisasjon anbefaler at barn blir ernært på morsmelk fremfor erstatning dersom det er mulig (Victora, Bahl, Barros, França, Horton, Krasevec, Murch, Sankar, Walker & Rollins, 2016).

2.2.1 Helsekonsekvenser av amming

Amming gir kort- og langvarige positive helsekonsekvenser for både mor og barn. For mor vil amming virke forebyggende for brystkreft, samt redusere risiko for diabetes og eggstokkreft (Victora, et al., 2016). Amming er dessuten et mer miljøvennlig og billigere alternativ enn morsmelkerstatning, samt et tryggere alternativ for mødre i utviklingsland uten tilgang på rent vann til bruk i morsmelkerstatning og sterilisering av utstyr (Burbidge & Williams, 2020). For barnet vil de kortsiktige helsekonsekvensene for amming være beskyttelse mot en rekke respiratoriske- og gastrointestinale infeksjonssykdommer, otitis media, samt redusere plutselig spedbarnsdødsfall i høy- og lavinntektsland. De langsiktige helsekonsekvensene innebærer en

beskyttelse for utvikling av overvekt, fedme og diabetes. Amming har også vist assosiasjon med en liten økning i intelligenskvotient (Victora, et al., 2016).

Morsmelk gir ikke utelukkende positive helsekonsekvenser. Langvarig diing kan på kort sikt gi tannrøte og karies i barnets melketenner (Victora, et al, 2016). I tillegg til at mor kan overføre mange av sine akkumulerte miljøgifter over til spedbarnet via morsmelk. Miljøgifter lagres i fettvev, og for å produsere morsmelk mobiliseres fettlagre som frigjør blant annet giftene som er lagret der (Mead, 2008).

Helsekonsekvensene for spedbarns eksponering av miljøgifter og tungmetaller i morsmelk er ikke tilstrekkelig kartlagt og det er mye pågående forskning på feltet. Kort oppsummert kan forurenset morsmelk med blant annet tungmetaller gi endringer i immunsystemets strukturer, forstyrre homeostase og påvirke spesifikke kroppsorganer og systemer direkte (Pajewska-Szmyt, Sinkiewicz-Darol & Gadzala-Kopciuch, 2019).

2.3 Arsen

Arsen er et metalloid med symbol As og atomnummer 33. Det er et halvmetall, men på grunn av sin tetthet regnes det som et tungmetall i miljøsammenheng. Stoffet er et naturlig grunnstoff som er allestedsnærværende i naturen. Særlig er det å finne i lave konsentrasjoner i jordskorpa, grunnvann og enkelte bergarter. Det finnes ulike arsenforbindelser, grovt fordelt; organisk og uorganisk med flere undergrupper og oksidasjonstrinn (Frumkin, 2016). I uorganisk (iAs) form finnes arsen som AsIII og AsV. I organiske former finnes arsen som monometylarsenisk (MMA), dimetylarsen (DMA), arsenobetain og arsenolipider (Pajewska-Szmyt, et al., 2019).

Uorganiske former for arsen er vannløselige, derfra spres det videre i omliggende jordområder og hopper seg opp i mat som ris og korn. I det marine miljø finnes arsen primært i organiske former, men noe iAs er å spore i relativt lave konsentrasjoner i fisk og sjømat (Carignan, et al., 2015). I mange land inneholder drikkevannet store mengder iAs. Derfor har WHO satt en grenseverdi for hva som er forsvarlig arsennivå i drikkevann på 10 µg/L (World Health Organization, 2018). Samtlige arsenforbindelser reguleres gjennom flere EU-regelverk og direktiv. Norge har felles kjemikalierregelverk med EU. Arsen og arsenforbindelser står derfor på

den norske prioritetslista over miljøgifter og stoffer med særlig grunn til bekymring (Miljødirektoratet, 2021). I Norge skjer hovedeksponeringen for arsen via kosten og særlig ved konsumering av fisk og sjømat. Det er ikke satt grenseverdier for inntak av fisk og sjømat på bakgrunn av arseninnhold for verken voksne eller barn. Men det er satt etablerte generelle grenseverdier (0,3 mg/kg for barn) for uorganisk arsen i Norge, og ifølge matloven (Matloven, 2003) er det ikke lov til å omsette utrygg mat. Mattilsynet gjorde i 2016 en risikovurdering, og siden da har det vært gjeldende nasjonale kostholdsråd med anbefalinger om å ikke gi riskaker til små barn, på grunn av risens innhold av iAs (Mattilsynet, 2016).

2.3.1 Arseneksponering & mulige helsekonsekvenser

Arsen absorberes raskt av fordøyelseskanalen. AsIII og AsV oksideres og metyleres, til mindre giftige produkter som DMA og MMA. Underveis i metabolismeringen kan imidlertid reaktive mellomprodukter som MMAIII og DMAIII oppstå, noe som kan ha genotoksiske effekter (Pajewska-Szmyt, et al., 2019). Arsen og dens metabolitter distribueres til alle kroppens organer og akkumuleres i keratin- og lipidrike områder. Videre metyleres arsen i leveren før den går over til det systemiske kretsløpet. Dyrestudier (Kenyon, Razo & Hughes, 2005) på mus (n=5) har vist forholdsvis rask eliminering av arsen, med en gjennomsnittlig halveringstid på ± 44 timer. Arsen kan gi mange ulike helsekonsekvenser. iAs er et svært giftig i høye konsentrasjoner og er et potent carcinogen som kan forårsake hudlesjoner og hjerte- og karsykdommer ved eksponering for lavere eksponering over lengre tid (Carignan, et al., 2015). Ved kronisk eksponering kan det føre økt risiko for utvikling av diabetes-type-2, samt luftveis- og diaréinfeksjoner hos barn (Dong, Shulzhenko, Lemaitre, Greer, Peremyslova, Quamruzzaman, Rahman, Hasan, Joya, Golam, Christiani, Morgun & Kile, 2017). Eksponering for arsen under graviditet er assosiert med prenatal veksthemming, svekkelse av kognitive funksjoner hos barnet og i ekstreme tilfeller - fosterdød (Carignan, et al., 2015). OrgAs har mindre negative helsekonsekvenser, men studier (Molin, 2017) har vist at OrgAs kan ha cytotoksiske effekter på dyrkede humane blære- og leverceller.

Arsen har også noen positive helsekonsekvenser ved at det for eksempel virker antimikrobielt og var hyppig brukt som behandlingsmetode for smittsomme sykdommer (som syfilis) i før-antibiotika-tider (Dong, et al., 2017).

2.3.2 Tidligere forskning på arsen i morsmelk

Arsen kan overføres transplacentalt og deretter gjennom blod-hjerne-barrieren prenatalt. På grunn av arsens bioakkumulerende egenskaper kan det også gå over i morsmelk, noe som utgjør en potensiell risiko for foster og nyfødte (Mead, 2008)(Pajewska-Szmyt, et al., 2019). Barn har høyere arseneksponering i kosthold enn voksne på grunn av deres mer begrensede dietter og større inntak per kroppsmasseenhet (Carignan et al., 2015). Tilstedeværelse av potensielt nevrotoksisk arsen er problematisk for spedbarn, fordi nyfødthjernen er spesielt følsom for toksiner under utvikling av hjerne- og nervesystem (Xiong, Stiboller, Glabonjat, Rieger, Paton & Francesconi, 2020). Arsen kan i tillegg føre til forstyrrelser i produksjon av cytokiner - en viktig immunmodulator som i sin tur kan føre til allergier, forstyrrelser i det endokrine systemet og nevrokognitiv utvikling (Pajewska-Szmyt, et al., 2019).

En metaanalyse (Pajewska-Szmyt, et al., 2019) så på studier fra åtte (Tyskland, Japan, Sverige, Bangladesh, Chile, Taiwan, Libanon og Kypros) land hvor det hadde blitt foretatt analyser av morsmelk, alle med funn av arsen. Dog viste studiene at kvinnene hadde lave konsentrasjoner av arsen. En studie (Stiboller, Raber, Gjengedal, Eggesbø & Francesconi, 2017) på norske kvinner viste at arsen også var tilstede i melk hos ammende mødre, særlig interessant var funn av arsenlipider i melk. Studieforfatterne mente at dette funnet trolig hadde sammenheng med at fisk utgjør en vesentlig del av det norske kostholdet. Samme funn gjorde en svensk studie (Björklund, Vahter, Palm, Grandér, Lignell & Berglund, 2012) som i tillegg kunne vise til en sammenheng mellom fiskeinntak og funn av arsen (da særlig arsenlipider) i morsmelk. En studie fra 2020 (Xiong, et al.) overvåket og analyserte morsmelk hos én ammende kvinne etter inntak av en 300 grams norsk laksefilet (2,63 mg/kg arsen) i løpet av en tre dagers periode. Allerede fire timer etter fiskemåltidet hadde tAs i melken økt fra utgangspunktetsverdi: 0,1 µg/kg før måltidet til 0,57 µg/kg, peaket ved åtte timer etter måltidet med en verdi på 1,72 µg/kg for deretter å synke ned til 0,2 µg/kg etter tre dager (Xiong, et al., 2020).

Barn som får morsmelkerstatning får også i seg arsen, fra selve erstatningen og i noen land også via vannet som må tilsettes pulveret (Carignan, et al., 2015).

2.3.3 Tidligere forskning på arsenisk påvirkning av tarmflora

Tarmmikrobiomet er involvert i mange aspekter av menneskers helse; det kan imidlertid lett forstyrres av miljøskadelige stoffer, slik som arsen (Chi, Bian, Gao, Ru, Tu & Lu, 2016). I en bangladeshisk studie (Dong, et al., 2017) med n=50 barn i områder med lav (1,7 µg/L) og høy (218,8 µg/L) eksponering for arsen i drikkevann så man endring i mikrobiota i gruppen med høy arseneksponering. Disse hadde overflod av phylen Proteobakterier og E.coli i tarmfloraen (Dong, et al., 2017). Økt prevalens av Proteobakterier i tarmen er en potensiell markør for dysbiose og risiko for sykdom (Shin, et al., 2015). Ellers hadde begge gruppene mest av phylene av Bacteroidetes og Firmicutes slik som i andre populasjoner (Dong, et al., 2017).

En nepalsk studie med n=42 voksne fra to områder med svært arsenforurensede drikkevann (med en arsenkonsentrasjon på henholdsvis 0.009 (±0.014) µg/L og 0.018 (±0.021) µg/L målt i fekale prøver) viste opphopning av Bilophila i tarmmikrobiota - en uvanlig bakterieslekt i normal tarmflora, men som kan være en bidragsyter til kolorektal kreft, samt ha geno- og cytotoxiske effekter på tarmepitelceller. I gruppene fant man en utarming av spesifikke bakterier innen Firmicutes-phylen (Brabeck, Wright, Ly, Wong, McClimans, Tokarev, Lamendella, Sherchand, Shrestha, Uprety, Dangol, Tandukar, Sherchand & Sherchang, 2020). Firmicutes er - sammen med Bacteroidetes dominerende (90% kolonisering) i en voksen sunn tarmflora (Schnippa & Conte, 2014) og interagerer med tarmens epitelceller for å beskytte verten mot opportunistiske patogener (Brabeck, et al., 2020). En dyrestudie på n=24 mus som ble gitt arsenforurenset fôr i 60 dager viste at eksponering av arsen signifikant endrer mikrobiell taxa (Wang, Hu, Yang, Chen, Shu, Zhang, Liu, Lui, Li & Guo 2020).

3.0 Metode og materialer

I denne studien er det anvendt data fra tarmflorastudien; The Norwegian Microbiota Cohort (NoMIC), en studie ledet av Merete Eggesbø ved Folkehelseinstituttet. Studien er kohortstudie der mødre og deres barn følges opp fra fødsel og gjennom spedbarnsalder.

3.1 NoMIC

NoMIC-studien (The Norwegian Microbiota Cohort) har som formål å identifisere hvilke faktorer som påvirker utviklingen av tarmflora, samt om det er sammenheng mellom tarmflora og mors og barns helse. Deltakerne til studien ble rekruttert av lege eller jordmor på fødeavdelingen på Sykehuset i Østfold (2002-2005). Flytende norsk og bosted i Østfold fylke var inkluderingkriterier. Mødrene ble bedt om å samle inn én avføringsprøve fra seg selv (fire dager postpartum) og avføringsprøver fra barna i løpet av syv tidsperioder: da barna var fire og ti dager gamle, etter én og fire måneder, og prøver ved ett-, to- og tolv års alder. Deltakerne ble bedt om å samle inn 25 ml morsmelk hver morgen i åtte påfølgende dager (totalt 200 ml), mellom 2 uker og 2 måneder postpartum. Mindre endringer i prøvetakningsprotokoll ble akseptert. Mødrene registrerte tid og dato for laktasjon, samt om det var benyttet hjelpemidler som brystpumpe. Prøvetaking ble utført over flere dager for å redusere variasjonen for motivet i estimert eksponeringsnivå (Eggesbø, Thomsen, Jørgensen, Becher, Odland & Longnecker, 2011).

Melken ble lagret i en beholder i fryser, og når beholderen ble full, ble melkeprøver og avføringsprøver samlet inn av studiepersonell og kjørt til Folkehelseinstituttets biobank. DNA ble ekstrahert etter at alle prøvene ble samlet. Totalt takket 601 mødre ja til å delta, 89% returnerte fekale prøver, og etterlot en kohort på n=552 mor-barn-par. Av disse mødrene var det 321 hvis brystmelkprøver hadde blitt analysert for giftstoffer, noe som tilsvarte 333 barn (inkludert flerfødsler); 5 hadde ikke mikrobiominformasjon på grunn av tapte prøver som etterlot 328 barn med måling av giftstoffer og informasjon om tarmmikrobiomdiversitet. Trehundre og syv spedbarn fikk målt både kjemikalier og fekale prøver ved 1 måneds alder (Dahl, et al., 2018)

Deltakerne svarte også på spørreskjema da barnet var én måned, seks måneder, ett år, to år og ti-tolv år gammelt. Der ble det blant annet innhentet informasjon om viktige kovariater, inkludert mors utdannelse, bruk av antibiotika, amming, kosthold og forløsningsmetode. I tillegg ble det

koblet til informasjon fra Norsk Medisinsk Fødselsregister (MFR) om mors alder, paritet, barnets kjønn og fødselsvekt (Dahl, et al., 2018).

Vi fokuserer på et tidspunkt (30 dager) hvor spedbarnets mikrobiom gjennomgår en rask utvikling (Mead, 2008). Avføringsprøver ved senere tidspunkt kan påvirkes av faktorer som antibiotikabruk, fast føde og kosthold.

3.2 Utvalg

Blant de 307 mødrene hvis morsmelk ble analysert for arsen, var det 102 som hadde levert avføringsprøve fra barna på dag 30. Datasettet hadde 3 outliers som ble ekskludert. To av tre outliersene hadde avvikende høye arsenkonsentrasjoner på henholdsvis 4,45 og 4,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mot en gjennomsnittskonsentrasjon på 0,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Den siste outlieren hadde en Shannonscore på 0,34 H. Noe som var en svært lav konsentrasjon sammenlignet med gruppens gjennomsnitt på 2,73 H. Outliersene ble ekskludert av ovennevnte grunner fordi de gjorde analysen svært sprikende. Utvalget ble til slutt $n=99$ mor-barn-par. Oppgaven vil undersøke tarmfloraprøvene som ble tatt da barna 30 dager, altså 1 prøve per barn.

3.3 Avhengig variabel

Den avhengige variabelen i analysen (utfallsvariabelen) er diversitet i tarmflora. Det er en kontinuerlig variabel som er oppgitt som Shannon (H). Shannon er en artsmangfoldindeks, kalt Shannon diversity index som viser biologisk mangfold i tarmflora. Indeksen baserer seg på antall tilstedeværende arter og antall individer per art. Flere arter og god fordeling per art, gir større biodiversitet i tarmfloraen. I analysen oppgis mangfold med et indeksnummer angitt som (H). Dette kan konverteres til antall arter som vist i ligningen under, hvor p = andel (n/N), hvor n er en bestemt art som finnes i en populasjon (N), \ln er en naturlig logaritme, s =summen av antall arter og Σ er den totale summen H (Figur 1) (Morris, Caruso, Buscot, Fischer, Hancock, Maier, Meiners, Müller, Obermaier, Prati, Socher, Sonnemann, Wäschke, Wubet, Wurst & Rilling, 2014). I regresjonsanalysene er Shannon inkludert som en kontinuerlig variabel. I tillegg dikotomiserte vi variabelen til lav og høy Shannon (H). Vi tok utgangspunkt i gjennomsnittsverdien på total Shannon (100% av utvalget) = 2,73 H, og delte opp deretter.

Gruppen med lav Shannon hadde verdi under 2,72 H (n=50), gruppen med høy Shannon hadde verdi over 2,73 H (n=49).

$$\text{Shannon Index (H)} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

Figur 1 - Viser formel for utregning av Shannonscore (Morris, et al., 2014).

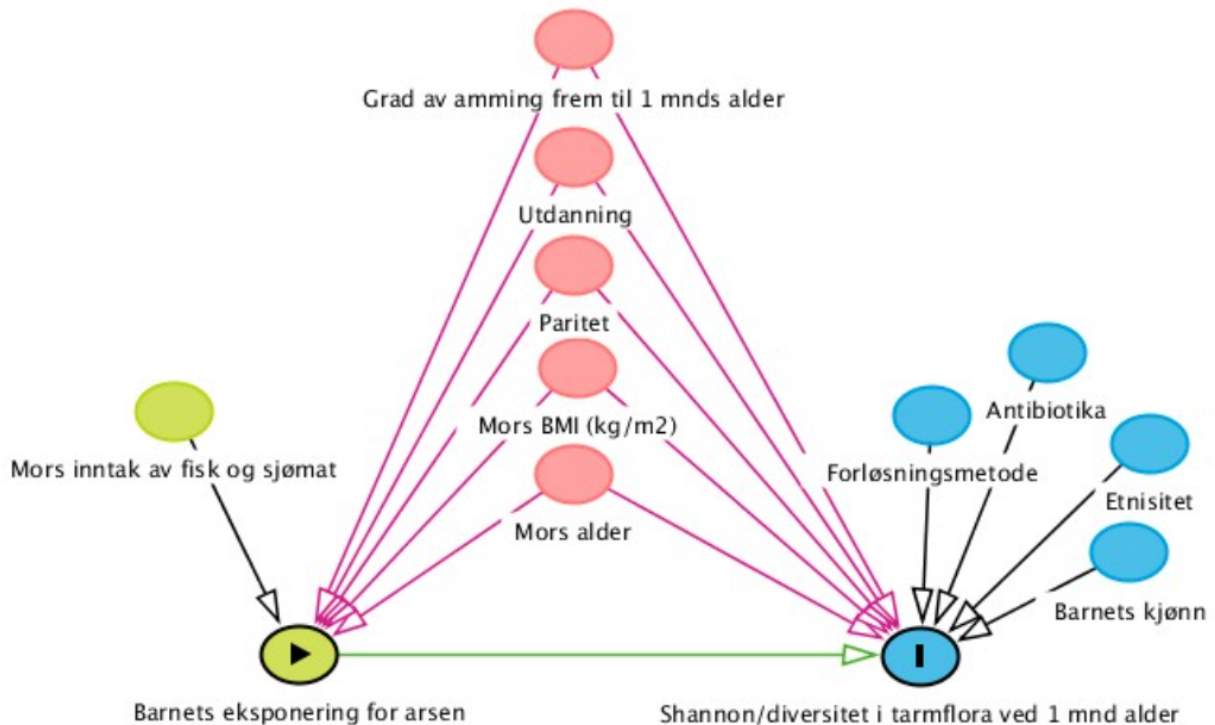
Tarmmikrobiell sammensetning er analysert etter protokoll fra Earth Microbiome Project. Avføringsprøvene er analysert ved hjelp av en Illumina HiSeq 2000-maskin, hvor DNA fra avføringsprøvene ble ekstrahert via 16S rRNA-genamplikonsekvensering av V4-regionen. Hovedfunn fra analyser av avføringsprøvene viste at det var tilstede fire hovedbakteriestammer i tarmfloraen hos de nyfødte; actinobacteria, firmicutes, proteobacteria og bacteroidetes (Iszatt, Janssen, Lenters, Dahl, Stigum, Knight, Mandal, Peddada, González, Midtvedt & Eggesbø, 2019).

3.4 Uavhengig variabel

Den uavhengige variabelen (eksponering) er arsen og er oppgitt som µg/kg. Den viser den totale arsen (tAs) konsentrasjonen i morsmelk. Arsen ble inkludert som en kontinuerlig variabel i analysene. Morsmelken fra NoMIC-studien er analysert ved flere laboratorier, blant annet ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet, Folkehelseinstituttet og Universitetet i Graz (Østerrike). Arsen i brystmelk ble analysert ved Universitetet i Graz. For å kartlegge nivåer av arsen i materialet er det foretatt HPLC (High Performance Liquid Chromatography) og molekylær spektroskopi. Ved hjelp av denne analysemetoden fant man at alle av de 307 analyserte prøver inneholdt arsen i ulike former (Stiboller, et al., 2017).

3.5 Potensielle Confoundere

For å besvare problemstillingen vil vi også inkludere potensielle confoundere fordi disse variablene på ulike måter er assosiert med både eksponering (arsen) og den avhengige variabelen (biodiversitet). Basert på en DAG (directed acyclic graph) (som vist under), belyser vi hvilke variabler som kan være konfunderende faktorer: paritet, mors alder, BMI (kg/m²), utdanning, samt grad av amming frem til 1 måneds alder.



Figur 2 - Viser DAG for masteroppgavens potensielle confoundere og variabler.

Da alle mødre fortsatt ammet ved 1 måneds alder valgte vi å ikke justere for den. Alle confoundere er kontinuerlige variabler, utenom utdanning. "Utdanning" er oppgitt som en ordinal variabel med to kategorier; lav/middels (grunnskole/videregående) og høy utdanning (høgskole/universitet). I tillegg justerte vi for barnets kjønn, fødselsmetode (keisersnitt/vaginal fødsel), og mors etnisitet (norsk/ikke-norsk), alle faktorer som kan tenkes å påvirke utfallet. Disse variablene er alle ordinale/nominale. Antibiotikabruk kan påvirke tarmmikrobiota (Kriss, et al., 2018), men ingen av barna hadde gjennomgått antibiotikakur på dette tidspunktet.

Mors inntak av fisk er kun assosiert med eksponering i DAGen, men vi kan ikke utelukke at det kan være en pil fra fiskeinntak til barnets diversitet hvilket ville gjort fisk til en confounder. Derfor vil vi også kjøre en egen analyse hvor vi også justerer for fisk. Inntak av fisk og sjømat er kontinuerlige variabler (g/uke).

2.6 Statistiske analyser

De ulike variablene som er beskrevet over er oppsummert ved hjelp av gjennomsnitt, SD og prosentandeler. For å teste forskjeller av gjennomsnittlig biodiversitet og gjennomsnittsverdier av arsen etter mors alder, utdanning, BMI (kg/m^2), grad av amming og paritet benyttes t-tester og kji-kvadrat-tester. For å undersøke sammenhengen mellom arseneksponering og diversitet i tarmflora gjøres en lineær regresjonsanalyse. I disse analysene kan vi også kontrollere for de ulike potensielle confounderingsvariablene.

Vi ønsker å gjøre en hypotesetesting, med H_0 = ingen sammenheng og H_1 = sammenheng (mellom det arseneksponering og diversitet i tarmflora). Regresjonskoeffisienten med 95% konfidensintervall vil presenteres disse testene. Det statistiske signifikansnivået er satt til 0,05. Vi benytter programvaren SAS JMP 15,0.

3.7 Etikk

NoMIC-studien innhentet informert samtykke fra mødrene før studiene startet slik personvernloven (Personopplysningsloven, 2018, § 9-10) krever. Studien er behandlet og godkjent av Datatilsynet og Regionale Komiteer for medisinsk- og Helsefaglig forskningsetikk (REK). Data, svar på spørreskjema og biologisk materiale er lagret aidentifisert (med løpenummer). For å få tilgang til materiell for anvendelse i denne aktuelle masteroppgaven er det sendt protokoll og tilleggsøknad til REK, referansenummeret til søknaden er: 17841. Forfatterne erklærer at det ikke finnes noen interessekonflikter vedrørende oppgaven.

4.0 Resultater

Resultatene er beskrevet i artikkelen til denne studien (Valstad, et al., under utarbeidelse). Hovedfunnene vil kort bli oppsummert her. Tabell 1 med beskrivelse av utvalget, og tabell 2 med oversikt over sammenheng mellom diversitet i tarmflora og arsen i morsmelk finnes i artikkelen og vil ikke bli gjengitt i denne kappen.

4.1 Oppsummering av hovedfunn

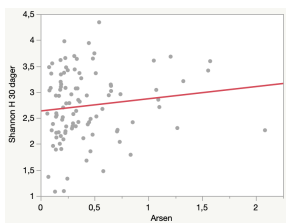
Våre modeller viste ingen signifikant sammenheng mellom Shannon (H) og arsen i morsmelk. Hverken før eller etter justeringer med variabler og potensielle confoundere.

4.2 Tilleggsresultater

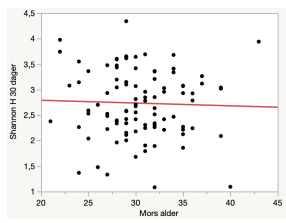
Tilleggsresultatene viser enkle lineære regresjonsmodeller som videre anvendes og diskuteres i diskusjonsdelen.

4.2.1 Shannon (H) ved 30 dager og arsenkonsentrasjon i morsmelk mot ulike forklaringsvariabler og confoundere

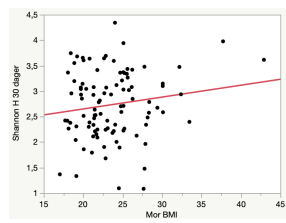
Tilleggsresultatene viser sammenheng mellom biodiversitet, samt arsenkonsentrasjon og de andre variablene vi har inkludert i analysene. Resultatene er fra lineære regresjoner. I figur 3 - 15 er Shannon (H) avhengig variabel (Y) og i figur 16-25 er den avhengige variabelen arsenkonsentrasjoner i morsmelk. I sistnevnte er variablene kjønn og forløsning er utelatt, da disse ikke er relevante for arsenkonsentrasjon. Resultatene gir et visuelt bilde på hvordan fordelingen i de ulike gruppene ser ut.



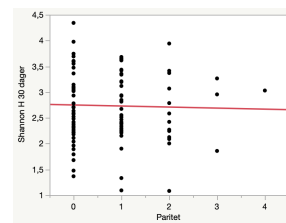
Figur 3 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Arsen (X) p-verdi: 0,194



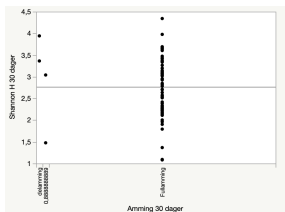
Figur 4 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Mors alder (X) p-verdi: 0,735



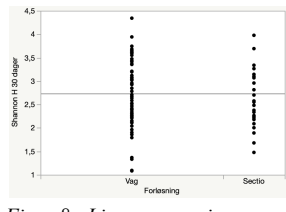
Figur 5 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Mors BMI (X) p-verdi: 0,133



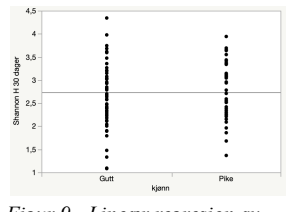
Figur 6 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Paritet (X) p-verdi: 0,785



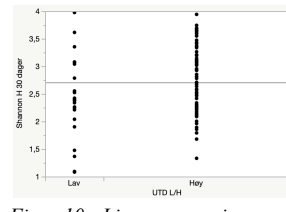
Figur 7 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Grad av amming (X) Delamming / Fulllamming



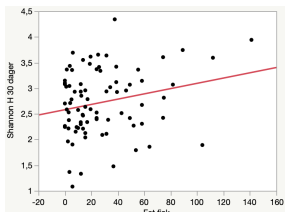
Figur 8 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Forløsning (X) Vaginalt / sectio



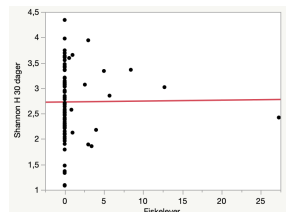
Figur 9 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - barnets kjønn (X) Gutt / Jente



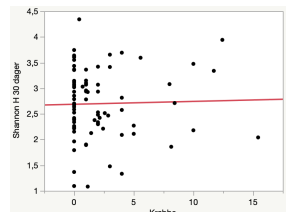
Figur 10 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Utdanning (X) Lav / Høy. p-verdi: 0,054



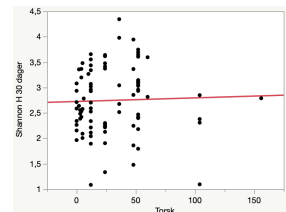
Figur 11 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Fet fisk (X) p-verdi: 0,035



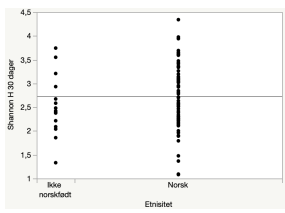
Figur 12 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Fiskelever (X) p-verdi: 0,929



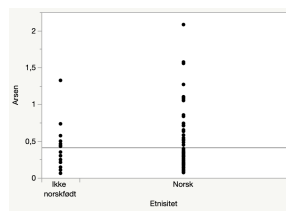
Figur 13 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Krabbe (X) p-verdi: 0,804



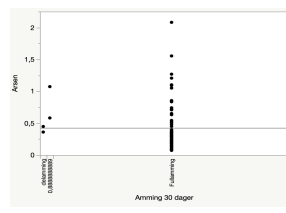
Figur 14 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Torsk (X) p-verdi: 0,762



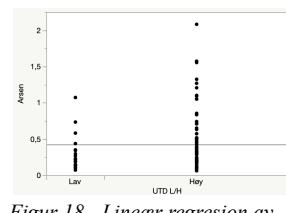
Figur 15 - Lineær regresjon av Shannon (Y) - Etnisitet (X) ikke-norsk / norsk



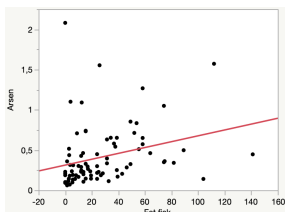
Figur 16 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Etnisitet (X) ikke-norsk / norsk



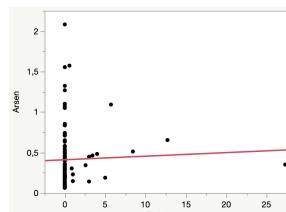
Figur 17 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Grad av amming (X) Delamming / Fulllamming ved 30 dager



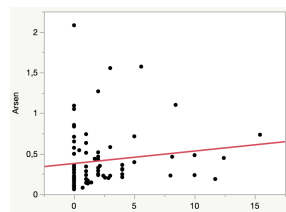
Figur 18 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Utdanning Lav / Høy (X) p-verdi: 0,011



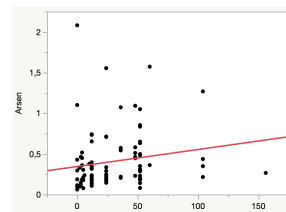
Figur 19 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - fet fisk (X) p-verdi: 0,009



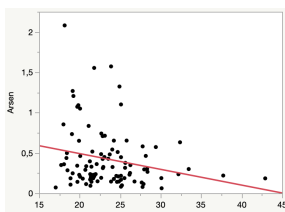
Figur 20 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Fiskelever (X) p-verdi: 0,700



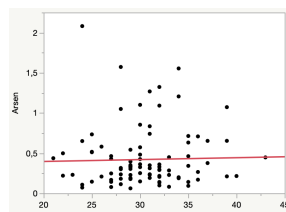
Figur 21 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Krabbe (X) p-verdi: 0,222



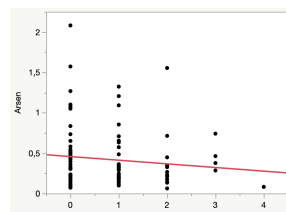
Figur 22 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Torsk (X) p-verdi: 0,103



Figur 23 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Mors BMI (før graviditet) p-verdi: 0,023



Figur 24 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Mors alder (X) p-verdi: 0,794



Figur 25 - Lineær regresjon av Arsen (Y) - Paritet (fra 0 - 4 pari) (X) p-verdi: 0,276

Inntak av fet fisk er den eneste variabelen som har sammenheng med Shannon (H) ($p=0,035$) og vi ser at høyere inntak av fet fisk har sammenheng med høyere Shannon. Inntak av fet fisk er også assosiert med høyere arsenkonsentrasjon i morsmelk ($p=0,009$). I tillegg er høyere BMI (kg/m^2) hos mor (før graviditet) assosiert med lavere arsenkonsentrasjon ($p=0,023$). Mors utdanning har også en sammenheng med arsenkonsentrasjon.

5.0 Diskusjon

Diskusjonen rundt funn er beskrevet i artikkelen til denne studien (Valstad, et al., under utarbeidelse). I denne delen av oppgaven vil utdypelse av diskusjonen bli presentert med en bredere tilnærming til temaer som er tatt opp i artikkelen. Den starter med en diskusjon vedrørende forklaringer og mekanismer for våre funn. Videre vil metodologiske betraktninger, reliabilitet og validitet tas opp. Avslutningsvis presenteres en kort konklusjon.

5.1 Diskusjon av funn

Denne studien er en av få studier som har undersøkt sammenheng mellom arsen og diversitet i tarmflora. Det er den første av sitt slag som er utført i Norge. I tidligere studier har hovedeksponeringen for arsen vært lokalt drikkevann (Dong, et al., 2017)(Brabeck, et al., 2020)(Carignan et al., 2015), mens i denne studien studerer vi arsen i morsmelk, hvor mødrene i hovedsak har blitt eksponert for arsen gjennom kosten. Blant ovennevnte studier har også deltakerne hatt betraktelig høyere arsenkonsentrasjoner enn våre deltakere. De ulike studiene har også benyttet ulike utfall og målinger på tarmflora er ulik. Tidligere studier er i likhet med denne studien basert på kohortstudier, foruten om Chi, et al. (2016) og Wang, et al. (2020) som er dyrestudier på mus.

I denne studien undersøkte vi om innhold av tAs i morsmelk hadde en sammenheng med biodiversitet i tarmflora hos 30 dager gamle spedbarn hos $n=99$ norske mor-barn-par forløst ved Sykehuset i Østfold. Vi fant ingen signifikant sammenheng (se *figur 3*) mellom arsen i morsmelk og diversitet i tarmflora, verken før eller etter justering for potensielle confoundere. Det kan være mange forklaringer på hvorfor vi ikke har funnet noen sammenheng slik vi antok å gjøre basert på resultater fra andre studier (Chi, et al., 2016)(Dong, et al., 2017)(Brabeck, et al., 2020)(Wang, et al., 2020)(Carignan et al., 2015).

De ovennevnte studiene har som nevnt innledningsvis ikke brukt samme utfallsvariabelen Shannon (H), men de har undersøkt endring eller sammensetning av spesifikke bakteriearter- og stammer. Her har alle studienes resultater kunne knytte arseneksponering med endring av tarmmikrobiell sammensetning til fravær av gunstige bakterier og/eller en overflod av ugunstige bakterier assosiert med en dysbiotisk tarm. Det er imidlertid viktig å presisere at det mangler en klar definisjon eller konsensus på hva sunn tarmflora innebærer (Schnippa & Conte, 2014) men mange studier har sett en sammenheng mellom redusert biodiversitet, overflod av ugunstige bakterier og sykdom. Dette indikerer at et artsrikt tarmøkosystem er mer robust mot miljøpåvirkninger og derfor mer gunstig. Funksjonsrelaterte mikrober i et intakt økosystem kan kompensere for funksjonen til andre manglende arter. Følgelig ser det ut til at en høy biodiversitet kan gi en god indikator på en “sunn tarm” (Valdes, et al., 2018). En dysbiotisk tarm med lav biodiversitet er forbundet med mange sykdommer og lidelser, derfor er det viktig å forstå mekanismer som kan påvirke eller motvirke dette i folkehelsearbeidet. Særlig dersom H-tallet kan predikere videre utvikling frem til barnet har en stabil tarmflora. Da vi vet at etablering av tarmflora skjer før tre års alder (Mead, 2008) er det nyttig å vite hvordan og hvilke faktorer tarmfloraen påvirkes av (som arsen) før etableringen er ferdig.

Tidligere studier har kunnet påvise at miljøkemikalier påvirker tarmmikrobiomet. Mange av miljøkemikalierne (slik som arsen) som måles i morsmelk, kommer fra mors kosthold (Mead, 2008). Nordmenn blir ofte eksponert for arsen gjennom konsumering av fisk og sjømat, noe som også gjelder for studiens deltakere da vi kunne se en sammenheng mellom rapportert inntak av fisk og sjømat og deres tAs-konsentrasjon i morsmelk (se *figur 19, 21 og 22*). Det var en klar sammenheng mellom inntak av fet fisk og høyere tAs-konsentrasjon, men også en tendens til at høyere inntak av krabbe og torsk var assosiert av tAs i morsmelk.

I fisk finnes hovedsakelig de organiske arsenforbindelsene arsenobetain og arsenolipider (Meyer, Schulz, Jeibmann, Taleshi, Ebert, Francesconi, & Schwerdtle, 2014). En polsk studie (Mania, Rebeniak, Szynal, Wojciechowska-Mazurek, Starska, Ledzion & Postupolski, 2016) som undersøkte konsentrasjoner av tAs i fisk og sjømat fant både orgAs og iAs. Det samme funnet ble gjort blant analyserte fiskefileter fra norske farvann (Julshamn, Nilsen, Frantzen, Valdernesnes,

Maage, Nedreaas & Sloth, 2012). Begge studiene fant imidlertid ut at iAs-konsentrasjonene i prøvene var så lave at de befant seg under deteksjonsgrense og dermed vanskelig å fastslå. Det er derfor nærliggende å tro at iAs er under de fastsatte grenseverdier for barn som i dag ligger på 0,3 mg/kg (Matloven, 2003) og det er dermed trygt for barn å spise fisk med tanke på fiskens innhold av iAs. I den polske studien (Mania, et al., 2016) var den gjennomsnittlige tAs-konsentrasjonen i fisk på 0,46 mg/kg og 0,87 mg/kg i annen sjømat (som Hijiki-tang og alger).

De organiske arsenformene som finnes i fisk har lenge har vært antatt å gi mindre helseskade enn iAs, likevel har nyere studier indikert at de organiske formene både kan gi endringer på tarmmikrobiomet, samt gi cytotoksiske effekter på lever- og blæreceller, som potensielt kan krysse blod-hjernebarrieren (Meyer, et al., 2014). Dette er svært uheldig for voksne og barn, men særlig for den følsomme nyfødthjernen. Det er ikke fastsatt grenseverdier for inntak av organisk arsen for hverken barn eller voksne. Men flere studier på toksisitet og helsekonsekvenser på de organiske arsenforbindelsene bør vurderes, særlig med tanke på at det er mange som har et jevnt inntak av fisk og sjømat hver uke, hele året. Dersom man følger Helsedirektoratets kostårdsanbefalinger om å spise inntil 300-450 gram fisk i uken får man i seg relativt store mengder arsen (Helsedirektoratet, 2016). Dette konsumet tilsvarer rundt 7-10 gram tAs fra konsumering av fisk årlig (Mania, et al., 2016). Mødrene i denne studien har imidlertid rapportert å ha et langt lavere konsum av fisk og sjømat (målt i g/uke) i uken enn det helsedirektoratet anbefaler, dette må tas i betraktning med tanke på studiens resultater og funn hadde kanskje vært annerledes dersom kvinnene hadde fulgt kostholdsrådene.

Selv om eksponeringskilden til våre observasjoner er som nevnt ovenfor tilsynelatende fisk og sjømat kan eksponering fra andre kilder - som vann, ikke utelukkes. I Norge er arsenkonsentrasjonene i vann svært lave (Folkehelseinstituttet, 2018) og ligger trygt innenfor grenseverdiene for hva som er forsvarlig arsennivå i drikkevann satt av WHO (grenseverdiene er 10 µg/L). Disse retningslinjene er ment som grunnlag for global regulering av arseneksponering for den globale folkehelsen (World Health Organization, 2018). Studiene som har kunnet vise til en endret tarmmikrobiota som en følge av arseneksponering (Dong, et al., 2017)(Brabeck, et al., 2020)(Carignan et al.,2015) har hatt arsenforurenset drikkevann som primærkilde. Arsennivåene

i drikkevann til disse studiene har vært langt høyere enn i norsk drikkevann, eksempelvis hadde det ene området i den henviste studien fra Bangladesh (Dong, et al., 2017) en tAs-konsentrasjonen i drikkevannet på 218,8 µg/L, sammenlignet med gjennomsnittlig verdi på 0,2 µg/L i norsk drikkevann (Folkehelseinstituttet, 2018). Det er den uorganiske arsenformen som er dominerende i vann. Uorganisk arsen har lengre halveringstid enn organisk arsen og akkumuleres derfor i høyere grad. Det er mulig at dette er grunnen til at tidligere studier har sett en sammenheng mellom arsen og tarmdiversitet som vi ikke kunne se i denne studien.

Mødrene i vår studie hadde relativt lave konsentrasjoner av tAs i sin morsmelk. Kanskje er dosene for lave for å gi utslag på barnas tarmflora. Organisk arsen har relativt rask halveringstid. Både dyre- (Kenyon, et al., 2005) og humanstudier (Xiong, et al., 2020) har påvist den organiske arsenvariantens halveringstid med hyppige analyser på forskningsobjektene etter eksponering. Målte arsennivåer i morsmelk viser at arsenkonentrasjonen peaker åtte timer etter eksponering og er nesten helt eliminert etter tre dager (Xiong, et al., 2020). Det er derfor relevant *hva* mødrene i studien har spist eller drukket i forkant eller underveis av innsamling av brystmelkprøver. Mødrene samlet inn 25 ml brystmelk hver morgen i åtte påfølgende dager etter protokoll fra WHO (Eggesbø, et al., 2011). I løpet av disse åtte dagene kan altså moren ha spist/drukket arsenforurenset materiale og få utslag på tAs i hennes prøver, eller unngått arsenforurenset materiale i prøvetakningsperioden og dermed ikke fått utslag på tAs. Mødre med høyere inntak av fet fisk, hadde spedbarn med høyere Shannonverdier (H) (se *figur 10*). Det kan tenkes at fisk har en beskyttende effekt på mikrobiomet. Det kan også være at kvinner som spiser mer fisk også har andre helsevaner eller en generelt bedre helse som påvirker barnets tarmdiversitet positivt. I tråd med data fra Statistisk sentralbyrå (Stabell, 2017), rapporterte mødrene med høy utdanning å ha et høyere inntak av fisk og sjømat enn mødre med lav utdanning. De sosiale ulikhetene i helse er veldokumenterte og danner en gradient gjennom den norske befolkningen. Høyere utdanning og inntekt gir mulighet for høyere psykososiale og materielle ressurser som legger til rette for bedre helse (Helsedirektoratet, 2018). Flere studier (Bowyer, Jackson, Le Roy, Lochlainn, Spector, Dowd & Steves, 2019) har funnet at deltakere med høyere sosioøkonomisk status (SØS) hadde høyere biodiversitet i tarmflora. Høyere SØS er også forbundet med et bedre kosthold, noe som er en viktig driver for utvikling av tarmflora (Thursby & Juge, 2017).

Høyere SØS er også forbundet med lavere BMI (Bowyer, et al., 2019). Mødrene i studien hadde en gjennomsnittlig BMI (før graviditet) på 23,62 kg/m² - en BMI som er klassifisert som en normalvekt (Shekar & Popkin, 2020). Det var kun tre kvinner med en BMI (>25kg/m²) forbundet med overvekt og fedme blant våre observasjoner. Tidligere har høy BMI og høy alder blitt forbundet med en høyere miljøgiftbyrde i morsmelk (Mead, 2008). Forskning har også vist at høy biodiversitet i tarmflora kan beskytte mot overvekt og fedme (Schnippa & Conte, 2014). En interessant observasjon blant våre kvinner var at høyere BMI var assosiert med lavere arsenkonsentrasjon (slik *figur 23* illustrerer), men høyere Shannon (H) (se *figur 5*). Det kan tenkes at kvinner med noe høyere BMI spiser mindre arsenforurenset mat, inkludert fisk og sjømat, eller at de har fått flere barn tidligere og har overført arsen til disse gjennom morsmelk. Da kun tre av deltakerne i studie var overvektige, er det sannsynlig at vi ikke har hatt mulighet til å fange opp en eventuell sammenheng mellom høy BMI og arsen i morsmelk eller mellom høy BMI og Shannon. Alder var heller ikke forbundet med verken arsen (*figur 24*) eller Shannon (*figur 4*) i våre resultater, men dette må også sees i lys av at alle deltakerne var relativt unge.

Vi undersøkte også om forløsningsmetode var forbundet med Shannon i vår studie, noe det ikke var, selv om gruppen med vaginalt forløste barn hadde noe høyere Shannon enn andre barn (se *figur 8*). At forløsningsmetode påvirker mikrobiom er veldokumentert (Bäckhed, Roswall, Peng, Kristiansen, Dahlgren & Wang, 2015). Lavt mangfold i tarmmikrobiota i løpet av de tre første levemånedene av spedbarnets liv er hos de fleste nyfødte forbundet med keisersnitt (Rutayisire, Huang, Liu & Tao, 2016). Vi så heller ingen sammenheng mellom mikrobiom og kjønn (*figur 9*). Tidligere studier har vist at arsen påvirker tarmmikrobiomet på en kjønns spesifikk måte, hvor guttebarn er mest sårbare for arsenisk påvirkning på tarmmikrobiomet (Hoen, Madan, Li, Coker, Lundgren & Morrison, 2018)(Chiu, Warner, Nowak, Flaws & Mei, 2020). Vi har ikke testet om sammenhengen mellom arsen i morsmelk og tarmmikrobiomet er ulik mellom gutter og jenter.

Morsmelk virker beskyttende for mange lidelser og sykdommer på kort- og lang sikt blant barna. For mor vil amming også redusere risiko for diabetes og eggstokkreft, samt virke forebyggende for brystkreft (Victoria, et al., 2016) som er den hyppigste kreftformen hos kvinner i Norge (Kreftregisteret, 2021). Morsmelk er den foretrukne næringskilden for spedbarn. Men selv om

morsmelk er den foretrukne ernæringskilden til spedbarn er det viktig å forstå hvordan forurenset morsmelk påvirker mors- og barns helse. Man trenger kunnskap om kilder til forurensing, dose-respons-forholdet som gir utslag for spesifikke helseutfall for mor og barn, og hvordan man kan tilrettelegge og veilede kvinner på gruppe- og individnivå for å gi det sårbare og nyfødte barnet det beste oppvekstgrunnlaget. Dersom vi hadde kunnet vise til en signifikant sammenheng mellom arsen i morsmelk og biodiversitet i tarmflora kunne en av anbefalingene våre være å anvende brystpumpe før og i timene etter eksempelvis et stort fiskemåltid og gi barnet den utpumpede brystmelken uten høye arsennivåer på flaske.

5.3 Metodologiske betraktninger

Denne observasjonsstudien baserer seg på data fra den prospektive kohortstudien NoMIC. Kohortstudier er et velegnet studiedesign for å studere sammenhenger mellom ulike eksponeringer og en eller flere spesifikke helseutfall (Greenhalgh, 2010). Derfor er en kvantitativ metode med data fra ovennevnte studier godt egnet til å besvare denne studiens problemstilling om hvordan en bestemt eksponering (arsen) påvirker et bestemt helseutfall (biodiversitet i tarmflora).

I NoMIC-studien er det foretatt spørreskjemaundersøkelser, det er innhentet morsmelkprøver og ulike biometriske mål, samt tatt flere avføringsprøver ved ulike tidsperioder. Dette gir et godt grunnlag for å følge med på ulike utfall av interesse. Denne studien ser bare på avføringsprøver fra én tidsperiode hos barnet, og vi kan derfor ikke si noe om utvikling, kun om sammenhenger ved ett bestemt tidspunkt. Vi valgte å se på avføringsprøven fra barna var 30 dager gamle. På dette tidspunktet er mikrobiomet i utgangspunktet ganske jevnt utviklet (Carignan, et al., 2015) noe som gir oss et godt grunnlag for å sammenligne barna. Funnene i denne studien kan også sees i lys av, og supplere, andre longitudinelle studier med samme forskningsspørsmål, som igjen kan gi grunnlag for å fastslå kausale sammenhenger (Greenhalgh, 2010).

Confoundervariable er variabler som påvirker både eksponering og utfall i en studie, og som kan forstyrre den sammenhengen man ønsker å studere. For å få et mest mulig riktig bilde av sammenhengen man ønsker å se på, justerer man for slike kjente konfoundervariable (Greenhalgh, 2010). I vår studie har vi justert for slike variabler; mors alder, paritet, BMI (før

graviditet), utdanning, etnisitet, barnets kjønn, forløsningsmetode og inntak av fisk og annen sjømat. Vi kan ikke utelukke at eventuelle sammenhenger skyldes eller er påvirket av ukjente confoundere, variabler vi ikke har hatt mulighet til å justere for i studien. Målepresisjon i confoundere kan i tillegg påvirke sammenhengen. For eksempel kan inntak av fisk og sjømat være upresist oppgitt av deltakerne.

Det at deltakerne ble rekruttert på sykehus kan ha økt representativiteten i studien. Her møter man fødende kvinner fra ulike sosioøkonomiske grupper. Dette er fordelaktig, da det vanligvis er de med høy SØS som både blir med i og fullfører studier og som oftest er mest interessert i helse. Deltakere i en kohortstudie må delta over lang tid, og studien er avhengig av at de fleste er med gjennom hele løpet. Det kan være krevende, og som regel faller noen fra underveis. Ofte er det kun de mest ressurssterke deltakerne som gjennomfører hele det lange studieløpet (Greenhalgh, 2010). NoMIC studien er en krevende studie å delta på, da mødre må levere fekale prøver flere ganger, samle morsmelk flere dager på rad i en kanskje krevende barseltid. Det at utvalget måtte kunne norsk flytende har nok ekskludert en del innvandrerkvinner, noe som kunne ha påvirket resultatet dersom disse kvinnene kom fra land med naturlig høye arsennivå i for eksempel vann, eller hadde andre levevaner enn andre kvinner i Norge. En av studiens styrker er at frafallsprosenten fra kohortstudien er relativt lav (11%). Dataene vi bruker i studien vår er målt tidlig i studien, de aller fleste er fortsatt med.

5.4 Reliabilitet & validitet

De fleste funn fra NoMIC er gjort med avanserte analysemetoder og objektive måleinstrumenter, noe som gir mindre rom for feilkilder og subjektive tolkninger av datamateriale. Reliabiliteten av disse objektive målingene er derfor høy. Studiens fremgangsmåte for ekskluderingskriterier til utvalg og tilhørende statistikk transparent, noe som muliggjør reproduksjon av resultater.

NoMIC anvender spørreskjema for å innhente supplerende informasjon til det biologiske materiale. I spørreskjema undersøkelser er det alltid en sjanse for at folk svarer upresist, enten fordi de ikke husker (hukommelsesbias) eller fordi de ønsker å fremstå litt bedre enn de er, slik de tror den som spør synes de burde være (pleasing bias). For vår studie kan det ha vært vanskelig å oppgi nøyaktig hvor mye fisk en spiser og det er sannsynlig at noen overestimerer

inntaket sitt, og andre muligens underestimerer det. For annen sjømat som av de fleste konsumeres relativt sjelden, kan det være lettere å anslå. Det kan også være at deltakere oppfatter og forstår spørsmålene forskjellig. Spørreskjemaene i denne studien var validerte, noe som øker sannsynligheten for at de fanger opp den informasjonen de var tenkt å fange opp.

6.0 Konklusjon og fremtidige perspektiver

Vi fant ingen sammenheng med arsenkonsentrasjon i morsmelk og biodiversitet i tarmflora ved 30-dagers alder. En grunn til at vi ikke fant noen sammenheng kan være at konsentrasjonene av tAs i morsmelk var relativt lave. Eksponeringskilden er tilsynelatende fisk og sjømat hvor majoriteten av arsenet er av de organiske - og mindre helsefarlige arsenforbindelsene. I tillegg har vi kun sett på avføringsprøver på ett tidspunkt i spedbarnets liv - en periode hvor mikrobiomet fortsatt er veldig umodent.

Selv om denne studien ikke kunne vise til en signifikant sammenheng arsen i morsmelk og biodiversitet i spedbarn vil fremtidige, mer grundige studier om arsens innflytelse på tarmmikrobiomet være viktige, særlig med tanke på nordmenns hyppige eksponering for arsen. Denne studien gir ingen indikasjon på at gjeldende råd om amming bør endres.

Litteraturliste

Björklund, K.L., Vahter, M., Palm, B., Grandér, M., Lignell, S., Berglund, M. (2012). *Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study*. Environ Health. 2012; 11: 92. doi: 10.1186/1476-069X-11-92

Brabeck, J.L., Wright, J., Ly, T., Wong, H.T., McClimans, C.J., Tokarev, V., Lamendella, R., Sherchand, S., Shrestha, D., Uprety, S, Dangol, B., Tandukar, S., Sherchand, J.B., Sherchang, S.P. (2020). *Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal*. Heliyon. 2020 Jan; 6(1): e03313. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03313

Bowyer, R.C.E, Jackson, M.A., Le Roy, C., Lochlainn, M.,N., Spector, T.D., Dowd, J.B., Steves, C.J. (2019). *Socioeconomic Status and the Gut Microbiome: A TwinsUK Cohort Study*. Microorganisms. 2019 Jan 11;7(1):17. doi: 10.3390/microorganisms7010017.

Burbidge, A., Williams, E. (2020). *Breastfeeding & the Environment*. Hentet 10.05.2021 fra <https://www.laleche.org.uk/breastmilk-and-the-environment/>

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Wang, J. (2015). *Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life*. Cell Host & Microbiome, VOLUME 17, ISSUE 5, P690-703, MAY 13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>

Caspersen, I.H., Knutsen, H.K., Brantsaeter, A.L., Haugen, M. Alexander, J., Meltzer, H.M. (2013). *Dietary exposure to dioxins and PCBs in a large cohort of pregnant women: results from the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)*. Environment International, 59. 398-407.

Carignan, C.C., Karagas, M.R., Punshon, T., Gilbert-Diamond, D., Cottingham, K.L. (2015). *Contribution of breast milk and formula to arsenic exposure during the first year of life in a U.S. prospective cohort*. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2016 Sep; 26(5): 452–457. 2015 Nov 4. DOI: 10.1038/jes.2015.69

Chi, L., Bian, X., Gao, B., Ru, H., Tu, P., Lu, K. (2016). *Sex-specific effects of arsenic exposure on the trajectory and function of the gut microbiome*. Chem Res Toxicol. 2016;29(6):949–51. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00066.

Chiu, K., Warner, G., Nowak, R.A., Flaws, J.A., Mei, W. (2020). *The Impact of Environmental Chemicals on the Gut Microbiome*. Toxicological Sciences, Volume 176, Issue 2, August 2020, Pages 253–284, DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa065>

Coryell, M., Roggenbeck, B., Walk, S. (2019). *The Human Gut Microbiome's Influence on Arsenic Toxicity*. Curr Pharmacol Rep. 2019 Dec; 5(6): 491–504. (2019 Nov 25.) doi: 10.1007/s40495-019-00206-4

Dahl, C., Stigum, H., Valeur, J., Iszatt, N., Lenters, V., Peddada, S., Bjørnholt, J.V., Midtvedt, T., Mandal, S., Eggesbø, M. (2018). *Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure*. International Journal of Epidemiology, 2018, doi: 10.1093/ije/dyy064

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Margis, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010). *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107 (26):11971-5. DOI: 10.1073/pnas.1002601107

Dong, X., Shulzhenko, N., Lemaitre, J., Greer, R.L., Peremyslova, K., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Hasan, O.S.I., Joya, S.A., Golam, M., Christiani, D.C., Morgun, A., Kile, M.L. (2017). *Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh*. PLoS One. 2017; 12(12): e0188487. doi: 10.1371/journal.pone.0188487

Eggesbø, M., Thomsen, C., Jørgensen, J.V., Becher, G., Odland, J.Ø., Longnecker, M.P. (2011). *Associations between brominated flame retardants in human milk and Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) in neonates*. Environ Res. 2011 August ; 111(6): 737–743. doi:10.1016/j.envres.2011.05.004.

European Food Safety Authority. (2009). *EFSA assesses arsenic in food*. Hentet 20.09.20 fra <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/contam091022> .

Folkehelseinstituttet. (2018). Kjemiske og fysiske stoffer i drikkevann. Hentet 21.05.21 fra <https://www.fhi.no/nettpub/stoffer-i-drikkevann/kjemiske-og-fysiske-stoffer-i-drikkevann/kjemiske-og-fysiske-stoffer-i-drikkevann/>

Frumkin, H. (2016). *Environmental Health - from global to local*. 3 edition. ISBN 978-1-118-98476-5. Jossey-Bass, San Francisco.

Gut Microbiota for Health. (2012). *MetaHIT*. Hentet 20.05.2021 fra <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/metahit/>

Greenhalgh, T. (2010). *How to read a paper. The basics of evidence-based medicine*. 4 ed. Chichester, England, Wiley-Blackwell, 2010.

Hoen, A.G., Madan, J.C., Li, Z., Coker, M., Lundgren, S.N., Morrison, H.G. (2018). *Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 12627 10.1038/s41598-018-30581-9.

Helsedirektoratet (2016). *Kostrådene*. Hentet 10.10.2020 fra <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/kostrad-for-befolkningen>

Helsedirektoratet. (2018). *Sosial ulikhet påvirker helse - tiltak og råd*. Hentet 01.08.2021 fra <https://www.helsedirektoratet.no/tema/sosial-ulikhet-i-helse/sosial-ulikhet-pavirker-helse-tiltak-og-rad>

Iszatt, N., Janssen, S., Lenters, V., Dahl, C., Stigum, H., Knight, R., Mandal, S., Peddada, S., González, A., Midtvedt, T., Eggesbø, M. (2019). *Environmental toxicants in breast milk of Norwegian mothers and gut bacteria composition and metabolites in their infants at 1 month. Microbiome*. 2019 Feb 27;7(1):34. doi: 10.1186/s40168-019-0645-2.

Julshamn, K., Nilsen, B., Frantzen, S., Valdersnes, S., Maage, A., Nedreaas, K., Sloth, J.J. (2012). *Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters*. 2012;5(4):229-35. doi: 10.1080/19393210.2012.698312.Epub 2012 Jul 24.

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., Pannaraj, P.S. (2018). *Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity*. *Front. Immunol.*, 28 February 2018 | DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>

Mania, M., Rebeniak, M., Szynal, T., Wojciechowska-Mazurek, M., Starska, K., Ledzion, E., Postupolski, J. (2016). *Total and inorganic arsenic in fish, seafood and seaweeds - exposure assessment*. *Rocz Panstw Zakl Hig.* DOI:2015;66(3):203-10.

Matloven. (2003). *Lov om matproduksjon og mattrygghet mv.(matloven)*. Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2003-12-19-124?q=Matloven>

Mattilsynet. (2016). *Mattilsynet anbefaler ikke riskaker til små barn*. Hentet fra https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/uonskede_stofferimaten/miljogifter/mattilsynet_anbefaler_ikke_riskaker_til_smaa_barn.22454den 18.05.2021

Mead, N.M. (2008). *Contaminants in Human Milk: Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding*. *Environ Health Perspect.* 2008 Oct; 116(10): A426–A434.

Meyer, S., Schulz, J., Jeibmann, A., Taleshi, M. S., Ebert, F., Francesconi, K. A., Schwerdtle, T. (2014). *Arsenic-containing hydrocarbons are toxic in the in vivo model *Drosophila melanogaster**. *Metallomics*, 6 (11): 2010-4. doi: 10.1039/c4mt00249k.

Miljødirektoratet. (2021). *Arsen og arsenforbindelser (miljøstatus)*. Hentet 16.04.2021 fra <https://miljostatus.miljodirektoratet.no/tema/miljogifter/prioriterte-miljogifter/arsen-og-arsenforbindelser//>

Molin, M. (2017). *Verdt å vite om arsen i sjømat og ris*. Norsk tidsskrift for ernæring. Nr. 1 - 17.Mars 2017.

Morris, K.E., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S.A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., Rilling, M. (2014). *Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories*. Ecol Evol. 2014 Sep; 4(18): 3514–3524. doi: 10.1002/ece3.1155

Kenyon, E.M., Razo, L.M.D., Hughes, M.F. (2005). *Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate*. Toxicol Sci, 2005 May;85(1):468-75. doi: 10.1093/toxsci/kfi107

Kreftregisteret. (2021). *Nøkkeltall om kreft*. Hentet 05.08.2021 fra <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/om-kreft/>

Kriss, M., Hazleton, K.Z., Nusbacher, N.M., Martin, C.G., Lozuponed, C.A. (2018). *Low Diversity Gut Microbiota Dysbiosis: Drivers, Functional Implications & Recovery*. Curr Opin Microbiol. 2018 Aug; 44: 34–40. 2018 Jul 20. doi: 10.1016/j.mib.2018.07.003

Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y., Tao, F. (2016). *The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review*. BMC Gastroenterol. 2016 Jul 30;16(1):86. doi: 10.1186/s12876-016-0498-0.

Schnippa, S., Conte, M.P. (2014). *Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health*. Nutrients. 2014 Dec; 6(12): 5786–5805. doi: 10.3390/nu6125786

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016). *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the body*. Plos Biology. 2016;14(8):e1002533

Shekar, M., Popkin, B. (2020). *Obesity : Health and Economic Consequences of an Impending Global Challenge. Human Development Perspectives*; . Washington, DC: World Bank. © World Bank.

Shin, N-R., Whon, T.W., Bae, J.W. (2015). *Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota*. Trends in Biotechnology. Volume 33, Issue 9, September 2015, S. 496-503 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>

Shreiner, A.B., Kao, J.Y., Young, V.B. (2015). *The gut microbiome in health and in disease*. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015 Jan; 31(1): 69–75. doi: 10.1097/MOG.0000000000000139

Stabell, C. (2017). Hvem spiser fisk? Hentet 01.08.2021 fra <https://www.ssb.no/helse/artikler-og-publikasjoner/hvem-spiser-fisk>

Stiboller, M., Raber, G., Gjengedal, E.L.F., Eggesbø, M., Francesconi, K.A. (2017). *Quantifying Inorganic Arsenic and Other Water-Soluble Arsenic Species in Human Milk by HPLC/ICPMS*. *Anal Chem*. 2017 May 10. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01276.

Pajewska-Szmyt, M., Sinkiewicz-Darol, E., Gadzala-Kopciuch, R. (2019). *The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk*. *Environmental Science and Pollution Research*, volume 26, 7405-7427 (2019).

Personopplysningsloven (2018). *Lov om behandling av personopplysninger (personopplysningsloven)*. (01.05.2021-LOV-2018-06-15-38). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2018-06-15-38/>

Tanaka, M., Nakayama, J. (2017). *Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life*. Allergology International. Volume 66, Issue 4, October 2017, Pages 515-522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>

Thursby, E., Juge. N. (2017). *Introduction to the human gut microbiota*. Biochem J . 2017 Jun 1; 474(11): 1823–1836. Published online 2017 May 16. doi: 10.1042/BCJ20160510

Xiong, C., Stiboller, M., Glabonjat, R.A., Rieger, J., Paton, L., Francesconi, K.A. (2020). *Transport of Arsenolipids to the Milk of a Nursing Mother after Consuming Salmon Fish*. April 2020. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 61:126502. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126502

Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D. (2018). *Role of the gut microbiota in nutrition and health*. BMJ 2018;361:k2179 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>

Victora, C.G., Bahl, R., Barros, A.J., França, G.V., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M.J., Walker, N., Rollins, N.C. (2016). *Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect*. Lancet (2016) 387(10017):475–90. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01024-7

Wang, J., Hu, W., Yang, H., Chen, F., Shu, Y., Zhang, G., Liu, J., Lui Y., Li, H., Guo, L. (2020). *Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food*. Environment International. Volume 138, May 2020, 105600. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105600>

World Health Organization. (2018). *Arsenic*. Hentet 20.04.21 fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>

ARTIKKEL

Arsen via morsmelk og diversitet i spedbarns tarmflora

Ida Valstad

Artikkelen skal sendes til
Tidsskriftet den norske Legeforeningen
<https://tidsskriftet.no>

Sammendrag

Bakgrunn: Tarmfloraens økosystem har sammenheng med mange fysiske og psykiske sykdommer, sammensetning og diversitet av ulike bakteriestammer- og arter har vist seg å være en viktig determinant for å opprettholde god vertshelse. Kunnskap om faktorer som bidrar til å fremme en tarmflora med høy biodiversitet er viktig. Nordmenn er hyppig eksponert for arsen via konsumering av fisk og sjømat. Derfor undersøker denne studien hvordan total arsen i morsmelk påvirker spedbarns diversitet i tarmflora ved 30 dagers alder. En periode hvor tarmen er i en viktig etableringsfase.

Materiale og metode: Studien bruker data fra den prospektive tarmflorastudien, NoMIC. Totalt undersøker vi n=99 mor-barn-par. Vi har gjort en lineær regresjonsanalyse for å undersøke det aktuelle.

Resultater: Vi fant ingen signifikant sammenheng mellom arsen i morsmelk og diversitet i tarmflora.

Fortolkning: En mulig forklaring på hvorfor vi ikke fant sammenheng mellom arsen og diversitet kan være fordi mødrene jevnt over hadde relativt lave konsentrasjoner av arsen i morsmelken, mødrene var hovedsakelig eksponert for de mindre farlige, organiske arsenforbindelsene som ikke påvirker tarmfloraen i like stor grad som de uorganiske eller fordi avføringsprøvene er tatt på et for tidlig tidspunkt i tarmfloraens etableringsfase. Replikasjon av studien med flere avføringsprøver ved ulike tidspunkt gjør vurderes.

Introduksjon

Arseneksponering er et globalt folkehelseproblem og arsen er derfor listet på Verdens helseorganisasjons (WHO) ti mest bekymringsverdige kjemikalier som mennesker daglig blir eksponert for (World Health Organization, 2018). I mange land er arsen i drikkevann et stort problem. I Norge skjer arseneksponering primært via inntak av fisk og annen sjømat (Molin, 2017). Foruten i drikke og kost - kan eksponering av arsen skje via innånding av luftbårne arsenpartikler og dermal absorpsjon av arsenforurenset materiale (World Health Organization, 2018).

Helsekonsekvensene av eksponering for arsen er mange og mest kjent er den høytoksiske effekten uorganisk arsen (iAs) har på levende organismer, særlig ved kronisk eksponering. I tillegg er iAs et potent carcinogen som kan påvirke blant annet hud, blære, hjertet og lunger (Carignan, Karagas, Punshon, Gilbert-Diamond & Cottingham, 2015). Helsekonsekvensene av eksponering for organisk arsen (orgAs) har lenge vært antatt å være harmløse. Men en toksitetsstudie fra 2014 (Meyer, Schulz, Jeibmann, Taleshi, Ebert, Francesconi & Schwerdtle, 2014) viser at orgAs kan ha cytotoksiske effekter på dyrkede humane blære- og leverceller. I samme studie antyder forskerne at noen organiske arsenmetabolitter har cytotoksiske effekter som kan krysse blod-hjerne barrieren. Derfor kan orgAs være en risiko ved kritiske faser som tidlig utvikling av hjerne- og nervesystemet (Meyer, et al., 2014).

Arsen påvirker også tarmflora ved at tarmbakterier metaboliserer arsen slik at det dannes andre metabolitter med varierende toxicitet. Arseneksponering kan gi komposisjonelle- og funksjonelle endringer i mikrobiomet ved at transformasjon gjennom metabolisering er en toveis interaksjon hvor arsenet kan ødelegge visse viktige bakterier i tarmfloraens økosystem (Coryell, Roggenbeck & Walks, 2019). Arsens påvirkning på tarmflora er derfor uheldig, da tarmen er et habitat for mangfoldig og dynamisk mikrobielt økosystem og spiller en avgjørende rolle i funksjoner som å opprettholde helse (Morelli, 2008). Tarmfloraen fungerer som en barriere for patogener og regulering av inflammatoriske responser ved å stimulere immunforsvaret. Tarmmikrobiell ubalanse (dysbiose) knyttes til ulike sykdommer, fedme, diabetes og betennelsesrelaterte lidelser (Schippa & Conte, 2014).

En forutsetning for god tarmflora er optimale koloniseringsforhold mens etableringen av tarmens økosystem skjer. Det ufødte barnet har en steril tarm i mors livmor som blir kolonisert med de første bakteriene barnet blir eksponert for under og etter fødsel (Dominguez-Bello, Costello, Contreras, Margis, Hidalgo, Fierer & Knight, 2010). Dernest vil den andre dominerende determinanten for kolonisering av tarmflora være barnets næringskilde; morsmelk og/eller morsmelkerstatning (Le Doare, Holder, Bassett & Pannaraj, 2018) og videre innføring av fast føde. Barnets tarmflora er dynamisk frem til barnet er tre år, og vil være nokså stabilt videre inn i voksen alder (Tanaka & Nakayama, 2017).

Man vet ikke nok om hvordan arseneksponering påvirker spedbarnets tarmflora i en etableringsfase, men dersom det påvirker tarmfloraen tidlig er det sannsynlig at de også har langsiktige konsekvenser på barns helse. Spedbarn kan bli eksponert for arsen gjennom transplacentale passasje, morsmelk (Concha, Nermell & Vahter, 1998), samt ovennevnte eksponeringskilder. Studier på morsmelk (Xiong, Stiboller, Glabonjat, Rieger, Paton & Francesconi, 2020)(Stiboller, Raber, Gjengedal, Eggesbø & Francesconi, 2017) og ammende kvinner (Grandjean & Murata, 2007)(Samanta, Dipankar, Badal, Mandal, Chowdhury, Chakraborti & Sad, 2007) med ulik eksponeringsgrad av arsen, viste at arsen går over til morsmelk hos de aller fleste. Særlig fant man høye konsentrasjoner av arsen i morsmelk hos kvinner med høy arsenisk kroppsbyrde (Samanta et al., 2007).

Målet med denne studien er å undersøke hvordan arseneksponering via morsmelk påvirker spedbarnets diversitet i tarmflora ved 1 måneders alder - en kritisk og følsom periode for utvikling og etablering av tarmflora i spedbarnets liv (Morelli, 2008).

Metode og materialer

I denne studien er det anvendt data fra tarmflorastudien blant nyfødte (NoMIC). Studien er en kohortstudie der mødre og deres barn følges opp fra fødsel og gjennom spedbarnsalder.

NoMIC (Norwegian Microbiota Cohort) ble opprettet for å undersøke kolonisering av spedbarnets tarm, samt om det var sammenheng mellom tarmflora og mors og barns helse. Deltakere til studien ble rekruttert ved Sykehuset i Østfold (2002-2005) av lege eller jordmor på sykehusets fødeavdeling. Flytende norsk og bosted i Østfold fylke var inkluderingskriterier for deltakelse (Dahl, Stigum, Valeur, Iszatt, Lenters, Peddada, Bjørnholt, Midtvedt, Mandal & Eggesbø, 2018). Mødrene ble bedt om å samle inn 25 ml morsmelk daglig i åtte dager da barnet var mellom to uker og to måneder i samsvar med samleprotokoll benyttet av WHO. Prøvetaking ble utført over flere dager for å redusere variasjonen for motivet i estimert eksponeringsnivå (Eggesbø, Thomsen, Jørgensen, Becher, Odland & Longnecker, 2011).

I tillegg skulle de samle inn én avføringsprøve fra mor (fire dager postpartum) og avføringsprøver fra barna i løpet av syv tidsperioder: da barna var fire og ti dager gamle, etter én og fire måneder, og prøver ved ett-, to- og tolv års alder. Prøvene ble hentet av studiepersonell fra Folkehelseinstituttet samtidig med en melkebeholder med morsmelk på 200 ml og fekal materiale til analyse. Prøvene ble deretter lagret i Folkehelseinstituttets biobank. Tarmmikrobiell sammensetning er analysert etter protokoll fra Earth Microbiome Project (Iszatt, Janssen, Lenters, Dahl, Stigum, Knight, Mandal, Peddada, González, Midtvedt & Eggesbø, 2019) og er analysert ved hjelp av en Illumina HiSeq 2000-maskin. I slike analyser blir DNA fra avføringsprøvene ekstrahert via 16S rRNA-genamplikonsekvensering av V4-regionen (Iszatt, et al., 2019).

Deltakerne svarte også på spørreskjema da barnet var én måned, seks måneder, ett år, to år og ti-tolv år gammelt. Der ble det blant annet innhentet informasjon om inntak av fisk og sjømat. Det ble også koblet til informasjon fra Norsk Medisinsk Fødselsregister (MFR) om mors alder, fødselsmetode, utdanning, paritet, barnets kjønn og fødselsvekt (Folkehelseinstituttet, 2017).

Totalt takket 601 mødre ja til å delta, og 89% av disse leverte fekale prøver som førte til en kohort på $n=552$ barn. Av disse mødrene var det 321 hvis brystmelkprøver hadde blitt analysert for giftstoffer, noe som tilsvarte 333 barn (inkludert flerfødsler); 5 hadde ikke mikrobiominformasjon på grunn av tapte prøver som etterlot 328 barn med måling av giftstoffer og informasjon om tarmmikrobiomdiversitet. Trehundre og syv spedbarn fikk målt både kjemikalier og fekale prøver ved 1 måneds alder (Dahl, et al., 2018).

Utvalg

Blant de 307 mødrene hvis morsmelk ble analysert for arsen, var det 102 som hadde levert avføringsprøve fra barna på dag 30. Datasettet hadde 3 outliers som ble ekskludert. Utvalget ble til slutt $n=99$ mor-barn-par. Oppgaven vil undersøke tarmfloraprøvene som ble tatt da barna 30 dager, altså 1 prøve per barn.

Utfall

Den avhengige variabelen i analysen (utfallsvariabelen) er diversitet i tarmflora. Det er en kontinuerlig variabel som er oppgitt som Shannon (H). Shannon er en arts mangfoldindeks, kalt Shannon diversity index som viser biologisk mangfold i tarmflora. Indeksen baserer seg på antall tilstedeværende arter og antall individer per art. Flere arter og god fordeling per art, gir større biodiversitet i tarmfloraen. I analysen oppgis mangfold med et indeksnummer angitt som (H), og som kan konverteres til antall arter (Morris, Caruso, Buscot, Fischer, Hancock, Maier, Meiners, Müller, Obermaier, Prati, Socher, Sonnemann, Wäschke, Wubet, Wurst & Rilling, 2014). I regresjonsanalysene er Shannon inkludert som en kontinuerlig variabel. I tillegg dikotomiserte vi variabelen til lav og høy Shannon (H). Vi tok utgangspunkt i gjennomsnittsverdien på total Shannon (100% av utvalget) = $2,73 H$, og delte opp deretter. Gruppen med lav Shannon hadde verdi under $2,72 H$ ($n=50$), gruppen med høy Shannon hadde verdi over $2,73 H$ ($n=49$).

Eksponering

Den uavhengige variabelen (eksponering) er arsen og er oppgitt som $\mu\text{g}/\text{kg}$. Den viser den totale arsen (tAs) konsentrasjonen i morsmelk. Arsen ble inkludert som en kontinuerlig variabel i analysene. Morsmelkprøvene som skulle undersøkes for arsen ble analysert ved Universitetet i Graz. For å kartlegge nivåer av arsen i materialet er det foretatt HPLC (High Performance Liquid Chromatography) og molekylær spektroskopi. Ved hjelp av denne analysemetoden fant man at alle av de 300 analyserte prøver prøvene inneholdt arsen i ulike former (Stiboller, et al., 2017).

Potensielle Confoundere

For å besvare problemstillingen vil vi også inkludere potensielle confoundere fordi disse variablene på ulike måter er assosiert med både eksponering (arsen) og den avhengige variabelen (biodiversitet). Basert på en DAG (directed acyclic graph), fant vi at følgende variabler er confunderende faktorer som skal justeres for i analysen: paritet, mors alder, BMI (kg/m^2), utdanning, samt grad av amming frem til 1 måneds alder. Da alle mødre fortsatt ammet ved 1 måneds alder trengte vi ikke justere for den. Alle confoundere er kontinuerlige variabler, utenom utdanning. "Utdanning" er oppgitt som en ordinal variabel med to kategorier; lav/middels (grunnskole/videregående) og høy utdanning (høgskole/universitet). I tillegg justerte vi for barnets kjønn, fødselsmetode (keisersnitt/vaginal fødsel) og etnisitet (norsk/ikke-norsk) - alle faktorer som kan tenkes å påvirke utfallet. Disse variablene er alle ordinale/nominale.

Antibiotikabruk kan påvirke tarmmikrobiota (Bäckhed, Roswall, Peng, Kristiansen, Dahlgren & Wang, 2015), men ingen av barna hadde gjennomgått antibiotikakur på dette tidspunktet, så antibiotikabruk var ikke med i analysene. Mors inntak av fisk (g/uke) er kun assosiert med eksponering i DAGen, men vi kan ikke utelukke at det kan være en pil fra fiskeinntak til barnets diversitet hvilket ville gjort fiskeinntak til en confounder. Derfor vil vi også kjøre en egen analyse hvor vi også justerer for inntak av fisk og sjømat. Dette er kontinuerlige variabler.

Statistikk

De ulike variablene som er beskrevet over er oppsummert ved hjelp av gjennomsnitt, SD og prosentandeler. For å teste forskjeller i innhold av arsen ($\mu\text{g}/\text{kg}$) i morsmelk, mors alder, utdanning, BMI (kg/m^2), grad av amming og paritet mellom deltakere med høy og lav diversitet i tarmfloraen benyttes t-tester og kji-kvadrat-tester. For å undersøke sammenhengen mellom arseneksponering og diversitet i tarmflora gjøres en lineær regresjonsanalyse. Vi gjorde analysen ujustert, justert for barnet kjønn, paritet, fødselsmetode, mors alder, etnisitet, BMI (kg/m^2) og utdanning (Modell 1) og i tillegg for inntak av sjømat (Modell 2).

Det statistiske signifikansnivået er satt til 0,05. Vi benytter programvaren SAS JMP 15,0.

Etikk

NoMIC studien innhentet informert samtykke fra mødrene før studiene startet slik personvernloven krever (Personopplysningsloven, 2018, § 9-10). Studien er behandlet og godkjent av Datatilsynet og Regionale Komiteer for medisinsk- og Helsefaglig forskningsetikk. Data, svar på spørreskjema og biologisk materiale er lagret aidentifisert (med løpenummer). For å få tilgang til materiell for anvendelse i denne studien er det sendt protokoll og tilleggssøknad til REK, referansenummeret til søknaden er: 17841.

Resultater

Tabell 1. Beskrivelse av utvalget

I utvalget var gjennomsnittlig verdi på Shannon 2,73 H (SD 0,66) og gjennomsnittlig arsenkonsentrasjon 0,42 (SD 0,36) $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mødrene hadde en gjennomsnittsalder på 30,7 (SD 4,15) og en gjennomsnittlig BMI på 23,6 kg/m^2 (SD 4,30). Barnas kjønn var jevnt fordelt (56% guttebarn, 44% jentebarn). De aller fleste (85%) hadde norsk etnisitet. Nesten halvparten (45%) var førstegangsfødende og majoriteten (76%) hadde høy utdanning. Nesten alle (95%) fullammet barna ved 1 måneds alder, mens resten delammet. En fjerdedel av barna ble forløst med keisersnitt. Innhold av arsen i morsmelk, mors alder, utdanning, forløsningsmetode, barnets kjønn, paritet, etnisitet og grad av amming varierte ikke mellom mødre med høye og lave

Shannon verdier. Inntak av fisk var derimot høyere blant mødre med høye Shannonverdier, særlig gjaldt dette kvinnene som spiste fet fisk.

Tabell 1. Beskrivelse av utvalget, totalt og fordelt på lave og høye Shannon verdier.

	Gjennomsnitt (SD)			p-verdi
	Total n=99	Lav Shannon (< 2,72 H) (51%) n=50	Høy Shannon (> 2,73 H) (49%) n=49	
Shannon (H)	2,73 (0,66)	2,19 (0,39)	3,28 (0,34)	
Arsen (µg/kg)	0,42 (0,36)	0,38 (0,35)	0,45 (0,38)	0,376
Mors alder (i år)	30,74 (4,15)	30,04 (3,78)	30,91 (4,49)	0,289
BMI (kg/m ²)	23,62 (4,30)	23,17 (3,56)	24,08 (4,94)	0,288
Inntak fet fisk (g/uke) (n=84)	27,09 (28,45)	22,39 (23,51)	32,26 (32,58)	0,106
Inntak fiskelever (g/uke) (n=96)	0,81 (5,28)	0,80 (3,95)	0,82 (2,44)	0,973
Inntak krabbe (g/uke) (n=85)	2,01 (3,18)	2,07 (3,17)	1,95 (3,22)	0,857
Inntak torsk (g/uke) (n=95)	29,77 (28,48)	24,70 (27,31)	24,95 (28,93)	0,072
Utdanning (%) (n=96)				0,054
Lav	24	32	15	
Høy	76	68	85	
Etnisitet (%) (n=97)				0,054
Norsk	85	78	92	
Ikke-norsk	15	12	8	
Amming (%) (n=76)				0,414
Fullamming	95	97	93	
Delammet	5	3	7	
Ingen amming	0	0	0	

Paritet (%)				0,382
0	45	48	43	
1	35	34	37	
2	14	16	12	
3 / > 3	6	2	8	
Forløsningsmetode (%)				0,272
Sectio	25	30	20	
Vaginal	75	70	80	
Barnets kjønn (%)				0,769
Gutt	56	56	53	
Pike	44	44	47	

**p*-verdi for forskjell mellom lav/høy Shannon

Sammenheng mellom diversitet i tarmflora og arsen i morsmelk

I en lineær regresjonsmodell var ikke arsen assosiert med Shannon index, og heller ikke når det var justert for mors alder, BMI (kg/m²), paritet, mors etnisitet, grad av amming, barnets kjønn eller forløsningsmetode. Det var imidlertid en tendens til en negativ assosiasjon når sammenhengen ble justert for inntak av fisk og sjømat.

Tabell 2. Sammenheng mellom diversitet i tarmflora og arsen i morsmelk. Lineære regresjoner.

	Ujustert		Justert			
	βkoeffisient med 95% KI	<i>p</i> -verdi	Modell 1		Modell 2	
			βkoeffisient med 95% KI	<i>p</i> -verdi	βkoeffisient med 95% KI	<i>p</i> -verdi
Arsen (µg/kg)	0,13 (2,43-2.83)	0,194	0,09 (-0,26-0,577)	0,459	-0,107 (-0,56-0,23)	0,414

Diskusjon

I denne studien har vi undersøkt om innhold av arsen (tAs) i morsmelk hadde en sammenheng med biodiversitet i tarmflora hos 30 dager gamle spedbarn forløst ved Sykehuset i Østfold. Vi fant ingen signifikant sammenheng mellom arsen i morsmelk og diversitet i tarmflora.

Det kan være flere forklaringer på hvorfor vi ikke har funnet sammenheng slik vi antok å gjøre basert på resultater fra andre lignende studier. I en studie fra Bangladesh (Dong, Shulzhenko, Lemaitre, Greer, Peremyslova, Quamruzzaman, Rahman, Hasan, Joya, Golam, Christiani, Morgun & Kile, 2017) så man endring i mikrobiota forenlig med dysbiose hos barn (n=50) med høy arseneksponering. De samme resultatene ble påvist i en studie (Brabeck, Wright, Ly, Wong, McClimans, Tokarev, Lamendella, Sherchand, Shrestha, Uprety, Dangol, Tandukar, Sherchand & Sherchang, 2020) fra Nepal (n=42) hvor høy arsenisk eksponering hadde sammenheng med utarming av gunstige tarmbakterier hos voksne. I en amerikansk studie så forfatterne (Hoen, Madan, Li, Coker, Lundgren & Morrison, 2018) at selv moderate mengder arseneksponering hadde negative konsekvenser på tarmmikrobiomet for spedbarn (n=204) ved seks ukers alder. I tillegg har musestudier (Wang, Hu, Yang, Chen, Shu, Zhang, Liu, Lui, Li & Guo 2020)(Chiu, Warner, Nowak, Flaws & Mei, 2020) vist at arseneksponering har egenskaper forenlig med å kunne ha negativ påvirkning på tarmmikrobiell taxa hos nyfødte, unge og voksne mus. Nyfødte og unge mus fikk større endring i mikrobiomet enn voksne. Samme studie (Chiu, et al., 2020) fant dessuten ut at arsen påvirker tarmmikrobiomet på en kjønnsesifikk måte, hvor hannmus er mer sårbare for arsenisk påvirkning på tarmmikrobiomet enn hunnmus. Humanstudier har også vist at arsen påvirker tarmmikrobiomet på en kjønnsesifikk måte, her er også gutter mest utsatt (Hoen, et al., 2018).

En av grunnene til at vi har fått andre resultater enn ovennevnte studier kan være fordi hovedeksponeringskilden for arsen er ulik. Alle mødrene i studien vår har tilsynelatende blitt primærekspontert for tAs gjennom kosthold (fisk og sjømat) da vi kunne se en korrelasjon mellom inntak av fisk og sjømat opp mot brystmelkens tAs-konsentrasjon. Her så vi at et høyt inntak av fisk og sjømat, viste høyere tAs i morsmelken. Funn fra andre studier som har både har antatt (Stiboller, et al., 2017) eller påvist (Xiong, et al., 2020)(Björklund, Vahter, Palm, Grandér, Lignell & Berglund, 2012) en sammenheng mellom arsenkonsentrasjon i morsmelk etter inntak

av fisk og sjømat har også hatt samme resultat. De aller fleste av mødrene i kohorten vår rapporterte at de hadde hatt et jevnt inntak av arsenforurenset mat (fisk og sjømat) under svangerskapet. Dette vil gi både mor og foster en subkronisk høy eksponering av tAs, da arsen påvirker fosteret prenatalt gjennom transplacental passasje (Carignan, et al., 2015). Kronisk og subkronisk arseneksponering via mat og drikke er helseskadelig og vil ifølge Wang, et al. (2020) endre tarmmikrobiomet betydelig. Dersom de ammende kvinnene fortsatte med et jevnt inntak av arsenforurenset mat gjennom ammeperioden, vil spedbarnas tarmmikrobiom bli ytterligere eksponert gjennom hele denne perioden. Det er derfor mulig at våre avføringsprøver er tatt i en tidsperiode (30 dager) hvor det er for tidlig å se en betydelig endring i tarmmikrobiomet til spedbarna, og derfor for tidlig for å gi en Shannonrespons. Studien hadde kanskje hatt andre resultater dersom vi hadde gjort analyser med flere prøvetakningstidspunkt for å følge tarmmikrobiomets utvikling. Ved å undersøke avføringsprøver over tid kan man få kunnskap om mikrobiomets utvikling, samt gruppens normalvariasjon av Shannon.

Ved de ovennevnte studier med hensikt om å undersøke sammenheng mellom arsen og tarmmikrobiom har deltakerne blitt eksponert for arsen gjennom deres lokale drikkevann med høye nivåer av arsen. I Norge ligger arsenkonsentrasjonen på knappe 0,2 µg/L i naturlig, uforurenset vann (Folkehelseinstituttet, 2018) i motsetning til eksempelvis et arsenforurenset område i Bangladesh hvor tAs-konsentrasjonen ligger på 218,8 µg/L (Dong, et al., 2017). I drikkevann er det høyere forekomst av iAs enn i fisk og sjømat, hvor majoriteten av arsenet er organisk. iAs har betydelig lengre halveringstid enn den organiske forbindelsen og vil derfor lettere akkumuleres i kroppens keratin- og lipidrike områder enn de organiske - og mindre farlige arsenformene (Kenyon, Razo & Hughes, 2005). For å produsere morsmelk mobiliseres fettlagre som frigjør blant annet miljøgiftene som er lagret der (Mead, 2008). Sannsynligvis vil det være mer uheldig å ha en arseneksponeringskilde fra drikkevann (med mer iAs) enn for eksempel kosthold (med flere organiske arsenforbindelser). Men selv om de organiske arsenformene er mindre helseskadelige for blant annet tarmflora, har studier (Molin, 2017) vist at OrgAs kan ha cytotoksiske effekter på dyrkede humane blære- og leverceller, og som nevnt innledningsvis kan arsen i tillegg gi komposisjonelle- og funksjonelle endringer i mikrobiomet (Coryell, et al., 2019) Ifølge European Food Safety Authority(EFSA)(2009) er nordmenn det folkeslaget i Europa som får i seg høyest konsentrasjoner av arsen via kosten, mye på grunn av en diett med stort

fiskeinntak. Derfor er vår problemstilling relevant og viktig i det norske folkehelsearbeidet, særlig dersom man tar utgangspunkt i at majoriteten av den norske befolkningen følger Helsedirektoratets anbefalinger om å spise to til tre fiskemiddager i uken (noe som tilsvarer 300-450 gram fisk) (Helsedirektoratet, 2016) noe som fører til at nordmenn får i seg relativt store mengder fisk - og derfor mye arsen. Våre deltakere har dog rapportert (via spørreskjema) at de aller fleste har hatt en diett med mye mindre konsumering av fisk og sjømat enn helsedirektoratet anbefaler. Dette må hensyntas ved tolkning av funn.

I tillegg til andre primæreksponeeringskilder av arsen for våre deltakere sammenlignet med lignende studier, hadde mødrene relativt lave konsentrasjoner av tAs i morsmelken med et gjennomsnitt på 0,42 µg/kg sammenlignet med lignende studier fra USA (Hoen, et al., 2018)(Carignan, et al., 2015), Nepal (Brabeck, et al., 2020) India (Samantha, et al., 2007) og Bangladesh (Dong, et al., 2017) der konsentrasjonene i morsmelk var betydelig høyere. Våre resultater kan muligens forklares med at konsentrasjonene av tAs var for lave til å gi en utslag på Shannon. I motsetning til nevnte studier fant kunne det i våre funn se ut som gruppen med høyest konsentrasjon av tAs hadde en høyere Shannonscore enn de med lave tAs verdier, men dette var ikke et signifikant funn. Vi fant også ut at deltakerne med høyere tAs og høy Shannon også var blant gruppen med "høy utdanning". Antagelig kan høyere Shannonverdi blant denne gruppen forklares med andre mekanismer slik som generelt bedre helse relatert til høyere sosioøkonomisk status. De sosioøkonomiske (SØS) ulikhetene i helse er godt etablert og kanskje har de biologiske mekanismene som ligger til grunn for disse assosiasjonene sammenheng med diversitet i tarmmikrobiomet. Særlig på bakgrunn av kunnskap om at mikrobiomets sammensetning og funksjon er en viktig determinant for opprettholdelse av god helse (Kriss, Hazleton, Nusbacher, Martin & Lozuponed, 2018). En stor (n=1672) britisk tvillingstudie (Bowyer, Jackson, Le Roy, Lochlainn, Spector, Dowd & Steves, 2019) indikert at det finnes sammenheng med høyere SØS og høyere diversitet i tarmflora. Kanskje kan andre helserelaterte faktorer som livsstil- og ernæring forklare dette funnet i vår studie.

Avslutningsvis er det viktig å påpeke at ingen av de ovennevnte studier anvendte Shannon-index, men undersøkte spesifikke bakterierarter og stammer noe som kompliserer muligheten til å sammenligne resultatene. Dessuten er det kun én (Hoen, et al., 2018) av de ovennevnte studiene som undersøkte sammenheng mellom endring i tarmmikroiom hos spedbarn via morsmelk og/eller morsmelkerstatning.

Tarmmikrobiomet er dynamisk og vil gradvis modnes frem til barnet er tre år gammelt. De viktigste driverne for utvikling av tarmflora er forløsningsmetode (keisersnitt/vaginal), kosthold og antibiotikabruk (Bäckhed, et al., 2015). Et nyfødt barn som modner og utvikler ulike organer og forsvarsmekanismer er spesielt sårbare for faktorer som kan ha negative innvirkninger på helsen. Beskyttelse av dette er derfor viktig i barndommen. Et beskyttende element er amming (Pajewska-Szmyt, Sinkiewicz-Darol, & Gadzala-Kopciuch, 2019) og de helsemessige fordelene med morsmelk for spedbarn er veldokumentert og ubestridelige (Mead, 2008). Det er ingen tvil om at morsmelk beskytter spedbarnet for ulike lidelser og risiko for sykdom på kort- og lang sikt (Pajewska-Szmyt, et al., 2019), og funn fra ulike mikrobiomstudier de siste to tiårene belyser de potensielle mekanismer der amming kan forbedre mikrobiomet som er involvert i mange aspekter av menneskers helse (Victoria, Bahl, Barros, França, Horton, Krasevec, Murch, Sankar, Walker & Rollins, 2016)(Chi, Bian, Gao, Ru, Tu & Lu, 2016). Tarmmikrobiomet kan tilsynelatende lett forstyrres av miljøskadelige stoffer, slik som arsen - men dette gjaldt imidlertid ikke hos våre mor-barn-par og det ser ut til at arseneksponering for våre deltakere ikke utfordrer fordelene ved amming.

Styrker og svakheter

Denne studien er basert på data fra en omfattende prospektiv kohort. Hovedmengden av eksisterende data er i form av observasjonsstudier. Utvalget vårt på n=99 mor-barn-par er et relativt stort utvalg sammenlignet med lignende studier. Deltakerne (mødrene) i studien er nokså aldersmessig og sosialt homogene, hvor 76% av deltakerne hadde høy utdanning, mot 24% med lav/middels utdanning. Dette er representativt for den norske befolkningen forøvrig, da tall fra Statistisk sentralbyrå (SSB)(2021) viser at 24,8% voksne blant Norges befolkning hadde lav utdanning (grunnskole), mot 75,2% voksne med høy utdanning (videregående og/eller høyere utdanning) i 2020. Det er ikke overraskende at majoriteten av deltakerne hadde høyere

utdanning, da i likhet med mange andre studier er denne gruppen som typisk deltar på studier. Høyere utdanning er forbundet med bedre helse, og derfor må denne skjevheten tas med i vurderingen av våre funn.

Studien har vurdert arsenkonsentrasjoner i morsmelk mot diversitet i tarmflora basert på Shannon-index (H) og bruker ingen andre biometriske mål (blodprøver) selv om dette også er korrelert med utvikling av tarmmikrobiota gjennom vertsfysiologi (Bäckhed, et al., 2015). Vi har benyttet en artsmangfoldsindeks som mål på biodiversitet i våre studier. Svakheten ved bruk av artsmangfoldindekser er at biodiversitet er en flerdimensjonal egenskap som er vanskelig å tallfeste. Resultatene er avhengig av fortolkning av indeksverdiene og det er vanskelig å kvantifisere biologisk mangfold. Et spørsmål er om Shannon her er hensiktsmessig å bruke i studien, eller om vi burde sammenligne med spesifikk taxa (Morris, et al., 2014). Arsenet i morsmelken til mødrene i studien har kanskje påvirket spesifikke aspekter ved ved mikrobiomet som ikke Shannon-indexen kan fange opp (slik andre ovennevnte studier har påvist).

Studiens hovedstyrke er at alle spedbarna er 30 dager gamle, en periode hvor mikrobiomet er jevnt utviklet. Nesten alle (95%) barna ble eksklusivt ammet på dette tidspunktet og ingen hadde gjennomgått antibiotikakur. Det er jevn fordeling av kjønn blant spedbarna (56% gutter og 44% piker). Det gir derfor en god mulighet for sammenligning og er et godt utgangspunkt for å besvare problemstillingen.

Konklusjon

I denne studien hvor vi undersøkte sammenhengen mellom Shannonscore hos spedbarn og konsentrasjon av arsen i morsmelk fant vi i motsetning til hva vi forventet ikke en sammenheng mellom lav Shannonscore og høy tAs-konsentrasjon. En mulig forklaring kan være at tAs-konsentrasjonene var for lave til å gi en respons eller at avføringsprøvene er tatt på et for tidlig tidspunkt. Våre resultater tyder på at arsen i morsmelk ikke påvirker spedbarns tarmmikrobielle sammensetning ved lave tAs-konsentrasjoner, hvor arseneksponeringen hovedsakelig er via fisk og sjømat. Funnene må dog tolkes med aktsomhet og bør replikeres med et større utvalg i kohorter hvor tAs-konsentrasjonene er høyere, med flere avføringsprøver ved ulike tidspunkt hos barna for å følge med på tarmmikrobiomets dynamiske utvikling og i land

eller steder med høyere forekomst av konsumering av tAs-forurenset mat eller drikke. Flere toksisitetstudier på eksponeringsvei (drikkevann/kosthold) bør i tillegg vurderes grundigere når det gjelder forstyrrelse av mikrobiomet (Wang, et al. 2020). Tross arsen i morsmelk er amming fortsatt den foretrukne ernæringsmetoden og vi kan ikke implisere at arsen påvirker et 30 dager gammelt spedbarns diversitet i tarmflora.

Litteraturliste

Björklund, K.L., Vahter, M., Palm, B., Grandér, M., Lignell, S., Berglund, M. (2012). *Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study*. Environ Health. 2012; 11: 92. doi: 10.1186/1476-069X-11-92

Brabeck, J.L., Wright, J., Ly, T., Wong, H.T., McClimans, C.J., Tokarev, V., Lamendella, R., Sherchand, S., Shrestha, D., Uprety, S, Dangol, B., Tandukar, S., Sherchand, J.B., Sherchang, S.P. (2020). *Arsenic disturbs the gut microbiome of individuals in a disadvantaged community in Nepal*. Heliyon. 2020 Jan; 6(1): e03313. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03313

Bowyer, R.C.E, Jackson, M.A., Le Roy, C., Lochlainn, M.,N., Spector, T.D., Dowd, J.B., Steves, C.J. (2019). *Socioeconomic Status and the Gut Microbiome: A TwinsUK Cohort Study*. Microorganisms. 2019 Jan 11;7(1):17. doi: 10.3390/microorganisms7010017.

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Wang, J. (2015). *Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life*. Cell Host & Microbiome, VOLUME 17, ISSUE 5, P690-703, MAY 13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>

Carignan, C.C., Karagas, M.R., Punshon, T., Gilbert-Diamond, D., Cottingham, K.L. (2015). *Contribution of breast milk and formula to arsenic exposure during the first year of life in a U.S. prospective cohort*. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2016 Sep; 26(5): 452–457. 2015 Nov 4. DOI: 10.1038/jes.2015.69

Chi, L., Bian, X., Gao, B., Ru, H., Tu, P., Lu, K. (2016). *Sex-specific effects of arsenic exposure on the trajectory and function of the gut microbiome*. Chem Res Toxicol. 2016;29(6):949–51. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00066.

Chiu, K., Warner, G., Nowak, R.A., Flaws, J.A., Mei, W. (2020). *The Impact of Environmental Chemicals on the Gut Microbiome*. Toxicological Sciences, Volume 176, Issue 2, August 2020, Pages 253–284, DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa065>

Coryell, M., Roggenbeck, B., Walk, S. (2019). *The Human Gut Microbiome's Influence on Arsenic Toxicity*. *Curr Pharmacol Rep*. 2019 Dec; 5(6): 491–504. (2019 Nov 25.) doi: 10.1007/s40495-019-00206-4

Concha, G., Nermell, B., Vahter, M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences*, 44(2):185–190.

Dahl, C., Stigum, H., Valeur, J., Iszatt, N., Lenters, V., Peddada, S., Bjørnholt, J.V., Midtvedt, T., Mandal S., Eggesbø, M. (2018). *Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure*. *International Journal of Epidemiology*, 2018, doi: 10.1093/ije/dyy064

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Margis, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010). *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2010) 107 (26):11971-5. DOI: 10.1073/pnas.1002601107

Dong, X., Shulzhenko, N., Lemaitre, J., Greer, R.L., Peremyslova, K., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Hasan, O.S.I., Joya, S.A., Golam, M., Christiani, D.C., Morgun, A., Kile, M.L. (2017). *Arsenic exposure and intestinal microbiota in children from Sirajdikhan, Bangladesh*. *PLoS One*. 2017; 12(12): e0188487. doi: 10.1371/journal.pone.0188487

European Food Safety Authority. (2009). *EFSA assesses arsenic in food*. Hentet 10.05.21 fra <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/contam091022>

Eggesbø, M., Thomsen, C., Jørgensen, J.V., Becher, G., Odland, J.Ø., Longnecker, M.P. (2011). *Associations between brominated flame retardants in human milk and Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) in neonates*. *Environ Res*. 2011 August ; 111(6): 737–743. doi:10.1016/j.envres.2011.05.004.

Folkehelseinstituttet. (2017). *Om HUMIS-studien*. Hentet 13.10.2020 fra <https://www.fhi.no/studier/humis/om-humis/>

Folkehelseinstituttet. (2018). Kjemiske og fysiske stoffer i drikkevann. Hentet 21.05.21 fra <https://www.fhi.no/nettpub/stoffer-i-drikkevann/kjemiske-og-fysiske-stoffer-i-drikkevann/kjemiske-og-fysiske-stoffer-i-drikkevann/>

Grandjean, P., Murata, K. (2007). *Developmental arsenic neurotoxicity in retrospect*. *Epidemiology*, 18(1):25–26.

Helsedirektoratet (2016). *Kostrådene*. Hentet 10.05.2021 fra <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/kostrad-for-befolkningen>

Hoen, A.G., Madan, J.C., Li, Z., Coker, M., Lundgren, S.N., Morrison, H.G. (2018). *Sex-specific associations of infants' gut microbiome with arsenic exposure in a US population*. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 12627 10.1038/s41598-018-30581-9.

Iszatt, N. Janssen, S., Lenters, V. Dahl, C., Stigum, H., Knight, R., Mandal, S., Peddada, S., González, A., Midtvedt, T., Eggesbø, M. (2019). *Environmental toxicants in breast milk of Norwegian mothers and gut bacteria composition and metabolites in their infants at 1 month*. *Microbiome*. 2019 Feb 27;7(1):34. doi: 10.1186/s40168-019-0645-2.

Kenyon, E.M., Razo, L.M.D., Hughes, M.F. (2005). *Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate*. *Toxicol Sci*, 2005 May;85(1):468-75. doi: 10.1093/toxsci/kfi107

Kriss, M., Hazleton, K.Z., Nusbacher, N.M., Martin, C.G., Lozuponed, C.A. (2018). *Low Diversity Gut Microbiota Dysbiosis: Drivers, Functional Implications & Recovery*. *Curr Opin Microbiol*. 2018 Aug; 44: 34–40. 2018 Jul 20. doi: 10.1016/j.mib.2018.07.003

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., Pannaraj, P.S. (2018). *Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity*. Front. Immunol., 28 February 2018 | DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>

Mead, N.M. (2008). *Contaminants in Human Milk: Weighing the Risks against the Benefits of Breastfeeding*. Environ Health Perspect. 2008 Oct; 116(10): A426–A434.

Meyer, S., Schulz, J., Jeibmann, A., Taleshi, M. S., Ebert, F., Francesconi, K. A. & Schwerdtle, T. (2014). *Arsenic-containing hydrocarbons are toxic in the in vivo model Drosophila melanogaster*. Metallomics, 6 (11): 2010-4. doi: 10.1039/c4mt00249k.

Molin, M. (2017). *Verdt å vite om arsen i sjømat og ris*. Norsk tidsskrift for ernæring. Nr. 1 - 17.Mars 2017.

Morelli, L. (2008). *Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition*. J Nutr. 2008;138(9):1791S–5S.

Morris, K.E., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T., Meiners, T., Müller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S.A., Sonnemann, I., Wäschke, N., Wubet, T., Wurst, S., Rilling, M. (2014). *Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories*. Ecol Evol. 2014 Sep; 4(18): 3514–3524. doi: 10.1002/ece3.1155

Samanta, G., Dipankar D., Badal, K., Mandal, T.R., Chowdhury, D., Chakraborti, A.P., I, Sad, A. (2007). *Arsenic in the breast milk of lactating women in arsenic-affected areas of West Bengal, India and its effect on infants*. Journal of Environmental Science and Health, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. Volume 42, 2007 - Issue 12

Statistisk Sentralbyrå (2021). *Befolkningens Utdanningsnivå*. Hentet 01.08.2021 fra <https://www.ssb.no/utdanning/utdanningsniva/statistikk/befolkningens-utdanningsniva>

Stiboller, M., Raber, G., Gjengedal, E.L.F., Eggesbø, M., Francesconi, K. (2017). *Quantifying Inorganic Arsenic and Other Water-Soluble Arsenic Species in Human Milk by HPLC/ICPMS*. April 2017. Analytical Chemistry 89(11). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01276

Schippa, S., Conte, M.P. (2014). *Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health*. Nutrients. 2014 Dec; 6(12): 5786–5805. doi: 10.3390/nu6125786

Tanaka, M., Nakayama, J. (2017). *Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life*. Allergology International. Volume 66, Issue 4, October 2017, Pages 515-522. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>

Pajewska-Szmyt, M., Sinkiewicz-Darol, E., Gadzala-Kopciuch, R. (2019). *The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk*. Environmental Science and Pollution Research, volume 26, 7405-7427 (2019).

Personopplysningsloven (2018). *Lov om behandling av personopplysninger (personopplysningsloven)*. (01.05.2021-LOV-2018-06-15-38). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2018-06-15-38/>

Victoria, C.G., Bahl, R., Barros, A.J., França, G.V., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M.J., Walker, N., Rollins, N.C. (2016). *Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect*. Lancet (2016) 387(10017):475–90. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01024-7

Wang, J., Hu, W., Yang, H., Chen, F., Shu, Y., Zhang, G., Liu, J., Liu, Y., Li, H., Guo, L. (2020). *Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food*. Environment International. Volume 138, May 2020, 105600. doi: doi.org/10.1016/j.envint.2020.105600

World Health Organization. (2018). *Arsenic*. Hentet 20.04.21 fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic> den

Xiong, C., Stiboller, M., Glabonjat, R.A., Rieger, J., Paton, L., Francesconi, K.A. (2020).
Transport of Arsenolipids to the Milk of a Nursing Mother after Consuming Salmon Fish. April
2020. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 61:126502. DOI:
10.1016/j.jtemb.2020.126502



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway