



UPPSALA
UNIVERSITET

Reproduktionsstörningar hos fiskar till följd av exponering för syntetiskt östrogen och progestin

Kajsa Mattsson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Reproduktionsstörningar hos fiskar till följd av exponering för syntetiskt östrogen och progestin

Kajsa Mattsson

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Alla vertebrater har någon form av endokrint system som reglerar många viktiga processer i kroppen, däribland signalering av hormoner som är involverade i den sexuella utvecklingen. Det endokrina systemet är känsligt för störningar, särskilt sådant som rör den hormonella regleringen av könsdifferentiering. Flertalet rapporterade fall de senaste decennierna rörande könsbyten hos fiskar som levt i vatten med högt innehåll av syntetiska hormoner, vanligt förekommande i preventivmedel, har således lett till ett ökat fokus på studier av dessa ämnen. Med fokus på fiskar är därför syftet med denna litteraturstudie att undersöka vilka effekter syntetiska hormoner kan ge på deras reproduktion. Östrogen och progesteron är två steroida könshormoner som förekommer naturligt hos fiskar. De är främst förknippade med utveckling och reglering av menstruation och ägglossning hos honor, men studier har visat att de även kan påverka hanliga fiskar. Hanliga fiskar som exponerats för syntetiskt östrogen och progestin har uppvisat såväl tillbakabildade testiklar till följd av utvecklandet av äggstockar och honliga könsorgan som en mer feminin kroppsform. Även honor som exponeras får en påverkad reproduktion, då de syntetiska hormonerna leder till en minskad fertilitet till följd av en minskad ägglossning. Exponering för dessa ämnen har även visats ge effekter på fiskars beteendemönster. Studier av fiskar som exponerats för syntetiska hormoner har visat att både honor och hanars parningsbeteenden påverkas negativt av denna typ av endokrinostörande ämnen. Med dessa resultat i åtanke borde därför fortsatt fokus ligga på att finna en möjlighet att applicera denna laborativa information till praktiskt utnyttjande i naturliga miljöer, bland annat genom en mer effektiv rening av avloppsvatten, med det gemensamma målet att minska den negativa påverkan som fiskpopulationer drabbas av.

Inledning

Många organ och system i kroppen styrs och regleras av det endokrina systemet (Kavlock *et al.* 1996) som består av körtlar med specialiserade celler som syntetiserar, lagrar och utsöndrar hormoner. Utsöndringen av hormoner sker via blodomloppet till celler i kroppen där specifika receptorer aktiveras, vilka reglerar olika biologiska processer. Denna typ av hormonreglering styr många viktiga processer, såsom utvecklingen av gonader och andra könsdifferentieringar. Det endokrina systemet använder sig av extracellulär vätska för att signalera och på så sätt reglera olika funktioner i kroppen och det är känsligt för förändringar av interna och externa miljöer, speciellt ändringar som uppkommer under kritiska steg i livscykeln (Holbech *et al.* 2006, Klaassen & Watkins 2010). Miljöfarliga ämnen har sedan industrialismens början varit kända för att ha negativ påverkan på organismer, där exponering har lett till ökade fall av cancer och missbildningar. Under de senare decennierna har det även uppmärksamats att exponering för kemikalier kan leda till endokrina störningar (Guillette *et al.* 1995) då man har sett att kemikalier kan interagera med och störa syntetisering, lagring eller utsöndring av hormoner, störningar som kan komma att påverka hela organismen (Klaassen & Watkins 2010).

Förekomsten av fiskar som uppvisat förändringar av könsorganens morfologi och fysiologi samt uppvisat atypiska könsbeteenden har rapporterats i ett flertal länder (Bortone *et al.* 1989, Orlando *et al.* 2007). Detta tillsammans med en ökad förekomst av naturliga östrogener och

syntetiska hormoner i avloppsvatten (Shore *et al.* 1993) i flera länder såsom Norge (Knudsen *et al.* 1997), Sverige (Larsson *et al.* 1999), England (van Aerle *et al.* 2001) och USA (Folmar *et al.* 1996) har lett forskare till att undersöka sambandet mellan endokrinstörande ämnen och deras påverkan på organismer i akvatiska ekosystem. Endokrinstörande ämnen är naturliga eller syntetiska kemikalier som kan fungera som agonister eller antagonister till kroppens hormonreceptorer och därmed interagera med och förändra naturliga processer i kroppen (Bjerselius *et al.* 2001), något som kan vara förödande för organismer som utsätts för dessa ämnen.

Tidiga stadier i utvecklingen hos fiskar är extra känsliga för störningar (Selderslaghs *et al.* 2009) eftersom fiskar ofta har ett så kallat ”critical window” under embryogenesen. Med critical window menas en period i utvecklingen då embryot eller larven är som mest känslig för exponering för exempelvis kemikalier och ändringar i hormonhalter (Chow & Cheng 2003). Störningar i det endokrina systemet under något av de känsliga stadierna i livet kan ge bestående och allvarliga effekter (Santos *et al.* 2014). Ofta gäller det processer som är knutna till reproduktionen (Baatrup & Henriksen 2015), men endokrinstörande ämnen kan påverka kroppen på en rad olika sätt beroende på ålder hos individen (Liang *et al.* 2015) och vilken typ av exponering det gäller. Med exponering menas hur organismen i fråga har utsatts för det aktuella ämnet vilket kan syfta på koncentration av det givna ämnet, på vilket sätt individen kommit i kontakt med ämnet eller hur länge exponering har pågått.

Syntetiska hormoner och andra endokrinstörande ämnen har i flera fall sammankopplats med en negativ effekt på den del av det endokrina systemet som reglerar könsorganens utveckling och funktion hos fiskar, då förändringar har dokumenterats gällande deras sexuella differentiering och utveckling till följd av exponering för dessa ämnen (Bjerselius *et al.* 2001, Orlando *et al.* 2007, Liang *et al.* 2015) (Tabell 1). Exponering för syntetiska hormoner skulle därför i slutändan kunna innebära en påverkan på hela populationer av fiskar, eftersom reproduktionsförmågan är knuten till den sexuella utvecklingen (Han *et al.* 2014). Med fokus på fiskar är därför syftet med denna litteraturstudie att undersöka vilka effekter syntetiska hormoner kan ge på deras reproduktion.

Vad är endokrinstörande ämnen och hur sprids de?

Med endokrinstörande ämnen (endocrine disruptors) menas ”ämnen som interagerar med syntes, sekretion, transport, bindning, aktion eller elimination av naturliga hormoner som ansvarar för uppehållandet av homeostasis, reproduktion, utveckling och/eller beteende” (Kavlock *et al.* 1996). Ämnen som stör det endokrina systemet är vanligen miljögifter såsom diklordifenyltrikloretan (DDT), bisfenol-A (BPA) och dioxiner men de kan även finnas i olika läkemedel (Guillette *et al.* 1995). En stor del av de endokrinstörande ämnena som finns i miljön kommer från användningen av just läkemedel (Fent *et al.* 2006), främst sådana som innehåller olika typer av syntetiska hormoner (Holtorf 2009). Syntetiska hormoner är konstgjorda ämnen, skapade med syftet att efterlikna funktionerna av naturliga hormoner (Holtorf 2009) och eftersom användandet av dessa läkemedel har ökat de senaste åren innebär det även ökade utsläpp till miljön via avloppsvatten och industriavfall som kan spridas vidare ut till yt- och grundvatten (Corcoran *et al.* 2010). Detta kan ha oönskade konsekvenser för miljön eftersom det är svårt att förutspå hur effekterna av exponering kommer yttra sig hos andra organismer än människan (Corcoran *et al.* 2010).

Varför är fiskar känsliga?

Läkemedel består oftast av icke-polära beståndsdelar, vilket innebär att de kan passera

biologiska membran genom enkel diffusion (Corcoran *et al.* 2010). Ämnen i läkemedel som sprids ut i miljön kan därför tas upp relativt lätt av fiskar. Eftersom fiskar lever i vatten är de ständigt exponerade för de läkemedel och kemikalier som släpps ut i deras livsmiljö (Fent *et al.* 2006) och absorptionsvägarna är många. Vanligast är att lipofila ämnen tas upp av fiskar via gälarna men exponering kan även ske via födointag (Bjerselius *et al.* 2001) eller via modern då kemikalier och metaboliter av ämnen kan överföras från honan till ägget (Corcoran *et al.* 2010). Genom olika exponeringsvägar kan således syntetiska hormoner komma att påverka fiskars utveckling och reproduktion.

Ålder vid exponeringstillfället har visats vara avgörande när det gäller hur allvarliga effekterna blir. Vanligtvis är organismer som mest känsliga under kritiska utvecklingsstadier (Corcoran *et al.* 2010) vilket innefattar bland annat larvstadie, embryoniskt och juvenilt stadie, varför flertalet studier som genomförts inom detta område fokuserar på dessa stadier i utvecklingen (Liang *et al.* 2015).

Könsbestämningen hos fiskar är fortfarande ett relativt outforskat område (Hofsten & Olsson 2005), troligen på grund av att deras könsbestämning är mer diverserad mellan arterna än hos däggdjur (Scholz & Klüver 2009) eftersom fiskars utveckling av gonader och könstypiska organ kan bero på fler faktorer än just könskromosomer. Hos däggdjur är det oftast närvaron eller frånvaron av Y-kromosomen som avgör vilken kön avkomman får. Fiskar kan ha en liknande typ av kromosomal könsbestämning, men det finns fiskarter med en helt annan typ av utveckling där miljöfaktorer såsom temperatur, föda och endokrinostörande ämnen (Luzio *et al.* 2015) påverkar vilket kön embryot utvecklar. Dessa arter är således känsliga för förändringar i den omgivande miljön, vilket kan speglas i könsuppdelningen i populationen (Hofsten & Olsson 2005). Gemensamt för fiskar är dock att de är som allra känsligast för endokrina störningar under könsdifferentieringen (Holbech *et al.* 2006) vilket gör det intressant att undersöka effekten av exponering för olika störningsämnen under denna tid.

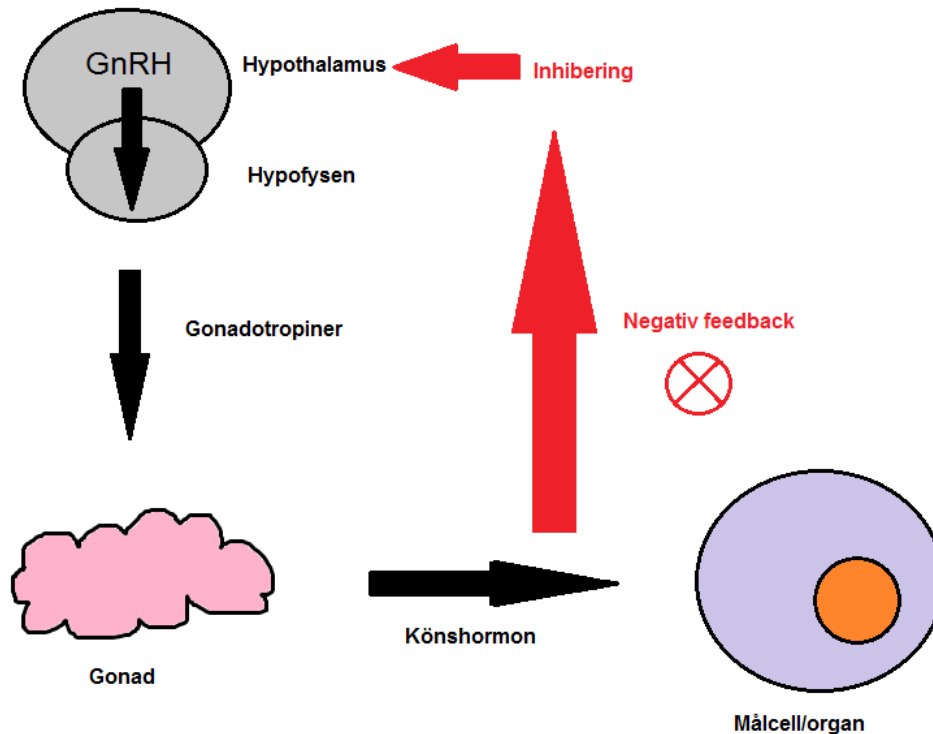
Zebrafisken (*Danio rerio*) är en populär modellorganism vid laborativa studier. Dess korta och känsliga tidiga utvecklingsstadier (Liang *et al.* 2015) samt det faktum att den genomgår en fas av juvenil hermafroditism (Holbech *et al.* 2006) gör den lämplig för studier av endokrinostörande ämnen. Möjligheten att stimulera arten till att para sig året runt bidrar även det till dess lämplighet som försöksdjur (Fenske *et al.* 2005), speciellt vid studiet av embryonal utveckling då anlagen för gonaderna uppkommer tidigt. De transparenta äggen underlättar studier av strukturella förändringar (Santos *et al.* 2014). Zebrafiskens utveckling av könen styrs vanligtvis av genetiska faktorer men processerna kan påverkas och störas av förändringar i näringsintag, temperatur eller miljöfarliga ämnen (Luzio *et al.* 2015).

Vid fältstudier används bland annat sandkrypare (*Gobio gobio*) eller moskitfiskar (*Gambusia affinis holbrooki*), fiskarter som i flera fall uppvisat negativa effekter av endokrinostörande ämnen (van Aerle *et al.* 2001, Orlando *et al.* 2007).

Hur styrs gonadernas utveckling och funktion?

Alla vertebrater genomgår någon gång under livscykeln utveckling av gonaderna, de endokrina körtlar i kroppen som reglerar utsöndringen av könshormoner och som producerar könsceller. Utsöndringen av hormoner från gonaderna styrs av hypotalamus som signalerar till hypofysen om utsöndring av gonadotropin-releasing hormoner (GnRH) vilka triggar utsöndring av gonadotropiner. Gonadotropiner är hormoner som stimulerar syntetisering och utsöndring av könshormoner från testiklar och äggstockar. Denna samverkan mellan hjärnan, hypofysen och gonaderna brukar kallas hjärna-hypofys-gonad axeln (HHG), en process som

styrts av feedbackmekanismer av de utsöndrade hormonerna (Figur 1). HHG-axeln utnyttjas ofta vid intag av olika läkemedel, såsom användandet av preventivmedel som används för att påverka honors ägglossning och fertilitet (Scholz & Klüver 2009). Eftersom preventivmedel innehåller syntetiska hormoner som efterliknar de naturliga könshormonerna innebär intag av dessa en konstant närvaro av de reglerande hormonerna vilket leder till inhibering av gonadotropinutsöndring och mognad av äggen och således uteblir möjligheten till befruktning (Klaassen & Watskins 2010).



Figur 1. Schematisk ritning över HHG-axeln och dess reglering.

HHG-axeln kan på liknande sätt modifieras och påverkas av olika endokrinstörande ämnen, där de syntetiska formerna av könshormoner är vanligt förekommande störningsämnen i naturen (Shore *et al.* 1993). Signaleringen från HHG-axeln kan hos vissa arter triggas eller inhiberas av miljöfaktorer såsom temperatur eller ljus, men det kan även påverkas av miljöhaltiga koncentrationer av syntetiska hormoner (Luzio *et al.* 2015).

Syntetiska hormoner

Progesteron

Progesteron är ett naturligt steroidhormon som styr många viktiga processer hos vertebrater såsom embryogenes och sexuell utveckling. Det kan även fungera som ett substrat vid syntetiseringen av andra viktiga hormoner, såsom testosteron och östrogen. Naturligt progesteron, P4, är främst förknippat med regleringen av typiskt kvinnliga attribut såsom reglering av ägg-tillväxt och menstruation (Liang *et al.* 2015) men hormonet finns hos både honor och hanar. Progesteroner finns även i olika syntetiska former såsom norgestrel (NGT), megestrol acetat (MTA) och syntetiskt progestin (syntetisk P4), vilka oftast används i olika typer av preventivmedel (Liang *et al.* 2015).

Östrogen

Östrogener är en typ av steroida könshormoner som utsöndras av äggstockarna hos honor och till viss del av testiklarna hos hanar. De verkar vanligen genom ligandbindning och aktivering av specifika receptorer vilka fungerar som transkriptionsfaktorer i regleringen av system och vävnader kopplade till endokrina systemet (Menuet *et al.* 2002). De bidrar främst till utvecklingen av könstypiska karaktärer och beteenden (Scholz & Klüver 2009) men de kan även påverka och ändra andra viktiga processer i en organism, och därigenom störa könsutveckling och reproduktion (Menuet *et al.* 2002).

Bildandet av naturliga östrogener sker via specifika enzymer, såsom aromatas (Fenske & Segner 2004) och de utsöndras av könsorganen (Scholz & Klüver 2009). Aromataser kan manipuleras och inhiberas så att östrogenproduktionen och dess utsöndring påverkas på olika sätt, vilket ger synliga effekter på organismen. Studier har visat att påverkan på aromataser under könsutvecklingen kan ändra kvoten av honliga och manliga gonader (Fenske *et al.* 2005). Ett exempel på en östrogen som syntetiseras av aromatas är 17β -östradiol (E_2) vilken är viktig vid bildandet och mognaden av äggstockarna (Fenske & Segner 2004).

En stor del av de endokrinstörande ämnena som sprids ut i miljön är så kallade xenoöstrogener, syntetiska östrogener som syftar att härma funktionen hos naturligt östrogen (Baatrup & Henriksen 2015). Xenoöstrogener används ofta tillsammans med syntetiskt progestin (Liu *et al.* 2012) för att kontrollera menstruation och graviditet hos kvinnor i form av preventivmedel (Baatrup & Henriksen 2015). Utvecklingen av dessa läkemedel har varit revolutionerande för människan men i fel miljö och i fel organism kan syntetiska hormoner orsaka allvarliga konsekvenser då de flesta xenoöstrogener interagerar med östrogenreceptorn och på så sätt stör normal endokrin signalering (Luzio *et al.* 2015). Detta kan i förlängningen leda till störningar på reproduktionen, vilket har setts hos fiskar (Fenske & Segner 2004).

Ett exempel på en xenoöstrogen är 17α -etinylostradiol (EE_2). Detta syntetiska hormon har en halveringstid på ca 14 dagar, en mycket längre halveringstid än naturligt östrogen. Skillnaden i nedbrytningshastighet innebär att utsläpp av EE_2 till sjöar och vattendrag kan resultera i störningar av viktiga livsprocesser, vilket är dokumenterat även vid låga nivåer (Shore *et al.* 1993).

Fältstudier och laborativa studier

Eftersom balansen mellan könshormoner kan påverka den sexuella utvecklingen hos fiskar (Fenske & Segner 2004) är det viktigt att undersöka vilka effekter utsläpp av endokrinstörande ämnen kan leda till och vad förhöjda halter i vattendrag kan innebära. Studier har visat att förändrade östrogen- och progesteronkoncentrationen under utvecklingen kan komma att påverka såväl könsbestämningen som utvecklingen av gonader (Yamamoto 1953, Fenske *et al.* 2005, Liang *et al.* 2015).

I naturliga miljöer är det ovanligt att fiskar utsätts för enskilda, korta exponeringar under en väldigt kort tid. Förändringar i väderförhållanden, så som regn, kan påverka koncentrationen av de utsläppta ämnena men generellt sett utsätts fiskar för en mer kronisk typ av exponering då utsläpp av miljöfarliga ämnen ofta är mer eller mindre konstanta under en viss tid. Den kroniska exponeringstypen är även vanligt förekommande vid laborativa studier av endokrinstörande ämnen. Dessa typer av studier använder generellt sett en av två exponeringstyper: korttids-exponering eller långtids-exponering (Fent *et al.* 2006). Korttidsexponering innebär att organismen exponeras vid ett kritiskt utvecklingsstadium

under en kortare tidsperiod medan långtidsexponering sker under en längre period eller under fiskens hela livstid. Vid studier av den senare typen är livscykelns längd den avgörande faktorn i bestämningen av vilken art som används, dels på grund av ekonomiska aspekter men även eftersom det underlättar hanteringen av fiskarna (Fenske *et al.* 2005).

Korttidsexponering är den vanligaste exponeringstypen vid laboratoriestudier, men långtidsexponering borde ges mer utrymme inom forskningen då dessa studier ger en mer överensstämmande bild med de faktiska miljöerna i akvatiska system och genererar passande modeller att använda i fortsatta fältstudier (Fent *et al.* 2006, Scholz & Klüver 2009).

Fältstudier rörande endokrina störningar av syntetiska hormoner hos fiskar till följd av utsläpp av läkemedel och kemikalier är svårtolkade. Detta framförallt på grund av svårigheten att dra någon konkret slutsats av resultaten, eftersom många fler faktorer än endast exponering för det aktuella ämnet måste tas i beaktning. Istället lämpar sig undersökningar som utförs i kontrollerade miljöer, där en påverkan kan konstateras. Resultaten kan sedan tolkas och appliceras på mer naturliga miljöer.

Vilka mätvärden används?

Studier som rör endokrinostörande ämnen kan behandla antingen fiskar som levt i sin naturliga miljö eller fiskar som i en kontrollerad miljö får spendera en viss tid exponerad för det ämne eller ämnen som undersöks. Gemensamt för dessa studier är dock observationer av antingen beteendeförändringar eller fysiologiska och morfologiska förändringar, till följd av exponering för ett endokrinostörande ämne.

Vid beteendestudier noteras och kvantifieras arttypiska beteenden, främst parningsbeteenden. Hänsyn tas till fiskens kön och den yta den har att röra sig på. Exempel på parametrar som observeras är den totala längden som fiskarna simmar, vilken hastighet fiskarna simmar med under en given tidsintervall, tid som spenderas i romläggningssytan samt antal gånger honor och hanar befinner sig i en avsedd romläggningssyta (Bjerselius *et al.* 2001, Baatrup & Henriksen 2015).

En vanligt använd biomarkör vid analys av syntetiska hormoners effekter är förändringar av könet (Holbech *et al.* 2006). Studier av förändringar på den sexuella differentieringen och utvecklingen hos fiskar till följd av exponering för endokrinostörande ämnen innebär oftast en ingående analys av förändringar i fysiologin. Embryonala studier observerar och mäter olika morfologiska abnormiteter, förändringar i hjärtslag och graden av mortalitet (Selderslaghs *et al.* 2009, Santos *et al.* 2014) medan man i studier av juvenila och vuxna individer analyserar genuttryck och förändringar av gonader. Effekter på könsorgan och kroppsform kan observeras rent utseendemässigt eller genom histologiska studier av sperma- och äggkoncentration (Fenske *et al.* 2005).

Fysiologiska studier innebär ofta analyser av genuttryck, där kvantitativ PCR vanligen används för att mäta graden av transkription. En viktig gen som undersöks vid endokrina studier är vitellogenin (VTG). Vitellogenin är ett protein som finns i plasman hos ovipariska vertebrater. Det är främst en prekursor för ämnen som är viktiga vid utveckling av oocyter och den syntetiseras i levern för att sedan utsöndras i blodet och tas upp av växande oocyter (Tyler *et al.* 1996). Gentranskriptionen av VTG är östrogenberoende och förekommer i störst utsträckning hos honor men även hanar bär på genen, vilket gör den intressant som biomarkör vid *in vitro* och *in vivo* studier av det endokrina systemet då den påverkas av östrogena ämnen (Tyler *et al.* 1999). Studier har visat att transkription hos hanfiskar kan triggas vid närvaro av östrogen och xenoöstrogener som EE₂ (Chen 1983), vilket kan ses på ökade VTG-halter i

blodet (Tyler *et al.* 1999). Det finns även en stark koppling mellan halten VTG i blodet och mognadsgraden av ägg och äggstockar, då fiskar som exponerats för P4 uppvisar en dosberoende minskning av VTG koncentration i blodet, vilket i sin tur skulle kunna påverka såväl fiskarnas reproduktion som äggens kvalitet (Zucchi *et al.* 2013) (Tabell 1).

Fysiologisk påverkan

Fältstudier har visat att fiskar utsätts för endokrinstörande ämnen i det vatten de lever (Knudsen *et al.* 1997, van Aerle *et al.* 2001, Orlando *et al.* 2007) (Tabell 1). Denna exponering sker främst till följd av utsläpp från industrier och hushåll, där diverse kemikalier och ämnen släpps ut i avloppsvattnet (van Aerle *et al.* 2001).

I en studie av Orlando *et al.* (2007) (Tabell 1) undersöktes morfologin hos ca 230 moskitfiskar i de två floderna Fenholloway river och Econfina river i Florida, USA. Fenholloway river valdes med tanke på dess nära lokalisering till ett pappersbruk. Tidigare fält- och laboratoriestudier har nämligen dokumenterat maskuliniserade honor (maskuliniserad mindre analfena och typiskt hanligt beteende) i vattendrag som innehållit utsläpp från pappersindustrier (Bortone *et al.* 1989, Drysdale & Bortone 1989). I Orlandos studie valdes Econfina river som referensplats då den inte har någon dokumenterad förekomst av föroreningar men den får sitt vatten från samma ursprungliga källa som Fenholloway. Syftet med studien var att undersöka fiskarnas utveckling och reproduktion med avseende på deras morfologi: analfenan mättes, leverns storlek dokumenterades, gonaderna bestämdes och antalet embryon hos honorna räknades. Fiskarna i den kontaminerade floden Fenholloway uppvisade maskulinisering både hos han- och honfiskar, då hanarna hade en större stjärtfena än referensgruppen samt större testiklar och honorna hade en maskuliniserad analfena och färre embryon.

Denna typ av exponering och påverkan kan även ses i Europeiska länder (Tabell 1). Van Aerle *et al.* (2001) visar i sin studie att utsläpp av endokrinstörande ämnen kan påverka sandkrypare i deras naturliga miljö. I studien undersöktes individer från två floder i Storbritannien som kontinuerligt exponeras för utsläpp från både industrier och hushåll, river Aire och river Lea. Som kontroll användes sjöarna Longton Park lake och Lakeside Fisheries, eftersom sandkrypare inte fanns vilt i någon annan flod som inte är exponerat för föroreningar. Resultaten visade att de exponerade fiskarna uppvisade exempel på intersexualism, det vill säga många av hanarna hade både testikelvävnad och äggstocksvävnad. De exponerade individerna hade även höjda halter VTG i blodet jämfört med kontrollerna. Forskarna drog därför slutsatsen att sandkrypare som utsätts för endokrinstörande ämnen i sin naturliga miljö i floder och vattendrag får en störd sexuell differentiering och utveckling.

Studier som dessa, som utförts i fält, ligger till grund för fortsatta studier i mer kontrollerade laborativa studier som undersöker mer konkret vilka faktiska effekter endokrinstörande ämnen har på fiskars reproduktion. Men då det inte går att fastslå vilka ämnen det är som genererar dessa störningar i fältstudier krävs det forskning som fokuserar på enskilda ämnen. Flertalet laborativa studier har således byggt vidare på antagandet att endokrinstörande ämnen, såsom syntetiska hormoner, släpps ut i sjöar och vattendrag vilket påverkar fiskars sexuella utveckling och således deras reproduktion (Fenske & Segner 2004, Fenske *et al.* 2005, Han *et al.* 2014, Liang *et al.* 2015) (Tabell 1).

Ett exempel på en studie som vidare utforskar tesen att endokrinstörande ämnen kan påverka

fiskars reproduktion är en studie av Fenske *et al* (2005) (Tabell 1). Enligt deras laborativa undersökningar kan en hög halt östrogen leda till en ökad utveckling av äggstockar hos hanliga zebrafiskar medan lägre halter av östrogen kan leda till att andelen fiskar som maskuliniseras och utvecklar testiklar ökar. I studien visades att zebrafiskar med naturligt utvecklade hanliga gonader som exponerats för det syntetiska östrogenet etinylöstradiol (EE₂) helt tillbakabildade dessa till förmån för bildandet av äggstockar. Fiskarna exponerades från 2 timmar efter fertilisering fram till 42 respektive 75 dagar efter fertilisering. De hölls därefter i rent vatten utan EE₂ fram till dag 118 efter fertilisering. De fiskar som exponerats i 42 dagar uppvisade förhöjda halter av VTG men ingen skillnad i könsdifferentiering. Samtliga individer i långtidsexponeringen uppvisade dock förhöjda halter av VTG, en total utveckling till fenotypiska honor 118 dagar efter befruktning och en inhibering av reproduktionsförmågan, då ingen reproduktion skedde under denna tid. Hos de fenotypiska honorna kunde två distinkta grupper urskiljas: genetiska honor med mogna äggstockar eller genetiska hanar med en avstannad utveckling av hanliga gonader och omogna äggstockar. Honfiskar som exponerats för östrogen under lång tid uppvisade även cellförändringar och en hämmad äggutveckling vilket i sin tur kan påverka reproduktionen. Dessa resultat tyder på att exponeringstiden, och exponeringstillfälle, påverkar utvecklingen av gonader då en kontinuerlig exponering för östrogen ledde till en total omvandling av hanliga gonader till honliga sådana. Effekter av denna typ kan således komma att påverka hela populationer.

Liknande resultat kan även ses i en tidig studie av Yamamoto (1953) där medakafiskar (*Oryzias latipes*) som exponerats för östrogener uppvisade en fullständig könsdifferentiering från genetiska hanar till fenotypiska honor (Tabell 1). Dessa fiskar kunde även efter differentieringen reproducera sig och få avkommor.

Effekterna hos fiskar efter exponering för syntetiskt progestin är inte lika väl studerade som effekterna av östrogen (Han *et al.* 2014). Mycket pekar dock på att syntetiskt progestin redan vid låga nivåer kan leda till transkriptionsförändringar kopplade till syntesen av steroida hormoner (Fent *et al.* 2006) vilket vidare kan leda till skadliga effekter på fiskars reproduktionsförmåga (Han *et al.* 2014) då de påverkar både embryoutveckling (Fent *et al.* 2006) och könsutveckling (Liang *et al.* 2015) (Tabell 1).

Liang *et al.* (2015) visar i sin studie att de syntetiska progestinerna P4 och NGT påverkar könsdifferentieringen hos zebrafiskar samt påverkar könshormonbalansen hos juvenila fiskar vid låga koncentrationer (Tabell 1). I studien exponerades zebrafiskar för miljörelevanta nivåer (0 ng, 5 ng, 50 ng och 100 ng L⁻¹) av P4 och NGT från dag 20 efter fertilisering till dag 60 efter fertilisering, vilket resulterade i statistiskt signifikanta förändringar av könsdifferentieringen. De grupper som utsatts för P4 uppvisade en statistiskt signifikant ökning av andelen honor i gruppen jämfört med kontrollen samt en statistiskt signifikant inhibering av Amh-genen, en gen relaterad till hanlig könsdifferentiering, hos dessa honor. Vidare kunde man konstatera att det fanns ett samband mellan inhibering och inducering av gentranskription till följd av exponering. Exponering för P4 inducerade även Figa-genen, en gen som är relaterad till honlig könsdifferentiering. Exponering för NGT däremot resulterade i en inhibering av Figa-genen, vilket gav en ökad andel hanar i gruppen. Forskarna drog därför slutsatsen att exponering för P4 kan orsaka könsdifferentiering från hanligt till honligt kön medan exponering för NGT kan leda till könsdifferentiering från honligt till hanligt kön.

Exponering för P4 (100 ng L⁻¹, 1000 ng L⁻¹, nominala koncentrationer) kan även leda till en minskad fekunditet eftersom det syntetiska hormonet orsakar en statistiskt signifikant inhibering av äggproduktionen samt en minskning av antalet lyckade befruktningar, sett hos

ägg av knölskallelöja (*Pimephales promelas*) (DeQuattro *et al.* 2012) (Tabell 1). Det syntetiska hormonet kan även stänga av gener som är involverade i regelringen av reproduktionen vilket kan påverka utsöndringen av prostaglandiner. Detta kan i sin tur leda till en minskad ägglossning och slutligen en inhiberad äggproduktion (Han *et al.* 2014). Vid exponering av zebrafiskar för lägre koncentrationer av P4 (3,5 ng, 33 ng och 306 ng L⁻¹) observerades ingen påverkan på fekunditet, men dos-beroende transkriptionsförändringar av VTG i levern sågs vilket indikerar att även låga nivåer av P4 påverkar reproduktionen (Zucchi *et al.* 2013).

För att studier av syntetiska hormoner skall ge applicerbara resultat bör de utföras på både honor och hanar, då effekten hos de båda könen skiljer sig åt. Skillnad i effekt beroende på kön ses eftersom hanar generellt sett är känsligare för endokrinstörande ämnen än honor (Tejeda-Vera *et al.* 2007). Denna skillnad kan bero på honornas mer komplexa asynkrona utveckling av gonaderna, vilket innebär att ägg och äggstockar inte utvecklas i samma takt. Detta skulle kunna försvåra distribution av ämnen och kräver en högre koncentration för att effekt ska uppnås (Luzio *et al.* 2015).

Beteendepåverkan

Syntetiska hormoner påverkar inte bara fiskars fysiologi och utveckling. Även fiskars beteende kan störas av exponering för denna typ av ämnen, främst då deras parningsbeteenden (Fenske & Segner 2004). Eftersom en stor del av fiskars reproduktionsförmåga beror på deras parningsbeteende är detta en viktig faktor att belysa när det gäller störningar på det endokrina systemet, eftersom ändringar i beteendet kan påverka hela populationer (Baatrup & Henriksen 2015).

Störningar på beteendet till följd av endokrinstörande ämnen påverkar inte bara de exponerade individerna, störningar kan även indirekt påverka oexponerade individer. I en ny studie av Baatrup & Henriksen (2015) undersöktes således effekterna av EE₂ på beteendet hos zebrafiskar, med syftet att undersöka hur icke-exponerade honfiskar påverkades av exponerade hanar (Tabell 1). Studien innebar att de hanliga fiskarna exponerades för låga halter (1 ng, 3 ng och 10 ng L⁻¹) av EE₂ från kläckning fram till mätningarna av beteendet. Exponeringen utfördes under denna tid för att efterlikna fiskarnas faktiska miljö där endokrinstörande ämnen förekommer under längre tid. Parningsbeteendet hos fiskarna analyserades genom att man placerade en hona och en hane i ett akvarium innehållande vatten med feromoner från romläggande honor, i syfte att stimulera sexuell aktivitet hos hanarna. Under 16 h förvarades fiskarna i mörker separerade av en skiljevägg. När sedan skiljeväggen togs bort observerades fiskarnas beteende, där parningstypiskt beteende innebar att hanen försökte få honan att röra sig mot en avsedd romläggningsyta, genom att svänga sin stjärtfena snabbt mot hennes sida.

Resultaten från studien tillförde nya insikter i hur reproduktionsbeteendet kan påverkas hos zebrafiskar under exponering för endokrinstörande ämnen. Det visade sig att hanarna inte uppvisade någon statistiskt signifikant ändring i beteende efter exponering för EE₂ jämfört med kontrollgruppen. Istället sågs en skillnad hos honorna. De honor som placerats med en exponerad hane visade en statistiskt signifikant skillnad i parningsbeteende jämfört med kontrollgruppen då de uppvisade ett uppenbart undvikande av romläggningsytan. Från detta drar författarna slutsatsen att endokrinstörande ämnen kan ge indirekta störningar på oexponerade individer, då könsidentifiering hos fiskar baseras på såväl visuella intryck som kemiska. De exponerade hanfiskarna fick en förändrad kroppsform mot en mer honliknande fenotyp (rundare kroppsform och en starkare blå färg, typisk för honor) vilket kan påverka

honfiskarnas respons på typiskt hanliga parningsbeteenden, något som också visats i en tidigare studie av Larsen *et al* (2008). Resultaten kan även bero på en förändrad kemisk signalering individerna emellan (Baatrup & Henriksen 2015). Vanligtvis utsöndrar både hanar och honor hos zebrafiskar olika vattenburna kemiska signaler som syftar till att påverka reproduktionen. Hanar utsöndrar ämnen som inducerar ägglossning hos honliga zebrafiskar och honorna utsöndrar feromoner som dämpar reproduktionen hos andra honor (Gerlach 2006). Resultaten tyder på att signaleringen av feromoner från de exponerade hanarna på något sätt har störts, eller upphört helt, så att honornas beteende påverkats.

Liknande resultat konstaterades tidigare i en studie i Uppsala, av Bjerselius *et al.* 2001, där sexuellt mogna guldfiskar (*Carassius auratus*) av hanligt kön exponerades för E_2 (1 μg och 10 $\mu\text{g } E_2/l$, nominala koncentrationer) under 24-28 dagar (Tabell 1). Hanarnas beteende vid närvaron av honor observerades genom att typiska reproduktionsbeteenden hos guldfiskar, såsom uppvaktning av honor och konkurrens om ägg-fertilisering mellan hanar, registrerades. Resultaten visade att exponering för E_2 gav en statistiskt signifikant påverkan på hanarnas beteende och fysiologi, då de uppvisade ett nästintill obefintligt intresse för de närvarande honorna. Resultaten visade även att E_2 påverkar testiklarna, då hanarna uppvisade en statistiskt signifikant minskning av sädesvätska och en minskad produktion av androgener. Denna androgenminskning kan kopplas till beteendeförändringarna eftersom ezymaktiviteten av aromatas i hjärnan påverkas, den del av hjärnan som rör reproduktion och sexuellt beteende. Forskarna drog slutsatsen att exponering för fysiologiska koncentrationer av E_2 kan ge stora effekter på reproduktionen hos guldfiskar samt att studien kan fungera som modell för vidare studier av endokrinstörande ämnens effekter på reproduktion hos vilda fiskar.

Varaktighet och mortalitet

Trots de allvarliga effekter som kan ses efter exponering för syntetiska hormoner kan dessa symptom försvinna vid upphörd exponering. I studien av Fenske *et al.* (2005) utvecklades hela populationen zebrafiskar som exponerats för EE_2 under 75 dagar till fenotypiska honor. Men då flödet av vatten till fiskarna byttes ut från östrogenhaltigt vatten till vatten utan tillsatt östrogen uppkom intressanta resultat. Efter 58 dagar hade 26 % av de fiskar som tidigare könsbestämts som honor utvecklat differentierade testiklar, en typisk hanlig fenotyp. Dock påverkade inte detta reproduktionsmöjligheterna, då återbildandet av testiklar inte innebar en ökad andel befruktade ägg.

Trots denna uppenbart positiva återhämtning efter exponering kan exponering leda till långt värre konsekvenser än en störd reproduktion då effekter även kan ses på överlevnadsgraden (Kim *et al.* 2009, Santos *et al.* 2014) och ökade fall av apoptos hos embryon och ägg som exponeras för östrogener (Sassi-Messai *et al.* 2009, Chandrasekar *et al.* 2011) (Tabell 1). Ökningen i mortalitet som dokumenterats vid exponering för endokrinstörande ämnen skiljer sig dock åt beroende på vid vilken tidpunkt exponering skett. Eftersom embryon är extra känsliga för endokrina störningar (Chow & Cheng 2003) kan relativt låga koncentrationer av endokrinstörande ämnen leda till ökad dödlighet. När individen har passerat de kritiska stadierna i utvecklingen verkar det dock inte finnas något statistiskt signifikant samband mellan mortalitet eller apoptos och exponering för dessa ämnen (Baatrup & Henriksen 2015, Liang *et al.* 2015).

Mortaliteten hos de exponerade individerna är viktigt även ur statistisk synpunkt, då könskvoten är beroende av mortaliteten hos de båda könen som undersöks. En högre mortalitet hos något av könen som inte tas i beräkning vid dessa typer av studier kan således ge en felaktig bild av effekterna (Yamamoto 1953). Effekterna pekar dock på hur viktigt det

är att reglera utsläpp av syntetiska hormoner till naturliga miljöer då de påverkar inte bara utvecklingen och reproduktionen hos fiskar, utan även deras direkta överlevnad (Santos *et al.* 2014).

Tabell 1. Exempel på fält- och *in vivo*-studier där effekter av endokrinstörande ämnen undersökts.

Författare	Studietyp	Art	Ämne & exponeringskoncentration	Beskrivning
Orlando <i>et al.</i> (2007)	Fältstudie: USA, Florida, Fenholloway River & Econfina River	Moskitfisk (<i>Gambusia affirostrata</i>)	-	Under 13 månader samlades fiskar in vid fyra tillfällen. Fiskarnas analfenor mättes, embryon i olika utvecklingsstadier räknades och fiskarnas utvecklingsstadier bestämdes. Honorna hade en kortare längd, mindre kroppsytta, maskuliniserad analfena, mindre äggstockar och färre embryon.
Knudsen <i>et al.</i> (1997)	Fältstudie: Norge, Oslofjorden, Bekkelaget	Rengbågsöring (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Dicksvatten innehållande 0%, 2,5%, 10% och 20% avloppsvatten från tre industrier	Fiskar exponerades under tre veckor. Blodprover samlades under tiden vilka visade att samtliga exponerade grupper fick en ökad VTG-koncentration.
van Aerle <i>et al.</i> (2001)	Fältstudie: Storbritannien, River Aire & River Lea, Longton Park Lake & Lakeside Fisheries	Sandkrypare (<i>Gobio gobio</i>)	-	Fiskar samlades in och deras gonader undersöktes med avseende på testikelvävnad och äggstocksvävnad. Graden av intersexualism bestämdes med avseende på antal oocyter i gonaderna. Resultaten visade att de exponerade hanarna hade förekomst av äggstocksvävnad i testiklarna samt en ökad koncentration av VTG.
Fenske <i>et al.</i> (2005)	Laborativ studie	Zebrafisk (<i>Danio rerio</i>)	2,4 – 3,6 ng EE ₂ L ⁻¹	Fiskar exponerades för korttids- och långtidsexponering för EE ₂ . Korttidsexponering ledde till höjda halter VTG, långtidsexponering ledde till höjda VTG-halter, störd sexuell differentiering och inhiberad reproduktion.

Liang <i>et al.</i> (2015)	Laborativ studie	Zebrafisk	0 ng, 5 ng, 50 ng och 100 ng P4 L ⁻¹ 0 ng, 5 ng, 50 ng och 100 ng NGT L ⁻¹	Fiskar exponerades för P4 och NGT under 40 dagar. Exponering för P4 ledde till en statistiskt signifikant ökning av honor i populationen, NGT exponering ledde till en ökning av hanar.
Han <i>et al.</i> (2014)	Laborativ studie	Zebrafisk	33 ng, 100 ng, 333 ng och 666 ng MTA L ⁻¹	Fiskar exponerades för MTA under 21 dagar. Exponering ledde till en statistiskt signifikant minskning av äggproduktion samt en nedreglering av gentranskription i HHG-axeln.
Yamamoto (1953)	Laborativ studie	Medakafisk (<i>Oryzias latipes</i>)	1,250 I.U. östron/gm	Fiskar som exponerats för östrogener genomgick en fullständig könsdifferentiering från genetiska hanar till genetiska honor. Dessa fiskar kunde även efter differentieringen reproducera sig och få avkommor.
DeQuattro <i>et al.</i> (2012)	Laborativ studie	Knölskallelöja (<i>Pimephales promelas</i>)	0 ng, 10 ng, 100 ng och 1000 ng P4 L ⁻¹	Honliga fiskar exponerades för P4 under 21 dagar. Exponeringen ledde till en minskad fekunditet samt inhibering av äggproduktion och antal lyckade befruktningar.
Zucchi <i>et al.</i> (2013)	Laborativ studie	Zebrafisk	3 ng, 5 ng, 33 ng och 306 ng P4 L ⁻¹	Honliga fiskar exponerades för P4 under 14 dagar. Ingen påverkan på fekunditeten observerades men mognaden av äggen påverkades och VTG koncentrationen sänktes.
Baatrup & Henriksen (2015)	Laborativ studie	Zebrafisk	1 ng, 3 ng och 10 ng EE ₂ L ⁻¹	Hanfiskar exponerades för EE ₂ från kläckning fram till mätningarna av beteendet. Exponerade hanar fick en förändrad feminin kroppsform men ingen förändring på parningsbeteendet. Oexponerade honor uppvisade dock ett förändrat parningsbeteende.

Bjerselius <i>et al.</i> (2001)	Laborativ studie	Guldfisk (<i>Carassius auratus</i>)	0 µg, 1 µg och 10 µg E ₂ L ⁻¹	Hanfiskar exponerades E ₂ under 24-28 dagar vilket resulterade i en statistiskt signifikant minskat intresse för närvarande honor samt en statistiskt signifikant minskning av sädesvätska.
Santos <i>et al.</i> (2014)	Laborativ studie	Zebrafisk	0,4 ng, 2 ng, 4 ng och 20 ng EE ₂ L ⁻¹ 2 ng, 20 ng, 200 ng och 2000 ng Gen L ⁻¹ 2 µg 10 µg, 50 µg och 250 µg Fad L ⁻¹	Fiskembryon exponerades för EE ₂ och xenoöstrogenerna Genistein (Gen) och Fadrozole (Fad) från 2 timmen till 144 timmen efter fertilisering. exponering för EE ₂ ledde till en ökad mortalitet och missbildning hos larver, samt toxiska effekter på hjärtrytmen.
Kim <i>et al.</i> (2009)	Laborativ studie	Zebrafisk	0,1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM Gen	Fiskembryon exponerades för Gen under 60 timmar, vilket resulterade i minskad hjärtrytm, missbildningar och en ökad, dos-beroende, mortalitet.
Chandrasekar <i>et al.</i> (2011)	Laborativ studie	Zebrafisk	1 µM, 2 µM, 5 µM och 7 µM 4-NP	Fiskembryon exponerades för östrogen agonisten 4-Nonylphenol (4-NP) under 24 timmar. Exponering resulterade i reducerad rörlighet samt en ökat apoptos i svans, mittfena och hjärna.
Sassi-Messai <i>et al.</i> (2009)	Laborativ studie	Zebrafisk	0,1 µM – 17,5 µM Gen 1nM – 0,1 µM E ₂	Fiskembryon exponerades för Gen och E ₂ från 5 timmar efter fertilisering och framåt. Exponering resulterade i apoptos i hjärnan.

Åtgärder och utnyttjande

De studier som gjorts inom detta område visar på vikten av reglering när det gäller utsläpp av endokrinstörande ämnen då deras effekter kan komma att påverka reproduktionen och således individantalet inom en population (Fenske *et al.* 2005). Redan under 1980-talet konstaterade Världshälsofonden (WWF) under en konferens att ”man är säker på följande: ett stort antal mänskligt skapade kemikalier har släppts ut i miljön [...] med potential att störa det endokrina systemet hos djur, inkluderat människor”. Vidare slogs det fast att störningar som sker under den embryonala utvecklingen kunde leda till permanenta förändringar på såväl organismer reproduktion som immunsystem och hjärnutveckling även för framtida generationer (Guillette *et al.* 1995).

Regleringen av utsläpp av möjliga endokrinstörande ämnen såsom läkemedel och miljöfarliga ämnen skiljer sig åt mellan länder. I Europa, Japan och Nordamerika finns hårda bestämmelser gällande vilka läkemedel som får släppas ut på marknaden (Corcoran *et al.* 2010). Inom EU har man infört ett flertal krav på riskutvärdering om hälsoeffekter och

ekotoxicitet för läkemedel som registreras samt tagit fram direktiv för miljökonsekvensbeskrivningar till följd av godkännandet av läkemedel inom unionen (Fent *et al.* 2006). Vidare har flertalet tester utvecklats under de senaste årtiondena för att kartlägga hur såväl nya som äldre läkemedel och kemikalier påverkar det endokrina systemet hos fiskar. Detta sköts främst av "Organisation for Economic Co-operation and Development" (OECD) som genom ett rådgivande organ kallat "Endocrine Disrupters Testing and Assessment" (EDTA) utvecklat riktlinjer för hur dessa test ska ske. EDTA har som mål att ge ut internationella riktlinjer och strategier för tester, med syfte att spara resurser och minska användandet av försöksdjur. Ett exempel på detta är "Fish Sexual Development Test" (FSDT) vilket går ut på att, liksom vid flertalet tidigare nämnda studier, exponera fiskar via vatten från juvenilt stadium fram till fullständig sexuell utveckling. Den fiskart som fått stå modell för testet är den av OECD rekommenderade zebrafisken (Holbech *et al.* 2006).

Zebrafisken är dock inte den enda arten som används vid utvecklandet av dessa typer av tester. FSFT appliceras även på arter som japansk medaka (*Oryzias latipes*), knölskallelöja och storspigg (*Gasterosteus aculeatus*), vilka bidrar till möjligheten att säkerställa olika artberoende känslighetskorrelationer vilka senare kan appliceras på ytterligare arter (Holbech *et al.* 2006). WWF stöder liknande utökningar av försöksdjur till andra vertebratgrupper, såsom reptiler, då man under konferensen på 1980-talet ansåg det nödvändigt att utöka modellerna för vilda djur i hopp om att få en tydligare bild av vilka skador dessa ämnen har på vilda populationer (Guillette *et al.* 1995).

Dessa tester är dock endast en del av lösningen, eller kanske snarare en början på lösningen, eftersom det i grund och botten är utsläppen av dessa ämnen som måste minska för att observerade effekter ska kunna minska. Ett sätt är att påverka spridningen av ämnen vid utsläppskällan skulle kunna vara genom olika kemiska processer, såsom filter eller kemikalier som eliminerar de endokrinstörande ämnena innan utsläpp. Problemet med detta tillvägagångssätt ligger snarare då i ekonomiska hinder snarare än effektivitet (Knudsen *et al.* 1997). En viss del av de läkemedel som når våra vattendrag kan redan nu oskadliggöras på naturlig väg, där elimineringen huvudsakligen sker antingen via adsorption i upplöst bottenslam eller genom bionedbrytning av mikroorganismer. Men eftersom endokrinstörande ämnen bevisligen påverkar viktiga utvecklingsprocesser hos fiskar är det av yttersta vikt att komma fram till någon typ av lägsta koncentrationvärde för uppvisad effekt, även kallat "Lowest Observed Adverse Effect Concentration" (LOAEC) för att bestämma säkra nivåer av exponering (Fent *et al.* 2006, Santos *et al.* 2014).

Den forskning som visar att syntetiska hormoner har förmågan att ändra könsfördelningen i en population kan även utnyttjas ekonomiskt, då fiskeproducenter ofta är intresserade av ett specifikt kön på fiskar i odlingar. Favorisering och differentiering mot ett kön av en ekonomiskt viktig art kan på så sätt leda till en ökad ekonomisk vinst, då fiskar av det ena könet inom vissa arter är mer eftertraktade, exempelvis på grund av sin rom. Metoden kan även användas för att öka andelen honor i populationen, vilket skulle kunna generera större reproduktiva framgångar och således en större ekonomisk vinst (Hunter & Donaldson 1983).

Diskussion

Syntetiska hormoners påverkan på fiskars fysiologi och beteende kan komma att påverka deras reproduktion, antingen direkt eller indirekt. Studier har visat att fiskar som exponerats för syntetiska hormoner helt eller delvis utvecklat gonader som är typiska för det motsatta genotypiska könet (Yamamoto 1953, Fenske *et al.* 2005, Liang *et al.* 2015) eller uppvisat

någon typ av störning på den sexuella utvecklingen. Vidare visar även flertalet studier att beteendet vid parning kan få en negativ påverkan av syntetiska hormoner (Bjerselius *et al.* 2001, Baatrup & Henriksen 2015). Resultaten av dessa studier ligger till grund för slutsatsen att de syntetiska versionerna av östrogen och progesteron kan påverka fiskars reproduktion och att exponering för dessa ämnen kan leda till negativa effekter på fiskpopulationer. Vidare pekar dessa studier på vikten av att reglera utsläpp av ämnen som kan skada eller påverka det endokrina systemet, hos såväl människor som andra djurarter.

Att fiskeproduktionen har funnit ekonomiska vinster med hjälp av dessa ämnen är något som skulle kunna ses som en tillgång med tanke på hur världen ser ut idag, då vi har ett stort antal människor som är i desperat behov av mat. Med en ökad produktion skulle således många munnar gå att mätta, vilket i teorin är en god sak. Men det går inte att bortse från att målet är en ökad ekonomisk vinst, vilket är oroväckande. Om fokus ligger på hur mycket pengar som kan utvinnas finns risken att mindre fokus hamnar på säkerhet och djurens välmående. Vidare är det oklart om dessa ändringar som pådrivs inom produktionen även kan påverka vilda fiskbestånd, något som måste tas i beaktning när det gäller endokrina störningar. Om den risken finns, att endokrinstörande ämnen som används inom fiskeproduktion kan läcka ut till miljön, skulle konsekvenserna bli förödande då dessa ämnen kan totalt förändra könsfördelningen inom populationer. En annan nackdel med denna aktiva exponering är också att det inte finns några garantier för att exponering för syntetiska hormoner faktiskt leder till öknings av ett specifikt kön, eftersom det bygger på Mendelsk teori med heterosomala grunder. Då fiskar har en relativt outforskad genutveckling, där många arter har primitivt utvecklade heterosomala system, skulle denna teori vara svårapplicerad på flertalet fiskar inom handeln. Vidare går det inte heller att garantera att de könsdifferentierade fiskarna kommer kunna reproducera sig. Flertalet studier visar att reproduktionen faktiskt minskar till följd av denna typ av störningar eftersom de fiskar som bytt kön har genomgått av det motsatta könet och har fått allvarliga störningar av deras reproduktionsförmåga. Slutligen måste denna typ av aktiv exponering för endokrinstörande ämnen ta i beaktning den höga risk som finns gällande mortalitet hos embryon och juvenila fiskar. Att syntetiska hormoner kan orsaka en ökad mortalitet och missbildningar hos embryon belyser ytterligare de risker som finns med användningen av sådana metoder (Hunter & Donaldson 1983).

Trots de oroväckande resultaten av studier gällande syntetiska hormoner och deras effekter är det värt att ha i åtanke det faktum att det finns fiskarter med en fenotypisk plasticitet vilket innebär att de kan skifta kön en eller flera gånger under sin livstid (Fenske & Segner 2004). Den sexuella utvecklingen hos fiskar är långt ifrån kartlagd, men många arter har uppvisat tecken på denna typ av könsdifferentiering även utan någon uppenbar exponering för endokrinstörande ämnen (Scholz & Klüver 2009).

Resultaten från exponering av fiskar för endokrinstörande ämnen i denna litteraturstudie behandlar främst experimentella undersökningar under kontrollerade former i laboratorier. I fält exponeras fiskar av en komplex mix av flera ämnen medan laborativa studier oftast behandlar enstaka eller en begränsad blandning av ämnen. En överföring och tolkning av resultat från laboratorier till vilda fiskbestånd är därför problematisk, inte enbart på grund av skillnaden i vilka ämnen som undersöks. Eftersom antalet faktorer som påverkar utvecklingen hos fiskar i sin naturliga miljö ökar tiofalt blir det även svårt att avgöra vilken faktor som svarar för vilken effekt. Dokumenterade fall av könsbyte hos vilda fiskar betyder inte nödvändigtvis att endokrinstörande ämnen är orsaken. Det finns rapporter som pekar på att fiskar som utsatts för parasiter har uppvisat samma typ av påverkan på könsdifferentiering som kan ses i studiet av syntetiska hormoner (Scholz & Klüver 2009). Detta visar ytterligare

på komplexiteten när det gäller störningsfaktorer i fiskars naturliga miljö, och varför en slutsats baserad på fältstudier blir mer abstrakt jämfört med laboratoriestudier.

Fältstudier av den typ som tidigare presenterats försvåras ytterligare av det faktum att djuren som studerats i många fall har migrerat och befunnit sig på flera olika platser under sin livstid, givet att det är en art som lever i större vattendrag med möjlighet att förflytta sig. Detta innebär att en undersökt population kan skilja sig avsevärt mellan individer gällande exponering för ämnet, vilket även försvårar fastställandet av kontrollgrupper. Vanligtvis används grupper av fiskar som levt uppströms i vatten med låg kontaminering som kontroller men det ger inte samma säkerhet som vid laboratoriestudier eftersom dessa fiskar har ett annorlunda habitat jämfört med de exponerade grupperna och förmodligen skiljer sig åt på flera andra punkter (Scholz & Klüver 2009).

Risken för ett lågt antal individer i studien måste även tas i beaktning eftersom vildlevande fiskar ständigt utsätts för predationstryck och således även ett selektionstryck då de svagare exponerade fiskarna troligen är lättare byten för predatorer. Det finns inte heller några säkra sätt att få en jämn sammansättning av ålder i populationen, vilket kan påverka resultaten nämnvärt då exponeringstidpunkt har visats vara av yttersta vikt vid endokrina störningar.

Oavsett brister i överförandet av teoretisk information till praktiskt utnyttjande är det av yttersta vikt att utveckla riktlinjer för minsta accepterade exponeringsgrad för såväl fiskar som andra vertebrater, inklusive människor, då samtliga organismer i miljöer som utsätts för endokrinstörande ämnen löper risk att påverkas av dessa (Holbech *et al.* 2006). Trots potentiella brister i applicering av teoretisk information till praktisk handling är det nödvändigt för fortsatt utveckling av förebyggande metoder (Fent *et al.* 2006). Eftersom flertalet studier har konstaterat att fiskars reproduktionsförmåga påverkas av endokrinstörande ämnen i allmänhet och syntetiska hormoner i synnerhet är det av yttersta vikt att utveckla och omvandla information till praktiska åtgärder. För att säkerställa och bibehålla sunda levnadsförhållanden för såväl fiskar som övriga djur och natur bör fokus i samhället ligga på att reglera utsläpp av endokrinstörande ämnen i miljön (Holbech *et al.* 2006) och ta fram en accepterad lägstanivå för förekomsten av syntetiska hormoner i miljön, då det är främst mänskliga faktorer som är orsaken till dessa negativa effekter.

Tack

Ett stort tack till min handledare Maria Jönsson och min seminariegrupp för deras konstruktiva kritik och kommentarer som har väglett mig under arbetets gång.

Referenser

- Baatrup E, Henriksen PG. 2015. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2). *Aquatic Toxicology* 160: 197–204.
- Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsén H, Mayer I, Dimberg K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology* 53: 139–152.
- Bortone SA, Davis WP, Bundrick CM. 1989. Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bull Environ Contam Toxicol* 43: 370–377.

- Chandrasekar G, Arner A, Kitambi SS, Dahlman-Wright K, Lendahl MA. 2011. Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 33: 752–764.
- Chen TT. 1983. Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology Revue Canadienne De Biochimie Et Biologie Cellulaire* 61: 802–810.
- Chow ESH, Cheng SH. 2003. Cadmium Affects Muscle Type Development and Axon Growth in Zebrafish Embryonic Somitogenesis. *Toxicological Sciences* 73: 149–159.
- Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR. 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* 40: 287–304.
- DeQuattro ZA, Peissig EJ, Antkiewicz DS, Lundgren EJ, Hedman CJ, Hemming JDC, Barry TP. 2012. Effects of progesterone on reproduction and embryonic development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 31: 851–856.
- Drysdale DT, Bortone SA. 1989. Laboratory induction of intersexuality in the mosquitofish, *Gambusia affinis*, using paper mill effluent. *Bull Environ Contam Toxicol* 43: 611–617.
- Fenske M, Maack G, Schäfers C, Segner H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1088–1098.
- Fenske M, Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 67: 105–126.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76: 122–159.
- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104: 1096–1101.
- Gerlach G. 2006. Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Animal Behaviour* 72: 1119–1124.
- Guillette LJ, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect* 103: 157–164.
- Han J, Wang Q, Wang X, Li Y, Wen S, Liu S, Ying G, Guo Y, Zhou B. 2014. The synthetic progestin megestrol acetate adversely affects zebrafish reproduction. *Aquatic Toxicology* 150: 66–72.
- Hofsten J von, Olsson P-E. 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 63.
- Holbech H, Kinnberg K, Petersen GI, Jackson P, Hylland K, Norrgren L, Bjerregaard P. 2006. Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology and Pharmacology* 144: 57–66.
- Holtorf K. 2009. The bioidentical hormone debate: are bioidentical hormones (estradiol, estriol, and progesterone) safer or more efficacious than commonly used synthetic versions in hormone replacement therapy? *Postgrad Med* 121: 73–85.
- Hunter GA, Donaldson EM. 1983. Hormonal Sex Control and its Application to Fish Culture. I: Hoar W.S., Randall DJ, Donaldson EM (red.). *Fish Physiology*, ss. 223–303. Academic Press, New York.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson

- HA. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104: 715–740.
- Kim D-J, Seok S-H, Baek M-W, Lee H-Y, Na Y-R, Park S-H, Lee H-K, Dutta NK, Kawakami K, Park J-H. 2009. Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicology Mechanisms and Methods* 19: 251–256.
- Knudsen FR, Schou AE, Wiborg ML, Mona E, Tollefsen KE, Stenersen J, Sumpter JP. 1997. Increase of Plasma Vitellogenin Concentration in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Effluents from Oil Refinery Treatment Works and Municipal Sewage. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 59: 802–6.
- Klaassen CD, Watkins JB. 2010. Casarett & Doull's essentials of toxicology. 2:a upplagan. The McGraw-Hill Companies, Kina.
- Larsen MG, Hansen KB, Henriksen PG, Baatrup E. 2008. Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminising effects of 17 α -ethinyloestradiol—morphological sexual characteristics do not. *Aquatic Toxicology* 87: 234–244.
- Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Frölin L. 1999. Ethinyloestradiol—an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol. Aquatic Toxicology* 45: 91–97.
- Liang Y-Q, Huang G-Y, Liu S-S, Zhao J-L, Yang Y-Y, Chen X-W, Tian F, Jiang Y-X, Ying G-G. 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 160: 172–179.
- Liu S, Ying G-G, Zhao J-L, Zhou L-J, Yang B, Chen Z-F, Lai H-J. 2012. Occurrence and fate of androgens, estrogens, glucocorticoids and progestagens in two different types of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Monitoring* 14: 482–491.
- Luzio A, Monteiro SM, Garcia-Santos S, Rocha E, Fontainhas-Fernandes AA, Coimbra AM. 2015. Zebrafish sex differentiation and gonad development after exposure to 17 α -ethinylestradiol, fadrozole and their binary mixture: A stereological study. *Aquatic Toxicology* 166: 83–95.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. 2002. Molecular Characterization of Three Estrogen Receptor Forms in Zebrafish: Binding Characteristics, Transactivation Properties, and Tissue Distributions. *Biology of Reproduction* 66: 1881–1892.
- Orlando EF, Bass DE, Caltabiano LM, Davis WP, Gray Jr. LE, Guillette Jr. LJ. 2007. Altered development and reproduction in mosquitofish exposed to pulp and paper mill effluent in the Fenholloway River, Florida USA. *Aquatic Toxicology* 84: 399–405.
- Santos D, Matos M, Coimbra AM. 2014. Developmental toxicity of endocrine disruptors in early life stages of zebrafish, a genetic and embryogenesis study. *Neurotoxicology and Teratology* 46: 18–25.
- Sassi-Messai S, Gibert Y, Bernard L, Nishio S-I, Ferri Lagneau KF, Molina J, Andersson-Lendahl M, Benoit G, Balaguer P, Laudet V. 2009. The Phytoestrogen Genistein Affects Zebrafish Development through Two Different Pathways. *PLoS ONE*, doi 10.1371/journal.pone.0004935.
- Scholz S, Klüver N. 2009. Effects of endocrine disruptors on sexual, gonadal development in fish. *Sexual Development* 3: 136-151.
- Selderslaghs IWT, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE. 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology* 28: 308–320.
- Shore LS, Gurevitz M, Shemesh M. 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Bulletin of*

- Environmental Contamination and Toxicology 51: 361–366.
- Tejeda-Vera R, López-López E, Sedeño-Díaz JE. 2007. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameioba River, Mexico. *Environ Int* 33: 521–531.
- Tyler CR, Eerden B van der, Jobling S, Panter G, Sumpter JP. 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology B* 166: 418–426.
- Tyler CR, van Aerle R, Hutchinson TH, Maddix S, Trip H. 1999. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337–347.
- van Aerle R, Nolanusan M, Jobling S, Christiansen LB, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom Freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2841–2847.
- Yamamoto T-O. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Zoology* 123: 571–594.
- Zucchi S, Castiglioni S, Fent K. 2013. Progesterone Alters Global Transcription Profiles at Environmental Concentrations in Brain and Ovary of Female Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 47: 12548–12556.

Reproduktionsstörningar hos fiskar till följd av exponering för syntetiskt östrogen och progestin: etisk bilaga

Kajsa Mattsson

Självständigt arbete i biologi 2015

Samhällets hantering

Eftersom endokrinstörande ämnen som släpps ut i naturen till stor del kommer från mänsklig användning är det viktigt att belysa varje enskild människas roll i det hela. När vi släpper ut miljöfarliga ämnen, som syntetiska hormoner, påverkar vi många organismer i miljön och rubbar deras reproduktion och förökning. Det är fortfarande oklart om vi människor kan drabbas på liknande vis, vilket kanske är anledningen till att vi inte är mer oroliga. Det går dock inte att bortse från att vi är en del av naturen och de konsekvenser som drabbar andra organismer kan mycket väl drabba även oss.

Forskningen inom mitt område är av oerhörd vikt för många kvinnor idag. Möjligheten att bestämma över sin egen kropp och när/om man vill bli gravid är en grundläggande rättighet som många kvinnor har jobbat hårt för. Detta möjliggörs med användandet av preventivmedel, som också är grundproblemet med mitt ämne, då de syntetiska hormonerna som vi människor (och djur) stoppar i oss på olika sätt sprids vidare till djurgrupper de inte är ämnade för. Användandet av preventivmedel har många fördelar men nackdelarna kan visa sig vara allvarligare än vad man tidigare trott. Dock tror jag att det är möjligt att hitta en gyllene medelväg, som varken inskränker på kvinnors rätt till sin egen kropp eller ger någon allvarlig påverkan på djur och natur.

Nästan alla mina referenser har använt sig av försöksdjur, antingen fiskar eller fiskembryon. De flesta artiklarna noterar att de utför sina experiment enligt rådande regler och lagar och de försöker hålla antalet djur till ett absolut minsta nödvändiga antal. Dock går det att fråga sig om dessa lagar är tillräckliga, snarare borde de kanske debatteras ytterligare med avseende på djurskyddsfrågan. Många av dem nämner också att vidareutveckling av forskningen, mot en mer in vitro baserad sådan, är välkommet med djurens bästa i åtanke.

Eftersom jag i mitt arbete inte har gjort någon egen forskning och inte använt några egna försöksdjur så har jag inte bidragit direkt till någon etisk problematik, men faktum kvarstår att de resultat som lyfts fram i min uppsats kan bidra till ytterligare studier. Ju mer belyst detta ämne blir desto mer forskning kommer krävas. Dock finns det redan en konstaterad påverkan, så mitt arbete skulle även kunna leda till en ökad medvetenhet om utsläpp och vilken påverkan vi människor har på vår omgivande miljö.

Forskningsetik

Vid urvalet av mina källor har jag valt de som utfört egna studier där metoden är relevant för ämnet där kontrollgrupper och ett väl anpassat antal replikat använts. De problem som finns med resultaten diskuteras, där fokus oftast ligger på resultatens möjliga applicering till naturlig miljö. I min text har ingen hänsyn givits till eventuella åsikter av författarna. Mitt ämne ger litet utrymme till åsikter, det baserar sig snarare på fakta, även om en viss vinkling är möjlig gällande utförande, redovisning av resultat etc. Eftersom ämnet är relativt nytt avslutas ofta diskussionen med en uppmaning om vidare forskning.