



UPPSALA
UNIVERSITET

Projektrapport från utbildningen i

EKOTOXIKOLOGI

Ekotoxikologiska avdelningen

Nr 137

Aromatasaktivitet i gonader och hjärna hos
västafrikansk klogroda (*Xenopus tropicalis*) efter
exponering för fluoxetin eller etinylöstradiol

Hanna Eriksson

Innehållsförteckning

Förord.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning.....	5
1.1 Introduktion.....	5
1.2 Västafrikansk klogroda, Xenopus tropicalis.....	6
1.3 Aromatas.....	6
1.4 Fluoxetin.....	8
1.5 Etinylöstradiol.....	9
1.6 Syfte och hypotes.....	9
2. Material och metod.....	9
2.1 Parning.....	9
2.2 Exponering.....	9
2.3 Aromatasaktivitet.....	10
2.3.1 Stadium 56.....	10
2.3.2 Metamorfos.....	11
2.4 Aromatasmätningar.....	11
2.5 Statistiska metoder.....	11
3. Resultat.....	12
4. Diskussion.....	15
5. Slutsats.....	16
6. Referenser.....	17

Förord

Det här är min rapport för magisterexamen i biologi, inriktning ekotoxikologi vid Uppsala Universitet. Arbetet utfördes på avdelningen för ekotoxikologi vid Uppsala Universitet.

Jag vill speciellt tacka min ”projektkompis” Anneli Söderqvist, som även blev en bra vän, vilket gjorde projektet mycket roligare. Ett enormt tack till Irina Gyllenhammar och Cecilia Berg för bra handledning och stöttning under arbetets gång. Tack till Gunnar Steinholtz som hjälpt till med skötseln av grodorna. Stort tack till Jan Örberg som bland mycket annat hjälpt mig på sluttampen av det här examensarbetet. Tack till Margareta Mattsson och resten av avdelningen för en kämpig men rolig och lärorik tid. Största tacket vill jag rikta till min sambo Martin Rehn som alltid finns där för mig. Du är min klippa!

Sammanfattning

Antalet grodor minskar snabbt i antal och en bidragande orsak till detta kan vara endokrinstörande kemikalier som kommer ut i naturen från bland annat våra reningsverk. Det syntetiska hormonet etinylöstradiol (EE₂) och fluoxetin, som är det verksamma ämnet i antidepressiva medel som till exempel Fontex[®] och Prozac[®], har båda hittats i utsläppsvattnet från reningsverk. Det är känt sedan tidigare att etinylöstradiol ger skev könkvot vid miljörelevanta koncentrationer hos bland annat västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, och vanlig groda, *Rana temporaria*. Det är tyvärr inte så välstuderat om eller vilken påverkan fluoxetin kan ha på organismer i naturen. Aromatas är det enzym som omvandlar androgen till östrogen och kan därför vara ett mål för endokrinstörande ämnen. Hos grodor uttrycks aromatasenzymet i hjärna och gonader. Syftet med den här studien var att undersöka om exponering för fluoxetin och etinylöstradiol under yngelperioden har någon påverkan på aromatasaktiviteten hos västafrikansk klogroda, samt att se om vikt vid och tid till metamorfos påverkas. Grodynglen exponerades för 0, 3, 30 nM fluoxetin eller 100 nM EE₂ från utvecklingsstadium 47 till metamorfos. Aromatasaktiviteten mättes i gonader och hjärna vid könsdifferentieringen (utvecklingsstadium 56) och vid metamorfos. Resultaten visade inte på någon skillnad i aromatasaktivitet mellan de olika exponeringarna jämfört med kontrollen. Inte heller vid metamorfos var det någon signifikant skillnad i aromatasaktiviteten. Några signifikanta skillnader påvisades inte heller vid jämförelse mellan de olika exponeringarna med avseende på tid till metamorfos och vikt vid metamorfos. Det var heller ingen signifikant skillnad i överlevnad mellan de olika exponeringsgrupperna. Aromatasaktiviteten var mycket låg vid metamorfos och mätosäkerheten tämligen hög beroende på liten provmängd (hjärna eller njur- och gonadpaket från en individ per prov). Studien borde genomföras igen och då med fler hjärnor eller njur- och gonadpaket per prov.

1 Inledning

1.1 Introduktion

Många grodarter minskar snabbare i antal än något däggdjur eller fågel och det befaras att hundratals arter står inför utrotning (Stuart *et al.* 2004). Det finns många faktorer som påverkar dem, så som habitatförstöring, sjukdomar och introducering av nya predatorer (Beebee and Griffiths 2005). Hayes *et al* skrev i en rapport 2002 att endokrinstörande kemikalier som släpps ut i naturen kan vara ytterligare en orsak till amfibiernas sjunkande antal (Hayes *et al.* 2002).

Genom utsöndring och på grund av att överblivna mediciner ofta spolats ner når stora mängder av läkemedelssubstanserna reningsverken. Då de inte är konstruerade för att kunna bryta ner sådana ämnen släpps en del av läkemedlen ut till sjöar och vattendrag. Medicinerna är tillverkade för att ha en effekt på oss och det är då inte konstigt att de också kan påverka andra organismer som blir exponerade. Vid en studie där vattenprover togs på det inkommande orenade vattnet och på det reade vattnet vid reningsverket Kungsängsverket i Uppsala hittades det antidepressiva medlet fluoxetin i mätbar mängd (24 ng/l) i det reade utgående vattnet men inte i det orenade inkommande vattnet. Detta beror troligen på att fluoxetinet kommer ut ur kroppen i metaboliserad form och därför kunde inte påvisas i det inkommande vattnet men att det går tillbaka till sin ursprungliga form på grund av mikroorganismer i reningsverket (Landstinget i Uppsala län, 2005). År 2002 fann Metcalfe och medarbetare fluoxetin i det utgående vattnet från flera reningsverk i Kanada. Koncentrationerna varierade mellan 0,038 och 0,099 µg/l (Metcalfe *et al.* 2002).

I Venedigs laguner fann man 2004 det syntetiska hormonet etinylöstradiol (EE₂) i koncentrationen 0,125µg/l (Pojana *et al.* 2004). 1999 fann man i utsläppsvattnet vid ett reningsverk på Sveriges västkust EE₂ i halten 0,0045 µg/l (Larsson *et al.* 1999). Studier har visat att mycket låga men miljörelevanta halter (0,0018 µg/l), resulterar i feminisering hos både västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, och vanlig groda, *Rana temporaria*, i den mening att äggstockar bildas hos en genotypisk hane, (Pettersson och Berg 2007, Gyllenhammar *et al.* 2008). Flera experiment gjorda på fisk där de utsatts för miljörelevanta halter av etinylöstradiol har visat på effekter som induktion av vitellogeninsyntes (ägguleprotein (Läkemedelsverkets hemsida)), ovotestis och fenotypiskt könsbyte hos hanar samt onormal äggstocksutveckling och reducerad äggproduktion hos honor (Hogan *et al.* 2008).

I en studie i norra Texas, USA, påvisades fluoxetin i *Lepomis macrochirus* (solabborre), *Ictalurus punctatus* (prickig dvärgmal), *Cyprinus carpio* (karp), and *Pomoxis nigromaculatus* (kalikoabborre)

som levt i vatten nära utsläpp från kommunala reningsverk. Fluoxetin och sertraline, som också är en SSRI (av eng. selective serotonin reuptake inhibitor) och deras metaboliter, norfluoxetin och desmethylsertralin uppmättes alla till mer än 0,1 ng/g vävnad i alla vävnadsprover (Brooks *et al.* 2005).

I en studie där tusensnäckor, *Potamopyrgus antipodarum*, exponerats för fluoxetin via vatten med koncentrationer på 0,64, 3,2, 16, 80 eller 400 µg/l visades en signifikant minskning i reproduktionen, med mindre kullstorlek, vid de tre högsta koncentrationerna (Nentwig 2006).

1.2 Västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*

Sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*, är ett ofta använt försöksdjur, men släktingen västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, har blivit allt mer populär då den har kortare generationstid och mindre kroppsstorlek vilket gör att den kan hållas mer effektivt. De lägger även upp till tre gånger fler ägg än *X. laevis* (*Xenopus tropicalis* homes hemsida). De 66 olika Nieuwkoop och Faber-stadierna (NF-stadierna) är utvecklingsstadier för *X. laevis* som även är tillämpliga på *X. tropicalis* och vid NF-stadium 66 nås metamorfosen. (Nieuwkoop och Faber 1956). Könsdifferentieringen hos *X. tropicalis* sker under NF-stadium 54-59 (Takase och Iguchi 2007). Östrogenreceptorer har påvisats i hjärna, lever och gonad- och njurpaketet vid NF-stadium 51 hos *X. tropicalis* (Takase och Iguchi 2007). I det stadiet är gonaderna odifferentierade och kan påverkas av östrogenlika ämnen. Att det finns både östrogenreceptor-mRNA och aromatas-mRNA så tidigt tyder på att östrogen har en nyckelroll i könsgenieringen hos *X. tropicalis* (Miyashita *et al.* 2000). Xenopusarter lever i Afrika i dyiga vattensamlingar och långsamt rinnande vatten. Till utseendet är kroppen oval och huvudet är litet. Hela kroppen är relativt platt. Grodorna lever större delen av sitt liv i vatten. Vuxna grodor av släktet *Xenopus* är allätare (Nationalencyklopedins hemsida 1).

1.3 Aromatas

Endokrinstörande ämnen kan ändra aktivitet eller uttryck av specifika enzym. Aromatas (CYP 19 eller p450_{arom}) är det enzym som omvandlar androgen till östrogen och aromatas kan vara ett mål för endokrinstörande kemikalier (Milnes *et al.* 2006). Ett exempel där aromatasaktiviteten i en organism störts är ett laboratorieresperiment gjort av Crain och medarbetare 1997 där nykläckta hanliga alligatorer visade en ökad aromatasaktivitet i gonaderna efter exponering för herbiciden atrazin under embryostadiet. Aktiviteten var i nivå med kontrollhonornas (Crain *et al.* 1997).

Haye med medarbetare visade 2002 att hanliga grodor av arten sydafrikansk klogroda som under

larvstadiet exponerats för atrazin blev hermafroditer och hade utvecklat både testiklar och äggstockar (Hayes *et al.* 2002).

I ett experiment gjort på benfisken tilapia, *Oreochromis mossambicus*, utsattes yngel från dag 7-10 efter kläckning för bland annat 17 β -oestradiol (E₂) och para-klorofenylalanin som är ett ämne som hämmar syntesen av serotonin. Syftet med studien var att se hur könshormoner påverkar aromatasaktiviteten i hjärna och serotoninssystemet under kritiska perioden under könsdifferentieringen. Resultaten från de båda exponeringarna var att könskvoten blev skev, med fler honor än hanar och att aromatasaktiviteten samt serotoninhalten i hjärnan var lägre jämfört med kontroll ynglen. Man vet mycket lite om hur könshormoner påverkar serotoninssystemet och aromatasaktiviteten under könsdifferentieringen. (Tsai *et al.* 2000).

Man har funnit aromatas-mRNA i gonader hos *Xenopus* i NF-stadium 51 (Miyashita *et al.* 2000). Enzymet uttrycks även i hjärna hos grodor (Coady *et al.* 2005). Under yngelperioden skiljer sig aromatasaktiviteten i gonader mellan könen hos grodan *Rana rugosa*. Hos grodynglen var nivåerna av aromatas-mRNA under ovariumutvecklingen höga. När grodorna sedan injicerades med testosteron sjönk nivåerna snabbt. Grodornas gonader utvecklade sedan hanliga karaktärer (Kato *et al.* 2004). En studie på guldfisk visade att aromatasaktiviteten är högre i hjärna än i gonader (Sawyer *et al.* 2006). Hos juvenila individer av *X. laevis* är det även skillnad mellan könen med avseende på aromatasaktiviteten i gonaderna och hjärnan. Två till tre månader efter metamorfos hos *Xenopus laevis* var aromatasaktiviteten signifikant högre i de honliga gonaderna och hjärnorna än i de hanliga (Coady *et al.* 2005).

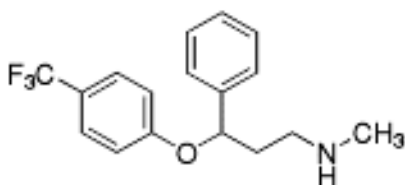
En av få studier som visar hur grodor påverkas av en aromatasinhibitor är ett *in vitro*-försök på gonader från *X. tropicalis*. Efter inkubering i ett medium innehållande 20 μ g aromatasinhibitor (CGS 16949A)/l i 14 dagar visade alla behandlade gonader hanliga karaktärer. Resultatet tyder på att aromatasenzymet är en huvudkomponent för ovariumutveckling av gonader hos grodor (Miyata och Kubo 2000). I en studie på påfågelslemfisk, *Salaria pavo*, mättes aromatasaktiviteten i ovarier och testiklar på viltfångade fiskar i olika stadier: "sneakers" som efterliknar honor till utseende och beteende för att i smyg kunna befrukta äggen, hanar som byggt bo, hanar som är i mellanstadiumet och är i ett icke-reproduktionsstadium med underutvecklade testiklar och honor. Aromatasaktiviteten i testiklarna hos de hanar i mellanstadiet var ca tio gånger högre än hos bobyggande hanar och "sneakers". Detta tyder på att aromatasaktivitet kan ha en undertryckande effekt på testikelutveckling (Gonçalves *et al.* 2008).

Hos benfiskar fungerar aromatasaktivitet i hjärnan som en markör för östrogena effekter på nervsystemet och är en ofta använd variabel vid studier av hormonella och i miljön förekommande östrogenerns roll i nervutveckling och nervplasticitet (Sawyer *et al.* 2006).

I en studie där japansk risfisk, *Oryzias latipes*, exponerades för 50 ng/l eller 100 ng/l etinylöstradiol ökade aromatasaktiviteten i testiklarna med 9,5 respektive 21,5 gånger (Kashiwada *et al.* 2007).

1.4 Fluoxetin

Fluoxetin (figur 1) är det verksamma ämnet i bland annat de antidepressiva medlen Fontex[®] och Prozac[®]. Fluoxetin är ett så kallat SSRI-medel som selektivt hämmar serotoninåterupptaget i synapsen vilket förlänger serotoninets verkningstid och förstärker nervimpulser som förmedlas av serotonin (Nationalencyklopedins hemsida 2). Serotoninets främsta funktion i människans kropp är att verka som signalsubstans i nervbanorna som har att göra med sinnesstämning såsom välbefinnande, oro och ångest (Nationalencyklopedins hemsida 3). Serotonin fungerar som en differentieringssignal och inducerar könsdimorfism i hjärnans struktur och funktion vid nervutvecklingen i hjärnan hos människan (Tsai *et al.* 2000). Flera studier har visat att parning och äggläggning kontrolleras direkt av serotonin hos flera arter inom fylat *mollusca* (Nentwig 2006).



Figur 1. Fluoxetins strukturformel, 3-Fenyl-N-metyl-3-[p-(trifluorometyl)fenoxi]propylamin (Fass hemsida).

Metaboliseringen av fluoxetin hos människan sker huvudsakligen i levern med hjälp av enzymet CYP2D6 och genom demetylering bildas den aktiva metaboliten norfluoxetin. Norfluoxetin tros vara lika effektivt som fluoxetin (Universitetssjukhuset i Lunds hemsida). Halveringstiden i blodplasma är 1-3 dagar för fluoxetin medan den är 7-15 dagar för norfluoxetin. En studie där radioaktivt fluoxetin administrerats visade på att ca 65% av fluoxetinet återfanns i urinen och ca 15% i feces (Lemberger *et al.* 1985).

En studie där guldfisk, *Carassius auratus*, injicerats med 5µg fluoxetin/g kroppsvikt två gånger i veckan i 14 dagar visade att östrogenhalten i blodplasman hos honorna sjönk. Slutsatsen i studien var att fluoxetin skulle potentiellt kunna påverka hormoner och modulera gener i hjärnan som är

involverade i funktioner och beteenden vid reproduktion hos honliga guldfiskar (Menninger *et al.* 2008). En studie på vattenloppa, *Ceriodaphnia dubia*, där de exponerades för högre halt fluoxetin än som hittats i miljön, visade att det ledde till minskat antal avkommor. (Henry *et al.* 2004).

1.5 Etinylöstradiol

Etinylöstradiol är ett syntetiskt östrogen som används vid behandling av östrogenbrist men används även i många preventivmedel så som p-piller, p-plåster m.fl. (Nationalencyklopedins hemsida 4). I denna studie har etinylöstradiol använts som referenssubstans då det är känt att exponering för så låg koncentration som 0,0018 µg/l ger skev könskvot hos *X. tropicalis* (Pettersson *et al.* 2006, Pettersson & Berg 2007, Gyllenhammar *et al.* 2008). Östrogenets påverkan på könsdifferentieringen kanske förmedlas av serotoninssystemet. Om serotoninssystemet behövs vid hjärnans könsdifferentiering kan genotypiska hanar som exponeras för östrogener, som sänker syntesen av serotonin och aromatasaktiviteten, därmed utvecklas till fenotypiska honor (Tsai *et al.* 2000).

1.6 Syfte och hypotes

Syftet med detta examensarbete är att undersöka effekter av fluoxetin och etinylöstradiol på det östrogenproducerande enzymet aromatas i hjärna och gonader hos *X. tropicalis* vid NF-stadium 56 under könsdifferentieringen och vid metamorfos (stadium 66) efter att de exponerats från stadium 47 till metamorfos.

Hypoteserna är att fluoxetinxponeringen ska leda till längre tid till metamorfos och lägre vikt vid metamorfos samt att aromatasaktiviteten ska förändras. Etinylöstradiolxponeringen förväntas leda till en skev könskvot med flest honor samt ökad aromatasaktivitet i hjärna och gonader.

2. Material och Metod

2.1 Parning

Fyra hanar och fyra honor av *X. tropicalis* injicerades med humant gonadotropin (hCG, 0,1 ml, 200 enheter/ml) i den dorsala lymfkörteln för att parningsbeteende skulle induceras. Dagen efter, då parningen skulle ske, injicerades grodorna igen men med en högre dos (hCG, 0,1 ml, 1000 enheter/ml). Grodorna placerades sedan i par i fyra akvarier som täcktes över.

2.2 Exponering

Vattentemperaturen hölls vid ca 26°C och ynglena hade en ljus- och mörkercykel på 12h. När ynglen nått NF-stadium 47 flyttades 23-24 yngel från varje parningsakvarium till åtta

försöksakvarier (Niewkoop och Faber 1956). Det totala antalet individer/akvarium var 70. Koncentrationerna av testsubstanserna var 3 och 30 nM fluoxetin samt 100 nM EE₂ med två replikat per koncentration. Som lösningsmedel användes etanol (0,0005 % etanol i akvarierna). Som kontrollgrupp användes två replikat där endast lösningsmedel tillsattes. Vattenvolymen i akvarierna var 8 liter och 5 liter vatten byttes ut en gång om dagen, 6-7 dagar i veckan. Vid varje vattenbyte tillsattes stamlösning bestående av testsubstans löst i etanol. Ynglen exponerades till NF-stadium 56 eller till metamorfos (NF-stadium 66) då de avlivades. Ammoniak- och nitrithalt i de olika försöksakvarierna mättes 9 gånger under försökets gång. Resultatet från mätningarna i de olika akvarierna visas i tabell 1. De olika akvarierna nämns som kontroll 1 och 2 (endast lösningsmedel), fluox 3A och 3B (koncentration 3 nM fluoxetin), fluox 30A och 30B (koncentration 30 nM fluoxetin) och EE2 A och EE2B (koncentration 100nM etinylöstradion).

Avlivningen av grodorna skedde genom att de lades i 10 % bensokain (löst i 70 % etanol). Vid metamorfos noterades kroppsvikt, kroppslängd, gonad- och njurlängd och antal dagar fram till metamorfos.

Tabell 1. Medelvärden \pm SD (mg/l) för ammoniak- och nitrithalt i de olika försöksakvarierna. De åtta akvarierna anges som kontroll 1 och 2 (endast lösningsmedel), fluox 3A och 3B (koncentration 3 nM fluoxetin), fluox 30A och 30B (koncentration 30 nM fluoxetin) och EE2 A och EE2B (koncentration 100 nM etinylöstradion).

Akvarium	Medelvärde \pm SD	Medelvärde \pm SD
	(mg/l)	(mg/l)
	Ammoniak	Nitrit
Kontroll 1	0,06 \pm 0,06	1,3 \pm 1,5
Kontroll 2	0,08 \pm 0,06	0,84 \pm 1,4
Fluox 3A	0,09 \pm 0,06	0,13 \pm 0,10
Fluox 3B	0,09 \pm 0,06	0,12 \pm 0,09
Fluox 30A	0,09 \pm 0,06	0,17 \pm 0,14
Fluox 30B	0,10 \pm 0,07	0,12 \pm 0,07
EE2 A	0,07 \pm 0,07	1,7 \pm 1,6
EE2 B	0,05 \pm 0,07	2,4 \pm 1,7

2.3 Aromatasaktivitet

2.3.1 Stadium 56

När ca 20 av de 70 ynglen i varje akvarium nått NF-stadium 56 avlivades 5 stycken per replikat dvs. 10 yngel per koncentration. Hjärna och njur- och gonadpaket dissekerades ut från 10 individer per koncentration och poolades. Detta upprepades två gånger till när 40 respektive 60 av de totalt 70

ynghen nått NF-stadium 56, detta för att inte endast få de individerna som utvecklades snabbast.

2.3.2 Metamorfos

När ynglen nått metamorfos, NF-stadium 66, avlivades de. Hjärnan togs ut och frystes direkt ner i flytande kväve. I de fall det var möjligt att bestämma grodans kön makroskopiskt togs även njur- och gonadpaketet ut och frystes ner i flytande kväve. Aromatasaktiviteten analyserades sedan på enskilda hjärnor och njur- och gonadpaketets. I de fall där könet inte kunde fastställas dissekerades mellangärdet inklusive njur- och gonadpaketet ut och lades i 4 % buffrad formalin. De bäddades sedan in i plast och könsbestämde histologisk (Söderqvist 2008).

2.4 Aromatasmätningar

2.4 Aromatasmätningar

Aromatasaktivitetsmätningarna utfördes enligt Lephart och Simpsons metod (1991) med vissa ändringar (Lephart och Simpson 1991). 5,2 µl (0,96 µM) ³H-märkt androstendione indunstades i eppendorfrör i ca 45-60 min. Vävnaden homogeniserades med 300 µl iskall buffert (50 nM KPO₄, 1 nM KCl, 1 nM EDTA och 1 nM ditiotritol pH 7,4). 100 µl av homogenatet, 5 µl propylenglukol, 45 µl buffert och 40 µl NADPH (1nM) sattes till eppendorfröret med det indunstade androstendionet. Proven inkuberades i 30 min. Reaktionen stoppades genom att proven lades på is och 100 µl 30 % TCA tillsattes. Proven centrifugerades i 10 min (1500 g). Sedan sattes 1250 µl kloroform till supernatanten. Därefter blandades provinhållet i 60 s på en vortexapparat. Sedan centrifugerades proverna i 25 min (1500 g). Vattenfasen pipetterades upp och späddes med 1250 µl destillerat vatten. Vattenblandningen centrifugerades i 5 min (1500 g). Supernatanten tillsattes 1 ml 5 %-ig suspension av aktivt kol i 0,5 % dextran (T-70). Proven blandades i ytterligare 40 s på vortexapparaten, därefter centrifugerades de i 30 min (10000 g). 1 ml av supernatanten pipetterades till ett scintillationsrör och 4 ml scintillationsvätska (Ultima Gold, PerkinElmer, Shelton, USA) tillsattes. Provet analyserades sedan i en Tri-Carb modell 1600CA scintillationsräknare. Proteinkoncentrationen i homogenatet bestämdes i en spektrofotometer med hjälp av ett BCA-kit (Nordic Biolabs AB, Stockholm, Sverige). Aromatasaktiviteten uttrycktes som pmol/h/mg protein.

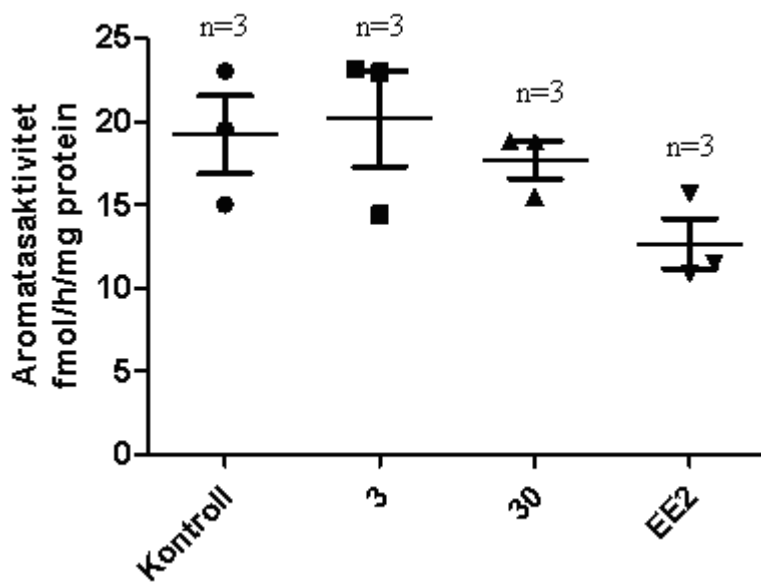
2.5 Statistiska metoder

Kruskal-Wallis (Dunn's multiple comparison test) användes för att jämföra de olika exponeringsgrupperna med avseende på aromatasaktivitet i hjärna, gonader, tid till metamorfos och kroppsvikt (GraphPad Prism 5). Vid jämförelse mellan honor och hanar med avseende på aromatasaktivitet i hjärna och i gonader, tid till metamorfos och vikt användes Mann-Whitneytest

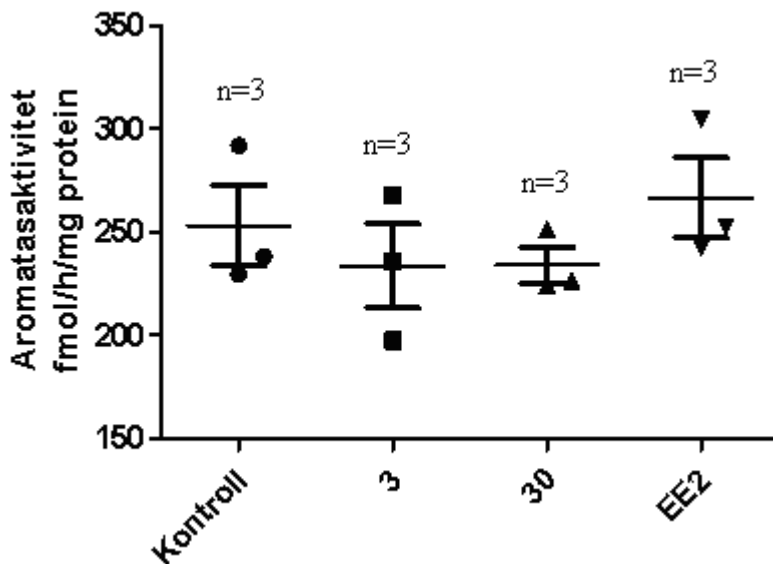
(GraphPad Prism 5). För att jämföra överlevnad mellan de olika behandlingsgrupperna användes ett χ^2 -test (GraphPad Prism 5).

3. Resultat

Det kunde inte ses några signifikanta skillnader mellan de olika exponeringarna i aromatasaktivitet i gonader eller hjärna vid stadium 56 (figur 1 och 2). Det var ingen sänkt överlevnad i någon av de olika exponeringarna (tabell 2). Det var heller ingen signifikant skillnad mellan de olika exponeringarna i tid till metamorfos eller i kroppsvikt vid metamorfos (tabell 3 och 4). Vid jämförelse av de olika exponeringsgrupperna med avseende på aromatasaktiviteten i hjärna vid metamorfos sågs ingen signifikant skillnad. Det var heller ingen signifikant skillnad då aromatasaktiviteten i hjärna jämfördes mellan könen (figur 3). Inga skillnader mellan de olika exponeringsgrupperna eller mellan könen kunde ses i aromatasaktiviteten i gonader vid metamorfos (figur 4). I kontrollgruppen var aromatasaktiviteten signifikant högre i hjärna än i gonader.



Figur 1. Aromatasaktivitet (medelvärde \pm SD) i gonader hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, i NF-stadium 56 i kontrollgruppen samt efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nmol/l) eller 100 nmol/l etinylöstradiol (EE₂). Varje mätvärde är baserat på tio poolade gonader, fem per replikat. 3= 3 nmol/l fluoxetin, 30= 30 nmol/l fluoxetin.



Figur 2. Aromatasaktivitet (medelvärde \pm SD) i hjärna hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, i NF-stadium 56 i kontrollgruppen samt efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nmol/l) eller 100 nmol/l etinylöstradiol (EE₂). Varje mätvärde är baserat på tio poolade hjärnor, fem per replikat. 3= 3 nmol/l fluoxetin, 30= 30 nmol/l fluoxetin.

Tabell 2. Överlevnad (medelvärde \pm SD) i procent hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nM) eller 100 nM etinylöstradiol (EE₂) samt i en kontrollgrupp.

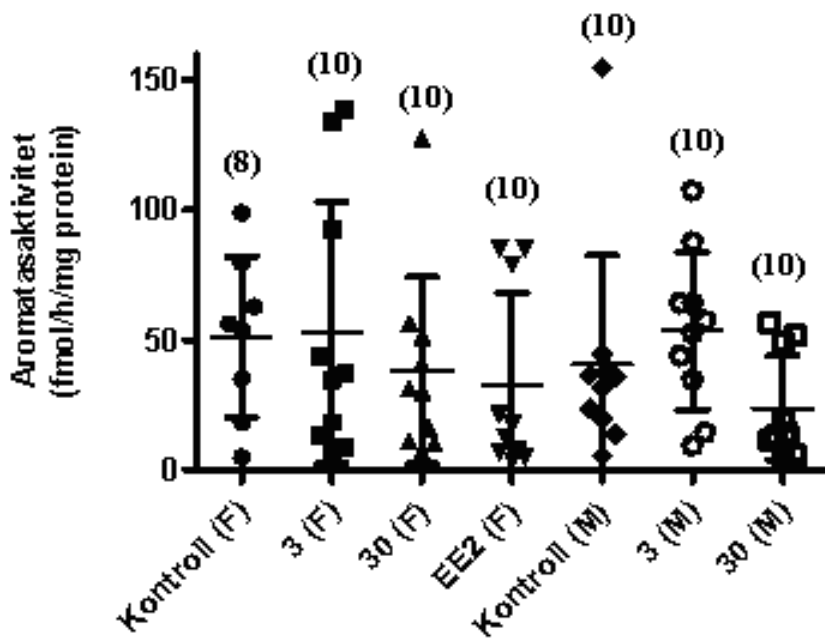
Exponerings-grupp	n=	Medelöverlevnad (\pm SD) (%)
Kontroll	140	81,4 \pm 8,5
Fluox 3 nM	136	87,5 \pm 6,4
Fluox 30 nM	141	86,5 \pm 2,1
EE ₂ 100 nM	134	94 \pm 9,2

Tabell 3. Vikt (medelvärde \pm SD) i gram vid metamorfos hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis* efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nM) eller 100 nM etinylöstradiol (EE₂) samt i en kontrollgrupp.

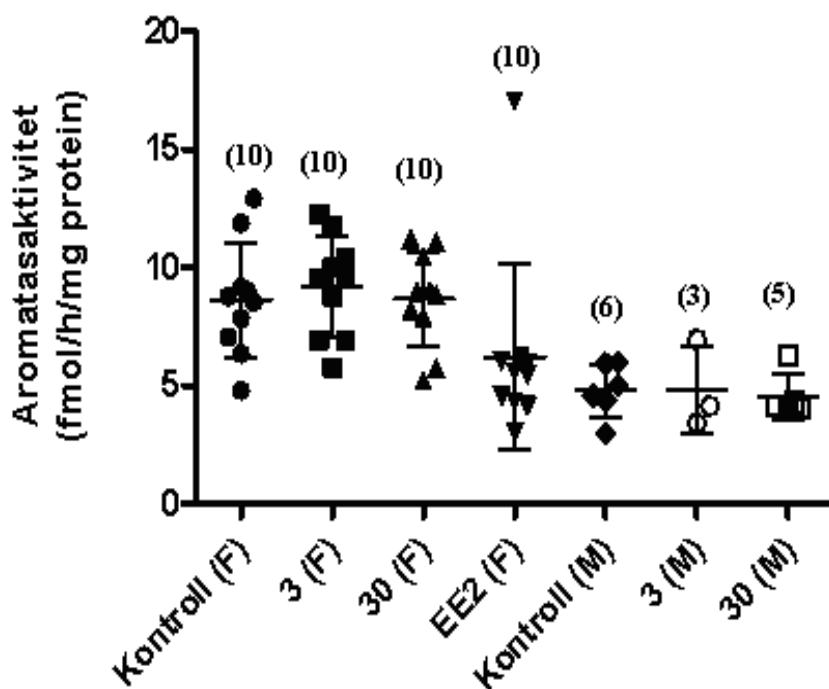
Exponerings-grupp	n=	Medelvikt (\pm SD) vid metamorfos (g)
Kontroll	61	0,38 (\pm 0,13)
Fluox 3 nM	66	0,42 (\pm 0,11)
Fluox 30 nM	69	0,37 (\pm 0,13)
EE ₂ 100 nM	96	0,36 (\pm 0,1)

Tabell 4. Tid (medelvärde \pm SD) i dagar från kläckning till metamorfos hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nM) eller 100 nM etinylöstradiol (EE₂) samt i en kontrollgrupp.

Exponerings-grupp	n=	Medeltid (\pm SD) till metamorfos (d)
Kontroll	71	51,8 (\pm 12,7)
Fluox 3 nM	87	53,1 (\pm 11,3)
Fluox 30 nM	91	50,8 (\pm 10,8)
EE ₂ 100 nM	94	51,4 (\pm 10,1)



Figur 3. Aromatasaktivitet (medelvärde \pm SD) i hjärna hos honliga och hanliga västafrikanska klogrodor, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nM) eller 100 nM etinylöstradiol (EE₂) samt i en kontrollgrupp. F=honor M=hanar. Antal anges inom parentes. 3= 3 nmol/l fluoxetin, 30= 30 nmol/l fluoxetin.



Figur 4. Aromatasaktivitet (medelvärde \pm SD) i gonader hos honliga och hanliga västafrikanska klogrodor, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos efter exponering för fluoxetin (3 eller 30 nM) eller 100 nM etinylöstradiol (EE₂) samt i en kontrollgrupp. F=honor M=hanar. Antal anges inom parentes. 3= 3 nmol/l fluoxetin, 30= 30 nmol/l fluoxetin.

4. Diskussion

Det är ytterst viktigt att vi undersöker om och hur de läkemedel som kommer ut ur våra reningsverk påverkar organismer i naturen. Vissa läkemedel som läcker ut i naturen är hormonstörande och kan ha förödande konsekvenser för organismerna som exponeras då bland annat deras könskvot rubbas. Etinylöstradiol som finns i p-piller är ett exempel på ett hormonstörande ämne som har visats att till exempel ge den effekten hos *X. tropicalis* att genotypiska hanar bildar äggstockar (Pettersson *et al.* 2006, Pettersson & Berg 2007, Gyllenhammar *et al.* 2009).

Syftet med denna studie var att undersöka om fluoxetin, som har återfunnits i naturen, verkar hormonstörande genom att undersöka aromatasaktiviteten i hjärna och gonader vid könsdifferentiering och metamorfos hos västafrikansk klogroda. Syftet var även att undersöka etinylöstradiols effekt på aromatasaktiviteten i hjärna och gonader vid könsdifferentiering och metamorfos.

Studier på fisken tilapia som exponerats för 17β -oestradiol under dag 7-10 efter kläckning gav en minskad aromatasaktivitet och serotoninhalt i hjärnan. De exponerade fiskarna fick en skev könskvot med fler honor. Även exponering för paraklorofenylalanin (dag 7-10), som hämmar serotoninsyntesen i hjärnan, resulterade i en skev könskvot med fler honor och en minskad aromatasaktivitet i hjärnan. Detta tyder på att serotonin är viktigt för testikelutvecklingen i denna art (Tsai *et al.* 2000).

Som förväntat vid etinylöstradiol exponeringen i detta experiment blev alla hanliga grodor feminiserade i den mening att de bildade äggstockar. Dessa grodor hade dock inte minskad aromatasaktivitet i hjärnan jämfört med kontrollen, varken vid NF-stadium 56 eller vid metamorfos, vilket jag hade förväntat mig att de skulle ha då Tsai och medarbetare 2000 såg en sänkt aromatasaktivitet i hjärna hos tilapia yngel exponerade för 17β -oestradiol jämfört med kontroll ynglen (Tsai *et al.* 2000).

Den här undersökningen gav heller inte något resultat som visar en förhöjd aromatasaktivitet i gonader jämfört med kontrollen efter exponering för etinylöstradiol, varken vid NF-stadium 56 eller vid metamorfos. Det hade jag förväntat mig då Kashiwada med kollegor exponerade japansk risfisk för etinylöstradiol och fick ett resultat med ökad aromatasaktivitet i testiklarna (Kashiwada *et al.* 2007)

Vid NF-stadium 56 syntes ingen signifikant skillnad i aromatasaktivitet i hjärnan eller i gonaderna mellan de olika fluoxetinexponeringarna och kontrollgruppen. Någon slags förändring av aktiviteten var dock förväntad då fluoxetin inverkar på serotonin som i kroppen bland annat fungerar som en differentieringssignal och inducerar könsdimorfism i hjärnans struktur och funktion vid nervutvecklingen i hjärnan hos människan (Tsai *et al.* 2000).

En studie gjord på *X. laevis* visade på förlängd tid till metamorfos efter exponering för fluoxetin i koncentrationerna 2,95 eller 29,5 µg/l. En annan effekt var reducerad vikt vid metamorfos vid koncentrationerna 0,059, 0,259, 2,95 och 29,5 µg/l. (Black och Rogers 2005). Då koncentrationerna i den här studien ligger inom spannet av de koncentrationer som Black och Rogers använde förväntade jag mig se en signifikant skillnad mellan de olika exponeringarna i vikt vid metamorfos eller tid till metamorfos, men det var ingen signifikant skillnad. Dock vet jag inte vilka exponeringsförhållanden de använde. Skillnader i till exempel yngeltätheten skulle kunna påverka resultaten.

I en tidigare studie var aromatasaktivitet i hjärna hos kontrollgrodor som endast exponerats för lösningsmedlet aceton från NF-stadium 47 till metamorfos, ca 50 – 240 fmol/h/mg protein vid metamorfos (Moa Kvarnryd 2008). I den här studien var aromatasaktiviteten i de enskilda hjärnorna hos kontrollgrodorna 0-150 fmol/h/mg protein vid metamorfos. Då aromatasaktiviteten vid metamorfos i denna studie var mycket låg antas att något gick fel under försöket.

Om jag skulle göra om försöket skulle jag poola 3 gonader eller 3 hjärnor per mätvärde i stället för att göra mätningar på enskilda organ. Kanske var det så att det var för lågt proteininnehåll för att mäta i en enskild gonad/hjärna. Den makroskopiska könsbestämningen av hanar var särskilt svår. Det blev bara ett fåtal hanar som jag kunde mäta aromatasaktiviteten i gonaderna på vid metamorfos vilket gör att det inte känns säkert att jämföra aromatasaktiviteten i gonader mellan könen då grupperna skiljer i antal mätvärden. Jag skulle ha fler mätvärden och samma antal mätvärden i de olika mätgrupperna och i könsgrupperna.

5. Slutsats

Studien borde upprepas och ytterligare aspekter borde undersökas, såsom till exempel reproduktionsframgång (antal kläckta ägg, överlevnad hos avkommorna osv.) hos de exponerade grodorna. Man borde även undersöka missbildningar och beteendestörningar. Fluoxetin är ett av många läkemedel som släpps ut ur reningsverken och borde undersökas ingående vad det kan ha för

effekter på exponerade organismer i naturen. Man kan heller inte vara säker på att fluoxetin inte samverka med andra läkemedel som också finns utsläppta i naturen och på så vis får en effekt eller en grövre effekt på exponerade organismer.

6. Referenser

- Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125, 271–285.
- Black, M.C., Rogers, E.D., Henry, T.B. 2005. Endocrine effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) on aquatic organisms.
<http://www.epa.gov/ncer/publications/workshop/8-23-2005/abstract/black1.html>
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 24, Issue 2, pp 464–469
- Coady, K.K., Murphy, M.B., Villeneuve, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy J.P. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol 62, Issue 2, Pages 160-173.
- Crain, D. A., Guillette, L. J., Rooney, A. A. & Pickford, D. B. 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect* 105, 528-533.
- Gonçalves, D., Teles, M., Alpedrinha, J., Oliveira, R.F. 2008. Brain and gonadal aromatase activity and steroid hormone levels in female and polymorphic males of the peacock blenny *Salaria pavo*. *Hormones and behavior*, Volume 54, Issue 5. November 2008, Pages 717-725
- Gyllenhammar, I., Holm, L., Eklund, R., Berg, C. 2009. Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*. Volume 91, Issue 2, 31 January 2009, Pages 171-178
- Hayes, T.B. 1998. Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians: Genetic and Developmental Mechanisms *The Journal of Experimental Zoology*. 281:373–399
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. & Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 99, pp.5476-5480
- Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C. 2004. Acute and chronic toxicity of five

- selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Sep;23(9):2229-33.
- Hogan, N.S., Duarte, P., Wade, M.G., Lean, D.R.S., Trudeau, V.L. 2008. Estrogenic exposure affects metamorphosis and alters sex ratios in the northern leopard frog (*Rana pipiens*): Identifying critically vulnerable periods of development. *General and Comparative Endocrinology* Volume 156, Issue 3, pp.515-523
- Kashiwada S, Kameshiro M, Tatsuta H, Sugaya Y, Kullman SW, Hinton DE, Goka K. 2007. Estrogenic modulation of CYP3A38, CYP3A40, and CYP19 in mature male medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology* 145(3):370-8
- Kato, T., Matsui, K., Takase, M., Kobayashi, M., Nakamura, M. 2004. Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology* 137, 227-236
- Kvarnryd, M. 2008. Effekter av clotrimazol på könsdifferentiering och aromatasaktivitet i gonader och hjärna hos västafrikansk klogroda (*Xenopus tropicalis*). Examensarbete nr 124 från ekotoxikologiprogrammet, Uppsala universitet.
http://www.ibg.uu.se/upload/2008-05-15_073716_879/n%C3%A4tversion.pdf
- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P.-E., Förlin, L. 1999. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* Volume 45, Issues 2-3, 1 April 1999, Pages 91-97
- Lemberger, L., Bergstrom, R.F., Wolen, R.L., Farid, N.A., Enas, G.G., Aronoff, G.R. 1985. Fluoxetine: clinical pharmacology and physiologic disposition. *The journal of clinical psychiatry* 46(3 Pt 2):14-9
- Lephart, E. D. & Simpson, E. R. 1991. Assay of aromatase-activity. *Meth. Enzymol.* 206, 477–483
- Menninger, J.A., Martyniuk, C.J., Crump, K., Xiong, H., Zhao, E., Popescu, J., Anisman, H., Cossins, A.R., Xia X., Trudeau, V.L. 2008. The effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiological Genomics* 35: 273-282.
- Metcalf, C.D., Miao, X-S., Koenig, B.G., Struger, J. 2003. Distribution of acid and Neutral drugs in surface water near sewage treatment plants in lower great lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 22, No 12, pp. 2881-2889
- Milnes, M. R., Bermudez, D. S., Bryan, T. A., Edwards, T. M., Gunderson, M. P., Larkin, I. L. V., Moore, B. C. & Guillette, J. L. J. 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research* 100, pp.3-17.

- Miyashita, K., Shimizu, N., Osanai, S., Miyata, S. 2000. Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the *Xenopus* ovary. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75, 101-107.
- Miyata, S., & Kubo, T., 2000. In vitro Effects of Estradiol and aromatase Inhibitor Treatment on Sex Differentiation in *Xenopus laevis* Gonads. *General and Comparative Endocrinology* 119,105-110
- Nentwig, G., 2006. Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part II: The Antidepressant Drug Fluoxetine. *Environmental Contamination and Toxicology*. Volume 52, Number 2, Pages 163-170
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1956. Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin) – A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis.
- Pettersson, I., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K., Mortensen, A.A., Berg, C., 2006. Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquatic toxicology* 79(4):356-65.
- Pettersson, I., Berg, C., 2007. Environmentally relevant concentration of ethynylestradiol cause female-biased sex ratio in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry* May;26(5):1005-9.
- Pojana, G., Bonfà, A., Buseti, F., Collarin, A., Marcomini, A. 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. *Environmental toxicology and chemistry* Aug;23(8):1874-80
- Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., Callard, G.V. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and comparative endocrinology* Vol 147 Issue 2, pages 108-117
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide, *Science* 3, nr 5702, pp 1783-1786
- Söderqvist, A., 2008. Effekter av det antidepressiva läkemedlet flouxetin på metamorfos och könsdifferentiering hos *Xenopus tropicalis*. Examensarbete från civilingenjörsprogrammet i miljö- och vattenteknik, Uppsala Universitet.
http://www.w-program.nu/filer/exjobb/Anneli_S%C3%B6derqvist.pdf
- Takase, M., Iguchi, T. 2007. Molecular cloning of two isoforms of *Xenopus (Silurana) tropicalis* estrogen receptor mRNA and their expression during development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. Volume 1769, Issue 3, Pages 172-181

Tsai, C.-L., Wang, L.-H., Chang, C.-F., Kao, C.-C. 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Journal of Neuroendocrinology. Vol. 49, 894-898

Internetsidor

FASS hemsida, substans: fluoxetin

http://www.fass.se/LIF/produktfakta/substance_products.jsp?substanceId=IDE4POF4UAPRVVERT1 2008-03-31

Läkemedelsverkets hemsida

http://www.lakemedelsverket.se/Tpl/NewsPage_666.aspx 2008-09-08

Nationalencyklopedins hemsida

1. Sökord, klogrodor

http://ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=226531&i_word=klogrodor 2008-06-07

2. Sökord, SSRI-medel

http://ne.se/jsp/search/article.jsp?i_sect_id=313716&i_history=1 2008-03-31

3. Sökord, serotonin

http://ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=303795&i_word=serotonin 2008-03-31

4. Sökord, etinylöstradiol

http://ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=164924&i_word=etinyl%20f6stradiol 2008-06-03

Universitetssjukhuset i Lunds hemsida (Specialenheten klinisk kemi och farmakologi)

<http://www.analysforteckning.usil.se/Pages/aList/view.asp?Nr=854> 2008-04-02

Rapport ”Kartläggning av läkemedelsrester i avlopps- och dricksvatten.

Provtagning vid Akademiska sjukhuset, Uppsala och lasarettet i

Enköping hösten 2005.” Landstinget i Uppsala län 2005

<http://www.lul.se/upload/miljo/Rapport%20provtagningsresultat.pdf> 2008-04-02

Xenopus Tropicalis homes hemsida, Universitetet i Virginia, USA

<http://faculty.virginia.edu/xtropicalis/overview/intro.html> 2008-04-02