



UPPSALA  
UNIVERSITET

Projektrapport från utbildningen i

**EKOTOXIKOLOGI**

*Ekotoxikologiska avdelningen*

Nr 124

Effekter av clotrimazol på könsdifferentiering och aromatasaktivitet i gonader och hjärna hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*

Moa Kvarnryd

## Innehållsförteckning

<b>Förord</b> .....	3
<b>Sammanfattning</b> .....	4
<b>Introduktion</b> .....	5
<b>Bakgrund</b> .....	5
<b>Västafrikansk klogroda, <i>Xenopus tropicalis</i></b> .....	5
<b>Clotrimazol</b> .....	7
<u>Förekomst i naturen</u> .....	8
<b>Syfte och hypotes</b> .....	9
<b>Material och metod</b> .....	9
<b>Parning</b> .....	9
<b>Exponering</b> .....	9
<b>Aromatasaktivitet</b> .....	10
<u>Referensgrupp - yngel</u> .....	10
<u>Referensgrupp – vid metamorfos</u> .....	10
<u>Exponerade individer</u> .....	11
<u>Metod för aromatasaktivitetsmätning</u> .....	11
<b>Histologisk könsbestämning</b> .....	12
<b>Statistiska metoder</b> .....	12
<b>Resultat</b> .....	13
<b>Aromatasaktivitet hos individer från referensgruppen</b> .....	13
<b>Aromatasaktivitet hos exponerade individer</b> .....	14
<b>Histologi</b> .....	17
<b>Tillväxt och tid till metamorfos</b> .....	17
<b>Diskussion</b> .....	18
<b>Effekt av clotrimazol på aromatasaktiviteten och könsdifferentieringen</b> .....	18
<b>Metodutveckling</b> .....	20
<b>Tillväxt och tid till metamorfos</b> .....	20
<b>Slutsats</b> .....	21
<b>Referenser</b> .....	22

## **Förord**

Detta 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 Irina Pettersson för all hjälp och stöd med allt praktiskt arbete samt Cecilia Berg för all handledning under examensarbetet. Ni har varit ett stort stöd som alltid tagit er tid för mig när jag haft frågor och funderingar! Jag vill även tacka Margareta Mattsson för hjälpen med histologin! Tack även till Gunnar Steinholtz för skötseln av grodorna under försökets gång. Tack alla på avdelningen för en trevlig tid! Till sist ett tack till min sambo Jesper som hjälp mig under arbetets gång med allt ifrån krångliga datorer till kluriga formuleringar.

## Sammanfattning

Runt om i världen blir amfibier allt mer sällsynta. Flera möjliga orsaker till minskningen av groddjuren har föreslagits varav en är endokrinstörande miljöföroreningar. Clotrimazol är en fungicid som används som läkemedel och som har påvisats i ytvatten. Clotrimazol hämmar aromatas (CYP 19 eller p450arom) vilket är det enzym som ansvarar för att omvandla androgen till östrogen. Aromatas uttrycks i olika vävnader såsom gonader, lever och hjärna. Studier tyder på att aromatas spelar en avgörande roll i könsdifferentieringen hos amfibier (salamander), fåglar och reptiler. Syftet med denna studie var att undersöka om exponering av clotrimazol under yngelperioden påverkar könsdifferentieringen samt aromatasaktiviteten i gonader och hjärna hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*. Ynglen exponerades för 0, 3, 30 och 300 µg/L clotrimazol från några dagar efter kläckning (utvecklingsstadium 47) till metamorfos. Aromatasaktiviteten mättes i hjärna och gonader under könsdifferentieringen (utvecklingsstadium 56) samt vid metamorfos. Resultaten indikerar att aromatasaktiviteten i hjärnan minskade med ökad clotrimazolkoncentration vid stadium 56, medan aktiviteten i gonaderna ökade. Histologisk könsbestämning visade att samtliga individer utvecklat ovarier vid metamorfos, även kontrollerna, vilket avviker från normal könskvot. I en referensgrupp bestående av individer från samma yngelkull var könsfördelningen mer balanserad än i exponeringsgrupperna. Om den skeva könskvoten är en effekt av clotrimazol skulle det betyda att kontrollen kontaminerats med clotrimazol. Vid metamorfos var hjärnans aromatasaktivitet i individerna från såväl kontrollgrupp som från alla exponeringsgrupper signifikant lägre än den hos referenshonorna, vilket stöder hypotesen att kontrollgrupperna påverkats av clotrimazol. Ingen signifikant skillnad mellan de clotrimazolexponerade grupperna och kontrollen kunde påvisas vad gäller aromatasaktiviteten i hjärna och gonader vid metamorfos. Resultaten tyder på att exponering för clotrimazol under yngelperioden resulterade i hämmad aromatasaktivitet i hjärnan och ökad aktivitet i gonaderna vid tiden för könsdifferentiering vilket skulle kunna spegla den ökade ovariumbildningen i förhållande till testikelbildning. En uppföljande studie behövs för att konfirmera de preliminära resultaten i detta arbete.

## Introduktion

### Bakgrund

Runt om i världen blir amfibier allt mer sällsynta och det har framförts rapporter om att 1856 amfibiarter, dvs. 32,5 %, är globalt hotade (Stuart et al. 2004). Orsakerna till minskningen av amfibier kan vara många. Klimatförändringar och invaderande arter är några faktorer som har diskuterats (Stuart et al. 2004) men även miljöföroreningar har föreslagits (Hayes et al. 2002). Det är väl känt att många miljöföroreningar kan störa den normala fysiologin och endokrinologin hos organismer. Tidigare studier har visat på samband mellan exponering för endokrinstörande föroreningar, så som t.ex. PCB och DDT, och reproduktiva abnormiteter hos vild fisk, fåglar och däggdjur (Fry & Toone 1987; Helle et al. 1976; Jobling et al. 2002).

Könsbestämning hos de flesta amfibier kontrolleras genetiskt men exponering för hormoner kan slå ut den genetiska mekanismen och påverka könsdifferentieringen (Schmid & Steinlein 2001). Man skulle kunna tänka sig att det skulle krävas höga doser hormoner för att påverka könsdifferentieringen men mycket låga koncentrationer (0,06nM) av etinylöstradiol, koncentrationer lägre än de som förekommer i miljön, kan resultera i en skev könskvot hos både västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, och vanlig groda, *Rana temporaria*, (Pettersson et al. 2006).

Mekanismen bakom hur hormoner påverkar könsdifferentieringen i grodor är inte känd (Hayes 1998). Mer kunskap om könsdifferentieringen hos amfibier är en förutsättning för riskbedömning av endokrinstörande ämnen när det gäller reproduktionsbiologi (Bogi et al. 2002).

Amfibier befinner sig en stor del av sitt liv i akvatisk miljö då deras embryo- och yngelstadium utvecklas i vatten (Hayes et al. 2002). Därigenom kan amfibier ute i naturen exponeras för många olika hormonstörande ämnen, bl.a. östrogener som t.ex. etinylöstadiol. På laboratorium gäller generellt att grodor som exponeras under yngelstadiet för androgener respektive östrogener blir maskuliniserade respektive feminiserade (bildar hanliga respektive honliga gonader) (Hayes 1998).

En mekanism för hur endokrinstörande ämnen verkar är att ändra aktivitet eller expression av specifikt enzym. Aromatas (CYP 19 eller p450arom) är det enzym som ansvarar för att omvandla androgen till östrogen. Det uttrycks i olika vävnader såsom gonader, lever och hjärna (Milnes et al. 2006). Hos hälleflundra, *Hippoglossus hippoglossus*, har två olika former av aromatas påvisats, en i hjärna (cyp19b) och en i gonad (cyp19a) (Matsuoka et al. 2006). Aromatas kan vara ett mål för endokrinstörande kemikalier. Hanliga alligatorer som exponerats av herbiciden aztrazin under embryostadiet visade en ökad aromatasaktivitet i gonaderna, upp till en nivå likande kontrollhonornas (Crain et al. 1997). Hos sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*, har exponering för aztrazin under larvstadiet resulterat i tvekönade hanar (Hayes et al. 2002).

Tidigare studier tyder på att aromatasenzymet spelar en avgörande roll i könsdifferentieringen hos amfibier (salamander), fåglar och reptiler (Chardard & Dournon 1999; Desvages & Pieau 1992; Smith et al. 1995). Hos dessa djurgrupper har behandling av genetiskt honliga embryon med aromatasinhibitor visats inducera könbyte från genetisk hona till fenotypisk hane (Chardard & Dournon 1999; Elbrecht & Smith 1992; Wennstrom & Crews 1995). Ett exempel är en studie gjord på spansk revbenssalamander, *Pleurodeles waltl*, som exponerades för aromatasinhibitor fadrozol. Behandlingen påbörjades omedelbart före gonaderna börjat differentiera och avslutades vid metamorfos. Vid en koncentration på 300 µg/L fadrozol utvecklade 9 av 30 genetiskt honliga yngel hanlig fenotyp, dvs. utvecklade testiklar. Efter två dagars exponering, under yngelperioden, för en fadrozolkoncentration på 400 µg/L var aromatasaktiviteten i honliga gonader reducerad till en hanlig nivå (Chardard & Dournon 1999).

Hos grodor har aromatas påvisats i gonader och i hjärna (Coady et al. 2005; Hecker et al. 2005; Kato et al. 2004; Ohtani et al. 2002). Aromatasaktiviteten i gonader skiljer sig mellan könen under yngelperioden. Under ovariumutveckling hos grodyngel, *Rana rugosa*, var nivåerna av aromatas mRNA höga, för att sedan snabbt sjunka efter det att grodan injicerades med testosteron och gonaden utvecklade hanlig karaktär (Kato et al. 2004). Även hos juvenila grodor har skillnader mellan könen i aromatasaktivitet setts i gonader samt även i hjärna. Hos juvenila sydafrikanska klogrodor, två till tre månader efter metamorfos, var aromatasaktiviteten signifikant högre i gonader och hjärna hos honor jämfört med hos hanar (Coady et al. 2005).

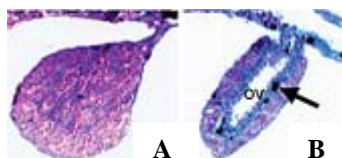
Det finns få tidigare studier på hur grodor påverkas av en potent aromatasinhibitor. Ett *in vitro*-försök på gonaderna från sydafrikansk klogroda tyder på att aromatasenzymet även är huvudkomponenten för ovariumutveckling av gonaderna hos grodor. Där hölls gonaderna i ett medium innehållande 20 µg/L aromatasinhibitor (CGS 16949A). Efter 14 dagar visades alla behandlade gonader ha en hanlig karaktär (Miyata & Kubo 2000).

### **Västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis***

I de flesta studier på grodor har sydafrikansk klogroda används som modelldjur. I denna studie valdes det istället använda dess nära släkting västafrikansk klogroda eftersom den har kortare generationstid och inte kräver lika mycket utrymme. De 66 utvecklingsstadier (Nieuwkoop och Faber (NF) stadier) som sydafrikansk klogroda har (Nieuwkoop & Faber 1956), är tillämpliga även på västafrikansk klogroda. NF-stadier är karaktäriserade med avseende på yttre morfologi och det sista stadiet nås vid metamorfos.

Hos många grodor sker könsdifferentiering under yngelstadiet och är klar vid metamorfosen. Hos västafrikansk klogroda sker den under NF-stadierna 54 till 59 (Takase & Iguchi 2007). Hos grodyngel, från västafrikansk klogroda, har östrogenreceptorn påvisats i NF-stadium 51 (Takase & Iguchi 2007). I detta stadium är gonaderna odifferentierade vilket betyder att könsdifferentieringen hos grodyngel kan påverkas av östrogenlika ämnen (Miyashita et al. 2000).

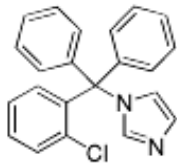
En testvariabel vid studier av endokrinstörande ämnens effekt på grodor är könsdifferentieringen. Könsutvecklingen är lätt att studera histologiskt. I differentierade ovarier är mörgen tillbakabildad och ovariehålighet har bildats (Pettersson et al. 2006) . Hos hanar migrerar könscellerna till mörgen och ingen hålighet bildas (Pettersson et al. 2006) . (Fig. 1).



**Figur 1.** **A** Histologiskt snitt på en testikel från sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*, vid metamorfos. Könscellerna har migrerat till mörgen och ingen hålighet syns. **B** Histologiskt snitt på ett ovarium från sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*. Mörgen har tillbakabildats och bildat ett hålrum. (Hayes et al. 2002)

## Clotrimazol

Clotrimazol (Fig. 2) är en fungicid som främst används mot dermatologiska och gynekologiska svampinfektioner. Den är den aktiva substansen i Canesten<sup>®</sup> och i Klotrimazol NM Pharma (Fass hemsida). Clotrimazol inhiberar ergosterolsyntesen genom att störa den p450-beroende 14- $\alpha$ -demetyleringen av lanosterol vilket är huvudsteget i biosyntesen av ergosterol (OSPAR 2007). Ergosterol förekommer i svampars cellmembraner (Robine et al. 2005) och inhibering av dess syntes leder till skador på cellmembranet (OSPAR 2007).



**Figur 2.** Strukturformel för clotrimazol, 1-(2-Klorotrifenylnmetyl)imidazol

*In vitro*-försök på fisk tyder på att clotrimazol är en potent inhibitor av aromatas i både hjärna och gonader (Hinfray et al. 2006; Monod et al. 1993; Noaksson et al. 2003).

Hjärnor från olika benfiskar exponerades *in vitro* för olika koncentrationer clotrimazol och aromatasaktiviteten i dessa hjärnor visade sig minska med ökad clotrimazolkoncentration (Noaksson et al. 2003). Den clotrimazolkoncentration som gav upphov till 50 % inhibering av aromatasaktivitet jämfört med kontrollen beräknades till 0,9  $\mu$ M. Hjärnor och ovarier från regnbåge, *Oncorhynchus mykiss*, exponerades *in vitro* för clotrimazol. De exponerade organen hade en sänkt aromatasaktivitet jämfört med kontrollen. En 50 % inhibering av aromatasaktivitet, i både hjärna och ovarier, erhöles vid exponering för 10  $\mu$ M (Hinfray et al. 2006). *In vitro*-exponering för clotrimazol påverkar könsdifferentieringen hos grodan *Rana dybowskii*. Oocyter inkuberades i 24 h med olika koncentrationer av clotrimazol. Exponering för 6  $\mu$ M clotrimazol resulterade i en 50 % inhibering av oocyttnogad jämfört med kontrollen (Choi et al. 2007).

### Förekomst i naturen

Den största utsläppskällan av clotrimazol är avloppsvatten från hushåll som släpps ut från kommunala reningsverk (OSPAR 2007). Clotrimazol har hittats utanför reningsverk i floden Tyne i Storbritannien. Nio prover togs och clotrimazol detekterades i alla prover. Koncentrationerna varierade från 6 till 34 ng/L (Roberts & Thomas 2006). Prov på ytvatten vid fem flodmynningar i Storbritannien har tagits och analyserats med avseende på 14 farmaceutiska föreningar som valts från en prioritetslista från UK Environment Agency samt



Oslo och Paris Kommissionen (OSPAR 2007). Bland dessa föreningar ingår clotrimazol vilken förekom mycket frekvent i de olika proverna som togs i Storbritannien, med en maxkoncentration på 22 ng/L (Thomas & Hilton 2004). Clotrimazol har även hittats i sedimenten i två svenska sjöar, Molnbyggen och Vadbäcken (Noaksson et al. 2003). Ett log  $K_{ow}$ -värde på 4,1, en biokoncentrationsfaktor (BCF) på 610 och en halveringstid på mer än 60 dagar visar att clotrimazol inte är lätt nedbrytbar och dess potential för bioackumulering är tämligen hög (OSPAR 2007).

## **Syfte och hypotes**

Detta examensarbete syftar till att undersöka om exponering för clotrimazol under yngelperioden påverkar könsdifferentieringen samt aromatasaktiviteten i gonader och hjärna hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*. Hypotesen är att exponering för clotrimazol orsakar minskad aromatasaktivitet i gonader under könsdifferentieringen vilket leder till en ökad andel hanar. I arbetet ingår en metodutveckling med syfte att undersöka hur aromatasaktiviteten i gonader och hjärna på bästa sätt mäts under yngelperioden samt vid metamorfos.

## **Material och metod**

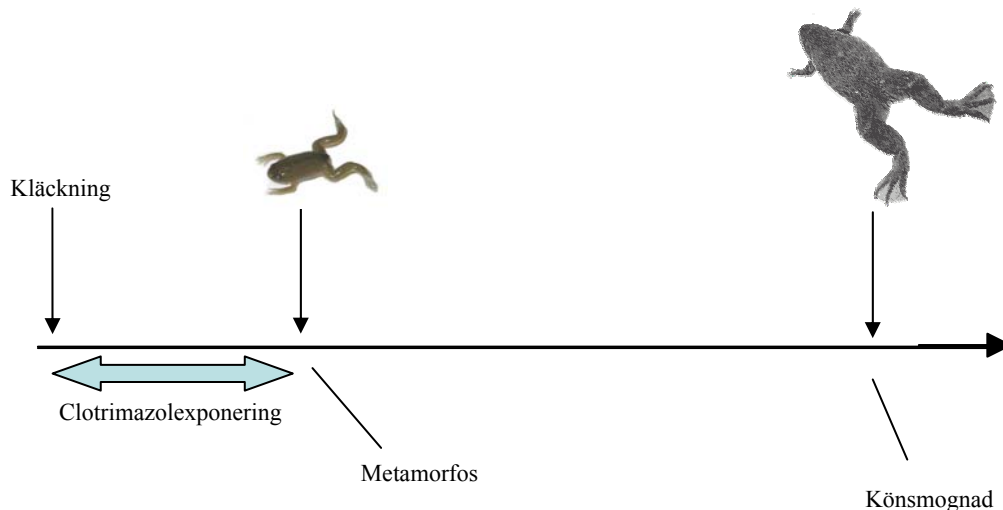
### **Parning**

För att inducera parningsbeteende injicerades 4 hanar och 4 honor av västafrikansk klogroda i den dorsala lymfkörteln med humant gonadotropin (hCG, 0,1 mL, 200 enheter/mL) dagen innan parningen skulle äga rum. Dagen för parning injicerades grodorna med en högre dos hCG (0,1 mL, 1000 enheter/mL). Grodorna placerades parvis i små akvarier observerades med 45 minuters intervall under sex timmar.

### **Exponering**

Yngel från de fyra par västafrikanska klogrodor som parats hölls i 10-litersakvarier (26°C, 12 timmars ljus/mörkeracykler). Vid NF-stadium 47 (Nieuwkoop & Faber 1956) flyttades 55 – 60 yngel till vart och ett av 8 st 4-litersakvarier och exponeringen för clotrimazol började. De resterande ynglen utgjorde en referensgrupp. Ynglen exponerades för 0, 3, 30 eller 300 µg/L clotrimazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) med två replikat per koncentration. Ynglen exponerades fram till metamorfos (NF-stadium 66) (Fig. 3) under semi-statiska förhållanden. Hälften av vattnet byttes ut tre gånger i veckan. Stamlösningar av clotrimazol i aceton (37,5

mg/L, 3,75 mg/L och 0,375 mg/L) förbereddes. Vid varje vattenbyte tillsattes 16 µL av stamlösningarna till respektive akvarium för att upprätthålla koncentrationerna av clotrimazol. Acetonkoncentrationen var 0,000008 % i samtliga akvarier. Grodorna avlivades genom att placeras i 0,5 % bensocain, löst i 70 % etanol. Deras vikt ( $\pm 0,01$ g) och antal dagar till metamorfos, dvs. till NF-stadium 66 då fullständig tillbakabildning av svansen skett, noterades.



**Figur 3.** I försöket exponerades västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, för 0, 3, 30 eller 300 µg/L clotrimazol från strax efter kläckning, NF-stadium 47, fram till metamorfos, NF-stadium 66 (Nieuwkoop & Faber 1956).

## Aromatasaktivitet

### Referensgrupp - yngel

För metodutveckling användes en referensgrupp med individer från samma yngelkull som de exponerade ynglen. Njur- och gonadpaket samt hjärnor från yngel vid NF-stadium 50, 52, 54, 55, 56 och 58 dissekerades ut. Under yngelperioden är gonaderna mycket små och svåra att dissekera ut och eftersom gonaderna ligger i direktkontakt med njurarna är det lättare att dissekera ut hela njur- och gonadpaketet. För att hitta ett lämpligt stadium och lämplig provmängd för mätning av aromatasaktivitet testades samlingsprover av njur- och gonadpaket respektive av hjärna från olika antal yngel vid varje NF-stadium.

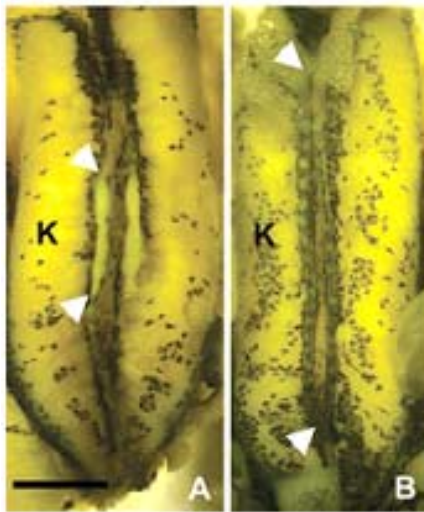
### Referensgrupp – vid metamorfos

Individerna från referensgruppen könsbestämdes makroskopisk utifrån gonadernas storlek och form. Ovarier vid metamorfos kännetecknas av att de är långa och loberade till skillnad från

testikeln som är kort och har jämn struktur (Hayes et al. 2002). Figur 4 visar gonader från en honlig och en hanlig sydafrikansk klogroda vid metamorfos (Hayes et al. 2002) vilka överensstämmer med hur det ser ut hos västafrikansk klogroda. Gonader och hjärnor från individerna dissekerades ut. Aromatasaktivitet mättes på enskilt ovarium samt på enskild testikel samt på olika stora samlingsprover av ovarier respektive testiklar. Aromatasaktiviteten mättes i fem enskilda hjärnor från vardera kön.

#### Exponerade individer

NF-stadium 56 valdes som lämplig tidpunkt att mäta aromatasaktivitet hos de exponerade ynglen och fyra samlingsprover av 10 njur- och gonadpaket samt två samlingsprover av 10 hjärnor per exponeringsgrupp mättes. Vid metamorfos valdes storlek på samlingsprov till 8 gonader per exponeringsgrupp för mätning av aromatasaktivitet. De metamorfoserade grodorna könsbestämdes histologiskt och aromatasaktiviteten mättes enskilt i tio hjärnor från honor per exponeringsgrupp.



**Figur 4.** **A** Gonader från en hanlig sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*, vid metamorfos. Pilarna visar början och slutet på högra gonaden. Gonaderna ligger i direkt kontakt med njurens yta (K). **B** Gonad från en honlig sydafrikansk klogroda, *Xenopus laevis*, vid metamorfos. Pilarna visar början och slutet på högra gonaden. Gonaderna ligger i direkt kontakt med njurens yta (K). (Hayes et al. 2002)

#### Metod för aromatasaktivitetsmätning

Aromatasaktivitet mättes med en metod utvecklad av Lephart och Simpson (1991) med modifieringar. Vävnaderna (hjärna och njur- och gonadpaketet) homogeniserades i 300  $\mu$ L iskall buffert (50 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM KCl, 1 mM EDTA och 1 mM ditiotritol pH 7,4). I ett tomt rör pipetterades 5,2  $\mu$ L 1 $\beta$ -[<sup>3</sup>H] androstendion (0,96  $\mu$ M) löst i etanol, som indunstades.

Därefter tillsattes 5 µL propylenglykol, 45 µL buffert, 100 µL homogenat och 40 µL NADPH (1 mM). Reaktionen fick fortgå vid 37 °C i 60 min (undantag för samlingsprover av hjärnor vid NF-stadium 56 där den använda inkuberingstiden var 30 min). Därefter stoppades reaktionen genom att tillsätta 100 µL av 30 % TCA och provet centrifugerades i 10 min. Ometaboliserat androstendion extraherades med 1250 µL kloroform. Provet skakades på vortexapparat i 60 sek och centrifugerades i 25 min (1500 g). Vattenfasen togs ut och späddes med 1250 µL vatten för att sedan centrifugeras i 5 min (1500 g). Därefter tillsattes 1 mL suspension av aktivt kol (5 %) i vatten innehållande 0,5 % dextran T-70 till 1 mL av supernatanten innehållande  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Provet skakades på vortexapparat i 40 sek och centrifugerades i 30 min (10 000 g). 1 mL av vattenfasen sattes till 4 mL scintvätska, Ultima gold, (PerkinElmer, Shelton, USA) och provet mättes i en Tri-Carb modell 1600CA scintillationsräknare. Proteinkoncentrationerna i homogenaten bestämdes spektrofotometriskt med hjälp av BCA-kit (Nordic Biolabs AB, Stockholm, Sverige). Aromatasaktiviteten uttrycktes som fmol per timme och mg protein. Protein bestämning skedde inte på homogenat från referensgruppens yngelstadier.

### **Histologisk könsbestämning**

Njur- och gonadpaketet från 12 metamorfoserade grodor per exponeringsgrupp dissekerades ut och fixerades i formalin. Gonaderna dehydrerades i etanol (70 %, 95 % samt 99 %) innan de inbäddades i plast (Technovit). Ett snitt så att båda gonaderna var synliga gjordes och snittet lades på ett objektglas samt färgades med hematoxylin och eosin. Gonadhistologin utvärderades under mikroskop och könet bestämdes. För att en individ skulle klassas som hona skulle gonaden uppvisa en hålighet (Pettersson et al. 2006) (fig. 1).

### **Statistiska metoder**

Anova användes för att jämföra de olika exponeringsgrupperna med avseende på aromatasaktivitet i hjärna och gonader, tillväxt samt tid till att nå metamorfos.

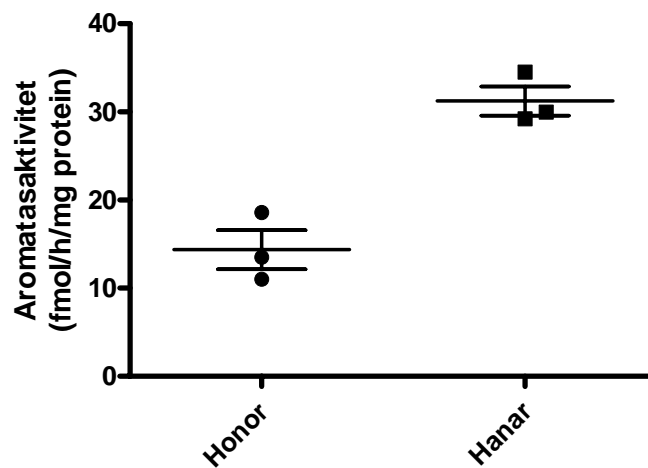
Oparat t-test användes för att jämföra hanar och honor i referensgruppen med avseende på aromatasaktivitet i hjärna och gonader.

## Resultat

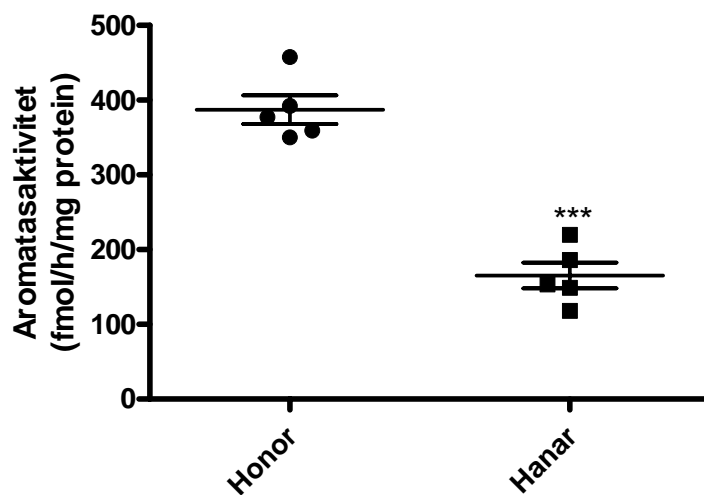
### Aromatasaktivitet hos individer från referensgruppen

Vid NF-stadium 50 och 52 var aromatasaktiviteten i gonader och hjärna för låg för att kunna mätas. Under NF-stadium 54 uppmättes en aktivitet på 2,5 fmol/h i samlingsprov av 10 hjärnor. Vid NF-stadium 55 fanns en låg men mätbar aktivitet i samlingsprover av 15 hjärnor respektive 15 njur- och gonadpaket. Vid NF-stadium 56 i samlingsprover av 10 hjärnor respektive 10 njur- och gonadpaket var aromatasaktiviteten 80,1 respektive 4,97 fmol/h. Vid NF-stadium 58 låg aromatasaktiviteten på 198 och 3,55 fmol/h för 10 hjärnor respektive 10 njur- och gonadpaket.

Vid metamorfos erhöles en mätbar aromatasaktivitet i samlingsprover av gonader från 8 individer. Aromatasaktiviteten skiljde sig inte signifikant mellan testiklar och ovarier (Fig. 5). I hjärna fanns det dock en signifikant skillnad i aromatasaktivitet mellan honor och hanar, där medelaktiviteten låg på 334,4 respektive 117,1 fmol/h/mg protein (Fig. 6).



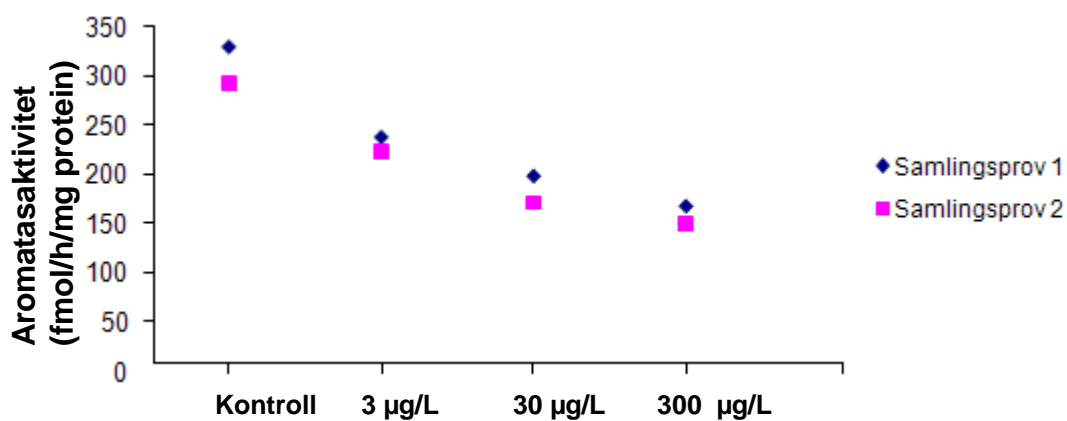
**Figur 5.** Aromatasaktivitet i samlingsprover av 8 gonader från honor respektive hanar från en referensgrupp av västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos.



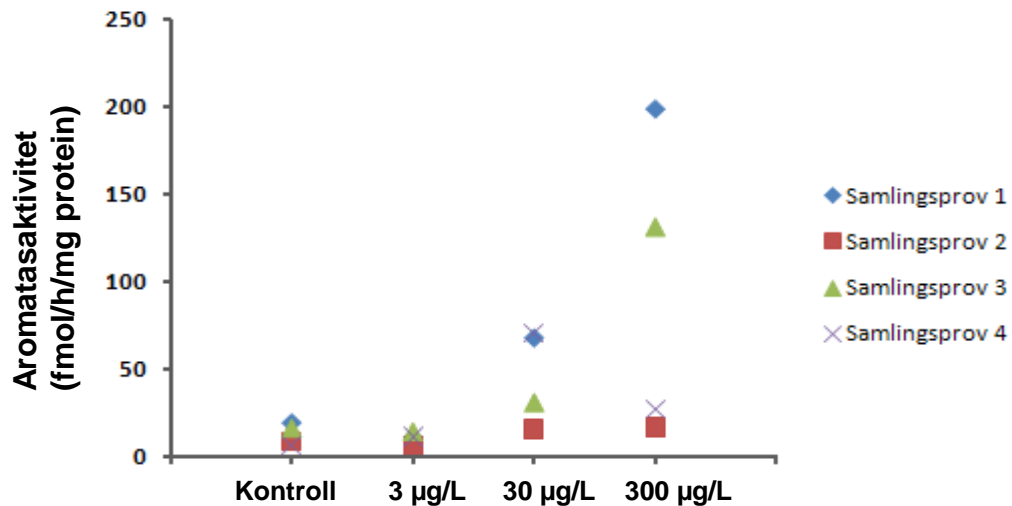
**Figur 6.** Aromatasaktivitet i hjärna från honor respektive hanar från en referensgrupp av västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos. Asterix visar på signifikant skillnad från honor (\*\*\*) p < 0,0001).

### Aromatasaktivitet hos exponerade individer

Vid NF-stadium 56 såg aromatasaktiviteten i hjärnan ut att minska med ökad koncentration (Fig. 7). Aromatasaktiviteten i gonaderna från de exponerade individerna vid NF-stadium 56 visade en tendens till ökning med ökad koncentration men skiljde sig inte signifikant från kontrollen (Fig. 8).

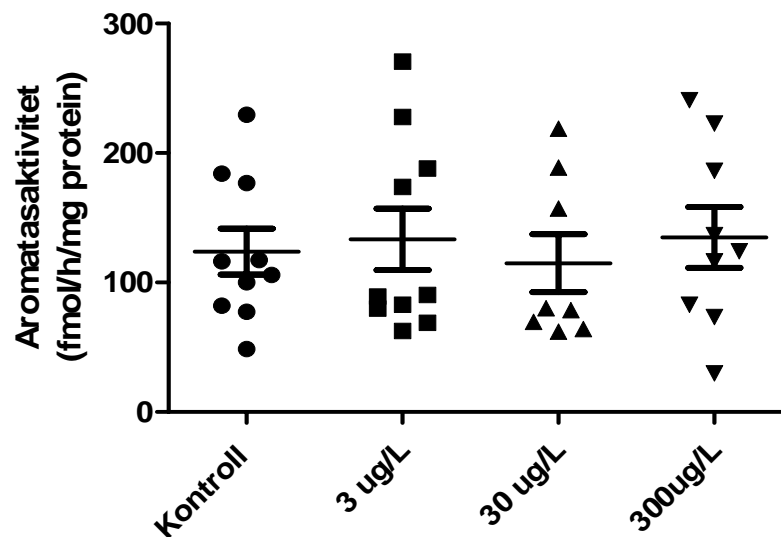


**Figur 7.** Aromatasaktivitet i samlingsprover av 10 hjärnor från västafrikans klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid NF-stadium 56 som exponerats för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300 µg/L), från NF-stadium 47.

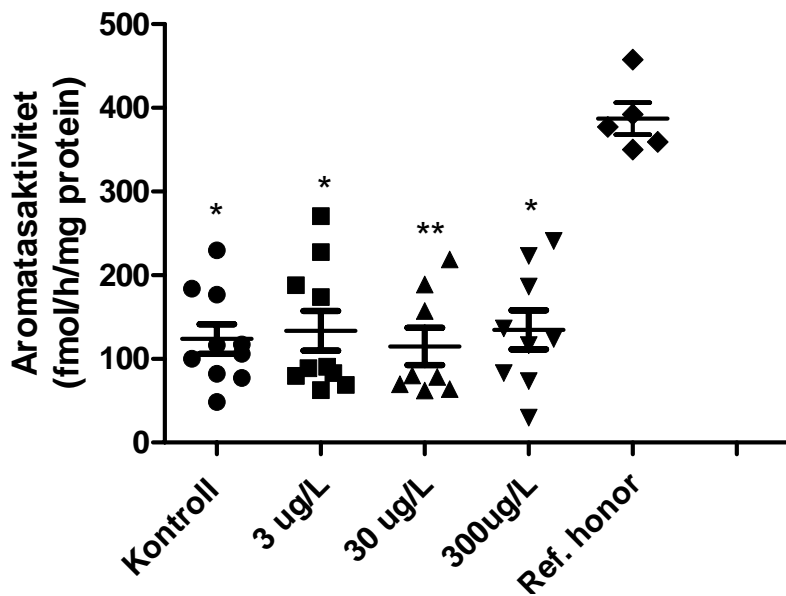


**Figur 8.** Aromatasaktivitet i samlingsprover av 10 njur- och gonadpaket från västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid NF-stadium 56. Individerna har exponerats för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300 µg/L) från NF-stadium 47.

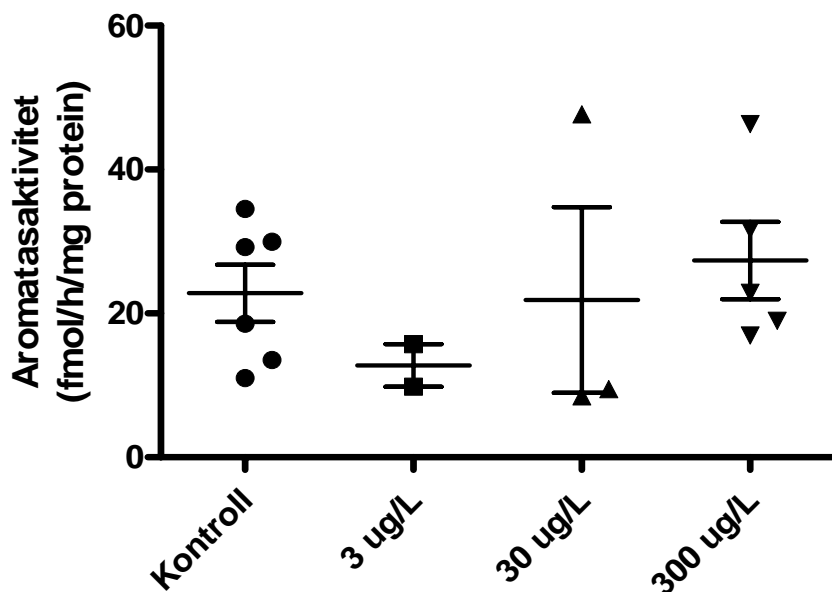
Vid metamorfos fanns det ingen signifikant skillnad mellan kontrollerna och de exponerade grodorna med avseende på aromatasaktiviteten i hjärnan (Fig. 9). Aromatasaktiviteten i hjärnan hos alla exponerade grupper, även kontrollindividerna, var signifikant lägre än den hos referenshonorna (Fig. 10). Aromatasaktiviteten i gonaderna från de exponerade individerna vid metamorfos skiljde sig inte från den i kontrollgruppen (Fig. 11)



**Figur 9.** Aromatasaktivitet i hjärna från västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos. Individerna har exponerats för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300 µg/L) från NF-stadium 47 fram till metamorfos.



**Figur 10.** Aromatasaktivitet i hjärna från västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos. Individerna har exponerats för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300  $\mu\text{g/L}$ ) från NF-stadium 47 fram till metamorfos. Referenshonorna är oexponerade. Asterix (\*) visar på signifikant skillnad från referenshonorna (\*  $p < 0.05$  och \*\*  $p < 0.01$ ).



**Figur 11.** Aromatasaktivitet i samlingsprover av 8 gonader från västafrikans klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos. Individerna har exponerats för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300  $\mu\text{g/L}$ ) från NF-stadium 47 fram till metamorfos.

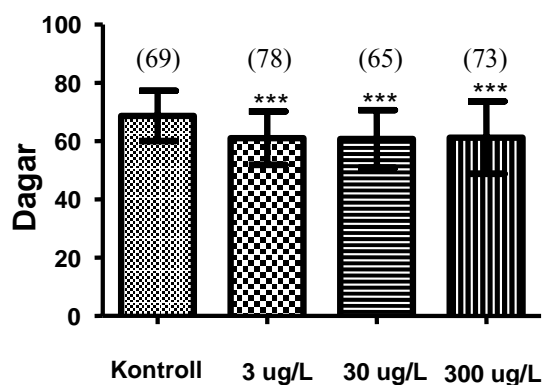


## Histologi

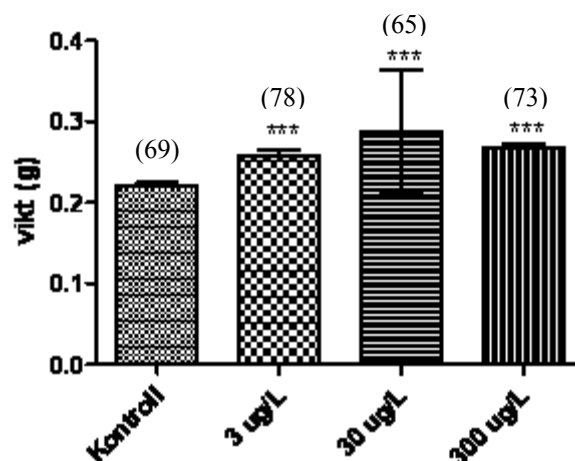
Alla individer från varje exponeringsgrupp, även kontrollen, uppvisade en honlig fenotyp. Gonaderna hade en tydlig håligheter och därmed en honlig struktur.

## Tillväxt och tid till metamorfos

De exponerade individerna, oberoende av exponeringsnivå, nådde metamorfos signifikant snabbare än kontrollindividerna och vägde även signifikant mer än kontrollindividerna vid metamorfos (Fig. 12 och 13).



**Figur 12.** Tid till metamorfos för västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, efter exponering för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300 µg/L) från NF-stadium 47 fram till metamorfos. Asterisk (\*) visar på signifikant skillnad från kontrollen (\*\* p < 0,0001). Antal individer (n) i respektive grupp visas ovanför staplarna.



**Figur 13.** Vikt hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, vid metamorfos efter exponering för clotrimazol (0, 3, 30 eller 300 µg/L) från NF-stadium 47 fram till metamorfos. Asterisk (\*) visar på signifikant skillnad från kontrollen (\*\*\*) p < 0,0001). Antal individer (n) i respektive grupp visas ovanför staplarna.

## **Diskussion**

### **Effekt av clotrimazol på aromatasaktiviteten och könsdifferentieringen**

Vid NF-stadium 56 skiljde sig aromatasaktiviteten i gonaderna från de exponerade individerna inte signifikant från kontrollen. Resultaten indikerade dock att aromatasaktiviteten ökar med ökad clotrimazolkoncentration. Den ökade aromatasaktiviteten i gonaderna under könsdifferentieringen skulle kunna förklara den skeva könskvot som uppvisades vid metamorfos. Histologisk könsbestämning visade att samtliga individer, även kontrollerna, utvecklat ovarier vid metamorfos vilket avviker från det normala (Pettersson & Berg 2006). I referensgruppen bestående av individer från samma yngelkull var könskvoten mer balanserad. Om den skeva könskvoten var en effekt av clotrimazol skulle det betyda att även kontrollerna blivit kontaminerade av clotrimazol, vilket i sin tur skulle betyda att västafrikansk klogroda är mycket känslig för clotrimazol med avseende på könsdifferentieringen. En eventuellt kommande analys av vattenprover från de olika akvarierna skulle ge svar på om kontaminering skett.

Vid NF-stadium 56 sågs en tendens till att aromatasaktiviteten i hjärnan minskade med ökad clotrimazolkoncentration. Avsikten var att ha 3 samlingsprover per exponeringsgrupp men en gick förlorad och därför kan inget statistiskt test göras på värdena. Vid metamorfos fanns det ingen signifikant skillnad i aromatasaktivitet i hjärna mellan kontrollerna och de exponerade grodorna. Hypotesen om clotrimazolkontamination gör det intressant att jämföra de exponerade individerna, som alla hade honlig fenotyp, med referenshonorna.

Aromatasaktiviteten i hjärnan från alla exponeringsgrupper inklusive kontrollen var signifikant lägre än hos referenshonorna, vilket stödjer hypotesen att kontrollgrupperna påverkats av clotrimazol. Det går inte att direkt jämföra referensindividerna med kontrollerna och de exponerade då de levt under olika förhållanden med avseende på storlek av akvarium och mängd yngel per akvarium. Skillnaden i aromatasaktivitet i hjärnan mellan exponeringsgrupperna och referenshonorna är dock en indikation på att aktiviteten hos exponeringsgrupperna är lägre än vad som är vanligt förekommande hos honor. Den låga aktiviteten i hjärna vid metamorfos är antagligen en effekt av clotrimazol vilket stöds av resultaten på individer från NF-stadium 56 där aromatasaktiviteten i hjärnan visade en tendens till att minska med ökad clotrimazolkoncentration.

Vid metamorfos kunde ingen signifikant skillnad mellan de exponerade individerna och kontrollen ses med avseende på aromatasaktivitet i gonaderna. Även detta skulle kunna bero på en clotrimazolkontaminering av kontrollerna.

Resultaten från denna *in vivo*-studie överensstämmer inte med resultaten från tidigare *in vitro*-data där clotrimazol visats inhibera aromatas i både hjärna och gonad (Choi et al. 2007; Hinfray et al. 2006; Monod et al. 1993; Noaksson et al. 2003). Resultat från en *in vivo*-studie på regnbåge, *Oncorhynchus mykiss*, överensstämmer inte heller med *in vitro*-datan. I den studien exponerades regnbåge för clotrimazol med doser på upp till 1 ml/L i två veckor, och ingen effekt som minskad östrogenkoncentrationen i plasman kunde visas (Shilling et al. 1999). I ett annat försök undersöktes hur könsdifferentieringen hos *Rana sylvatica* påverkades av exponering för aromatasinhibitorn flavon (Mackenzie et al. 2003). Exponering skedde från strax efter kläckning till metamorfos. Histologisk könsbestämning visade att vid koncentrationen 100 µg/L flavon hade fler honor än hanar bildats, 20 respektive 11. I *in vivo*-studier ingår ett helt hormonsystem och det kan vara så att det finns ett orsakssamband mellan aromatasaktiviteten i hjärnan och aromatasaktiviteten i gonaderna. En minskad östrogenkoncentration i hjärnan till följd av minskad aromatasaktivitet skulle kunna stimulera aromatasaktiviteten och därmed östrogenproduktionen i gonaderna. Fler studier på hur aromatasenzymets aktivitet i hjärnan påverkar aktiviteten i gonaderna krävs för att fastställa orsakssambandet.

En annan förklaring till den skeva könskvoten i detta försök än clotrimazolpåverkan skulle vara att en okänd faktor har påverkat könsfördelningen.

En faktor som påverkar könsfördelningen hos flera arter av grodor är temperaturen. Att det i detta fall skulle vara temperaturen som orsakat skev könskvot är inte troligt eftersom individer från tidigare försök (Pettersson et al. 2006) har hållits under samma temperatur (26°C) och inte uppvisat sådan skev könskvot i kontrollen. Den faktor som skiljer samtliga exponeringsgrupper från referensgruppen är acetonexponering. Även denna faktor är inte en trolig orsak till könsförändring då aceton tidigare använts som lösningsmedel vid studier på västafrikansk klogroda (Pettersson & Berg 2006) med balanserad könskvot i kontrollen.

## **Metodutveckling**

Mellan NF-stadium 54 och 56 skedde en markant ökning i aromatasaktivitet i både hjärna och njur-gonadpaketet. Det är första gången aromatasaktivitet uppmätts så tidigt under gonadernas utveckling. Samlingsprover av 10 hjärnor respektive 10 njur- och gonadpaket vid NF-stadium 56 valdes för aromatasaktivitetsmätning hos de exponerade ynglen då 56 var det tidigaste stadiet med den minsta samlingsprovstorlek (10 stycken) som gav en mätbar aromatasaktivitet. NF-stadium 56 är ett lämpligt stadium att mäta aromatasaktiviteten då det är en tidpunkt mitt i könsdifferentiering.

Vid metamorfos gav samlingsprover av gonader från 8 individer en mätbar aromatasaktivitet och med den storleken kunde tillräckligt många samlingsprover per exponeringsgrupp fås för att kunna utföra statistiska tester. Gonader från 8 individer vilket valdes därför som en lämplig samlingsprovstorlek för aromatasaktivitetsmätning hos de exponerade individerna vid metamorfos. I hjärna kunde aktiviteten mätas på enskilda organ vid metamorfos.

Vid metamorfos kunde en signifikant högre aromatasaktivitet uppmätas i hjärna från honor från referensgruppen jämfört med hanarna från referensgruppen. Resultatet stämmer överens med tidigare studier på juvenila *X. laevis*, två till tre månader efter metamorfos, där aromatasaktiviteten var högre i hjärna från honor jämfört med hanar (Coady et al. 2005).

Hos referensgruppen visades ingen signifikant skillnad i aromatasaktivitet mellan ovarier och testiklar. Studie på juvenila sydafrikanska klogrodor, två till tre månader efter metamorfos, visade en signifikant högre aromatasaktivitet i ovarier jämfört med testiklar (Coady et al. 2005). Att liknande resultat som från sydafrikanska klogrodor inte kunde ses i detta försök kan bero på få mätvärden.

## **Tillväxt och tid till metamorfos**

De clotrimazolexponerade individerna var större vid metamorfos och nådde metamorfos snabbare än kontrollindividerna. Eftersom det finns en misstanke om att kontrollerna blivit kontaminerade får framtida studier visa om detta är ett resultat av clotrimazol.

## **Slutsats**

Slutsatsen av mitt arbete är att yngelexponering för clotrimazolkoncentrationer upp till 300 µg/L inte inducerar testikelbildning hos västafrikansk klogroda, *Xenopus tropicalis*, utan inducerar istället ovariumbildning. Hypotesen att exponering för clotrimazol skulle hämma aromatasaktiviteten i gonaderna under könsdifferentieringen vilket i sin tur skulle leda till ökad andel hanar stämde inte. Resultaten tyder på att exponeringen resulterar i hämmad aromatasaktivitet i hjärna vid könsdifferentieringen samt vid metamorfos. Exponeringen verkade öka aktiviteten i gonaderna vid könsdifferentieringen vilket skulle kunna spegla den ökade ovariumbildningen i förhållande till testikelbildningen. Denna pilotstudie resulterade i en hypotes att västafrikansk klogroda är mycket känslig för clotrimazol. Det vore intressant med en uppföljande studie som skulle kunna verifiera denna hypotes.

## Referenser

- Bogi, C., Levy, G., Lutz, I. & Kloas, W. 2002 Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **133**, 559-570.
- Chardard, D. & Dournon, C. 1999 Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.* **283**, 43-50.
- Choi, M. J., Kim, S. C. & Kim, A. N. 2007 Effect of endocrine disruptors on the oocyte maturation and ovulation in amphibians, *Rana dybowskii*. *Integrative biosciences* **11**.
- Coady, K. K., Murphy, M. B., Daniel L. Villeneuve, Markus Hecker, Paul D. Jones, James A. Carr, Keith R. Solomon, Ernest E. Smith, Glen Van Der Kraak, Ronald J. Kendall & 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* **62**, 160-173.
- Crain, D. A., Guillette, L. J., Rooney, A. A. & Pickford, D. B. 1997 Alteratins in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect* **105**, 528-533.
- Desvages, G. & Pieau, C. 1992 Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 851-853.
- Elbrecht, A. & Smith, R. 1992 Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* **255**, 467-470.
- Fry, D. M. & Toone, C. K. 1987 Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxicological considerations. *Stud. Avian Biol.* **10**, 26-43.
- Hayes, B. 1998 Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms, vol. 281, pp. 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, vol. 99, pp. 5476-5480.
- Hecker, M., Kim, W. J., Park, J.-W., Murphy, M. B., Villeneuve, D. L., Coady, K. K., Jones, P. D., Solomon, K. R., Kraak, G. V. D., Carr, J. A., Smith, E. E., Preez, L. d., Kendall, R. J. & P.Giesy, J. 2005 Plasma concentration of estradiol and testosterone, gonadal aromatase activity and ultrastructure of the testis in *Xenopus laevis* exposed to estradiol or atrazine. *Aquatic Toxicology* **72**, 383-396.
- Helle, E., Olsson, M. & Jensen, S. 1976 PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio* **5**, 261-263.
- Hinfray, N., Porcher, J.-M. & Brion, F. 2006 Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **144**, 252-262.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G. C., Sumpster, J. P. & Tyler, C. R. 2002 Altered Sexual Maturation and Gamete Production in Wild Roach (*Rutilus rutilus*) Living in Rivers That Receive Treated Sewage Effluents, vol. 66, pp. 272-281.
- Kato, T., Matsui, K., Takase, M., Kobayashi, M. & Nakamura, M. 2004 Expression of P450 aromatase protein in developing and sex-reversed gonads of the XX-XY type of frog *Rana rugosa*. *General and Comparative Endocrinology* **137**, 227-236.
- Lephart, E. D. & Simpson, E. R. 1991 Assay of aromatase-activity. *Meth. Enzymol.* **206**, 477-483.
- Mackenzie, C. A., Berrill, M., Metcalfe, C. & Pauli, B. D. 2003 Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 2466-2475.
- Matsuoka, P. M., Nes, S. v., Andersen, O., Benfey, T. J. & Reith, M. 2006 Real-time PCR analysis of ovary-and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **144**, 128-135.
- 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**, 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.
- Monod, G., De Mones, A. & Fostier, A. 1993 Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in Rainbow trout. *Marine Environmental Research* **35**, 153-157.
- Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. 1956 Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). . North Holland Publishing, Amsterdam.

- Noaksson, E., Linderöth, M., Bosveld, A. T. C. & Balk, L. 2003 Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *General and Comparative Endocrinology* **134**, 273-284.
- Ohtani, H., Miura, I. & Ichikawa, Y. 2002 Role of aromatase and androgen receptor expression in gonadal sex differentiation of ZW/ZZ-type frogs, *Rana rugosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **134**, 215-225.
- OSPAR. 2007 Open background documentation on clotrimazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **Volume 389**.
- Pettersson, I. & Berg, C. 2006 Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause femal-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 1005-1009.
- Pettersson, I., Berg, C., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K. & Mortensen, A. S. 2006 Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology* **79**, 356-365.
- Roberts, P. H. & Thomas, K. V. 2006 The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment* **356**, 143-153.
- Robine, E., Lacaze, I., Moularat, S., Ritoux, S. & Boissier, M. 2005 Characterisation of exposure to airborne fungi: Measurement of ergosterol *Journal of Microbiological Methods* **63**, 185-192
- Schmid, M. & Steinlein, C. 2001 Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class amphibia. *EXS* **91**, 143-176.
- Shilling, A. D., Carlson, D. B. & Williams, D. E. 1999 Rainbow trout, *Onocorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **70**, 89-95.
- Smith, C. A., Elf, P. K., Lan, J. W. & Joss, J. M. P. 1995 Aromatase enzyme activity during gonadal sex differentiation in alligator embryos. *Differentiation* **58**, 281-290.
- 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, vol. 306, pp. 1783-1786.
- 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* **1769**, 172-181.
- Thomas, K. V. & Hilton, M. J. 2004 The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **49**, 436-444.
- Wennstrom, K. A. & Crews, D. 1995 Making Males from Females: The Effects of Aromatase Inhibitors on a Parthenogenetic Species of Whiptail Lizard. *General and Comparative Endocrinology* **99**, 316-322.

Nätsidor

Fass för allmänheten

<http://www.fass.se> 2007-11-12