



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Bisfenol A i urin från sällskapshundar en riskfaktor för prostataförändringar?

Ylva Persson Leijer

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:39*

Bisfenol A i urin från sällskapshundar

En riskfaktor för prostataförändringar?

Bisphenol A in urine from domestic dogs

A risk factor for prostatic changes?

Ylva Persson Leijer

Handledare: Sara Persson, institutionen för kliniska vetenskaper

Ev. Biträdande handledare:

Examinator: Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:39

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bisfenol A, prostata, benign prostatahyperplasi, prostatacancer

Key words: Bisphenol A, prostate, benign prostatic hyperplasia, prostate cancer

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Bisfenol A (BPA) är ett hormonstörande ämne som bl.a. används i tillverkningen av epoxi- och polykarbonatplaster, vilka i sin tur används i bl.a. nappflaskor och matförpackningar. Det är sedan länge känt att en stor del av befolkningen exponeras för BPA, framförallt via oralt intag, men även andra exponeringsvägar är kända. Huruvida tamhundar exponeras, till vilken grad och vilken effekt det kan tänkas ge finns det få studier på. Experimentella studier på gnagare har dock visat tydliga effekter på reproduktionssystemet, t.ex. förändringar på prostata och förstadier till prostatacancer. Prostataförändringar är vanligt förekommande hos äldre, intakta hanhundar och syftet med denna studie var därför att undersöka förekomst av BPA i urinen på tamhundar, samt om en eventuell förekomst av BPA skulle kunna anses vara en riskfaktor för prostataförändringar hos hund. Urinprov samlades in från åtta hundar med symptom på prostataförändringar eller prostataförändringar diagnosticerade med ultraljud samt från tio symptomfria, intakta kontrollhundar och analyserades sedan för förekomst av BPA. Djurägarna fick svara på ett antal frågor som berörde hundarnas hemmiljö. Resultaten visade att samtliga hundar i studien exponerats för BPA, men däremot fanns inget signifikant samband mellan BPA-halter i urinen och prostataförändringar. Inte heller sågs några signifikanta samband mellan hundarnas hemmiljö och BPA-halter i urinen. Halterna i urin (medel 1,22 ng/ml) låg i nivå med, eller något under, de halter som kunnat visas i olika studier på människa, förutom en hund som hade högre halter (128,43 ng/ml). Vid en jämförelse av hundarnas beräknade dagliga intag av BPA och tolererbart dagligt intag för människa är det inte troligt att BPA utgör någon risk för hund, men med tanke på det låga antalet hundar i studien och att en hund hade högre halter kan det inte heller helt uteslutas. Fler och större studier behövs för att fastställa ett samband samt kartlägga exponeringsvägar.

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical used in epoxy- and polycarbonate plastics, which in turn are used in baby bottles and food packages, among other things. It is well known that the majority of the human population is exposed to BPA, mostly orally, but other ways of exposure are also known. Few studies have focused on whether domestic dogs are exposed, and if so, to which degree and what effect that level of exposure might have on the exposed dogs. Evident effects on the reproductive system have been shown in experimental studies on rodents, for example prostatic changes and changes associated with prostate cancer. Prostatic changes are common on aged, intact male dogs and the purpose of this study was to examine presence of BPA in the urine of domestic dogs and if BPA could be a possible risk factor for prostatic changes in domestic dogs. Urine samples were collected from eight dogs showing symptoms of prostatic changes or diagnosed with prostatic changes through ultrasound. In addition, ten urine samples were collected from intact male dogs without symptoms of prostatic changes. All samples were then analysed for BPA. The dog owners answered a survey containing questions about their dogs home environment. The results showed that all of the dogs in the study had been exposed to BPA, but no significant connection was found between occurrence of prostatic changes and the levels of BPA in urine samples. Neither did it show any significant connection between the dogs' home environment and levels BPA in urine. The levels of BPA in urine (mean 1,22 ng/ml) were lower or similar to those that have been found in human urine samples, except from one dog that had higher levels (128,43 ng/ml). When comparing estimated daily intake of BPA for the dogs with human tolerable daily intake, it is not likely that BPA poses as a risk for dogs, but considering the low number of dogs in the study and that one dog had higher levels it can not be ruled out completely. More and larger studies are needed to confirm a possible correlation and to find different exposure routes.

INNEHÅLL

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Inledning | 1 |
| Litteraturstudie | 2 |
| Prostata | 2 |
| Bisfenol A | 3 |
| BPA och BPH..... | 4 |
| BPA och prostatacancer | 4 |
| Material och metoder | 7 |
| Resultat | 9 |
| Diskussion | 11 |
| Slutsats | 12 |
| Referenslista | 13 |

INLEDNING

Bisfenol A (BPA) är ett hormonstörande ämne som framförallt används i epoxiplaster och polykarbonatplaster, vilka i sin tur används till bl.a. nappflaskor, CD-skivor och plastförpackningar för mat. På grund av BPAs hormonstörande effekter finns vissa förbud mot användningen (t.e.x i nappflaskor) inom EU. Flera studier har kunnat påvisa BPA i blod och urin hos människor världen över, och vi anses vara utsatta för en kontinuerlig lågdosexponering främst via oralt intag, men luft och damm är också möjliga exponeringsvägar (Calafat *et al.*, 2004; Rudel *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 2006).

BPA har effekt på reproduktionsorganen hos både han- och hondjur, men även påverkan på centrala nervsystemet, beteendeförändringar och förändringar i pancreas och insulinregleringen har visats och unga individer under utveckling förefaller känsligast för exponering (se review: Rubin, 2011). Exponering för BPA har i flera studier på råttor visats påverka prostata och höga halter BPA har också visats i urin hos män med prostatacancer (Tarapore *et al.*, 2014; Timms *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011).

Prostataförändringar i allmänhet och benign prostatahyperplasi (BPH) i synnerhet är en vanlig förekomst hos äldre, intakta hanhundar (Nelson & Couto, 2014). I vissa fall kan den förstörade prostatan leda till smärta, hematuri, dysuri samt svårigheter att defekera och den rekommenderade behandlingen är kastration. Etiologin och patogenesen bakom BPH är ännu inte helt fastställd, men hormonförändringar tycks spela en viktig roll. Diagnosen ställs genom anamnes, kliniska symptom och/eller med hjälp av bilddiagnostik, t.ex. ultraljud och behandlingen är kastration (kemisk eller kirurgisk) eller tillfällig behandling med antiandrogena läkemedel.

En amerikansk studie simulerade tuggning och salivering på hundträningsredskap och hundleksaker och kunde visa ett sannolikt läckage från dessa i tillräckliga nivåer för att orsaka endokrin aktivitet *in vitro* (Wooten & Smith, 2013). En annan möjlig exponeringsväg för hundar är via foder, då både hund- och kattfoder på burk visats kunna innehålla varierande halter av BPA (Kang & Kondo, 2002).

Syftet med denna studie var att undersöka förekomst av BPA i urinen hos hundar samt eventuella skillnader i BPA-halter hos hundar med diagnostiserade prostataförändringar jämfört med friska hundar, och därigenom undersöka om BPA kan misstänkas vara en riskfaktor för prostataförändringar hos hund.

LITTERATURSTUDIE

Prostata

Prostata är en hanlig accessorisk könskörtel vars tillväxt och funktion är beroende av testosteron. I prostata produceras vätska som är en del av ejakulatet och underlättar transporten av spermier samt förser spermatozoerna med näring. Testosteron konverteras i prostata till dihydrotestosteron (DHT), vilket anses spela en viktig roll i prostatas tillväxt både under utvecklingen och vid patologiska tillstånd då prostata förstoras (Schwab, 2012). DHT bildas med hjälp av enzymet 5-alfa-reduktas i framförallt prostata, men även i testiklar, binjurar och hårsäckar. Androgener produceras i binjurarna och omvandlas sedan till testosteron och östrogener i perifer vävnad (Harvey, 2011).

Benign prostatahyperplasi är en naturlig del av den intakta hanhundens åldrande, och innefattar både hyperplasi och hypertrofi av prostata (se review: Smith, 2008). Ett ökat antal androgenreceptorer banar väg för storleksökningen, och en ökning av DHT anses vara en primär faktor i patogenesen. När prostata förstoras kan körtelgångarna täppas igen och fyllas med vätska och bilda cystor. Prostatacancer drabbar framförallt äldre hundar, men är ovanligt. De vanligaste tumörformerna är adenocarcinom och övergångscellscarcinom. Andra sjukdomar som kan drabba prostata är akut eller kronisk bakteriell prostatit och prostataabscesser och samtidig BPH är vanligt bland flera av de nämnda sjukdomstillstånden. Som nämnts ovan finns en positiv korrelation mellan prostatavolym och ålder, men även mellan prostatavolym och testosteronnivåer i prostata och medelvärdet för utsöndring av testosteron i prostata är högre hos hundar med benign prostatahyperplasi (BPH) jämfört med friska kontroller (Wolf *et al.*, 2012). Av 418 hundar som fanns registrerade i Alfort Veterinary Collage databas för misstänkt prostatasjukdom (BPH, cystor, plattepitelcellsmetaplasi, prostatit, abscess eller neoplasi) var 98.3% okastrerade (Polisca *et al.*, 2016). De vanligaste diagnoserna var BPH och prostatit, och de hundar som diagnosticerades med prostataneoplasi var i regel äldre än de som diagnosticerats med BPH eller prostatacystor. Ett signifikant samband sågs även mellan storlek och prostatasjukdom, där hundar >20kg utgjorde 56% av fallen. Detta samband sågs för samtliga undersökta prostatasjukdomar utom tumörsjukdomar.

I en studie på hundar med liten/omogen, normal eller hypertrofisk prostata undersöktes om någon skillnad fanns i testosteron- och DHT-nivåer mellan de olika grupperna (Gloyna *et al.*, 1970). Hundar med BPH hade högre testosteronnivåer och DHT-nivåer i prostata jämfört med de två andra grupperna. Det undersöktes även om den ökade koncentrationen DHT orsakades av en ökad hastighet i bildningen av DHT, om hastigheten kunde vara åldersrelaterad samt om de ökade nivåerna berodde på minskad nedbrytning av DHT, men inget av ovanstående hypoteser kunde styrkas i studien. Slutligen undersöktes DHT som möjlig orsak till BPH. Under nio månader injicerades fyra unga (yngre än ett år) kastrerade hundar tre gånger i veckan med testosteron och fyra unghundar med DHT. Det fann även en kontrollgrupp med tre kastrerade hundar. Efter nio månader sågs att de hundar som injicerats med DHT hade en prostatamedelvikt som var nästan dubbelt så stor som hos de hundar som fått testosteron (6,6 g jämfört med 3,6 g) och medelvikten på prostata hos hundarna i kontrollgruppen var minst (1,8

g). Förstoringen var dock inte tillräcklig för att klassas som BPH. Även histologiskt sågs patologiska förändringar hos de hundar som fått DHT. Prostatan hos hundar som fått testosteron föreföll histologiskt normal. Det anses sannolikt att flera års ansamling av DHT spelar en roll i patogenesen för BPH, men mekanismen bakom de höjda DHT-nivåerna är fortfarande okänd.

Bisfenol A

Enligt European Food Safety Authority 2015 är tolererbart dagligt intag (TDI) för BPA 4 µg/kg kroppsvikt/dag. Acconcia *et al.* (2015) påpekar dock i sin review att BPA har visats ha endokrin effekt i halter lägre än 4 µg/kg/dag och att det i vissa studier setts större effekt av låga halter BPA än vid exponering av höga halter. Icke-monoton dosrespons, d.v.s. att effekten inte går att förutsäga baserat på exponeringsdosen, har visats relativt vanligt på *in vitro*-studier av BPA, enligt en review av Vandenberg, (2014), där det även visades att ju fler doser som testades och ju större studien var, desto högre var sannolikheten för en icke-monoton dosrespons.

BPA anses ha svagt östrogen effekt genom att, beroende på dos och celltyp, verka som agonist eller antagonist på östrogenreceptorer *in vitro*. BPA har dessutom visats ge ett ökat uttryck av östrogen- och androgenreceptorer i mesenkymala celler från urogenitala sinus (varifrån prostata sedan utvecklas) från råttfoster *in vitro*, vid BPA-halter inom de referensvärden som har påvisats i blod och vävnader på människa (Richter *et al.*, 2007). En koreansk studie på 1904 vuxna människor kunde påvisa BPA i urinen hos 97,3% av studiedeltagarna. Östrogenkoncentrationen i urinen hos de personer med högst BPA-nivåer jämfört med de personer som låg i den lägre percentilen var högre hos både män och kvinnor i den övre percentilen och det sågs en positiv korrelation mellan BPA-nivåer och östrogennivåer (Kim *et al.*, 2014).

Vid både intravenös och oral exponering elimineras BPA hos råttor till största delen via faeces och distributionen till olika vävnader är som störst i tunntarmen (Kurebayashi, 2003; Shin *et al.*, 2004). Distribution till andra vävnader sker, hos råttor, i storleksordningen lever, magsäck, hjärna, njurar, testiklar, mjälte, hjärta, muskler, blod och fett. BPA metaboliseras huvudsakligen till inaktiv bisfenol A-glukoronid (BPA-GA) i levern och utsöndras (på råttor) till störst del som detta, i faeces via galla och en liten andel via urinen, oberoende av administrationsväg (Kurebayashi, 2003). Hundar kan ta upp BPA genom slemhinnan sublingualt, vilket innebär en direkt väg ut i blodet utan förstapassagemetabolism och således en stor biotillgänglighet av BPA (Gayraud *et al.*, 2013). Plasmanivåerna efter sublingual giva har visats jämförbara med intravenös administration, och vissa doser resulterade i högre plasmanivåer BPA vid sublingual giva jämfört med samma dos vid intravenös administration. Vid peroral giva blev biotillgängligheten betydligt lägre, vilket tyder på att en stor del absorberas i tarmen och genomgår förstapassagemetabolism till BPA-GA i levern. Detta påstående styrks av att plasmanivåerna BPA-GA var betydligt högre vid oral administration jämfört med sublingual.

På människa har det visats att BPA förekommer i follikelvätska, fostervätska och fosterserum. BPA har alltså förmåga att passera placentabarriären och ackumuleras i fostervätskan. Detta tros bero på att fostrets lever inte är tillräckligt utvecklad för att kunna metabolisera BPA och

halterna sjunker senare i graviditeten (Ikezuki *et al.*, 2002). I en studie exponerades dräktiga råttor för höga halter BPA-GA och låga halter av både BPA-GA och BPA kunde sedan påvisas hos foster och i fostervätskor (Nishikawa *et al.*, 2010). Detta resultat tolkades som en indikation på att BPA-GA har förmåga att passera placenta, men även att BPA-GA kan dekonjugeras tillbaka till den endokrint aktiva formen BPA. Det senare påståendet grundar sig i att både BPA-GA och dekonjugerad BPA kunde påvisas hos foster och fostervätskor trots att modern endast exponerats för BPA-GA samt att det enzym som dekonjugerar BPA-glukoronid kunde påvisas i både fetala lever- och hjärtceller *in vitro*. Exponeringshalterna i studien var dock betydligt högre än vad människor och djur normalt utsätts för via sin omgivning.

BPA och BPH

Flera studier har visat att exponering för BPA kan ha effekt på reproduktionsorganen. Till exempel har oral exponering av BPA (10, 30 eller 90 µg/kg/dag) på intakta hanråttor visats kunna öka vikten på prostata samt höjden på prostatas epitel (Wu *et al.*, 2011). Hos grupperna som exponerades för högre doser (30 respektive 90 µg/kg/dag) minskade däremot både prostatavikt och epithelhöjd ju högre exponeringen var, jämfört med en kontrollgrupp intakta hanråttor samt en negativ kontrollgrupp med kastrerade hanråttor. BPA-exponerade råttor hade sänkta serumnivåer av 17β-östradiol och testosteron jämfört med icke exponerade intakta råttor och en ökning av serum-DHT, serumprolaktin, prostataspecifik antigen (PSA) sågs hos råttor som exponerats för BPA, jämfört med den negativa kontrollgruppen. PSA produceras hos människa framförallt av epitelet i prostata och finns fritt i olika former, varav formen ”benign” PSA associeras starkt med BPH (Stephan, 2011). PSA används som markör vid diagnostik av prostatacancer. På möss uppstod förändringar i avkommornas reproduktionsorgan när mödrarna exponerats oralt för BPA (10 µg/kg/dag) under dräktighetsdag 14-18. De förändringar som sågs var bl.a. ökad proliferation i epitelcellerna i prostatas körtelgångar samt en ökad volym och ett ökat antal körtelgångar (Timms *et al.*, 2005).

BPA och prostatacancer

Prostatacancer är vanligare på kastrerade än intakta hanhundar och förekomsten har ökat de senaste 30 åren, vilket även är sant för förekomsten av kastrationer (Bryan *et al.*, 2007). Störst risk för kastrerade hanhundar var att drabbas av övergångscellscarcinom och det verkar finnas en viss rasskillnad gällande oddsen för prostatatumörer generellt. Hundens prostatatumörer svarar i regel inte på antiandrogen behandling, till skillnad från på humansidan. Gemensamt för hund och människa är dock att det framförallt är äldre individer som drabbas. Enligt World Cancer Research Fund International var prostatacancer den fjärde vanligaste cancerformen globalt år 2012 och det är den vanligaste cancerformen i Sverige enligt Cancerfonden.

Prostatatumörer hos män är generellt heterogena, långsamväxande och till viss del beroende av androgener för sin tillväxt, varför medicinsk behandling till stor del utgörs av antiandrogena läkemedel eller läkemedel som hämmar androgenfrisättning (Denis & Griffiths, 2000). I en studie *in vitro* undersökte Wetherill *et al.* (2002) påverkan av BPA på prostataadenocarcinomceller. BPA-behandlingen hade en mitogen effekt på celler som

vanligtvis är beroende av androgener för att proliferera. Cellerna kunde proliferera även utan närvaro av androgener, om de exponerades för BPA. Vidare sågs en ökning av androgenreceptorer (AR) i BPA-exponerade celler jämfört med celler som inte exponerats för BPA samt en ökning av PSA-mRNA jämfört med icke exponerade celler och en aktivering av endogena AR. Det visades även att aktivering av dessa AR-receptorer krävdes för att BPA skulle kunna ha mitogen effekt på cellerna.

Som nämnts ovan, används bl.a. PSA som markör vid diagnostik för prostatacancer på människa. Tarapore *et al.* (2014) kunde dock visa en negativ korrelation mellan PSA och BPA hos män yngre än 65 år, med konstaterad prostatacancer. I studien sågs även signifikant högre halter BPA i urinen hos prostatacancerpatienter <65 år jämfört med kontrollpersoner, vilket enligt författarna kan indikera att hög exponering för BPA kan associeras med tidigt debuterande prostatacancer. Någon signifikant skillnad i BPA-halter förelåg inte hos prostatacancerpatienter >65 år, och en teori är att patienter <65 år exponerats för BPA i yngre ålder/*in utero* jämfört med patienter >65 år eftersom BPA inte fanns på marknaden när den äldre åldersgruppen föddes. *In vitro* kunde en ökad förekomst av abnormala centrosomer påvisas hos celler behandlade med BPA. Centrosomen är en del av eukaryota cellers cytoskelett och spelar en viktig roll vid celldelning och abnormaliteter hos centrosomerna har visats förekomma hos en rad olika maligna tumörtyper, däribland prostatatumörer (Pihan *et al.*, 1998).

Burton *et al.* (2015) undersökte *in vitro* en eventuell effekt av BPA och östrogen på histon-modifierande enzymer (bl.a. *Set8*) som tidigare har visats ha samband med bl.a. cancer. Försöket utfördes i två olika typer av prostatacancermodeller (androgenberoende och kastrationsresistent) samt i närvaro av fysiologiska hormoner för att få ett så rättvisande resultat som möjligt. Det visades att BPA-behandling av cellerna, i halter representativa för vad som anses vara normal exponering för människa, inom 24 h gav en tendens till ökat genuttryck av *Set8* i den androgenberoende cancermodellen. I den andra modellen (kastrationsresistent prostatacancer) fanns inga androgenreceptorer, men båda typerna av östrogenreceptorer (α och β) och här sågs istället en minskning av *Set8*-genuttryck. Östrogenbehandling gav ingen effekt på den androgenberoende modellen, men hade samma effekt som BPA på modellen för kastrationsresistent prostatacancer. I båda cancermodellerna reducerades effekten av BPA vid tillsats av östrogenreceptorantagonist. Om BPA har förmåga att påverka uttrycket av denna histon-modifierande gen skulle det kunna vara ännu en indikation på att BPA kan relateras till prostatacancer. Det faktum att effekten reducerades vid tillsats av östrogenreceptorantagonist tyder på att BPAs verkningsmekanism vid prostatacancer sker via östrogenreceptorsignalering.

Det har även visats att neonatala råttor som exponeras för BPA s.c (0.1 μg /råtta eller 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), följt av s.c administration av östradiol och testosteron motsvarande halter normala för en vuxen råtta, fick en signifikant ökad förekomst av den typen av lesioner som brukar föregå prostatacancer (prostatic intraepithelial neoplasia – PIN) (Ho *et al.*, 2006). De områden med hög grad PIN visade även en signifikant ökad proliferation och exponering för BPA ledde till förändringar i flera olika geners metylering. Sammantaget tyder fynden på att neonatal

exponering för BPA i kombination med normala nivåer östrogen och testosteron kan ge förändringar som senare kan leda till utveckling av prostatacancer.

MATERIAL OCH METODER

Under sommaren 2016 samlades urinprov in på Distriktsveterinärernas station i Kiruna, från två hundar med misstänkt prostatasjukdom. Djurägarna gav sitt skriftliga medgivande samt fyllde i en enkät med frågor som var tänkta att ge en överblick över hur mycket plast hunden har i sin omgivning till vardags. Exempel på faktorer som undersöktes var ras, ålder, vikt, hemmiljö, matskålar, foder, material på leksaker m.m.

Ytterligare sju urinprover togs från Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, genom att välja ut journaler från intakta hanhundar och därigenom hitta individer som genom ultraljud fått prostataförändringar diagnosticerade, men där prostataproblem inte var den primära orsaken till att vård söktes (undantaget ett återbesök efter kastration på grund av misstänkt prostatit). Genom ultraljudet konstaterades att samtliga sex hundar hade heterogen, förstörd prostata med cystor eller "cystliknande lesioner". Dessa hundars djurägare kontaktades och gav sitt muntliga medgivande till att delta i studien samt svarade muntligen på enkäten.

Även urinprov nio från friska kontroller samlades. Kriterierna för kontrollerna var: vuxen och intakt hanhund utan kliniska symptom eller tidigare prostataproblem. Även kontrollhundarnas djurägare fick svara på enkäten. Urinproven togs genom cystocentes eller spontankastade (togs i de flesta fall av djurägarna själva) som samlades i metallslev, porslinsskål, plastbehållare eller pappersskål för att sedan förvaras i ca -20°C i 2 ml cryorör. Alla prover transporterades frysta till Lunds universitet, där de analyserades för förekomst av BPA. Analysmetoden var samma som användes för ftalatanalys av (Bornehag *et al.*, 2014), men nu modifierad för att även kunna analysera förekomst av BPA. Halterna justerades för densitet med hjälp av ekvationen:

$$C_{corr} = \frac{C_{(obs)}(1,036-1)}{\rho-1}$$

C_{obs} är den observerade koncentrationen, 1,036 är medelvärdet för densitet i denna studie och ρ motsvarar densiteten för det specifika provet som ska justeras. C_{corr} blir således BPA-halten korrigerad för urinprovets densitet. Ekvationen finns även beskriven av Carnerup *et al.* (2006).

En genomsnittlig daglig exponering (ng BPA/kg/dygn) uppskattades enligt ekvationen nedan (Lakind & Naiman, 2008):

$$\frac{\text{urinary BPA (ng/ml)} \times \text{urinary output (ml/day)}}{\text{bodyweight (kg)}}$$

Värdet för urinary output antogs vara 0,46 ml/kg/h enligt en studie av Boscan *et al.* (2010).

Samband mellan hundarnas BPA-halter och prostatabelsvär, kroppsvikt eller ålder undersöktes med linjär regression genom att använda SAS GLM procedure. På samma sätt undersöktes samband mellan BPA-halter och miljöfaktorer såsom frekvens på dammsugning, golvtyp, var hunden sover och material på leksaker. För att uppnå normalfördelning av residualerna logaritmerades BPA-halterna.

RESULTAT

Resultaten för densitetskorrigerade BPA-halter och densitet på urinen från samtliga hundar redovisas i tabell 1. En av kontrollhundarna (K4) hade anmärkningsvärt hög halt BPA (128,43 ng/ml) i urinen, varför medelvärden och median räknades ut utan den kontrollhunden. Det uppskattade värdet för daglig exponering BPA för K4 var 220,87 ng/kg/dag och densiteten var 1,049 g/ml. Två av hundarna visade sig också vara kastrerade och avlägsnades därför från studien.

Studien bestod av hundar av olika raser, i ett åldersspann från 2 till drygt 13 år. Hundarna med konstaterade prostataförändringar var i åldern 5-12 år och de hundar som sökte vård på grund av prostatarelaterade symptom hade kliniska tecken på BPH eller prostatit. Hälften av djurägarna angav att hundarna bodde på landet och hälften i stan, och alla hundar utom tre angavs vistas i bostaden under dagarna. Samtliga hundars matskålar var gjorda av stål eller porslin och sex av hundarna hade leksaker i plast. Ingen av hundarna fick foder som förpackas i konservburk.

Inga signifikanta samband mellan hundarnas BPA-halter och prostatabesvär kunde ses, inte heller påverkade kroppsvikt eller ålder halterna. Det fanns inga signifikanta samband mellan miljöfaktorer och BPA-halter.

Tabell 1. Resultat för urinanalyser (BPAhalter korrigerade för densitet)

| | Kontrollhundar (n=9) | | Hundar med prostataförändringar (n=8) | | Samtliga hundar (n=17) |
|------------|-------------------------|------------------------|---|-------------|------------------------------|
| | BPA (ng/ml) | | BPA (ng/ml) | | BPA (ng/ml) |
| | | Omfång | | Omfång | |
| Medelvärde | 1,05 | 0,10-2.45 ^a | 1,41 | 0,19-2,45 | 1,22 |
| Median | 0,86 | | 1,59 | | 0,98 |
| | Densitet (g/ml) | | Densitet (g/ml) | | |
| Medelvärde | 1,046 | 1,025-1,066 | 1,024 | 1,010-1,041 | 1,036 |
| Median | 1,047 | | 1,022 | | 1,035 |

^aett extremt högt värde på en av hundarna (128,43 ng/ml) togs bort från beräkningarna.

Tabell 2. Uppskattad daglig exponering (ng BPA/kg/dag, densitetskorrigerad)

| | Medelvärde | Median | Omfång |
|--|------------|--------|-----------|
| Samtliga hundar (<i>n</i> =17) | 0,89 | 0,60 | 0,06-2,82 |
| Hundar med prostataförändringar (<i>n</i> =8) | 1,01 | 0,55 | 0,08-2,82 |
| Kontrollhundar (<i>n</i> =9) | 0,78 | 0,60 | 0,06-2,25 |

DISKUSSION

Studien kunde inte påvisa något samband mellan BPA-halter i urinen och prostataförändringar. Däremot hade samtliga hundar påvisbara halter BPA i urinen och en kontrollhund (K4) hade 128,43 ng/ml BPA, vilket med stor marginal översteg övriga hundars BPA-halter. Vid närmare granskning av urindensiteten och enkätsvaren för K4 hittades ingenting som kunde förklara den höga halten. Enkätsvaren för K4 var identiska med de för en annan kontrollhund (K3), med skillnad för ålder (två respektive tre år), ras och vikt (nio respektive 25 kg). Densiteten på K4s urin var 1,049 g/ml och för K3 var densiteten 1,050 g/ml.

Cryorören som urinen transporterades i är fria från BPA, men det kan inte uteslutas att urinprov, i samband med provtagningen, kontaminerats med BPA från t.ex. plastbehållare. Detta kan dock enbart gälla de sex hundar vars urinprov togs på UDS eftersom provtagningsutrustning för resterande hundar tillhandahölls av författaren själv och var av porslin eller metall.

Medelvärdet för den densitetskorrigerade koncentrationen av BPA hos kontrollgruppen var 1,05 ng/ml och "prostatagruppens" 1,41 ng/ml, men skillnaden var inte statistiskt signifikant. Studiens "prostatagrupp" var heterogen gällande sina prostataförändringar och för att kunna tydligare kunna utreda ett eventuellt samband mellan BPA och BPH eller BPA och andra prostatabesvär vore det kanske fördelaktigt att fokusera på endast en diagnos samt använda sig av en större population, där även kontrollhundar undersöks med ultraljud. Kontrollhundarna i denna studie var enligt djurägarna friska, utan symptom på prostatabesvär, men det utesluter inte att prostataförändringar skulle ses om alla hundarna ultraljudades.

Vad som däremot kan anses anmärkningsvärt är att båda studiegruppernas medelvärde för BPA-halter i urinen ligger i nivå med, och i vissa fall även högre än medelvärden som påvisats i flera studier på människa. Humanstudier från bl.a. USA, Kanada och Norge har visat olika medelvärden för BPA i urin: 3,9 ng/ml (Sverige), 0,701 ng/ml (USA), 0,86 ng/ml (Kanada), 2,6 ng/ml (USA) och 4,5 ng/ml (Norge) (Calafat *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009; Liao & Kannan, 2012; Lindh *et al.*, 2012; Kubwabo *et al.*, 2014). Beroende på exponeringsgrad och elimination av BPA finns både variation i halterna under dygnet, men även beroende på hur hög exponeringen varit den dagen provet tas (Arakawa *et al.*, 2004). Ett enstaka urinprov ger därför endast en ögonblicksbild av exponeringsnivån, och optimalt vore att ta flera prover per dygn under några dagar för att kunna uppskatta exponeringsnivå för en specifik individ.

Trots att hundarna i denna studie inte kommer upp i European Food Safety Authoritys TDI (4 µg/kg/dag) behöver BPAs eventuella icke-monotona dosrespons tas i beaktande. Den icke-monotona dosresponsen innebär att dosresponskurvorna är u-formade, d.v.s att vid en viss dos svänger kurvan och responsen antingen ökar eller minskar. Att bestämma TDI kan således vara problematiskt eftersom effekten skulle kunna vara högre vid lägre doser, snarare än om TDI överskrids. En lägre exponering innebär inte per automatik en lägre risk för endokrin effekt och TDI baseras ofta på No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), vilken i sin tur ofta baseras på toxikologiska studier för högre värden, utan att det slutliga värdet för NOAEL testats (se review: Vandenberg, 2014). Oral exponering eller exponering *in utero* genom oral exponering

hos mödrarna för låga doser BPA (10µg/kg/dag) har orsakat ökad prostatavikt hos både råttor och möss, men ingen ökning sågs vid högre doser (Timms *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011). Ashby *et al.* (1999) kunde dock inte visa någon signifikant skillnad på prostatavikt hos möss som exponerats *in utero* genom att deras mödrar exponerats oralt i antingen hög (20 µg/kg/dag) eller låg (2 µg/kg/dag) dos. Dessa motstridiga resultat ger en anledning att fortsätta utforska lågdoseffekter av BPA på prostata.

Enligt en amerikansk studie är det uppskattade dagliga intaget av BPA 46,8 ng/kg-dag för människa (Lakind & Naiman, 2008). Det beräknade dagliga intaget för samtliga hundar i denna studie ligger under det intaget. Som nämnts tidigare är den huvudsakliga exponeringsvägen för BPA hos människa troligtvis oral, och de få studier som gjorts på avseende hundars exponeringsvägar omfattar hundmatsburkar och leksaker/träningsredskap. En annan exponeringsväg är hushållsdamm (Geens *et al.*, 2009). Hundar har sannolikt mer kontakt med hushållsdamm eftersom de i stor utsträckning vistas på golvet och därigenom troligtvis får i sig mer hushållsdamm än människa i och med ett mer oralt beteende. I bl.a. Malaysia och Portugal har BPA kunnat påvisas i vattendrag (upp till 683 ng/L i portugisiska floder och upp till 215 ng/L i malaysiska floder) (Jonkers *et al.*, 2010; Santhi *et al.*, 2012). I de svenska ytvatten som provtagits varierar halterna från <5 ng/L till 71 ng/L, där den högsta halten uppmättes i Fyrisån i Uppsala, enligt en rapport från Svenska Miljöinstitutet, 2010. Kontaminerade vattendrag skulle således kunna vara en möjlig tillfällig exponeringsväg. BPA i dricksvattnet är också en möjlig källa till exponering (Lagerstedt, 2013).

Enligt enkäten i denna studie var det endast 6/17 hundar som hade plastleksaker (inga frågor om träningsredskap fanns med i enkäten) och ingen hund vars foder säljs i burk.. Då det har visats att BPA också kan tas upp genom munslemhinnan räcker det alltså att hunden slickar på föremål innehållande BPA för att ett upptag ska ske. Huruvida detta skulle kunna förklara BPA-halterna i denna studie är svårt att bedöma och fler och större studier behövs avseende exponeringsvägar och för att bättre kunna bestämma exponeringsgrad.

SLUTSATS

Baserat på litteraturstudien och resultatet av denna studie är det inte sannolikt att BPA utgör någon riskfaktor för prostataförändringar hos hund, men på grund av studiens begränsade storlek och att prostataförändringar hos kontrollhundarna inte kunnat uteslutas, går det heller ej att utesluta ett eventuellt samband mellan BPA-halter i urinen och prostataförändringar. Klart står dock att hundar exponeras för BPA i halter jämförbara med de för människa, och fler och större studier behövs för att kartlägga och hitta eventuella okända exponeringsvägar och fastställa huruvida låga doser BPA har effekt på prostata eller ej.

REFERENSLISTA

- Acconcia, F., Pallottini, V. and Marino, M. (2015), “Molecular Mechanisms of Action of BPA”, *Dose-Response*, Vol. 13, (4). Tillgängligt: <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>.
- Arakawa, C., Fujimaki, K., Yoshinaga, J., Imai, H., Serizawa, S. and Shiraishi, H. (2004), “Daily urinary excretion of bisphenol A”, *Environmental Health and Preventive Medicine*, Vol. 9 (1), ss. 22–26.
- Ashby, J., Tinwell, H. and Haseman, J. (1999), “Lack of Effects for Low Dose Levels of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on the Prostate Gland of CF1 Mice Exposed in Utero”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 30 (2), ss. 156–166.
- Bornehag, C.-G., Carlstedt, F., Jönsson, B.A., Lindh, C.H., Jensen, T.K., Bodin, A., Jonsson, C., *et al.* (2014), “Prenatal Phthalate Exposures and Anogenital Distance in Swedish Boys”, *Environmental Health Perspectives*. Tillgänglig: <https://doi.org/10.1289/ehp.1408163>.
- Boscan, P., Pypendop, B.H., Siao, K.T., Francey, T., Dowers, K., Cowgill, L. and Ilkiw, J.E. (2010), “Fluid balance, glomerular filtration rate, and urine output in dogs anesthetized for an orthopedic surgical procedure”, *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 71 (5), ss. 501–507.
- Bryan, J.N., Keeler, M.R., Henry, C.J., Bryan, M.E., Hahn, A.W. and Caldwell, C.W. (2007), “A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer”, *The Prostate*, Vol. 67 (11), ss. 1174–1181.
- Burton, K., Shaw, L. and Morey, L.M. (2015), “Differential effect of estradiol and bisphenol A on Set8 and Sirt1 expression in prostate cancer”, *Toxicology Reports*, Vol. 2, ss. 817–823.
- Calafat, A.M., Kuklenyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J. and Needham, L.L. (2004), “Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113 (4), ss. 391–395.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A. and Needham, L.L. (2008), “Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 116 (1), ss. 39–44.
- Carnerup, M.A., Spanne, M. and Jönsson, B.A.G. (2006), “Levels of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and its metabolites in plasma and urine from volunteers after experimental exposure to NMP in dry and humid air”, *Toxicology Letters*, Vol. 162 (2–3), ss. 139–145.
- Denis, L.J. and Griffiths, K. (2000), “Endocrine treatment in prostate cancer”, *Seminars in Surgical Oncology*, Vol. 18 (1), ss. 52–74.
- Gayrard, V., Lacroix, M.Z., Collet, S.H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P.-L. and Picard-Hagen, N. (2013), “High Bioavailability of Bisphenol A from Sublingual Exposure”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 121 (8), ss. 951–956.
- Geens, T., Roosens, L., Neels, H. and Covaci, A. (2009), “Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium”, *Chemosphere*, Vol. 76 (6), ss. 755–760.
- Gloyna, R.E., Siiteri, P.K. and Wilson, J.D. (1970), “Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy: II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog”, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 49 (9), s. 1746.

- Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Frausto, J.B. de and Prins, G.S. (2006), “Developmental Exposure to Estradiol and Bisphenol A Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 4 Variant 4”, *Cancer Research*, Vol. 66 (11), ss. 5624–5632.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. and Taketani, Y. (2002), “Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure”, *Human Reproduction*, Vol. 17 (11), ss. 2839–2841.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.-P.E. and Giger, W. (2010), “Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal”, *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 17 (4), ss. 834–843.
- Kang, J.-H. and Kondo, F. (2002), “Determination of bisphenol A in canned pet foods”, *Research in Veterinary Science*, Vol. 73 (2), ss. 177–182.
- Kim, E.J., Lee, D., Chung, B.C., Pyo, H. and Lee, J. (2014), “Association between urinary levels of bisphenol-A and estrogen metabolism in Korean adults”, *Science of The Total Environment*, Vol. 470–471, ss. 1401–1407.
- Kubwabo, C., Kosarac, I., Lalonde, K. and Foster, W.G. (2014), “Quantitative determination of free and total bisphenol A in human urine using labeled BPA glucuronide and isotope dilution mass spectrometry”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 406 (18), ss. 4381–4392.
- Kurebayashi, H. (2003), “Disposition of a Low Dose of ¹⁴C-Bisphenol A in Male Rats and Its Main Biliary Excretion as BPA Glucuronide”, *Toxicological Sciences*, Vol. 73 (1), ss. 17–25.
- Lagerstedt, J. (2013), “Tusentals kan ha bisfenol i dricksvattnet”. *Svt.se*. 22 oktober. Tillgänglig: <http://www.svt.se/nyheter/inrikes/3000-hem-riskerar-att-ha-bisfenol-a-i-dricksvattnet> [2017-01-03]
- Lakind, J.S. and Naiman, D.Q. (2008), “Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003–2004 NHANES urinary BPA data”, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, Vol. 18 (6), ss. 608–615.
- Liao, C. and Kannan, K. (2012), “Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry”, *Environmental Science & Technology*, Vol. 46 (9), ss. 5003–5009.
- Lindh, C., Jönsson, B., Berggren, M., Beronius, A., Carlberg, B., Sundkvist, A. and Bergdahl, I. (2012), “Bisfenol A i urin från män och kvinnor i Norr-och Västerbotten”. Tillgänglig: <http://www.imm.ki.se/datavard/rapporter/halsorelaterad%20miljoovervakning%20bisphenola%20-%202190902.pdf> [2016-12-15].
- Nelson, R.W. and Couto, C.G. (2014), *Small Animal Internal Medicine*, 5. uppl., Mosby, St. Louis, Mo.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H. and Yokota, H. (2010), “Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 118 (9), ss. 1196–1203.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. and Doxsey, S.J. (1998), “Centrosome Defects and Genetic Instability in Malignant Tumors”, *Cancer Research*, Vol. 58 (17), ss. 3974–3985.

- Polisca, A., Troisi, A., Fontaine, E., Menchetti, L. and Fontbonne, A. (2016), “A retrospective study of canine prostatic diseases from 2002 to 2009 at the Alfort Veterinary College in France”, *Theriogenology*, Vol. 85 (5), ss. 835–840.
- Richard A. Harvey. (2011), *Biochemistry*, 5. uppl., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. ; London.
- Richter, C.A., Taylor, J.A., Ruhlen, R.L., Welshons, W.V. and vom Saal, F.S. (2007), “Estradiol and Bisphenol A Stimulate Androgen Receptor and Estrogen Receptor Gene Expression in Fetal Mouse Prostate Mesenchyme Cells”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 115 (6), ss. 902–908.
- Rubin, B.S. (2011), “Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 127 (1–2), ss. 27–34.
- Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R. and Brody, J.G. (2003), “Phthalates, Alkylphenols, Pesticides, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Other Endocrine-Disrupting Compounds in Indoor Air and Dust”, *Environmental Science & Technology*, Vol. 37 (20), ss. 4543–4553.
- Santhi, V.A., Sakai, N., Ahmad, E.D. and Mustafa, A.M. (2012), “Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water”, *Science of The Total Environment*, Vol. 427–428, ss. 332–338.
- Schwab, M. (Ed.). (2012), “Dihydrotestosterone”, *Encyclopedia of Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, ss. 1117–1117.
- Shin, B.S., Kim, C.H., Jun, Y.S., Kim, D.H., Lee, B.M., Yoon, C.H., Park, E.H., et al. (2004), “Physiologically based pharmacokinetics of bisphenol A”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Vol. 67 (23–24), ss. 1971–1985.
- Smith, J. (2008), “Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment”, *Theriogenology*, Vol. 70 (3), ss. 375–383.
- Stephan, C. (2011), “Prostate-Specific Antigen”, in Schwab, M. (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, ss. 3064–3068.
- Tarapore, P., Ying, J., Ouyang, B., Burke, B., Bracken, B. and Ho, S.-M. (2014), “Exposure to Bisphenol A Correlates with Early-Onset Prostate Cancer and Promotes Centrosome Amplification and Anchorage-Independent Growth In Vitro”, *PLoS ONE*, Vol. 9 (3). Tillgänglig:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090332>.
- Timms, B.G., Howdeshell, K.L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C.A. and vom Saal, F.S. (2005), “Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102 (19), ss. 7014–7019.
- Vandenberg, L.N. (2014), “Non-Monotonic Dose Responses in Studies of Endocrine Disrupting Chemicals: Bisphenol a as a Case Study”, *Dose-Response*, Vol. 12 (2), ss. 13–20.
- Wetherill, Y.B., Petre, C.E., Monk, K.R., Puga, A. and Knudsen, K.E. (2002), “The Xenoestrogen Bisphenol A Induces Inappropriate Androgen Receptor Activation and Mitogenesis in Prostatic Adenocarcinoma Cells”, *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 1 (7), ss. 515–524.

- Wolf, K., Kayacelebi, H., Urhausen, C., Piechotta, M., Mischke, R., Kramer, S., Einspanier, A., *et al.* (2012), “Testicular Steroids, Prolactin, Relaxin and Prostate Gland Markers in Peripheral Blood and Seminal Plasma of Normal Dogs and Dogs with Prostatic Hyperplasia”, *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 47, ss. 243–246.
- Wolff, M.S., Teitelbaum, S.L., Windham, G., Pinney, S.M., Britton, J.A., Chelimo, C., Godbold, J., *et al.* (2006), “Pilot Study of Urinary Biomarkers of Phytoestrogens, Phthalates, and Phenols in Girls”, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 115 (1), ss. 116–121.
- Wooten, K.J. and Smith, P.N. (2013), “Canine toys and training devices as sources of exposure to phthalates and bisphenol A: Quantitation of chemicals in leachate and in vitro screening for endocrine activity”, *Chemosphere*, Vol. 93 (10), ss. 2245–2253.
- Wu, J.-H., Jiang, X.-R., Liu, G.-M., Liu, X.-Y., He, G.-L. and Sun, Z.-Y. (2011), “Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats”, *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 27 (9), ss. 810–819.
- Ye, X., Pierik, F.H., Angerer, J., Meltzer, H.M., Jaddoe, V.W.V., Tiemeier, H., Hoppin, J.A., *et al.* (2009), “Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)”, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 212 (5), ss. 481–491.