



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Exogena östrogeners påverkan på fisk

The influence of exogenous estrogens on fish

Angelica Johansson

*Uppsala
2019*

Exogena östrogeners påverkan på fisk

The influence of exogenous estrogens on fish

Angelica Johansson

Handledare: Johannes Pohl, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Examinator: Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

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

Nyckelord: Östrogen, fisk, vitellogenin, beteende, intersex

Key words: Estrogen, fish, vitellogenin, behavior, intersex

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturöversikt.....	4
Naturliga östrogener	4
Xenoöstrogener.....	4
Fysiologiska effekter av östrogena endokrinstyrande ämnen	5
Effekter på beteende	6
Additiva effekter	7
Påverkan på populations- och ekosystemnivå	7
Diskussion.....	8
Slutsats.....	10
Litteraturförteckning	11

SAMMANFATTNING

Fiskars proteiner är snarlika människans vilket gör att de i många fall kan påverkas av samma ämnen som oss. Hormonpreparat, naturliga östrogener och östrogena nedbrytningsprodukter passerar genom reningsverken och hamnar slutligen i vattenmiljön där fiskar exponeras för ämnena. De naturliga östrogenerna bryts ner snabbare i miljön och är mindre potenta än det syntetiska östrogeten etinylöstradiol som används i de flesta kombinerade hormonella preventivmedlen. Samtliga östrogena ämnen påverkar dock kroppen via gemensamma verkningsmekanismer och deras effekter adderas samman till en total östrogen påverkan hos fisken. Denna litteraturstudie syftar till att sammanställa information kring hur fiskar påverkas av östrogena ämnen i vattenmiljön med fokus kring påverkan på fysiologiska funktioner, beteende samt populations- och ekosystemeffekter.

Förekomst av vitellogenin i blodet på hanar och ungfisk används som indikation på förekomst av östrogena ämnen i vattenmiljön, eftersom vitellogeninsyntes induceras av östrogen som normalt finns i mycket låga halter hos dessa fiskgrupper. Vid exponering för östrogena ämnen ses utöver vitellogeninsyntes hos hanar och ungfisk även ökad andel hanfiskar med intersex och störningar i gonadutvecklingen, samt skev könsfördelning till följd av att genetiska hanar utvecklas till fenotypiska honor. Hanar med intersex kan ha försämrade spermiekvalitet och spermiedensitet, vilket kan ge nedsatt fertilitet som följd. Vitellogenin bryts till slut ner i levern, vilket gör att det är en övergående effekt av exogena östrogena ämnen. Intersex tar längre tid att utveckla och uppkommer av en längre tids exponering eller en exponering under fiskens tidiga levnadsstadier. Alltså bör dessa två parametrar kunna avslöja ungefärligt något om när eller hur länge fisken varit exponerad.

Beteende förknippat med ångest hos fisk kan påverkas av exogena östrogena ämnen, men hur det påverkas varierar mellan studier då både minskning och ökning av ångestbeteende har setts. Skillnaderna kan möjligen bero på artskillnader eller på när i livscykeln fiskarna exponeras, men fler studier på olika arter behövs för att säkert kunna dra några slutsatser.

Fiskar kan påverkas av östrogena ämnen i vattenmiljön på flera sätt men den kanske allvarligaste effekten är risken för nedsatt fertilitet. Reproduktionsstörningar till följd av intersex och störd gonadutveckling av östrogenexponering har setts kunna leda till kraftiga populationsminskningar. Det kan i sin tur ge indirekta effekter på andra arter i ekosystemet på grund av minskad predation eller minskad tillgång på bytesdjur. Exakt vilka effekter som kan ses på ekosystem är svårt att förutspå på grund av komplexiteten hos dessa.

SUMMARY

Proteins of fish are similar to the ones in humans which means that they in many cases can be affected by the same substances as us humans. Synthetic and natural estrogens and degradation products with estrogenic properties pass through water treatment plans and ends up in the aquatic environment where fish can get exposed. The natural estrogens get degraded quicker and are less potent than the synthetic estrogen ethinylestradiol, which is used in the majority of combined contraceptives. All estrogenic substances affect the body by the same mechanisms of action and their individual effects are added together to make up the total estrogenic effect on the fish. This study aims to put together information about how fish get affected by estrogenic substances in the aquatic environment, with the focus being on physiological functions, behavior and effects on populations and ecosystems.

The presence of vitellogenin in the blood of male and juvenile fish is used as an indication of the presence of estrogenic substances in the aquatic environment, as vitellogenin synthesis is induced by estrogen which is normally found in very low levels in these groups. When exposed to estrogenic substances, in addition to synthesis of vitellogenin in males and juveniles, an increased proportion of male fish with intersex and disturbances in gonadal development are observed, as well as skewed gender distribution as a result of genetic males developing into phenotypical females. Males with intersex may have impaired sperm quality and sperm density, which may result in impaired fertility. Vitellogenin is eventually degraded in the liver, making it a transient effect of exogenous estrogenic substances. Intersex takes longer to develop and arises from a longer-term exposure or an exposure during the fish's early stages of life, thus these two parameters should be able to reveal approximately when or how long the fish has been exposed.

Behavior associated with anxiety in fish can be affected by exposure to estrogenic substances, but how it is affected varies between studies. Both reduction and increase in anxiety behavior have been seen. The differences may possibly be due to differences between species or when in the life cycle the fish are exposed, but more studies on different species are needed to safely draw any conclusions.

Fish can be affected by estrogenic substances in the aquatic environment in several ways, but perhaps the most serious effect is the risk of impaired fertility. Reproductive disorders due to intersex and disturbed gonadal development because of estrogen exposure have been seen to lead to sharp population reductions. This, in turn, may have indirect effects on other species in the ecosystem due to reduced predation or reduced access to prey. Exactly what effects can be seen on ecosystems is difficult to predict due to their complexity.

INLEDNING

Östrogener i miljön kan ge konsekvenser på beteende, reproduktion och gonadutveckling hos fisk, vilket vidare kan ge sekundära effekter på populationsstorlek och ekosystemnivå. År 2014 publicerades en studie gjord i Kanada som visade att en fiskart nästintill försvann i en sjö på fyra år till följd av det syntetiska östrogenet etinylöstradiol (Kidd *et al.*, 2014). Tidningar som The Telegraph och New York Post har uppmärksammat intersex och försämrad fertilitet som effekter av östrogener i vattenmiljön (Brown, 2017; Jamieson, 2017).

Fiskar är relativt närbesläktade till människan och har proteiner som är snarlika våra. Vanligaste verkningsmekanismen för läkemedel är att substansen binder till proteiner i kroppen, exempelvis enzymer eller receptorer (Löf & Larsson, 2015). Substanser som är avsedda för humant bruk kan därför påverka fiskar om de kommer ut i vattenmiljön (Löf & Larsson, 2015; LIF, 2019). Fiskarnas gälar är byggda för effektivt utbyte av molekyler mellan omgivande vatten och blodet. Det gör att syre lätt transporteras från vattnet till blodet, men också att andra molekyler riskerar att tas upp (Löf & Larsson, 2015). Följden blir att organismer som vattenandas är mer utsatta för exponering av läkemedel och andra molekyler i vatten än djur som endast dricker vatten (Löf & Larsson, 2015; 1177 Vårdguiden, 2017).

Främsta spridningsvägen av humanläkemedel är via reningsverk (1177 Vårdguiden, 2017; LIF, 2019). Vid användning utsöndrar kroppen läkemedelssubstanser och metaboliter av dessa via urin och avföring (LIF, 2019). Substanserna transporteras därefter till reningsverk där de antingen bryts ner, hamnar i slammet eller går ut med det renade avloppsvattnet (Löf & Larsson, 2015). Läkemedel är ofta kemiskt stabila ämnen, vilket i många fall är önskvärt då läkemedel ska klara av att ta sig till målorganen i terapeutisk koncentration. Baksidan är att kemiskt stabila ämnen lättare kan passera reningsverk utan att brytas ner och kan persistera i miljön (Löf & Larsson, 2015; Region Uppsala, 2018). Det ger ökad risk för ackumulering till skadliga koncentrationer i vattenmiljön (Löf & Larsson, 2015). Östrogener kommer ut i vattenmiljön via hormonpreparat som exempelvis kombinerade preventivmedel. I majoriteten av de kombinerade preventivmedlen används det syntetiska östrogenet etinylöstradiol (EE2). Syntetiska östrogener utsöndras från kroppen tillsammans med naturliga östrogener som också bidrar till effekterna (Owen & Jobling, 2012). Utöver EE2 och naturliga östrogener finns industriella kemikalier som har en svagt östrogen effekt (Löf & Larsson, 2015).

Denna litteraturstudie syftar till att sammanställa information om den påverkan som hormonstörande ämnen med östrogen effekt kan ha på fiskar. Målet är att ta reda på hur fiskars normala fysiologiska funktioner påverkas av dessa ämnen samt hur beteendet kan påverkas. Därutöver kommer studien titta på vilka effekter som kan ses på populations- och ekosystemnivå.

MATERIAL OCH METODER

Vid sökning efter material användes databaserna Web of Science och Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (ASFA). Sökningar gjordes främst med följande sökord och kombinationer: Fish* AND (estrogen* OR oestradiol OR xenoestrogen*) AND (behav* OR population* OR

ecosystem*), Fish* AND (endocrine disrupt* OR hormonal disrupt*) AND (estrogen* OR ethinylestradiol OR estrone OR bisphenol*) AND (physiology* OR effects OR environment*), Fish* AND (estradiol OR oestradiol) AND (intersex OR feminisation OR feminization). Därutöver användes referenser från lästa artiklars referenslistor. Viss information har hittats på relevanta webbsidor som bedömts som pålitliga.

LITTERATURÖVERSIKT

Naturliga östrogener

De 3 huvudsakliga östrogenerna hos kvinnor är östron (E1), östradiol (E2) och östriol (E3). Samtliga av dem syntetiseras med kolesterol som ursprung. Kolesterol omvandlas till dehydroepiandrosteron (DEHA) som i sin tur omvandlas till östron eller testosteron. Testosteron omvandlas vidare till östradiol, och östron kan omvandlas vidare till östradiol eller östriol (Cui *et al.*, 2013). Hos gravida kvinnor syntetiseras stora mängder östriol ifrån östron medan hos ickegravida är syntesen knappt detekterbar (Strauss & Barbieri, 2013). Östradiol är den huvudsakliga slutprodukten i syntetiseringskedjan och därutöver det mest potenta östrogenerna hos kvinnor fram till klimakteriet (Cui *et al.*, 2013).

De naturliga östrogenerna bryts ner snabbare i miljön jämfört med det syntetiska östrogenerna etinylöstradiol (Larsson *et al.*, 1999). Utsöndring sker kontinuerligt till miljön ifrån reningsverkens utflöden. Koncentrationen av ämnena i vattnet varierar beroende på utspädningsfaktorn för utflödesvattnet (Jobling *et al.*, 2006). Uppmätta koncentrationer i utflödesvatten från reningsverk i ett flertal länder varierar i olika studier mellan <1–48 ng/L för östradiol och 1–76 ng/L för östron (Jobling *et al.*, 2006).

Xenoöstrogener

Xenoöstrogener är ämnen som strukturellt har likheter med naturliga östrogener. De kan binda till östrogenreceptorer och inducera ett svar eller störa svaret från endogena östrogener (Słomczyńska, 2008). Etinylöstradiol (17 α -etinylöstradiol, EE2) är det syntetiska östrogenerna i kombinerade p-piller och en del andra hormonella preventivmedel (Owen & Jobling, 2012). I en studie visades EE2 vara 25 till 30 gånger mer potent än E2, vilket gör EE2 till ett mycket potent endokrinstörande ämne (Brian *et al.*, 2005). Uppmätta koncentrationer i utflödesvatten från reningsverk varierar i olika studier mellan <1–7 ng/L (Jobling *et al.*, 2006). Enligt Läkemedelsverkets läkemedelsbok är koncentrationerna av EE2 i de svenska reningsverkens utflöden omkring 1 ng/L (Löf & Larsson, 2015).

Fler exempel på xenoöstrogener är nonylfenol (NP) och oktylfenol (OP) som är nedbrytningsprodukter från bland annat rengöringsmedel. NP har visats ge effekt på lekbeteende, gonadutveckling och äggproduktion på honor av arten Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (El-Sayed Ali *et al.*, 2014). Den östrogena effekten för NP och OP var i en mätning 280 respektive 1800 gånger lägre jämfört med E2 (Brian *et al.*, 2005). Bisfenol-A (BPA) är en misstänkt xenoöstrogen som återfinns i bland annat tandfyllningsmaterial, plastflaskor,

plastmatlådor, lim och kvitton. De flesta urin- och blodprov från människor har visats innehålla BPA (Kemikalieinspektionen, 2019). BPA har i en mätning visats vara 6000 gånger mindre potent än E2 (Brian *et al.*, 2005).

Fysiologiska effekter av östrogena endokrinstörande ämnen

Vitellogenin finns normalt i blodet hos honfiskar i den fertila fasen av livscykeln. Inför ägglossning och parning producerar hypotalamus och hypofysen hormoner som stimulerar tillväxande folliklar att syntetisera främst östradiol. Östradiol förs med blodet till levern där hepatocyterna stimuleras att syntetisera vitellogenin som förs med blodet tillbaka till äggstockarna. Vitellogenin tas där upp av mognande oocyter och genomgår enzymatisk klyvning till diverse äggulekomponenter som lagras in och bygger upp oocytens äggula. Inlagring av äggulekomponenter är mycket viktigt för embryots och det nykläckta ynglets överlevnad (Mommsen & Walsh, 1988). I hanfisk och ungfisk är halterna vitellogenin i blodet mycket låga (Larsson *et al.*, 1999). Generna för vitellogeninsyntes i hanfisk och ungfisk är normalt tysta då det är låga halter cirkulerande E2 i de kategorierna. Uttryck av generna och syntes av vitellogenin kan induceras av exogena östrogena ämnen (Rani *et al.*, 2010). I de fall hanar exponerats för östrogena ämnen och syntetiserat vitellogenin kommer ämnet cirkulera i blodet tills nedbrytning sker i levern tillsammans med andra cirkulerande plasmaproteiner (Mommsen & Walsh, 1988).

Att syntes av vitellogenin induceras hos hanar exponerade för östrogena ämnen styrks av en studie som påvisade massiv induktion av vitellogeninsyntes hos exponerade fiskar på platser där det fanns östrogena substanser i vattenmiljön (Larsson *et al.*, 1999). En studie på mört (*Rutilus rutilus*) visade på låg halt vitellogenin i blodet på hanar fångade på platser där inga vattenutflöden från städer eller industri kontaminerat vattnet (Geraudie *et al.*, 2010). Förhållandet mellan östrogener och uppmätt vitellogeninhalt i blodet är dosberoende i låga doser men det finns en topp som uppstår vid mättnad av östrogenreceptorerna. Inducerande av vitellogeninsyntes kan dessutom inhiberas av toxiskt höga halter östrogen (Song *et al.*, 2014). Hur potenta olika östrogena ämnen är för att inducera vitellogeninsyntes varierar beroende på fiskart. På prickig ormhuvsfisk (*Channa punctata*) är E1 minst potent och E3 troligen mest potent då E3 visats kunna inducera mer vitellogenin än E2. Generellt anses dock E2 vara mest potent av de naturliga östrogenerna (Rani *et al.*, 2010). Bland xenoöstrogener är EE2 mest potent för att inducera vitellogeninsyntes i hanfisk (Brian *et al.*, 2005).

Koriogenin är prekursor till de proteiner som omsluter ryggradsdjurens ägg. Generna för koriogeninsyntes är normalt tysta i ungfisk och hanfisk och precis som med vitellogeningenerna beror det på den låga halten E2 i blodet hos dem. Uttryck av generna kan induceras av exogena östrogener i fiskens vattenmiljö. E1 har visat sig vara minst potent medan E2 och E3 är lika potenta för att inducera uttryck av generna (Rani *et al.*, 2010).

Könsfördelningen kan bli skev i en fiskpopulation exponerad för östrogena ämnen under sina första levnadsveckor. Fiskar kan vara genetiska hanar men fenotypiska honor, det visades i en studie på storspigg (*Gasterosteus aculeatus*). I studien exponerades en grupp hanar för 30ng/L EE2 under tidigt utvecklingsstadium. 14 fiskar som fenotypiskt var honor testades och av dem

var 8 genetiskt hanar. Tre fiskar klassades som intersex och samtliga tre var genetiskt hanar. De fiskar med hanlig fenotyp var samtliga genetiskt hanar (Porseryd *et al.*, 2019). Intersex på en hanfisk innebär att det ses oocyter i testis eller att det finns en honlig reproduktionskanal utöver den hanliga. Koncentrationen östrogena ämnen i vattenmiljön bidrar till att intersex uppkommer men det förklarar kanske bara en liten del, 8% av variationen enligt en beräkning. Ålder på fisken kan i så fall vara en annan förklarande faktor (Jobling *et al.*, 2006). En viktig faktor att tänka på är att intersex kan associeras med flera möjliga orsaker och att förekomsten av det i en population har setts variera över tid (Iwanowicz *et al.*, 2019).

Intersex kan vara en fördröjd reaktion på exponering för östrogener tidigt i fiskens liv som visar sig först under puberteten. Det kan också uppkomma efter ackumulering av exponeringstid (Jobling *et al.*, 2006). På platser där exponeringsrisken för östrogener är låg är intersexandelen låg för mört vilket indikerar att intersex kan vara ovanligt under naturliga förhållanden. Kön fördelningen på platser med låg exponeringsrisk var välbalanserad och vitellogeninhalten i hanarna låg (Geraudie *et al.*, 2010). På guldfiskhanar (*Carassius auratus*) som exponerats intraperitonealt för olika blandningar av östrogena ämnen i hög koncentration atrofierade gonaderna och på vissa individer kunde gonaderna inte ses makroskopiskt (Song *et al.*, 2014).

Effekter på beteende

Exponering för östrogener påverkar ångestbeteende hos vissa fiskar men det skiljer sig mellan arter. Det finns studier där exponering lett till mer ångestbeteenden men också studier som påvisat det motsatta. Mätning av fiskars beteenden kan göras med Novel tank test, Scototaxis och Shoalingtest. I Novel tank test sätts fisken in i ett nytt akvarie och rörelsemönstren observeras. I Scototaxistestet observeras fiskens tendens att våga lämna en mörk del och utforska en ljus del av ett akvarium. Shoalingtestet möjliggör observation av stimbeteende. Ångestbeteende hos fisk är förknippat med bland annat att fisken föredrar mörka delen av akvariet under Scototaxistestet och att fisken stannar upp på botten av det nya akvariet, så kallat freezingbeteende, i Novel tank test (Porseryd *et al.*, 2019).

En studie på hanliga guppyfiskar (*Poecilia reticulata*) exponerade för EE2 visade att fiskarna fick ökat ångestbeteende. I Novel tank test sågs att de exponerade fiskarna uppvisade ökning i antal och duration av freezingbeteende jämfört med oexponerade kontrollfiskar som normalt inte uppvisade beteendet alls. Det sågs även tecken på att EE2 minskade fiskarnas vilja att utforska den övre halvan av nya akvariet. De exponerade fiskarna väntade längre innan de korsade mittenplanet och simmade tillbaka ner snabbare än de oexponerade. Koncentrationen 3 ng/L EE2 var tillräcklig för att förändringarna i ångestbeteende skulle uppstå, men vid exponering för liknande koncentrationer har normalt reproduktionsbeteende setts. Det tyder på att ångestbeteenden kan vara känsligare för påverkan av EE2 än reproduktionsbeteenden hos hanguppys (Hallgren *et al.*, 2011).

Storspigg exponerade för EE2 under de första levnadsveckorna uppvisade minskat ångestbeteende som vuxna. Effekterna var persistenta och minskningen av ångestbeteenden var koncentrationsberoende. Exponeringskoncentrationerna som undersöktes var 5 ng/L och 30ng/L, varvid beteendeförändringar sågs i båda grupperna. Exponerade storspigghanar var

snabbare med att utforska den ljusa delen i scototaxistestet. De väntade kortare tid innan de simmade in i den ljusa delen och uppehöll sig där längre jämfört med storspigghanar som inte exponerats för EE2 under de första levnadsveckorna. Både exponerade honor och hanar utforskade övre halvan i Novel tank test mer än oexponerade fiskar i respektive könsgрупп (Porseryd *et al.*, 2019). Ingen av studierna på guppy respektive storspigg fann signifikanta skillnader mellan exponerade och oexponerade fiskar med avseende på deras stimbeteende (Hallgren *et al.*, 2011; Porseryd *et al.*, 2019).

Additiva effekter

I vattenmiljön nedströms reningsverk återfinns en blandning av naturliga östrogener och xenoöstrogener (Löf & Larsson, 2015). I studier där fiskar exponerats för låga doser av flera östrogena ämnen samtidigt har den totala effekten kunnat förutses genom addition av effekterna från varje enskilt ämne (Brian *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2014). Vid blandningar med högre doser av olika östrogener blev den verkliga totaleffekten lägre än de adderade effekterna hos de enskilda ämnena. Det kan möjligen bero på att östrogenreceptorerna blivit mättade (Song *et al.*, 2014). Även då koncentrationerna av varje enskilt ämne är för låga för att inducera vitellogeninsyntes på fisk separat kan de i samma doser ge effekt i en blandning. Alla östrogena ämnen bidrar additivt till den totala östrogena effekten, vilket tyder på att östrogena ämnen påverkar fiskkroppen via gemensamma mekanismer (Brian *et al.*, 2005).

Påverkan på populations- och ekosystemnivå

De fysiologiska effekterna av östrogenexponering på hanfisk kan leda till reproduktionsstörningar. Det har visats på vildfångad mört där resultaten visade att hanar som utvecklade intersex hade sämre spermiekvalitet och spermieproduktion jämfört med normalt utvecklade hanar (Jobling *et al.*, 2002). Ju allvarligare grad av intersex desto lägre spermiedensitet uppmättes i hanarnas mjölke. Hanar med intersex uppvisade sämre spermieaktivitet, både med avseende på andel motila spermier och spermiernas simhastighet. Både påverkan på spermiedensitet och motilitet kan vara bidragande orsaker till den försämrade reproduktionsförmågan hos hanfiskar med intersex. Andra resultat av studien var att lägre andel hanar i klasserna måttlig till allvarlig grad intersex kunde släppa ut mjölke jämfört med hanar med ingen eller låg grad intersex, och spermiernas förmåga att befrukta ägg försämrades hos hanar med intersex. Det sågs även att hanar med intersex kunde släppa ut mjölke producerade mindre volymer jämfört med hanar utan intersex (Jobling *et al.*, 2002). Hanfiskar av många arter släpper ut så få spermier som möjligt eftersom spermieproduktion kostar energi. Om det är konkurrens av flera hanar på samma hona kan hanarna maximera den totala andelen lyckade befruktningar genom att dela upp sina spermier över flera befruktningstillfällen, eller genom att lägga mer energi på att försvara honan från konkurrenter och mindre energi på spermieproduktion (Warner, 1997). En spermiesparande strategi kan vara problematisk om hanar utvecklar intersex (Jobling *et al.*, 2002).

Östrogena effekter på en art kan förändra balansen mellan arter på ekosystemnivå både via direkta och indirekta effekter. Effekten av EE2 på ekosystemet i en sjö har studerats i en långtidsstudie i Kanada där en hel sjö ingick i experimentet och resultaten jämfördes med liknande kontrollsjöar i samma område. Av studien framgick att EE2 påverkade knölskallelöja (*Pimephales promelas*) och andra små fiskarter i sjön med direkta effekter som förhöjt uttryck av vitellogenin, störning i gonadutveckling och intersex som i sin tur lett till reproduktionsstörningar. På fyra år försvann 99% av knölskallelöjpopulationens biomassa och arten blev nästintill odetekterbar. Populationerna av fiskarterna pearl dace (*Margariscus margarita*) och slimy sculpin (*Cottus cognatus*) minskade också i testsjön och detta kan vara direkta effekter av EE2. Pearl dace uppvisade förhöjda halter vitellogenin och störningar i gonadutvecklingen men artens biomassa minskade stadigt i både testsjön och referenssjön. Populationen av slimy sculpin minskade kraftigt och den minskningen sågs inte i referenssjön, däremot testades inte vitellogeninhalt och gonadutvecklingen på den fiskarten (Kidd *et al.*, 2014).

EE2 i de koncentrationerna som uppnåddes i sjön hade ingen toxikologisk effekt på populationer av bakterier, växtplankton, djurplankton, *Chaoborus* (ett släkte tofsmyggor) eller kustlevande ryggradslösa djur. *Chaoborus*, hjuldjur (*Rotifera*), kustlevande ryggradslösa djur och vissa arter av djurplankton ökade i antal vilket kan vara en indirekt effekt av minskningen bland småfiskarter. Både *Chaoborus* och djurplankton är viktiga byten för knölskallelöja och pearl dace. När de fiskarterna minskar i antal minskar också predationen på deras bytesdjur som då kan öka i antal. En annan art som främst påverkades indirekt av EE2 var den större fiskarten kanadaröding (*Salvelinus namaycush*). Inga störningar i gonadutvecklingen sågs och induktion av vitellogenin i honor var låg vilket tyder på att arten inte fick reproduktionsstörningar av EE2. Trots det minskade populationen. Minskningen var troligen en indirekt effekt av minskad mängd bytesfisk då knölskallelöja och slimy sculpin är viktiga byten för kanadaröding (Kidd *et al.*, 2014).

DISKUSSION

När effekterna av östrogenpåverkan på fisk mäts används ofta vitellogenin, men ibland koriogenin, som markörer för hur mycket östrogena ämnen det finns i vattnet. Då vitellogenin och koriogenin normalt ska finnas i väldigt låga halter i hanfisk och ungfisk (Rani *et al.*, 2010) tyder höga koncentrationer av dessa ämnen på att exogena östrogena ämnen tagits upp i fisken. Eftersom vitellogenin tillslut degraderas i levern kommer de östrogena effekterna på vitellogeninhalten i blodet vara övergående. Vitellogenin i blodet på fiskar utöver honor i fertilt stadie av livscykeln är därför en effekt som tyder på att exponeringen för östrogena ämnen skett relativt nyligen. Intersex och andra störningar i gonadutvecklingen på hanfisk är en effekt som tar längre tid att uppnå. Det kan uppkomma antingen ifrån en längre tids exponering (Jobling *et al.*, 2006) eller ifrån exponering under de tidiga utvecklingsstadierna (Porseryd *et al.*, 2019) och effekten visar sig först fullt ut i vuxen ålder. Intersex och störningar i gonadutvecklingen är därmed en effekt som uppkommer relativt lång tid efter exponering. Genom att studera både intersex och cirkulerande koncentration vitellogenin kan rimligtvis ungefärliga slutsatser dras kring när fisken exponerades och eventuellt även kring durationen av exponeringen.

Det har framkommit under litteraturstudien att det finns skillnader i effekter av östrogenpåverkan mellan olika fiskarter, vilket är föga förvånande med tanke på den stora variationen i utseende, storlek och levnadsmiljö hos fiskar av olika arter. De största skillnaderna verkar vara på ångestbeteende hos fiskar exponerade för EE2. Guppyhanar som exponerades visade ökat ångestbeteende, medan storspiggarna av båda könen uppvisade mindre ångestbeteenden efter exponering. Artskillnader kan vara en förklaring till de olika resultaten, men det skulle också kunna bero på när i fiskarnas liv exponeringen skett. Guppyhanarna exponerades i tre veckor som vuxna medan storspiggarna exponerades från tidpunkten då äggen befruktades fram till sju veckor efter kläckning. Resultaten skulle möjligen kunna tyda på att tidig exponering för EE2 ger mindre rädsla för nya miljöer och en exponering i vuxen ålder det motsatta, men det är endast egna spekulationer och fler studier på olika fiskarter skulle behövas för att kunna dra en tydlig slutsats.

Östrogena ämnen i miljön kan påverka fiskars reproduktion negativt genom att påverka bland annat gonadutveckling och spermie kvalitet hos hanfiskar. Eftersom hanar av flertalet fiskarter generellt släpper ut minsta nödvändiga mängd spermier för att lyckas med befruktning kan en försämrad spermie kvalitet hos hanar med intersex leda till problem som minskad andel lyckade befruktningar (Jobling *et al.*, 2002). Spermier från mörtar med intersex uppvisade sämre motilitet jämfört med histologiskt normala hanar. Konsekvenserna av försämrad spermie motilitet kan vara allvarigare under naturliga förhållanden än det uppvisades i laboratoriemiljön. Under naturliga betingelser parar sig mört i stim vilket leder till en spermie konkurrens mellan hanar där de med snabbast simmande spermier kommer befrukta honornas ägg i större utsträckning vilket är en nackdel för hanar med intersex (Jobling *et al.*, 2002). Om en del av hanarna i en population utvecklar intersex riskerar deras spermier konkurreras ut av histologiskt normala hanar och i mina ögon finns därmed en risk för en minskning av det genetiska urvalet hos mört som inte skulle uppkommit utan mänsklig påverkan via utflöden från reningsverk och industriellt vattenavflöde.

Om reproduktionen hos en art påverkas kan det ge effekter även på andra arter. En försämrad fertilitet inom en art kan få till följd att populationen minskar i det östrogendrabbade området. Konsekvenserna av en populationsminskning kan ge effekter på ekosystemnivå, men då ekosystem är mycket komplexa är det svårt att förutspå vilka effekter som kan uppkomma och mer forskning på detta behövs. Det ska tilläggas att komplexiteten i att studera ett helt ekosystem gör studier svårupbyggda.

Vissa koncentrationer som använts i de lästa studierna har varit högre än de som normalt uppmäts, åtminstone i Sverige. De effekter som redovisats i dessa studier ska därför inte förväntas hittas i vildfångade fiskar där exponeringen är lägre. Däremot är studierna bra för att påvisa vad hos fiskar som kan påverkas av exogena östrogener. Det finns sannolikt platser i världen där höga koncentrationer östrogena ämnen kan uppmätas och resultaten av studierna med höga koncentrationer skulle kunna användas för att förutspå de förväntade effekterna hos fisk på sådana högexponerade platser.

Ytterligare en faktor att ha i åtanke är de additiva effekterna. Även om östrogena ämnen i det rena avloppsvattnet uppmäts till koncentrationer låga nog att inte ge ett fysiologiskt svar kan flera ämnen i låg koncentration samverka och gemensamt ge effekt (Brian *et al.*, 2005). Det är

viktigt att beakta vid riskbedömningar av produkter innehållande östrogena ämnen eller nedbrytningsprodukter som riskerar att hamna i vattenmiljön. Additiva effekter är också bra att ha i åtanke vid studier av östrogenpåverkan på vildfångad fisk exponerade för renat avloppsvatten. Det är viktigt att inte koppla ihop koncentrationen av endast ett östrogen ämne med de fysiologiska effekterna, eftersom det sannolikt finns ett flertal östrogena ämnen i vattnet i en sådan situation som gemensamt kan ligga till grund för de fysiologiska effekterna.

Slutsats

Det finns tydliga bevis på att östrogena ämnen påverkar fiskars fysiologi. Den kanske allvarligaste effekten är påverkan på gonadutvecklingen och spermiekvaliteten då detta kan ge negativa konsekvenser för fertiliteten hos hanar. En effekt av nedsatt fertilitet är populationsminskning och det finns risk att flera arter i ekosystemet påverkas om en art minskar i antal, men de totala konsekvenserna på ekosystemnivå är komplexa och svåra att förutspå. Även påverkan på könsfördelningen i populationer har setts, då fiskar exponerade för exogena östrogen i större grad blev fenotypiska honor. Vitellogeninhalten i blodet ökar på exponerade hanar, det är inte en fysiologiskt normal förekomst och anses därför som en bra indikator på att östrogena ämnen funnits i fiskens vattenmiljö relativt nyligen. Slutligen har påverkan på fiskars ångestbeteenden påvisats men exakt vilken effekt som kan förväntas av exponering är svårt att säga av resultaten som tagits upp i denna studie. Klart är åtminstone att östrogena ämnen i vattenmiljön kan påverka fisk på flera sätt. Även om koncentrationerna generellt är ganska låga i Sverige så finns risk för effekter på fisk och den additiva effekten bör hållas i åtanke.

LITTERATURFÖRTECKNING

- 1177 Vårdguiden. *Läkemedel och miljö*. (2017-04-04). Available from: <https://www.1177.se/Fakta-och-rad/Rad-om-lakemedel/Lakemedel-och-miljo/>. [Accessed 2019-03-11].
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A. & Sumpter, J.P. (2005). Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, vol. 113 (6), s. 721.
- Brown, R. Birth control is giving rise to transgender fish. (2017-07-03) (New York Post). Available from: <https://nypost.com/2017/07/03/birth-control-pills-are-turning-male-fish-into-females/>. [Accessed 2019-03-07].
- Cui, J., Shen, Y. & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, vol. 19 (3), ss. 197–209.
- El-Sayed Ali, T., Abdel-Aziz, S.H., El-Sayed, A.-F.M. & Zeid, S. (2014). Structural and functional effects of early exposure to 4-nonylphenol on gonadal development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): a-histological alterations in ovaries. *Fish Physiology and Biochemistry; Dordrecht*, vol. 40 (5), ss. 1495–507.
- Geraudie, P., Gerbron, M., Hill, E. & Minier, C. (2010). Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site. *Fish Physiology and Biochemistry; Dordrecht*, vol. 36 (3), ss. 767–77.
- Hallgren, S., Volkova, K., Reyhanian, N., Olsén, K.H. & Porsch Hällström, I. (2011). Anxiogenic behaviour induced by 17[alpha]-ethynylestradiol in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Fish Physiology and Biochemistry; Dordrecht*, vol. 37 (4), ss. 911–8.
- Iwanowicz, L.R., Pinkney, A.E., Guy, C.P., Major, A.M., Munney, K., Blazer, V.S., Alvarez, D.A., Walsh, H.L., Sperry, A., Braham, R., Sanders, L.R. & Smith, D.R. (2019). Temporal evaluation of estrogenic endocrine disruption markers in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) reveals seasonal variability in intersex. *Science of The Total Environment*, vol. 646, ss. 245–256.
- Jamieson, S. (2017). Fish becoming transgender from contraceptive pill chemicals being flushed down household drains. *The Telegraph*. Available from: <https://www.telegraph.co.uk/news/2017/07/02/fish-becoming-transgender-contraceptive-pill-chemicals-flushed/>. [Accessed 2019-03-07].
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (2002). Wild Intersex Roach (*Rutilus rutilus*) Have Reduced Fertility. *Biology of Reproduction*, vol. 67 (2), ss. 515–524.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E. & Brighty, G. (2006). Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environmental Health Perspectives*, vol. 114 (Suppl 1), ss. 32–39.
- Kemikalieinspektionen. *Kort om Bisfenol A*. (2019). Available from: <https://www.kemi.se/privatpersoner/kemiska-amnen/bisfenol-a>. [Accessed 2019-03-08].
- Kidd, K.A., Paterson, M.J., Rennie, M.D., Podemski, C.L., Findlay, D.L., Blanchfield, P.J. & Liber Karsten (2014). Direct and indirect responses of a freshwater food web to a potent synthetic oestrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369 (1656), s. 20130578.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E. & Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, vol. 45 (2), ss. 91–97.
- LIF. *Läkemedel och miljö*. (2019). Available from: <https://www.lif.se/grundfakta/lakemedel-och-miljo/>. [Accessed 2019-03-11].
- Löf, L. & Larsson, J. *Läkemedel i miljön | Läkemedelsboken*. (2015). Available from: https://lakemedelsboken.se/kapitel/lakemedelsanvandning/lakemedel_i_miljon.html. [Accessed 2019-02-19].
- Mommsen, T.P. & Walsh, P.J. (1988). 5 Vitellogenesis and Oocyte Assembly. I: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (red) *Fish Physiology*. Academic Press, ss. 347–406.
- Owen, R. & Jobling, S. (2012). Environmental science: The hidden costs of flexible fertility. *Nature*, vol. 485, s. 441.

- Porseryd, T., Larsson, J., Kellner, M., Bollner, T., Dinnétz, P. & Porsch Hällström, I. (2019). Altered non-reproductive behavior and feminization caused by developmental exposure to 17 α -ethinylestradiol persist to adulthood in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology*, vol. 207, ss. 142–152.
- Rani, K.V., Sehgal, N., Goswami, S.V. & Prakash, O. (2010). Relative potencies of natural estrogens on vitellogenin and choriogenin levels in the Indian freshwater spotted snakehead, *Channa punctata*: in vivo and in vitro studies. *Fish Physiology and Biochemistry; Dordrecht*, vol. 36 (3), ss. 587–95.
- Region Uppsala. *Miljö och läkemedel*. (2018-11-07). Available from: http://www.lul.se/sv/Extranat/For_vardgivare/Lakemedelskommitten/Lakemedel-och-miljo/. [Accessed 2019-03-11].
- Słomczyńska, M. (2008). Xenoestrogens: mechanisms of action and some detection studies. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 11 (3), ss. 263–269.
- Song, W.T., Wang, Z.J. & Liu, H.C. (2014). Effects of individual and binary mixtures of estrogens on male goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiology and Biochemistry; Dordrecht*, vol. 40 (6), ss. 1927–35.
- Strauss, J.F. & Barbieri, R.L. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management (Expert Consult - Online and Print)*. (2013-09-13) (Google Books). Available from: https://books.google.se/books?id=KZ95AAAAQBAJ&pg=PA256&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. [Accessed 2019-03-10].
- Warner, R.R. (1997). Sperm Allocation in Coral Reef Fishes. *BioScience*, vol. 47 (9), ss. 561–564.