

Fisk på p-piller

Påvirkning med østrogene stoffer forstyrrer hormonbalancen hos fisk.

Forskere sætter fokus på, hvorvidt det aktive hormon i p-piller påvirker hanfisks evne til at formere sig.

Af Katrine B. Hansen, Mia G.G. Larsen og Erik Baatrup

■ Hunlige kønshormoner – østrogener – medvirker til at regulere kønsudviklingen og forplantningsevnen hos alle hvirveldyr. Men når østrogener findes i for høje koncentrationer i miljøet kan det forskyde den normale hormonbalance. Hos hanfisk har man således observeret nedsat sædtal, misdannede kønsorganer, hunligt udseende og manglede parringsadfærd, efter at de er blevet udsat for østrogener.

Både naturlige og syntetiske østrogener udledes til miljøet. De naturlige østrogener stammer især fra mennesker og husdyr. Kvinder udskiller omkring 2-12 mikrogram af det primære hunlige kønshormon E2 (17 β -østradiol) med urinen om dagen, gravide kvinder hele 257 mikrogram og mænd kun 1-2 mikrogram E2 om dagen (1 mikrogram = 1 milliontedel af et gram). Der er dog begrænset skadevirkning af disse bidrag, eftersom urinen fra mennesker passerer rensningsanlæg, hvor størstedelen af østrogenene nedbrydes (se boks 1). Anderledes forholder det sig med gyllen fra husdyrene, der spredes på markerne og således afledes direkte til vandmiljøet. I et landbrugsland som Danmark



Foto: Per G. Henningsen

Figur 1. Zebrafisken (*Danio rerio*) er af de fleste kendt som en akvariefisk. I forskningsverden er zebrafisken en yndet modelorganisme i Europa, når giftige stoffer undersøges. Den nederste fisk på billedet med rødlig gatfinne, slankt udseende og uden æglægningpapir er en han, mens den midterste fisk med en svagt farvet gatfinne, rundere bug og synlig æglægningpapir er en hun.

er udledningen af østrogen fra landbruget højt på grund af det store antal køer og grise. Virkningen i vandmiljøet regnes dog for begrænset, eftersom E2 i naturen nedbrydes i løbet af timer til få dage. Langt den største skadevirkning på naturens dyreliv skyldes derimod syntetiske østrogen (kaldet xeno-østrogen, da xenos = fremmed)

Problemet er syntetiske østrogen

I utallige dagligvareprodukter så som kosmetik, maling og emballage, optræder kemiske stoffer, som udover deres tilsigtede egenskaber også har østrogen effekt. Mange husker sikkert debatten omkring brugen af phthalater i babylegetøj. Selvom disse blødgøringsmidler til plast kun er svagt østrogene, anvendes de i så store mængder, at de kan udgøre en trussel for dyr og mennesker. Heldigvis er det i dag forbudt at anvende phthalater i legetøj til børn under fire år. Et andet eksempel er brugen af parabener som konserveringsmiddel i kosmetik og fødevarer. Også denne stofgruppe besidder svag østrogen aktivitet, og er blandt andet mistænkt for at kunne skade kønsudviklingen hos især drengefostre. Også plast, der beklæder indersiden af konserverdåser, og brandhæmmende komponenter i computeren på børneværelset, rummer østrogene stoffer.

Modsat de nævnte stoffer, der alle besidder en utilsigtet og uønsket østrogen effekt, har industrien også bevidst fremstillet stoffer, der efterligner kroppens naturlige østrogen. Eksempelvis anvendes det syntetiske østrogen zeranol som vækstfremmer i kvægopdrættet i USA. I Danmark er zeranol på listen over forbudte stoffer, idet zeranolrester kan forekomme i kødet. Ligeledes er det aktive hormon i p-piller kaldet EE2 (17α-ethinyløstradiol) et syntetisk østrogen. Kvinder, der bruger p-piller, udskiller omkring 35 mikrogram EE2 om dagen med urinen. I lande med vel fungerende rensningsanlæg, der

Nedbrydning af østrogen (boks 1)

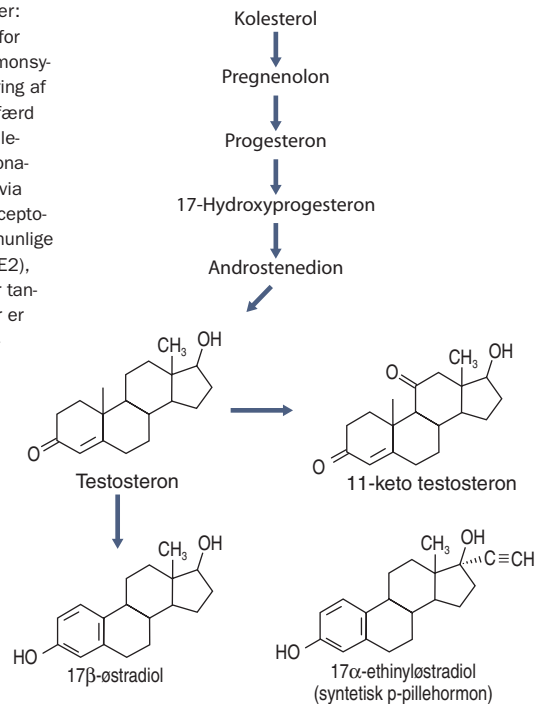
Både det naturlige østrogen E2 (17β-østradiol) og det syntetiske p-pille østrogen EE2 (17α-ethinyløstradiol) hører til steroiderne, der er svært opløselige i vand. Begge stoffer udskilles i en form, hvor der er påhæftet et molekyle, eksempelvis glycoronsyre eller sulfat, der letter transporten over membraner og øger vandopløseligheden og dermed udskillelsen gennem nyrerne. I denne

form er steroiderne hormonelt inaktive, men i renseanlægget kan det påhæftede molekyle fraspaltes af bakterier, hvorved hormonet genvinder aktiviteten. E2 nedbrydes dog hurtigt (1-2 dage) og mister således det meste af sin aktivitet, inden det når ud i vandløbet. Det aktive EE2 har derimod en levetid på flere uger og kan dermed nå at blive optaget i vandløbets dyr.

Kønshormoner: Funktion og syntese (boks 2)

Hvirveldyr har to interne kommunikationssystemer: nerve- og hormonsystemet. Nervesystemet står for den hurtige og kortsigtede regulering, mens hormonsystemet anvendes til den længerevarende regulering af kroppens funktioner såsom udvikling, vækst, adfærd og forplantning. Kønshormoner dannes ud fra kolesterol og produktionen foregår i kønskirtlerne (gonaderne). Hormoner er kemiske signalstoffer, som via blodbanen transporteres til specifikke hormonreceptorer, hvor de udøver deres virkning. Det primære hunnlige kønshormon hos hvirveldyrene er 17β-østradiol (E2), mens det hanlige er testosteron (se figur). Det er tankevækkende, at disse to primære kønshormoner er fælles for alle hvirveldyr, og signalsystemet således er mere end 500 millioner år gammelt.

Hos de fleste fiskearter er 11-ketotestosteron (se figur) dog det dominerende hanlige kønshormon, mens E2 er det dominerende kønshormon i hunnfisk. Begge kønshormoner dannes ud fra androgenet (hanligt kønshormon) testosteron og begge kønshormoner indgår i hormonalancen hos de to køn. Af figuren ses det også, at det syntetiske p-pillehormon EE2's (17α-ethinyløstradiol) stregformel næsten er identisk med E2. Det er derfor ikke så underligt, at EE2 efterligner E2's virkemekanisme.



tilbageholder de fleste af industriens xeno-østrogen, regnes p-pillehormonet som en af de væsentligste bidragydere til østrogenaktiviteten i de ferske vande (se boks 1). I Danmark er der målt koncentrationer på op til 5 nanogram EE2 pr liter i de ferske vande. I andre lande i Europa er der målt op til 15 nanogram EE2 pr liter og i amerikanske spildevandsbelastede floder har man målt helt op til 800 nanogram EE2 pr liter (1 nanogram = 1 milliardtedel af et gram).

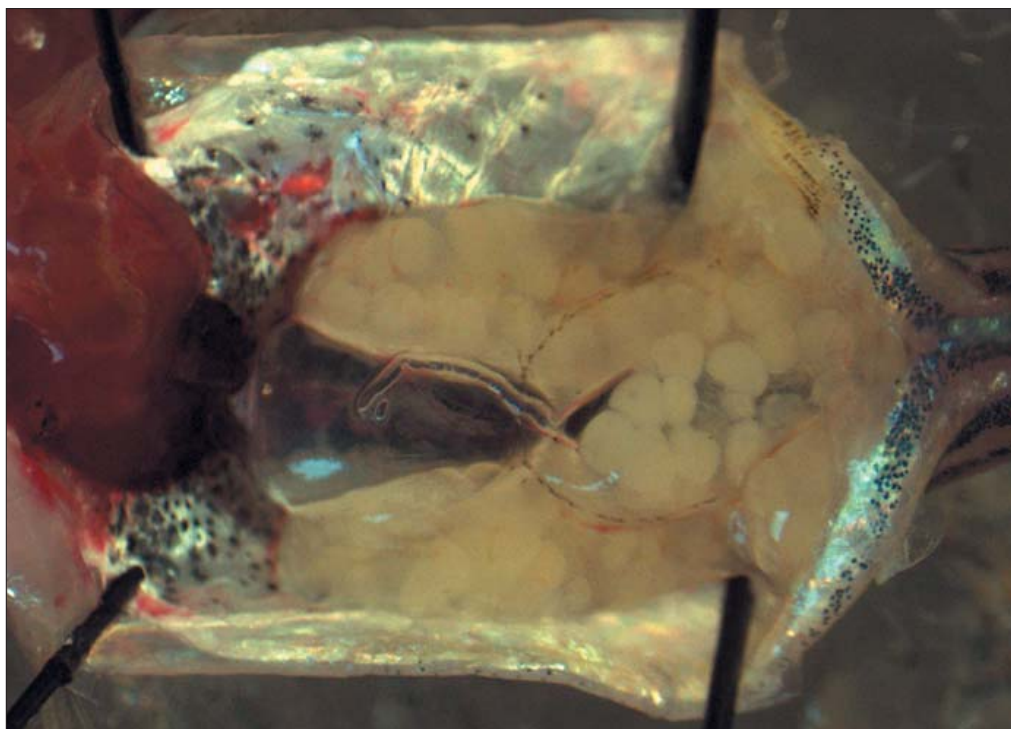
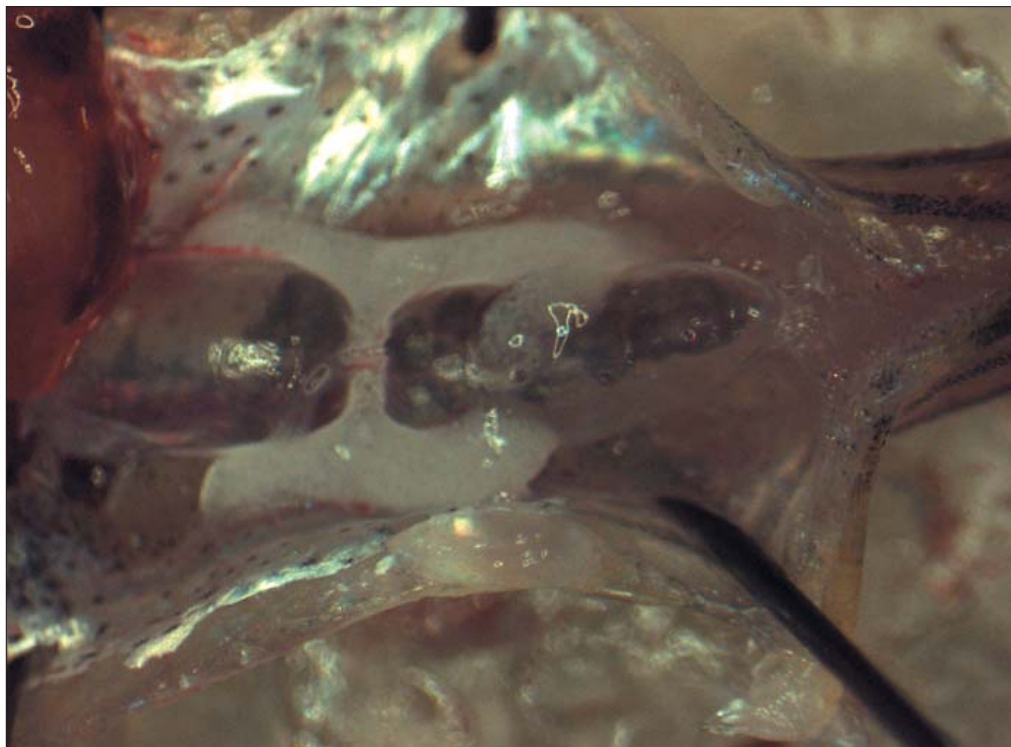
Brugen af østrogene stoffer i dagens forbrugssamfund er altså mangfoldig og udledning til naturen er uundgåelig. Mange østrogen er ender ultimativt i

vandmiljøet, hvor de kan forstyrre hormonbalancen hos fisk. Adskillige danske og udenlandske undersøgelser har søgt at afdække disse skadelige effekter på fiskebestande.

Hanfisk med læbestift og høje hæle

I de sidste 10 år er der fundet flere hanfisk med hunnlige karaktertræk i ær og floder herhjemme og i udlandet. Ligesom hos andre hvirveldyr styres kønsudviklingen og forplantningen hos fisk af kønshormonerne. Udviklingen af kønskaraktererne bestemmes af balancen mellem hanlige (androgene) og hunnlige (østrogene) hormoner (se boks 2). Ubalance i

denne fordeling kan medføre forstyrrelser i kønsudviklingen og reproduktionen. Udefrakommende østrogen kan ligeledes forskyde balancen og derved fremprovokere processer i hanfisk, der normalt kun finder sted i hunnfisk. Når hanner udsættes for østrogene kemikalier stimuleres reaktioner, der normalt er undertrykt i fisken. Et tegn på forurening med østrogen kan eksempelvis være en skæv kønsfordeling, hvor en fiskepopulation næsten udelukkende består af hunner. Da hanner genetisk besidder evnen til at producere æg, kan øgede koncentrationer af østrogen også indvirke på dannelsen af kønsceller, således at hanfisk begynder at danne



Fotos: Katrine B. Hansen

Figur 2. Efter bugen er åbnet og maven og tarmen er fjernet, ses kønskirtlerne (gonaderne) tydeligt. På det øverste billede ses testes (testikler) hos en hanzebrafisk og på nederste billede ses ovariet hos en hunzebrafisk med runde hvide æg.

æg mellem sædcellerne. Dette fænomen kaldes intersex og er en abnorm form for tvekhønethed. I særlige tilfælde udvikler hannerne også æggeleder. Et andet tegn på, at fisken lever i et østrogenholdigt vandmiljø, er tilstedeværelsen af blomme-

proteinet vitellogenin i blodet hos hanfisk og unge ikke kønsmodne fisk. Blommeprotein dannes normalt i leveren hos hunner, hvorfra det transporteres til æggene som ernæring for de nyudklækkede fiskelarver. En meget anvendt undersøgelses-

metode til påvisning af forurening med østrogene kemikalier er netop at søge efter blommeprotein i hanfisk.

At nogle hanfisk svømmer rundt med feminine træk kan til nød accepteres, men det er langt alvorligere, når fiskenes

evne til at forplante sig påvirkes. Vi har i en undersøgelse af zebrafisk vist, at p-pillehormonet EE2 påvirker hanners kønskarakter og reproduktion. Zebrafisken (*Danio rerio*) er en meget anvendt modelorganisme i økotoxikologiske studier, idet den udmærker sig ved at formere sig året rundt under de rette betingelser, og ved at have en parringsadfærd, som let lader sig kvantificere.

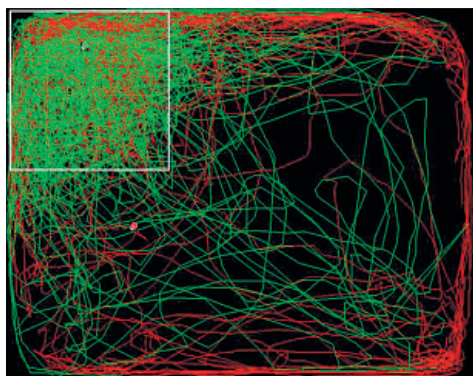
Skæv kønsfordeling

I eksperimenterne på Aarhus Universitet behandlede vi zebrafisk fra ægstadiet til kønsmodenhed med EE2. Vi udsatte zebrafiskene for koncentrationer på 0,05; 0,50 og 5,00 nanogram EE2 pr liter vand, hvilket svarer til de koncentrationer, som man kan finde i miljøet. Resultaterne af forsøgene viste, at allerede ved udsættelse for 0,05 nanogram EE2 pr liter fik hannerne et hunligt udseende, således at de udviklede hunlig farve og æglægningpapil (et organ ved gattet, hvorfra hunfisk gyder sine æg til omgivelserne). Farveændringen vil potentielt kunne indvirke negativt på hannerne evne til at tiltrække hunner under parringslegen, idet hanlig farve tiltrækker hunnens opmærksomhed. Udviklingen af en æglægningpapil hos hanner kunne være en velegnet indikator for forurening med østrogener som eksempelvis EE2.

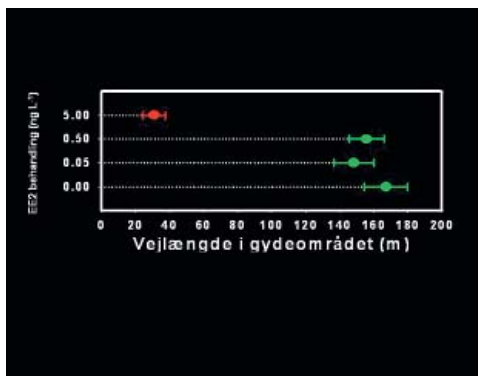
Udover de nævnte ændringer fik gruppen af hanner, der blev udsat for 5,00 nanogram EE2 pr liter, en rundere mere hunlig facon og vejede betydeligt mere end hanner, der ikke havde været udsat for EE2. Alt sammen er tegn på, at EE2 kan feminisere hanfisk.

Undersøgelser af zebrafiskenes kønskirtler (gonader) viste endvidere, at behandlingen med de to højeste EE2-koncentrationer resulterede i en skæv kønsfordeling med overvægt af hunner. Efter behandlingen med 5,00 nanogram EE2 pr liter blev kun seks fisk ud af 113 fisk bestemt som hanner mod normalt 60% hanner. Derimod viste de EE2-behandlede hanner ingen tegn på den abnorme form for tve-

Hannens parringsadfærd hos zebrafisk



Figur 3a: Svømmemønstre fra en han- og hunzebrafisk i 10 minutter af de 45 minutter målingerne varede.



Figur 3b: Hanzebrafisks svømmede distance i gydeområdet i løbet af de 45 minutter.

Ved hjælp af det computerstyrede sporingsprogram *Motio* kan man følge en fisks bevægelsesmønstre i et akvarium. Ud fra disse bevægelsesmønstre er det muligt at kvantificere parringsadfærd hos hanner af zebrafisk. Hanzebrafisk udviser forskellige typer af parringsadfærd. En del af adfærd er karakteristisk ved, at hannen lokker hunnen hen over et gydeområde, hvor æggene bliver beskyttet mellem småsten. I vores forsøg med p-pillehormo-

net EE2 udgjorde en bakke med glaskugler placeret i akvariets øverste venstre hjørne gydeområdet. På figur 3a repræsenterer den grønne streg hanfiskens svømmemønstre i en periode på 10 minutter, mens den røde repræsenterer hunnens. Det ses, at hannen har tilbragt meget tid over gydeområdet og forsøgt at lokke hunnen derhen, hvilket blev fastslået ved at optælle antallet af gange, hannen svømmede mellem hunnen og gydeområdet.

Figur 3b viser hannernes gennemsnitlige svømmede distance i gydeområdet, hvilket er et udtryk for hannernes parringsaktivitet. Jo længere vejlængde hannen har svømmet i gydeområdet, desto mere udtalt parringsadfærd. Den røde farve symboliserer værdier, der er statistisk signifikant forskellig fra referencegrupperne. I referencegrupperne har fiskene ikke været udsat for østrogen og udtrykker dermed hannernes normale parringsadfærd.

kønnethed intersex, da kønskirtlerne blev undersøgt i mikroskopet. At der observeres intersex hos flere andre fiskearter efter eksponering for EE2, men ikke hos zebrafisk, skyldes sandsynligvis forskelle i arternes kønsudvikling. Gatfinnen hos flere af de EE2-behandlede hunner var stor og rødlig. Normalt er hunnernes gatfinne lille og bleg, mens hannernes er stor og rødlig. Dette er yderligere et indicium på, at flere af hunnerne er stærkt feminiserede hanner.

Det østrogene stof i p-piller påvirker altså udviklingen af zebrafiskens køn, når det optages under kønsudviklingen. Hvis en population ikke producerer hanner, vil det naturligvis påvirke antallet af afkom og dermed true bestandens overlevelse.

Ændring af parringsadfærd

Ud over fordelingen af hanner og hunner i populationen afhænger den reproduktive suc-

ces hos zebrafisk også af evnen til at udføre korrekt parringsadfærd. Ændringer i parringsadfærd kan potentielt påvirke forplantningen og derved populationsdynamikken. Hunnerne hos zebrafisk gyder kun, hvis de kurtiseres af en han.

Vi undersøgte hannernes evne til at udøve parringsadfærd ved at sammenligne parringsadfærd i grupper af hanfisk, der havde været udsat for EE2 under opvæksten, med grupper, der ikke havde fået denne behandling. I hvert eksperiment blev en hanzebrafisk sat sammen med en ubehandlet hunfisk i et akvarium, hvorefter parringsadfærd blev målt automatisk med et digitalt video-sporingsystem (se boks 3). Resultaterne viste, at hannernes evne til at udføre parringsadfærd var intakt efter behandling med de to laveste EE2-koncentrationer, mens hannerne fra gruppen, der

havde været udsat for 5,00 nanogram EE2 pr liter, ikke udførte parringsadfærd og dermed var ude af stand til at få hunnerne til at gyde.

Undersøgelserne viser samlet, at de koncentrationer af EE2, man finder i de danske ferske vande er i stand til at feminisere hanzebrafisk i en sådan grad, at forplantningsevnen er stærkt nedsat. Tidligere undersøgelser har vist, at netop zebrafisken er særdeles følsom overfor østrogene påvirkninger, men det kan ikke udelukkes, at p-pille østrogen også kan påvirke vilde bestande af fisk i Danmark. Forskere ved Syddansk Universitet har dog i en stor landsdækkende undersøgelse heldigvis kunnet konstatere, at feminiserede hanfisk kun findes i et fåtal af vandløb. Flere steder i udlandet er kønsstyrrede fiskebestande dog langt mere udbredt. ■

Om forfatterne:



Katrine B. Hansen er ph.d.-studerende ved iNANO
e-mail:
katrine.hansen@biology.au.dk
Tlf. 8942 2646



Mia G.G. Larsen er ph.d.-studerende ved Biologisk Inst.
e-mail:
mia.larsen@biology.au.dk
Tlf. 8942 2646



Erik Baatrup er lektor ved Biologisk Institut.
e-mail:
erik.baatrup@biology.au.dk

Alle er tilknyttet
Afdelingen for Zoofysiologi,
C.F. Møllers allé, bygn. 1131
Biologisk Institut,
Aarhus Universitet

Videre læsning:

Bjerregaard, P. (2005). *Økotoksikologi*. Gyldendals boghandel, Nordisk Forlag A/S, København.

Christiansen, L.B. og Plesner, P. (2001) *Intersex og andre effekter på reproduktionssystemet i skalle og bækorrød – relationer til østrogen og østrogenlignende stoffer*. Århus Amts Trykkeri.

Jensen, C.B. og Paludan-Müller, P. (2000). *Økotoksikologi pesticider og østrogenlignende stoffer*. Nuclues-Foreningen af Danske Biologer Forlag, ApS.