



UPPSALA
UNIVERSITET

Utgör användning av p-piller ett hot mot livskraftiga grodpopulationer?

Etinylöstradiols och levonorgestrels effekter hos arterna *Xenopus leavis*, *Xenopus tropicalis* och *Rana temporaria*



Marianne Balck

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2013
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Innehållsförteckning

Sammandrag	1
Inledning	1
Minskande grodpopulationer	2
Etinylöstradiol	2
Levonorgestrel	3
Undersökta amfibier	4
<i>Modellorganismerna Xenopus leavis och Xenopus tropicalis</i>	4
<i>Rana temporaria</i>	5
Sammanställning av metoder	6
Resultat	7
Etinylestradiols påverkan på grodpopulationer	7
<i>Effekt på könskvot med honor i majoritet</i>	7
<i>Fertilitetspåverkan och sterilitet</i>	8
<i>Påverkan på metamorfos och vitellogenes</i>	9
Levonorgestrels påverkan på grodpopulationer	10
<i>Påverkan på äggledare och oogenes</i>	10
<i>Effekter på hormonuttryck</i>	11
<i>Parningsbeteende</i>	11
Diskussion	11
Slutsats	13
Tack	13
Referenser	14

Sammandrag

En eskalerande minskning hos grodpopulationer och grodarter har skett världen över sedan 1980. Minskningen har påverkats av flera faktorer, bland annat utsläpp av endokrina ämnen till vattendrag. Endokrina ämnen är naturliga och syntetiska hormoner och kemikalier som stör människors och djurs hormonsystem. Syntetiska hormoner finns i p-piller och andra preventivmedel och hormonerna släpps ut i vattendrag via urinen. Det har visats att grodor påverkas av de syntetiska hormonerna etinylestradiol och levonorgestrel som finns i p-piller. Den här litteraturstudien syftar till att undersöka vilka effekter de två hormonerna har på modellarterna *Xenopus laevis* och *Xenopus tropicalis* och på svenska grodarter såsom *Rana temporaria*. Effekterna är främst förändrad könskvot, med honor i majoritet, samt minskad fertilitet. Fertiliteten försämras genom missbildade könsorgan, genom att äggen mognar långsammare och honor kan bli sterila med avsaknad av äggledare. Hormonexponering kan leda till försenad metamorfos och det kan bli en högre mortalitet hos juvenila grodor. Även hormonuttryck kopplade till reproduktion och fertilitet kan påverkas av hormonexponering. Dock behövs mer forskning, särskilt i fält då mestadels experimentella studier gjorts hittills i laboratorier. Hormonutsläpp är en bidragande faktor till att sex av Sveriges åtta grodarter är rödlistade och i världen handlar det om tusentals arter. Även den så kallade cocktail effekten, det vill säga de effekter flera olika ämnen skapar tillsammans, bör undersökas närmare.

Inledning

Endokrinostörande ämnen kan vara naturliga hormoner, syntetiska hormoner eller kemikalier och det är ämnen som stör hormonsystemen i kroppen (WHO & UNEP 2012). Att det är högst aktuellt att undersöka hur dessa ämnen påverkar människor, djur och miljö bekräftas genom att det 2012 gjordes en grundlig rapport av världshälsoorganisationen och FN om det. Rapporten var ett resultat från ett 1,5 år långt samarbete mellan toxikologi- och neurologiexperter världen över. Ett välfungerande endokrint system är viktigt för att människor och djur ska kunna utvecklas och reproducera sig normalt. Enligt rapporten är endokrinostörande ämnen komplexa för att de finns överallt och de påverkar djurs och människors utveckling. Det finns minst 800 ämnen som misstänks interferera med endokrina receptorer eller hormonsyntes (WHO & UNEP 2012).

Syntetiska hormoner finns till exempel i preventivmedel och en del tas inte upp av kroppen utan utsöndras via urinen. Hormoner släpps även ut i miljön vid produktion, ofta från fabriker i Indien och Kina, och när oanvända piller slängs (Stenberg 2008). I Sverige har p-piller varit lagligt sedan 1964 då medicinalstyrelsen godkände det till försäljning. På den tiden var det mer hormoner i pillren än idag (Jönsson 2008). Uppskattningsvis använder 400 000 kvinnor p-piller i Sverige och i världen är siffran närmare 100 miljoner. Även andra hormonella preventivmedel används flitigt (Lindh 2011). Syntetiska hormoner som används i läkemedel har högre persistens än naturliga hormoner för att inte brytas ner för snabbt i kroppen. Det gör att de är svårnedbrytbara även i naturen (Larsson *et al.* 1999). Av dessa anledningar är det viktigt att undersöka vad hormoner och andra ämnen får för effekter på organismer som kommer i kontakt med dem, allt från plankton längst ner i näringskedjan till fiskar, kräldjur och däggdjur.

Hormoner ansamlas i vattendrag och i slam från reningsverk. Därigenom påverkas många vattenlevande organismer. Grodor är en bra modellorganism för endokrinologi då deras reproduktionsbeteende är stabilt och konsekvent (Moore 1983). Modellorganismer vid reproduktionsforskning hos grodor är vanligtvis två arter av afrikansk klogroda;

Xenopus leavis och *Xenopus tropicalis*. Ett par studier har även gjorts på *Rana temporaria*, vanlig groda, som vi har i Sverige och Europa (Bögi *et al.* 2003, Pettersson & Berg 2007).

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka hur hormonutsläpp från p-piller kan påverka livskraftiga grodpopulationer, med inriktning på hur de syntetiska hormonerna etinylöstradiol och levonorgestrel påverkar reproduktionen hos modellarterna västafrikansk klogroda (*Xenopus tropicalis*), afrikansk klogroda (*Xenopus laevis*) och den europeiska arten vanlig groda (*Rana temporaria*). Utifrån relevanta artiklar undersöks om hormoner kan utgöra ett hot mot svenska grodarter som *R. temporaria* och om även rödlistade arter i Sverige påverkas.

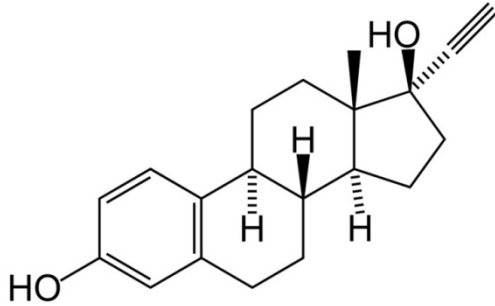
Minskande grodpopulationer

Amfibiepopulationer har globalt sett minskat i större utsträckning än fåglar och däggdjur sedan 1980 och många grodarter misstänks ha blivit utdöda sedan dess. Det är svårt att veta hur många grodarter som helt dött ut men det befaras vara över 100 arter de senaste decennierna (Stuart *et al.* 2004). Enligt Wake och Vredenburg (2008) kan detta vara en del av början på ett massutdöende som i så fall skulle vara det sjätte genom jordens historia. Det femte skedde för 65 miljoner år sedan då en asteroid utplånade dinosaurierna. Om inte annat kan minskningen hos amfibier ses som en varning på att miljön förstörs (Hayes *et al.* 2010). År 2004 fanns 1856 hotade amfibiearter på röda listan hos International Union for Conservation of Nature (IUCN) vilket är cirka en tredjedel av det totala artantalet. Nära hälften av dessa arter är hotade på grund av habitatfragmentering eller överexploatering (Stuart *et al.* 2004). Grodpopulationer hotas även av faktorer som svampsjukdomen chytridiomycosis, klimatförändringar och olika miljöföroreningar som hormoner (Stuart *et al.* 2004).

Under de senaste årtiondena har ett antal artiklar publicerats innehållande studier om hur grodor påverkas av hormonstörande ämnen. Många av dessa artiklar används i denna litteraturstudie. Det har visats att flera östrogena ämnen påverkar amfibier varav ett ämne är etinylöstradiol (EE₂), ett syntetiskt östrogen i preventivmedel. Det är även troligt att progestiner (syntetiska gulkroppshormon) påverkar amfibier, exempelvis levonorgestrel (LGN) som är vanligt förekommande i p-piller och akut-p-piller. Då laborativa studier gjorts till stor del på afrikanska grodarter är det mestadels dessa som studerats i detta arbete. Dock har det visats att endokrina störningar likväl sker på arter som *R. temporaria* (Rankouhi *et al.* 2005, Pettersson & Berg 2007). Därför har effekter på denna europeiska art också undersökts i detta arbete. Sex av åtta grodarter i Sverige är rödlistade och *R. temporaria* är inte en av dem (Jordbruksverket 2005), däremot är det den enda svenska art som studier om etinylöstradiols effekter utförts på.

Etinylöstradiol

Etinylöstradiol (EE₂, Figur 1) används främst i preventivmedel. Hormonet bryts ner till konjugater i levern och en del tas upp av kroppen (Ranney 1977). Det som inte tas upp utsöndras med urinen ut i våra vattendrag via reningsverken. Dagens p-piller innehåller 20-40 mg EE₂ per tablett (Landstinget i Uppsala län 2012). Med tanke på den stora p-pillerkonsumtionen i Sverige och världen släpps stora mängder hormoner ut i våra vattendrag. EE₂ är syntetiskt och degraderas långsammare än det naturliga östrogenet estradiol (E₂) vilket innebär att EE₂ har en högre persistens (Larsson *et al.* 1999). Exempelvis var halveringstiden i sjön Thames i Storbritannien 1,2 dagar för E₂ och 17 dagar för EE₂ (Jürgens *et al.* 2002). Enligt en studie gjord i Tyskland förekommer EE₂ i slam från reningsverk och bryts ned märkbart långsammare än E₂ (Ternes *et al.* 1999).



Figur 1. Strukturformel av det syntetiska hormonet etinylöstradiol (EE₂). Etinylgruppen skiljer formeln från estradiol och den gör EE₂ mer potent. Foto: Anonym, Wikimedia commons.

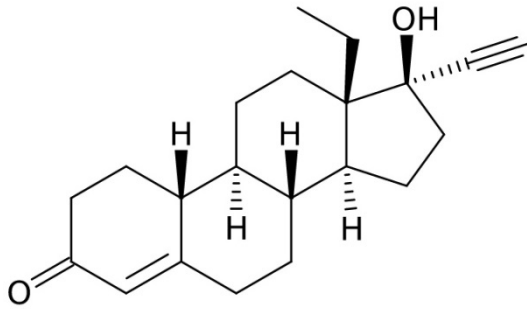
I Sverige finns små mängder EE₂ i renat avloppsvatten, ofta runt 0,004 nM men det förekommer högre halter (Larsson & Löf 2011). I Europa varierar halten EE₂ i renat vatten från reningsverk men uppemot 0,2 nM har mätts i Tyskland och England även om lägre koncentrationer som 0,002-0,006 nM är vanligare (Desbrow *et al.* 1998). Hur mycket EE₂ som renas bort av reningsverk är olika beroende på reningsmetod, det kan vara allt upp till 85% (Johnson & Sumpter 2001). Enligt en rapport från Naturvårdsverket (2008) är medelkoncentration i inkommande avloppsvatten till reningsverk i Sverige 0,027 nM och medel i utgående renat vatten 0,0067 nM (Ternes *et al.* 1999).

I amfibier utsöndras E₂ från gonaderna och har funktionen att stimulera produktionen av signalsubstansen dopamin (Browne 2008). Dopamin i sin tur blockerar hypofysens utsöndring av luteiniserande hormon (LH), oxytocin och prolaktin. Dessa tre hormoner stimulerar lek och andra parningsrelaterade beteenden (Browne 2008). Detta innebär att EE₂ som imitator av E₂ kan störa grodans naturliga hormoncykel och inhibera reproduktionen vid tillfällen då honan i sin naturliga hormoncykel ska leka och para sig.

Levonorgestrel

Under ägglossning hos människor släpper follikeln (äggblåsan) ett ägg från en av äggstockarna (Britannica online 2013a). Ägget omvandlas till en gulkropp som tillverkar progesteron (gulkroppshormon) för att göra livmodersslemhinnan redo att ta emot ett ägg (Britannica online 2013a). I p-piller finns syntetiskt progesteron, så kallat progestin, som istället inhiberar ägglossning. Levonorgestrel (LNG, Figur 2) är ett progestin som används i många p-piller, akut-p-piller, hormonspiraler och vid behandling av äggstockscancer (Britannica online 2013b). Hormonet orsakar i människan en negativ feedback i hypotalamus vilket hindrar utsöndring av hormonerna LH och FSH som stimulerar ägglossning. Levonorgestrel lurar kroppen att det redan producerat ett ägg och om ett ägg ändå fertiliserats förändras livmodersslemhinnan så att ägget inte kan fästa (Britannica online 2013b). Naturligt progesteron i grodor produceras i äggstockarna och det stimuleras av hormonerna LH och FSH (Browne 2008). Progesteronet leder då till mognad av oocyter genom upptag av fetter och äggulebildning, så kallad vitellogenesis (Browne 2008). Det är aktuellt inom forskning att ta reda på progestinernas effekter hos grodor.

Det finns få undersökningar om halter av LNG i miljön. Ett snitt nedströms ett antal svenska reningsverk är 0,003 nM (Fick *et al.* 2010). Koncentrationer om 0,02-0,035 nM LNG har uppmätts i Österrikiskt grundvatten och i ytvatten 0,01-0,02 nM (Vulliet *et al.* 2008). Nedströms ett reningsverk i Montreal, Canada, uppmättes i snitt 0,1 nM LNG (Vigilino *et al.* 2008).



Figur 2. Strukturformel av det syntetiska hormonet levonorgestrel. Foto: Anonym, Wikimedia commons.

Undersökta amfibier

Modellorganismerna *Xenopus laevis* och *Xenopus tropicalis*

Släktnamnet *Xenopus* är latin för ”lustig fot”, ett fysiskt sett karaktäristiskt namn för detta släkte. På 1930-talet upptäcktes att honor av arten *X. laevis* (Figur 3) fick ägglossning vid injektion av en gravid kvinnas urin (Gurdon *et al.* 2000). Det aktiva hormonet i urinen som satte igång ägglossningen var koriongonadotropin. Injektionen gjordes i den dorsala lymfsäcken på grodan och detta användes som graviditetstest på bland annat sjukhus under många år. Att honan lade ägg inom ett dygn efter urininjektion gjorde även arten attraktiv som studieobjekt då människan kunde reglera dess ägglossning och på så sätt få fram grodindivider till studier. *X. laevis* har därför studerats sedan dess och särskilt har det forskats kring reproduktion och fertilitet (Gurdon *et al.* 2000). Även *X. tropicalis* (Figur 4) lägger ägg kort efter injektion av koriongonadotropin och detta används för att få fram yngel i studier (Gyllenhammar *et al.* 2009).



Figur 3. Foto på *Xenopus laevis*.
Foto: Ben Rschr Wikimedia Commons.



Figur 4. Foto på *Xenopus tropicalis*.
Foto: Narbonne P, Simpson D, Gurdon J. Wikimedia Commons.

Fördelen med *X. laevis* som modellorganism är att den har stora oocyter, stora embryon och snabb embryonalutveckling (Xenbase 2013). Efter fertilisering tar det cirka tre dagar innan ägget utvecklats till ett grodyngel. Arten har använts till försök sedan början på 1900-talet och är väldokumenterad vilket är positivt. Däremot har arten 1-2 års generationstid vilket kan innebär lång väntan i studier och arten är tetraploid vilket är en nackdel inom exempelvis genetikforskning (Xenbase 2013). *X. tropicalis* har kortare generationstid och är den enda diploida arten inom *Xenopus*-släktet. Den är nära besläktad med *X. laevis* och oocyt-systemet är väldokumenterat då det är samma som hos systerarten (Säfholm *et al.* 2011). *X. tropicalis* har mindre storlek på oocyter och embryon än *X. laevis* vilket gör det svårare att injicera

substrat (Xenbase 2013). Dock visar en studie gjord 2009 att *X. tropicalis* är en lämplig modellorganism för att undersöka hur olika ämnen påverkar reproduktionen och andra endokrina störningar. Studien visade att effekten på arten liknade dem på andra amfibier, fiskar och däggdjur (Berg *et al.* 2009). Att båda arterna är vattenlevande genom hela livscykeln gör de passande att använda inom akvatisk toxikologi till skillnad från andra amfibiearter som lever både i vatten och på land (Säfholm *et al.* 2011).

Utvecklingen från oocyt till groda hos *X. laevis* består av Nieuwkoop och Fabers (NF) 66 utvecklingssteg som kartlagts i detalj i en bok (Tabell 1, Nieuwkoop & Faber 1967). Systemet är viktigt att utgå ifrån för att äggen och ynglen ska bli exponerade vid rätt tidpunkt i till exempel reproduktionsstudier. Samma stegsystem används även i studier gjorda på *X. tropicalis*.

Tabell 1. Nieuwkoop och Fabers utvecklingssteg för *Xenopus*-släktet

NF steg	Händelse
1	Nylagt ägg
2	Celldelning i ägget
25	Östrogena hormoner kan biotransformeras*
45	Yngel kläcks
52	Sexuell differentiering påbörjas
66	Fullständig metamorfos till juvenil

* biologiskt omvandlas eller metaboliseras

Rana temporaria

R. temporaria (vanlig groda, Figur 5) är väl utbredd i Sverige och Europa. Till skillnad från *Xenopus*-arterna lever den både i vatten och på land. Det har identifierats olika vägar i gonadutvecklingen hos arten (Pettersson & Berg 2007). En är att gonader innan metamorfos utvecklas till testiklar hos hanar eller äggstockar hos honor och den andra innebär att hanens gonader först går igenom en äggstockfas och sedan en intersexfas, med en blandning av hanliga och honliga gonader, för att sedan utvecklas vidare till testiklar. Denna ickesynkronisering kan ses som en nackdel för *R. temporaria* i studier där könskvot eller tid till metamorfos mäts (Pettersson & Berg 2007).



Figur 5. Vanlig groda, *Rana temporaria*. Foto: Annika Lydänge, med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren.

Utvecklingen från oocyt till metamorfos hos *R. temporaria* sker genom Gosners 46 utvecklingssteg (Tabell 2, Gosner 1960). Liksom systemet hos *Xenopus*-släktet används detta för att äggen och ynglen ska bli exponerade vid rätt tidpunkt i till exempel reproduktionsstudier.

Tabell 2. Gosners utvecklingssteg för *Rana temporaria*

Gosners steg	Händelse
1	Nylagt ägg
2	Celldelning i ägget
20	Ägget kläcks
46	Fullständig metamorfos

Etik

Vid planering av djurförsök skickas en ansökan till en djuretisk nämnd (Jordbruksverket 2013). Lagen säger att ansökan skall skickas in om försök planeras på levande däggdjur, fåglar, kräldjur, groddjur, fiskar och rundmunnar och det kostar 6000 kr att ansöka. För godkänd ansökan krävs att lidandet för djuren är mindre än försökets värde och det ska finnas goda skäl till användning av försök på djur (Jordbruksverket 2013).

Sammanställning av metoder

Ett 15-tal artiklar ligger till grund för denna litteraturstudies resultatdel som handlar om hur hormonerna EE₂ och LNG påverkar grodpopulationer. Försöksgrödor av släktet *Xenopus* avlades fram genom att honor injicerades med gonadotropin i den dorsala lymfsäcken för att framkalla ägglossning. Hanar befruktade äggen som sedan hölls i akvarier till kläckning. Ett mindre antal individer valdes ut per akvarium och bestämd hormonmängd tillsattes tills rätt hormonkoncentration uppmätts. Exponering av hormonerna startade i de flesta studier före den sexuella differentieringens början. Hormonkoncentrationen mättes och kontrollerades med hjälp av spektrometri (Tompsett *et al.* 2012, Pettersson & Berg 2007).

En indikator på att endokrin störning har skett är ökade halter av vitellogenin (Vtg) i grodorna. Vtg är ett protein som kodar för honliga egenskaper hos amfibier (Wallace & Bergink 1974, Wallace 1985). Även hanar har genen som gör att de kan producera proteinet vid stimulering. Som indikator för att amfibier utsatts för östrogena substanser kan Vtg-halten mätas, särskilt hos hanar. Proteinet bildas i levern, frisätts i blodet och tas upp av oocyter. Vitellogenesen är processen där gulan i ägget skapas och i den har Vtg en viktig roll. Det bidrar till att oocyter växer till och mognar (Wallace & Bergink 1974, Wallace 1985).

För att ta reda på om hormonerna gör att grodpopulationer får en skev könskvot har genetiskt och fenotypiskt kön undersökts i studier. För att få fram genetiskt kön gjordes PCR med extraherat DNA för att undersöka om individen hade en viss honlig gen (Tompsett *et al.* 2012). För att undersöka fenotypiskt kön gjordes excision av gonader och en histologisk undersökning och fotografering av dessa. Kvarnryd med kollegor (2011) undersökte fenotypiskt kön hos grodorna vid metamorfos och bestämde att gonader med äggstockshåligheter tillhörde honor och gonader med märm utan dessa ihåligheter tillhörde hanar. Ofta innehöll äggstockar oocyter och testiklar spermatozoer vilket var behjälpligt.

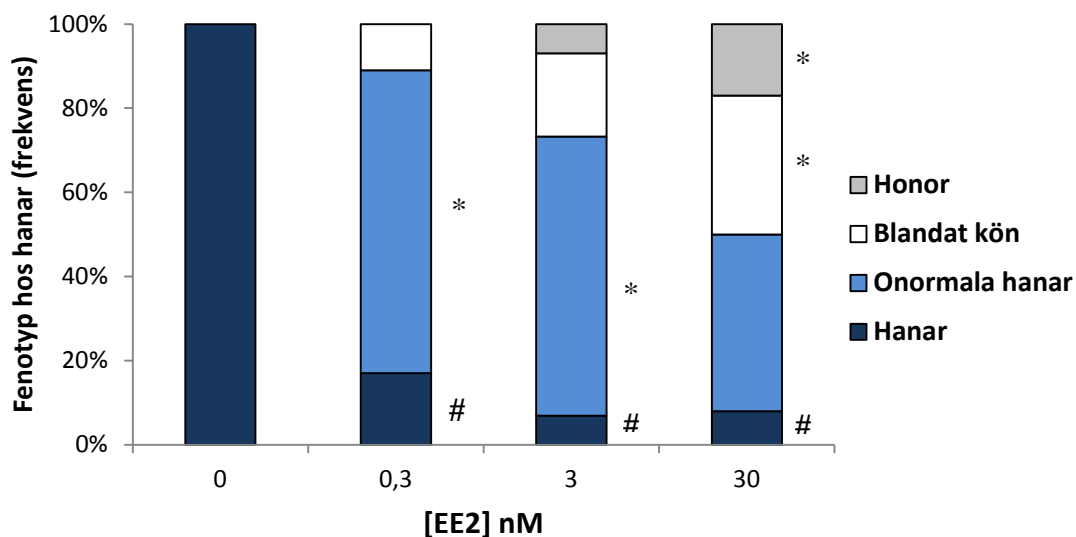
Till syfte att undersöka hormonernas påverkan på grodornas fertilitet räknades äggen i äggstockarna och sattes i relation till honans storlek och även äggstockarnas vikt sattes i relation till honans storlek (Kvarnryd *et al.* 2011). I flera studier undersöktes om en eller båda äggledarna saknades hos honorna och deras äggstockmognad bestämdes genom att beräkna andelen mogna respektive omogna oocyter. mogna oocyter definierades som ägg som genomgått eller befann sig i meiotisk profas. Hos hanarna mikroskopierades antalet spermier (Kvarnryd *et al.* 2011). I litteraturstudiens alla studier jämfördes hormonexponerade grupper med en icke exponerad kontrollgrupp.

Resultat

Etinylestradiols påverkan på grodpopulationer

Effekt på könskvot

I en studie med enbart genotypiska hanar upptäcktes att andelen juvenila individer som visade mixat kön, onormal fenotyp eller var fenotypiska honor ökade längs en koncentrationsgradient från 0 till 30 nM EE₂ (Figur 6, Tompsett *et al.* 2012). Mera specifikt var andelen onormala hanar signifikant högre vid koncentrationerna 0,3 och 3 nM och andelen individer av blandat kön ökade signifikant vid 30 nM. De två högre koncentrationerna har inte uppmätts i naturen. Gyllenhammar med kollegor visade att exponering av EE₂ i yngelstadiet hos vuxna *X. tropicalis* skapade en signifikant skillnad i könskvot vid koncentrationer högre än den miljömässigt relevanta halten 0,0062 nM EE₂ (Gyllenhammar *et al.* 2009).

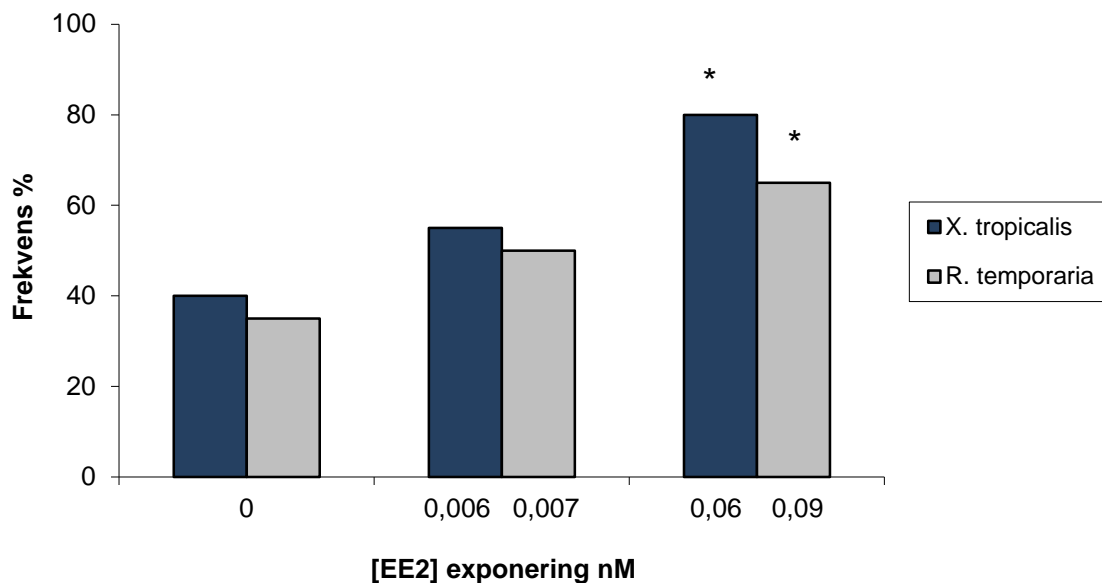


Figur 6. Fenotyp hos genotypiska hanar av arten *X. laevis* efter 89 dagars exponering av EE₂ och genomgången metamorfos. Omritad efter Tompsett med kollegor (2012).

* = signifikant överrepresenterat jämfört med en kontrollgrupp.

= signifikant underrepresenterat jämfört med en kontrollgrupp.

Det har visats att koncentrationer som uppmätts i miljön har skapat en skev könsfördelning i juvenilstadiet hos *X. tropicalis* och *R. temporaria* (Pettersson & Berg 2007). Resultatet blev att skillnaden i könskvot hos *X. tropicalis* fanns längs koncentrationsgradienten 0,006 till 0,6 nM EE₂ och blev signifikant från 0,06 nM (Figur 7). Hos *R. temporaria*, vid könsbestämning en månad efter metamorfos, fanns en signifikant skillnad i könskvot vid 0,09 nM EE₂ (Figur 7). En annan studie med både vuxna och juvenila *X. tropicalis* resulterade i en signifikant skillnad i fenotypisk könsfördelning hos grupper utsatta för minst 1 nM (Pettersson *et al.* 2006). Sammanfattningsvis har det visats att EE₂ påverkar könskvoten hos *X. tropicalis* och *R. temporaria*.



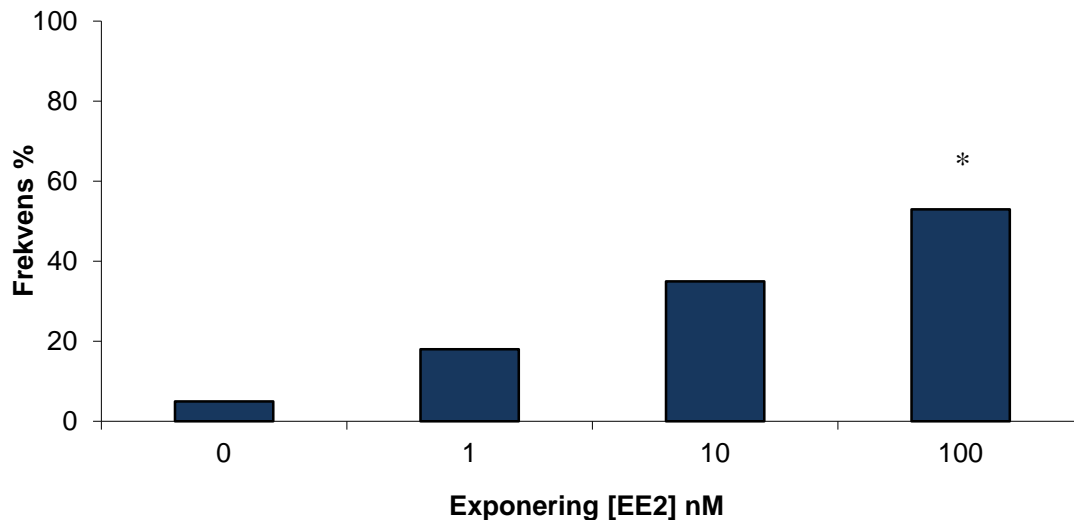
Figur 7. Andel honor hos *X. tropicalis* och *Rana temporaria* efter metamorfos, vid exponering av olika koncentrationer EE₂ i yngelstadiet. Omritad från två figurer av Pettersson och Berg (2007).

* = signifikant ($p < 0,001$) jämfört med en kontrollgrupp.

Fertilitetspåverkan och sterilitet

Vuxna individer av arten *X. tropicalis* har visats få nedsatt utveckling av reproduktionsorgan och nedsatt fertilitet. Efter exponering av koncentrationer mellan den miljömässigt relevanta halten 0,006 nM upp till 0,6 nM EE₂ utvecklade en stor andel genotypiska hanar honliga reproduktiva organ (Gyllenhammar *et al.* 2009). Hanar som inte gjorde det hade minskad fertilitet, bland annat innehöll testiklarna färre spermier än i kontrollgruppen. Vid 0,6 nM var det signifikant fler individer med äggstockar som saknade båda äggledarna, vilket innebär att de var sterila (Gyllenhammar *et al.* 2009).

Pettersson med kollegor (2006) har visat att EE₂-exponerade honor i högre utsträckning saknat en eller båda äggledarna vid 1 nM eller mer. Dock blev skillnaden signifikant först vid den höga halten 100 nM (Figur 8). I studien påträffades en mindre mängd östrogenreceptor-mRNA i hjärnan hos individer med äggstockar men med avsaknad av äggledare. Denna skillnad kan påverka både reproduktionen och det centrala nervsystemet (Pettersson *et al.* 2006).



Figur 8. Andel honor, exponerade för EE₂ i yngelstadiet till metamorfos, med äggstockar som saknar en eller båda äggledarna. Omritad efter Pettersson med kollegor (2006). * = signifikant (p<0,01) jämfört med en kontrollgrupp.

Vid exponering av 10 nM EE₂ har det visats att *X. laevis*-honors oogenes påverkas (Cevasco *et al.* 2008). Av honorna hade 47,6% en ökad andel atretiska oocyter i äggstockarna, vilket innebär tillbakabildade eller förlorade ägg. I studien exponerades hanar för samma koncentration med resultatet att de fick minskad testikelstorlek och minskad diameter på sädesledarkanalerna. En femtedel av hanarna hade även förekomst av oocyter (Cevasco *et al.* 2008). Urbatzka med flera (2007) har visat att hanar och honor av arten *X. laevis* som utsatts för 10 nM EE₂ får signifikant minskade testosteronhalter men att enbart honor får signifikant minskad östrogenhalt. Exponering av EE₂ har också visats påverka aromatasaktiviteten hos *X. laevis* där exponering av 10 nM EE₂ resulterade i en ökad förekomst av aromatas mRNA i de exponerade hanarnas hjärnor men inte i honornas (Massari *et al.* 2010). Aromatas är ett enzym som katalyserar transformationen från androgener till östrogener. Sammanfattningsvis finns en fertilitetspåverkan redan vid låga halter EE₂-exponering men effekterna blir allvarligare vid höga halter.

Påverkan på metamorfos och vitellogenesis

Exponering av EE₂ har visat sig ge längre medeltid till metamorfos samt högre mortalitet efter metamorfos. Överlevnaden minskade signifikant hos *X. tropicalis* från metamorfos till 8 månaders ålder efter exponering av 0,06 nM EE₂ (Gyllenhammar *et al.* 2009). Medeltiden till metamorfos påverkades hos *X. laevis* enligt en annan studie (Tompsett *et al.* 2012). Resultatet var att ju högre koncentration EE₂-exponering i yngelstadiet, desto längre medeltid till fullbordad metamorfos. Skillnaden var signifikant hos grupper utsatta för minst 0,3 nM EE₂ (Tompsett *et al.* 2012).

Vtg-syntes inducerades hos *R. temporaria* vid exponering av 10 nM EE₂ vilket indikerade påverkan på östrogenreceptor-system och leverfunktion enligt en studie (Rankouhi *et al.* 2005). Även Thompsett med kollegor (2012) uppmätte högre halter Vtg hos båda könen av *X. laevis* som varit exponerade för minst 0,3 nM EE₂ och det var endast exponerade individer som hade Vtg i testiklarna.

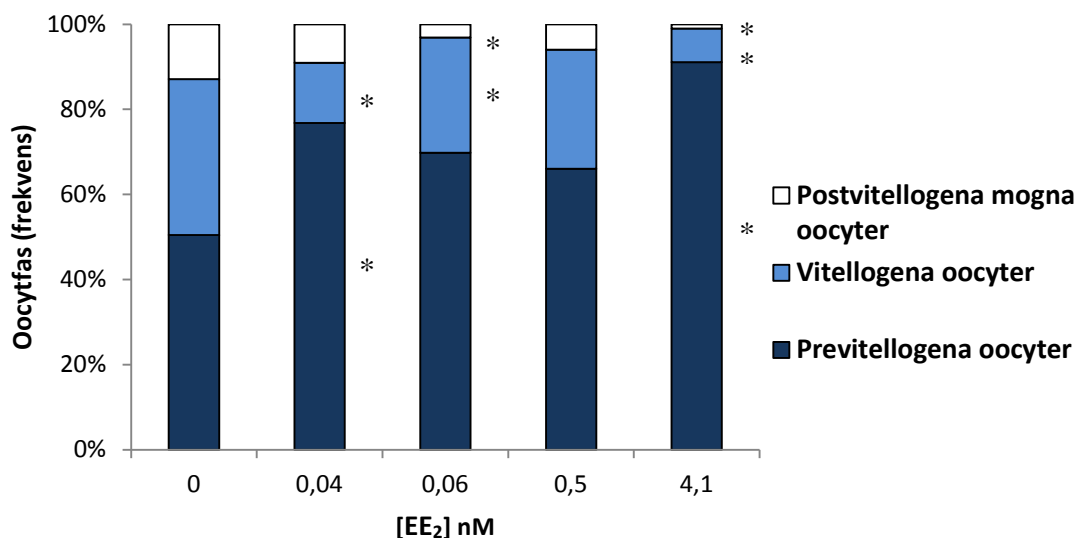
Levonorgestrels påverkan på grodpopulationer

Flera studier om levonorgestrels (LNG) effekter på grodpopulationer undersöker reproduktion, främst honors. För honor är det avsknad av äggstockar och förändringar i oogenes och reproduktionsrelaterade hormonnivåer som påverkas. Hos hanar är det parningsbeteende och hormonnivåer som påverkas.

Påverkan på äggledare och oogenes

En studie har visat att LNG kan göra *X. tropicalis*-honor sterila (Kvarnryd *et al.* 2011). Yngel utsattes för 0,06 nM och 0,5 nM LNG före sexuell differentiering. Exponering av 0,5 nM LNG resulterade i att honorna som vuxna saknade äggledare och hade lågt Gonadosomatiskt index (gonadmassa/kroppsmassa). Flera exponerade honor blev sterila som vuxna. När de exponerade honorna parades med icke-exponerade hanar lade endast en hona ägg. Det var en bråkdel av normalt äggantal medan alla honor i kontrollgruppen lade normalt antal ägg (Kvarnryd *et al.* 2011).

En amfibies oocyt genomgår fyra faser innan den är mogen att genomgå ägglossning. I kronologisk ordning är faserna omogen, previtellogen, vitellogen och mogen. Den mognar genom att samla på sig fett, äggula och andra näringsämnen (Kvarnryd *et al.* 2011). *X. tropicalis*-honor som utsatts för minst 0,5 nM LNG har en signifikant större andel omogna oocyter i äggstockarna enligt Kvarnryds forskargrupp (2011). Även Säfholm med kollegor (2011) har visat att en månad LNG-exponering hos sexuellt mogna honor av arten *X. tropicalis* resulterar i problem med oogenesen. Redan vid exponering av 0,04 nM LNG blev resultatet försämrade vitellogenesis (äggulebildning). Vid samma halt eller mer fanns en ökad andel previtellogena oocyter och förändrade proportioner mellan previtellogena, vitellogena och postvitellogena mogna oocyter (Figur 8). Vid LNG-exponering minskade andelen mogna oocyter i äggstockarna vilket innebär färre ägg i nästkommande ägglossning. Resultatet blev att LNG störde vitellogenesis och oogenes och därmed påverkade fekunditeten negativt (Säfholm *et al.* 2011).



Figur 8. Proportioner mellan omogna previtellogena, vitellogena och mogna postvitellogena oocyter hos *X. tropicalis* exponerade för olika koncentrationer LNG. Omritad efter Säfholm med kollegor (2011). (* = signifikant skillnad jämfört med en kontrollgrupp).

Effekter på hormonuttryck

Flera hormonuttryck har hos *X. laevis* visat påverkan av LNG-exponering i yngelstadiet. I en studie undersöktes LNG-exponerade individer histologiskt i stadiet före metamorfos samt vid metamorfos (Lorenz *et al.* 2011a). RNA-uttrycket för luteiniserande hormon (LH) var hämmade hos bägge könen utsatta för minst 1 nM LNG vid undersökning före metamorfos. Skillnaden var signifikant vid 10 nM, en koncentration som inte hittas i naturen.

Undersökningen vid metamorfos visade att RNA-uttrycket av follikelstimulerande hormon (FSH) var högre hos hanar utsatta för minst 1 nM LNG. LH och FSH stimulerar ägglossning hos honor och testosteron- och spermieproduktion hos hanar (Lorenz *et al.* 2011a). LNG har även visats påverka sköldkörteln. Individer utsatta för minst 1 nM LNG fick en signifikant ökning i mängden mRNA som kodar för sköldkörtelstimulerande hormon (TSH) (Lorenz *et al.* 2011b). TSH stimulerar sköldkörteln att utsöndra sköldkörtelhormon som har till uppgift att kontrollera grodans metabolism samt den komplexa förändringsprocessen metamorfos (Tata 1998).

Parningsbeteende

X. laevis hanars parningsbeteende påverkas av LNG enligt Hoffmann och Kloas (2012). Vuxna hanar utsattes för koncentrationer från 0,1 till 100 nM LNG respektive naturligt progesteron. I alla grupper med LNG fick hanarna ökad frekvens parningsrop och blev mer sexuellt upphetsade jämfört med de som utsattes för naturligt progesteron som inte visade någon skillnad (Hoffmann & Kloas 2012). Detta kan anses vara en positiv effekt om hanarna i högre utsträckning lockar till sig honor.

Diskussion

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka om utsläpp av de syntetiska hormonerna etinylöstradiol och levonorgestrel påverkar livskraftiga grodpopulationer. Det är relevant och aktuellt för att det sker en alarmerande minskning i grodpopulationer världen över. Vilken inverkan på denna minskning har p-piller? Sammanställda studier är gjorda på modellarter ur släktet *Xenopus* (*X. laevis* och *X. tropicalis*) och ett fåtal på den europeiska arten *R. temporaria*.

Studier har gjorts både vid låga miljömässigt relevanta och mycket höga hormonkoncentrationer. Redan vid miljömässigt relevant hormonexponering visar resultaten på flera allvarliga reproduktionseffekter och kraftigare blir dem vid högre koncentrationer. Det är viktigt att poängtera att även låga koncentrationer EE₂ kan bidra till endokrina störningar hos amfibier (Larsson & Löf 2011). Det blir en så kallad cocktaileffekt när andra östrogena ämnen binder till samma receptorer som EE₂. Exempel på ämnen är de naturliga östrogenerna östradiol, östron och östriol men även i viss mån kemikalier som bisfenol A (Larsson & Löf 2011). Undersökningar av högre koncentrationer EE₂ än vad som påträffas i miljön är relevanta då naturliga östrogena ämnen släpps ut i naturen i större mängder än EE₂. Att EE₂ är mer potent än E₂ gör att dessa tillsammans kan generera stora endokrina störningar. En studie visade att *X. laevis*-hanar som utsattes för 0,1 nM E₂ i en månad fick ökad dödlighet och feminisering i form av hermafroditism (Oka *et al.* 2006). Vattendrag kan lättare nå upp till denna koncentration endokrina ämnen om det även släpps ut flera olika östrogena ämnen. Ytterligare ett skäl till att undersöka effekter av höga koncentrationer EE₂ är att det kan finnas stora utsläpp som skapar koncentrerade hormonhalter i små områden eller delar av vattendrag. Till exempel kan utsläppen vara stora i Indien och Kina där många fabriker producerar syntetiska hormoner och p-piller och restprodukter ofta släpps ut direkt i naturen (Stenberg 2008). Att i framtiden undersöka vilka endokrina störningar EE₂ och LNG skapar hos

amfibier i anslutning till dessa industrier kan vara av värde delvis för att det med stor sannolikhet finns en cocktaileffekt där.

Att EE₂ påverkar grodpopulationers könskvot genom att det blir en större andel honor med ökad exponeringshalt styrks av flera forskargrupper (Pettersson *et al.* 2006, Pettersson & Berg 2007, Gyllenhammar *et al.* 2009, Tompsett *et al.* 2012). Utifrån dessa studier kan slutsatsen dras att tidpunkt för exponering påverkar effekten kraftigt och att miljömässiga halter kan ha en effekt på könskvoten. Om exponering sker under den sexuella differentieringen blir det en stor skillnad i könskvot efter metamorfos om EE₂-koncentrationen är hög. Intressant är att en förändring i könskvot kommer vid olika EE₂-koncentrationer i olika studier. Förklaringen kan vara att det är skillnad mellan olika parningar och exponerings sätt vilket gör att det är viktigt att se på vilka koncentrationer som ger signifikant effekt. I olika studier blir skillnaden dock signifikant vid olika koncentrationer EE₂. Det kan tolkas som en grop som kan grävas igen genom att utföra fler studier, både i fält och i experimentell miljö.

Förändring i aromatasaktivitet kan användas som en biomarkör för endokrin påverkan enligt Massaris forskargrupp (2010). Enzymet aromatas är viktigt i den sexuella differentieringen vid utveckling av äggstockar då det sker en transformation av androgener till östrogener (Miyashita *et al.* 2000). Att aromatasaktiviteten ökar hos hanar i yngelstadiet efter exponering av EE₂ kan därför vara en bidragande orsak till skev könskvot på så sätt att fler yngel blir honor.

Pettersson och Berg (2007) undersökte könskvot hos *R. temporaria* med resultatet att kvoten blev olika vid metamorfos jämfört med mätning en månad efter metamorfos. Det har att göra med att arten kan ha olika vägar i gonadutvecklingen (se "*R. temporaria*", s. 4). Ett syfte med studien var att se om resultat från *X. tropicalis* gick att översätta till *R. temporaria*, om även *R. temporaria* kan användas som modellorganism i försök med EE₂-exponering. Svaret är att resultaten från arterna över lag kan jämföras med varandra. En faktor som talar emot *R. temporaria* som passande modellorganism är dock att arten har olika vägar i gonadutvecklingen, vilket inte finns hos *Xenopus*-arterna. Gonadutvecklingen kan göra *R. temporaria* opålitlig som modellart i reproduktionsstudier då inte alla yngel genomgår metamorfos likadant och i samma takt. Resultaten kan bli att endokrina effekter blir något annorlunda hos *R. temporaria* jämfört med hos *Xenopus*-arterna. Östrogenreceptorerna fungerar dock på samma sätt vilket gör att effekterna borde bli relativt likvärdiga hos släktena, men släktena vara olika känsliga för samma exponeringskoncentration EE₂.

Exponering med endast 0,06 nM EE₂ krävs för att dödligheten från juvenil till vuxen *X. tropicalis* ska öka (Gyllenhammar *et al.* 2009). Det är en effekt som absolut kan bidra till grodpopulationers minskning världen över. Att tiden till metamorfos ökar (Tompsett *et al.* 2012) bidrar till en förlängd riskfylld yngelperiod. Även om det krävs uppemot 0,3 nM för signifikant påverkan är den ökade tiden en faktor som gör att en mindre andel yngel överlever till metamorfos i det vilda. EE₂ påverkar grodors fertilitet genom att de kan få försämrade gonadutveckling, avsaknad av äggledare, färre mogna oocyter och färre spermier (Kvarnryd *et al.* 2011, Säfholm *et al.* 2011). Förutom färre spermier återfinns dessa effekter även hos LNG-exponerade individer. Båda hormonerna kan göra honor sterila genom att försvåra utvecklingen av äggstockar och påverka att de lägger få ägg, faktorer som hindrar många avkommor att bli till (Kvarnryd *et al.* 2011, Säfholm *et al.* 2011). Om dessa syntetiska hormoner har denna effekt på amfibier är det troligt att andra syntetiska hormoner också har det. Det bidrar till en cocktaileffekt då många ämnen bidrar till samma effekt.

Förändringar i hormonuttrycken för TSH som LNG kan bidra till kan påverka hela metamorfosprocessen hos amfibier (Klaos & Lutz 2006). Fullständig metamorfos kan åstadkommas endast genom en komplex interaktion mellan endokrina och morfologiska faktorer. Amfibier genomgår denna process under en kort och mycket känslig tid i yngelstadiet då exogena störningar orsakade av syntetiska hormoner kan få letala konsekvenser (Klaos & Lutz 2006). Obalans i hormonuttrycken av LH och FSH kan hos honor kopplas ihop med störningar på oogenesen och hos hanar skapa problem både med testosteronhalt och med spermieproduktion. Hög testosteronhalt kan kopplas ihop med ett av de andra LNG-resultaten hos hanar, nämligen resultatet att frekvensen parningsrop hos *X. laevis*-hanar ökade (Hoffmann & Kloas 2012). Dock kan denna positiva konsekvens hos hanar övervägas av de negativa konsekvenserna som att honorna kan bli sterila, få problem med oogenesen och även båda könens metamorfoseffekter.

Trots ovanstående resonemang och redan framtagna resultat är det så att LNG inte är tillräckligt undersökt. Med en allt större konsumtion av akut-p-piller kan vattendrags LNG-halter öka och därför bör det undersökas mer. Det är även relativt magert med studier gjorda kring EE₂-påverkan hos grodpopulationer. EE₂-påverkan hos fiskarter har undersökts i hög utsträckning och det finns mängder med studier kring det. Det behövs fler studier, inte bara experimentella studier utan även i fält. Att föredra vore att utföra studier på grodor där det naturligt finns mycket hormonutsläpp. Även cocktaileffekten behöver det forskas mer kring då studier hittills är gjorda i kontrollerade akvarium. Det är svårt att hitta vetenskapliga metoder för att undersöka hur flera ämnen tillsammans påverkar organismer men jag hyser hopp för teknikens utveckling. Något som saknas i undersökningar kring båda hormonerna är mer långvariga exponeringar; lever en groda nedströms ett reningsverk är den sannolikt kroniskt exponerad hela livsrytmen.

Slutsats

Utifrån denna litteraturstudie kan det konstateras att det behövs fler studier men att de som finns indikerar att utsläpp från hormoner i p-piller stör reproduktionen hos världens grodpopulationer. Det kan vara en bidragande orsak till att grodpopulationer minskar i hög takt och bör tas i beaktande av beslutstagare. Våra europeiska arter som vanlig groda och även rödlistade arter som gölgroda och lökgroda är troligtvis utsatta på liknande sätt som de afrikanska klogrodorna även om svenska reningsverk är bra och våra utsläpp är relativt små. Vi behöver släppa ut mindre hormoner i våra vattendrag och alla världens länder behöver resurser för att bygga bra reningsverk.

Tack

Jag vill tacka Silke Langenheder för handledning och stöd under skrivprocessen, studenterna Erika Gustavsson, Linda Eckardt och Benjamin Gustavsson för användbar konstruktiv återkoppling och professor i ekotoxikologi Jan Öberg för hjälp vid faktafrågor. Kristina Asker på språkverkstaden och Olof Pettersson vill jag tacka för hjälp med språk, tempus och grammatik.

Referenser

- Berg C, Gyllenhammar I, Kvarnryd M. 2009. *Xenopus tropicalis* as a Test System for Developmental and Reproductive Toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **3**: 219–225.
- Britannica online. 2013a. Ovulation. WWW-dokument:
<http://www.britannica.com.ezproxy.its.uu.se/EBchecked/topic/436140/ovulation>.
Hämtad 2013-05-14.
- Britannica online. 2013b. Levonorgestrel. WWW-dokument:
<http://www.britannica.com.ezproxy.its.uu.se/EBchecked/topic/338040/levonorgestrel>.
Hämtad 2013-04-05.
- Browne RK. 2008. Amphibian hormone cycle. Amphibian ark. WWW-dokument:
<https://aark.portal.isis.org/researchguide/amphibian%20larval%20rearing/amphibian%20hormone%20cycle.pdf>. Hämtad 2013-05-15.
- Bögi C, Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Steineck C, Sinowatz F, Kalbfus W, Negele RD, Luts I, Klaos W. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environmental Research*. **2**: 195–201.
- Cevasco A, Urbatzka R, Bottero S, Massari A, Pedemonte F, Klaos W, Mandish A. 2008. Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **2**: 241–251.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*. **11**: 1549–1558.
- Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Larsson DGJ. 2010. Therapeutic Levels of Levonorgestrel Detected in Blood Plasma of Fish: Results from Screening Rainbow Trout Exposed to Treated Sewage Effluents. *Environmental Science & Technology*. **7**: 2661–2666.
- Gosner KL. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*. **16**: 183–190.
- Gurdon, John B., and Nick Hopwood. 2000. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology* **44**: 43-50.
- Gyllenhammar I, Holm L, Eklund R, Berg C. 2009. Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*. **2**: 171–178.
- Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology*. **6**: 921–933.
- Hoffmann F, Kloas W. 2012. The synthetic progestogen, Levonorgestrel, but not natural progesterone, affects male mate calling behavior of *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*. **3**: 385–390.
- Johnson AC, Sumpter JP. 2001. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environmental Science & Technology*. **24**: 4697–4703.
- Jordbruksverket. 2005. Grod- och kräldjur i landskapet. Jordbruksverket, Jönköping.
- Jordbruksverket 2013. Etisk prövning av djurförsök. 2013-02-06. WWW-dokument:
<http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/djur/olikaslagsdjur/forsoksdjur/etiskprovning>.
Hämtad 2013-04-28.
- Jorgensen SE, Fath B. 2008. Endocrine disruptor chemicals: overview. *Encyclopedia of ecology*, ss.1265-1269. Elsevier science, Oxford.

- Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith J JL, Hetheridge M, Williams RJ. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **3**: 480–488.
- Jönsson J. 2008. En historia om frihet och förhinder. *LäkemedelsVärlden*. WWW-dokument 2008-03-18: <http://www.lakemedelsvarlden.se/nyheter/en-historia-om-frihet-och-forhinder-6004>. Hämtad 2013-04-04.
- Klaos W, Lutz I. 2006. Amphibians as a model to study endocrine disruptors. *Journal of Chromatography A* **1130**: 16-27.
- Kvarnryd M, Grabic R, Brandt I, Berg C. 2011. Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquatic Toxicology*. **1**: 18–24.
- Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Förlin L. 1999. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*. **2**: 91–97.
- Larsson J, Löf L. Läkemedel i miljön. *Läkemedelsboken*. WWW-dokument 2011-09-13: http://www.lakemedelsboken.se/lakemedel_i_miljon.html. Hämtad 2013-04-09.
- Lindh I. 2011. Factors influencing women´s choice of contraception. WWW-dokument: <http://hdl.handle.net/2077/25573>. Hämtad 2013-04-04.
- Lorenz C, Contardo-Jara V, Trubiroha A. 2011a. The Synthetic Gestagen Levonorgestrel Disrupts Sexual Development in *Xenopus laevis* by Affecting Gene Expression of Pituitary Gonadotropins and Gonadal Steroidogenic Enzymes. *Toxicological Sciences*. **2**: 311–319.
- Lorenz C, Contardo-Jara V, Pflugmacher S. 2011b. The Synthetic Gestagen Levonorgestrel Impairs Metamorphosis in *Xenopus laevis* by Disruption of the Thyroid System. *Toxicological Sciences*. **1**: 94–102.
- Massari A, Urbatzka R, Cevasco A, Canesi L, Lanza C, Scarabelli L, Klaos W, Mandich A. 2010. Aromatase mRNA expression in the brain of adult *Xenopus laevis* exposed to Lambro river water and endocrine disrupting compounds. *General and Comparative Endocrinology*. **2**: 262–268.
- Miyashita K, Schimizu N, Osanai S, Miyata S. 2000. Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the *Xenopus* ovary. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **75**: 101-107.
- Moore FL. 1983. Behavioral Endocrinology of Amphibian Reproduction. *BioScience*. **9**: 557–561.
- Naturvårdsverket. 2008. Avloppsreningsverkens förmåga att ta hand om läkemedelsrester och andra farliga ämnen. Rapport 5794. Naturvårdsverket, Solna.
- Nieuwkoop PD, Faber J. 1967. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. 2:a uppl. North-Holland Pub. Co. Amsterdam.
- Oka T, Mitsui N, Hinago M, Miyahara M, Fujii T, Tooi O, Santo N, Urushitani H, Iguchi T, Hanaoka Y, Mikami H. 2006. All ZZ male *Xenopus laevis* provides a clear sex-reversal test for feminizing endocrine disruptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2**: 236–243.
- Pettersson I, Arukwe A, Lundstedt-Enkel K, Mortensen AS, Berg C. 2006. Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology*. **4**: 356–365.
- Pettersson I, Berg C. 2007. Environmentally relevant concentrations of ethinylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **5**: 1005–1009.
- Ranney RE. 1977. Comparative metabolism of 17 α -ethynyl steroids used in oral contraceptives. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **3**: 139–166.
- Rankouhi T, Sanderson JT, van Holstejin I, van Kooten P, Bosveld ATC, van den Berg M. 2005. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in

- hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*). *Aquatic Toxicology*. **1**: 97–101.
- Schelin Å. 2012. Preventivmedel med två olika hormoner. 1177. WWW-dokument 2012-06-15: <http://www.1177.se/Uppsala-lan/Fakta-och-rad/Rad-om-lakemedel/Sa-fungerar-preventivmedel-med-tva-olika-hormoner---p-piller-p-plaster-och-p-ring-/>. Hämtad 2013-04-09.
- Stenberg I. 2008. Ignorerad miljökris. *LäkemedelsVärlden*. WWW-dokument 2008-11-03: <http://www.lakemedelsvarlden.se/nyheter/ignorerad-milj%C3%B6kris-6456>. Hämtad 2013-05-02.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman RW, Waller RW. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. **306**: 1783–1786.
- Säfhholm M, Norder A, Fick J, Berg C. 2011. Disrupted Oogenesis in the Frog *Xenopus tropicalis* after Exposure to Environmental Progesterone Concentrations I. *Biology of Reproduction*. doi: 10.1095/biolreprod.111.097378.
- Tata JR. 1998. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Nature* **8**: 259-272.
- Ternes T, Kreckel P, Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of The Total Environment*. **1**: 91–99.
- Tompsett AR, Wiseman S, Higley E, Pryce S, Chang H, Giesy JP, Hecker M. 2012. Effects of 17 α -ethynylestradiol on sexual differentiation and development of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **3**: 202–210.
- Urbatzka R, Bottero S, Mandich A, Lutz I, Kloas W. 2007. Endocrine disruptors with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **4**: 310–318.
- Viglino L, Aboulfadl K, Prévost M, Sauvé S. 2008. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*. **5**: 1088–1096.
- Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Grenier-Loustalot M-F. 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1**: 84–91.
- Wake DB, Vredenburg VT. 2008. Colloquium Paper: Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1**: 11466–11473.
- Wallace RA, Bergink EW. 1974. Amphibian Vitellogenin: Properties, Hormonal Regulation of Hepatic Synthesis and Ovarian Uptake, and Conversion to Yolk Proteins. *American Zoologist*. **4**: 1159–1175.
- Wallace RA. 1985. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Nonmammalian Vertebrates. *Developmental biology* **1**: 127-177.
- WHO & UNEP. 2012. Endocrine Disrupting Chemicals 2012 Summary for Decision-Makers. World health organisation & United nations environment programme. WHO press, Geneva.
- Xenbase 2013. Introduction to *Xenopus*. WWW-dokument: <http://www.xenbase.org/anatomy/intro.do>. Hämtad 2013-04-03.

Framsidas bild

Trevor R, Wikimedia Commons. WWW-dokument:

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Frogs_in_our_pond_-_1_-_geograph.org.uk_-_1765500.jpg. Hämtad: 2013-05-20.