UPPSALA
UNIVERSITET

Båtbottenfärger och mekanismerna bakom infertila snäckpopulationer

A. Sandman/Azote

Greta Nilén

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag
Imposex är ett fenomen, även kallat pseudohermafroditism, som upptäcktes hos ostronpopulationer redan under 70-talet, men senare även identifierades inom blötdjursklassen Gastropoda (snäckor). Honliga snäckor utvecklade hanliga könsdelar såsom penis och sädesledare och orsaken fastställdes vara utsläpp av tributyltenn (TBT). TBT blev redan på 60-talet en viktig beståndsdel i båtbottenfärger för att undvika tillväxt av framförallt havstulpaner. Efter upptäckten av imposex förbjöds TBT i stora delar av världen, men nya mätningar visar att tennföreningarna finns kvar i sediment och vattenmassa. Detta leder till fortsatta effekter på vattenlevande organismer. Trots att forskning kring imposex har pågått länge, råder det fortfarande tvivel kring vilka mekanismer som förklarar detta fenomen. Syftet med denna uppsats är därför att kartlägga vilka mekanismer som har studerats och varför TBT kan kopplas till dessa. De 5 mekanismerna är aromatasinhibering, inhibering av esterbildande enzym, minskad bildning av sulfatkonjugat, ökad frisläppning av neuropeptider och aktivering av retinoid-X-receptorn. Den första mekanismen utgår från en inhibering av enzymet som omformar testosteron till östradiol, vilket kan leda till en ökning av fritt testosteron. Den andra teorin menar istället att de ökade testosteronhalterna beror på en inhibering av ett esterbildande enzym (ATAT). En inhibering av detta leder till att mindre testosteron omformas och lagras som estrar i organismen. Testosteron har också visat sig kunna bilda konjugat med sulfat för eliminering. Detta är utgångspunkten för mekanism tre. Den fjärde mekanismen visar på att TBT kan påverka frisläppning av neuropeptiden APGW-amid som agerar neurotransmittor och påverkar utväxt av hanliga könsdelar. Dessa könsdelar tros sedan bilda testosteron som upprätthåller imposex i de honliga organismerna. Retinoid-X-receptorer (RXR) är transkriptionsfaktorer och bindning av TBT till dessa tros påverka frisläppning av neurohormon samt retinoider och steroider. Dessa kan i sin tur leda till utväxt av hanliga könsorgan hos honor. Forskning har på senare tid fokuserat på denna mekanism, vilken utgör den sista av de fem och även den mest troliga. Detta grundar sig främst på att RXR är inblandad i tillväxt av hanliga genitalier samt att denna mekanism inte baseras på inverkan av höjda testosteronnivåer. Störning av metabolism och eliminering av testosteron har länge stått i fokus, men studier har visat att höjda halter av testosteron återfinns först i senare steg av imposex. Detta tyder på att mekanismen bakom imposex inte först och främst baseras på höjda testosteronnivåer. För att klargöra orsaken till utväxt av hanliga könsdelar hos honliga snäckor krävs fortsatta studier på bland annat hormonsystemets uppbyggnad.

Inledning
Under 70-talet uppmättes en kraftig reducering av ostronpopulationer i Frankrike, vilket kom att kopplas till organiska tennföreningar som brukar förkortas med namnet TBT (Tjus 2014). Det visade sig att TBT är extremt giftig för marint liv och dessa föreningar har bland annat hormonstörande effekter på snäckarter (Hedlund *et al.* 2014), vilket redan vid koncentrationen 1 ngL^{-1} har lett till maskulinisering hos honliga individer (Tjus 2014). Detta har kommit att kallas ”imposex” (Hedlund *et al*. 2014, Tjus 2014). Imposex upptäcktes först hos *Nucella lapillus* (purpursnäcka) och innebar sterilitet och utvecklandet av manliga könsdelar (exempelvis penis och sädesledare) hos honliga individer (Dear & Kemp 2007). Effekterna av hormonstörande ämnen följer av att de blockerar eller härmar naturligt förekommande hormoner (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005). Studier på purpursnäcka och nätsnäcksarten *Hinia reticulata* har visat att exponering för TBT leder till en dos- och tidsberoende utveckling av imposex. Graden av imposex-utveckling hos honorna ökade med ökad dos och exponeringstid (Bettin *et al.* 1996). På grund av effekter på det marina livet förbjöds TBT av International Maritime Organization (IMO) år 2001 (International Maritime Organization 2002). Förbudet mot TBT startade dock redan 1982 i

Frankrike (Tjus 2014) och TBT har varit förbjudet sedan 2004 inom EU (Hedlund *et al.* 2014), men en studie gjord av Tjus (2014) visar att höga halter av TBT fortfarande finns kvar i marina miljöer. Detta innebär att ämnet fortsätter påverka vattenlevande organismer. Enligt Alzieu (1998) är det klasserna Bivalvia (musslor) och Gastropoda (snäckor) inom stammen Mollusca (blötdjur) som är känsligast för TBT.

TBT har efter förbuden ersatts av koppar som rapporterats läcka ut i havet och Eliasson (2013) skrev om en ny metod utvecklad av forskare från Göteborgs universitet och Sveriges Tekniska forskningsinstitut i Borås. För att undvika att gift läcker ut i havet bygger denna metod på att giftet frisläpps först när havstulpanerna gräver sig in i färgen. Giftet som används är en molekyl vid namn ivermektin som produceras av bakteriestammen *Streptomyces avermitilis,* och forskning kring metoden bedrivs inom EU-projektet LEAF (Low Emission Anti-Fouling). På grund av denna pågående forskning samt kvarvarande skadliga nivåer av TBT i miljön, trots långvarigt förbud, är detta ett aktuellt ämne som bör belysas. Till detta kan tilläggas att forskning kring TBT och dess effekt på snäckdjur har pågått länge, men fortfarande råder tvivel kring vilken mekanism som kan förklara inducering av imposex.

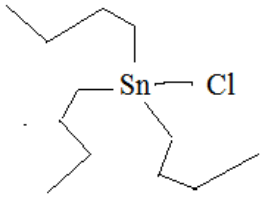
Studier har gjorts på fem troliga mekanismer bakom detta fenomen, där två har studerats mer. En av dessa två involverar enzymet cytokrom P450-aromatas som katalyserar konversionen av androgener till östrogener (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005). Hos människor har hormonstörande ämnen visat sig agera via flera mekanismer, däribland bindning till retinoidsyra-receptorer (RAR och RXR) (Klaassen & Watkins III 2010). Dessa receptorer är involverade i den andra troliga mekanismen bakom imposex. Utöver ovan nämnda finns det ytterligare tre mekanismer som kan förklara utvecklingen av imposex hos snäckdjur till följd av TBT-exponering. Dessa mekanismer utgår ifrån minskad eliminering av testosteron som sulfatkonjugat, inhibering av esterbildande enzym samt ökad frisläppning av neuropeptiden APGW-amid.

Syfte

Det har länge varit känt att TBT kan leda till hormonstörning vilket inducerar imposex hos exempelvis snäckor. Orsaken till detta händelseförlopp är dock oklar. Målet med denna uppsats är därför att undersöka mekanismerna som kan förklara att TBT leder till imposex inom klassen Gastropoda (snäckor).

TBT: egenskaper och användning

Tributyltenn (TBT) är en grupp av organiska tennföreningar vilka innehåller kolvätekedjor eller kolväteringar bundna till en tennjon (Sn^{4+}). TBT är en tri-substituerad tennförening med tre butylgrupper (4 kolatomer) bundna till tennjonen. Till tennjonen kan även en fjärde substituent binda, exempelvis klor (se figur 1) (Tjus 2014).



Figur 1. Strukturen för tributyltenn-klorid.

TBT är en biocid, vilken definieras som ”ett kemiskt eller biologiskt bekämpningsmedel som är avsett att förebygga eller motverka att djur, växter eller mikroorganismer, däribland virus, orsakar skada eller olägenhet för människors hälsa eller skada på egendom” (Kemikalieinspektionen 2011) och tillverkades till en början för att motverka snäckfeber orsakad av sugmaskslättet *Schistosoma* (Hedlund *et al.* 2014, Tjus 2014). Från och med 60-talet har TBT främst använts i båtbottenfärger för att undvika tillväxt av framförallt havstulpaner (Hedlund *et al.* 2014). Denna tillväxt hade lett till cirka 40 procent högre bränsleförbrukning för båtägare, vilket höjde koldioxidutsläppen samt ökade kostnaderna (Eliasson 2013). Dock var användare av färgen inte medvetna om de effekter som TBT skulle få och, på grund av dess egenskaper, fortfarande får (Hedlund *et al.* 2014, Tjus 2014).

Föreningar som är persistenta, bioackumulerande och toxiska, liksom TBT, bör enligt Tjus (2014) övervakas mycket noggrant. TBT binder till partiklar och lagras i bottensediment och nedbrytningshastigheten påverkas av bland annat syretillgång (Hedlund *et al.* 2014). I sediment, där syrehalten är låg, kan TBT lagras i upp till 90 år (Hedlund *et al.* 2014) medan nedbrytningen i vatten är snabbare (Alzieu 1998). Föreningens lipofila egenskaper resulterar i dålig vattenlöslighet och en lagring i fettvävnad hos organismer, vilket kan leda till en koncentrationsökning i näringskedjan (Alzieu 1998, Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005).

Endokrina system

Generella endokrina systemet

Hormonsystemet är uppbyggt av körtlar, såsom hypofys och testiklar, vilka utsöndrar kemiska signaler som kallas hormoner (Öberg & Håkansson 2000). Könshormoner är östrogener, progesteron och androgener (exempelvis testosteron) vilka alla tillhör gruppen steroidhormoner (Öberg & Håkansson 2000, Colman 2014). Dessa släpps från endokrina körtlar (testiklar och äggstockar) och frisläppningen av hormonerna kontrolleras av hypotalamus som producerar gonadotropinfrisättande hormoner (GnRH) (Öberg & Håkansson 2000, Klaassen & Watkins III 2010). GnRH når adenohypofysen som i sin tur frisläpper LH (könskörtelhormon som stimulerar ägglossning och androgenfrisläppning hos däggdjur) och FSH (follikelstimulerande hormon). Androgener och östrogener kan utföra negativ feedback på hypotalamus och adenohypofysen, vilket minskar frisättandet av GnRH, LH och FSH (Klaassen & Watkins III 2010).

Endokrina systemet hos snäckor

Hormonreceptorer i gonader har länge varit oidentifierade inom klassen snäckor (Graceli *et al.* 2013), men Hultin *et al.* (2014) har funnit en gen för östrogenreceptorer hos en art av sötvattensnäckor. Det krävs vidare forskning för att fastställa om liknande receptorer finns hos saltvattenlevande snäckor. Könsdifferentiering i många marina ryggradslösa djur har visat sig vara en plastisk process som styrs av hormoner (Garaventa *et al*. 2006), och könshormoner liknande de hos ryggradsdjur (till exempel testosteron och östradiol) har identifierats hos snäckor (Le Guellec *et al*. 1987). Testosteron verkar spela en viktig roll i exempelvis spermatogenes och könsutveckling hos snäckor (Gooding & LeBlanc 2001), och Spooner *et al.* (1991) visar bland annat att honor som utsätts för testosteron utvecklar sädesledare och penis.

TBT- ett hormonstörande ämne

Ett ämne som binder till en receptor och ger en respons, liknande den som till exempel hormonbindning ger, kallas agonist (Hine & Martin 2014). Antagonist är ett ämne som inhiberar effekten från agonister, till exempel genom att binda till samma receptor (Hine &

Martin 2014). Miljögifter kan efterlikna hormoner och kan vid bindning till receptorer leda till maskulinisering eller feminisering av organismer (Öberg & Håkansson 2000).

Det är allmänt accepterat inom detta forskningsområde att TBT skadar den reproduktiva funktionen hos organismer, bland annat genom utväxt av hanliga könsdelar hos honliga blötdjur (Abidli *et al.* 2012). Detta fenomen kallas imposex och tros vara en följd av hormonstörning (Bettin *et al.* 1996) och ökade testosteronnivåer har bland annat uppmätts hos honor från arten purpursnäcka utsatta för TBT (Spooner *et al.* 1991). Bettin *et al.* (1996) har utfört en studie på purpursnäcka och nätsnäcksarten *H. reticulata* för att ta reda på om effekterna av TBT följer av ökade testosteronnivåer. Resultaten styrker att imposex-utvecklingen är beroende av testosteronens bindning till receptorer. Dock råder det kontrovers om mekanismen bakom utveckling av imposex (Evans *et al.* 2000).

Imposex

Fenomenet imposex är även känt som pseudohermafroditism, vilket innebär att manliga könsdelar läggs till det honliga genitalsystemet (Oehlmann *et al.* 1998). År 2012 hade imposex identifierats hos cirka 200 snäckarter (Abidli *et al.* 2012), men forskning har visat att olika snäckarter genomgår olika antal steg vid utveckling av imposex. Hos den välstuderade arten purpursnäcka har tre steg observerats (Gibbs & Bryan 1986). I ett tidigt skede av imposex återfinns sädesledare och en liten penis, vilket följs av penistillväxt till liknande storlek som hos hannar. I det avslutande steget av imposex har den honliga könsöppningen helt överväxts av sädesledarvävnad.

VDS-index

Det finns flera grader av imposex som kan definieras utifrån olika index. Det mest användbara är ”vas deferens sequence” (VDS) index. Detta index består av 6 steg med flera understeg (Bettin *et al.* 1996) och ger en uppskattning om i vilken grad honor utvecklat penis samt sädesledare, och därmed i vilken utsträckning en reduktion av antalet reproduktiva honor skett (Oehlmann *et al.* 1998). Steg 0 är honor utan tecken på hanliga karaktärer och steg 4 är det sista fertila steget av imposex (Bettin *et al.* 1996). Honorna har då penis och komplett sädesledare, vilka i senare steg växer över vaginan och leder till infertilitet (Bettin *et al.* 1996). Enligt Oehlmann *et al.* (1998) är VDS-indexet det mest fördelaktiga för mätning av imposex, eftersom det inte påverkas av säsong. Hanliga penisar hos nätsnäckan *Hinia incrassata* är längst under tidig vår på grund av parningssäsong och index som utgår från en jämförelse mellan penislängd hos honor och hanar blir därmed beroende av årstid (Oehlmann *et al.* 1998).

Imposex som biomarkör

Effekterna av TBT har kartlagts hos många snäckarter och utbredningen av imposex inom populationer har använts som en biomarkör för TBT-kontamineringen (Garaventa *et al.* 2006). En biomarkör är en indikator på ett visst biologiskt förhållande (Malmquist 2014). Forskning har dock visat att effekterna av TBT kan vara artspecifika samt att inte enbart TBT leder till imposex (Evans *et al.* 2000).

Köns- och artspecifika effekter

TBT tros ha könsspecifika effekter, eftersom det hos hannar inte uppmätts ändring i steroidhormonnivåer (Abidli *et al.* 2012). Två arter inom ordningen neogastropoda utvecklade imposex efter TBT-inducering, men olika nivåer av steroider uppmättes (Abidli *et al.* 2012). Detta tyder på att TBT även kan ha artspecifika effekter.

Fler orsaker till imposex
Det råder enighet om att TBT är huvudorsaken till utveckling av imposex, men studier har visat att TBT inte behöver vara den enda orsaken (Evans *et al.* 2000). Exponering för tungmetaller, exempelvis koppar, samt en ändrad miljö har lett till imposex hos snäckarten *Lepsiella vinosa* (Nias *et al.* 1993). Även nonylfenol, vilket är ett ämne som liknar östrogen, har visat sig leda till inducering av imposex inom neogastropoda (Evans *et al.* 2000). Andra studier har motsatta resultat och visar på att östrogener inhiberar utveckling av imposex (Bettin *et al.* 1996).

Fem mekanismer bakom imposex

Som tidigare nämnts är den huvudsakliga förklaringen till imposex oklar. Det finns fem hypotetiska mekanismer, där två stycken är mer undersökta. Dessa är aromatasinhibering och påverkan på retinoid X-receptorns signaleringsväg (Stange *et al*. 2012). Nishikawa *et al.* (2004) skriver att det är oklart om organiska tennföreningar fungerar som agonister för kärnreceptorer eller inhibitorer av enzym som metaboliserar androgener i snäckor. Nedan följer en förklaring av varje mekanism.

Mekanism 1. Aromatasinhibering
Bakgrund till mekanismen
Den första mekanismen utgår ifrån fas I-metabolism av testosteron, vilket är en metabolisk aktivitet som involverar cytokrom P450-enzym och reduktaser (Oberdörster *et al.* 1998). TBT har visat sig störa testosteronmetabolismen (Spooner *et al.* 1991) och hypoteser har uppkommit om en möjlig inhibering av enzymet som omformar testosteron till östradiol: cytokrom P450-aromatas (Oberdörster & McClellan-Green 2002).

Cytokrom P450-aromatas är ett ryggradsdjursenzym (Ronis & Mason 1996) som katalyserar konversionen (aromatiseringen) av androgener till östrogener (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005). För att veta om ett ämne är hormonstörande undersöks ofta aromatasaktiviteten i den exponerade organismen (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2005).

Hur påverkar TBT aromatasaktiviteten?
TBT har visat sig blockera cytokrom P450-aromatas som katalyserar aromatisering av androgener till östrogener, vilket leder till förhöjda halter av testosteron (Bettin *et al*. 1996). En tillsatts av aromatasinhibitorn SH 489 till purpursnäckor och nätsnäcksarten *H. reticulata* har visat sig leda till liknande imposex-inducering som vid TBT-exponering (Bettin *et al.* 1996). För att undersöka om testosteronet har en avgörande roll i imposex-inducering har studier gjorts där snäckor exponerats för testosteron och där resultatet blev en utveckling av imposex (Bettin e*t al.* 1996).

Testosteron omformas till östradiol och en inhibering av aromatas torde leda till en minskning av östradiol. Flera studier visar dock att detta inte är fallet. TBT hade ingen effekt på östradiol-nivåerna hos purpursnäckor (Bettin *et al.* 1996, Spooner *et al.* 1991). Hos nätsnäcksarten *H. reticulata* återfanns istället en ökning av östradiol (Bettin *et al.* 1996). Abidli *et al.* (2012) visar i sin studie att östrogennivåerna, hos honor från arterna *Hexaplex trunculus* och *Bolinus brandaris* utsatta för TBT, ökade eller var oförändrade. Studier på nätsnäcksarten *Ilyanassa obsoleta* visar också på oförändrade östrogennivåer (Oberdörster & McClellan-Green 2002). För att undersöka om imposex utvecklas till följd av rubbad balans mellan testosteron och östradiol utsatte Bettin *et al.* (1996) purpursnäckor och nätsnäcksarten *H. reticulata* för en blandning av TBT och östrogen. Det visade sig att östrogenet upphävde

inducerat imposex hos båda arterna.

Androgena receptorer
Då de ändrade testosteronnivåerna tros inducera imposex har studier gjorts på vilket roll androgenreceptorerna spelar. Stange *et al*. (2012) använde i sin studie på purpursnäcka en kombination av androgenantagonisten cyproteronacetat (CPA) och TBT. Resultaten blev låga nivåer på VDS-index för de flesta honor och detta tyder på att CPA kan motverka imposex-utveckling hos TBT-exponerade snäckor. Liknande resultat ficks i en studie av Bettin *et al.* (1996) på purpursnäcka och nätsnäcksarten *H. reticulata*. Även hos dessa arter inhiberade CPA imposex-inducering av TBT.

Mekanism 2. Inhibering av esterbildande enzym (ATAT)
Bakgrund till mekanismen
Den andra mekanismen utgår ifrån fas II-metabolism och är beroende av transferaser (Oberdörster *et al.* 1998) för att bilda opolära fettsyrakonjugat (estrar) för lagring i organismen (Janer *et al.* 2005). Transferaser är enzym som överför atomgrupper mellan molekyler (Hine & Martin 2014). Fritt testosteron konverteras till estrar och lagras (Abidli *et al.* 2012) och esterbildning av testosteron och östradiol med fettsyror är viktig för att kontrollera hormonnivåer hos snäckor (Gooding & LeBlanc 2001, Janer *et al.* 2005).

Hur påverkar TBT esterbildningen?
TBT stör esterbildningen genom att inhibera acylkoenzym A: testosteron acyltransferas (ATAT), vilket är enzymet som ansvarar för esterbildningen (Gooding *et al.* 2003). Detta kan leda till obalans i steroidhormonnivåer, bland annat genom en ökning av fritt testosteron hos honor (Abidli *et al.* 2012). En studie gjord på nätsnäckan *I. obsoleta* visar att testosteron lagras som icke-polära estrar i organismen (Gooding & LeBlanc 2001) och att den totala testosteronmängden inte ökar vid exponering för TBT, men att andelen fritt testosteron blir högre (Gooding *et al.* 2003).

Mekanism 3. Minskad bildning av sulfatkonjugat för eliminering
Bakgrund till mekanismen
Mekanism tre utgår även den ifrån fas II-metabolism, men är istället beroende av transferaser (Oberdörster *et al.* 1998) för bildning av polära metaboliter för eliminering (Janer *et al.* 2005). Steroider, däribland testosteron, bildar bland annat konjugat med sulfat (Janer *et al.* 2005).

Hur påverkar TBT testosteroneliminerings?
Hos vanlig strandsnäcka (*Littorina littorea*) har TBT visat sig påverka elimineringen av testosteron genom att inhibera transformeringen till vattenlösliga polära metaboliter, såsom sulfat- och glukoskonjugat (Ronis & Mason 1996). Detta leder till en ökning av fritt testosteron. Hos vanlig strandsnäcka skedde en minskad eliminering av testosteron i form av sulfatkonjugat hos individer utsatta för TBT (Ronis & Mason 1996). Studier på andra arter har inte lett fram till samma slutsats.

Nätsnäckan *I. obsoleta* eliminerar inte testosteron som sulfatkonjugat utan behåller det som estrar (Gooding & LeBlanc 2001). Flera studier på *I. obsoleta* har visat att testosteron främst metaboliseras av reduktaser för att bilda reducerade föreningar och en minskad reduktasaktivitet hos snäckor med imposex ledde till en ackumulering av ometaboliserat testosteron (Oberdörster *et al.* 1998).

Mekanism 4. Onormal frisläppning av APGW-amid

Bakgrund till mekanismen

Hormoner som är peptider eller polypeptider kallas peptidhormoner och många av dessa fungerar som neurotransmittorer (Colman 2014). I mollusker kontrolleras sexuell differentiering av peptidhormoner (Oberdörster & McClellan-Green 2000). Neurohormon är hormoner som utsöndras från nervceller (Hine & Martin 2014) och den så kallade ”penis-tillväxt-faktorn” (PMF) är ett neurohormon som visat sig kunna inducera imposex i honliga snäckor (Oberdörster & McClellan-Green 2002). PMF tros kontrollera initial tillväxt av hanliga gonader medan androgena steroider utsöndrade från gonaderna upprätthåller könsdelarnas funktion via positiv feedback (Oberdörster & McClellan-Green 2000). Detta liknar peptidhormonkontrollen i ryggradsdjur, där peptiderna FSH och LH stimulerar bland annat östrogen- och progesteronproduktion (Klaassen & Watkins III 2010).

Inom forskningen kring imposex används termen ”neuropeptid” vilken syftar till ett peptidhormon som styr kommunikationen mellan nervceller. En naturlig PMF i snäckarten *I. obsoleta* är neuropeptiden APGW-amid som agerar neurotransmittor och har visat sig leda till imposex (Oberdörster & McClellan-Green 2000). APGW-amiden har hittats i celler i det centrala nervsystemet samt i hanliga reproduktionsorgan och är en tetrapeptid med sekvensen Ala-Pro-Gly-Trp (Favrel & Mathieu 1996).

Hur påverkar TBT frisläppning av APGW-amid?

Studier har visat att TBT lokaliseras till nervsystemet hos purpursnäckan (Bryan *et al.* 1993) samt att TBT har neurotoxisk verkan och kan leda till att APGW-amid frisläpps (Oberdörster & McClellan-Green 2002). Forskare har dragit slutsatsen att neuropeptiden APGW-amid kan inducera imposex i samma utsträckning som TBT och testosteron, samt att induceringen av imposex påverkar biosyntesen av steroidhormoner (Oberdörster & McClellan-Green 2000).

Hos snäckor höjs inte testosteronkoncentrationerna förrän efter inducering av imposex och östrogener kan motverka inducering av imposex (Bettin *et al.* 1996). Förklaringen till ökade testosteronnivåer först efter imposex-inducering är enligt Oberdörster *et al.* (1998) att neurohormoner initierar manlig organdifferentiering (exempelvis prostata och sädesledare) och dessa organ är sedan ansvariga för de höjda steroidnivåerna.

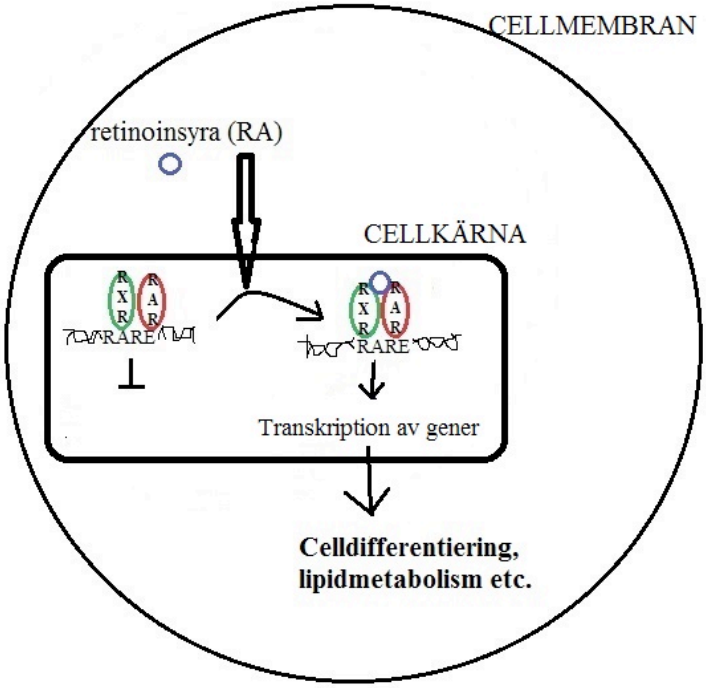
I *I. obsoleta* genomgår hanarna en säsongsberoende tillväxt av penis vilken kontrolleras av PMF (Oberdörster *et al.* 2005). Studier har visat att imposex hos honor inte kan induceras under pågående häckningstid och detta skulle kunna bero på att signalering av polypeptidhormon såsom ”äggläggningshormon” är starkare än den TBT-inducerade signaleringen (Oberdörster *et al.* 2005).

Mekanism 5. Aktivering av retinoid-X-receptorn (RXR)

Bakgrund till mekanismen

Retinoid-receptorer är kärnreceptorer inom familjerna RAR (retinoinsyra-receptorer) och RXR (retinoid-X-receptorer) vilka är viktiga transkriptionsfaktorer (Öberg & Håkansson 2000, Lefebvre *et al.* 2010). Retinoinsyra (RA) är en metabolit av vitamin A och den främsta signalerande formen av retinoider (Öberg & Håkansson 2000). Retinoider upprätthåller bland annat normal tillväxt och reproduktionsförmåga, och hos ryggradsdjur är de viktiga genreglerare genom att binda till RAR och RXR (Öberg & Håkansson 2000). RXR är kärnreceptorer som agerar transkriptionsfaktorer genom att binda till specifika DNA-sekvenser och aktiveras av exempelvis retinoiden 9-*cis*-RA (se figur 2) (Offermanns 2008). Alla kärnreceptorer har ett specifikt bindningsställe för ligander (Offermanns 2008).

RXR bildar dimerer med andra RXR (homodimer) eller med en annan typ av kärnreceptor, till exempel RAR (heterodimer) (Dawson & Xia 2012). Det finns flera RXR-isotyper och på grund av detta samt RXRs förmåga att bilda dimerer, är dessa receptorer inblandade i många cellulära processer såsom cellökning och lipidmetabolism (Allenby *et al.* 1993, Lefebvre e*t al.* 2010).



Figur 2. Retinoid-signalering i en ryggradsdjur-cell: Heterodimer av RAR och RXR binder till RARE (=retinoidsyra-respons-element), vilket är en kort DNA-sekvens. RA agerar ligand för transkriptionsfaktorn RAR-RXR och vid bindning av RA startar gentranskription. Detta kan bland annat leda till celldifferentiering och lipidmetabolism (Omritad efter Blum & Begemann 2013).

Lagring av retinoider

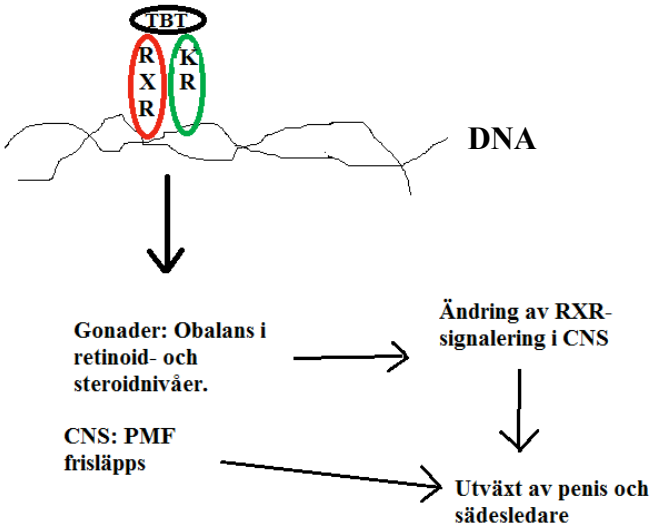
Länge var retinoidsystemet enbart identifierat hos ryggradsdjur, men snäckarten *Osilinus lineatus* har visat sig ha förmågan att lagra retinoider som retinylestrar, vilket är viktigt för att behålla kontroll över retinoidnivåer (Gesto *et al.* 2012, Gesto *et al.* 2013). Dock har studier på purpursnäcka visat att denna art inte kan lagra retinoider som retinylestrar (Gesto *et al*. 2013), vilket kan hindra upprätthållandet av retinoidnivåer. Detta kan påverka bindningsfrekvensen av RXR-agonister såsom TBT (Gesto *et al.* 2013). Hos *O. lineatus* hittades retinylester enbart hos hanar, vilket tyder på att dessa föreningar är könsspecifika och har en roll i testikelutveckling (Gesto e*t al.* 2012).

Hur påverkar TBT retinoid-X-receptorn?

Den ligandbindande domänen på RXR i snäckarten *Thais clavigera* liknar ryggradsdjurens och både TBT och 9-*cis*-RA har visat sig binda till detta område och leda till imposex (Nishikawa *et al.* 2004). Imposex-utvecklingen tros börja med en aktivering av RXR vilket leder till en signalkaskad (Castro *et al.* 2007). TBT har visat sig vara en RXR-agonist hos både ryggradsdjur och ryggradslösa djur (Nishikawa *et al*. 2004, Gesto *et al.* 2013) och aktiverar receptorn genom bindning. Detta leder till transkription och bildning av mRNA och studier har gjorts på detta mRNA (Lima *et al.* 2011). TBT har visat sig öka transkriptionen i penisbildningsområdet hos honliga purpursnäckor och mRNA-nivåerna för honor på de övre VDS-stegen var lika höga som hos normala hannar (Lima *et al.* 2011). Studier har visat på en korrelation mellan penislängd hos honor och RXR-gentranskription i penis och området där

penis bildas (Abidli *et al.* 2013). Gesto *et al.* (2012) har funnit att även injektion av 9-*cis*-RA i *O. lineatus* leder till penisutveckling hos honor och längre penis hos hanar.

En hypotetisk mekanism för TBT-inducerat imposex (se figur 3) lades fram i en studie av Lima *et al.* (2011). När TBT binder till RXR i gonader påverkar det gener som kodar för bildning av retinoider och steroider, vilket leder till obalans i hormonnivåer. Detta kan i sin tur leda till ändring av RXR-signaleringen i CNS och påverka utväxt av hanliga könsorgan till följd av frisläppning av PMF. Hos hanar är PMF-kodande gener under kontroll av RXR-signalering och en frisläppning av PMF initierar en kaskad av händelser som leder till utväxt av penis och sädesledare. I normala honor är PMF-kodande gener avstängda i frånvaro av en RXR-ligand. När TBT binder till RXR i CNS hos honor leder det till en aktivering av signaleringsvägen som påverkar bildning och frisläppning av PMF.



Figur 3. Hypotetisk mekanism för TBT-inducerat imposex. KR står för ”kärnreceptor”. Den primära effekten är beroende av om TBT binder till RXR bundet till DNA i gonad- eller centrala nervceller, medan den slutliga effekten är densamma för båda celltyperna.

RXR-antagonister och agonister

Antagonister kan inhibera aktiveringen av kärnreceptorn RXR och HX531 är en RXR-antagonist (Kanayasu-Toyoda *et al.* 2005) som har använts i studier för att undersöka förhindring av effekter från TBT (Stange *et al.* 2012). I en studie på purpursnäcka kunde inte HX531 motverka effekterna av TBT (Stange e*t al*. 2012). I samma studie användes den naturliga liganden 9-*cis*-RA och en syntetisk RXR-agonist (HX630). HX630- och TBT-behandlade grupper visade en utveckling av imposex, i form av ökat VDS, och RXR-antagonisten HX531 kunde upphäva HX630-inducerat imposex (Stange *et al.* 2012). Metofensyra är en annan RXR-agonist, vilken även den har visat sig inducera imposex hos snäckarter (Castro *et al.* 2007). Studier på snäckarterna *T. clavigera* (Nishikawa *et al.* 2004), purpursnäcka och stor nätsnäcka (*Nassarius reticulatus*) (Castro *et al.* 2007) visar att injicering av 9-*cis*-RA leder till utveckling av imposex hos honliga snäckor. I andra studier har den naturliga RXR-liganden, 9-*cis*-RA, inte lett till imposex (Oehlmann *et al.* 2007, Stange *et al.* 2012).

Diskussion

Det råder inget tvivel om att TBT-exponering leder till imposex (Bryan *et al.* 1986). Imposex har dock visat sig vara en indirekt effekt av TBT, då det tros vara de rubbade hormonnivåerna

som leder till utveckling av hanliga könsdelar hos honliga individer av snäckor (Bettin *et al.* 1996). Bindningen av testosteron till receptorer är avgörande för imposex-utveckling (Bettin *et al.* 1996, Oberdörster *et al.* 1998) och imposex används som biomarkör för TBT-kontaminering (Garaventa *et al.* 2006). Det är trots detta viktigt att vara medveten om att imposex kan vara en effekt av andra ämnen än TBT (Nias *et al.* 1993, Evans *et al.* 2000) samt att TBT har visat sig ha art- och könsspecifika effekter (Abidli *et al.* 2012). Motstridiga resultat finns också kring om antiandrogener, såsom östrogen, inhiberar eller aktiverar utvecklingen av imposex. I en studie utförd på purpursnäcka och nätsnäcksarten *H. reticulata* inhiberade östrogener utvecklingen av imposex (Bettin *et al.* 1996) medan en annan studie på purpursnäcka visade att ett ämne som härmar östrogen ledde till inducering av imposex (Evans *et al.* 2000). Mekanismerna bakom de rubbade hormonnivåerna och inducering av imposex, till följd av TBT-exponering, är flera. I diskussionen som följer kommer motstridiga resultat kring dessa teorier att behandlas.

Mekanism 1. Aromatasinhibering

En av de första förklaringar som lades fram kring mekanismen bakom inducering av imposex var aromatasinhibering, vilken leder till ökade nivåer av fritt testosteron (Bettin *et al.* 1996, Oberdörster & McClellan-Green 2002). Om imposex kan induceras av aromatasinhibering bör en aromatasinhibitor leda till imposex och en studie på purpursnäcka och nätsnäckan *H. reticulata* visade att aromatasinhibitorn SH 489 ledde till imposex i samma grad som TBT (Bettin *et al.* 1996). Denna inhibitor har lägre styrka än TBT (Oberdörster e*t al.* 1998), vilket tyder på att flera mekanismer borde vara inblandade för att ge samma effekt. Resultatet kan även peka mot att TBT verkar genom en annan mekanism än aromatasinhibering.

Påverkan på östrogennivåer

En inhibering av aromatas bör inte enbart öka mängden fritt testosteron utan även påverka östrogennivåerna. Dock verkar det enbart vara förhållandet mellan hormonerna som ändras (Bettin *et al.* 1996). En minskning av östrogennivåerna är att förvänta eftersom konvertering av testosteron till östrogen inte kan ske om aromatas är inhiberat. Flera studier har istället visat att östrogennivåerna höjs eller inte förändras (Spooner *et al.* 1991, Bettin e*t al.* 1996, Oberdörster & McClellan-Green 2002, Abidli *et al.* 2012) och imposex-utveckling skulle därmed kunna bero av de höjda östrogennivåerna. Studier har dock fokuserat på den ökade andelen fritt testosteron.

Om de rubbade testosteronnivåerna är en orsak till imposex torde halterna av fritt testosteron öka innan imposex utvecklas. Detta är inte vad studier visat. Snäckor i tidiga stadier av imposex hade inte högre testosteronnivåer än kontrollorganismerna (Oberdörster e*t al.* 1998) och ökade testosteronnivåer uppmättes först när penis och sädesledare var väl synliga (Spooner *et al.* 1991, Bettin e*t al.* 1996). Dessa resultat visar på bristerna i aromatasinhiberingsteorin. En inhibering av aromatas till följd av TBT-exponering torde leda till ökade nivåer av testosteron redan innan imposex. Det finns även studier som visar att aromatiseringen av testosteron enbart står för en liten del av testosteronmetabolismen (Ronis & Mason 1996) och aromatasinhiberingen kan därför inte helt beskriva ackumuleringen av testosteron.

Mekanism 2. Inhibering av ATAT

Esterbildning av testosteron och östradiol med fettsyror har visat sig vara betydande för att upprätthålla stabila hormonnivåer hos snäckor (Gooding & LeBlanc 2001, Janer *et al.* 2005). En förklaring till de ökade testosteronnivåerna utgår ifrån inhibering av esterbildande enzym (ATAT) och styrks av studier som visar att den totala testosteronmängden inte ökar vid

exponering för TBT, utan enbart andelen fritt testosteron (Gooding *et al.* 2003). Om TBT inhiberar ATAT torde esterbildning och lagring av testosteron minska, vilket leder till ökad andel fritt testosteron. Orsaken till den höjda halten testosteron vid imposex har dock visat sig vara artspecifik.

Studier på nätsnäckan *I. obsoleta* visar att eliminering av testosteron som polära derivat (till exempel sulfatkonjugat) inte sker, utan testosteron lagras i organismen som icke-polära estrar (Gooding & LeBlanc 2001). Detta innebär att imposex orsakat av höjda nivåer av fritt testosteron inte beror av minskad metabolisk eliminering av testosteron, utan istället av störning i testosteronlagringen. Dock visar en annan studie att TBT inte ökar fria testosteronnivåer genom att inhibera ATAT, då konversionen till estrar var densamma i både behandlade och icke-behandlade snäckor (Gooding *et al.* 2003). Detta tyder på att en reducerad esterbildning inte behöver vara den direkta orsaken till imposex. Testosteron är ett förstadium till östradiol (Gooding *et al.* 2003) och en ökad testosteronhalt kan därmed leda till ökad bildning av östradiol, vilket kan vara den slutgiltiga regulatorn av könsutvecklingen.

Mekanism 3. Minskad bildning av sulfatkonjugat för eliminering
I en studie på vanlig strandsnäcka presenteras resultat kring om förmågan att bilda lätteliminerade konjugat med sulfat påverkar testosteronnivåerna (Ronis & Mason 1996). TBT visade sig inhibera konjugatbildningen (Ronis & Mason 1996). Dock har studier på nätsnäckan *I. obsoleta* visat att denna art enbart eliminerar en liten del av testosteronet som polära sulfatkonjugat (Oberdörster e*t al.* 1998), jämfört med vanlig strandsnäcka där konjugeringen var majoriteten av testosteronmetabolismen. Nätsnäckan *I. obsoleta* har även visat sig kunna lagra testosteronet som estrar (Gooding & LeBlanc 2001). De motstridiga resultaten tyder på att det finns skillnader mellan arter i deras eliminering och lagring av testosteron samt att en minskning av sulfatkonjugat-bildning inte bör vara den enda mekanism som leder till höjda testosteronnivåer till följd av TBT-exponering.

Mekanism 4. Onormal frisläppning av APGW-amid
APGW-amid är en naturlig form av neurohormonet PMF som påverkar tillväxt av hanliga könsdelar och har visat sig kunna inducera imposex hos honliga snäckor (Oberdörster & McClellan-Green 2000, Oberdörster & McClellan-Green 2002). PMF kontrollerar den initiala tillväxten av hanliga könsdelar och androgena steroider påverkar delarnas funktion genom positiv feedback (Oberdörster & McClellan-Green 2000). Detta system liknar ryggradsdjurens (Klaassen & Watkins III 2010) och det är därför inte otroligt att en liknande peptidhormonkontroll för frisläppning av steroidhormoner återfinns hos snäckor. Forskning har visat att testosteronkoncentrationen höjs först i senare steg av imposex (Bettin *et al.* 1996) och förklaringen har varit att APGW-amid startar utväxt av manliga könsdelar och att dessa organ sedan producerar steroider (Oberdörster *et al.* 1998). Motstridiga resultat återfinns i studier på *B. brandaris* (Santos *et al.* 2006). APGW-amiden leder inte till imposex i denna art och liknande resultat har fåtts i studier på purpursnäcka (Castro *et al.* 2007). För att undersöka om TBT har en neurotoxisk verkan och påverkar frisläppandet av APGW-amiden har acetylkolinesterasaktiviteten studerats.

En viktig signalsubstans i nervsystemet är acetylkolin och acetylkolinesteras är ett enzym som bryter ner acetylkolin (Colman 2014). Santos *et al.* (2006) använde acetylkolinesterasaktiviteten som biomarkör för TBTs neurotoxicitet och studien visade att acetylkolinesterasaktiviteten inte påverkades (Santos *et al.* 2006). Dock har andra studier visat att TBT har neurotoxisk verkan och leder till att APGW-amid frisläpps (Oberdörster & McClellan-Green 2002).

Forskningen kring TBTs neurotoxiska verkan har breddats genom att involvera flera ämnen. Santos *et al.* (2006) använde en blandning av TBT och TPT (trifenyltenn) vilket gav synergistiska effekter (den sammanlagda effekten är större än summan av de två separata effekterna) (Klaassen & Watkins III 2010) och ledde till imposex. Ovanstående diskussion tyder på att fler ämnen än TBT kan inducera imposex, att APGW-amid har artspecifika effekter samt att TBT inte har neurotoxisk verkan i alla arter.

Mekanism 5. Aktivering av RXR

Retinoid-X-receptorn (RXR) hos ryggradslösa djur har visat sig ha stora likheter med ryggradsdjurens (Nishikawa *et al.* 2004) och lagring av retinoider i form av retinylestrar hos snäckor är viktig för att upprätthålla retinoidnivåer (Gesto *et al.* 2012, Gesto *et al.* 2013). Denna förmåga har inte hittats hos exempelvis purpursnäcka (Gesto e*t al.* 2013) vilket kan innebära att denna art är mer känslig för RXR-agonister.

Bindning av agonister kan motverkas av antagonister. HX531 är en RXR-antagonist (Kanayasu-Toyoda *et al.* 2005) och torde därmed kunna motverka bindning av agonister till RXR. Det har dock visat sig att imposex induceras trots att snäckorna utsätts för HX531 och TBT samtidigt (Stange e*t al*. 2012). Förutom TBT har även RXR-agonisterna HX630 och metofensyra visat sig leda till imposex (Castro *et al.* 2007, Stange *et al.* 2012). Då HX531 inte kunde motverka effekterna av TBT bör inte RXR-signaleringsvägen vara den enda mekanism som driver imposex-inducering. HX531 har dock visat sig kunna häva effekten av den syntetiska RXR-agonisten HX630 (Stange *et al.* 2012). Kanske pekar detta mot att TBT är en starkare agonist än HX630. Dock leder de båda till imposex och torde därmed verka via samma signalvägar. För att vidare undersöka inblandningen av RXR i imposex-inducering har forskning gjorts på den naturliga RXR-liganden 9-*cis*-RA.

Studier kring inducering av imposex av 9-*cis*-RA har motstridiga resultat. Vissa studier visar att denna retinoid inte leder till imposex (Oehlmann *et al.* 2007, Stange *et al.* 2012) medan andra istället kommer fram till det motsatta (Nishikawa *et al.* 2004, Castro *et al.* 2007). Detta kan bero på skillnader mellan arter. Till exempel kan purpursnäcka inte lagra retinoider (Gesto *et al*. 2013) vilket kan leda till högre mottaglighet för effekterna av agonisters bindning till RXR. På grund av en inducering av imposex både vid exponering för en naturlig RXR-ligand (9-*cis*-RA) och RXR-agonisten TBT har vissa forskare dragit slutsatsen att RXR är inblandad i imposex-utveckling. Det är här intressant att poängtera att den naturliga RXR-liganden 9-*cis*-RA har visat sig leda till imposex hos vissa arter, men inte hos andra.

Är någon mekanism mer trolig?

Det råder en oklarhet kring om TBT fungerar som agonist för kärnreceptorer eller inhibitor av enzymer som metaboliserar androgener i snäckor. Utifrån diskussionen ovan kring de fem mekanismerna verkar några mer rimliga än andra. Aromatasinhibering har visat sig vara mindre trolig främst på grund av att östrogennivåer inte ändras. Ökningen av fritt testosteron skulle kunna förklaras av en inhibering av esterbildande enzym (ATAT). Dock har studier visat att orsaken till denna testosteronhöjning inte beror av en inhibering av ATAT (Gooding *et al.* 2003). Eliminering av testosteron som sulfatkonjugat har enbart visat sig vara en viktig mekanism hos vanlig strandsnäcka (Ronis & Mason 1996). Andra arter behåller istället testosteron som estrar. APGW-amid är en neuropeptid som kan leda till imposex hos snäckor, men resultaten är motstridiga. Denna mekanism har förklarat de höjda testosteronnivåerna som en följd av utväxt av hanliga könsdelar. Detta är troligt då testosteronhalterna har visat sig vara höga först i senare steg av imposex (Bettin *et al.* 1996). Dock ger denna teori få svar

kring hur TBT skulle kunna leda till frisläppning av neuropeptiden APGW-amid.

Mekanismen som har studerats mest på senare tid är RXR-teorin. Bindning av TBT till transkriptionsfaktorn RXR tros leda till ökad transkription av gener som kodar för att neurohormon frisläpps, vilket leder till utväxt av penis och sädesledare. Dessa organ producerar sedan testosteron och de höjda nivåerna av testosteron upprätthåller utvecklingen av imposex.

Samverkan mellan mekanismer
Förmodligen orsakas imposex av en samverkan mellan flera mekanismer och det är därför svårt att dra en slutsats kring vad som egentligen orsakar imposex. Dock har det visats att testosteronhalterna spelar en avgörande roll (Bettin *et al.* 1996). Studier har haft olika fokus kring sin beskrivning av orsaken till de ökade testosteronhalterna, där vissa utgår ifrån att TBT stör eliminering, omformning och lagring av testosteron. Om de höjda testosteronhalterna inducerar imposex torde nivåerna av fritt testosteron vara höga redan innan imposex-utveckling. Detta styrks inte av gjorda studier (Bettin *et al* 1996).

Den mekanism som involverar RXR baseras inte främst på de höjda testosteronhalterna och är den mest troliga. Detta grundar sig främst på att RXR har en betydande roll i tillväxt av hanliga genitalier i honliga snäckor (Nishikawa e*t al.* 2004) samt att de höjda halterna av testosteron inte torde kunna inducera imposex om de återfinns först efter att imposex-utvecklingen har börjat. I RXR-teorin är de ökade testosteronnivåerna snarare en effekt av imposex än en orsak till fenomenet. Dock har hypotetiska mekanismer formulerats (se figur 3) (Lima *et al.* 2011) som visar att ökade retinoid- och steroidnivåer, till följd av bindning av TBT till RXR i gonaderna, kan leda till en ändring i RXR-signaleringen och öka frisläppningen av PMF. PMF leder i sin tur till utveckling av manliga könsorgan. Om TBT istället binder till RXR i centrala nervsystemet utsöndras PMF vilket leder till utväxt av hanliga könsorgan, vilka sedan bildar testosteron. Utifrån detta går att säga att testosteronnivåerna förmodligen är delvis inblandade i imposex-utveckling, men att imposex kan utvecklas enbart genom bindning av TBT till RXR i centrala nervsystemet.

Slutligen kan konstateras att TBT som släpps ut i naturen leder till många effekter på miljö och organismer samt att dessa effekter inte går att förutse. Imposex-inducering hos snäckor, till följd av främst TBT i båtbottenfärger, är enbart ett exempel på vad mänsklig aktivitet kan leda till. Trots att forskning inom detta område pågått länge, krävs fortsatta studier kring mekanismerna bakom imposex. Detta på grund av att höga halter av TBT fortfarande kvarstår i vatten och sediment. Vidare studier krävs bland annat på hur hormonsystemet är uppbyggt hos snäckor samt kring hur lagring av retinylestrar påverkar känsligheten för RXR-agonister. Detta skulle leda till en större kännedom om hur organismer påverkas av mänsklig aktivitet.

Tack

Jag vill tacka min handledare Tatjana Haitina för givande diskussioner och råd samt mina studiekamrater Isac Söderlund, Elin Ljunggren och Ingrid Lekberg för värdefulla kommentarer.

Referenser

Abidli S, Santos MM, Lahbib Y, Castro CLF, Reis-Henriques MA, El Menif NT. 2012. Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda:

Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. Ecological Indicators **13**: 13-21.
Abidli S, Castro CLF, Lahbib Y, Reis-Henriques MA, El Menif NT, Santos MM. 2013. Imposex development in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Caenogastropoda) involves changes in the transcription levels of the retinoid X receptor (RXR). Chemosphere **93**: 1161-1167.
Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Toxicological profile for tin and tin compounds. U.S. Department of Health and Human Services. WWW-dokument: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp55.pdf. Hämtad: 2014-11-08.
Allenby G, Bocquel M-T, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo FJ, Chambon P, Levin AA. 1993. Retinoid acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids. Biochemistry **90**: 30-34.
Alzieu C. 1998. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. Ocean & Coastal Management **40**: 23-36.
Bettin C, Oehlmann J, Stroben E. 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by increasing androgen level. Helgoländer Meeresuntersuchungen **50**: 299-317.
Bryan GW, Gibbs EP, Hummerstone LG, Burt GR. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the UK **66**: 611-640.
Bryan GW, Bright DA, Hummerstone LG, Burt GR. 1993. Uptake, tissue distribution and metabolism of ^{14}C-labelled tributyltin (TBT) in the dog-whelk, *Nucella lapillus*. Journal of the Marine Biological Association of the UK **73**: 889-912.
Blum N, Begemann G. 2013. The roles of endogenous retinoid signaling in organ and appendage regeneration. Cellular and molecular life sciences **70**: 3907-3927.
Castro CLF, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, Nakanishi T, Reis-Henriques MA, Santos MM. 2007. Imposex induction is mediated through the retinoid X receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus.* Aquatic Toxicology **85**: 57-66.
Colman MA. 2014. A Dictionary of Psychology. 3:e uppl. Oxford University Press, doi 10.1093/acref/9780199534067.001.0001
Dawson IM, Xia Z. 2012. The retinoid X receptors and their ligands. Biochimica et Biophysica Acta **1821**: 21-56.
Dear BCI, Kemp P. 2007. The Oxford Companion of Ships and the Sea. 2:a uppl. Oxford University Press, doi 10.1093/acref/9780199205684.001.0001
Eliasson C. 2013. Båtägare kan slippa havstulpaner med ny miljövänlig metod. WWW-dokument 2013-06-25:http://www.science.gu.se/aktuellt/nyheter/Nyheter+Detalj/batagare-kan-slippa-havstulpaner-med-ny-miljovanlig-metod-.cid1175568. Hämtad: 2014-10-30.
Evans SM, Kerrigan E, Palmer N. 2000. Causes of Imposex in the Dogwelk *Nucilla lapillus* (L.) and its Use as a Biological Indicator of Tributyltin Contamination. Marine Pollution Bulletin **40**: 212-219.
Favrel P, Mathieu M. 1996. Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Neuroscience letters **205**: 210-214.
Garaventa F, Faimali M, Terlizzi A. 2006. Imposex in pre-pollution times. Is TBT to blame? Marine Pollution Bulletin **52**: 696-718.
Gesto M, Castro CLF, Reis-Henriques MA, Santos MM. 2012. Retinol Metabolism in the mollusc *Osilus lineatus* indicate an ancient origin for retinyl ester storage capacity. PLOS ONE, doi: 10.1371/journal.pone.0035138.
Gesto M, Castro CLF, Santos MM. 2013. Differences in retinoid levels and metabolism among gastropod lineages: Imposex-susceptible gastropods lack the ability to store

retinoids in the form of retinyl esters. Aquatic toxicology **142-143**: 96-103.
Gibbs EP, Bryan WG. 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus,* caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **66**: 767-777.
Gooding PM, LeBlanc AG. 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsolete*. General and Comparative Endocrinology **122**: 172-180.
Gooding PM, Wilson SV, Folmar CL, Marcovich TD, LeBlanc AG. 2003. The biocide Tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta)*. Environmental Healt Perspectives **111**: 426-430.
Graceli BJ, Sena CG, Lopes IFP, Zamprogno CG, da Costa BM, Godoi LFA, dos Santos MD, de Marchi RRM, dos Santos Fernandez AM. 2013. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. Reproductive Toxicology **36**: 40-52.
Hedlund B, Hellström A, Linderholm L, Linderoth M. 2014. Gifter & miljö – Om påverkan på yttre miljö och människor. Naturvårdsverket, Bromma.
Hine R, Martin E. 2014. A Dictionary of Biology. 6:e uppl. Oxford University Press, doi 10.1093/acref/9780199204625.001.0001
Hultin LC, Hallgren P, Persson A, Hansson CM. 2014. Identification of an estrogen receptor gene in the natural freshwater snail *Bithynia tentaculata*. Gene **540:** 26-31.
International Maritime Organization. 2002. Focus on IMO: Anti-fouling systems. International Maritime Organization. WWW-dokument: http://www.imo.org/OurWork/Environment/Anti-foulingSystems/Documents/FOULING2003.pdf. Hämtad: 2015-01-13.
Janer G, Sternberg RM, LeBlanc AG, Porte C. 2005. Testosterone conjugation activities in invertebrates: are they targets for endocrine disrupters? Aquatic toxicology **71**: 273-28
Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. 2005. HX531, a retionid receptor antagonist, inhibited by the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology **94**: 303-309.
Kemikalieinspektionen. 2011. Vad är en biocidprodukt? WWW-dokument 2011-02-24: https://www.kemi.se/biocider. Hämtad: 2014-11-14.
Klaassen DC, Watkins III BJ. 2010. Casarett & Doull's Essentials of Toxicology. 2:a uppl. McGraw-Hill Medical, New York.
Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. 2010. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. Trend in Endocrinology and Metabolism **21**: 676-683.
Le Guellec D, Thiard M-C, Remy-Martin JP, Deray A, Gomot L, Adessi LG. 1987. *In vitro* metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa*. General and Comparative Endocrinology **66**: 425-433.
Lima D, Reis-Henriques AM, Silva R, Santos IA, Castro CLF, Santos MM. 2011. Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. Aquatic toxicology **101**: 221-227.
Malmquist J. 2014. Nationalencyklopedin. WWW-dokument: http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/biomark%C3%B6r. Hämtad 2014-11-12.
Nias JD, McKillup CS, Edyvane SK. 1993. Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southhern Australia. Marine Pollution Bulletin **26**: 380-384.
Nishikawa J-I, Mamiya S, Kanayama T, Nishikawa T, Shiraishi F, Horiguchi T. 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by

organotins in gastropods. Environmental Science & Technology **38**: 6271-6276.
Oberdörster E, Rittschof D, McClellan-Green P. 1998. Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta:* Comparison of field and TBTA Cl-inducerad imposex. Marine Pollution Bulletin **36**: 144-151.
Oberdörster E, McClellan-Green P. 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsolete*. Peptides **21**: 1323-1330.
Oberdörster E, McClellan-Green P. 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. Marine Environmental Research **54**: 715-718.
Oberdörster E, Romano J, McClellan-Green P. 2005. The neuropeptide APGWamide as i Penis Morphogenic Factor (PMF) in Gastropod Mollusks. Integrative and Comparative Biology **45**: 28-32.
Oehlmann J, Stroben E, Schulte-Oehlmann U, Bauer B. 1998. Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassate* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). Aquatic toxicology **43**: 239-260.
Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillman M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U. 2007. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. Ecotoxicology **16**: 29-43.
Offermanns S. 2008. Encyclopedia of Molecular Pharmacology. 2:a uppl. Springer.
Ronis JJM, Mason ZA. 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) *In vitro* and *In vivo*: Effects of Tributyltin. Marine Environmental Research **42**: 161-166.
Santos M, Reis-Henriquesa MA, Natividade Vieiraa M, Solé M. 2006. Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris.* Ecotoxicology and Environmental Safety **64**: 155-162.
Spooner N, Gibbs EP, Bryan WG, Goad JL. 1991. The effect of Tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus,* and the development of imposex. Marine Environmental Research **32**: 37-49.
Stange D, Sieratowicz A, Oehlmann J. 2012. Imposex development in *Nucella lapillus*-Evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways *in vivo*. Aquatic toxicology **106-107**: 22-24.
Tjus ES. 2014. Biociders spridning i miljön och deras hälso- och miljörisker – Screening år 2000-2013. Naturvårdsverket, Bromma.
Öberg M, Håkansson H. 2000. Hälsorisker med långlivade organiska miljögifter. Naturvårdsverket förlag, Stockholm.

Båtbottenfärger och mekanismerna bakom infertila snäckpopulationer: etisk bilaga

Greta Nilén

Självständigt arbete i biologi 2014

Flytta fokus från människan

Människan är en av alla arter. Trots det är syftet med många studier på miljögifter att beskriva konsekvenser för just denna art. Min översiktsartikel utgår istället ifrån organismerna som drabbas innan människan. Naturen har ett värde i sig eftersom ekosystemet som organismerna ingår i har egenskaper som de enskilda individerna saknar. Summan är större än delarna och människan är enbart en del av naturen.

Har människan ett ansvar?

Giftutsläpp orsakas av människor och okunskap kring konsekvenser leder till skada på organismer. Den som orsakar utsläppen torde ställa sig frågan: har jag ett ansvar gentemot natur och miljö? En reflektion kring detta krävs för att berättiga giftanvändandet. Å ena sidan har användaren ett ansvar för effekterna, men å andra sidan kan det vara svårt att förutse konsekvenserna. TBT var menat att döda havstulpaner (Hedlund *et al.* 2014), men visade sig orsaka imposex. Myndigheter, såsom Kemikalieinspektionen, har ansvaret att informera allmänheten om riskerna med båtbottenfärger. Detta krävs då det kan ta tid innan ämnen blir förbjudna. Konsumenterna ansvarar för vad de köper, men information kan medföra medvetna val som minskar miljöpåverkan.

Risk vs. nytta

Innan kemikalier används bör risken ställas mot nyttan. En definition av vad en risk är måste formuleras för att undvika att relevanta risker utesluts. Risken med TBT var att dess egenskaper inte var tillräckligt välstuderade, vilket ledde till oanade konsekvenser. Nyttan var minskad havstulpantillväxt samt sänkt bränsleförbrukning och utsläpp av koldioxid (Eliasson 2013). Den som fattar beslutet att använda kemikalier bör ställa sig frågan om vem som drabbas av eventuella konsekvenser. Beslutet att använda TBT togs av människor, men effekterna drabbade främst snäckor. Myndigheterna har ansvaret att reglera färgernas innehåll. Detta för att underlätta för konsumenter att göra val med minimal miljöpåverkan.

Forskningsetik

Val av källor

Forskare har ett ansvar gentemot andra forskare och allmänheten att medvetet välja källor samt tolka dessa på ett godtagbart sätt. Fakta får inte gå förlorad eller skrivas om. Källornas tillförlitlighet i denna översiktsartikel har ökat genom användning av granskade artiklar samt tidskrifter med en inte allt för låg ”impact factor”. Dock behöver en låg ”impact factor” inte vara negativt, utan kan tyda på ett smalt forskningsområde. Området som översiktsartikeln behandlar är relativt litet och många av artiklarna är skrivna av liknande forskargrupper. För att i största möjliga mån täcka området har artiklar valts som sträcker sig från forskningens start (omkring 1980) till nutid. Översiktsartikeln baseras främst på originalartiklar, men även några översiktsartiklar, uppslagsverk samt internetsidor. Detta för att täcka information som originalartiklarna saknade.

Olika perspektiv och källhänvisningar

För att ge en nyanserad bild av mekanismerna bakom imposex, presenteras olika perspektiv genom att ställa motstridiga resultat mot varandra. En viktig del av forskning är att andras

åsikter och slutsatser följs av en källa. Detta för att inte ta åt sig äran för någon annans arbete. De tydliga källhänvisningarna gör det lätt att förstå vad som är mina och vad som är andras slutsatser.

Referenser

Eliasson C. 2013. Båtägare kan slippa havstulpaner med ny miljövänlig metod. WWW-dokument 2013-06-25:http://www.science.gu.se/aktuellt/nyheter/Nyheter+Detalj/batagare-kan-slippa-havstulpaner-med-ny-miljovanlig-metod-.cid1175568. Hämtad: 2014-10-30.

Hedlund B, Hellström A, Linderholm L, Linderoth M. 2014. Gifter & miljö – Om påverkan på yttre miljö och människor. Naturvårdsverket, Bromma.