



Titel: Thyreoideaforstyrrelser hos vertebrater

Forfatter: Mette Bøhnke

Vejleder: Jane Ebsen Morthorst

Institut: Biologisk Institut, Syddansk Universitet

Dato: 1. juni 2019

Abstract

Since the 1990s concerns about endocrine disruption chemicals has been raised. The thyroid hormone system is one of the hormone systems where adverse effects are observed by endocrine disruption chemicals. Amphibians are used to investigate the thyroid disruption effects because the postembryonic development, metamorphosis, is dependent on thyroid hormones. The mainly used species to test the thyroid disruption effects is the African clawed frog, *Xenopus laevis*. There might be a difference in sensitivity of thyroid disruption effects between *X. laevis* and any other amphibian species, because of the difference of habitats. *X. laevis* is completely an aquatic species, while the majority of amphibians are semiterrestrial. The purpose of this project was to compare the sensitivity of thyroid disruption effects between *X. laevis* and *Rana temporaria*, a semiterrestrial species.

In this project, eggs of the European common frog, *R. temporaria*, was exposed to perchlorate (0; 11.9; 41.0; 131.2; and 426.9 $\mu\text{g/L}$), which is a thyroid disruption chemical. Biometric parameters, mortality, and development stage was examined in all exposed individuals ($N = 510$). The histology of the thyroid gland was examined in random individuals from the control group ($N = 27$), the lowest exposed group, 11.9 $\mu\text{g/L}$ ($N = 14$), and the highest exposed group, 426.9 $\mu\text{g/L}$ ($N = 14$). The follicle cell height of the thyroid gland was reduced significantly in the 11.9 $\mu\text{g/L}$ treatment compared with the control group ($P = 0.012$). The total length was increased significantly in the 41.0 and 131.2 $\mu\text{g/L}$ treatments compared with control group ($P < 0.05$), while the weight was reduced significantly in the 426.9 $\mu\text{g/L}$ treatment ($P < 0.05$). It is assumed, when the results are compared to results of *X. laevis*, that the sensitivity of thyroid disruption effects are the same in *X. laevis* and *R. temporaria*.

Resumé

Siden 1990'erne har været et øget fokus på kemikaliers hormonforstyrrende effekter. Thyreoideahormonsystemet er et af de hormonsystemer, hvor man har observeret skadelige effekter forårsaget af kemikalier. Padder er en god organisme at undersøge thyreoideahormonforstyrrende effekter på, da deres udviklingsproces efter embryostadiet, metamorfosen, er afhængig af thyreoideahormoner. Den primære art som bruges, ved testning af kemikaliers thyreoideahormonforstyrrende effekter, er den afrikanske sporefrø, *Xenopus laevis*. Da *X. laevis* er fuldstændig akvatisk, mens størstedelen af alle andre paddearter er semi-terrestriske, kan der være forskel på sensitiviteten overfor thyreoideahormonforstyrrende effekter mellem *X. laevis* og andre semi-terrestriske paddearter. Formålet med dette projekt var at sammenligne eksponeringseffekterne mellem *X. laevis* og den semi-terrestriske art, *Rana temporaria*, for at undersøge, om der er en forskel i sensitiviteten.

I dette forsøg blev æg fra den europæiske paddeart, *R. temporaria*, eksponeret for perchlorat (0; 11,9; 41,0; 131,2 og 426,9 µg/L), som er thyreoideahormonforstyrrende. Biometriske parametre, dødelighed, udviklingsstadiet blev undersøgt ved alle eksponerede individer (N = 510). Histologien af skjoldbruskkirtlen blev undersøgt hos tilfældige individer fra kontrolgruppen (N = 27), laveste eksponerede gruppe, 11,9 µg/L, (N = 14) og højest eksponerede gruppe, 429,9 µg/L, (N = 14). Follikelcellehøjden i skjoldbruskkirtlen blev signifikant reduceret ved eksponering af 11,9 µg/L sammenlignet med kontrolgruppen (P = 0,012). Totallængden var signifikant øget ved eksponering af 41,0 og 131,2 µg/L sammenlignet med kontrolgruppen (P < 0,05), mens vægten var signifikant reduceret ved eksponering af 426,9 µg/L (P < 0,05). Sammenlignes resultaterne med lignende resultater fra *X. laevis*, antages det at *X. laevis* og *R. temporaria* er lige sensitive overfor thyreoideaforstyrrelser forårsaget af perchlorat.

Indholdsfortegnelse

Abstract	1
Resumé.....	2
1 Ordliste.....	6
2 Introduktion.....	7
2.1 Hormonforstyrrende stoffer	7
2.2 Padders metamorfose	8
2.2.1 Hormoner i thyreoideahormonsystemet.....	11
2.3 Thyreoideaforstyrrende stoffer	14
2.3.1 Perchlorat	16
2.4 OECD-guideline.....	17
2.4.1 LAGDA.....	18
2.5 Afrikansk sporefrø og butsnudet frø	18
2.6 Formål	19
3 Metode	20
3.1 Eksponeringsforsøg med butsnudet frø.....	20
3.1.1 Perchloratkoncentration	21
3.2 Histologiundersøgelse af skjoldbruskkirtlen.....	21
3.2.1 Fra konservering til indstøbning	21
3.2.2 Snitning	21
3.2.3 Farvning	22
3.2.4 Dataopsamling	22
3.3 Statistiske analyser.....	23
4 Resultater	24
4.1.1 Perchloratkoncentrationen	24
4.1.2 Dødelighed	25

4.2 Biometriske målinger.....	25
4.2.1 Vægt.....	26
4.2.2 Snude-anus længde	26
4.2.3 Bagbenslængden	26
4.3.4 Totallængde.....	27
4.3.5 Udviklingsstadie.....	27
4.3 Histologi af skjoldbruskkirtlen.....	28
5 Diskussion.....	32
5.1 Eksponeringseffekter hos <i>R. temporaria</i>	32
5.1.1 Biometriske eksponeringseffekter hos <i>R. temporaria</i>	34
5.1.3 Artsensitivitet.....	36
5.2 Thyreoideahormonsystemet hos andre vertebrater	37
5.2.1 Fisk.....	37
5.2.2 Krybdyr	39
5.2.3 Fugle.....	40
5.2.4 Pattedyr	40
5.3 Testmetoder og endpoint.....	41
5.4 Bevaring af padder	42
5.5 Fejlkilder og usikkerheder	43
5.4.1 Forsøgsoptimering	44
6 Konklusion	45
Referencer	46
Bilag.....	53
Bilag 1: Udviklingsstadie 26-46 efter Gosner (1960).....	53
Bilag 2: Karoversigt.....	54
Bilag 3: Indstøbningsprocessen	55

Bilag 4: Farveprocessen	56
Bilag 5: Eksempel på histologiresultater	57
Bilag 6: Yderligere figurer	59

1 Ordliste

ACTH: Adrenocorticotrop hormone, dansk: Adrenokortikotropt hormon

AMA: Amphibian metamorfose assay

CRH: corticotropin-releasing hormone, dansk: kortikotropin-frigivende hormon

HPT-aksen: Hypothalamus-pituitary-thyroid axis, dansk: hypothalamus-hypofysen-thyreoidea-aksen

LAGDA: The Larval Amphibian Growth and Development Assay

LOEC: Lowest observed effect concentration

NIS: Sodium-iodide symporter, dansk: natrium-iod-symporter

OECD: Organisation for Economic Co-operation

PCB: Polyklorde biphenyler

RXR: Retinoid X receptor

SVL: Snout-vent-length

T₃: 3,5,3'-triiodothyronin

T₄: 3,5,3',5'-tetraiodothyronin (også kaldet thyroxin)

TG: Thyroglobulin

TH: Thyroid hormone, dansk: thyreoideahormon

TPO: thyroperoxidase

TR: Thyreoideahormonreceptor

TRH: Thyrotropin-releasing hormone, dansk: thyrotropin-frigivende hormone

TSH: Thyroid-stimulating hormone (også kaldet thyrotropin), dansk: thyreoidea-stimulerende hormone

2 Introduktion

Hormonsystemet er et komplekst kommunikationssystem mellem hjernen og kroppen, som sikrer at hjernen kan kontrollere kroppens forskellige fysiologiske systemer: metabolismen, homeostasen, væksten, udviklingen og reproduktionen (Gorman & Chiasera, 2013). Derfor er et velfungerende hormonsystem altafgørende for vertebraterne for at sikre korrekt udvikling og succesfuld reproduktion (Bergman et al., 2012). Nogle kemiske forbindelser fra industrien og naturen kan påvirke hormonsystemet, hvilket kan føre til skadelige effekter. Siden 1990'erne blev offentlige og private organisationer opmærksom på problemet med hormonforstyrrende stoffer, og det førte til udvikling af testmetoder af kemiske forbindelser (IPCS, 2002). Da thyreoideasystemet er velbevaret mellem alle vertebratklasserne (Paris & Laudet, 2008), er produktionen, sekretionen og overordnet set funktionen af thyreoideahormoner stort set ens for padder, pattedyr, fugle, krybdyr og fisk. Derfor kan testmetoden bruges til at undersøge om et kemikalie er thyreoideaforstyrrende for mennesker, selvom forsøgene udføres på blandt andet padder (Grim et al., 2009; Miyata & Ose, 2012; OECD, 2009). Efterhånden blev testmetoderne udviklet og designet til specifikke modelorganismer, hvor testmetoder af thyreoideaforstyrrende stoffer blandt andet testes på den akvatiske frøart *Xenopus laevis*.

De efterfølgende afsnit introducerer nærmere om hormonforstyrrende stoffer, især thyreoideaforstyrrende stoffer, og hvorfor padder er en god organisme til at undersøge thyreoideaforstyrrende stoffer. De nuværende testmetoder beskrives, og hvorfor testmetoderne muligvis ikke er nok dækkende i forhold til bevaring og beskyttelse af andre paddearter.

2.1 Hormonforstyrrende stoffer

De sidste tre årtier har der været en voksende bekymring og videnskabelig evidens for kemiske forbindelser, som påvirker hormonsystemet hos mennesker og dyr (IPCS, 2002). Dette førte til et samarbejde mellem flere store organisationer (heriblandt verdenssundhedsorganisationen, WHO) for at undersøge og evaluere kemikaliernes påvirkning på hormonsystemet. Samarbejdet resulterede i anerkendte videnskabelige beviser for observerede skadelige effekter hos dyrelivet og økosystemer, samt øget forekomst af hormonrelaterede sygdomme hos mennesker. Ligeledes var der påvist hormonforstyrrende effekter i forsøgsdyr efter eksponering af visse kemikalier (IPCS, 2002). Hormonforstyrrende effekter anses ikke som værende et toksisk endpoint (som fx dødelighed) men som en fysiologisk funktionel ændring, som kan føre til skadelige effekter. Derfor har hormonforstyrrende stoffer fået følgende definition (IPCS, 2002): Et hormonforstyrrende stof er et udefrakommende

stof eller blanding som ændrer funktion(er) på det endokrine system og forårsager skadelige virkninger hos organismen, dens afkom eller (sub)populationer.

I begyndelsen var bekymringen primært omhandlende forstyrrelser på kønshormonsystemet, hvor effekter som forskudt kønsratio, færre levedygtige afkom og misdannede kønsorganer blev observeret (Bergman et al., 2012; Colborn, 2002; IPCS, 2002; Jugan et al., 2010). Senere blev der forsket i andre hormonsystemer heriblandt thyreoideasystemet, hvor den væsentligst endokrine kirtel i dette hormonsystem er skjoldbruskkirtlen (Carlsson & Norrgren, 2007; Colborn, 2002; Jugan et al., 2010). Skjoldbruskkirtlen producerer thyreoideahormoner, som er nødvendige for blandt andet udvikling af hjernen, metamorfosen hos padder og normal adfærd hos vertebrater (Brown & Cai, 2007; Colborn, 2002). Flere forskellige kemikaliegrupper er mistænkt for at være thyreoideaforstyrrende blandt andet polyklorede biphenyler (PCB'er), bromerede flammehæmmere og perchlorat (Jugan et al., 2010; Mughal et al., 2018). Det har ført til forskning og udvikling af testmetoder til at undersøge kemikaliers thyreoideaforstyrrende effekter, og i dette tilfælde er padder en god forsøgsorganisme, da thyreoideasystemet er altafgørende for padders metamorfose (Brown & Cai, 2007).

2.2 Padders metamorfose

Siden 1912 har man vist, at skjoldbruskkirtlen er nødvendig for haletudser, når de gennemgår metamorfosen og udvikler sig til færdigudviklet frøer (Brown & Cai, 2007; Terry, 1918). Metamorfosen er en udviklingsproces efter individet har gennemført embryonstadiet (Dent, 1968; Paris & Laudet, 2008; Tata, 2006), og padder er den gruppe, hvor der sker den mest drastiske og fysiologiske ændring (Brown & Cai, 2007; Tata, 2006). Det er ikke alle paddearter som gennemgår lige store ændringer i metamorfosen, og nogle arter har direkte udvikling og derved ingen metamorfose (Dent, 1968; Paris & Laudet, 2008; Shi, 2000).

Selvom der er artsvariationer indenfor de forskellige faser af metamorfosen, er der overordnet følgende faser: præmetamorfosen, prometamorfosen og klimaks (Dodd & Dodd, 1976; Just et al., 1981; Shi, 2000). Dog er der uenighed i hvornår de forskellige faser præcist skal opdeles i forhold til udviklingsstadiet (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968; Fox, 2012), da der er artsvariationer mellem de mest undersøgte arter, og hvor meget de udvikler sig ved hæmmet thyreoideahormonsystem (Eksempelvis afrikansk sporefrø (*X. laevis*) sammenlignet med nordlig leopardfrø (*Rana pipiens*)) (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968). Dette projekt bruger udviklingsstadietinddelingen fra Etkin (1968) og udviklingsstadiesystem fra Gosner (1960) (Bilag 1). Præmetamorfosen er fra udviklingsstadiet 20-35 (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968; Gosner, 1960), 36-41 er prometamorfosen (Dent,

1968; Etkin, 1968) og klimaks er fra 42-46 (Etkin, 1968; Gosner, 1960) (Tabel 1). Faserne er ind- delt efter morfologiske ændringer og betydningen af thyreoideahormoner, da koncentrationen af hormonerne ændres i løbet af faserne (Tabel 1). Under præmetamorfosen vokser haletudsen med uændret morfologi og uden indflydelse af endogen thyreoideahormoner, da haletudsen ikke er be- gyndt at producere thyreoideahormoner før i slutningen af fasen (Brown & Cai, 2007; Etkin, 1968). I præmetamorfosen begynder bagbenene at vokse frem, og denne udvikling fortsætter i prometa- morfosen (Brown & Cai, 2007; Etkin, 1968; Miyata & Ose, 2012; Shi, 2000; Tietge et al., 2005). Prometamorfosen begynder, når udskillelsen af thyreoideahormoner er målbare, og koncentrationen af thyreoideahormonerne stiger løbende i denne fase, og dette aktiverer udviklingen af tæer på bag- benene, samt forberedelse til dannelsen af forben (Brown & Cai, 2007; Shi, 2000). I denne fase sker langsommere vækst end i præmetamorfosen, samt der sker morfologiske ændringer (Tabel 1). Kli- maks begynder når forbenene bryder ud, og koncentrationen af thyreoideahormonerne forsætter med at stige indtil koncentrationen når et maksimum, hvorefter koncentrationen falder, og det er i denne del af metamorfosen, hvor de mest drastiske morfologiske og fysiologiske ændringer sker fx forbenenes udbrud og absorbering af halen (Tabel 1) (Brown & Cai, 2007; Etkin, 1968; Kaltenbach, 1996).

Metamorfosen er en tilpasning fra det akvatiske liv til det terrestriske, hvor der overordnet sker tre forskellige typer af tilpasninger: degenerering af haletudseorganer, ændring af nuværende haletud- seorganer og udvikling af nye organer, som kun findes i voksne individer (Shi, 2000; Tata, 2006) (Tabel 1). Derfor er padden en god gruppe til at undersøge kemikaliers thyreoideaforstyrrende effek- ter, da padders metamorfose er meget afhængig af et velfungerende thyreoideahormonsystem for at de udvikles korrekt.

Tabel 1: Oversigt over metamorfosens inddeling og tilpasninger

	Premetamorfose	Prometamorfose	Klimaks
Koncentrationen af thyreoideahormoner	Fysiologisk lav (Brown & Cai, 2007; Sternberg et al., 2011; White & Nicoll, 1981).	Stigende (Brown & Cai, 2007; Sternberg et al., 2011; White & Nicoll, 1981).	Højst, herefter fal- dende (Brown & Cai, 2007; Shi, 2000; Sternberg et al., 2011; White & Nicoll, 1981).
Udviklingsstadier			

- Gosner (1960), generelle frøarter	20-35 (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968).	36-41 (Dent, 1968).	42-46 (Etkin, 1968; Gosner, 1960).
- Nieuwkoop og Faber (1994), specifik for <i>X. laevis</i>	46-55 (Brown & Cai, 2007; Dodd & Dodd, 1976; Fox, 2012).	56-58 (Brown & Cai, 2007; Dodd & Dodd, 1976; Fox, 2012).	59-66 (Brown & Cai, 2007; Dodd & Dodd, 1976; Fox, 2012).
Absorbering af hale- tudseorganer		Thyreoidea-induceret enzymaktivitet i halen (Weber, 1967).	Thyreoidea-induceret absorbering af halen (Dodd & Dodd, 1976) og gæller (Derby et al., 1979)
Ændring af nuværende organer		Thyreoidea-afhængig udvikling af nerver og hjerne (Dodd & Dodd, 1976; Kollros, 1981; Matsuda et al., 2010). Ændret leverenzym sammensætning (Munro, 1939). Reduceret længde af tyndtarm, og ændret tarm epitel (Ishizuya-Oka & Shi, 2005; Shi, 2000). Thyreoidea-induceret tilpasning af huden (Suzuki et al., 2009), hovedudformningen (Dent, 1968; Rose & Cahill, 2019; Trueb & Hanken, 1992) og skelettet (Trueb & Hanken, 1992)	
Dannelse af nye organer		Thyreoidea-induceret differentiering af bagbenenes tær og muskler (Dent, 1968; Shi, 2000). Thyreoidea-inducerende genregulering i lungerne (Veldhoen et al.,	Thyreoidea-afhængig udbrud af forbenene (Dent, 1968; Dodd & Dodd, 1976).

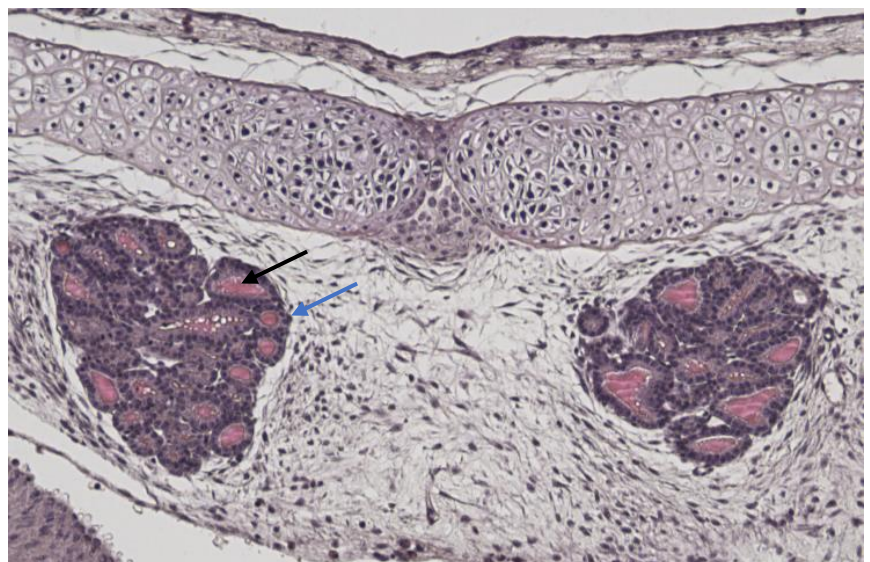
		2015), og thyreoidea-afhængig udvikling af lungerne (Burggren & West, 1982; Pei et al., 2011)	
--	--	---	--

2.2.1 Hormoner i thyreoideahormonsystemet

Den vigtigste kirtel i thyreoideahormonsystemet, er skjoldbruskkirtlen, som alle pattedyr, fugle, krybdyr og padder har (Paris et al., 2008; Paris & Laudet, 2008). Skjoldbruskkirtlen er placeret i svælget, og den består af follikler, hvor organiseringen af folliklerne varierer indenfor vertebraterne (Paris & Laudet, 2008; Zoeller et al., 2007). Hos pattedyr er folliklerne organiseret i en samlet enhed, mens de hos nogle padder er folliklerne organiseret i to enheder (Figur 1). Folliklerne består af et lag celler, follikelceller, som omgrænser lumen med den thyreoideahormonholdige kolloidvæske (Grim et al., 2009; Miyata & Ose, 2012; Rugh, 1951).

Skjoldbruskkirtlen udskiller thyreoideahormonerne og størstedelen af thyreoideahormonerne er

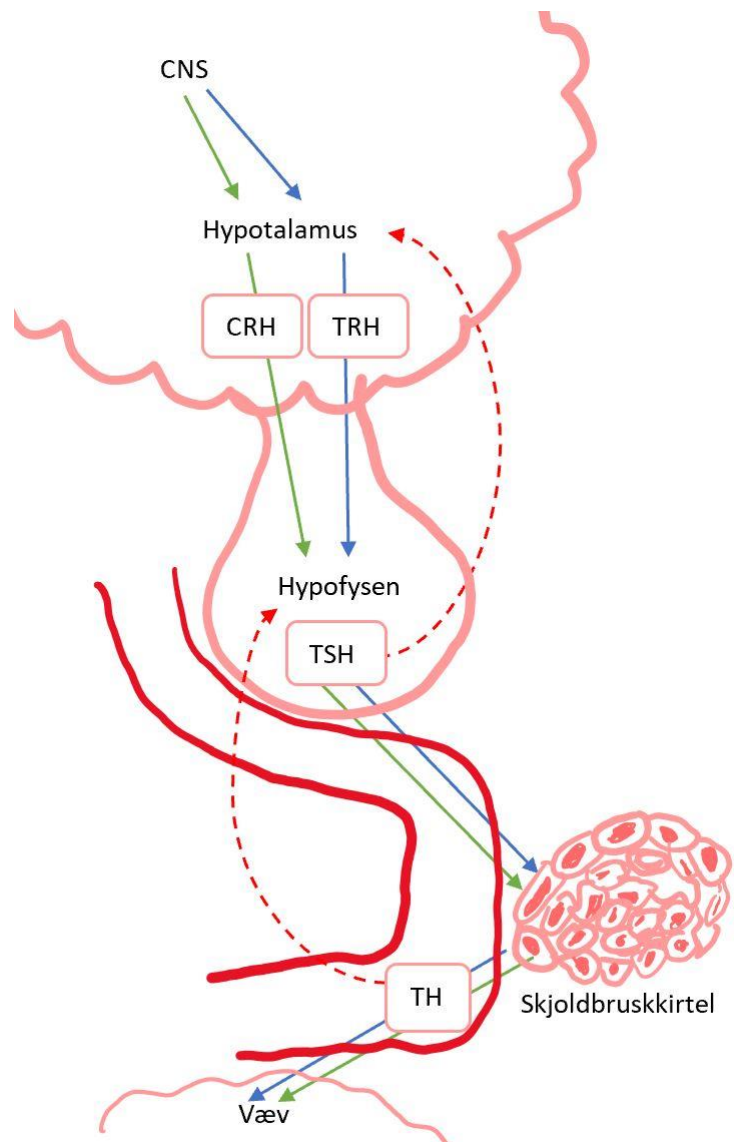
3,5,3',5'-tetraiodothyronin (også kaldet thyroxin, T₄) og en mindre del er 3,5,3'-triiodothyronin (T₃) (Brown & Cai, 2007; Kaltenbach, 1996). Skjoldbruskkirtlen bliver kontrolleret af hypofysen, som bliver kontrolleret af hypothalamus (Figur 2), og denne kommunikation kaldes for hypothalamus-hypofyse-thyreoidea-aksen (HPT-aksen), som alle vertebrater besidder (Jarque & Piña, 2014; Paris et al., 2008; Paris & Laudet, 2008). HPT-aksen fungerer ved at centralnervesystemet (CNS) sender signal til



Figur 1: Skjoldbruskkirtlen (farvet med hematoxylin og eosin) hos *Rana temporaria*, hvor folliklerne er organiseret i to enheder. Hver follikel består af epitel af follikelceller (mørkelilla, blå pil) og lumen med kolloidvæske, hvor thyreoideahormonerne bliver oplagret (lyserød, sort pil). Billedet er taget fra mikroskop ved 40 gangs forstørrelse.

hypotalamus om at udskille flere forskellige neurohormoner, fx thyrotropin-frigivende hormon (TRH), dette sker ved udvikling af hjernen hos pattedyr (Henrichs et al., 2010; Mughal et al., 2018) og kortikotropin-frigivende hormon (CRH), som sker når metamorfosen skal igangsættes hos haletudser (Denver, 1996; Sternberg et al., 2011; Tata, 2006). Disse neurohormoner fra hypotalamus stimulerer hypofysen til at udskille thyreoidea-stimulerende hormon (TSH), som stimulerer skjoldbruskkirtlen til at udskille thyreoideahormoner (TH) (Chiamolera & Wondisford, 2009; Kaltenbach, 1996; Shi, 2000; Sternberg et al., 2011) (Figur 2).

I løbet af metamorfosen ændres kommunikation i HPT-aksen, og derfor er kommunikationen i HPT-aksen ikke ens for haletudser og voksne frøer (Denver, 1988; Dodd & Dodd, 1976; Kaltenbach, 1996; Sternberg et al., 2011) (Figur 1). Hos haletudser er det CRH og ikke TRH, som er det væsentligste hormon fra hypotalamus (Denver, 1988). Når hypotalamus har modtaget tilstrækkelig stimulering fra CNS, udskiller hypotalamus CRH, og dette sker i slutningen af premetamorfosen/begyndelsen af prometamorfosen (Chiamolera & Wondisford, 2009; Denver, 1996; Matsuda et al., 2010). Sensitiviteten for CRH stiger i løbet af metamorfosen, således at den samme mængde CRH fører til frigivelse af mere TSH i prometamorfosen end i præmetamorfosen (Manzon & Denver, 2004). TSH fra hypofysen



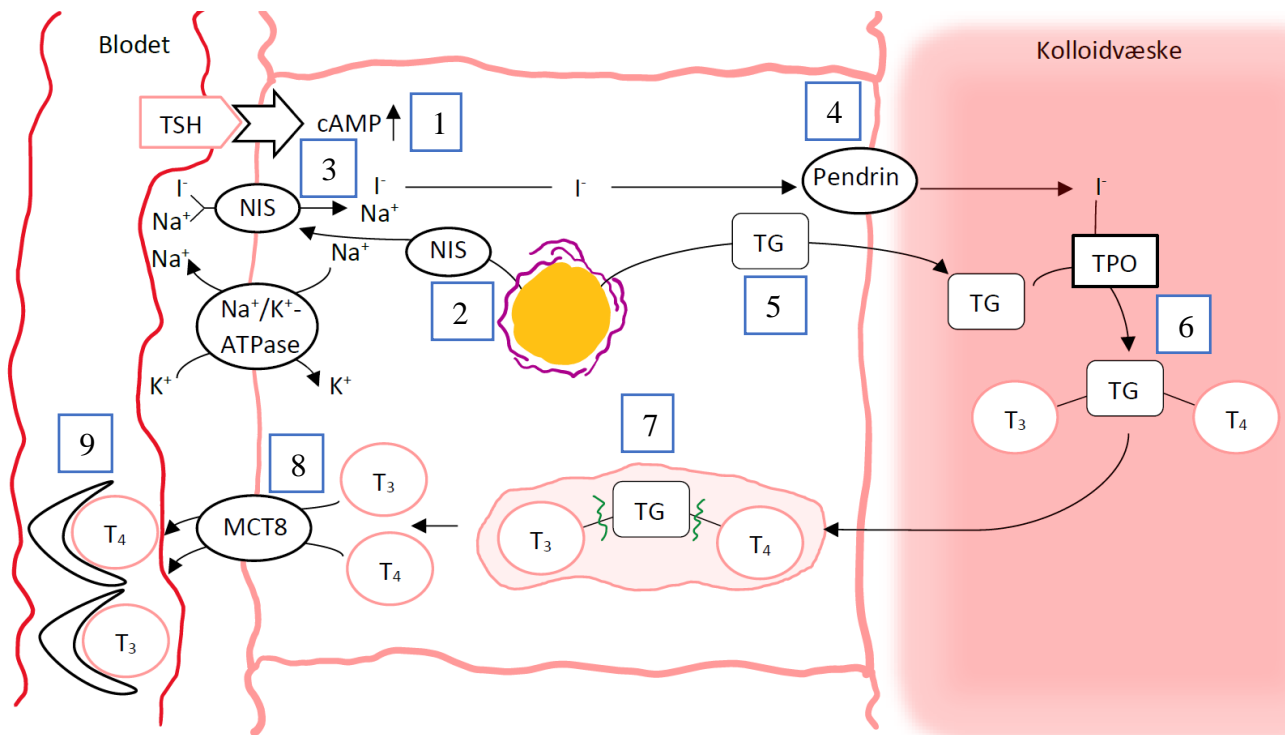
Figur 2: Den generelle HPT-akse vertebrater. CNS stimulerer hypotalamus til udskillelsen af TRH (hos alle vertebrater undtaget haletudser; blå pile) og CRH (hos haletudser; grønne pile), hvor disse hormoner stimulerer hypofysen til udskillelse af TSH. TSH stimulerer skjoldbruskkirtlen til udskillelse af TH. TH bliver transporteret til vævet, hvor det kan igangsætte et cellulært respons. HPT-aksen har negativ feedback, hvor hormonerne har hæmmende effekter (røde pile) (Efter Chiamolera & Wondisford, 2009; Gorman & Chiasera, 2013; Paris & Laudet, 2008; Sternberg et al., 2011)

stimulerer via receptorbinding på follikelcelleoverfladen af skjoldbruskkirtlen (se om mekanisme i afsnit 2.1.1.1), skjoldbruskkirtlen til at udskille TH (Fong, 2011; Kaltenbach, 1996; Miyata & Ose, 2012; Tata, 2006; Zoeller et al., 2007). For at kontrollere koncentrationen af TH, er der negativ feedback som alle vertebrater besidder (Figur 2), og sensitiviteten af det negative feedbacksystem hos padder ændres i løbet af metamorfosen for at sikre en høj koncentration af TH i klimaks. I slutningen af prometamorfosen og i hele klimaks, hæmmer TH med en mindsket effekt TSH, og derved kan der være en højere koncentration af TH i klimaks end i præmetamorfosen og efter klimaks (Sternberg et al., 2011). Den stigende koncentration af TH, er væsentligt for de morfologiske ændringer som sker i prometamorfosen og klimaks.

2.2.1.1 Mekanisme

Når TSH binder sig til TSH-receptoren på skjoldbruskkirtlens follikelceller, sker en kaskade, som fører til dannelse og udskillelse af TH (Figur 3) (Colin et al., 2013; Manna et al., 2013; Zoeller et al., 2007). Et af de cellulære responser er øget optagelse af iod, og dette sker via natrium-iod-symportereren (NIS), hvor iod (I^-) sammen med natrium (Na^+) transporteres ind i follikelcellen (Eskandari et al., 1997; Fong, 2011; Zoeller et al., 2007). Et andet cellulært respons er aktivering af enzymet thyroperoxidase (TPO), som binder iod til thyroglobulin (TG), så det færdige produkt er et TH-TG-kompleks, der bliver oplagret i kolloidvæsken i follikellumen (Paris & Laudet, 2008; Zoeller et al., 2007). Den vigtigste fysiologiske effekt af TSH på follikelcellerne, er udskillelsen af thyreoideahormonerne. Ved receptorbindingen af TSH, igangsættes et respons som fører til transport af TG-TH-komplekset ind i follikelcellen, hvor bindingen mellem TG og TH bliver brudt, og TH bliver transporteret ud i blodet, hvor transportproteiner binder sig til TH (Colin et al., 2013; Manna et al., 2013; Zoeller et al., 2007). Det cellulære respons efter binding af TSH på follikelcellerne, er generelt gældende for vertebrater (Paris & Laudet, 2008).

Det primære TH som bliver udskilt, er T_4 , som bliver transporteret i blodet via transportproteiner til det pågældende væv, hvor deiodinase-enzymet omdanner T_4 til det mere biologiske aktive T_3 (Miyata & Ose, 2012; Paris & Laudet, 2008). Derefter kan T_3 igangsætte et respons i det pågældende væv ved binding på thyreoideahormonreceptoren (TR) i cellekernen (Tata, 2006). TR danner sammen med retinod X receptor (RXR) en heterodimer, og når T_3 binder sig på TR, brydes bindingen mellem et repressormolekyle og komplekset, og derved kan transskriptionen igangsættes. Genet som bliver transskriberet, afhænger af vævstype og tidspunkt i udviklingsstadiet (Tata, 2006).



Figur 3: Cellulært respons når TSH binder sig til TSH-receptoren, hvor cAMP dannes (1). cAMP fører til øget transkription af NIS (2), øget optagelse af iod via NIS (3) og Pendrin (4), øget transkription og transport af TG (5), øget aktivering af TPO, og derved øget syntese af TH (6). Na⁺/K⁺-pumpen skaber en elektrochemisk gradient, så Na⁺ og I⁻ kan transporteres via NIS. Når TG-TH-komplekset transporteres fra kolloidvæsken til blodet, sker en proteolyse (grønne linjer) (7), hvorefter MCT8 transporterer TH ud i blodet (8). TH bliver transporteret af transportproteiner i blodet (9). Efter Colin et al., 2013; Manna et al., 2013; Zoeller et al., 2007)

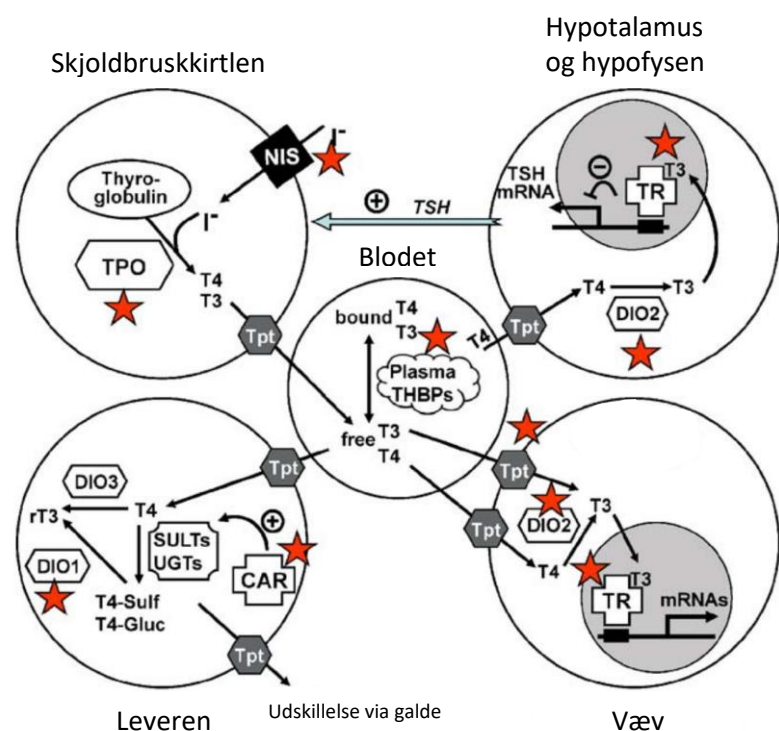
I løbet af præmetamorfosen øges mængden af TR, og ved aktivering af TR i prometamorfosen og klimaks induceres yderligere transkriptionen af TR-gener, og dette fører til øget sensitivitet for TH (Tata, 2006). Dette betyder også at mekanismen for aktivering af TR er tilstede før produktionen af thyroideahormoner, og derfor kan metamorfosen aktiveres for tidligt i forhold til naturlige aktivering (Miyata & Ose, 2012; Tata, 2006). Ligeledes kan nogle organismefremmede kemikalier påvirke hormonerne i metamorfosen, hvor der kan ske øget aktivering eller hæmning, som kan resultere i skadelige effekter for individet (Jugan et al., 2010; Miyata & Ose, 2012).

2.3 Thyroideaforstyrrende stoffer

Da thyroideasystemet er kompleks med de mange forskellige involverede hormoner, proteiner og enzymer (Figur 2 og 3), kan organismefremmede stoffer påvirke flere forskellige steder i thyroideahormonsystemet (Figur 4) (Jugan et al., 2010). I princippet kan et organismefremmede stof

forstyrre thyreoideahormonsystemet hver gang, der sker en fysiologisk proces (fx ved NIS), hvis det organismefremmede stof har kemiske egenskaber til at påvirke den specifikke mekanisme (fx perchlorat hæmmer NIS, beskrives i afsnit 2.3.1). Derfor er flere forskellige kemikaliegrupper mistænkt for at være thyreoideaforstyrrende blandt andet PCBer og perchlorat. PCBer er mistænkt fordi deres kemiske opbygning kan ligne naturlige hormoner (Mckinney et al. i Mughal et al., 2018), og flere studier har vist en sammenhæng mellem stigende koncentrationer af PCBer og faldende koncentrationer af thyreoideahormoner (Brucker-Davis et al. i Mughal et al., 2018), som muligvis skyldes at PCBer binder sig til transportproteiner, så thyreoideahormonerne bliver ikke transporteret rundt (Grimm et al. i Mughal et al., 2018), samt PCBer fører til øget koncentration af TSH (Kashiwagi et al., 2009). Hos mennesker, er de tydeligste skadelige effekter observeret hos fostre og nyfødte, hvor nedsat thyreoideahormonkoncentrationer fører til kognitive defekter, nedsat IQ og øget risiko for autisme og ADHD (Caspersen et al. i Mughal et al., 2018). Hos voksne mennesker er observeret en positiv sammenhæng mellem PCB-eksponering og forhøjet risiko for hjertekarsygdomme (Bergkvist et al. i Mughal et al., 2018).

Hos andre kemikaliegrupper er observeret lignende sammenhænge som PCBer, hvor øget eksponering af kemikaliegruppen fører til skadelige effekter (Mughal et al., 2018). De skadelige observerede effekter hos mennesker, er lavere IQ, udviklingsdefekter i nervesystemet og adfærdsproblemer fx ADHD, og disse effekter kan opstå ved eksponering af perchlorat, phenoler, pesticider og deres nedbrydningsprodukter, phthalater eller bromerede flammehæmmere. Dyreforsøg har ligeledes påvist en sammenhæng mellem eksponering af kemikalierne og skadelige effekter som udviklingsforstyrrelser hos mus,



Figur 4: Oversigt over hvor thyreoideaforstyrrende stoffer (rød stjerne) påvirker thyreoideahormonsystemet. CAR: Constitutive androstane receptor; DIO1, DIO2 og DIO3: deiodinase-enzymmer; NIS: natrium-iodsymporter; Plasma THBP: transportproteiner; T4-Sulf og T4-Gluc er inaktivt T4; rT3: inaktivt T3; TPO: thyroperoxidase; Tpt: membrantransport; TSH: thyreoidea-stimulerende hormon; TR; thyreoideahormonreceptor; SULT: sulfotransferase (Efter Jugan et al., 2010).

zebrafisk og padder, nedsat thyreoideahormonkoncentrationer hos mus og hæmmet deiodinase-enzymet i *in vitro* forsøg. Da de thyreoideaforstyrrende stoffer har forskellige virkningsmekanismer, forstyrrer det samme specifikke stof ikke flere forskellige processer i thyreoideahormonsystemet, og der er flere forskellige steder i thyreoideahormonsystemet, hvor thyreoideaforstyrrende stoffer kan påvirke (Figur 4).

Fordi der er observeret mange sammenhænge mellem eksponering af organismefremmede stof og skadelige effekter, er det vigtigt at pålidelige testmetoder findes, så under udvikling af nye kemikalier, at potentielle skadelige kemikalier bliver testet, så forbrugeren og miljøet undgår de skadelige kemikalier. Ved udvikling af thyreoideaforstyrrende testmetoder, bruges perchlorat og propylthiouracil som modelstof, da virkningsmekanismen af disse er kendt (Eskandari et al., 1997; Singh et al., 2015).

2.3.1 Perchlorat

Perchlorat er en uorganisk ion, ClO_4^- , som naturligt findes i miljøet, da det dannes i atmosfæriske processer, og derfor findes perchlorat mange steder (Leung et al., 2010). Perchlorat kan binde sig til kationer (fx natrium) og danne perchloratsalte, som bruges i industrien til fyrværkeri, raketbrændstof, spraystoffer mv. (Jugan et al., 2010; Leung et al., 2010; Sijimol & Mohan, 2014). Da perchlorat har været brugt i en lang årrække, og det er meget persistent, findes det overalt i miljøet, nogle steder med højere koncentrationer (Steinmaus, 2016). I 1950'erne blev perchlorat brugt som medicin mod hyperthyroidisme, da perchlorat hæmmer produktionen af thyreoideahormonerne, dog førte den daværende dosis (600-1000 mg dagligt) til lavere mængde af blodlegemer (aplastisk anæmi) (Johnson & Moore, 1961), og derfor stoppede man brugen af medicinsk perchlorat i en periode på tre årtier, før man brugte det kort i 1980'erne til behandling af Graves' sygdom. Nu bruger man andre stoffer til behandling af thyreoidea-relaterede sygdomme blandt andet propylthiouracil, som hæmmer TPO (Figur 4) (Nygaard et al., 2018).

Perchlorat er en kompetitiv inhibitor til NIS (Figur 4), da perchlorat blokerer NIS, så iod ikke kan transporteres via NIS (Eskandari et al., 1997). Derved hæmmer perchlorat optagelse af iod ind i folliklerne, hvorved syntesen af thyreoideahormoner hæmmes (Jugan et al., 2010; Zoeller et al., 2007). Fordi mekanismen for perchlorat er kendt, bruges perchlorat som modelstof i toksikologiske forsøg (Hu et al., 2006; Tietge et al., 2005). Perchlorat blev brugt i eksponeringsforsøget i dette projekt.

2.4 OECD-guideline

Da thyreoideaforstyrrende stoffer kan påvirke flere forskellige steder i thyreoideahormonsystemet, er det vigtigt at der findes testmetoder, som inkluderer hele thyreoideahormonsystemet (Miyata & Ose, 2012). Det er derfor vigtigt at testmetoderne er sikre og pålidelige, da resultaterne fra testene bliver brugt til regulering af det pågældende kemikalie (Gourmelon & Delrue, 2016). Dette er et af formålene med OECD (Organisation for Economic Co-operation), som er et samarbejde mellem størstedelen af de industrielle lande. Det er organisationen OECD som arbejder for et ensartet og retfærdigt økonomisk samarbejde mellem medlemslandene. Et af formålene med OECD er at have standardiserede testmetoder for kemikalier, og derfor har OECD udgivet principper om godt laboratoriarbejde (Good Laboratory Practice) for at styrke kvaliteten og sikkerheden af data fra kemikaliestene, og sikre at laboratoriarbejdet er standardiseret (Gourmelon & Delrue, 2016; OECD, 1998). Et andet formål med standardiserede testmetoder er at alle medlemslandene skal acceptere resultaterne fra forsøg udført efter OECD-guidelines for test (Gourmelon & Delrue, 2016). Dette samarbejde betyder at de samme forsøg ikke gentages i forskellige lande, og derved reduceres antallet af forsøgsdyr. OECD opdaterer og udvikler systematisk nye guidelines for testmetoder på baggrund af informationer fra naturvidenskabelige debatter og politiske holdninger fra medlemslandenes, industrien og interesseorganisationer. Dette er med til sikre flest mulige synsvinkler i forhold til naturvidenskabelige viden, samfundets behov, forsøgsdyrsvelfærd og miljøet (Gourmelon & Delrue, 2016).

Guidelinene er inddelt på fem forskellige niveauer alt efter hvilke informationer omkring stoffet man ønsker at undersøge (OECD, 2019). Niveau 1 indeholder testmetoder til at undersøge fysiske-kemiske egenskaber og opstille modeller for interaktion med biologiske systemer. Niveau 2 består af *in vitro*-testmetoder omkring mekanisme, mens niveau 3-5 består af testmetoder *in vivo*. Resultaterne fra testmetoderne fra niveau 3 giver information om mekanisme *in vivo*, mens resultaterne fra niveau 4 og 5 giver informationer om skadelige effekter fra relevante hormonforstyrrende endopoints. Niveau 5 inkluderer informationer om skadelige effekter efter eksponering i en lang periode af livscyklussen. Man tester på flere forskellige grupper af levende organismer, og derfor er testmetoderne designet til en specifik gruppe af organismer (OECD, 2019). Selvom testmetoderne kun giver resultater om skadelige effekter hos den specifikke gruppe (eller art), kan resultatet ofte perspektiveres til andre grupper, hvis virkningsmekanismen og hormonsystemet er ens. Dette er tilfældet med thyreoideahormonsystemet, som er velbevaret mellem vertebraterne, hvor forsøgsresultater fra

padder kan bruges til om det har thyreoideaforstyrrende effekter hos andre vertebrater fx mennesket.

2.4.1 LAGDA

Da padder er en god forsøgsorganisme til testning for thyreoideaforstyrrende effekter, har OECD siden 2009 anbefalet at bruge AMA (Amphibian metamorfose assay) (Testguide 231, niveau 3) (Miyata & Ose, 2012) til at teste kemikaliers thyreoideaforstyrrende effekter. Formålet med AMA er at undersøge om et kemikalie har en thyreoideaforstyrrende virkningsmekanisme i padder, hvor man undersøger forskellige endpoints blandt andet udviklingen og histologi. De mest følsomme endpoints vurderes ud fra histologi af skjoldbruskkirtlen, da skjoldbruskkirtlen er særlig følsom overfor thyreoideaforstyrrelser (Grim et al., 2009; Miyata & Ose, 2012). I AMA er resultaterne fra histologien fra skjoldbruskkirtlen semi-kvantitativ med fire kernekriterier (reduktion af skjoldbruskkirtlen, forøgelse af skjoldbruskkirtlen, follikelcelle hypertrofi og follikelcelle hyperplasi) (Grim et al., 2009). Senere fandt man ud af at follikelcellehøjden er et brugbart kvantitativt endpoint (Carlsson & Norrgren, 2007; Hu et al., 2006), og fra 2015 var udviklet en anden metode, LAGDA (the Larval Amphibian Growth and Development Assay) (Testguide 241, niveau 4). Formålet med LAGDA, er at undersøge dosis-respons sammenhængen mellem koncentrationer og skadelige effekter af thyreoideahormonforstyrrende kemikalier (OECD, 2015). Da eksponeringen sker i en længere periode i LAGDA end AMA, kan resultaterne fra LAGDA bruges til risiko- og farevurdering for både mennesker, miljøet og dyrelivet, især padder. LAGDA er designet til den afrikanske sporefrø (*Xenopus laevis*) (OECD, 2009, 2015), fordi denne art bliver brugt som modeldyr i andre laboratorieforsøg, og derfor er det meget viden om netop denne art.

2.5 Afrikansk sporefrø og butsnudet frø

Den afrikanske sporefrø, *X. laevis*, er en tropisk vandlevende art fra Afrika (Figur 5). Arten er meget populær i laboratorier som forsøgsdyr, da den er en meget hårdfør art og har let til at tilpasse sig (Measey et al., 2012; Tinsley et al., 2009). Derudover kan man igangsætte æglægningen hos den ved injektion af hormoner (Wlitzla et al., 2017). Fordi arten er fuldstændig vandlevende, kræver arten færre laboratoriefaciliter end andre arter som lever i terrestriske habitater (Measey et al., 2012). Naturligt findes *X. laevis* i alle forskellige typer ferskvandshabitater, selv meget modificeret antropogeniske habitater. Derfor er den generelle population af *X. laevis* stigende, og den har bredt sig til andre steder i naturen blandt andet Frankrig og USA, hvor den anses som være en invasiv art, og

man mener at *X. laevis* har spredt parasitsvampen *Batrachochytrium dendrobatidis*, som har ført til store konsekvenser for andre paddearter (Tinsley et al., 2009).

Den butsnudet frø, *Rana temporaria*, er en semi-terrestrisk europæisk art, som findes over største delen af Europa fra subtropiske skove til skovtundraer (Figur 6) (Kuzmin et al., 2009). Arter lever primært terrestrisk, men æglægningen og haletudsestadiet foregår kun i vand. Arten yngler en gang om året omkring marts-april i Danmark (Jørgensen & Kjærgaard Jensen, 2015), og det er findes endnu ikke en effektiv metode til at stimulerer æglægning (Sotowska-Brochocka et al. i Trudeau et al., 2010). Arten er ikke sensitiv, og derfor findes den i antropogeneriske habitater (fx byparker), og flere forsøg har vist at den kan tilpasse sig i forhold til forskellige miljøer (Beattie, 1987; Dittrich et al., 2019; Severtsova et al., 2017). Selvom arten er meget almindelig, er populationen generelt faldende (Kuzmin et al., 2009).



Figur 5: Afrikansk sporefrø, *Xenopus laevis*. (fra www.californiaherps.com/frogs/pages/x.laevis.html)



Figur 6: Butsnudet frø, *Rana temporaria* (fra <http://www.animalspot.net/common-frog.html>)

2.6 Formål

Dette projekt omhandler thyreoideaforstyrrelser hos vertebrater, hvor fokus er på padder, da denne dyregruppe er meget afhængig af thyreoideahormonsystemet. Projekt tager udgangspunkt i et større projekt om undersøgelse af hormonforstyrrende effekter hos den danske paddeart, butsnudet frø (*R. temporaria*) (Center for Hormonforstyrrende Stoffer). Formålet er at undersøge effekterne af perchlorat-eksponering hos *R. temporaria* primært ved histologiske undersøgelser af skjoldbrusk-kirtlen. Resultaterne af eksponeringsforsøget sammenlignes med lignende eksponeringsforsøg med *X. laevis* for at undersøge om der er en forskel i sensitivitet overfor thyreoideaforstyrrelser.

Kemikaliers thyreoideaforstyrrende effekter testes på *X. laevis*. Denne art lever udelukkende akvatisk, men størstedelen af padderne lever både akvatisk og terrestrisk, og derfor er der tvivl om eksponeringsforsøg på *X. laevis* kan give resultater som er dækkende for størstedelen af paddearterne, da sensitiviteten kan variere mellem forskellige levestrategier. Hos *R. temporaria* findes ikke en fast procedure, som der gør ved *X. laevis*, og derfor undersøges forskellige endpoints blandt andet biometriske målinger fra alle eksponerede frøer (N=510) og histologiske undersøgelser på en del af de eksponerede frøer (N=55).

3 Metode

Dette eksponeringsforsøg tager udgangspunkt i metoden fra LAGDA, hvor æg fra *R. temporaria* blev eksponeret for perchlorat.

3.1 Eksponeringsforsøg med butsnudet frø

1200 æg fra *R. temporaria*, blev opsamlet fra en dam ved Kohaveskoven (Landkildevej 2, Odense SØ) efter dyreforsøgstilladelse, da arten er fredet. Æggene blev opdelt i 24 kar á otte L med 50 æg i hver, hvoraf otte kar var kontrolkar. Der var fire kar af hver af de forskellige nominelle koncentrationer: 16, 51, 163 og 522 µg/L perchlorat (se bilag 2 for karoversigt). Eksponeringskemikaliet var natriumperchlorat (CAS 7601-89-0), som er let vandopløselig (Jugan et al., 2010), og derfor var et solvent ikke nødvendigt. Vandet i karrene var almindeligt vandhanevand, og vandudskiftning i hvert kar var fem gange i døgnet. Ole Dich perstaltiske pumper blev brugt til at dosere henholdsvis stamopløsningen med kemikaliet og vand. Haletudserne blev fodret ad libitum med TetraTabiMin (Tetra), og rumtemperaturen var 15°C. Dyrene blev tilset dagligt, hvor misdannelser blev noteret og eventuelle døde individer blev fjernet og noteret. Dyrene blev eksponeret fra d. 21. april 2018 (dag 0) til d. 6.-8. juni 2018 (dag 46-48), da forsøgsafslutningen foregik over flere dage. Ved afslutning af eksponeringsforsøget blev frøerne aflivet ved nedsækning i MS-222 (CAS 886-86-2), tørret let for at fjerne overskydende vand inden frøerne blev fotograferet (to billeder pr individ: fra siden og dorsalt) og målt på følgende parametre: vægt, længde fra snuden til anus (SVL), totallængde (snude til halespids) og bagbenslængden (venstre ben udstrakt målt fra hofte til tå). Efter måling af frøerne blev hver anden frø gjort klar til nærmere histologiundersøgelse. De andre frøer blev frosset ned (-20°C).

Haletudsernes udviklingsstadiet blev bestemt fra billeder ud fra Gosner (1960) (Bilag 1). Der blev noteret, hvis der var tydelige misdannelser ud fra de normale udviklingsstadier.

3.1.1 Perchloratkoncentration

Perchloratkoncentrationen blev målt (via LC-MSMS) løbende i hvert kar i eksponeringsperioden (dag 1, 3, 6, 11, 16, 18, 24, 31, 37, 39 og 40) for at sikre en konstant koncentration af perchlorat.

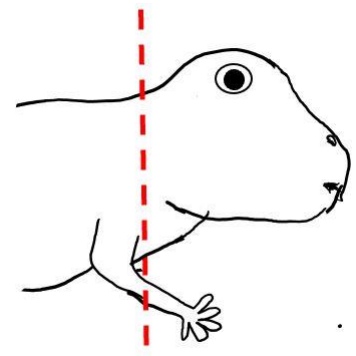
De aktuelle koncentrationer blev beregnet ud fra gennemsnit af karrene i grupperne, og således at de aktuelle koncentrationer var følgende: 0 (kontrol); 11,9; 41,0; 131,2 og 426,9 $\mu\text{g/L}$ perchlorat. (Se bilag 2 for de gennemsnitlige aktuelle koncentrationer i hvert enkelt kar).

3.2 Histologiundersøgelse af skjoldbruskkirtlen

Hver anden frø blev klargjort til histologiundersøgelse ved vævsfiksering i Bouin's-opløsning i et døgn. Herefter blev frøerne opbevaret i 70 % ethanol på køl (5°C) indtil indstøbningsprocessen.

3.2.1 Fra konservering til indstøbning

Hovederne blev skåret af lige foran forbenenes udspring (Figur 7), da skjoldbruskkirtlen befinder sig i hovedet mellem hjernen og underkæben. Under skæringsprocessen blev vævet fugtet med 70 % ethanol for at sikre at vævet ikke udtørrede. Hovederne blev individuelt lagt i indstøbningskassetter, og herefter blev frøhovederne dehydrerede via forskellige ethanolopløsninger ved brug af en histokinette (vævsprocessor HMP 110, MICROM Laborgeräte GmbH) (se bilag 3 for processen), og processen blev afsluttet med ren paraffin. Hovederne blev indstøbt i enkeltvis i flydende paraffin. Frøhovederne blev vendt med halsen nedad og snuden op i indstøbningskarrene.



Figur 7: Skitse over placeringen af snittet ved dekapitering.

3.2.2 Snitning

Snitningen af de støbte vævsprøver foregik på en mikrotom (HM 355S automatisk mikrotom, Thermo Scientific TM) med vandbad på 40°C . Paraffinblokken med vævsprøven blev orienteret således at der blev snittet fra halsen/nakken mod snuden. Først blev blokken trimmet med tykkere snit ($20\ \mu\text{m}$), for at snittet indeholdte hele tværsnittet af skjoldbruskkirtlen. Herefter blev tykkelsen reduceret ($5\ \mu\text{m}$), og snittet blev samlet op på et objektglas og undersøgt under mikroskop. Dette blev gjort for at kunne danne et overblik over, hvor langt man er inde i hovedet ud fra bruskladformningerne. Der blev trimmet, indtil brusklaget mellem mundhulen og nedre del af munden var ubrudt (Figur 8). Herefter kunne skjoldbruskkirtlen (eventuelt bare den ene side) ses som runde/ovale

follikler i mikroskopet ved forstørrelse 10-20 gange, ofte kan kirtlen anes ved forstørrelse på 4 gange (Figur 8). Når man kunne observere kirtlen, blev der udtaget fire til fem snit (5 μm) på objektglas. Ved nogle af de første frøer, blev alle snit samlet op indtil kirtlen begyndte at blive betydelige mindre, og senere blev der en afstand på 40 μm (8 snit) mellem hvert objektglas.

3.2.3 Farvning

Da objektglassene med vævet var helt tørre (to timer i varmeskab ved 60°C eller til efterfølgende dag ved 40°C), kunne farveprocessen begynde. Farvningen af objektglassene foregik i et farveapparat med farvning af hematoxylin (CAS 517-28-2) og eosin (CAS 15086-94-9) (Se bilag 4 for farveprocessen). Efter farveprocessen blev dækglas limet på objektglassene med Tissue-Tek® Glas™ monteringsmedie.

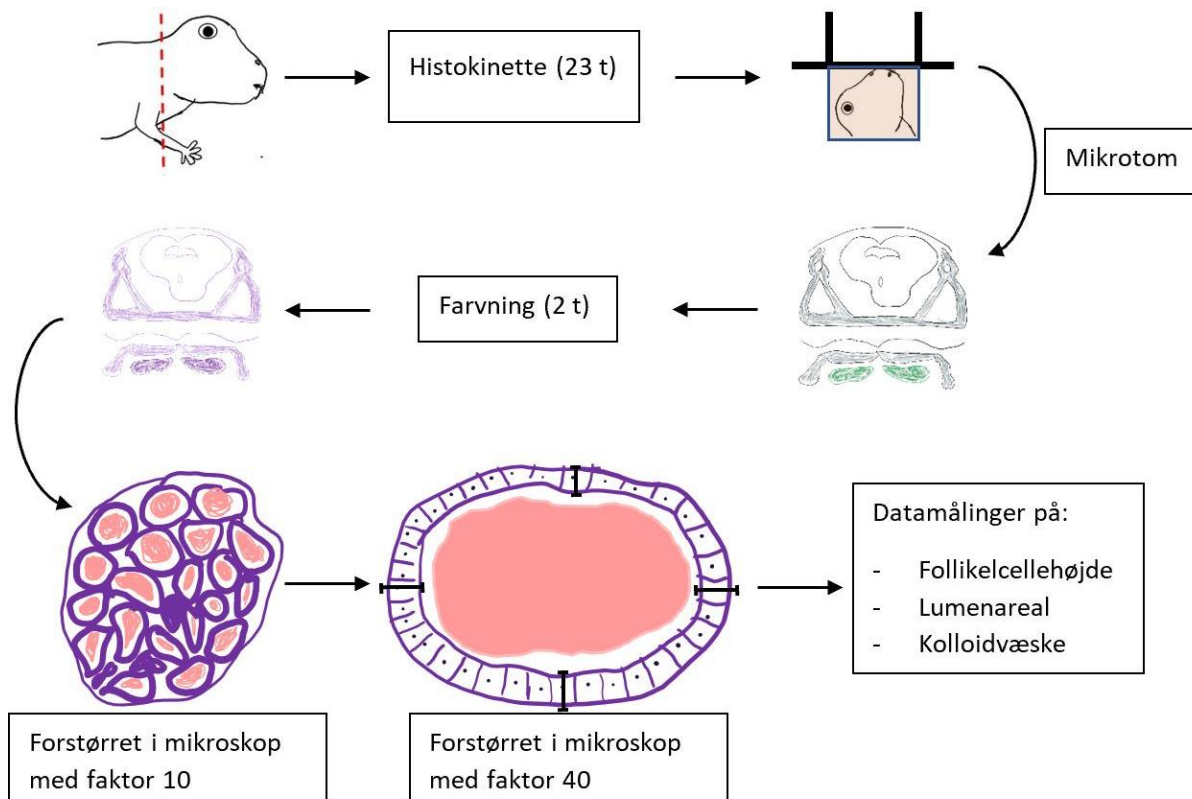
3.2.4 Dataopsamling

Efter snittene var farvet og tørre, blev der udvalgt et til to objektglas via undersøgelse i mikroskopet, hvor tværsnitsarealet af frøens højre kirtel var størst. Herefter blev tværsnitsarealet af de fire til otte snit bestemt ved brug af mikroskop (Nikon Eclipse Ti-E, Zyla sCMOS kamera) med et integreret billedeanalyseprogram (NIS elements version 4.60.00). Snittet med det største areal blev udvalgt til at bestemme cellehøjden i fire tilfældige tydelige follikler, samt lumenarealet (se eventuel Figur 1 og bilag 5 for opbygning af skjoldbruskkirtel). Det var kun de follikler, hvor cellekernernes membranafgrænsning tydeligt kunne ses, der blev brugt til bestemmelse af cellehøjden i fire celler. Når man kunne se at cellekernerne havde tydelige afgrænsning til resten af cellen, var cellen ofte tydeligt afgrænset til de omkringliggende celler, og derfor kunne cellehøjden måles mere præcist. Hvis der var flere end fire follikler som opfyldte ovenstående kriterier, blev de nummeret 1 til x, og ved brug af Googles tilfældige tal generator, blev fire follikler udvalgt. De fire celler i folliklerne var udvalgt ud fra at være placeret kl. 12, 3, 6 og 9 i folliklen, så den gennemsnitlige cellehøjde for en follikel var repræsenteret for hele folliklen (Figur 9). I den største follikel i snittet bestemmes arealet af



Figur 8: Et snit fra en frø (*R. temporaria*), hvor brusklaget (sort markering) er ubrudt og den ene side af skjoldbruskkirtlen kan anes (rød markering). Billedet er fra mikroskop ved en forstørrelse på 4 gange.

lumen ud fra to forskellige opmålinger: (1) den røde kolloidvæske og (2) lumens samlede areal. Hele metoden er skitseret i Figur 9.



Figur 9: Skitse af hele metoden, som er brugt i dette forsøg fra indstøbning (øverste serie) til snitning og farvning (midterste serie) til dataopsamling (nederste serie).

3.3 Statistiske analyser

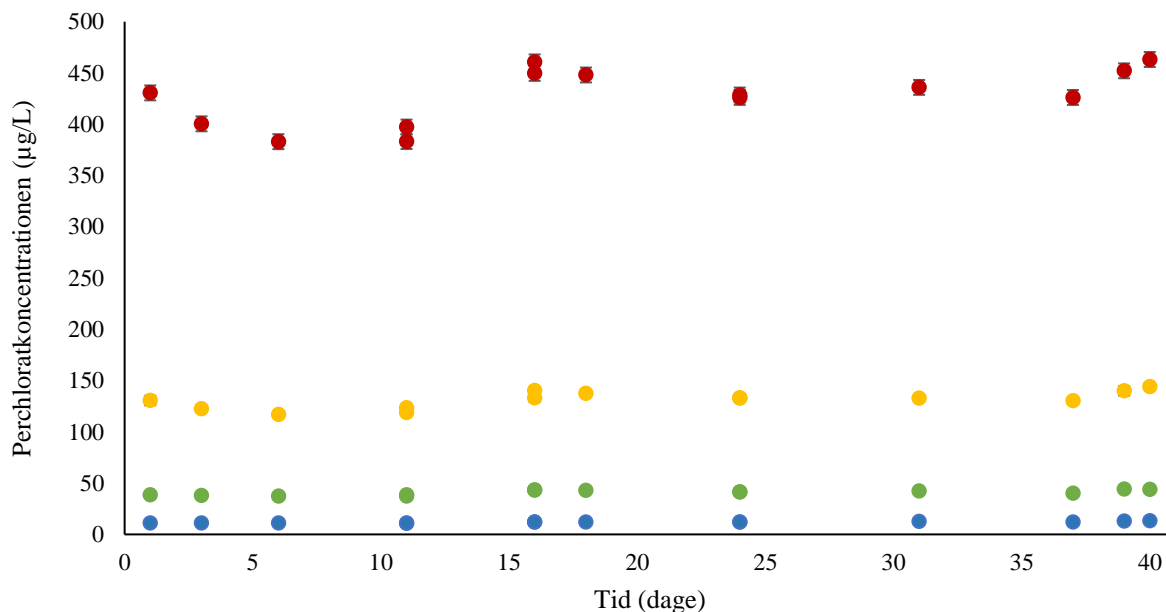
Perchloratkoncentrationen, dødeligheden, de biometriske parametre og follikelcellehøjden blev analyseret med envejs ANOVA. Forudsætningerne for ANOVA er ens varians og normalfordeling, som blev testet henholdsvis via ens varianstest og normalitetstest (Shapiro-Wilk). Hvis forudsætningerne for ANOVA ikke var opfyldt, eventuelt efter logtransformation, blev data analyseret via Kruskal-Wallis rangeret envejs ANOVA. Hvis ANOVA viste en statistisk signifikant forskel mellem grupperne ($P < 0,05$), blev forskellen mellem grupperne sammenlignet parvis (Student-Newman-Keuls-metode) eller kontrolgruppen kontra de andre grupper (Dunnets metode). Ved Kruskal-Wallis rangeret envejs ANOVA, blev statistiske signifikante forskelle mellem grupperne undersøgt ved Dunns metode. Dunns metode kan ikke give den præcise p-værdi, derfor angiver metoden kun om der er en forskel mellem grupperne hvis $P < 0,05$. Alle statistiske analyser blev udført i programmet SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc), og signifikansniveauet i alle test var $P < 0,05$.

4 Resultater

Resultaterne for eksponeringsforsøget og efterfølgende databehandling er inddelt efter observationer fra eksponeringsforsøget, apikale endpoints (biometriske resultater) og mekanistiske endpoints (histologiske resultater).

4.1.1 Perchloratkoncentrationen

Perchloratkoncentrationen over tid var konstant indenfor tre af eksponeringsgrupperne (11,9, 41,0 og 131,2 $\mu\text{g/L}$), og der var ingen signifikant forskel på replikaterne indenfor disse grupper (Figur 10).

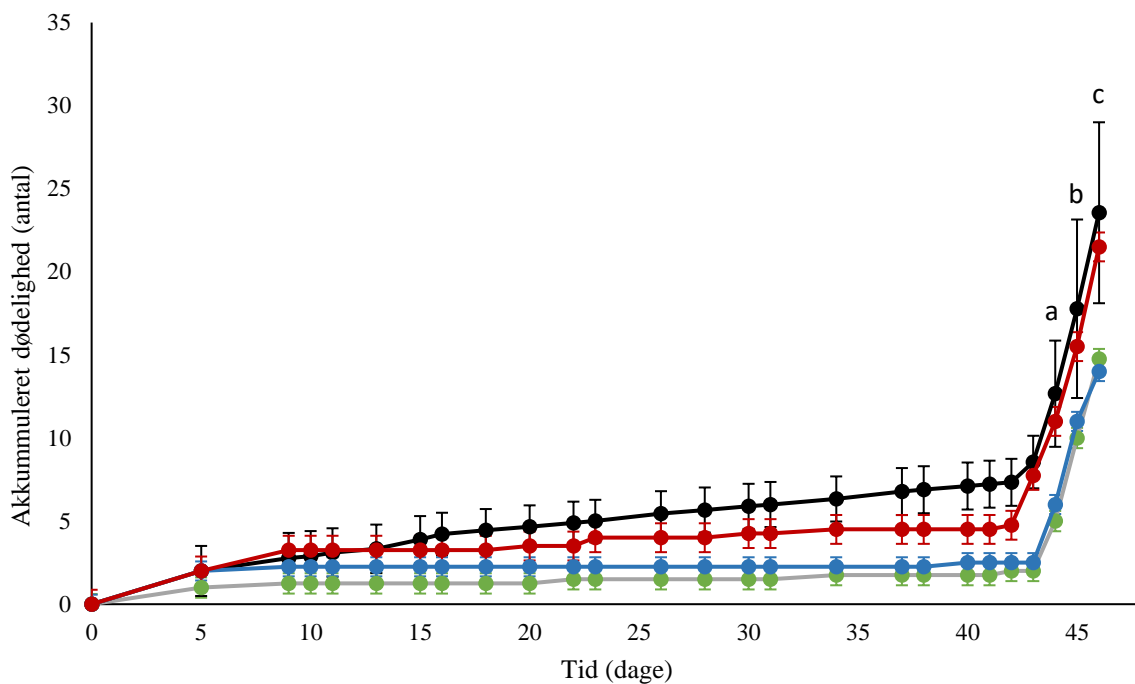


Figur 10: De gennemsnitlige aktuelle perchloratkoncentrationer ($\mu\text{g/L}$) i eksponeringsgrupperne 11,9 (kar 7, 8, 23 og 24; blå), 40,9 (kar 11, 12, 19 og 20; grøn), 131,2 (kar 3, 4, 15 og 16; gul) og 426,9 $\mu\text{g/L}$ (kar 1, 2, 13 og 14; rød). Fejllinjerne viser standardafvigelsen i mellem replikaterne.

I den højeste eksponeret gruppe (426,9 $\mu\text{g/L}$), var koncentrationen lavere i begyndelsen (dag 6 og 11) end resten af eksponeringstiden, samt der var en signifikant forskel på kar 1 og 14 med gennemsnitlige værdier på henholdsvis 438,9 og 406,4 $\mu\text{g/L}$. Der blev ikke detekteret perchlorat i nogen af kontrolkarrene.

4.1.2 Dødelighed

Dødeligheden i alle eksponeringsgrupper var ens og lav i størstedelen af eksponeringsperioden (indtil dag 43) (Figur 11, 131,2 µg/L-eksponeringsgruppen er ikke vist for overskueligheden), men dødeligheden steg signifikant i slutningen af eksponeringsforsøg (fra dag 43-46) for kontrolgruppen ($P < 0,001$). Kontrolkarrene havde højst antal døde (gennemsnit \pm SD: $23,6 \pm 5,4$), mens de eksponerede grupper havde lavere dødelighed afhængigt af dosis ($14,0 \pm 2,0$ i $11,9 \mu\text{g/L}$ mod $21,5 \pm 4,8$ i $426,9 \mu\text{g/L}$), dog var ikke statistisk signifikans mellem grupperne ($P = 0,058$) (Figur 11).



Figur 11: Den gennemsnitlige akkumuleret dødelig i kontrolgruppen (sort), 11,9 µg/L-gruppen (blå), 41,0 µg/L-gruppen (grøn), 426,9 µg/L-gruppen (rød). Fejllinjerne angiver standardafvigelsen. Bogstaverne (a - c) indikerer forskellige signifikante niveauer for kontrolgruppens dødelighed fra dag 43-44 (a, $P=0,042$), 44-45 (b, $P=0,013$), 45-46 (c, $P=0,005$).

Den akkumulerede dødelighed mellem alle replikaterne varierende fra 10 individer ($41,0 \mu\text{g/L}$) til 35 ($131,2 \mu\text{g/L}$).

4.2 Biometriske målinger

De biometriske data bestod af vægt og tre forskellige længder (snude-anus længde, bagbenslængde og totallængde). Generelt var der signifikant forskel mellem den højeksponeret gruppe ($426,9 \mu\text{g/L}$) og kontrolgruppen.

4.2.1 Vægt

Vægten varierede fra 0,177 g (kontrol) til 1,370 g (131,2 µg/L), og der var en signifikant forskel mellem den højeksponerede gruppe (426,9 µg/L) og kontrolgruppen ($P < 0,05$) (Figur 12).

Indenfor grupperne var der signifikante afvigelser mellem replikaterne undtagen for kontrolgruppen og 41,0 µg/L-gruppen.

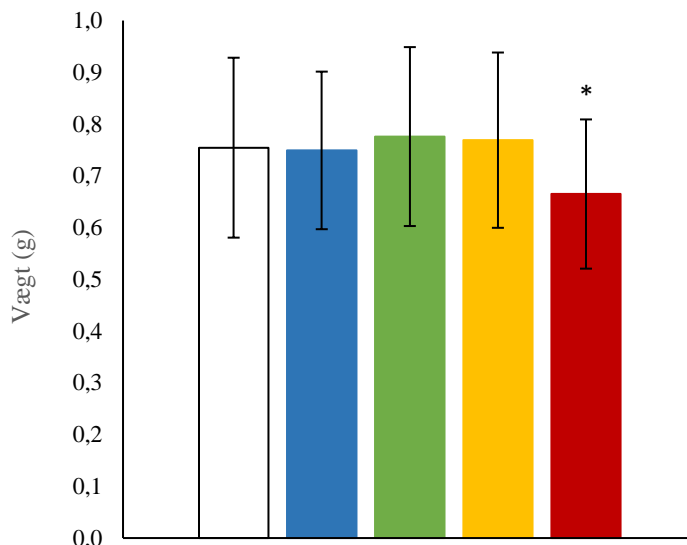
4.2.2 Snude-anus længde

Ligesom ved vægt, var der en signifikant forskel mellem den højeksponerede gruppe (426,9 µg/L) og kontrolgruppen ($P > 0,05$) (Figur 13). Snude-anus længden varierede fra 0,9 (kontrol) til 2,8 cm (kontrol).

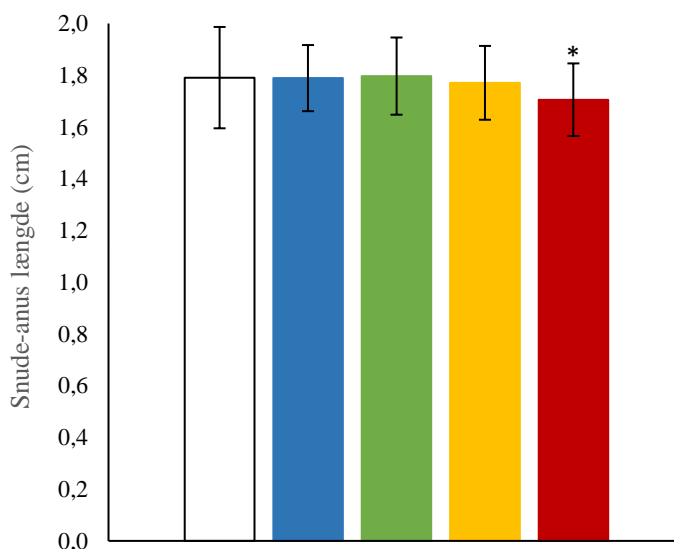
4.2.3 Bagbenslængden

Bagbenslængden varierede ikke signifikant indenfor grupperne ($P = 0,359$).

Den korteste bagbenslængde var 0,2 cm (kontrol), mens den længste bagbenslængde var 2,4 cm (kontrol). Den gennemsnitlige bagbenslængde var 1,87 cm $\pm 0,28$ for kontrol, 1,82 $\pm 0,30$ for 11,9 µg/L, 1,83 $\pm 0,29$ for 40,9 µg/L, 1,83 $\pm 0,30$ for 131,2 µg/L og 1,79 $\pm 0,32$ for 426,9 µg/L.



Figur 12: Gennemsnitlig vægt (\pm standardafvigelse) for kontrolgruppen ($N=163$; hvid) var 0,754 g \pm 0,174, 0,749 g \pm 0,152 i 11,9 µg/L-gruppen ($N=100$; blå), 0,776 g \pm 0,173 i 41,0 µg/L-gruppen ($N=93$; grøn), 0,769 \pm 0,169 i 131,2 µg/L-gruppen ($N=82$; gul) og 0,665 g \pm 0,144 i 426,9 µg/L-gruppen ($N=72$; rød). Stjernen (*) indikerer signifikans sammenlignet med kontrolgruppen ($P < 0,05$).



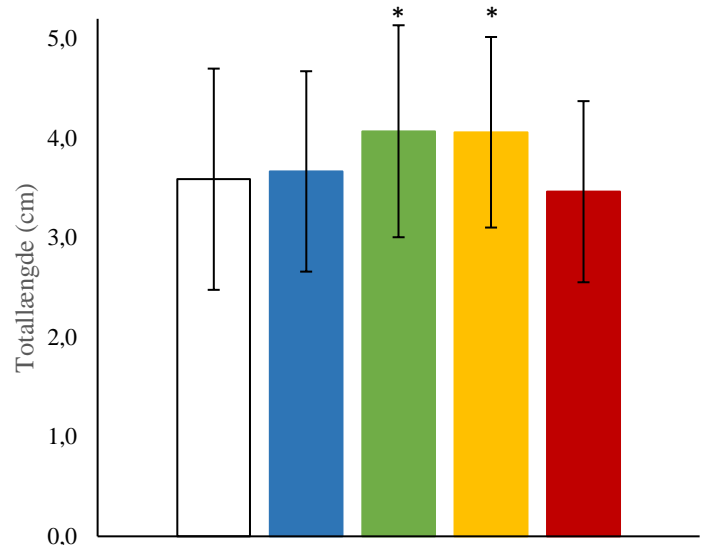
Figur 13: Gennemsnitlig snude-anus længde (\pm standardafvigelse) for kontrolgruppen ($N=163$; hvid) var 1,791 cm \pm 0,2, 1,789 \pm 0,13 i 11,9 µg/L-gruppen ($N=100$; blå), 1,797 cm \pm 0,15 i 41,0 µg/L-gruppen ($N=93$; grøn), 1,771 cm \pm 0,14 i 131,2 µg/L-gruppen ($N=82$; gul) og 1,706 cm \pm 0,14 i 426,9 µg/L-gruppen ($N=72$; rød). Stjernen (*) indikerer signifikans sammenlignet med kontrolgruppen ($P < 0,05$).

4.3.4 Totallængde

Totallængden varierede signifikant mellem grupperne ($P < 0,001$), hvor total-længden i 41,0 og 131,2 $\mu\text{g/L}$ var signifi-kant længere end kontrolgruppen ($P < 0,05$) (Figur 14). Den længste totallængde var 6,4 cm (131,2 $\mu\text{g/L}$) og den korteste var 1,4 cm (kontrol).

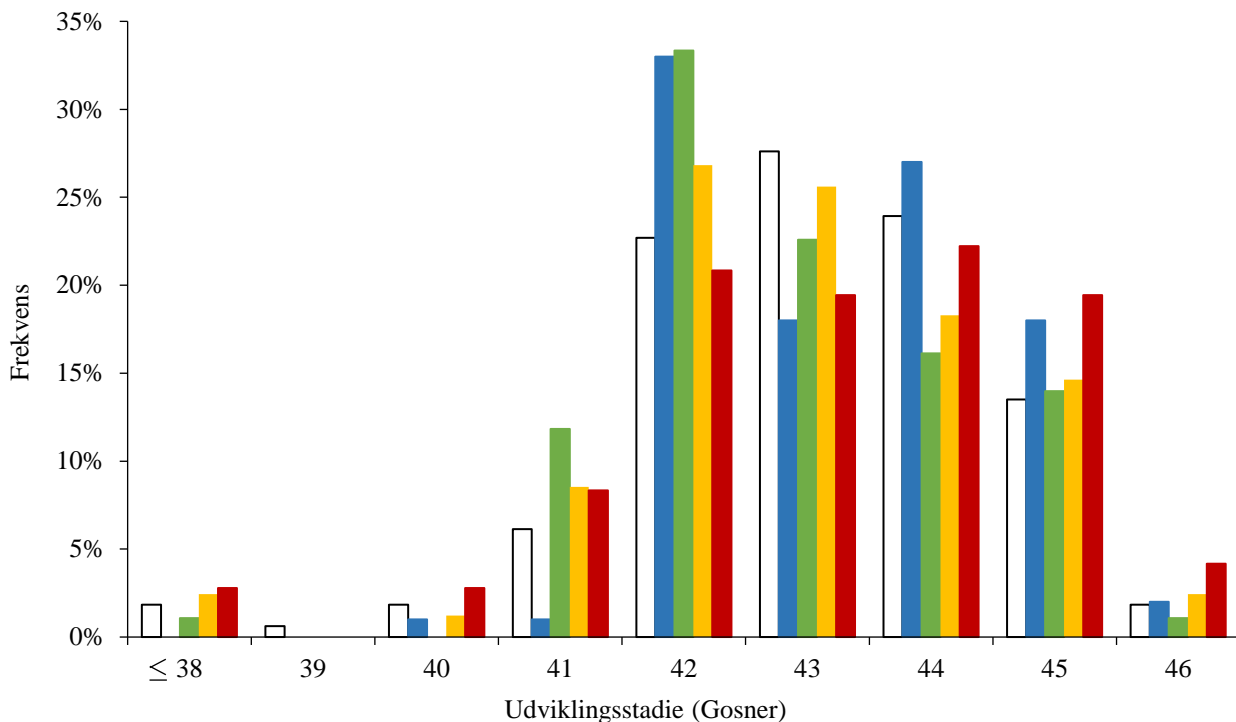
4.3.5 Udviklingsstadiet

Størstedelen af kontrolgruppen (121 ud af 163, 74,2 %) var i udviklingsstadiet 42-44 (Gosner, bilag 1), mens udviklingsstadiet i den højeksponerede gruppe (426,9 $\mu\text{g/L}$) var lige fordelt fra udviklingsstadiet 42 til 45 (14-16 ud af 72, 19,4-22,2 %) (Figur 15). Fordelingen af udviklingssta-



Figur 14: Gennemsnitlig totallængde (\pm standardafvigelse) for kontrolgruppen ($N=163$; hvid) var 3,59 cm \pm 1,11, 3,67 cm \pm 1,01 i 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=100$; blå), 4,07 cm \pm 1,07 i 41,0 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=93$; grøn), 4,06 cm \pm 0,96 i 131,2 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=82$; gul) og 3,46 cm \pm 0,91 i 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=72$; rød). Stjernen (*) indikerer signifikans sammenlignet med kontrolgruppen ($P < 0,05$).

dierne for de andre grupper end den højeksponerede gruppe (426,9 $\mu\text{g/L}$) var forskudt svagt mod lavere udviklingsstadiet sammenlignet med kontrolgruppen (Figur 8). 22,7 % ($N = 37$) af kontrolgruppen var i udviklingsstadiet 42, mens 33,0 % af henholdsvis 11,9 og 41,0 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N = 33$ og 31) og 26,8 % af 131,2 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N = 22$) var i samme udviklingsstadiet. Fordelingen i udviklingsstadiet 43 havde samme tendens, hvor de eksponerende grupper (undtaget 426,9 $\mu\text{g/L}$) var svagt forskudt mod lavere udviklingsstadiet, hvor 27,6 % af kontrolgruppen ($N = 45$) var udviklingsstadiet 43, mens 18, 22,6 og 25,6 % af henholdsvis 11,9, 41,0 og 131,2 $\mu\text{g/L}$ var i udviklingsstadiet 43, hvilket var en lavere fordeling end i kontrolgruppen (Figur 15). Det udviklingsstadiet hvor flest frøer var i, var udviklingsstadiet 42 (138 ud af 510, 27,1 %) (Figur 15), som er første udviklingsstadiet i klimaks, hvor forbenene lige er brudt ud. 23,3 % af frøerne var i udviklingsstadiet 43 ($N=119$), mens 22,0 % og 15,5 % var i henholdsvis i udviklingsstadiet 44 ($N=112$) og 45 ($N=79$).



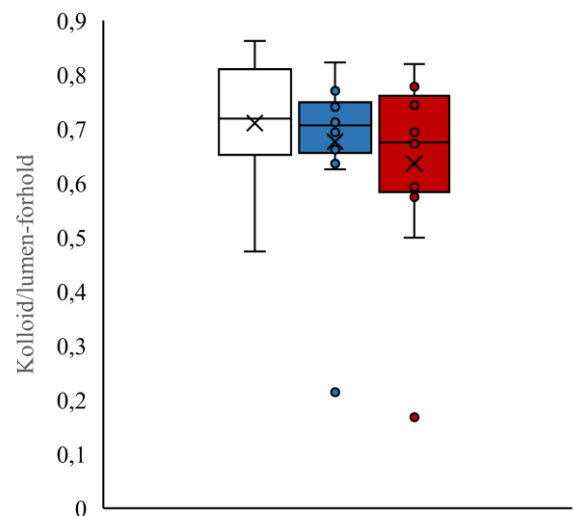
Figur 15: Frekvensdiagram som viser fordelingen af udviklingsstadierne for kontrolgruppen (N=163; hvid), 11,9 µg/L-gruppen (N=100; blå), 41,0 µg/L-gruppen (N=93; grøn), 131,2 µg/L-gruppen (N=82; gul) og 426,9 µg/L-gruppen (N=72; rød).

Samlet set var der 3,1 % (N=16) som var i udviklingsstadie 40 eller tidligere, og 2,2 % (N=11) som havde gennemført metamorfosen (udviklingsstadie 46). 3 individer fra både kontrolgruppen og 426,9 µg/L-gruppen har gennemført metamorfosen (nået til udviklingsstadie 46), hvilket svarer til 1,8 % for kontrolgruppen og 4,2 % for den højkseponeret gruppe (Figur 8).

4.3 Histologi af skjoldbruskkirtlen

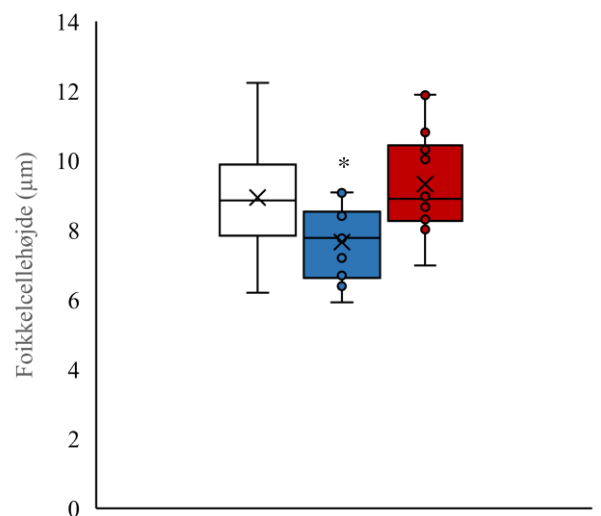
Skjoldbruskkirtlen blev undersøgt i 27 kontrolindivider, 14 fra henholdsvis 11,9 µg/L-gruppen og 426,9 µg/L-gruppen, hvor arealerne af kolloidvæsken, samlede lumen og samlede kirtelvæv i højre side blev målt, samt follikelcellehøjden (Figur 17) (Se bilag 5 for eksempel på hvordan follikelcellehøjderne og lumen- og kolloidarealet var målt). Kirtelarealet af højre side af skjoldbruskkirtlen var ikke forskelligt mellem de undersøgte grupper. Den højre side af kirtelarealet for kontrolgruppens kirtler varierede fra 20285 til 44034 µm², hvor gennemsnittet var 32530 ± 7301 µm², mens variationen for 11,9 µg/L og 426,9 µg/L var henholdsvis fra 22353 til 43477 µm² og fra 18105 til 47727 µm². Det gennemsnitlige areal for 11,9 µg/L-gruppen var 30556 ± 7686 µm² og 33175 ± 8942 µm² for 426,9 µg/L-gruppen.

Der var ingen forskelle på forholdet mellem arealet af kolloidvæsken og lumen ($P = 0,397$) (Figur 9). Forholdet mellem kolloidvæsken og lumen (Figur 9) blev bestemt, hvor det gennemsnitlige forhold var $0,71 \pm 0,11$; $0,68 \pm 0,14$ og $0,63 \pm 0,16$ for henholdsvis kontrol-, 11,9 $\mu\text{g/L}$ - og 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen. Arealerne af lumen og kolloidvæskerne var ikke forskellige mellem grupperne. Lumenarealerne var gennemsnitligt på $817 \mu\text{m}^2 \pm 430$ for kontrolgruppen, $832 \mu\text{m}^2 \pm 325$ for 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen og $749 \mu\text{m}^2 \pm 332$ for 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen. De gennemsnitlige arealer var højst i kontrolgruppen ($616 \mu\text{m}^2 \pm 315$) og lavere i 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($584 \mu\text{m}^2 \pm 300$) og 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($514 \mu\text{m}^2 \pm 267$), og grundet den store variation, var der ingen forskel mellem grupperne.



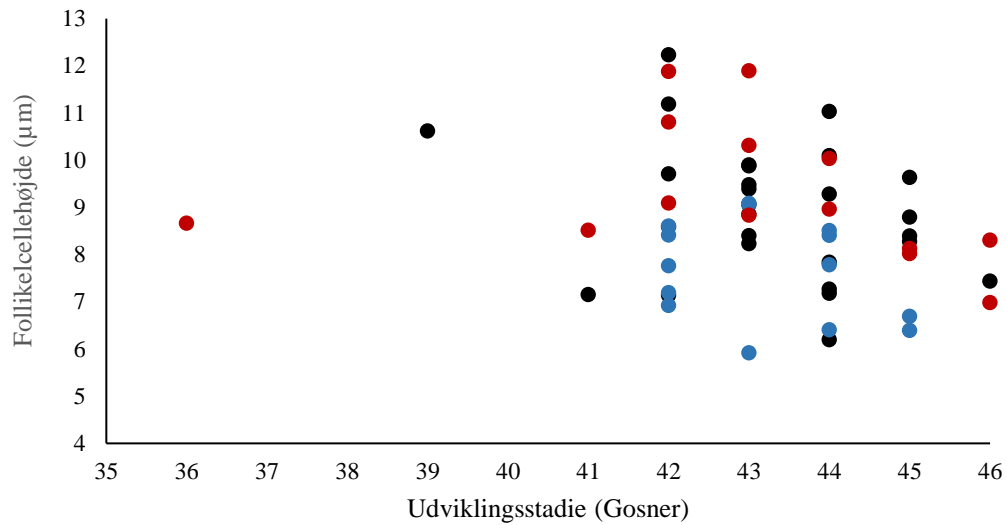
Figur 16: Forholdet mellem kolloid og lumen for kontrolgruppen ($N=27$; hvid), 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=14$; blå) og 426,9 $\mu\text{g/L}$ ($N=14$; rød)

Follikelcellehøjden var signifikant forskelle mellem de undersøgte grupper ($P = 0,004$), hvor 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen var signifikant lavere end kontrolgruppen ($P = 0,012$) (Figur 17). Gennemsnittet for follikelcellehøjden for kontrolgruppen, den laveksponeret gruppe (11,9 $\mu\text{g/L}$) og den højeksporeret gruppe (426,9 $\mu\text{g/L}$) var henholdsvis $8,94 \pm 2,08 \mu\text{m}$, $7,65 \pm 1,55 \mu\text{m}$ og $9,32 \pm 2,14 \mu\text{m}$ (Figur 10). Den laveste follikelcellehøjde for alle målinger var $3,88 \mu\text{m}$ (kontrol), mens den højeste højde var $18,05 \mu\text{m}$ (426,9 $\mu\text{g/L}$).



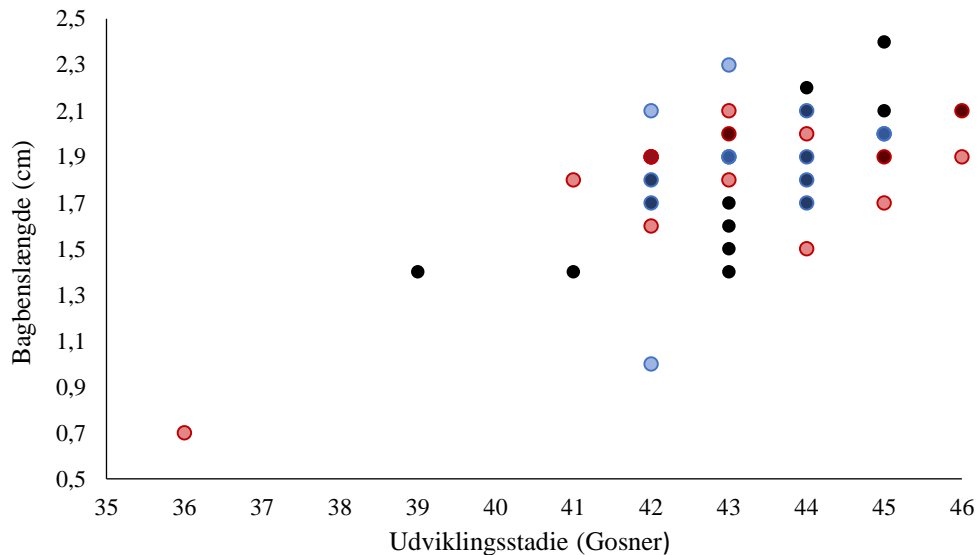
Figur 17: Follikelcellehøjden for kontrolgruppen ($N=27$; hvid), 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=14$; blå) og 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($N=14$, rød)). Signifikant forskel (*) mellem kontrolgruppen og 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen ($P = 0,012$).

Sammenhængen mellem udviklingsstadiet og follikelcellehøjden var positiv indtil udviklingsstadiet 42, hvor follikelcellehøjden efterfølgende blev lavere i løbet af udviklingen (Figur 18). Generelt havde 11,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen en lavere follikelcellehøjde end kontrolgruppen og 426,9 $\mu\text{g/L}$ -gruppen.



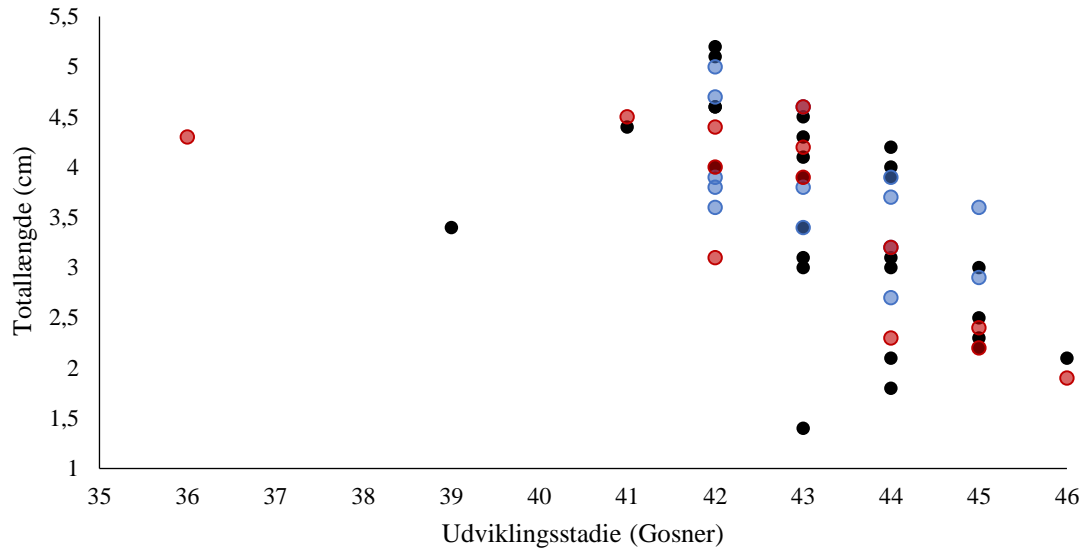
Figur 18: Sammenhængen mellem udviklingsstadiet (Gosner) og follikelcellehøjde (µm) for kontrolgruppen (N=27; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=14; blå) og 426,9 µg/L-gruppen (N=14; rød).

Bagbenslængden og totallængden havde en sammenhæng med udviklingsstadiet (Figur 19 og 20). Des højere udviklingsstadiet, des længere bagben, og dette var også gældende alle eksponerede frøer (Bilag 6). Generelt var bagbenslængderne mindre i 426,9 µg/L-gruppen end de andre, især ved udviklingsstadiet 44-46 (Figur 19).



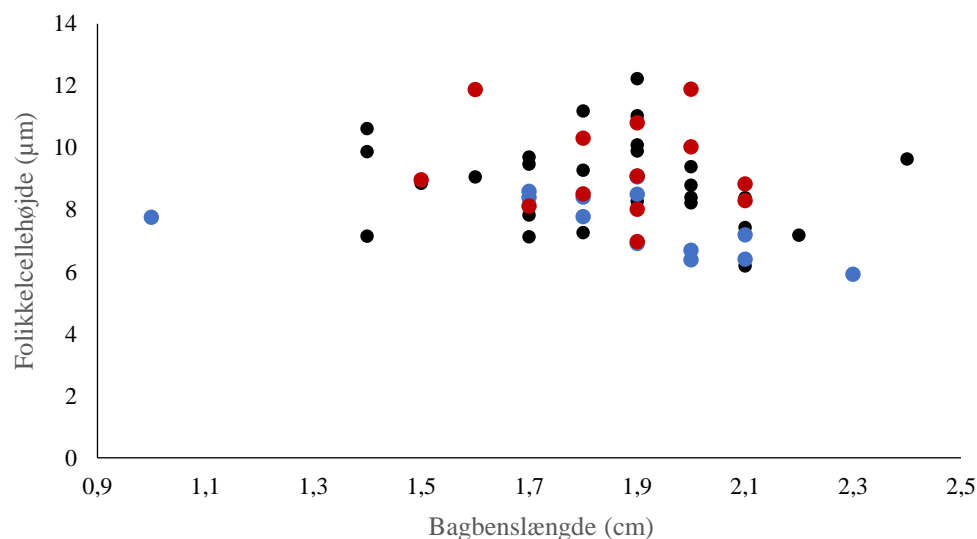
Figur 19: Sammenhængen mellem udviklingsstadiet (Gosner) og bagbenslængde for kontrolgruppen (N=27; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=14; blå) og 426,9 µg/L-gruppen (N=14; rød).

Efter udviklingsstadiet 42, faldt totallængden ved øget udviklingsstadium (Figur 20), hvor totallængden i 426,9 µg/L-gruppen var mindre end for kontrol- og 11,9 µg/L-gruppen, især i udviklingsstadiet 44-46.



Figur 20: Sammenhængen mellem udviklingsstadium (Gosner) og totallængden (cm) for bagbenslængde for kontrolgruppen (N=27; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=14; blå) og 426,9 µg/L-gruppen (N=14; rød). Bemærk den store variation i kontrolgruppen ved udviklingsstadiet 43-44.

Dette var også gældende, når alle eksponerede frøer var inkluderet (Bilag 6), hvor der var en signifikant forskel mellem totallængderne for kontrolgruppen og 41,0 µg/L- og 131,2 µg/L-gruppen (Figur 14).



Figur 21: Sammenhængen mellem bagbenslængden (cm) og follikelcellehøjden (µm) for kontrolgruppen (N=27; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=14; blå) og 426,9 µg/L-gruppen (N=14; rød).

Sammenhæng mellem follikelcellehøjde og bagbenlængde var svag, hvor des øgende bagbenslængde betød des øget follikelcellehøjde (Figur 21) indtil et maksimum ved en bagbenslængde på 1,9 cm. 11,9 µg/L-gruppen havde en lavere follikelcellehøjde ved tilsvarende bagbenslængde end kontrolgruppen og 426,9 µg/L-gruppen, især ved bagbenslængde over 1,9 cm (Figur 21).

5 Diskussion

Formålet med dette projekt var at sammenligne eksponeringseffekter af thyreoideahormonforstyrrende kemikalie hos *R. temporaria* med publicerede eksponeringseffekter hos *X. laevis*. Dette blev undersøgt ud fra biometriske parametre af alle eksponerede frøer (N=510) og histologiske undersøgelser af en del af de eksponerede frøer (N=55). Fokus var på histologiske undersøgelser for at undersøge om arterne er lige sensitive overfor thyreoideahormonforstyrrende kemikalier, eller om der er forskel på artssensitiviteten. *X. laevis* er den primære paddeart som bliver brugt ved eksponeringsforsøg blandt andet ved undersøgelse af thyreoideahormonforstyrrende kemikalier (OECD, 2009, 2015). Derfor er det vigtigt at vide om *X. laevis* er som minimum lige så sensitiv som andre paddearter, da resultaterne fra eksponeringsforsøgene med *X. laevis* især bliver brugt og vil blive brugt til vurdering af kemikaliers risiko- og farevurdering for alle andre paddearter (Coady et al., 2017; Europa-Kommissionen i Dang, 2019).

5.1 Eksponeringseffekter hos *R. temporaria*

Æg fra *R. temporaria* blev eksponeret for fire forskellige koncentrationer af perchlorat (11,9; 41,0; 131,2 og 426,9 µg/L) indtil metamorfosen (46-48 dage). I den højst eksponerede gruppe (426,9 µg/L) blev vægten og snude-anus længden signifikant reduceret i forhold til kontrolgruppen (Figur 12-13), mens totallængden var signifikant længere i 41,0- og 131,2 µg/L-grupperne i forhold til kontrolgruppens totallængde (Figur 14). De biometriske parametre som vægt og længde betegnes som apikale endpoints, mens follikelcellehøjden er et mekanistisk endpoint fordi mekanismen bag ændret follikelcellehøjde er kendt (Coleman et al., 1968; Dang, 2019; Hu et al., 2006). Perchlorat hæmmer natrium-iod-symporterens (NIS) i follikelcellerne i skjoldbruskkirtlen (Figur 3), og derved hæmmes syntesen af thyreoideahormoner (Jugan et al., 2010), og højden på follikelcellerne øges (Carlsson & Norrgren, 2007; Goleman et al., 2002; Hu et al., 2006). Den hæmmede syntese påvirker thyreoideahormonkoncentrationerne, så metamorfosen ikke kan forløbe optimalt, og derved forstyrres udviklingen fra haletudse til frø (Tietge et al., 2005). Follikelcellehøjden blev undersøgt i tre grupper (kontrol, 11,9 µg/L og 426,9 µg/L), og den var signifikant reduceret i 11,9 µg/L-gruppen i

forhold til kontrolgruppens follikelcellehøjde (Figur 17). Dette resultat stemmer ikke overens med de andre publicerede resultater, hvor stigende eksponering for et thyreoideaforstyrrende kemikalie førte til forhøjet follikelcellehøjde (Carlsson & Norrgren, 2007; Goleman et al., 2002; Hu et al., 2006) (Tabel 2). Carlsson og Norrgren (2007) fandt et dosis-responsforhold mellem follikelcellehøjden og koncentration af propylthiouracil hos haletudser (præmetamorfosen, stadie 51 (Nieuwkoop & Faber, 1994), se tabel 1 for sammenligning af udviklingsstadiesystemer) af arten *Xenopus tropicalis* (Vestafrikansk sporefrø) ved eksponering af 5-75 mg/L. Propylthiouracil er et thyreoideahormonforstyrrende kemikalie, hvor propylthiouracil hæmmer enzymet TPO (Figur 3 + 4), og derved reducerer syntesen af thyreoideahormoner. Follikelcellehøjden hos den højest eksponerede gruppe (75 mg/L) var cirka 2,5 gange højere end kontrolgruppens (16 µm kontra 6 µm). Et andet forsøg fandt lignende effekter efter æg fra *X. laevis* var eksponeret for perchlorat (1-1131 µg/L) i 38 dage (Hu et al., 2006). Follikelcellehøjden var signifikant forhøjet ved eksponering af 93 og 1131 µg/L i forhold til kontrolgruppen (14 µm kontra 10 µm). Mine histologiske resultater viste det modsatte, hvor den lavest eksponerede gruppe (11,9 µg/L) havde en lavere follikelcellehøjde end kontrolgruppen, og samtidig havde den højest eksponerede gruppe (426,9 µg/L) statistisk den samme follikelcellehøjde som kontrolgruppen (Figur 17). Hvis follikelcellehøjden blev sammenlignet ved en parvis statistisk test, var der en signifikant forskel mellem de to eksponerende grupper ($P = 0,06$), og det stemmer overens med resultaterne fra Carlsson og Norrgren (2007), hvor der var forskel på follikelcellehøjden ved eksponering på 5 og 75 mg propylthiouracil/L. Det kan betyde at kontrolgruppen muligvis ikke har været optimal at sammenligne med, og at der var en stor variation for den gennemsnitlige follikelcellehøjde i kontrolgruppen (fra 6,2 til 12,2 µm).

Tabel 2: Resultater fra andre eksponeringsforsøg med perchlorat eller propylthiouracil, hvor laveste observerede effektkoncentration (LOEC) er angivet i forhold til den observerede effekt af histologiundersøgelserne (af skjoldbruskkirtlen) med et signifikansniveau på $p < 0,001$ (***) eller $p < 0,05$ (*).

Kemikalie	Art	LOEC	Effekt	Kilde
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	8 µg/L ***	Reduceret kolloid T ₄	Hu et al. (2006)
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	59 µg/L *	Øget follikelcellehøjde	Goleman et al. (2002)
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	93 µg/L ***	Øget follikelcellehøjde	Hu et al. (2006)
Propylthiouracil	<i>X. tropicalis</i>	5 mg/L ***	Øget follikelcellehøjde	Carlsson og Norrgren (2007)

Propylthiouracil	<i>X. tropicalis</i>	2 mg/L* 5 mg/L***	Øget areal af skjold- bruskkirtel	Carlsson og Norrgren (2007)
------------------	----------------------	----------------------	--------------------------------------	--------------------------------

5.1.1 Biometriske eksponeringseffekter hos *R. temporaria*

Den øgede totallængde hos 41,0- og 131,2 µg/L-grupperne skyldes forstyrrede metamorfose, da hæmmet thyreoideahormonsystem i padders metamorfose fører til større individer, fordi thyreoideahormoner hæmmer haletuders vækst i at blive større/længere (Coady et al., 2010; Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968). Fra et andet eksponeringsforsøg af Tietge et al. (2005), konkluderede gruppen at hæmmet thyreoideahormonsystem fører til øget vækst, hvor de observerede at en øget vækst ved eksponering af 250-4000 µg/L perchlorat i 14 dag, som førte til signifikant øget vægt hos *X. laevis* haletudser (præmetamorfosen: stadie 51 og 54 (Nieuwkoop & Faber, 1994), se tabel 1 for sammenligning af udviklingsstadiesystemer). Den reducerede vægt og snude-anus længde ved den højst eksponerede gruppe (426,9 µg/L) skyldes ikke direkte effekter af hæmmet thyreoideahormonsystem, da vægten og længden burde været større og ikke mindre ifølge observationerne fra andre studier (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968; Tietge et al., 2005). Et forsøg med haletudser af *R. temporaria* blev vægten signifikant øget ved eksponering af 250 µg perchlorat/L (Ruthsatz et al., 2019), hvilket er det modsatte af resultatet i dette projekt ved en højere koncentration (426,9 µg/L) (Figur 12). Et andet forsøg (Carlsson & Norrgren, 2007) observerede samme tendens som dette projekt (Figur 12-13) med signifikant faldende vægt og totallængde hos *X. tropicalis* haletudser ved den højst eksponerede gruppe (75 mg/L) ved eksponering af propylthiouracil. Grunden til dette er endnu uvist, om det skyldes stress eller generel toksisk effekt (Coady et al., 2010), og vægttab var ikke observeret ved eksponering af høj koncentration af perchlorat (1131 og 4000 µg/L) i andre eksponeringsforsøg med *X. laevis* (Hu et al., 2006; Tietge et al., 2005). Ortiz-Santaliestra og Sparling (2007) observerede en signifikant dødelighed på 40 % (< 20% ved kontrol) ved 15 ugers eksponering af 15.000 µg perchlorat/L hos *Rana sphenoccephala* haletudser, så det kan tyde på en generel toksisk effekt for *R. temporaria* ved en koncentration over 427 µg perchlorat/L, eller at *X. laevis* er mindre sensitiv overfor toksiske effekter af høje (>4000 µg/L) koncentrationer af perchlorat end *X. tropicalis*, *R. temporaria* og *R. sphenoccephala*.

Der var ingen forskel på bagbenslængderne (afsnit 4.2.3), hvilket ellers var forventeligt, da thyreoideahormoner inducerer udvikling af bagben (Shi, 2000). Andre forsøg havde observeret en reduceret bagbenslængde hos *X. laevis* (Goleman et al., 2002; Hu et al., 2006) og *X. tropicalis* (Carlsson &

Norrgren, 2007) ved eksponering af henholdsvis perchlorat (59 og 93 µg/L) og propylthiouracil (75 mg/L). Thyreoideahormoner er væsentlige for udvikling, og derfor er udviklingen en anden parameter som er blevet undersøgt, da reducerede koncentration af thyreoideahormoner fører til forsinkelse i udviklingen (Brown & Cai, 2007; Shi, 2000) (Bilag 1). Forsinkelse i udviklingen var observeret ved eksponeringsforsøg ved koncentrationer fra henholdsvis 32-250 µg perchlorat /L hos *X. laevis* og 75 mg propylthiouracil /L hos *X. tropicalis* (Tabel 3). Hos *R. temporaria* og *R. sphenoccephala* var ligeledes observeret en forsinkelse i udvikling ved eksponering af perchlorat (250-15.000 µg/L) (Tabel 3). I dette forsøg med *R. temporaria* blev der ikke observeret en signifikant effekt på forsinkelse af udviklingsstadiet, selvom den højst eksponerede gruppe havde den største procentsats (4,2 %, N= 3 / 72) i det mest udviklet udviklingsstadium (Figur 15), og dette stemmer ikke overens med de andres resultater (Tabel 3).

Tabel 3: Resultater fra andre eksponeringsforsøg med perchlorat og propylthiouracil, hvor lavest observerede effekt-koncentration (LOEC) er angivet i forhold til den observerede effekt på udviklingen med et signifikansniveau på $p < 0,001$ (***) eller $p < 0,05$ (*).

Kemikalie	Art	LOEC	Effekt	Kilde
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	32 µg/L *	Forsinket udvikling	Y. F. Zhang et al. (2019)
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	59 µg/L *	Forsinket absorbering af hale	Goleman et al. (2002)
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	93 µg/L ***	Forsinket udvikling	Hu et al. (2006)
Perchlorat	<i>X. laevis</i>	250 µg/L *	Forsinket udvikling	Ruthsatz et al. (2018); Tietge et al. (2005)
Propylthiouracil	<i>X. tropicalis</i>	75 mg/L ***	Forsinket udvikling	Carlsson og Norrgren (2007)
Perchlorat	<i>R. temporaria</i>	250 µg/L***	Forsinket udvikling	Ruthsatz et al. (2019)
Perchlorat	<i>R. sphenoccephala</i>	15 mg/L ***	Forsinket udvikling	Ortiz-Santaliestra og Sparling (2007)

5.1.3 Artsensitivitet

Når den laveste observerede effektkoncentration (LOEC) sammenlignes mellem histologiundersøgelser (Tabel 2) og udviklingen (Tabel 3), er LOEC for histologiundersøgelserne af skjoldbruskkirtlen generelt lavere end LOEC for udviklingen. Forsinkelse i udviklingen er et apikalt endpoint, mens resultater fra histologiske undersøgelser er mekanistiske endpoints, da mekanismen som beskriver resultatet, er kendt fx forhøjet follikelcellehøjde. Dang (2019) pointerede ved sammenligning af forskellige endpoints (blandt andet biometriske parametre og histologiske undersøgelser af skjoldbruskkirtlen) fra eksponeringsforsøg ud fra AMA-metoden, at den laveste LOEC bør bestemmes fra histologiske undersøgelser. Histologiske undersøgelser anbefales fra andre reviews på baggrund, at mekanismen er kendt, og derfor kender man sammenhængen mellem effekten og observeret endpoint, og at histologiske undersøgelser kan detektere en signifikant forskel ved en lavere LOEC end de apikale endpoints (Tabel 2 og 3) (Coady et al., 2017; Marty et al., 2017; Slaby et al., 2019). Resultaterne fra dette projekt viste en forskel mellem kontrolgruppen og de eksponerede grupper (41,0 og 131,2 µg/L) ved øget totallængde, men den præcise mekanismen, hvorfor hæmmet thyreoideahormonsystem fører til øget totallængde er endnu ikke kendt, udover at thyreoideahormoner hæmmer haletudsens vækst (Dodd & Dodd, 1976; Etkin, 1968). Derfor anbefales det at bruge de mekanistiske endpoints, men de apikale endpoints som er afhængige af thyreoideahormoner kan bruges som et pejlemærke for thyreoideaforstyrrende effekter (Dang, 2019).

Sammenlignes LOEC mellem arterne (Tabel 2 og 3), er *X. laevis* den mest sensitive art, men ud fra nuværende tidspunkt findes der kun dette forsøg, som undersøgte histologiske eksponeringseffekter af skjoldbruskkirtlen hos en anden slægt end *Xenopus*. *R. temporaria* havde signifikant hæmmet udvikling ved eksponering af 250 µg perchlorat/L, og dette var den laveste eksponerede koncentration (Ruthsatz et al., 2019), så hvis *R. temporaria* blev eksponerede for en lavere koncentration end 250 µg/L, vil det kunne bekræfte om LOEC for hæmmet udvikling er 250 µg perchlorat/L eller lavere. I dette forsøg var totallængden signifikant øget ved 41,0 og 131,2 µg/L, men ikke for 11,9, og derfor var LOEC 41,0 µg/L. Denne LOEC er tæt på 32 µg/L hos *X. laevis* (Y. F. Zhang et al., 2019), så det kan tyde på at arterne er lige sensitive ved dette apikale endpoint (Tabel 3). Det mest sensitive endpoint observerede ved *X. laevis* var reduceret thyreoidea (T₄) i kolloidvæsken i skjoldbruskkirtlen (Hu et al., 2006) ved brug af immunokemiske metoder på de histologiske snit i stedet for farvning af eosin og hematoxylin. LOEC for denne metode var 8 µg perchlorat/L, hvilket er den laveste koncentration i alle de andre henviste forsøg. Thyreoidea i kolloidvæsken er et mekanistisk endpoint, da perchlorat hæmmer syntesen af thyreoideahormoner ved hæmning af transporten af det essentielle

iod (Figur 3 og 4) (Eskandari et al., 1997). Derfor kan man bruge thyreoidea i kolloidvæsken som et sensitivt mekanistisk endpoint ved undersøgelse af thyreoideaforstyrrende effekter ved syntesen af thyreoideahormoner.

5.2 Thyreoideahormonsystemet hos andre vertebrater

Thyreoideahormonsystemet findes hos alle chordataer, men det er kun hos vertebraterne at skjoldbruskkirtlen findes, dog er det ikke alle vertebrater som har en egentlig skjoldbruskkirtel (Paris et al., 2008). Kommunikationen i HPT-aksen er tilnærmelsesvist ens for alle vertebrater, men der er små forskelle, fx er det stimulerende hormon fra hypothalamus CRH hos haletudser, mens det er TRH hos alle andre (Figur 2) (Denver, 1988; Sternberg et al., 2011). Thyreoideahormonerne er ens på tværs af vertebratklasserne, og derfor kan hormonerne fra pattedyr aktivere et responssignal hos fx frøer (Brown & Cai, 2007; Paris & Laudet, 2008). Forskellen mellem vertebratklasserne (og muligvis arter) er hvilke specifikke proteiner som fx transporterer thyreoideahormonerne rundt i blodet, eller hvordan metabolismen af thyreoideahormonerne er (Paris & Laudet, 2008; Zoeller et al., 2007). Thyreoideahormonsystemet er nødvendigt for at alle vertebrater for kunne gennemføre livscyklusserne, og derfor kan forstyrrelser på thyreoideasystemet have en stor konsekvens (Brown & Cai, 2007; Mughal et al., 2018). Hos padder har flere forsøg påvist forsinket udvikling ved thyreoideaforstyrrende kemikalier (fx Ruthsatz et al., 2019; Tietge et al., 2005).

5.2.1 Fisk

Hos fiskene, er thyreoideahormonsystemet ligesom det generelle vertebrat (Figur 2), dog er det ikke alle fiskearter som har folliklerne organiseret i en skjoldbruskkirtel (Baumann et al., 2016; Paris & Laudet, 2008). Fisk er en anden vertebratgruppe, hvor thyreoideahormonforstyrrende effekter er velundersøgt. Hos fisk er øjets udvikling afhængig af thyreoideahormoner (Baumann et al., 2016), og ved eksponering af propylthiouracil i æg fra zebrafisk (*Danio rerio*), havde øjet hos fiskelarverne (5 dage efter befrugtning) udviklet sig signifikant forskelligt fra kontrolgruppen ved en koncentration på 250 mg propylthiouracil /L (Baumann et al., 2016). I samme forsøg var nogle thyreoidea-relateret gener signifikant op- eller nedreguleret (Baumann et al., 2016), hvor genet for enzymet TPO (Figur 3+4) var kraftigt opreguleret, hvilket stemmer overens med at propylthiouracil hæmmer TPO, og derfor er follikelcellens respons at øge enzymkoncentrationen. Mekanismen bag den specifikke ændrede øjeudvikling hos zebrafisk ved eksponering af propylthiouracil, er endnu ikke kendt, men det antages at det pigmenterede del af øjet er meget afhængigt af thyreoideahormoner, da propylthiouracil ændrede øjets udvikling mere end et andet thyreoideaforstyrrende kemikalie, som

forstyrrer thyreoideahormonreceptoren (Baumann et al., 2016). Follikelcellehøjden hos zebrafisk var blevet undersøgt efter eksponering med perchlorat, hvor follikelcellehøjden var signifikant reduceret efter 12 ugers eksponering med 1131 µg perchlorat/L (Mukhi et al., 2005). I samme forsøg blev thyreoideahormonkoncentrationen (T_4) i kolloidvæsken undersøgt ved brug af samme immunokemiske metoder som Hu et al. (2006), hvor Mukhi et al. (2005) fandt signifikant reducerede thyreoideahormonkoncentration i kolloidvæsken ved eksponering på 11 µg/L. Sammenlignet med resultaterne fra Hu et al. (2006) (Tabel 2), er *X. laevis* og zebrafisk lige sensitive overfor thyreoideahormonforstyrrelser forårsaget af perchlorat (henholdsvis LOEC på 8 og 11 µg/L). Mukhi et al. (2005) undersøgte thyreoideahormon i kolloidvæsken efter 12 ugers restitution i rent vand, hvor det kun var fiskene fra den højeste eksponering (11480 µg/L) som stadig havde reducerede thyreoideahormonkoncentration i kolloidvæsken. Dette stemmer overens med at blokeringen af NIS med perchlorat, som er reversibel (Eskandari et al., 1997).

Generelt er fisk afhængig af thyreoideahormoner ved udviklingen fra larve til fisk, og der er artsvariationer for hvor meget morfologien ændres i denne udviklingsperiode (Carr & Patino, 2011). Ved gonadeudvikling og reproduktion er thyreoideahormoner nødvendige, og ved eksponering af thyreoideaforstyrrende kemikalier påvirkes gonadeudviklingen og reproduktionssucces (Carr & Patino, 2011). Ved kronisk eksponering af perchlorat (100 mg/L), blev skjoldbruskkirtelmorfologien ændret hos trepigget hundestejle (*Gasterosteus aculeatus*) (Petersen et al., 2015), hvor follikelcellehøjden blev signifikant øget i embryoer og unge fisk. Ved undersøgelse af sammenhængen mellem koncentrationen af thyreoideahormoner og thyreoideaforstyrrende kemikalier hos to lokale fiskearter i USA, fandt Brar et al. (2010) signifikante sammenhæng mellem thyreoideahormoner og thyreoideaforstyrrende kemikalier (primært PCB'er). I områder med høje koncentrationer af PCB'er var forholdet mellem T_3 og T_4 ændret, og det skyldes at PCB'er påvirker deiodinase-enzymene, som omdanner T_4 til T_3 (Zoeller et al., 2007). Ligeledes er bisphenoler (A, F, S og Z) blevet påvist at påvirke thyreoideahormonsystemet ved ændret gentransskription og ændret thyreoideahormonkoncentration i zebrafiskembryoer (Lee et al., 2019). Ingen af de benævnte studier omkring thyreoideaforstyrrelser hos fisk (Baumann et al., 2016; Brar et al., 2010; Lee et al., 2019; Mukhi et al., 2005) beskrev, hvad de observerede thyreoideaforstyrrelser betydede for individerne eller populationen. Hvis skaderne på udviklingen af øjet er irreversible, og synssansen hæmmes, vil individet ikke kunne se, og derfor vil fødesøgning og undgåelse af predation være svært. Derfor kan skader på udviklingen af øjet føre til højere dødelighed, og det vil have en betydning for populationen.

Den ændrede thyreoideahormonkoncentration fører muligvis ikke til nogen skadelige effekter for individerne eller populationen, men det er endnu ikke undersøgt.

5.2.2 Krybdyr

Hos krybdyrene, er thyreoideahormonsystemet vigtigt for deres vækst, termoregulering, metabolisme og reproduktion (Chang et al., 2018; Lynn, 1960), og thyreoideahormonsystemet i krybdyr er ligesom det generelle thyreoideahormonsystem i vertebrater (Figur 2) (Lynn, 1960). Krybdyr er ikke lige så undersøgt som padder og fisk, og derfor findes der ingen standardiseret testmetode for krybdyr, og der er få eksponeringsforsøg med thyreoideahormonforstyrrende kemikaliers effekt i krybdyr. Der er ikke en modelart indenfor krybdyr, og derfor testes der på forskellige arter, og det giver et overblik over artssensitiviteten. Efter eksponering af insekticidet diflubenzuron til den asiatiske øgle (*Eremias argus*) blev observerede reducerede vægt ved dermaleksponering (20 mg/kg) efter 42 dage, og ændret thyreoideahormonkoncentration blev observerede ved både dermal- og oraleksponering (20 mg/kg) (Chang et al., 2018). Der var kønsforskel på thyreoideahormonkoncentrationerne, hvor thyreoideahormonkoncentrationen blev øget hos hannerne, men sænket hos hunnerne, og hunnerne var mere sensitive ved ændret thyreoidea-relaterede gener ved oraleksponering end hannerne. Alle resultaterne tyder på at krybdyr er mere sensitive overfor oraleksponering end dermalt, hvilket er forventeligt, da de har en lav permeabilitet over huden i forhold til padder (Lynn, 1960). Mekanismen bag diflubenzuron er ikke kendt hos øgler, men det tyder på at diflubenzuron er thyreoideaforstyrrende. Et feltstudie sammenlignende pesticiders thyreoideahormonforstyrrelser hos en anden øgleart (*Podarcis bocagei*) (Bicho et al., 2013), hvor der blev observerede thyreoideahormonforstyrrende effekter. Hanner blev sammenlignet fra to pesticideksponerede marker og to økologiske marker, hvor arealet af skjoldbruskkirtlen var større ved de pesticideksponerede marker end de økologiske. Alachlor var det pesticid, som blev fundet i højst koncentrationer ved de pesticideksponerede marker, og alachlor har thyreoideaforstyrrende effekter i rotter og padder (Helbing et al & Wilson et al i Bicho et al., 2013). Disse forsøg tyder på at pesticider har thyreoideaforstyrrende effekter i krybdyr, og at histologi af skjoldbruskkirtlen er et brugbart endpoint hos øgler, og eventuelt krybdyr. Ved eksponering af perchlorat (177 µg/g æg) i skildpaddeæg (*Chelydra serpentina*) faldt klækningssuccesen signifikant fra kontrolgruppen, mens dødeligheden efter klækningen var signifikant øget ved 200 µg perchlorat/g æg hos *Trachemys scripta* (Eisenreich et al., 2012). Hos begge arter var thyreoideahormonkoncentrationen reduceret, og det betyder at skildpadder kan påvirkes af thyreoideahormonforstyrrende kemikalier.

5.2.3 Fugle

Thyreoideahormonsystemet regulerer vækst, reproduktion, fjerproduktion og metabolismen hos fuglene, og thyreoideahormonsystemet overordneret det samme som alle vertebrater (Figur 2). Der er en forskel, som er at TSH kontrolleres af T_3 og ikke TRH (Merryman & Buckles, 1998). Thyreoideahormonforstyrrelser hos fugle er ikke velundersøgt, og thyreoideahormonforstyrrende endpoints er endnu ikke inkluderet i den nuværende testmetode på fugle (OECD testguide 206, niveau 4) (OECD, 2018). Fra et eksponeringsforsøg med tigerfinker (*Amandava amandava*), blev observeret en signifikant reduktion af follikelcellekernen ved eksponering af pesticiderne mancozeb (430 mg/kg/dag) og imidacloprid (15,5 mg/kg/dag) i foderet (Pandey & Mohanty, 2015). Samtidig blev observerede en vægtforøgelse af skjoldbruskkirtlen ved 30 dages eksponering af mancozeb i foderet, mens follikelcellehøjden blev reduceret ved 30 dages eksponering af imidacloprid. Begge pesticiderne sænkede koncentrationen af TSH og TH under ynglesæsonen, og det kan have betydning for reproduktionen (Pandey & Mohanty, 2015). Et feltstudie pointerede at fugle i området med høje koncentrationer af klorede organiske forbindelse (fx PCB) muligvis kunne have ændret skjoldbruskkirtelmorfologi, og derved reducerede reproduktionssucces (Sonne et al., 2010).

5.2.4 Pattedyr

Ligesom hos de andre vertebratgrupper, kontrollerer thyreoideahormonsystemet udvikling, metabolisme og vækst i pattedyr (Tata, 2006). I et eksponeringsforsøg med perchlorat i drikkevand i 51 dage (1-10 mg/kg dyr) hos præriemarkmusen (*Microtus ochrogaster*) blev thyreoideahormonkoncentrationen målt i blodet og skjoldbruskkirtlen (Isanhart et al., 2005). Thyreoideahormonkoncentration var signifikant lavere i skjoldbruskkirtlen ved 10 mg/kg end kontrolgruppen, mens thyreoideahormonkoncentrationen var uændret i blodet. Isanhart et al. (2005) forventede at observere en forskel på metabolismen mellem kontrolgruppen og eksponeringsgruppen, da thyreoideahormoner er væsentlige for metabolismen, men der var ingen forskel. Dette kan skyldes feedback-systemet i thyreoideahormonsystemet (Figur 2), da den lave koncentration af TH ikke hæmmer udskillelsen af TSH, og derfor øges udskillelsen af TSH, som stimulerer skjoldbruskkirtlen til at udskille TH. Isanhart et al. (2005) konkluderede at en fysiologisk effekt (fx reduceret metabolisme) først vil kunne observeres efter kronisk eksponering af perchlorat, da skjoldbruskkirtlen kan oplagre store mængder thyreoideahormoner.

Thyreoideahormonsystemet er vigtigt for padde i forbindelse med metamorfosen, og metamorfosen kan sammenlignes med fosterudvikling hos mennesket, hvor organerne udvikles (Tata, 2006). Når

hjernen udvikles i fosteret, er thyreoideahormonsystemet essentielt (Jugan et al., 2010), og thyreoideahormonforstyrrelser kan føre til kognitive forstyrrelser og neurologiske skader (Mughal et al., 2018). Derfor er det vigtigt at udvikle effektive og sensitive testmetoder til at undersøge kemikaliers thyreoideaforstyrrende effekter. Padder og fisk er de mest undersøgte grupper i forhold til thyreoideahormonforstyrrende effekter, og undersøgelsen af thyreoideahormon i folliklerne ved brug af immunokemiske metoder er den mest sensitive metode, som inkluderer et mekanistisk endpoint (Hu et al., 2006; Mukhi et al., 2005). Man har antaget at padder var den mest sensitive vertebratgruppe overfor thyreoideahormonforstyrrende effekter (Brown & Cai, 2007; Miyata & Ose, 2012), men padder og fisk er lige sensitive (LOEC på henholdsvis 8 og 11 µg perchlorat/L), og derfor bør man fortsætte med at undersøge på disse grupper.

5.3 Testmetoder og endpoint

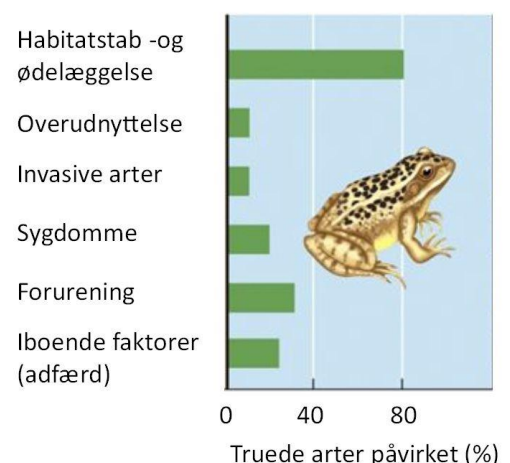
Eksporeringsforsøget i dette projekt tog udgangspunkt i OECD-guideline LAGDA (Testguide 241, niveau 4) for at undersøge om, der var en forskel mellem den europæiske frø, *R. temporaria*, og tropiske *X. laevis*. De undersøgte endpoints ved begge arter var apikale (biometriske parametre) og mekanistiske (histologi af skjoldbruskkirtlen), og efter gennemgang af andre eksporeringsforsøg, findes der forskellige endpoints som er undersøgt. Thyreoideahormonkoncentrationen i blodet er et ofte et endpoint i eksporeringsforsøgene, men det er sjældent et sensitivt endpoint, samt feedbackmekanismen i HPT-aksen opregulerer thyreoideahormonkoncentrationen (Figur 2). Derfor kan det være svært at skelne mellem at et thyreoideahormonforstyrrende kemikalie forskyder ligevægten midlertidigt eller forårsager irreversible effekter, når thyreoideahormonkoncentrationen i blodet måles (Mughal et al., 2018). Coady et al. (2017) pointerede at selv om et mekanistisk endpoint er sensitivt (fx thyreoideahormon i folliklerne (Hu et al., 2006; Mukhi et al., 2005), så forklarer endpointet intet om effekterne for populationen, hvilket er meget relevant i forhold til beskyttelse af dyrelivet og miljøet mod thyreoideaforstyrrende kemikalier. Vi ved ikke, hvilken effekt at 8 µg perchlorat/L har på populationen af *X. laevis*, eller om det er en effekt på populationen. De mekanistiske endpoint fra skjoldbruskkirtelhistologi i LAGDA anses ikke som at være et populationsrelevant endpoint, da sammenhængen mellem ændrede skjoldbruskkirtel og populationseffekter ikke er klar (Marty et al., 2017). Flere har pointeret, at de officielle testmetoder (fx fra OECD) mangler sammenhæng mellem endpoint (mekanistisk eller apikal) og skadelige populationseffekt (Coady et al., 2017; Marty et al., 2017). Forsinket udvikling ved padder (Tabel 3) kan være et relevant endpoint for skadelige populationseffekter (Marty et al., 2017). Fordi des længere periode som haletudse, des

længere tid i vandet (for størstedelen af paddearterne) som giver øget predation, så færre individer overlever, og det kan resultere i faldende populationer. Omvendt kan inducering af metamorfosen af thyreoideahormonforstyrrende kemikalier fører til hurtigere udvikling, men mindre individer, hvor overlevelsen vil være mindre grundet lavere fitness (fx lavere bevægelighed grundet kortere benlængde) (Ruthsatz et al., 2019). Udover dette kan thyreoideahormonforstyrrende kemikalier påvirke haletudsernes tilpasningsevne til ændrende miljø fx lavere vandstand (hurtigere udtørring af vandhullet) accelererer metamorfosen (Bekhet et al., 2014), og hvis haletudsernes udvikling hæmmes af det thyreoideaforstyrrende kemikalie, kan de ikke nå at gennemføre metamorfosen før vandhullet er tørret ud. Haletudsernes tilpasningsevne til ændrende miljø er vigtigt, især når klimaforandringer inkluderes (Ruthsatz et al., 2019; Thambirajah et al., 2019).

Fordi der er kommunikation mellem thyreoideahormonsystemet og kønshormonsystemet (Flood et al., 2013), er et af endpointene i LAGDA histologisk undersøgelse af gonaderne (OECD, 2015). Ligesom histologi af skjoldbruskkirtlen, vil histologien af gonaderne ikke kunne forklare om effekter på populationen. I stedet for kunne man yngle en generation efter den eksponerede generation, og antallet af levedygtige afkom vil kunne bruges som et populationsrelevant endpoint. Dette vil kræve flere ressourcer, men på nuværende tidspunkt har ingen undersøgt generationen efter den eksponerede generation. Et pilotforsøg vil kunne undersøge sammenhæng mellem histologien af gonaderne og/eller skjoldbruskkirtlen og populationsrelevante endpoints.

5.4 Bevaring af padder

Padder er den mest truede vertebratgruppe, hvor 70 % af alle paddearterne er truede eller har faldende population (Thambirajah et al., 2019). Forurening påvirker 30% af de truede paddearter (IUCN, 2004) (Figur 22), og derfor skal der handles, så udryddelsen af paddearterne stoppes. Padder er vigtige i økosystemet, hvor de fungerer som fødegrundlag for rovdyr (fx fugle og krybdyr) og holder insektbestanden i balance (Hamer & McDonnell, 2008). Udover bevarelse af padders habitat, som er den største trussel (Figur 22), vil hindring af yderligere forurening kunne være løsninger på at bevare padderne. Nogle paddearter er påvirket af flere faktorer end kun en, fx både habitattab og forurening (Figur 22). Resultater fra



Figur 22: Hvordan truede arter er påvirket af forskellige trusler (efter Primack, 2010)

feltundersøgelser (fx eksponeringsgraden af mistænkelige stoffer) kombinerede med generationsforsøg vil kunne vise sammenhængen mellem effekter i miljøet og effekterne fra laboratorieforsøg (fx perchlorat), og disse resultater vil kunne bruges til at bestemme, hvor stor effekten af et thyreoideahormonforstyrrende kemikalie vil være på paddepopulationen, når miljømæssige faktorer som temperatur og nedbør inkluderes.

Ved risikovurdering af pesticider, testes ofte den aktive hovedingrediens i pattedyr og fugle (Bruhl et al., 2013), mens der ikke findes en specifik testmetode for padder (og krybdyr) på trods af feltstudier har vist signifikante påvirkninger (Bicho et al., 2013; Gungordu et al., 2016). Heldigvis er implementering af risikovurdering for padder og krybdyr igangsat (Ockleford et al., 2018), og dette vil kunne hjælpe med viden om pesticiders effekt på padder (og krybdyr), og denne viden kan blive brugt i bevarelsesprojekter. Et andet problem ved testning af kemikalier, er at der kun testes for et kemikalie, men miljøet indeholder en cocktail af flere forskellige kemikalier (Marty et al., 2017; Slaby et al., 2019). Dette komplicerer problemstillingen, da effekter fra eksponering af et enkelt kemikalies påvirkning på fx thyreoideahormonsystemet (fx perchlorat) skal sammenlignes med mekanismen for andre kemikaliers påvirkning (fx propylthiouracil). Både perchlorat og propylthiouracil er thyreoideahormonforstyrrende stoffer, og man kender ikke vekselvirkningens effekter af begge samtidigt. Det er muligt at effekten af begge stoffer er additiv, hvor det både effekten af perchlorat og propylthiouracil sammenlagt. Det kan også være, at thyreoideahormonsystemet ikke kan regulere effekten af begge stoffer samtidig, og effekten af begge stoffer er synergistisk, hvor effekten er mere end begge stoffer sammenlagt.

5.5 Fejlkilder og usikkerheder

Dette eksponeringsforsøg havde udgangspunkt i LAGDA fra OECD, hvor den væsentlige forskel var en anden art. *R. temporaria* har en anden levevis end *X. laevis*. Da *X. laevis* er fuldstændig vandlevende, er der ikke behov for en rampe, som fungerer som landjorden. Derimod har *R. temporaria* behov for en rampe, da arten går på land i slutningen af metamorfosen (Jørgensen & Kjærgaard Jensen, 2015). Ved forsøgsdesign, er dette en af de væsentlige faktorer, og uden rampen, vil individerne drukne, da frøer i slutningen af metamorfosen ikke har gæller længere, og de begynder at bruge lungerne (Burggren & West, 1982). Dette kan muligvis være skyld i den høje dødelighed i eksponeringsforsøget, at individerne ikke har kunne respirere i det fortrukne medie. Kontrolgruppen havde højst dødelighed ($23,6 \pm 5,4$) til sammenligning med den lavest eksponerede gruppe ($11,9 \mu\text{g/L}$) ($14,0 \pm 2,0$) (Figur 11). Ifølge valideringen i LAGDA (Testguide 241) må dødelighed i

kontrolgruppen ikke overstige 20 % (OECD, 2015), hvilket er ikke gældende for dette eksponeringsforsøg, da dødeligheden varierer fra 33-77 % i kontrolreplikaterne. Andre forsøg med *R. temporaria* har varierende dødelighed (Brande-Lavridsen et al., 2010; Gutleb et al., 2000), så det er svært at præcisere den konkrete grund til den høje dødelighed i kontrolgruppen, da nogle af grupperne havde lavere dødelighed end kontrolgruppen. Generelt for alle arter, når de skal gennemfører klimaks, er høj dødelighed (Dent, 1968). Dette stemmer overens med den signifikante øget dødelighed i kontrolgruppen i slutningen af forsøget, hvor metamorfosen var i gang med klimaksfasen (Figur 11).

Variationen i kontrolgruppen var generelt større end i de andre grupper (fx follikelcellehøjden, figur 17), og det har resulteret i, at det har været svære at detektere signifikante forskelle. Grunden til den store variation - især i kontrolgruppen - kan skyldes, at de indsamlede æg stammede fra flere forskellige hunner (og eventuelle hanner). Hos *R. temporaria* er polygami almindeligt, hvor flere forskellige hanner kan befrugte flere forskellige hunner (Ruthsatz et al., 2019). En anden grund er at æggene ikke blev lagt samtidigt, og derfor var æggene i forskellige udviklingsstadie før eksponeringen begyndte. Hvis dette forsøg skulle følge valideres efter LAGDA, kunne resultaterne ikke bruges til officielle risikovurderinger eller lignende, og forsøget skulle gentages (OECD, 2015).

5.4.1 Forsøgsoptimering

Eksponeringsforsøget indeholder potentielt flere resultater, da halvdelen af alle eksponerede frøer er frosset ned, og man kan måle thyreoideahormonkoncentrationer på dem ligesom andre forsøg gør (Gutleb et al., 2000; W. Zhang et al., 2019). Thyreoideahormonkoncentrationen kan bruges til at forklare hormonkoncentrationen på det aflivede tidspunkt, men thyreoideahormonkoncentrationen ændres i løbet af metamorfosen (Brown & Cai, 2007; Kaltenbach, 1996), og derfor vil resultaterne variere. Den immunokemiske metode fra (Hu et al., 2006; Mukhi et al., 2005) vil være optimalt at bruge, da denne metode er meget sensitiv, og metoden kan udføres ud fra et kit.

Hvis formålet med eksponeringsforsøget er at sammenligne sensitiviteten mellem modelarten *X. laevis* og *R. temporaria*, bør forsøget været afsluttet tidligere, da de eksponerede grupper har nået at indhente den forsinket udviklingseffekt fra perchlorat. Udviklingsstadie er et sensitivt endpoint, og det havde muligvis været muligt at detektere en forskel i udviklingen, hvis æggene var i samme udviklingsstadie, da eksponeringen blev igangsat.

Hvis formålet med eksponeringsforsøget er at undersøge thyreoideahormonforstyrrelser hos *R. temporaria*, bør forsøget forlænges til næste generation, selvom det kan være svært at få frøerne til at

yngle (Wlizla et al., 2017). I det daværende eksponeringsforsøg, var endpointene ikke relevante for populationen, da der endnu ikke er viden om, hvordan forhøjet follikelcellehøjde påvirker populationen. Derfor bør populationsrelevante endpoints undersøges, så eksponeringsforsøget også kan bruges til beskyttelse af paddepopulationen.

6 Konklusion

Æg fra den europæiske art, *R. temporaria*, blev eksponeret for perchlorat (11,9; 41,0; 131,2 og 426,9 µg/L) i 46-48 dage, og eksponeringen resulterede i forskel på vægt, totallængde, snude-anus længde og follikelcellehøjde. Follikelcellehøjden blev undersøgt via histologiske undersøgelser af skjoldbruskkirtlen i 27 kontrolindivider og 14 individer fra henholdsvis 11,9- og 426,9 µg/L-gruppen, og follikelcellehøjden var reduceret for 11,9 µg/L-gruppen sammenlignet med kontrolgruppen. Dette stemte ikke overens med resultater fra andre forsøg med *X. laevis* og *X. tropicalis*, da follikelcellehøjde burde være øget ved eksponering af thyreoideahormonforstyrrende stoffer. Totallængden var forhøjet ved eksponering på 41,0 og 131,2 µg/L, og dette stemte overens med lignende forsøg, da thyreoideahormonforstyrrende effekter øger væksten hos haletudser. Vægt og snude-anus længde var reducerede i den højest eksponeret gruppe (426,9 µg/L), og denne reduktion skyldes mere toksiske effekter end thyreoideahormonforstyrrende effekter. På baggrund af resultaterne fra totallængde, blev lavest observerede effektkoncentration bestemt til 41 µg perchlorat/L, og denne koncentration stemte overens med lignende resultater fra eksponeringsforsøg med *X. laevis*. Det konkluderes at *X. laevis* og *R. temporaria* er lige sensitive ud fra lavest observerede effektkoncentration, men gentagelse af eksponeringsforsøg med *R. temporaria* anbefales grundet stor variation og dødelighed i kontrolgruppen.

Referencer

- Baumann, L., Ros, A., Rehberger, K., Neuhauss, S. C. & Segner, H. (2016). Thyroid disruption in zebrafish (*Danio rerio*) larvae: Different molecular response patterns lead to impaired eye development and visual functions. *Aquat Toxicol*, 172, 44-55. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.015
- Beattie, R. C. (1987). The reproductive biology of Common frog (*Rana temporaria*) population from different altitudes in northern England. *J. Zoo. Lond.*, 211, 387-398.
- Bekhet, G. A., Abdou, H. A., Dekinesh, S. A., Hussein, H. A. & Sebiae, S. S. (2014). Biological factors controlling developmental duration, growth and metamorphosis of the larval green toad, *Bufo viridis viridis*. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 67(3), 67-82. doi:10.1016/j.jobaz.2014.09.005
- Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K. & Zoeller, R. T. (2012). State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012. *Toxicology Letters*(211), S3.
- Bicho, R. C., Amaral, M. J., Faustino, A. M., Power, D. M., Rema, A., Carretero, M. A., . . . Mann, R. M. (2013). Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. *Ecotoxicology*, 22(1), 156-165. doi:10.1007/s10646-012-1012-2
- Brande-Lavridsen, N., Christensen-Dalsgaard, J. & Korsgaard, B. (2010). Effects of Ethinylestradiol and the Fungicide Prochloraz on Metamorphosis and Thyroid Gland Morphology in *Rana temporaria*. *The Open Zoology Journal*, 3(2), 7-16. doi:10.2174/1874336601003020007
- Brar, N. K., Waggoner, C., Reyes, J. A., Fairey, R. & Kelley, K. M. (2010). Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquat Toxicol*, 96(3), 203-215. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.023
- Brown, D. D. & Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*, 306(1), 20-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>
- Bruhl, C. A., Schmidt, T., Pieper, S. & Alscher, A. (2013). Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Sci Rep*, 3, 1135. doi:10.1038/srep01135
- Burggren, W. W. & West, N. H. (1982). Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respiration Physiology*, 47(2), 151-164. doi:[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(82\)90108-6](https://doi.org/10.1016/0034-5687(82)90108-6)
- Carlsson, G. & Norrgren, L. (2007). The impact of the goitrogen 6-propylthiouracil (PTU) on West-African clawed frog (*Xenopus tropicalis*) exposed during metamorphosis. *Aquat Toxicol*, 82(1), 55-62. doi:10.1016/j.aquatox.2007.01.005
- Carr, J. A. & Patino, R. (2011). The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen Comp Endocrinol*, 170(2), 299-312. doi:10.1016/j.ygcn.2010.06.001
- Chang, J., Wang, H., Xu, P., Guo, B., Li, J., Wang, Y. & Li, W. (2018). Oral and dermal diflubenzuron exposure causes a hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis disturbance in the Mongolian racerunner (*Eremias argus*). *Environ Pollut*, 232, 338-346. doi:10.1016/j.envpol.2017.08.115
- Chiamolera, M. I. & Wondisford, F. E. (2009). Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*, 150(3), 1091-1096. doi:10.1210/en.2008-1795
- Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Currie, R., Hancock, G., Crofoot, J., . . . Klecka, G. (2010). Evaluation of the amphibian metamorphosis assay: exposure to the goitrogen methimazole and the endogenous thyroid hormone L-thyroxine. *Environ Toxicol Chem*, 29(4), 869-880. doi:10.1002/etc.74
- Coady, K. K., Biever, R. C., Denslow, N. D., Gross, M., Guiney, P. D., Holbech, H., . . . Ankley, G. T. (2017). Current limitations and recommendations to improve testing for the environmental assessment of endocrine active substances. *Integr Environ Assess Manag*, 13(2), 302-316. doi:10.1002/ieam.1862
- Colborn, T. (2002). Clues from Wildlife to Create an Assay for Thyroid System Disruption. *Environmental Health Perspectives*, 110, 363-367.

- Coleman, R., Evennett, P. J. & Dodd, J. M. (1968). Ultrastructural observations on the thyroid gland of *Xenopus laevis* Daudin throughout metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 10, 34-46. doi:[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(68\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(68)90006-3)
- Colin, I. M., Deneff, J.-F., Lengelé, B., Many, M.-C. & Gérard, A.-C. (2013). Recent Insights into the Cell Biology of Thyroid Angiofollicular Units. *Endocrine Reviews*, 34(2), 209-238. doi:10.1210/er.2012-1015
- Dang, Z. (2019). Endpoint sensitivity in Amphibian Metamorphosis Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 513-519. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.028>
- Dent, J. N. (1968). Survey of Amphibian Metamorphosis. I W. Etkin & L. I. Gilbert (red.), *Metamorphosis : a problem in developmental biology* (s. 271-312). Amsterdam: North-Holland.
- Denver, R. J. (1988). Several hypothalamic peptides stimulate in vitro thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians. *General and Comparative Endocrinology*, 72(3), 383-393. doi:[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(88\)90160-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(88)90160-8)
- Denver, R. J. (1996). Neuroendocrine Control of Amphibian Metamorphosis. I L. I. Gilbert, J. R. Tata & B. G. Atkinson (red.), *Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. San Diego, Calif: Academic Press.
- Derby, A., Jeffrey, J. J. & Eisen, A. Z. (1979). The induction of collagenase and acid phosphatase by thyroxine in resorbing tadpole gills in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 207(3), 391-398. doi:10.1002/jez.1402070307
- Dittrich, C., Huster, J., Rodel, M. O. & Feldhaar, H. (2019). Matriline effects on metamorphic traits in a natural system in the European common frog (*Rana temporaria*). *Ecol Evol*, 9(6), 3075-3088. doi:10.1002/ece3.4811
- Dodd, M. H. I. & Dodd, J. M. (1976). The Biology Of Metamorphosis. I B. Lofts (red.), *Physiology of the Amphibia* (årg. III, s. 467-599): Academic Press.
- Eisenreich, K. M., Dean, K. M., Ottinger, M. A. & Rowe, C. L. (2012). Comparative effects of in ovo exposure to sodium perchlorate on development, growth, metabolism, and thyroid function in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) and red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 156(3-4), 166-170. doi:10.1016/j.cbpc.2012.07.005
- Eskandari, S., Loo, D. D. F., Dai, G., Levy, O., Wright, E. M. & Carrasco, N. (1997). Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter: Mechanism, Stoichiometry, and Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 27230-27238. doi:doi:0.1074/jbc.272.43.27230
- Etkin, W. (1968). Hormonal Control of Amphibian Metamorphosis. I W. Etkin & L. I. Gilbert (red.), *Metamorphosis : a problem in developmental biology* (1. udg., s. 313-348). Amsterdam: North-Holland.
- Flood, D. E. K., Fernandino, J. I. & Langlois, V. S. (2013). Thyroid hormones in male reproductive development: Evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 2-14. doi:10.1016/j.ygcen.2013.02.038
- Fong, P. (2011). Thyroid iodide efflux: a team effort? *J Physiol*, 589(Pt 24), 5929-5939. doi:10.1113/jphysiol.2011.218594
- Fox, H. (2012). *Amphibian Morphogenesis*: Humana Press.
- Goleman, W. L., Carr, J. A. & Anderson, T. A. (2002). Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(3), 590-597.
- Gorman, L. S. & Chiasera, J. M. (2013). Endocrinology review - adrenal and thyroid disorders. *Clin Lab Sci*, 26(2), 107-111.
- Gosner, K. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gourmelon, A. & Delrue, N. (2016). Validation in Support of Internationally Harmonised OECD Test Guidelines for Assessing the Safety of Chemicals. I C. Eskes & M. Whelan (red.), *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing* (s. 9-32). Cham: Springer International Publishing.

- Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., . . . Tietge, J. (2009). Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances. *Toxicol Pathol*, 37(4), 415-424. doi:10.1177/0192623309335063
- Gungordu, A., Uckun, M. & Yologlu, E. (2016). Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. *Chemosphere*, 144, 2024-2035. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.125
- Gutleb, A. C., Appelman, J., Bronkhorst, M., van den Berg, J. H. & Murk, A. J. (2000). Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Sci Total Environ*, 262(1-2), 147-157.
- Hamer, A. J. & McDonnell, M. J. (2008). Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: A review. *Biological Conservation*, 141(10), 2432-2449. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.07.020>
- Henrichs, J., Bongers-Schokking, J. J., Schenk, J. J., Ghassabian, A., Schmidt, H. G., Visser, T. J., . . . Tiemeier, H. (2010). Maternal Thyroid Function during Early Pregnancy and Cognitive Functioning in Early Childhood: The Generation R Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), 4227-4234. doi:10.1210/jc.2010-0415
- Hu, F., Sharma, B., Mukhi, S., Patino, R. & Carr, J. A. (2006). The colloidal thyroxine (T4) ring as a novel biomarker of perchlorate exposure in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci*, 93(2), 268-277. doi:10.1093/toxsci/kfl053
- IPCS. (2002). *Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors*. Hentet fra Geneva, Switzerland, .
- Isanhart, J. P., McNabb, F. M. A. & Smith, P. N. (2005). Effects of perchlorate exposure on resting metabolism, peak metabolism, and thyroid function in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(3), 678-684. doi:10.1897/04-306R.1
- Ishizuya-Oka, A. & Shi, Y.-B. (2005). Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: A model for studying organ regeneration. *Development, Growth & Differentiation*, 47(9), 601-607. doi:10.1111/j.1440-169X.2005.00833.x
- IUCN. (2004). *Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment*. Hentet fra Gland, Switserland:
- Jarque, S. & Piña, B. (2014). Deiodinases and thyroid metabolism disruption in teleost fish. *Environmental Research*, 135, 361-375. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.022>
- Johnson, R. S. & Moore, W. G. (1961). Fatal aplastic anaemia after treatment of thyrotoxicosis with potassium perchlorate. *British medical journal*, 1(5236), 1369-1371. doi:10.1136/bmj.1.5236.1369
- Jugan, M. L., Levi, Y. & Blondeau, J. P. (2010). Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochem Pharmacol*, 79(7), 939-947. doi:10.1016/j.bcp.2009.11.006
- Just, J. J., Kraus-Just, J. & Check, D. A. (1981). Survey of Chordate Metamorphosis. I L. I. Gilbert & E. Frieden (red.), *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology* (s. 265-326). Boston, MA: Springer US.
- Jørgensen, O. F. & Kjærgaard Jensen, J. (2015). *Padder og krybdyr i Danmark*. Kbh.: Gyldendal.
- Kaltenbach, J. C. (1996). Endocrinology of Amphibian Metamorphosis. I L. I. Gilbert, J. R. Tata & B. G. Atkinson (red.), *Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. San Diego, Calif: Academic Press.
- Kashiwagi, K., Furuno, N., Kitamura, S., Ohta, S., Sugihara, K., Utsumi, K., . . . Kashiwagi, A. (2009). Disruption of Thyroid Hormone Function by Environmental Pollutants. *Journal of Health Science*, 55(2), 147-160. doi:10.1248/jhs.55.147
- Kollros, J. J. (1981). Transitions in the Nervous System during Amphibian Metamorphosis. I L. I. Gilbert & E. Frieden (red.), *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology* (s. 445-459). Boston, MA: Springer US.
- Kuzmin, S., Ishchenko, V., Tuniyev, B., Beebee, T., Andreone, F., Nyström, P., . . . Kiss, I. (2009). *Rana temporaria*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2009*, e.T58734A86470817. doi:10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T58734A11834246.en

- Lee, S., Kim, C., Shin, H., Kho, Y. & Choi, K. (2019). Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, 221, 115-123. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.019
- Leung, A. M., Pearce, E. N. & Braverman, L. E. (2010). Perchlorate, iodine and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24(1), 133-141. doi:10.1016/j.beem.2009.08.009
- Lynn, W. G. (1960). Structure and Functions of the Thyroid Gland in Reptiles. *The American Midland Naturalist*, 64(2), 309-326. doi:10.2307/2422664
- Manna, D., Roy, G. & Mughesh, G. (2013). Antithyroid Drugs and Their Analogues: Synthesis, Structure, and Mechanism of Action. *Accounts of Chemical Research*, 46(11), 2706-2715. doi:10.1021/ar4001229
- Manzon, R. G. & Denver, R. J. (2004). Regulation of pituitary thyrotropin gene expression during Xenopus metamorphosis: negative feedback is functional throughout metamorphosis. *Journal of Endocrinology*, 182(2), 273-285. doi:10.1677/joe.0.1820273
- Marty, M. S., Blankinship, A., Chambers, J., Constantine, L., Kloas, W., Kumar, A., . . . Verslycke, T. (2017). Population-relevant endpoints in the evaluation of endocrine-active substances (EAS) for ecotoxicological hazard and risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(2), 317-330. doi:10.1002/ieam.1887
- Matsuda, K., Morimoto, N., Hashimoto, K., Okada, R., Mochida, H., Uchiyama, M. & Kikuyama, S. (2010). Changes in the distribution of corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the larval bullfrog brain and the involvement of CRF in the cessation of food intake during metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, 168(2), 280-286. doi:10.1016/j.ygcen.2010.01.004
- Measey, G. J., Rödder, D., Green, S. L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., . . . Thirion, J. M. (2012). Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions*, 14(11), 2255-2270. doi:10.1007/s10530-012-0227-8
- Merryman, J. I. & Buckles, E. L. (1998). The Avian Thyroid Gland. Part One: A Review of the Anatomy and Physiology. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 12(4), 234-237.
- Miyata, K. & Ose, K. (2012). Thyroid Hormone-disrupting Effects and the Amphibian Metamorphosis Assay. *Journal of Toxicologic Pathology*, 25(1), 1-9. doi:10.1293/tox.25.1
- Mughal, B. B., Fini, J. B. & Demeneix, B. A. (2018). Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endocr Connect*, 7(4), R160-R186. doi:10.1530/EC-18-0029
- Mukhi, S., Carr, J. A., Anderson, T. A. & Patiño, R. (2005). Novel biomarkers of perchlorate exposure in zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5), 1107-1115. doi:10.1897/04-270R.1
- Munro, A. F. (1939). Nitrogen excretion and arginase activity during amphibian development. *The Biochemical journal*, 33(12), 1957-1965.
- Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (1994). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis* (2. udg.). New York: Garland c1994.
- Nygaard, B., Kristensen, J. K. & Kjeldsen, H. C. (2018). Hyperthyreose. Hentet fra <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/laegehaandbogen/endokrinologi/tilstande-og-sygdomme/thyreoidesygdomme/hyperthyreose/>, (7. maj 2019)
- Ockleford, C., Adriaanse, P., Berny, P., Brock, T., Duquesne, S., Grilli, S., . . . Smith, R. H. (2018). Scientific Opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles. 16(2), e05125. doi:doi:10.2903/j.efsa.2018.5125
- OECD. (1998). OECD Principles on Good Laboratory Practice. Hentet fra <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264078536-en>, (3. april 2019)
- OECD. (2009). *Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay*.
- OECD. (2015). *Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)*.
- OECD. (2018). *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*.
- OECD. (2019). OECD Work Related to Endocrine Disrupters. Hentet fra <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>,

- Ortiz-Santaliestra, M. E. & Sparling, D. W. (2007). Alteration of larval development and metamorphosis by nitrate and perchlorate in southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 53(4), 639-646. doi:10.1007/s00244-006-0277-y
- Pandey, S. P. & Mohanty, B. (2015). The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere*, 122, 227-234. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.061
- Paris, M., Brunet, F., Markov, G., Schubert, M. & Laudet, V. (2008). The amphioxus genome enlightens the evolution of the thyroid hormone signaling pathway. *Dev Genes Evol*, 218, 667-680. doi:10.1007/s00427-008-0255-7
- Paris, M. & Laudet, V. (2008). The history of a developmental stage: Metamorphosis in chordates. *genesis*, 46(11), 657-672. doi:10.1002/dvg.20443
- Pei, L., Leblanc, M., Barish, G., Atkins, A., Nofsinger, R., Whyte, J., . . . Evans, R. M. (2011). Thyroid hormone receptor repression is linked to type I pneumocyte-associated respiratory distress syndrome. *Nat Med*, 17(11), 1466-1472. doi:10.1038/nm.2450
- Petersen, A. M., Dillon, D., Bernhardt, R. R., Torunsky, R., Postlethwait, J. H., von Hippel, F. A., . . . Cresko, W. A. (2015). Perchlorate disrupts embryonic androgen synthesis and reproductive development in threespine stickleback without changing whole-body levels of thyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*, 210, 130-144. doi:10.1016/j.ygcen.2014.10.015
- Primack, R. B. (2010). *Essentials of conservation biology* (5 udg.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Rose, C. S. & Cahill, J. W. (2019). How thyroid hormones and their inhibitors affect cartilage growth and shape in the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Anatomy*, 234(1), 89-105. doi:10.1111/joa.12897
- Rugh, R. (1951). *The frog; its reproduction and development*. Philadelphia: Blakiston.
- Ruthsatz, K., Dausmann, K. H., Drees, C., Becker, L. I., Hartmann, L., Reese, J., . . . Glos, J. (2018). Altered thyroid hormone levels affect body condition at metamorphosis in larvae of *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*, 38(11), 1416-1425. doi:10.1002/jat.3663
- Ruthsatz, K., Dausmann, K. H., Steffen, R., Robinson, T., Sabatino, N. M., Peck, M. A. & Glos, J. (2019). Endocrine disruption alters developmental energy allocation and performance in *Rana temporaria*. *Integrative Comparative Biology*, icz041. doi:10.1093/icb/icz041/5490197
- Severtsova, E. A., Kormilitsin, A. A. & Severtsov, A. S. (2017). The influence of anthropogenic factors on reproduction of *Rana temporaria* and *Rana arvalis*. *Biology Bulletin*, 43(7), 654-663. doi:10.1134/s1062359016070165
- Shi, Y.-B. (2000). *Amphibian Metamorphosis: from morphology to molecular biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Sijimol, M. R. & Mohan, M. (2014). Environmental impacts of perchlorate with special reference to fireworks--a review. *Environ Monit Assess*, 186(11), 7203-7210. doi:10.1007/s10661-014-3921-4
- Singh, R. P., Singh, A., Kushwaha, G. S., Singh, A. K., Kaur, P., Sharma, S. & Singh, T. P. (2015). Mode of binding of the antithyroid drug propylthiouracil to mammalian haem peroxidases. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 71(Pt 3), 304-310. doi:10.1107/S2053230X15001806
- Slaby, S., Marin, M., Marchand, G. & Lemiere, S. (2019). Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environmental Pollution*, 248, 478-495. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>
- Sonne, C., Verreault, J., Gabrielsen, G. W., Letcher, R. J., Leifsson, P. S. & Iburg, T. (2010). Screening of thyroid gland histology in organohalogen-contaminated glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian Arctic. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(9), 1705-1713. doi:10.1080/02772241003611920
- Steinmaus, C. M. (2016). Perchlorate in Water Supplies: Sources, Exposures, and Health Effects. *Curr Environ Health Rep*, 3(2), 136-143. doi:10.1007/s40572-016-0087-y
- Sternberg, R. M., Thoemke, K. R., Korte, J. J., Moen, S. M., Olson, J. M., Korte, L., . . . Degitz, S. J. (2011). Control of pituitary thyroid-stimulating hormone synthesis and secretion by thyroid hormones

- during *Xenopus* metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 173(3), 428-437.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.06.020>
- Stoffer, C. f. H. Hormonforstyrrende effekter hos danske padder. Hentet fra
<http://www.cend.dk/metamorfose-i-froer.html>, (7/5/2019)
- Suzuki, K.-i., Machiyama, F., Nishino, S., Watanabe, Y., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A. & Yoshizato, K. (2009). Molecular features of thyroid hormone-regulated skin remodeling in *Xenopus laevis* during metamorphosis. *Development, Growth & Differentiation*, 51(4), 411-427. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01100.x
- Tata, J. R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246, 10-20.
- Terry, G. S. (1918). Effects of the extirpation of the thyroid gland upon ossification in *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology*, 24(3), 567-587. doi:10.1002/jez.1400240306
- Thambirajah, A. A., Koide, E. M., Imbery, J. J. & Helbing, C. C. (2019). Contaminant and Environmental Influences on Thyroid Hormone Action in Amphibian Metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi:10.3389/fendo.2019.00276
- Tietge, J. E., Holcombe, G. W., Flynn, K. M., Kosian, P. A., Korte, J. J., Anderson, L. E., . . . Degitz, S. J. (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: Effects on development and thyroid histology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 926-933. doi:10.1897/04-105R.1
- Tinsley, R., Minter, L., Measey, J., Howell, K., Veloso, A., Núñez, H. & Romano, A. (2009). *Xenopus laevis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2009*, e.T58174A11730010. doi:10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T58174A11730010.en
- Trudeau, V. L., Somoza, G. M., Natale, G. S., Pauli, B., Wignall, J., Jackman, P., . . . Schueler, F. W. (2010). Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 36. doi:10.1186/1477-7827-8-36
- Trueb, L. & Hanken, J. (1992). Skeletal development in *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae). *Journal of Morphology*, 214(1), 1-41. doi:10.1002/jmor.1052140102
- Veldhoen, N., Stevenson, M. R. & Helbing, C. C. (2015). Comparison of thyroid hormone-dependent gene responses in vivo and in organ culture of the American bullfrog (*Rana (Lithobates) catesbeiana*) lung. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 16, 99-105. doi:10.1016/j.cbd.2015.09.001
- Weber, R. (1967). Biochemistry of Amphibian Metamorphosis. I R. Weber (red.), *The Biochemistry of Animal Development* (årg. II): Academic Press.
- White, B. A. & Nicoll, C. S. (1981). Hormonal Control of Amphibian Metamorphosis. I L. I. Gilbert & E. Frieden (red.), *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology* (s. 363-396). Boston, MA: Springer US.
- Wlizla, M., Falco, R., Peshkin, L., Parlow, A. F. & Horb, M. E. (2017). Luteinizing Hormone is an effective replacement for hCG to induce ovulation in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 426(2), 442-448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.028>
- Zhang, W., Chen, L., Xu, Y., Deng, Y., Zhang, L., Qin, Y., . . . Diao, J. (2019). Amphibian (*Rana nigromaculata*) exposed to cyproconazole: Changes in growth index, behavioral endpoints, antioxidant biomarkers, thyroid and gonad development. *Aquatic Toxicology*, 208, 62-70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.015>
- Zhang, Y. F., Xu, H. M., Yu, F., Yang, H. Y., Jia, D. D. & Li, P. F. (2019). Comparison the sensitivity of amphibian metamorphosis assays with NF 48 stage and NF 51 stage *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicol Mech Methods*, 1-29. doi:10.1080/15376516.2019.1579291
- Zoeller, R. T., Tan, S. W. & Tyl, R. W. (2007). General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit Rev Toxicol*, 37(1-2), 11-53. doi:10.1080/10408440601123446

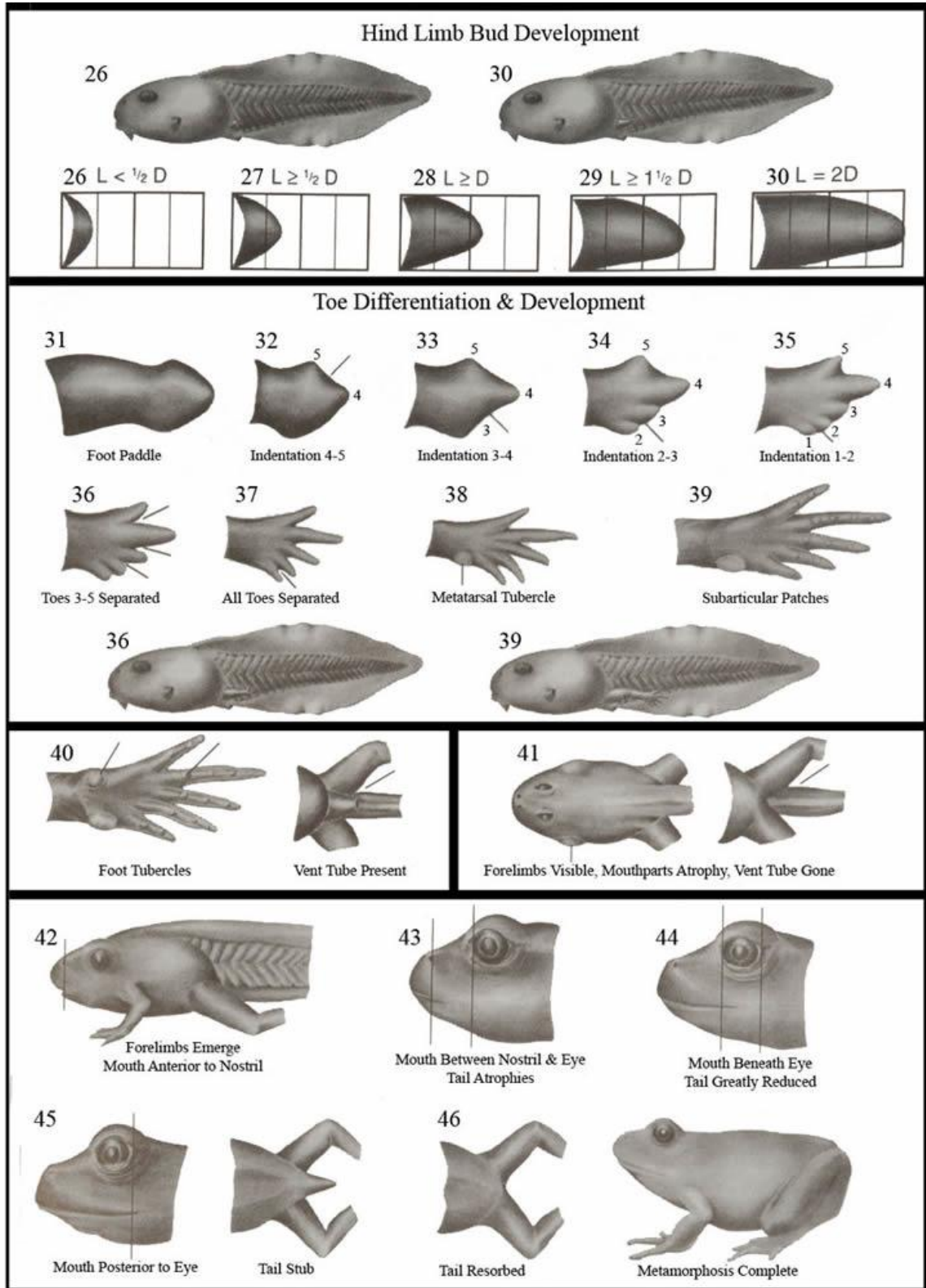
Figur 5 fra www.californiaherps.com/frogs/pages/x.laevis.html (26/5/19)

Figur 6 fra <http://www.animalspot.net/common-frog.html> (26/5/19)

Bilag

Bilag 1: Udviklingsstadie 26-46 efter Gosner (1960)

L
A
R
V
A
E



Bilag 2: Karoversigt

Karoversigten er som følgende med nominelle og gennemsnitlige aktuelle koncentrationer:

Kar nr.	Nominel koncentration [$\mu\text{g/L}$]	Gennemsnitlig aktuel koncentration [$\mu\text{g/L}$]
1	522	438,9
2	522	434,2
3	163	128,7
4	163	133,3
5	0 (kontrol)	0
6	0 (kontrol)	0
7	16	10,9
8	16	11,1
9	0 (kontrol)	0
10	0 (kontrol)	0
11	51	40,8
12	51	40,1
13	522	426,5
14	522	406,4
15	163	131,8
16	163	130,9
17	0 (kontrol)	0
18	0 (kontrol)	0
19	51	40,5
20	51	42,3
21	0 (kontrol)	0
22	0 (kontrol)	0
23	16	12,3
24	16	13,2

Bilag 3: Indstøbningsprocessen

Hovederne af haletudserne blev støbt ind efter følgende proces:

Trin	Tid	Reagens
1	2 timer	50 % ethanol
2	1 time	70 % ethanol
3	2 timer	70 % ethanol
4	3 timer	96 % ethanol
5	2 timer	96 % ethanol
6	1 time	99 % ethanol
7	2 timer	99 % ethanol
8	3 timer	99 % ethanol
9	1 time	100 % Tissue-Tek® Tissue Clear®
10	2 timer	100 % Tissue-Tek® Tissue Clear®
11	2 timer	100 % paraffin (60°C)
12	2 timer	100 % paraffin (60°C)

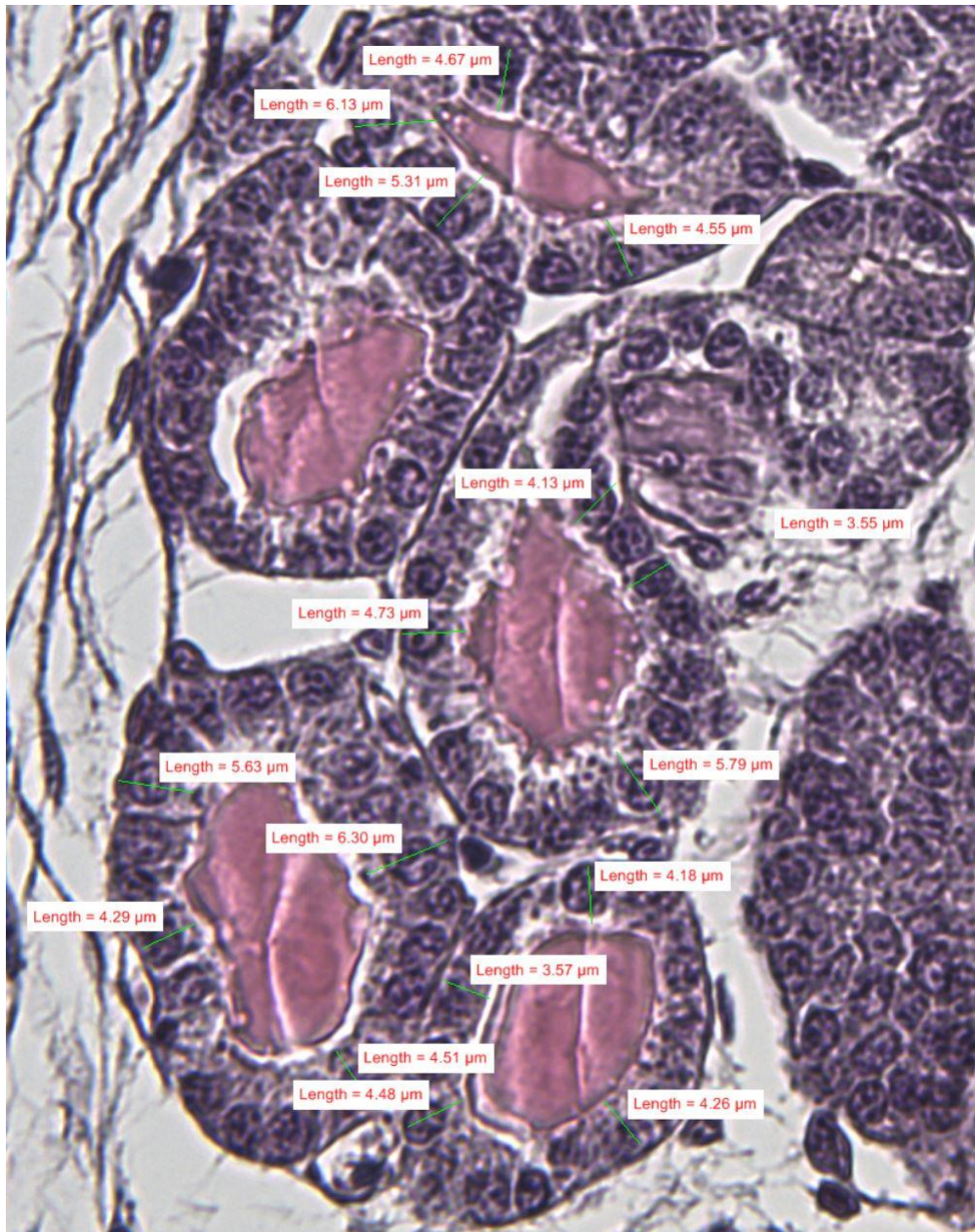
Bilag 4: Farveprocessen

Præparaterne blev farvet efterfølgende proces:

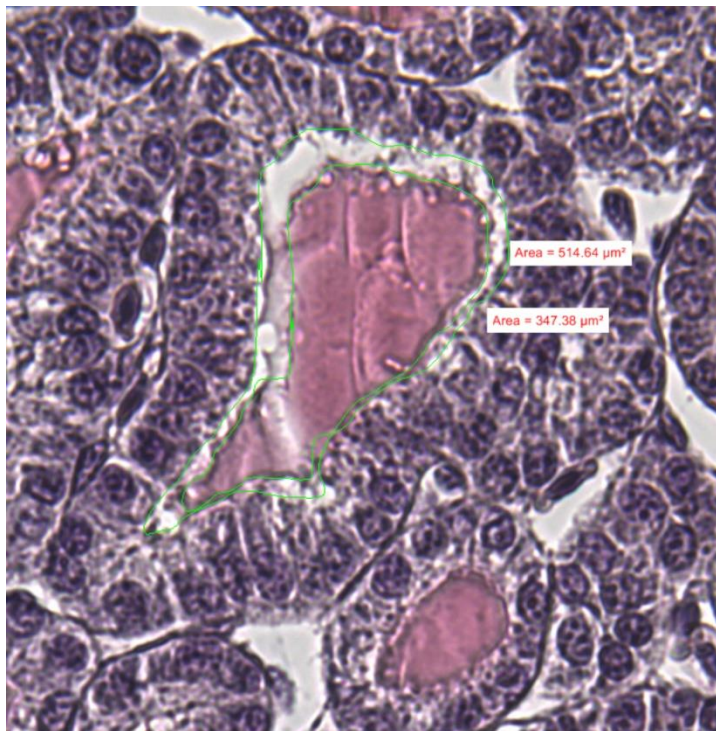
Trin	Tid	Reagens
1	7 min	Tissue-Tek® Tissue Clear®
2	7 min	Tissue-Tek® Tissue Clear®
3	6 min	99 % ethanol
4	6 min	99 % ethanol
5	6 min	99 % ethanol
6	5 min	96 % ethanol
7	5 min	96 % ethanol
8	5 min	70 % ethanol
9	10 min	Vand (gennemløbende)
10	4 min	Hematoxylin
11	10 min	Vand (gennemløbende)
12	45 sek.	Eosin
13	10 min	Vand (gennemløbende)
14	6 sek.	70 % ethanol
15	6 sek.	96 % ethanol
16	6 sek.	96 % ethanol
17	6 sek.	99 % ethanol
18	6 sek.	99 % ethanol
19	6 sek.	99 % ethanol
20	10 min	99 % ethanol
21	6 sek.	Tissue-Tek® Tissue Clear®
22	6 min	Tissue-Tek® Tissue Clear®

Bilag 5: Eksempel på histologiresultater

Figur 22 viser et eksempel, hvordan follikelcellehøjden var målt i dette projekt. Figur 23 viser et eksempel, hvordan lumen og kolloidvæsken var målt.

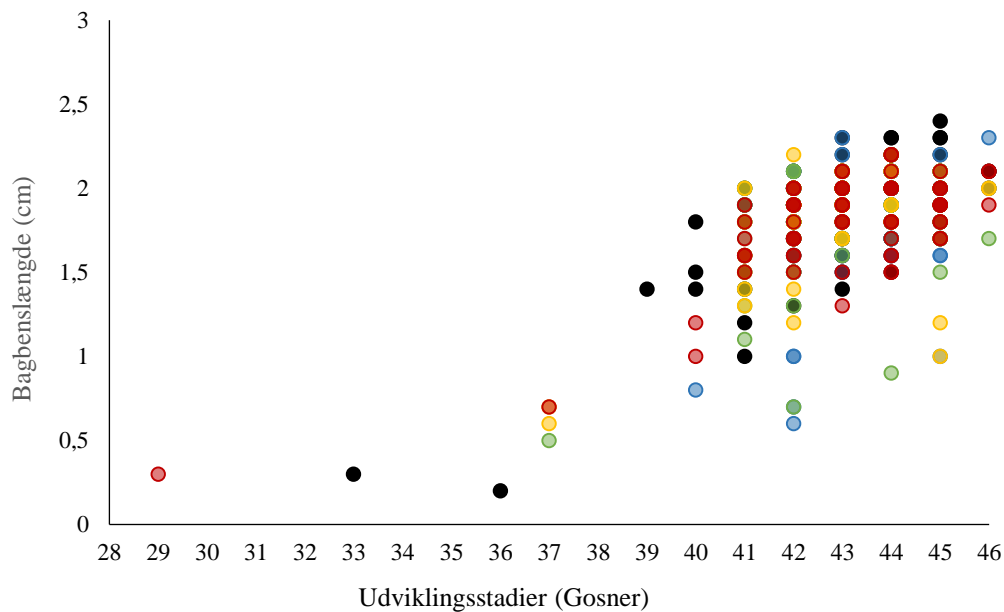


Figur 23: Fire udvalgte follikler fra et histologipræparat af *R. temporaria* (eksponeret for 426,9 μg perchlorat /L).

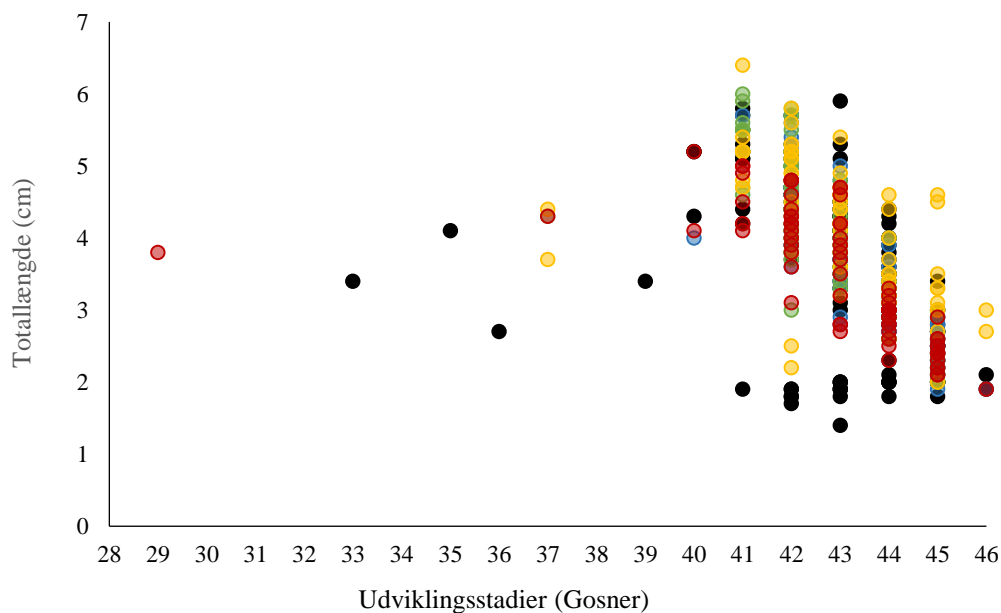


Figur 24: Den største lumen i et histologipræparat af R. temporaria (eksponeret for 426,9 μg perchlorat /L)

Bilag 6: Yderligere figurer



Figur 25: Bagbenslængden (cm) i forhold til udviklingsstadiet (Gosner) for kontrolgruppen (N=163; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=100; blå), 41,0 µg/L-gruppen (N=93; grøn), 131,2 µg/L-gruppen (N=82; gul) og 426,9 µg/L-gruppen (N=72; rød).



Figur 26: Totallængden (cm) i forhold til udviklingsstadiet (Gosner) for kontrolgruppen (N=163; sort), 11,9 µg/L-gruppen (N=100; blå), 41,0 µg/L-gruppen (N=93; grøn), 131,2 µg/L-gruppen (N=82; gul) og 426,9 µg/L-gruppen (N=72; rød).