

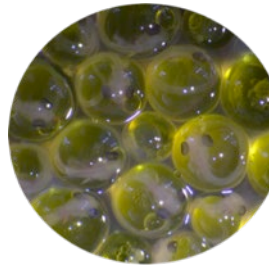
Zebrafisk og snegles udvikling som model for thyroidhormonforstyrrelser

Henrik Holbech

Lektor i Økotoxikologigruppen

Biologisk Institut, Syddansk Universitet

Center for Hormonforstyrrende Stoffer (CeHoS)



OECD Conceptual Framework – værktøjskasse

Vi har udviklet test til at identificere hormonforstyrrende stoffer med gnavere, fisk og padder i 20 år så EAS(T) medierede effekter delvist dækket for miljø:

Pattedyr (**V**)

Fisk (**V**(÷ **T**))

Padder (**V**)

Fugle (**V**)

Krybdyr ÷

Hvirvelløse dyr (95% af alle arter) ÷



Hvordan forbedrer vi værktøjskassen og reguleringerne

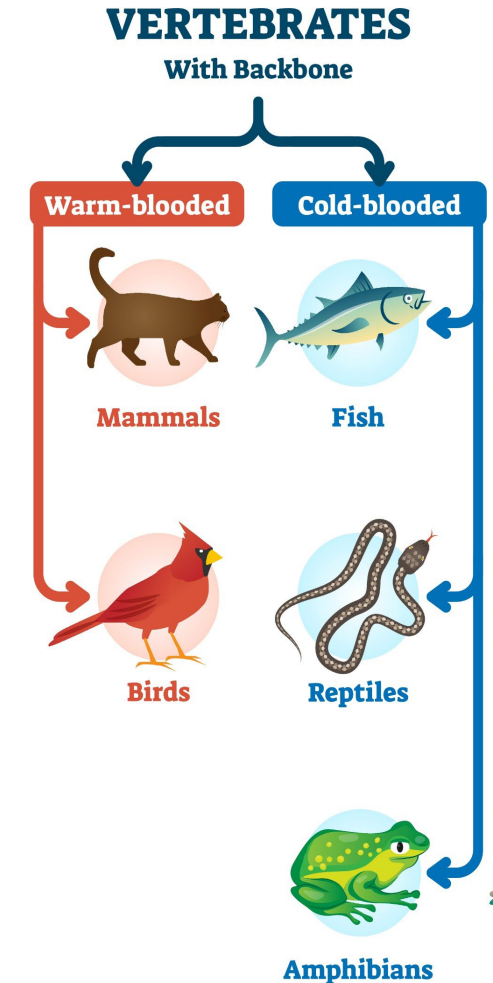
Forbedring for hvirveldyr EAS(T):

- ubrugt potentiale i extrapolering af hormonforstyrrende effekter på tværs af arter og klasser af hvirveldyr

Forbedret lovgivning:

- Opdater standardinformationskravene - især for REACH

For hvirvelløse dyr er der lang vej igen. Fordelen er at de ikke betragtes som forsøgsdyr

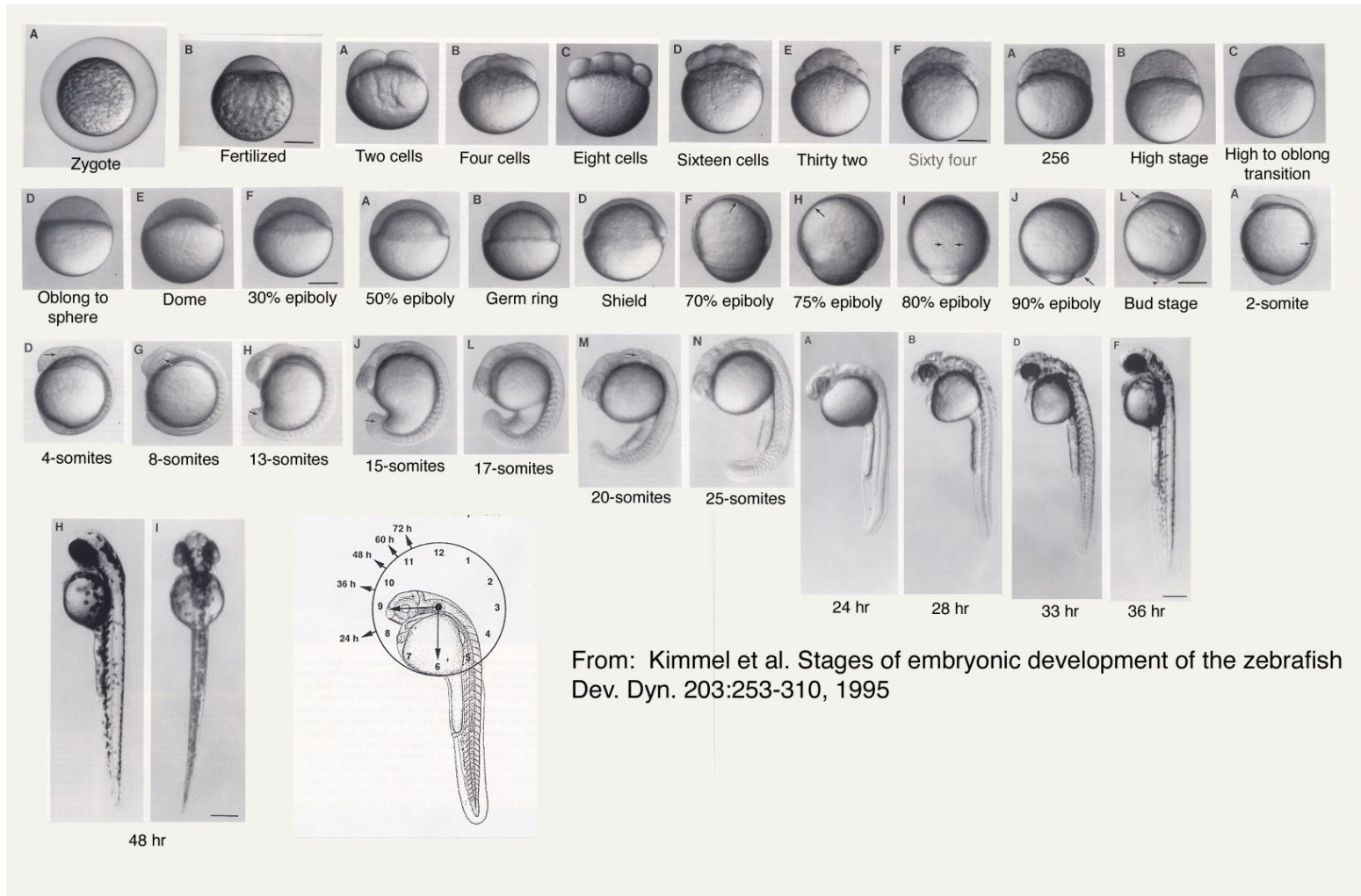


OECD test guidelines for hormonforstyrrende stoffer i miljøet

Species	Life-stage	No.	Name	ED modalities covered
	embryo	248	Xenopus Embryonic Thyroid Assay	T
	juvenile	231	Amphibian Metamorphosis Assay	T
	adult	241	Larval Amphibian Growth and Metamorphosis Assay	E, A, T, S
	adult	229	Fish Short-Term Reproduction Assay	E, A, S
	adult	230	21-Day Fish Assay	E, A, S
	juvenile	234	Fish Sexual Development Test	E, A, S
	adult	240	Medaka (Zebrafish) Extended One Generation Test	E, A, S
	embryo	251	Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) assay	A
	embryo	250	Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg (cyp19a1b:GFP) Zebrafish embrYos	E

Zebrafisk som forsøgsdyr

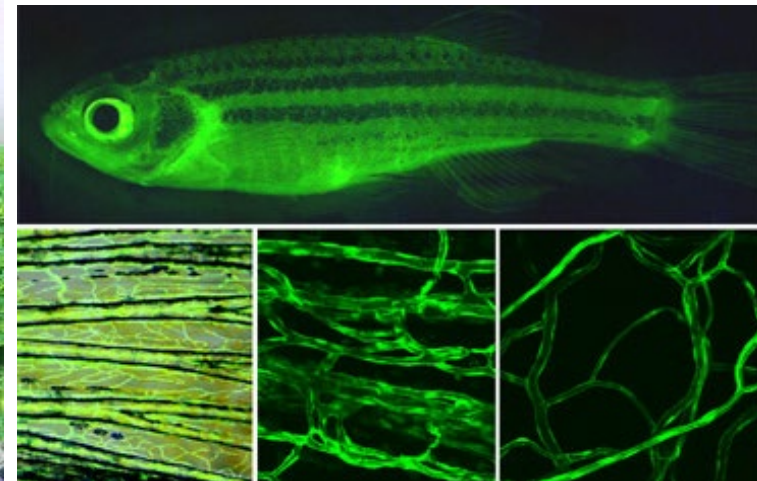
- Tropisk art – Lille fisk – kort generationstid
- Kontinuert æglæggende, gennemsigtige æg, genetisk kortlagt



From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish
Dev. Dyn. 203:253-310, 1995

Zebrafisk som forsøgsdyr

Der er udgivet mere end 100 000 artikler om zebrafisk og forskning.



Transgene zebrafisk: Et responselement kobles til et reporter-gen

Zebrafisk som forsøgsdyr



A: Normal zebrafisk

B: zebrafisk med humant pigment gen

(zebra)fisk som model for hvirveldyr

*70% af menneskets gener findes i zebrafisk

*Mere end 80% af sygdomsfremkaldende gener findes i zebrafisk

Yngler året rundt i modsætning til vores hjemmehørende arter

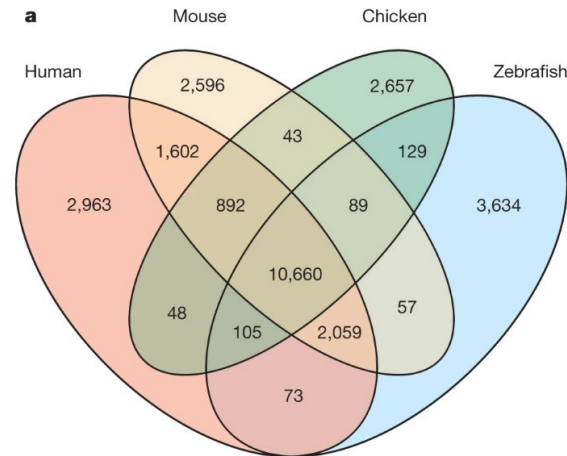
Er ikke et forsøgsdyr de første 5 dage!

Der er stærke kræfter mod flere dyreforsøg (Industri/NGO/befolkning)

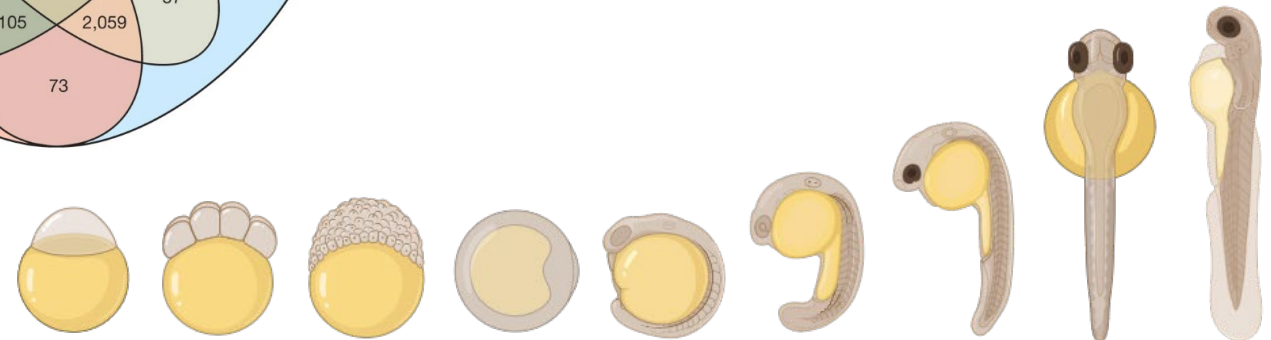
EU – in vivo dyreforsøg skal minimeres (3R)

*(Howe et al., Nature, 2013)

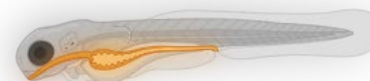
Figure 3: Evolutionary aspects of the zebrafish genome.



Zebrafisk (*Danio rerio*)



Udvikling fra befrugtning til 5 dage efter befrugtning



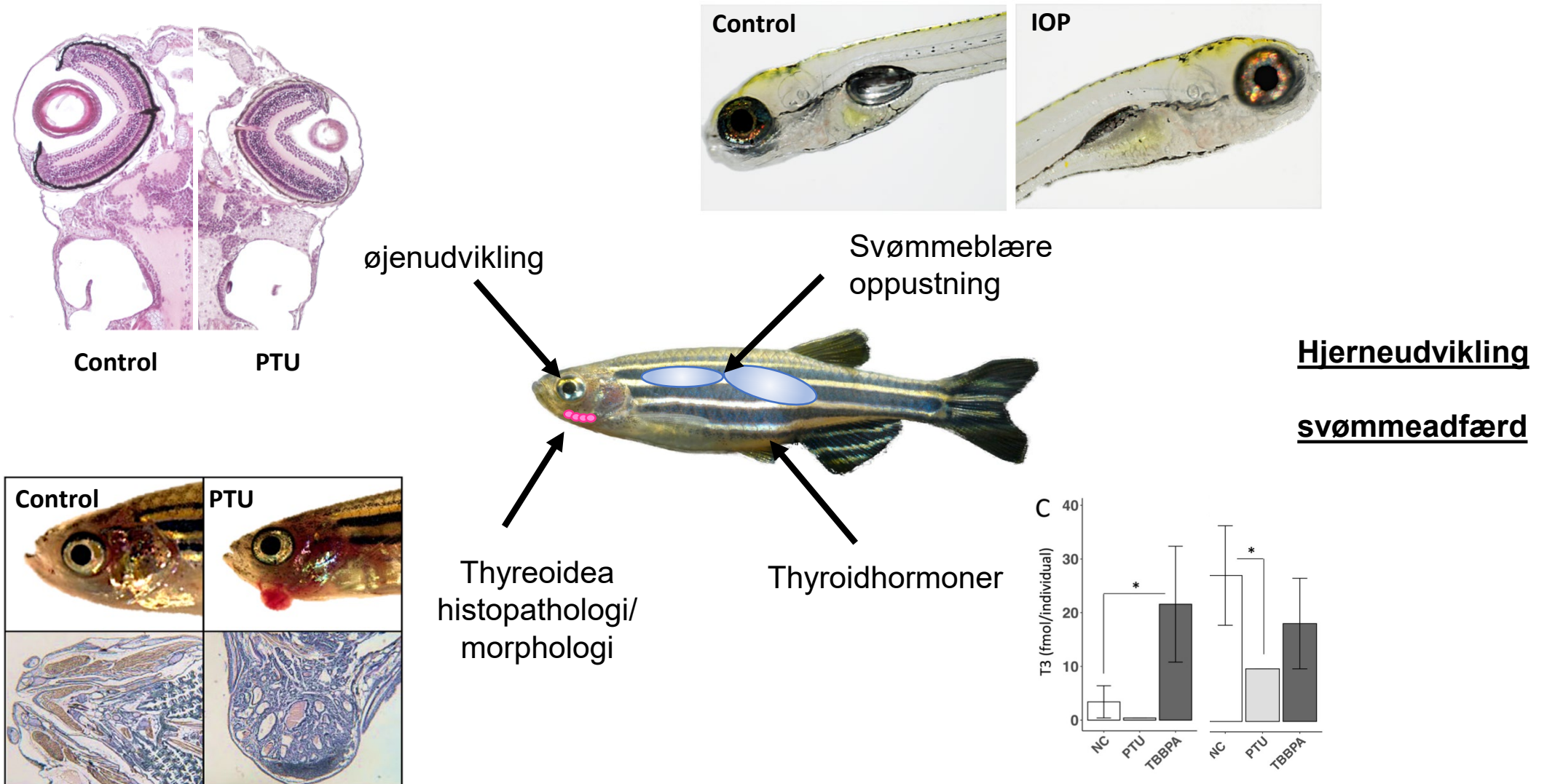
Forsøgsdyr?



Voksne - 2 mdr.

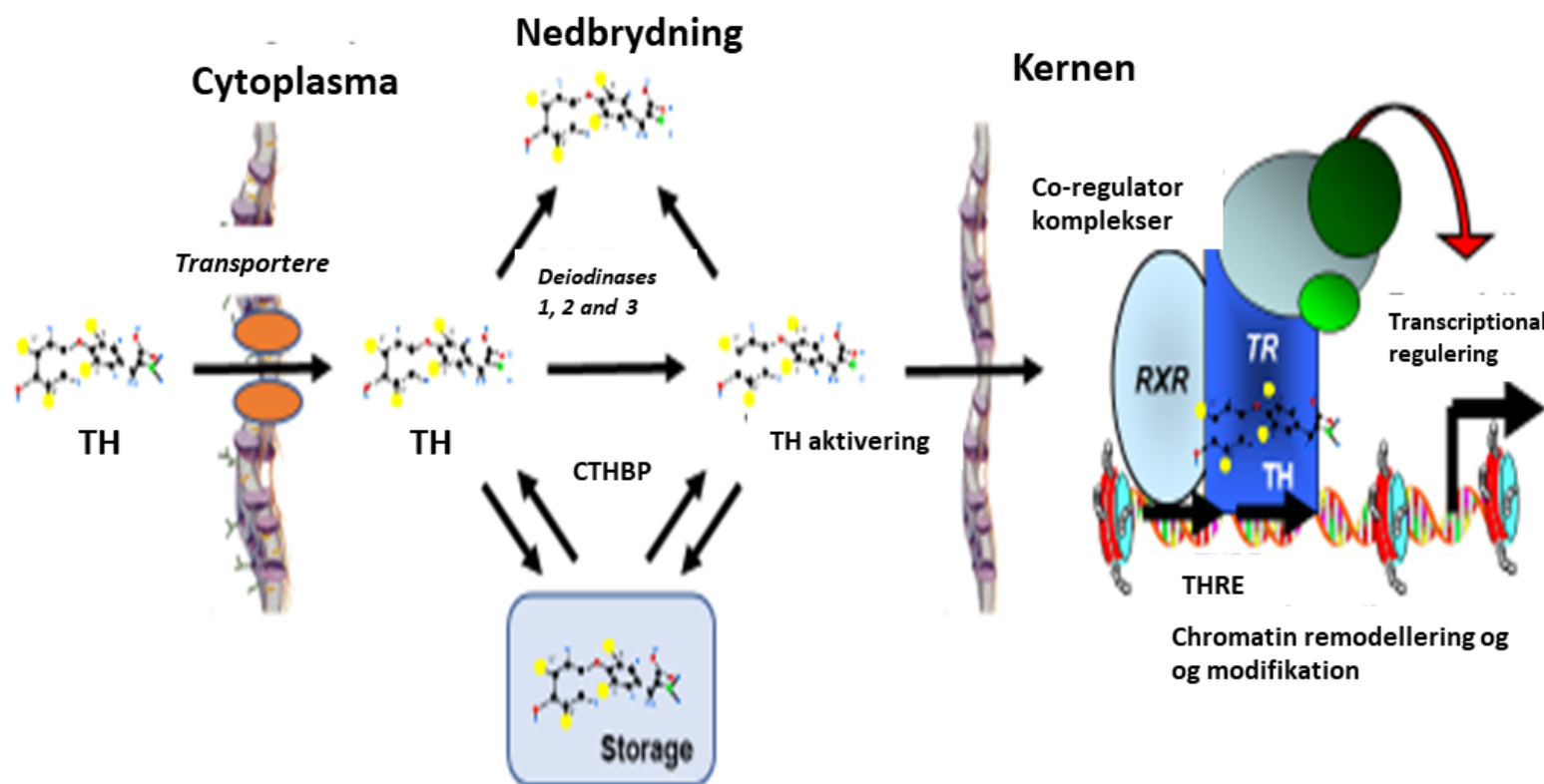


Thyreoiderahormonsystem-sensitive endpoints i zebrafisk



(zebra)fisk som model for hvirveldyr – thyreoideahormonsystemet

Molekylær konservering af TH-virkning



Konservering af TH

signalering:

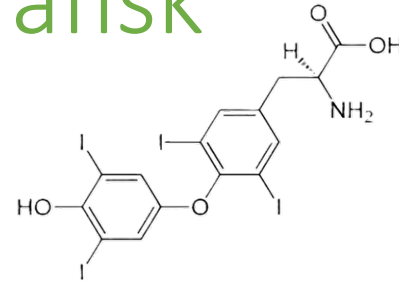
fisk, padder og pattedyr

- syntese
- sekretion
- transport



Modificeret fra Sachs & Buchholz, 2017

THS-sensitive endpoints i zebrafisk

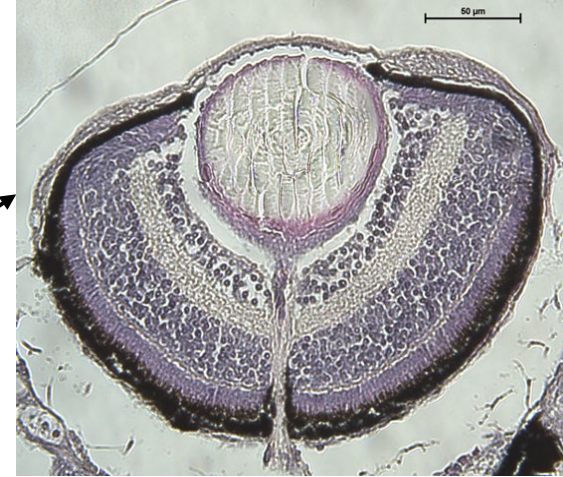
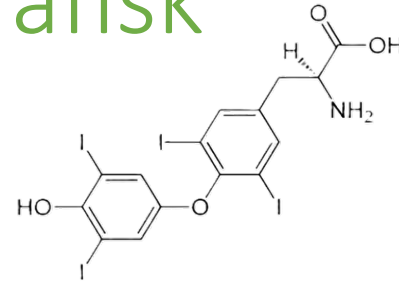


TPO katalyserer oxidation af jod og tilføjer jod til tyrosin på proteinet thyroglobulin – **TH syntese**

Vi tester modelstoffer og bisphenol a (BPA) alternativer



THS-sensitive endpoints i zebrafisk



Environmental Toxicology and Chemistry—Volume 41, Number 11—pp. 2632–2648, 2022
Received: 14 January 2022 | Accepted: 29 July 2022

2632

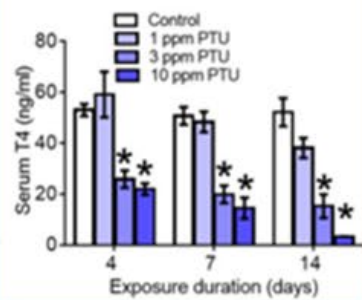
ET&C PATHWAYS AND PREDICTIONS

Pathways and Predictions articles are summaries of multi-process biological responses to chemicals described by extensive datasets. Adverse outcome pathways (AOPs) are one example of this where comprehensive compilations of concepts and evidence comprising a given AOP can be obtained from an open-source AOP Wiki (aopwiki.org).

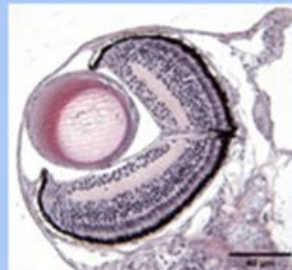
AOP Report: Thyroperoxidase Inhibition Leading to Altered Visual Function in Fish Via Altered Retinal Layer Structure

Lisa Götz,* Lisa Baumann,* Pauline Pannetier,* Thomas Braunbeck,* Dries Knapen,^b and Lucia Vergauwen^{b,*}

^aAquatic Ecology and Toxicology Research Group, Centre for Organismal Studies, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany
^bZebrafishlab, Veterinary Physiology and Biochemistry, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium



TH levels



Eye histopathology



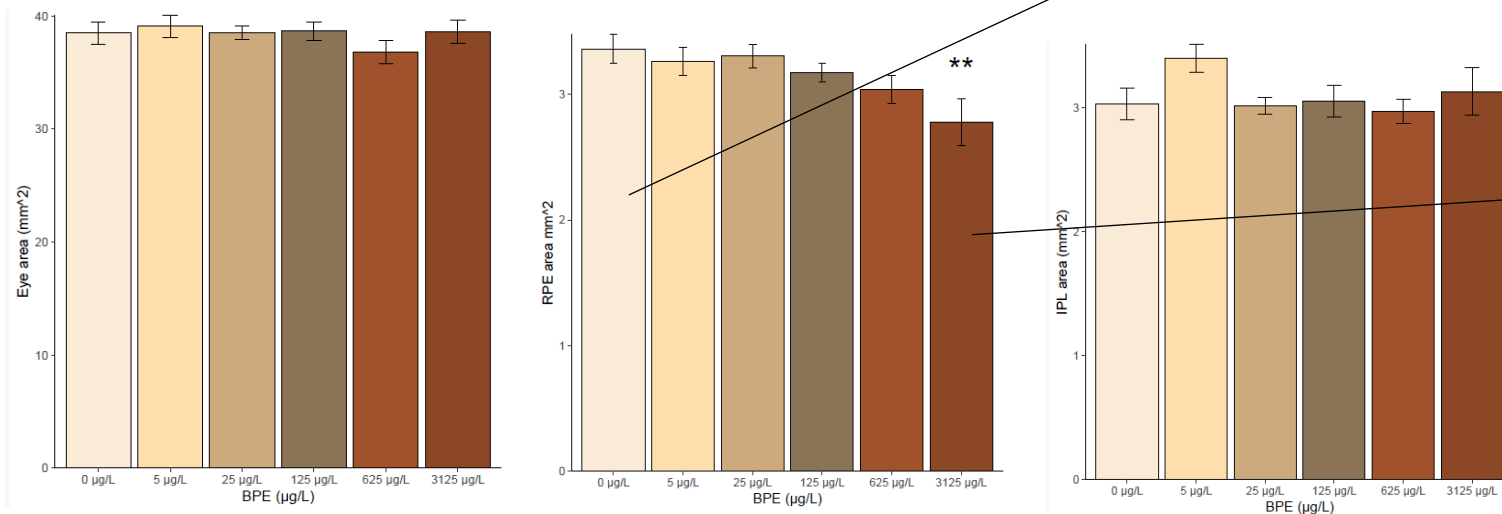
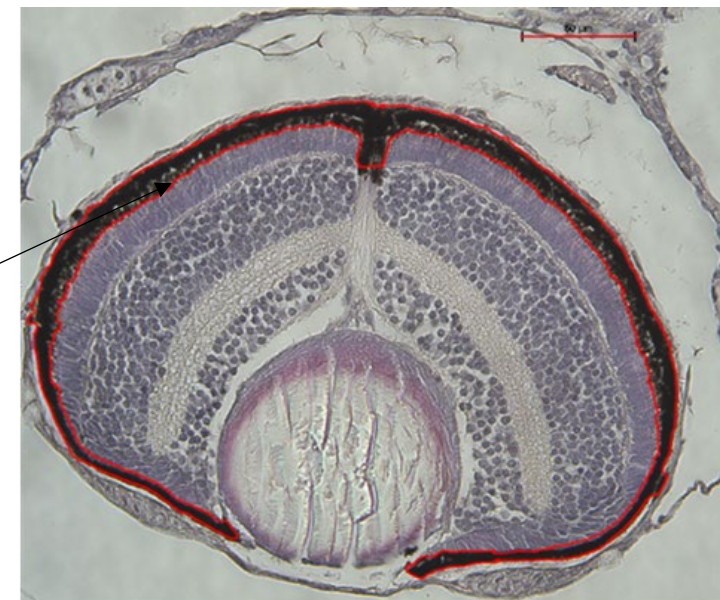
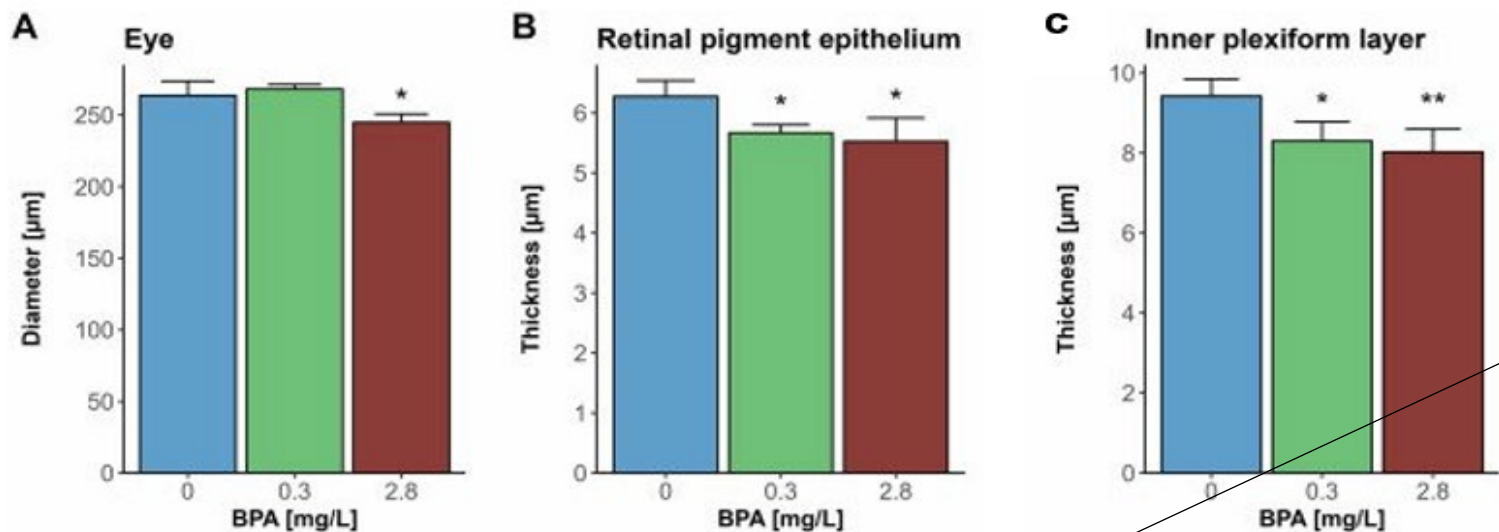
<https://aopwiki.org/aops/364>

Vision → Behavior

Mortality?

THS-sensitive endpoints i zebrafisk (BPA og BPE)

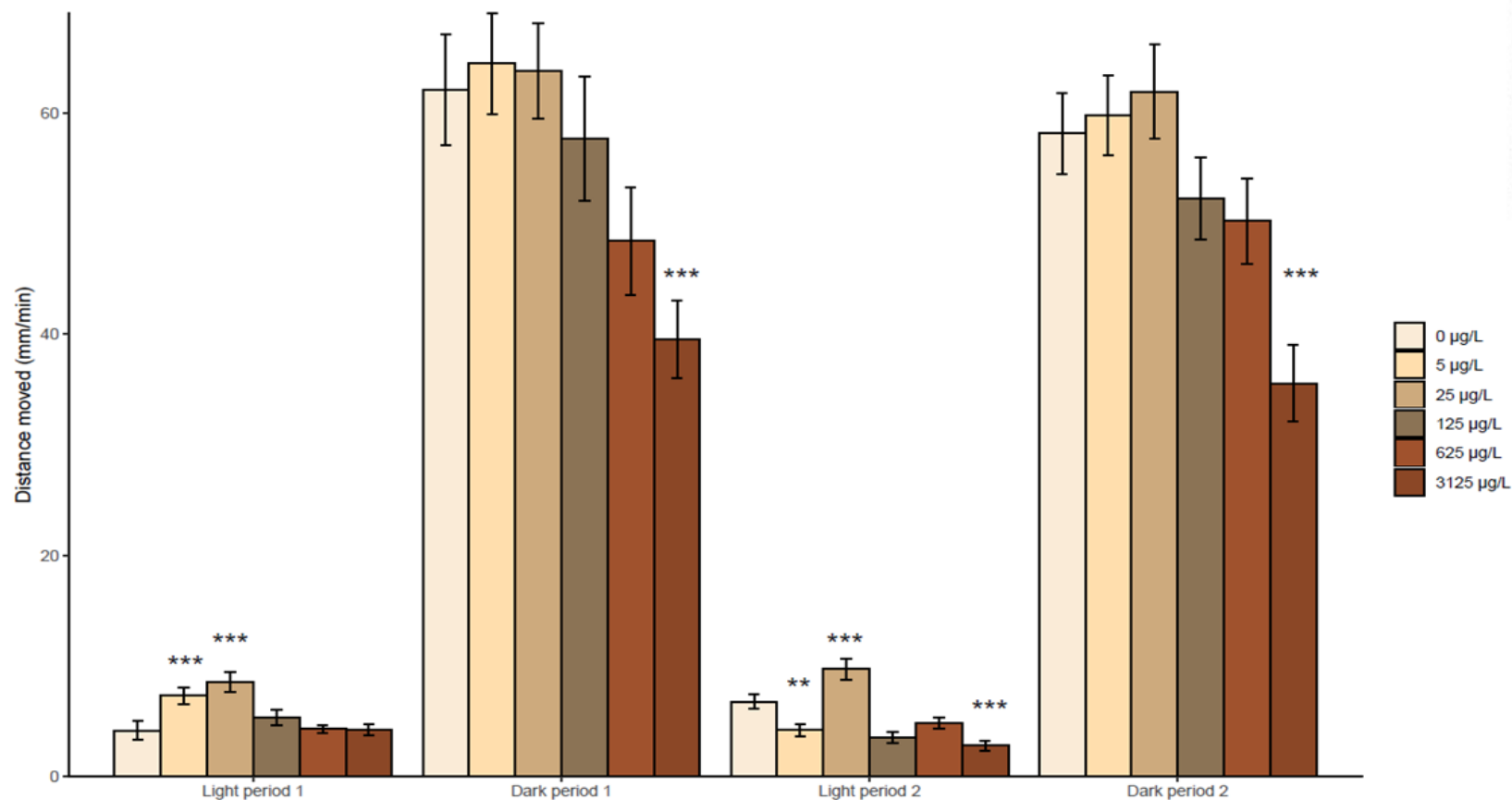
Volz et al., 2024



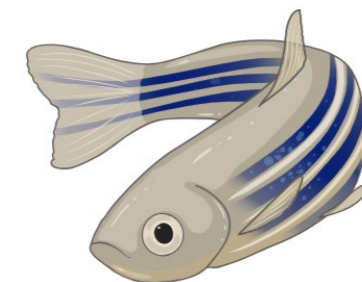
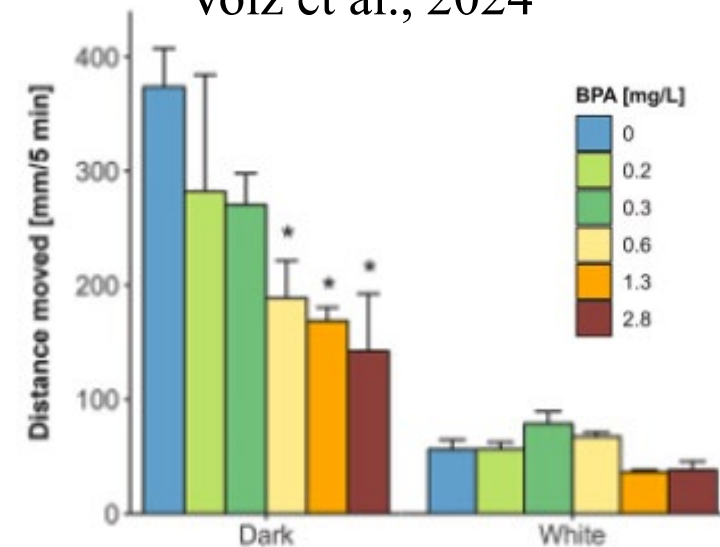
- BPE er potentielt hormonforstyrrende på THS, ligesom BPA (volz et al. 2024)

Kjær et al., in prep

Svømme performance BPE and BPA



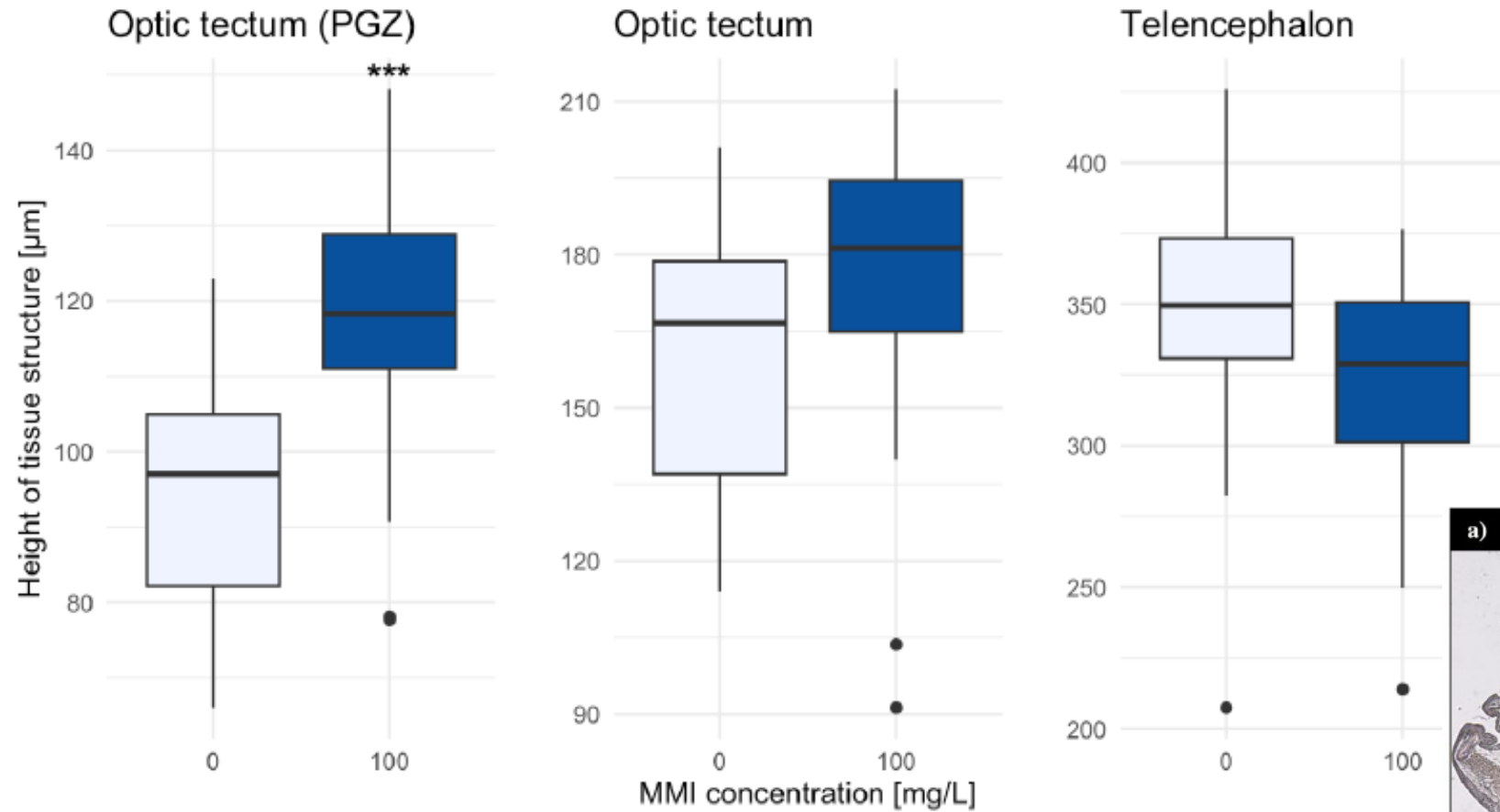
Volz et al., 2024



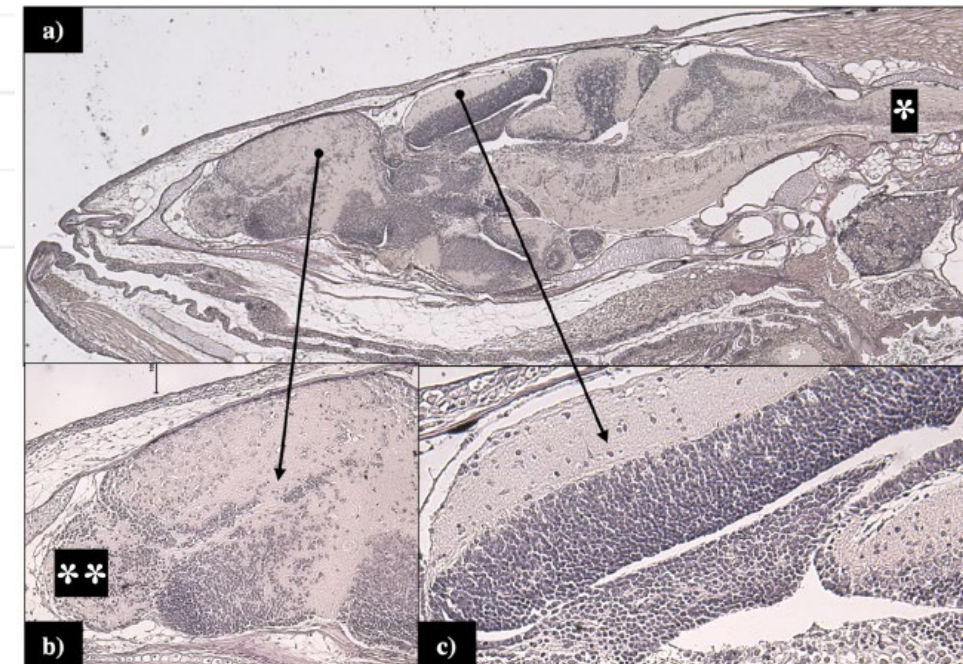
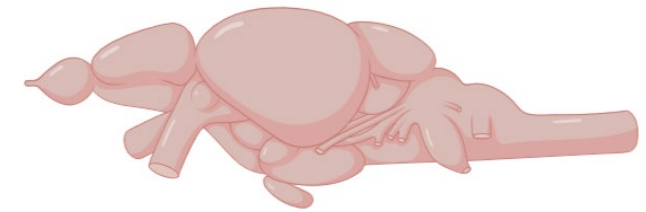
- BPA & BPE nedsætter svømme performance i zebrafisk i lyse og mørke perioder

Kjær et al., in prep

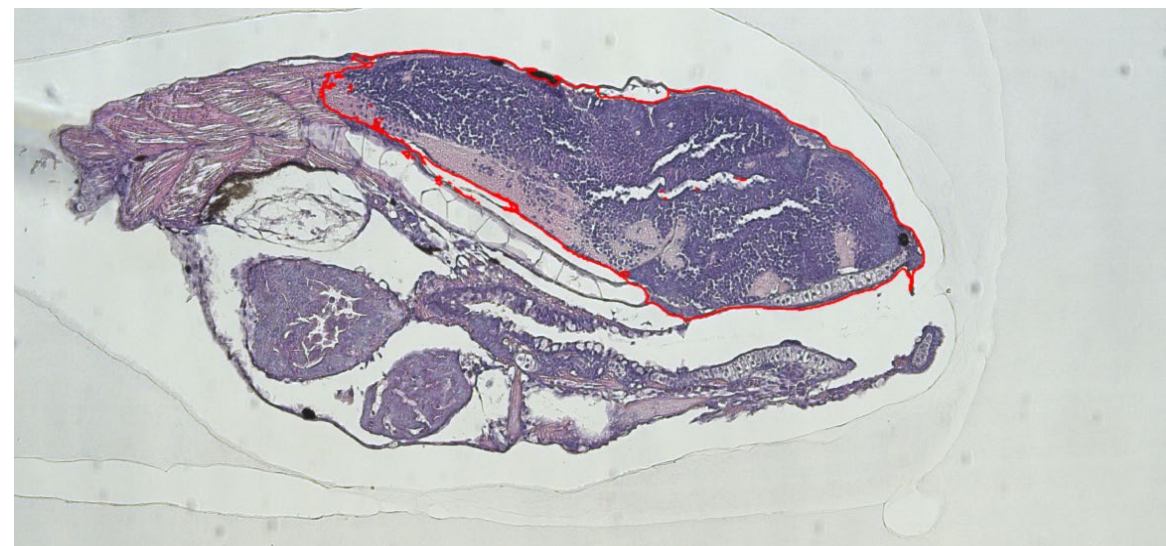
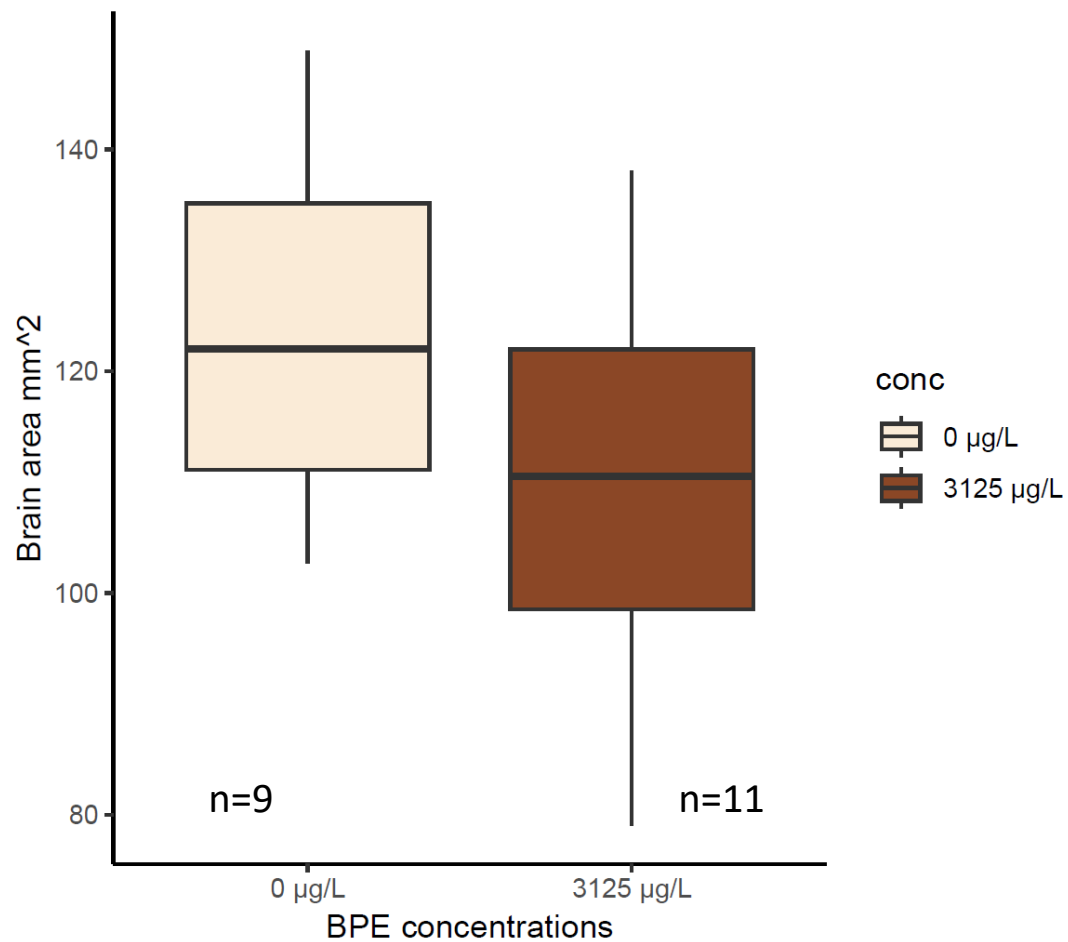
Effekter på hjerneudvikling i zebrafisk (33 dage)



Effekter på specifikke områder af hjernen efter eksponering for methimazole (TPO-hæmmer)



Effekter på hjerneudvikling i zebrafisk (5 dage)



Preliminary data: Tendens til mindre hjerner i BPE eksponeret fisk – målt blindet!

Pernille Ambus Kjær
og Simone Fibiger
Sørensen, 2025

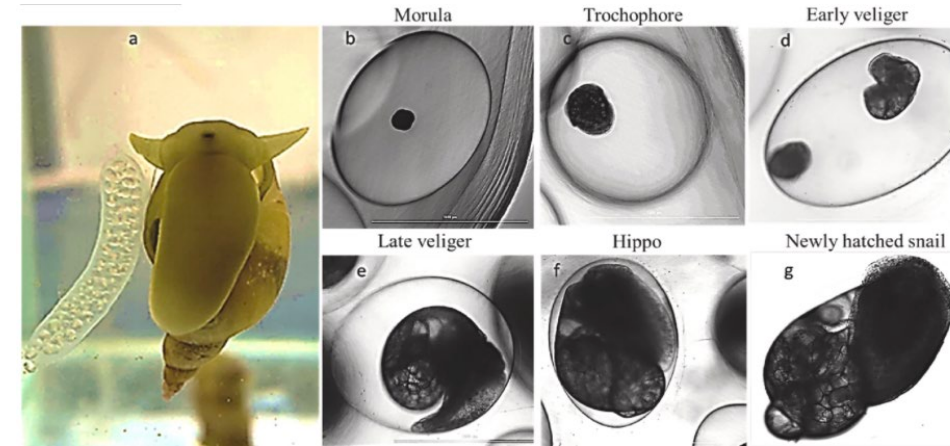


Bløddyr som model for hvirvelløse dyr

Stor mosesnegl *Lymnaea stagnalis*

- Sundhed

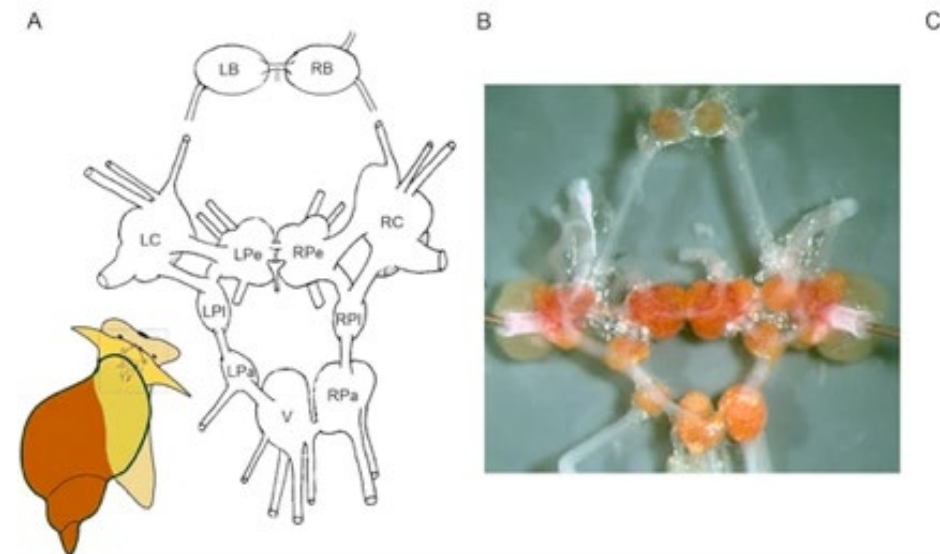
- Model for hvirveldyr
 - Neurobiologi – store nerver
 - Udviklingsbiologi
 - Læring og hukommelse



(Liu *et al.*, 2022)

- Miljø og sundhed

- Hvirvelløse dyr – meget anderledes
hormonsystem, men også ligheder med
hvirveldyr



Basisviden og tests med snegle

Voksne snegle (OECD TG 243)

- 28 dage
- Reproduktion
- Vækst
- ...
- Histologi af kønskirtler,
genekspression, effekter hos afkom?

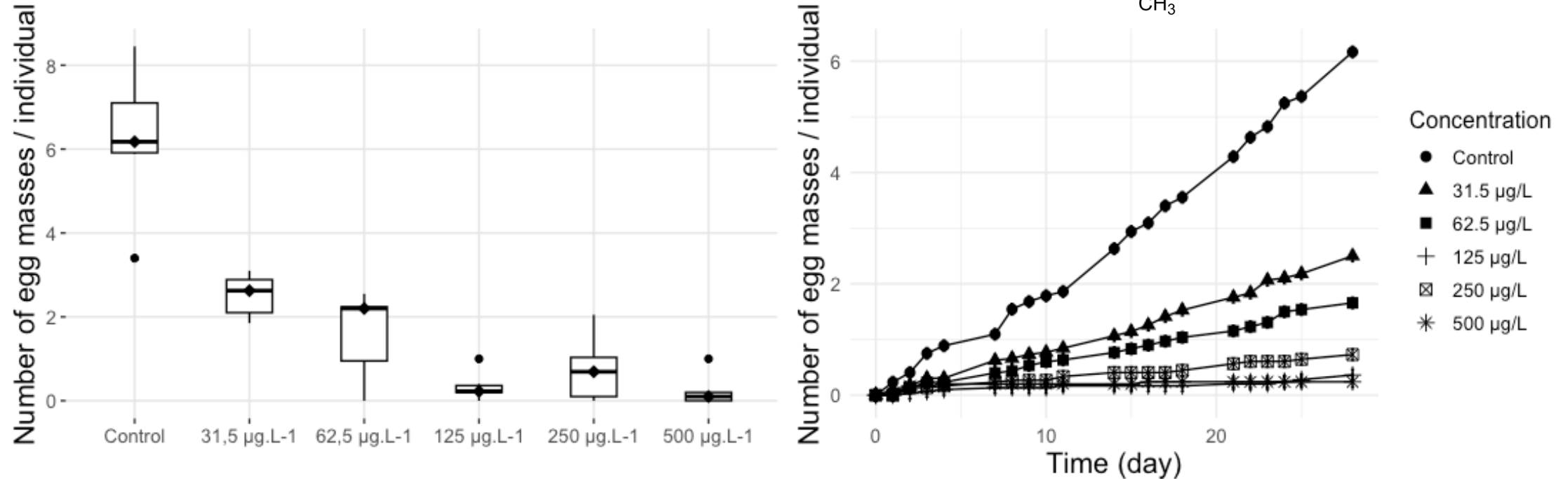
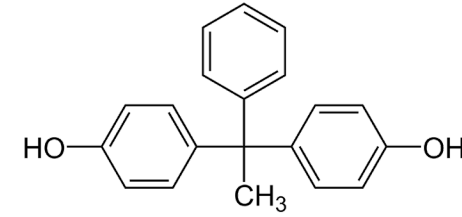
Snegleæg og embryoner

- Udviklingstid
- Klækning
- Hjerterate
- Abnormaliteter



Foto: Caspar Yan Hansen

Basisviden og tests med snegle – BPAP (voksne)

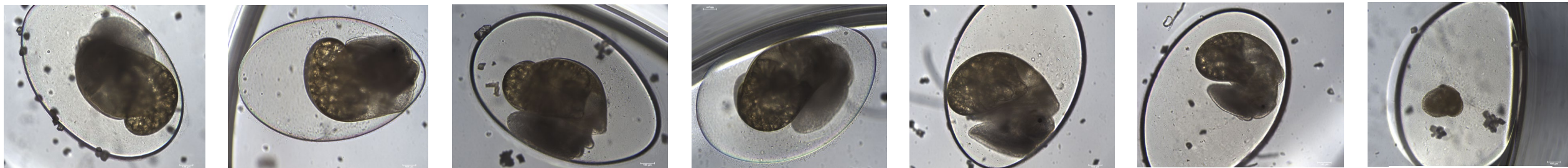


Effekter på reproduktion → mere end 50 % færre lagte ægmasser ved 31,5 µg BPAP/L

28 dage-EC₅₀ (reproduktion) = 38.7 µg BPAP/L – mere følsom end zebrafisk

Basisviden og tests med snegle – BPAP (embryoer)

Billeder af embryoer ved dag 9:



Kontrol

31.25 µg/L

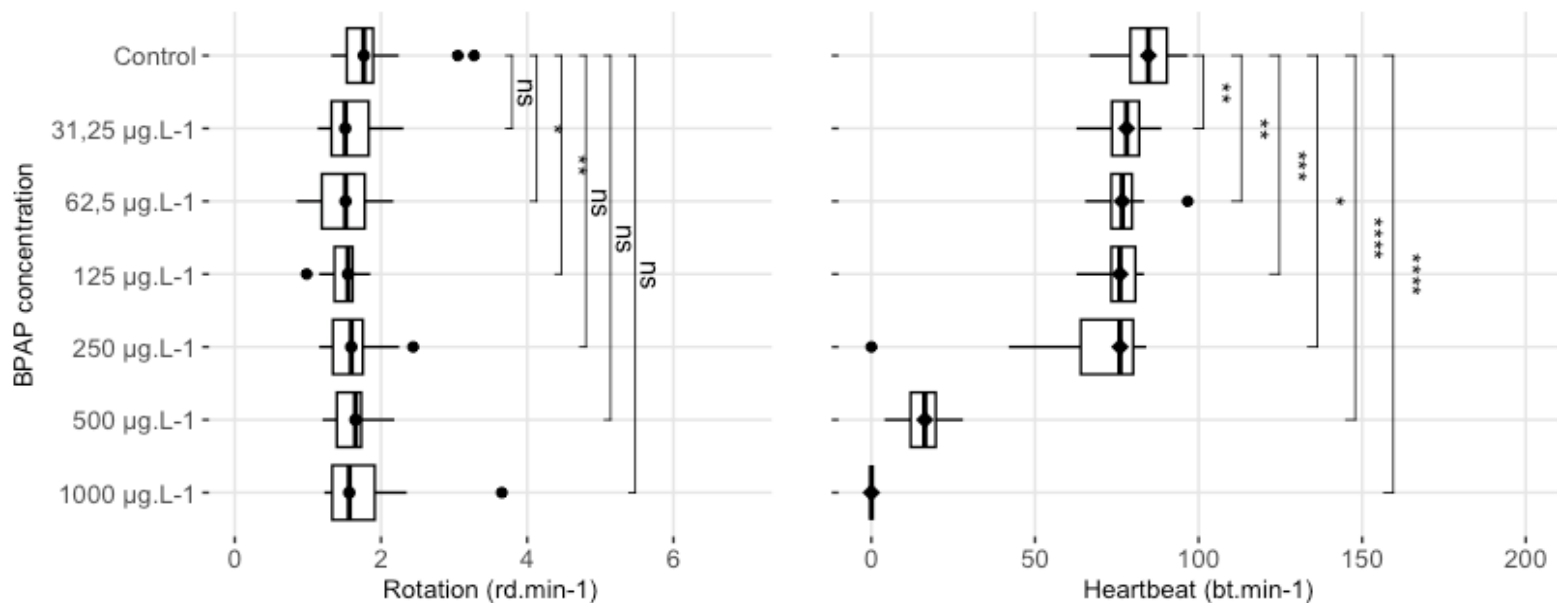
62.5 µg/L

125 µg/L

250 µg/L

500 µg/L

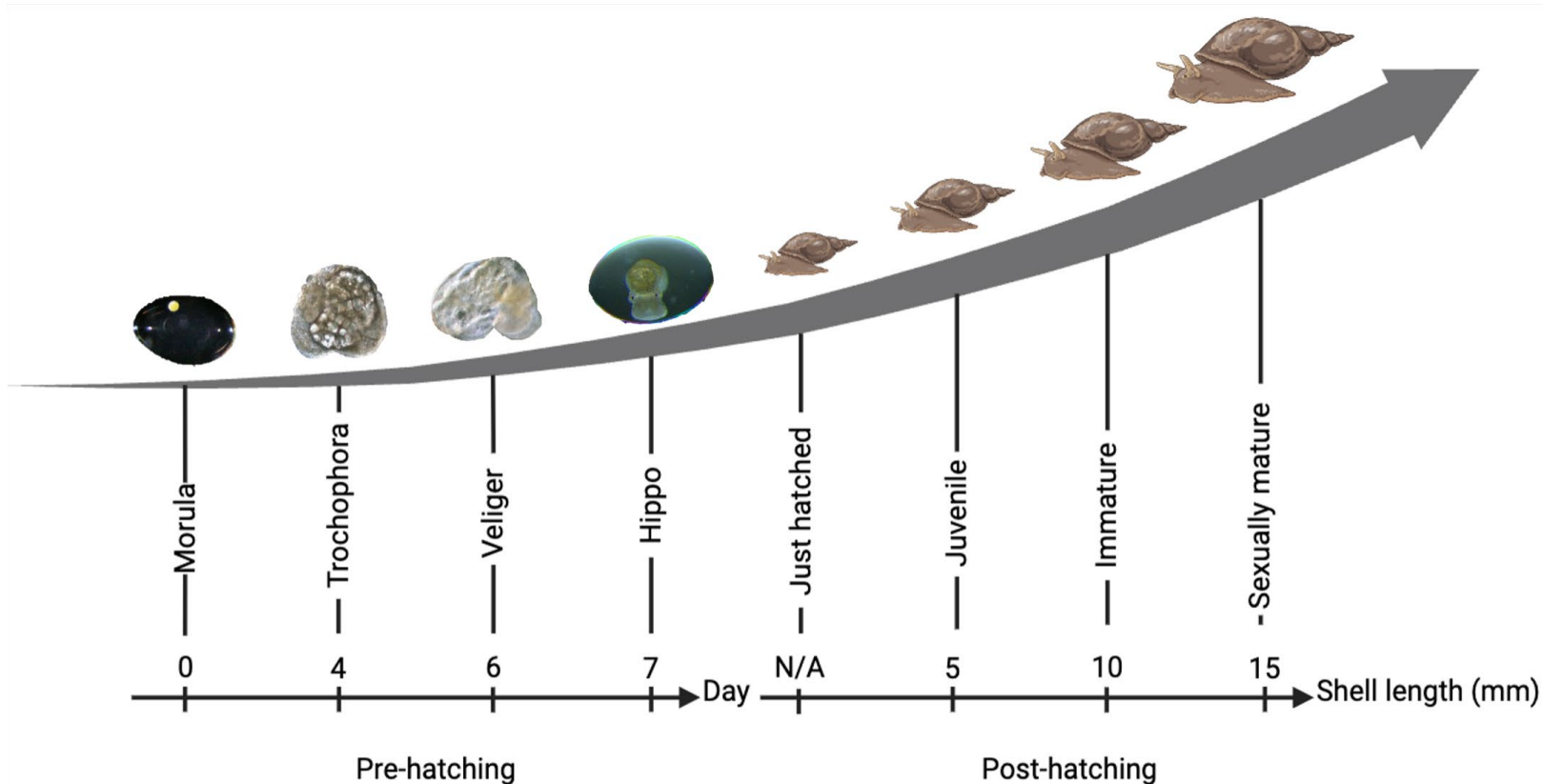
1000 µg/L



- Signifikante effekter på hjerteslag ved 31.25 µg BPAP/L
- Signifikante effekter på vækst ved 500 µg BPAP/L

Thyreoidea hormon(lignende)system i bløddyr

Snegle undersøgt for thyreoideahormoner
- Analyse udført på LC-MSMS (Agilent 6495c)



Det første spørgsmål, vi ønsker at besvare, er: Har *Lymnaea stagnalis* thyreoideahormoner?

Hvis ja, hvordan ændrer niveauet af disse hormoner sig gennem deres udvikling?"

Det andet spørgsmål er: Hvad er disse hormoners rolle i *Lymnaea stagnalis*?

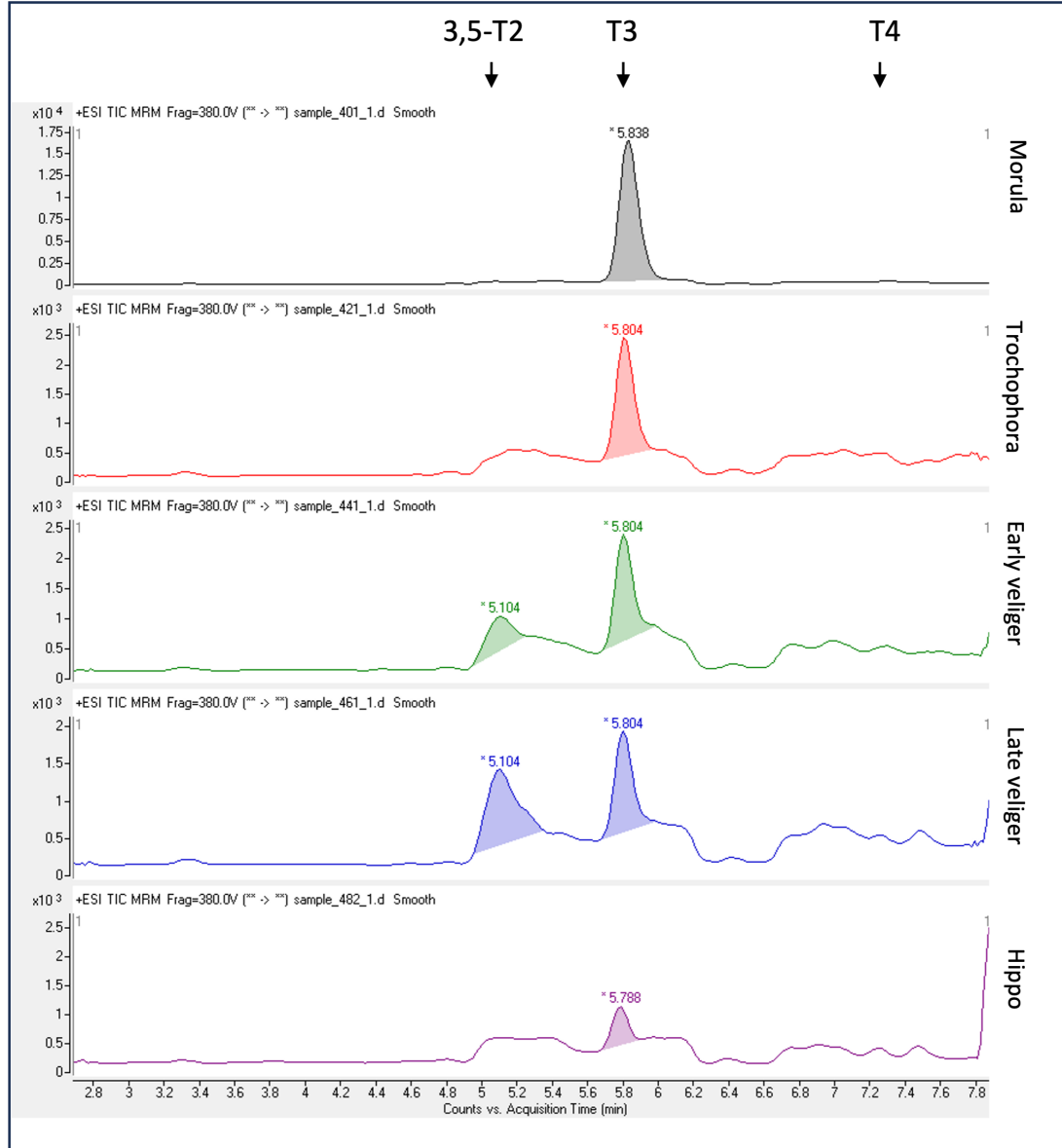
Thyreoidea hormon(lignende)system i bløddyr

Første analyser ved SDU på voksne snegle i juvenile stadie.

	Weight (mg)	T4	rT3	T3	3,3'-T2		3,5-T2	T1	T1Am	T1Ac	T0	Tetrac	Triac	Diac
Snail 1	32,0	-	-	+	-		+	-	+	+	+	(+)	+	+
Snail 2	39,5	-	-	+	-		+	-	+	+	+	(+)	+	-
Snail 3	49,0	-	-	+	-		+	-	+	+	+	(+)	+	-
Snail 4	53,1	-	-	+	-		+	-	+	-	+	(+)	+	-
Snail 5	54,8	-	-	-	-		+	-	+	-	+	(+)	-	-
Snail 6	60,0	-	-	+	-		+	-	+	+	+	(+)	+	-
Snail 7	61,5	-	-	+	-		+	-	+	+	+	(+)	-	-

- T3 ; 3,5-T2 ; T1Am ; T1Ac ; T0 and Triac fundet I juvenile sneglene

Thyreoidea hormon(lignende)system i bløddyr



Ny metode til thyreoideahormon i bløddyr

- Forenklet prøveforberedelse (færre trin)

- Hurtigere analyse
- Lavere omkostninger

-> Kvantificering af hormonniveauer i snegle gennem deres udvikling, fra æg til voksne (forår 2025 ved SDU)

Hvorfor bruge snegle?



1) Opbygge bedre og mere baggrundsviden

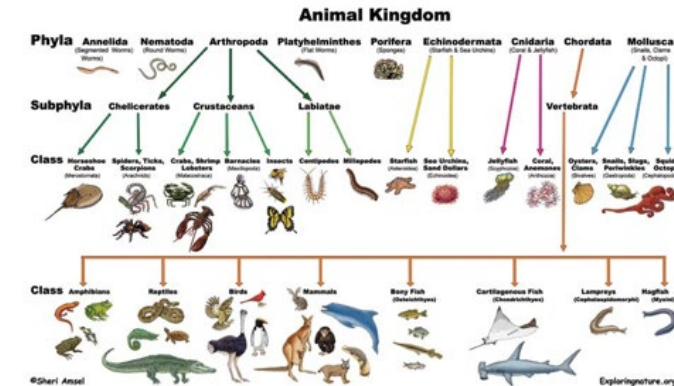
→ Forstå om kemikalier er årsagen til nogle af problemerne hos hvirvelløse i naturen (f.eks. ift. biodiversitetskrisen)

2) Udvikle testmetoder – ID af hormonforstyrrende stoffer

→ Beskytte hvirvelløse dyr

→ Hurtigere og billigere tests end med hvirveldyr

→ Reducere brugen af hvirveldyr (3R: Replacement, Reduction, and Refinement)



værktøjskassen

Vi arbejder med at få T og DNT med i fisketests og mulighed for at identificere hormonforstyrrende kemikalier i hvirvelløse dyr (bløddyr)

Pattedyr (**V**)

Fisk (**V**(÷ **T**)) - **V**

Padder (**V**)

Fugle (**V**)

Krybdyr ÷

Hvirvelløse dyr (95% af alle arter) ÷ - **V**





Take home messages



Skift først væk fra dyreforsøg når alternative metoder, der beskytter dyr i miljøet er udviklet

pas på **biodiversiteten**



EU – antallet af fisk der bruges til regulatoriske test og forskning mindre en 0,1 % af industrifisk der fanges i DK.



Økotoxikologigruppen, Biologisk Institut, Syddansk Universitet



CeHoS/PARC-Ph.d.-studerende **Gaëtan Tucou**

TG/PARC-Ph.d.-studerende **Pernille A. Kjær**

Lektor - **Jane Ebsen Morthorst**

Lektor – **Elvis Genbo Xu**

Lektor - **Henrik Holbech**: hol@biology.sdu.dk

