

Snegleæg, fiskelarver og andre gode historier!

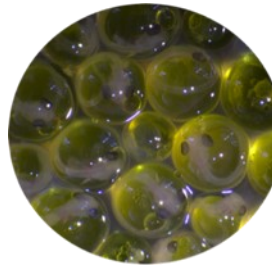
Undersøgelse af mulige nye (neuro)endokrine endpoints til tests med fisk og snegle

Henrik Holbech

Lektor i Økotoxikologigruppen

Biologisk Institut, Syddansk Universitet

Center for Hormonforstyrrende Stoffer (CeHoS)



Kemikaliers “skadelighed” vurderes på to måder:

1. Farlighedsvurdering (hazard assessment):

Eks. hvor akut giftigt er stoffet (iboende egenskab).
(grundlaget for mærkning og klassificering)



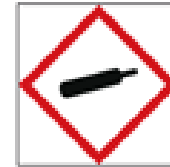
Akut giftig



Sundhedsskadelig,
lokaliriterende,
hudsensibiliserende



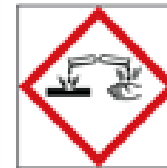
Yderst brandfarlig,
meget brandfarlig,
brandfarlig



Trykbeholder
med gas



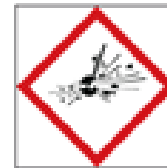
Kræftfremkaldende,
mutagen og reprod-
uktionsskadelig.
(Efter gamle regler
mærket med død-
ningehoved).



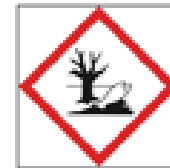
Ætsende



Brandnærende



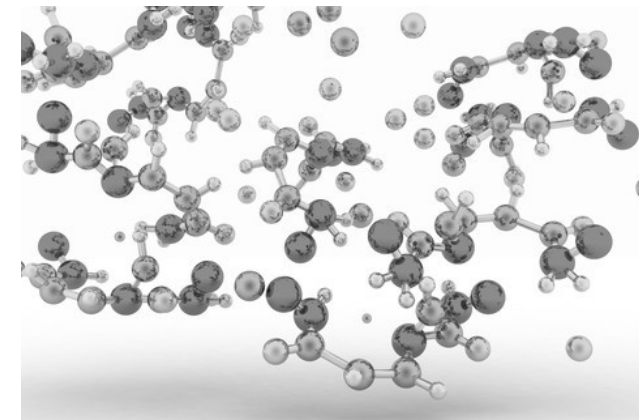
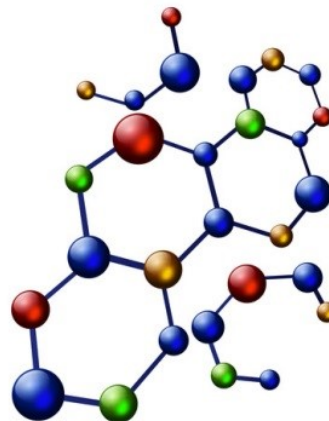
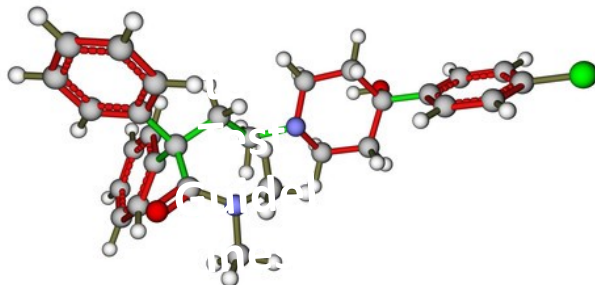
Eksplosiv



Giftig for vand-
levende organismer

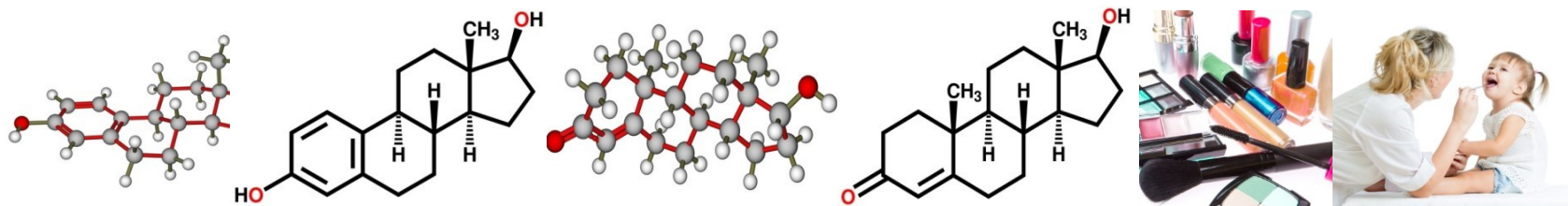
2. Risikovurdering (risk assessment):

Hvor meget af stoffet vil mennesker og dyr blive udsat for i forhold til, hvilken mængde, der giver en effekt.



Hormonforstyrrende stoffer

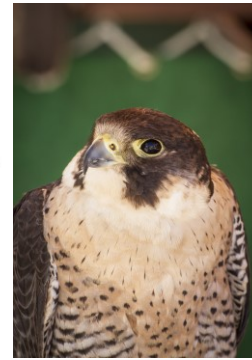
- Definitionen er meget vigtig på grund af lovgivningen i EU:
 - For de fleste kemikalier laves en farevurdering og en risikovurdering og kemikalier reguleres efter en vurdering af begge
 - Farevurdering – iboende egenskaber
 - Risikovurdering – eksponeringsscenarier
- For særligt bekymrende kemikalier reguleres der alene på baggrund af farevurdering
 - Eksempler er CMR-stoffer – carcinogene, mutagene og reprotoksiske
- Men nu også for hormonforstyrrende stoffer (gælder for PPP og BP) og snart (var planen!) også for industrikemikalier under REACH (+25.000 kemikalier)



Hormonforstyrrende stof:

- Et udefra kommende stof, der ændrer den endokrine funktion og derved forårsager alvorlige skadevirkninger i organismen, dens afkom og/eller i (sub)populationer af organismen.

• (Oversat fra WHO 2002)



Hormonforstyrrende kemikalier reguleres mest på baggrund af farevurdering:

Farevurdering laves med standardiserede/validerede tests

Testene bliver valideret og godkendt i OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)

Værktøjsskassen (OECD conceptual framework) indeholder tests på forskellige niveauer:

1. Eksisterende viden
2. Cellebaserede tests (in vitro) samt embryotests
3. Dyreforsøg – information om mekanismer
4. Dyreforsøg – information om alvorlighed og mekanismer
5. Dyreforsøg – information om mekanismer og alvorlighed over generationer



Hvad skal værktøjskassen indeholde

Tests der kan hjælpe med **Identifikation** af hormonforstyrrende stoffer der udøver deres alvorlige effekter gennem forskellige mekanismer på forskellige dele af hormonsystemet på følsomme livsstadier i relevante arter



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) ÷



Level 1 Sorting and prioritization based upon existing information	Existing data and Non-Test Information. Physical & chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability. All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests. Read across, chemical categories, QSARs and other in silico and ADME model predictions
Level 2 <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) and pathways(s)	ER or AR binding affinity. ER transcriptional activation (TG 455). Androgen or thyroid transcriptional activation. Steroidogenesis <i>in vitro</i> (TG 456). MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist). Other assays as appropriate.
Level 3 <i>In vivo</i> assays with selected endocrine mechanism(s) and pathway(s) ¹	Uterotrophic assay (TG 440) Hershberger assay (TG 441) Xenopus embryo thyroid signalling assay (TG248) Amphibian metamorphosis assay (TG 231) Fish Short Term Reproduction Assay (TG 229) Fish Screening Assay (TG 230) Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embrYos (TG 250) Rapid Androgen Disruption Activity Reporter assay (TG 251) Androgenized female stickleback screen (GD 148)
Level 4 <i>In vivo</i> assays with adverse effects on ED relevant endpoints:	Repeated dose study (TG 407 & 408). 1-generation assay (TG 415). Male & female pubertal assay and Intact Adult Male Endocrine Screening Assay (draft GD 150) Prenatal Development Toxicity Study (TG 414). Chronic toxicity and carcinogenicity studies (TG 451-3) Reproductive screening test (TG 421 if enhanced). Combined 28 day/reproductive screening assay (TG 422 if enhanced). Developmental Neurotoxicity (TG 426) Fish Sexual Development Test (TG 234). Larval Amphibian Growth & development Assay (TG 241). Avian Reproduction Assay (TG 206) Mollusc reproduction Assays (TG 242 & 243). Chironomid Tox. Test (TG 218-219)
Level 5 <i>In vivo</i> assays providing more comprehensive data on adverse effects on ED relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism	Extended one-generation reproductive Toxicity Study (TG 443). 2-generation assay (TG 416, 2001) FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) Medaka Extended one-generation test (MEOGRT, TG 240) Avian 2 generation reproductive toxicity assay Mysid Life Cycle Toxicity Test Copepod Reproduction and Development Test Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (TG 233) Daphnia Reproduction Test (with male induction) (TG 211) Daphnia Multi-generation Assay

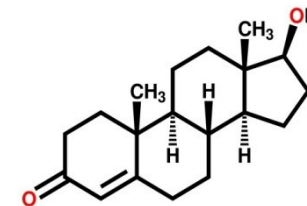
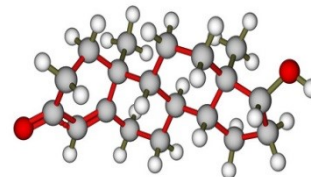
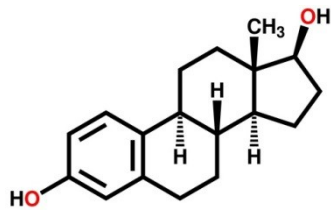
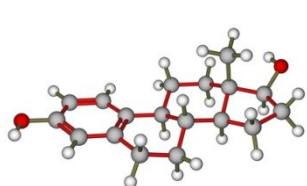
OECD test guidelines for hormonforstyrrende stoffer i miljøet

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

* EATS = Estrogen, Androgen, Thyroid, Steroidogenesis

Bliver de tests vi har udviklet brugt?

- Ja, til dels for PPPR og BPR lovgivningerne
- Kemikalier under REACH testes normalt ikke for hormonforstyrrende effekter i miljøet pga gamle informationskrav (+25.000 stoffer)
- REACH informationskrav skulle have været opdateret!
- Der er stærke kræfter mod flere dyreforsøg (Industri/NGO/befolkning)
- EU – in vivo dyreforsøg skal minimeres (3R)



Hvordan forbedrer vi værktøjskassen og reguleringerne

Forbedring for hvirveldyr EAS(T):

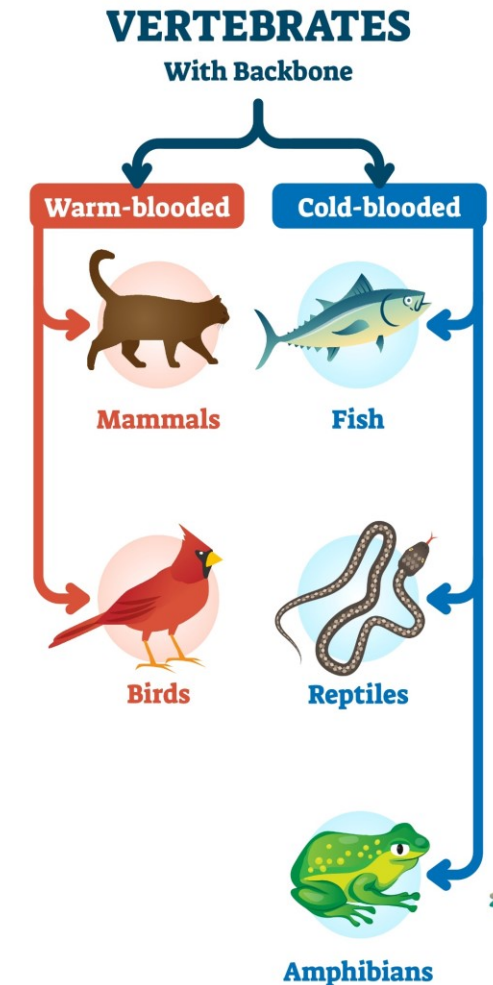
- ubrugt potentiale i extrapolering af hormonforstyrrende effekter på tværs af arter og klasser af hvirveldyr

Forbedret lovgivning:

- Opdater standardinformationskravene - især for REACH

(vision omkring horisontale kriterier for identification af hormonforstyrrende stoffer)

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



Fisk som model for hvirveldyr

- Sundhed
 - Model for andre hvirveldyr inkl. mennesker
 - Mutanter/transgene fisk
 - Alzheimers, cancer, nyresygdomme, hjertesygdomme
 - Erstatter mus som forsøgsdyr
- Miljø og sundhed
 - Hormonforstyrrende stoffer
 - Fisk og pattedyr har "samme" hormonsystem så de kan både beskytte miljø og hjælpe med at forstå effekter i pattedyr



(zebra)fisk som model for hvirveldyr

Zebrafiskens genom er blevet kortlagt

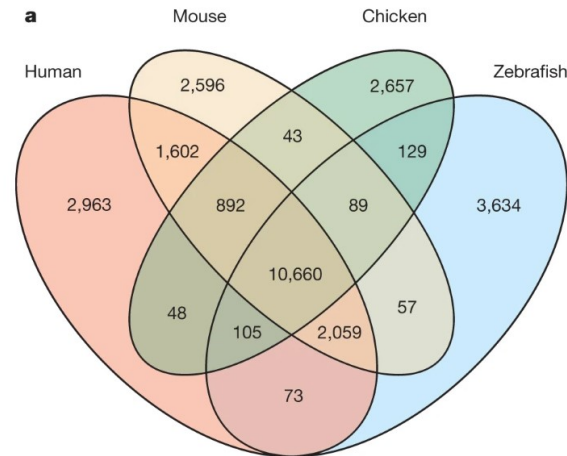
*70% af menneskets gener findes i zebrafisk

*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!

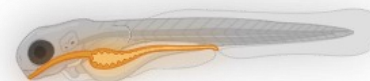
Figure 3: Evolutionary aspects of the zebrafish genome.



Zebrafisk (*Danio rerio*)



Udvikling fra befrugtning til 5 dage efter befrugtning



Forsøgsdyr?

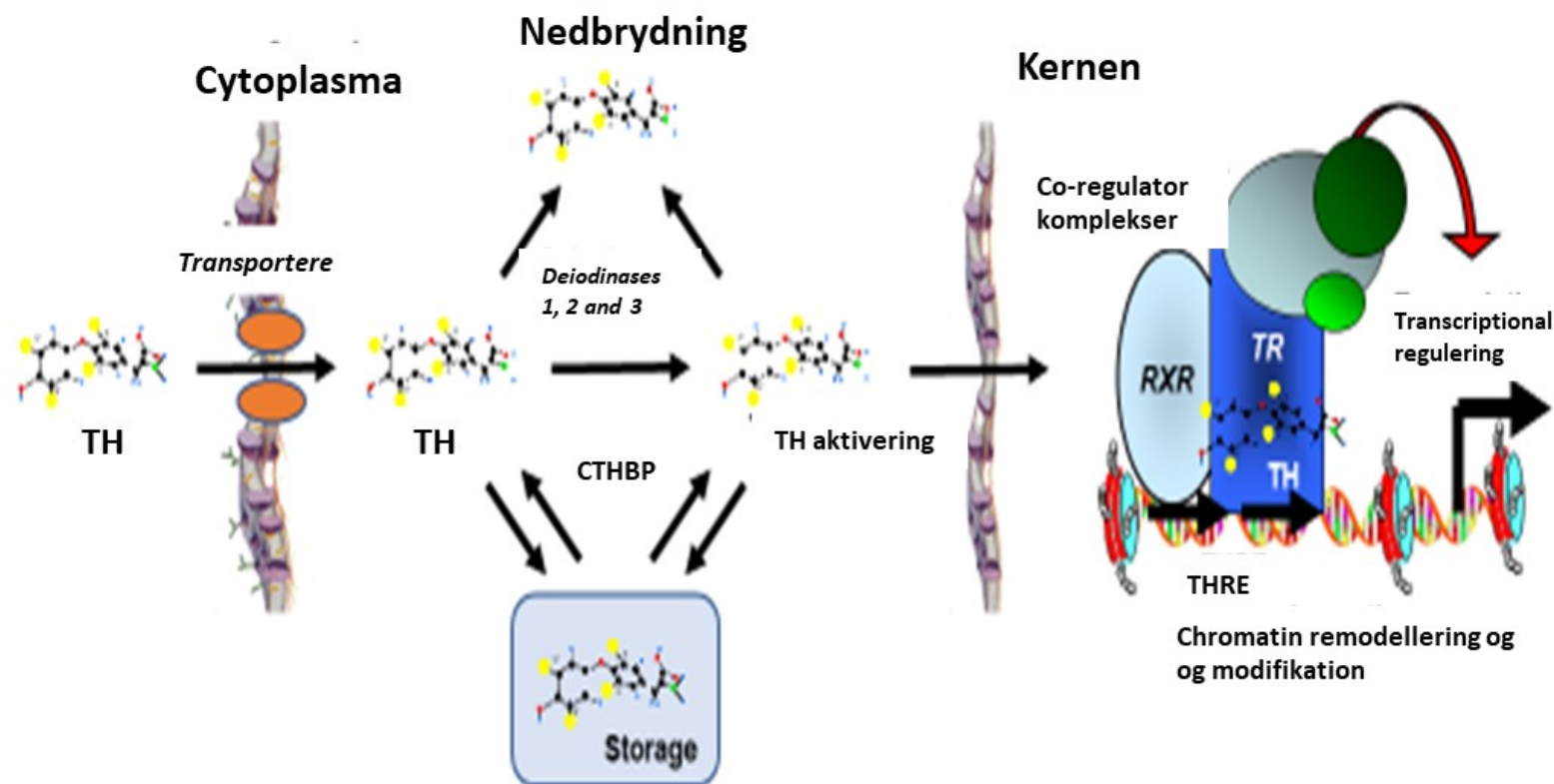


Voksne - 2 mdr.



(zebra)fisk som model for hvirveldyr – thyreoidea hormonsystemet

Molekylær konservering af TH-virkning



Konservering af TH

signalering:

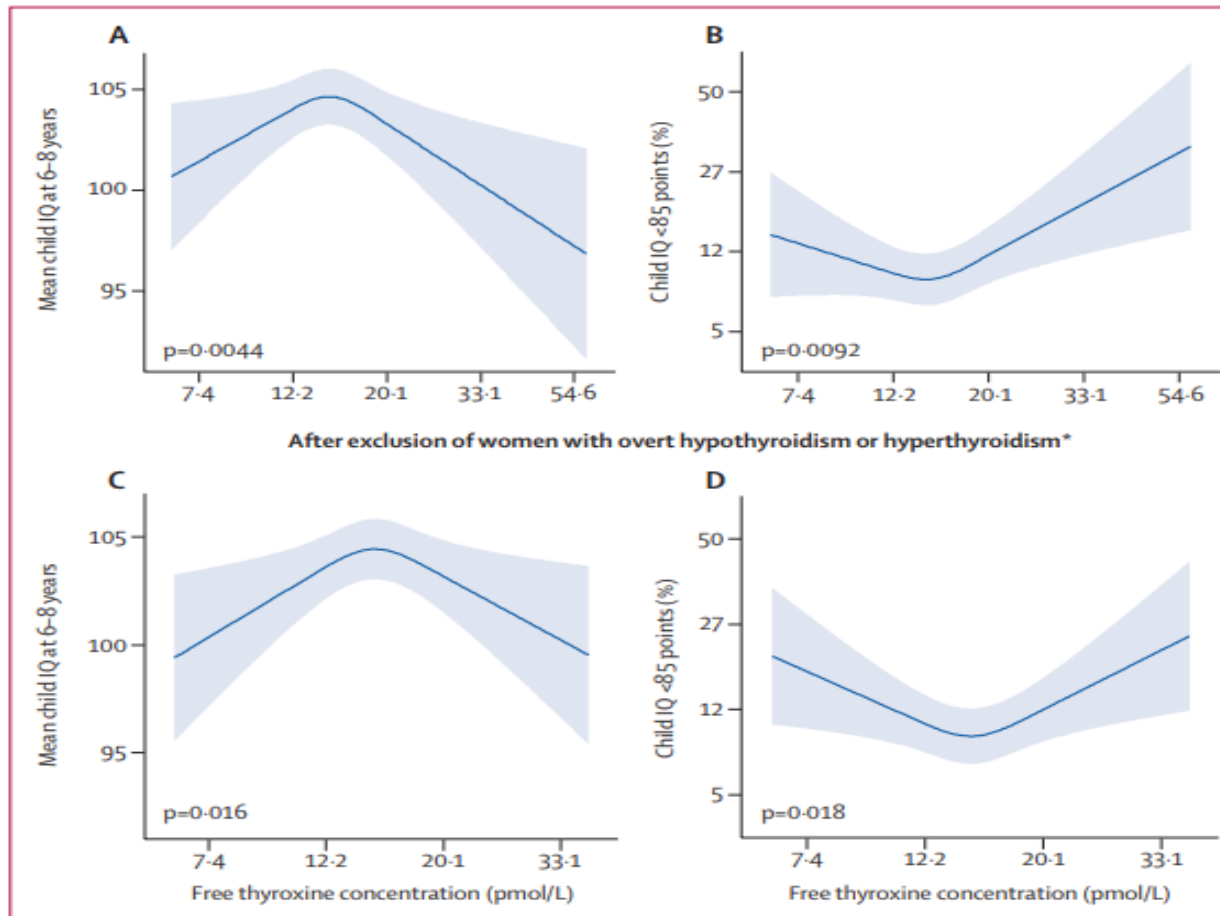
fisk, padder og pattedyr

- syntese
- sekretion
- transport



Modificeret fra Sachs & Buchholz, 2017

Thyreoideahormoner og hjerneudvikling

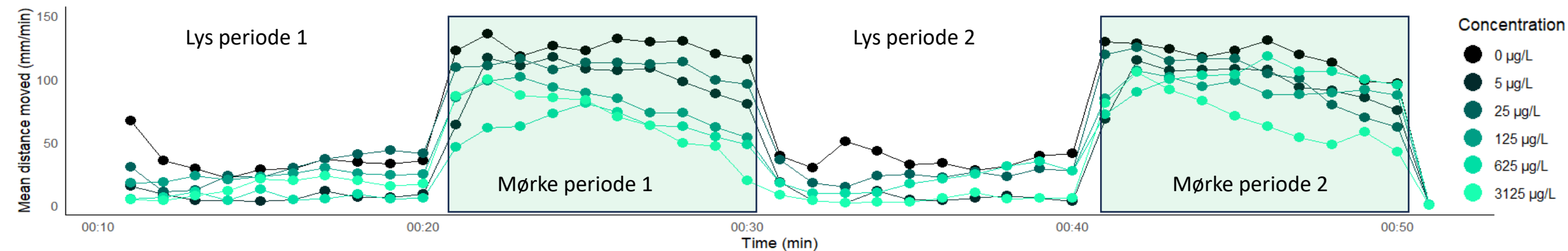


Hjerneudvikling IQ og
T4 – thyroxin
(thyreoideahormon)

Figure 2: Association between maternal free thyroxine and offspring IQ

IQ=intelligence quotient. *Overt hypothyroidism and hyperthyroidism are defined as the biochemical diagnosis made during pregnancy, based on the central 95% reference range, as advocated in international guidelines. (A, C) Association between maternal free thyroxine concentrations during pregnancy and child IQ as predicted mean and 95% CI in the whole population (A) and after the exclusion of women with overt thyroid disease (C). (B, D) Association of maternal free thyroxine levels during pregnancy and the risk of child IQ below 85 as predicted back-transformed log odds with 95% CI in the whole population (B) and after the exclusion of women with overt thyroid disease (D). Scales for the x axis might differ between the upper and lower graphs because of exclusions of women with overt, but not subclinical, disease entities. Appendix p 5 provides effect estimates from standard linear regression models.

Zebrafisk 5 dage gamle Lys/mørke adfærdstest (neuro-udvikling) Bisphenol E (alternativ til BPA)



Svømmedistance i mm/min for to lys- og mørke perioder (10 min hver) for BPE eksponeret zebrafiske larver (120 hpf).



Zebrafisk 5 dage gamle. BPE eksponeret histopatologi – øjenudvikling (bl.a. styret af thyroidhormoner)



Kontrol (0 µg/L)



Bisphenol E (3125 µg/L)

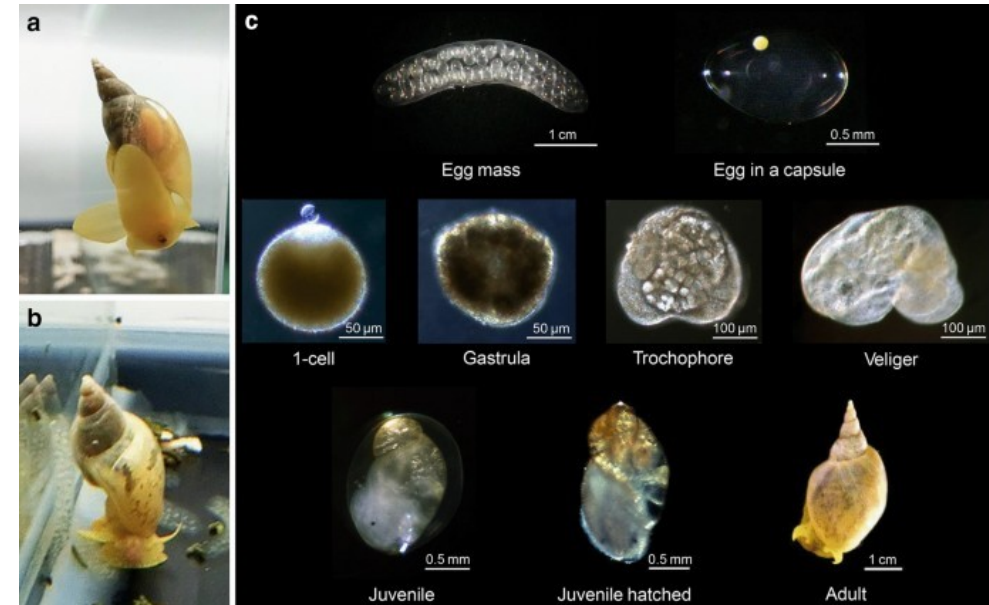
DK leder validering af T-effektmarkører i OECD test guidelines med fisk.



Bløddyr som model for hvirvelløse dyr

Stor mosesnegl *Lymnaea stagnalis*

- Sundhed
 - Model for hvirveldyr
 - Neurobiologi
 - Udviklingsbiologi
 - Læring og hukommelse
- Miljø og sundhed
 - Hvirvelløse dyr – meget anderledes hormonsystem, men også ligheder med hvirveldyr
 - OECD reproduktionstest men ingen test der kan identificere hormonforstyrrende stoffer



Basisviden og tests med snegle

Voksne snegle (OECD TG 243)

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

Snegleæg og embryoer

- Udviklingstid
- Klækning
- Hjerterate
- Abnormaliteter
- ...
- Adfærd (parring, flugt, æderate)?
- Læring og hukommelse?
- Metabolisme?



Foto: Caspar Yan Hansen

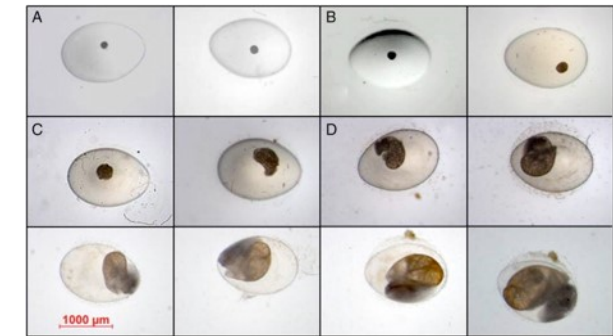
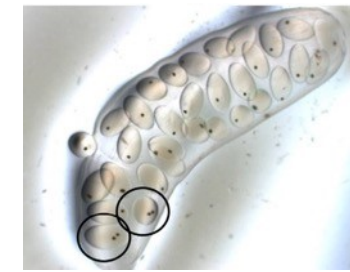
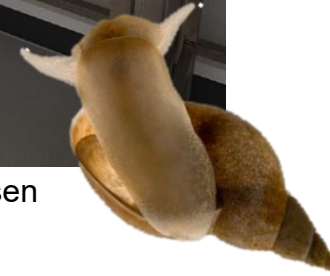
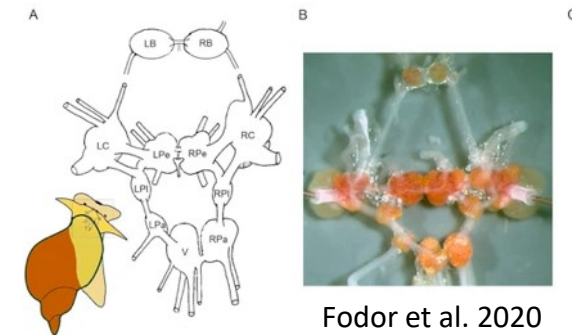
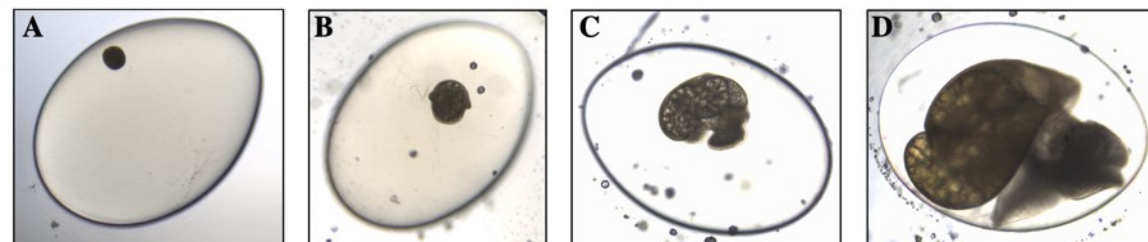


Foto: Bandow and Weltje 2012



Fodor et al. 2020

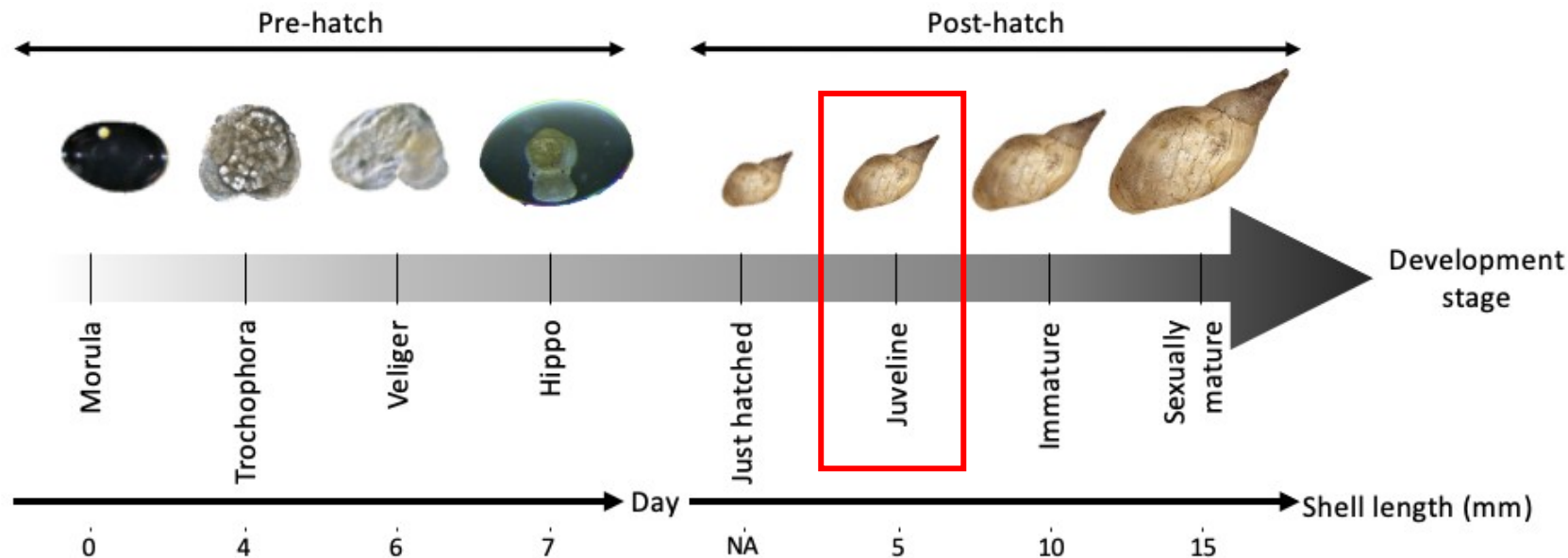


Embryonic stages A: Morula, B: trochophora, C: Veliger, D: Hippo. Foto: Lisbeth F. Sørensen.

Thyreoidea hormon(lignende)system i bløddyr

Unge snegle undersøgt for thyreoideahormoner

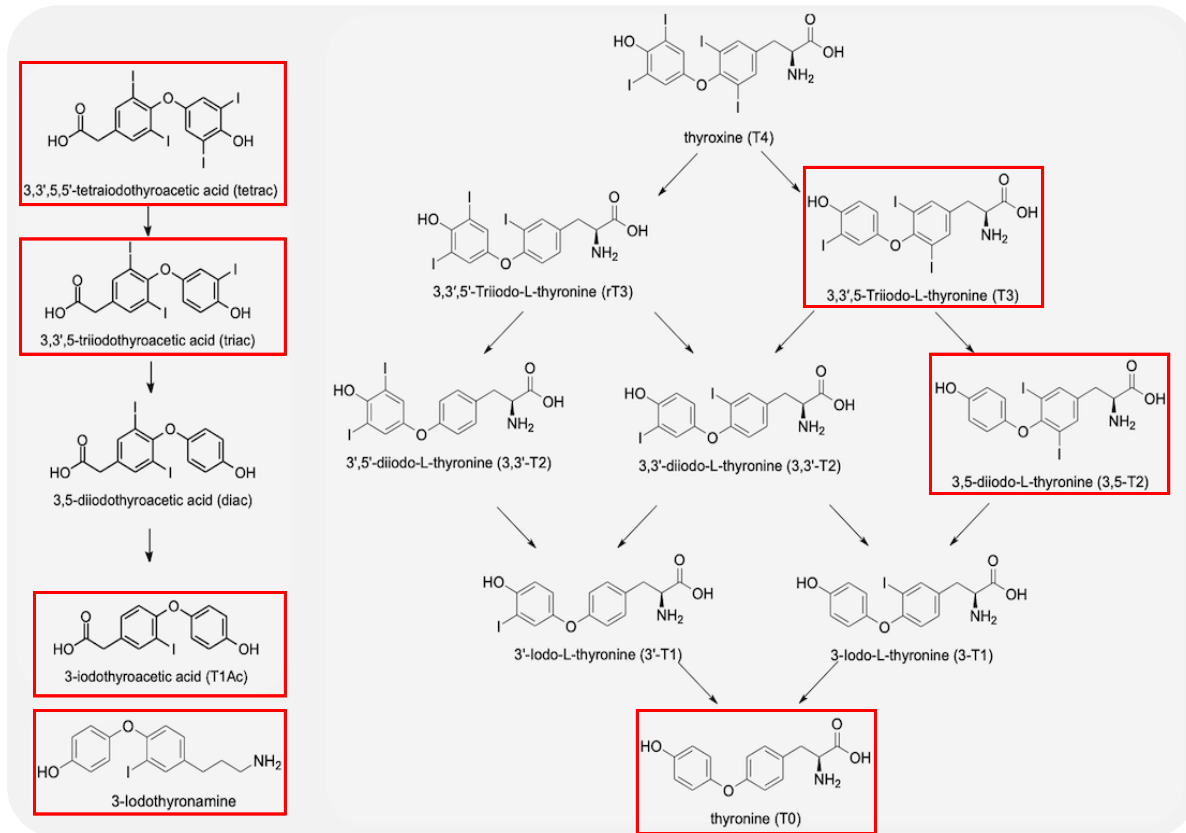
- Analyse udført på 3Q system (Agilent 6495c) with a hyphenated UHPLC system (Agilent 1290 Infinity II)



Lymnaea stagnalis development stages criteria for before and after hatching

Thyreoidea hormon(lignende)system i bløddyr

Første resultater



Main thyroid hormone metabolites targeted during MS analysis. Metabolites squared in red where detected in at least one of the snails.

Tyroid hormones metabolites found in juvenile snails. “-” when not detected and “+” when detected.

	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 sneglene

T3 – triiodotyronin aktive T-hormon i hvirveldyr

Flere analyser den kommende tid. Klarlægning af forekomsten i forskellige livsstadier

Hvorfor bruge snegle?



1) Opbygge bedre og mere baggrundsviden

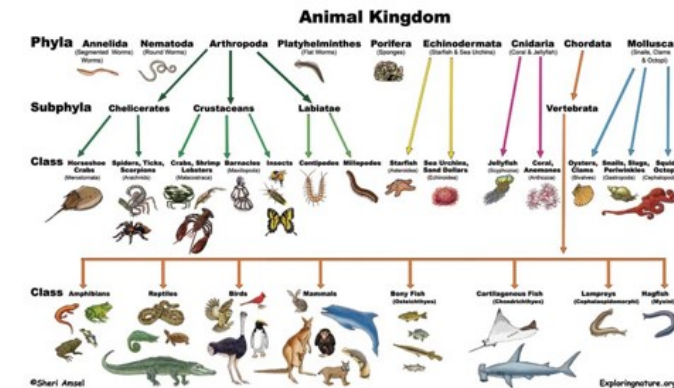
→ Forstå om kemikalier er årsagen til nogle af problemerne hos hvirvelløse i naturen (f.eks. ift. biodiversitetskrisen)

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)



OECD Conceptual Framework – værktøjskasse

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

Pattedyr (**V**)

Fisk (**V**(÷ **T**)) - **V**

Padder (**V**)

Fugle (**V**)

Krybdyr ÷

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



Økotoxikologigruppen, Biologisk Institut, Syddansk Universitet



CeHoS/PARC-Ph.d.-studerende **Gaëtan Tucoo**
TG/PARC-Ph.d.-studerende **Pernille A. Hansen**
Lektor - **Jane Ebsen Morthorst**
Lektor - **Henrik Holbech**: hol@biology.sdu.dk