



Zebrafisk - en yderst populær model for hvirveldyrers udvikling under kemikalieeksponering.

# Udvikling og forbedring af tests til identifikation af hormonforstyrrende stoffer

ERGO - EndocRine Guideline Optimization.

Af Henrik Holbech, Biologisk Institut, SDU, og Helle Elisabeth Lyngborg, Research & Innovation Organisation, SDU

Der er i de seneste årtier kommet stor fokus på, at kemikalier kan påvirke menneskers og dyrs hormonsystemer på en måde, der kan forårsage alvorlige effekter på sundhed, herunder udvikling og reproduktion. Derfor har man i de seneste 20 år arbejdet i internationalt regi (såsom i EU og OECD) på at udvikle og validere tests, der kan identificere hormonforstyrrende kemikalier, så de kan reguleres lovgivningsmæssigt. Man

er kommet langt, men der er stadigvæk store huller i de tests, der er til rådighed i dag og lovgivningsmæssigt er man heller ikke helt på plads i EU.

Derfor har EU i forskningsprogrammet Horizon 2020 støttet otte europæiske projekter, der forsker i at gøre tests bedre. Et af dem er projektet ERGO, koordineret af forskningsgruppen Økotoxikologi fra Biologisk Institut på SDU. ERGO forsker dels i bedre testmetoder til at identificere hormonforstyrrende stoffer, der påvirker skjoldbruskkirtelsystemet, og dels i at anvende viden fra dyreforsøg med fisk, padder og pattedyr til at forudsige effekter hos mennesker.

## Hvorfor bekymrer vi os om de hormonforstyrrende stoffer?

Både hos mennesker og hos dyr i naturen har der været tegn på problemer med kønsudvikling siden 1970'erne. For menneskers sundhed kan det være meget svært at bevise effekter af specifikke stoffer. Imidlertid har man i flere studier set en sammenhæng mellem eksponering for kemikalier og effekter på især den mandlige kønsudvikling og reproduktion såsom faldende sædcelletal og øget risiko for testikelkræft [2], men også effekter på piger og kvinder såsom brystkræft og tidlig menstruation [3] sættes i forbindelse med kemikalieeksponering. ►



Svømmeblæreoppustning i zebrafiskelarve hæmmes af kemikalier, der påvirker thyreoideahormonerne T4 og T3. Her ses effekten efter fire dages eksponering for den polycykliske aromatiske hydrocarbon, phenanthren. Kilde: Vergauwen et al., 2015 [7].

I forhold til miljøet er der klare beviser for effekter af specifikke stoffer. For eksempel er det påvist, at fisk kan blive hermafroditte på grund af østrogenlignende stoffer som nonylphenol og octylphenol i spildevand [4], og hunsnegle danner hanlige kønsorganer på grund af tributyltin (TBT) i skibes bundmaling [5].

## Regulering af hormonforstyrrende stoffer

I mange år kunne man i EU stort set ikke regulere kemikalier på baggrund af hormonforstyrrelser, fordi man ikke kunne blive enige om, hvilke kriterier for identifikationen der var nødvendige. Efter mange års til tider meget hårde diskussioner mellem industri, medlemslande, forskere og EU-Kommissionen blev der endeligt i 2018 vedtaget videnskabelige kriterier for identifikation af hormonforstyrrende stoffer i biocider og pesticider. Simplificeret betyder kriterierne, at biocider og pesticider ikke må indeholde hormonforstyrrende stoffer, medmindre de kun rammer de mål-

organismer, som midlerne er lavet for at bekæmpe. Kriterierne er farebaserede, hvilket betyder, at man hovedsageligt kigger på stoffernes farlighed og ikke så meget på, hvor meget mennesker og miljø eksponeres for stofferne. Denne tilgang skyldes, at man vurderer hormonforstyrrende stoffer som uønskede på lige fod med for eksempel kræftfremkaldende stoffer.

Der er et ønske i EU om horisontale kriterier, der regulerer stofferne ens i alle lovgivninger, men det er endnu ikke implementeret. Industrikemikalier (omkring 20.000 registrerede i EU) reguleres under forordningen REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances). Her er det endnu ikke et krav at undersøge kemikalierne for hormonforstyrrende effekter, men de enkelte medlemslande eller ECHA (EU's kemikaliebureau) kan nominere specifikke kemikalier som SVHC (Substances of Very High Concern) på baggrund af bekymring for hormonforstyrrelser.

En proces går så i gang for at under-

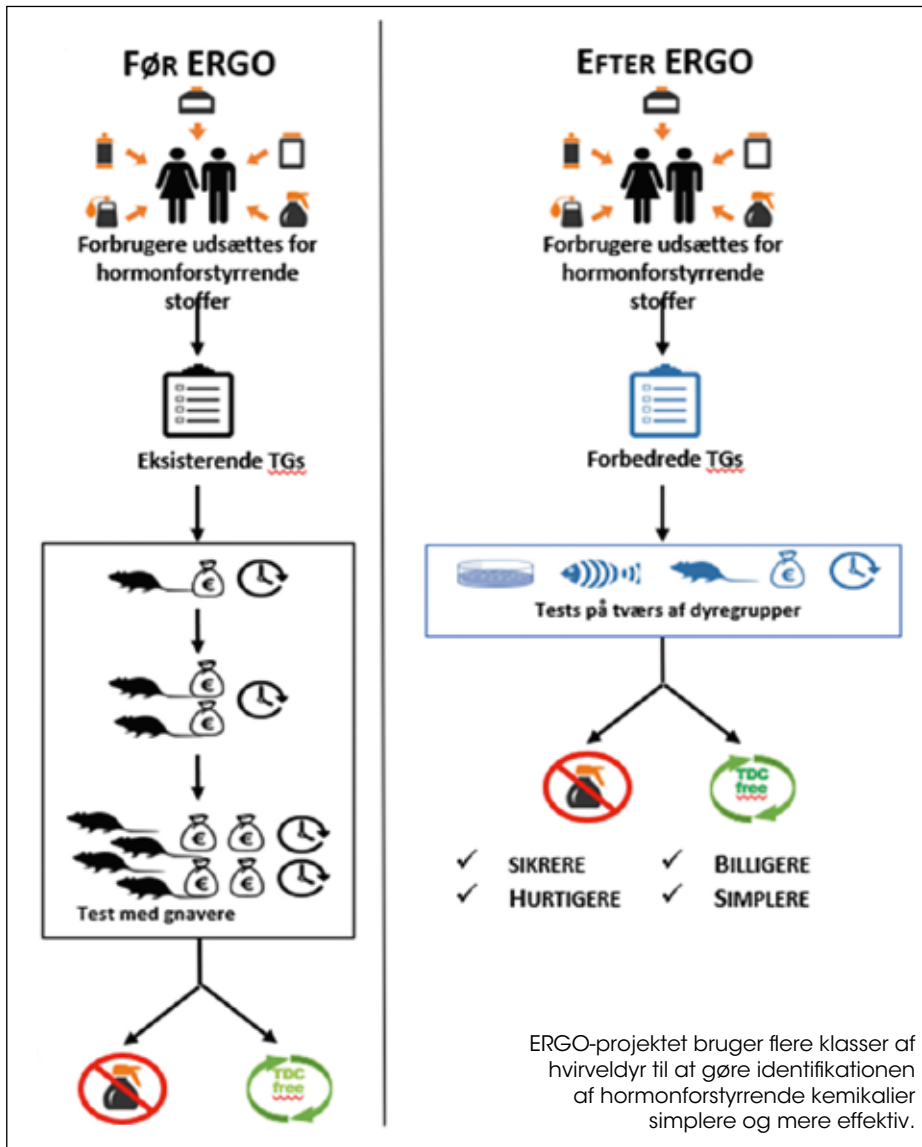
søge bekymringen, der kan stamme fra forskningsresultater eller resultater fremlagt af producenten/importøren af kemikaliet. Hvis processen fører til enighed om, at et kemikalie er hormonforstyrrende og lige så bekymrende som for eksempel kræftfremkaldende stoffer (jf. Artikel 57(f) i REACH), kommer kemikaliet på en såkaldt kandidatliste. Når et stof er på kandidatlisten, er det leverandørens pligt at oplyse om indholdet af stoffet i produktet. ECHA vurderer jævnlige stofferne på kandidatlisten og prioriterer stoffer, der er af særlig bekymring for sundhed og/eller miljø, og de kommer på en autorisationsliste. Stoffer på autorisationslisten skal udfases, og der gives kun midlertidige tilladelser til specifik brug. Der arbejdes i øjeblikket på at lave kriterier for REACH, som minder om kriterierne for biocider og pesticider.

## ERGO forbedrer tests til identifikation af hormonforstyrrende stoffer

For at kunne identificere hormonforstyrrende kemikalier kræves det, som tidligere nævnt, at man har egnede tests til det. De nuværende test-guidelines, som er validerede af OECD og dermed accepteret af alle OECD's medlemslande, identificerer nogle effekter og virkninger, især for kemikalier, der påvirker kønshormonsystemet (hvor hormonerne er østrogener som  $17\beta$ -østradiol og androgener som testosteron). Imidlertid mangler mange andre virkningstyper stadigvæk tests.

Et eksempel er skjoldbruskkirtelhormonsystemet, hvor thyreoideahormoner (T4 og T3) er vigtige for blandt andet udviklingen af alle pattedyrs hjerne og senere for stofskiftet, og hos padder og fisk er thyreoideahormoner afgørende for især overgangen fra haletudse/fiskelarve til frø/fisk. Skjoldbruskkirtlens hormonsystem er stort set ens i pattedyr, fisk og padder [6], og det udnytter vi i ERGO, hvor vi blandt andet udvikler såkaldte biomarkører for effekter på skjoldbruskkirtelhormonsystemet i fisk. En af de lovende markører er oppustning af fisks svømmeblære, der er kontrolleret af thyreoideahormoner.

Selvom det lyder mærkværdigt, vil en manglende oppustning af svømmeblæren i en zebrafiskelarve efter eksponering for et kemikalie i mange tilfælde kunne forudsige effekter i mennesker af samme kemikalie. Desværre (af historiske grunde) er regulatoriske procedurer for farevurdering af kemikalier adskilt for menneskers sundhed (hvor man bruger pattedyr som gnavere) og for miljøet



**ERGO**

ERGO har modtaget en bevilling på 6 millioner euro fra Horizon 2020, Europa-Kommissionens støtteprogram til forskning under Grant Agreement nummer 825753 - ERGO. ERGO koordineres af lektor Henrik Holbech, Biologisk Institut, SDU og administreres af projektleder Helle Elisabeth Lyngborg, SDU og har 15 partnere fra EU og Japan. Projektet løber fra 2019 til midten af 2024. ERGO står for Endocrine Guideline Optimization, og bevillingen består af 45 millioner kroner fra EU og 7,5 millioner kroner fra industrielle partnere. Blandt samarbejdspartnerne er universiteter i Heidelberg, Antwerpen og Aarhus, den tyske miljøstyrelse, L'Oréal og BASF.

ERGO har sammen med de syv andre EU-støttede projekter lavet et klynge-samarbejde, et såkaldt "cluster", EURION, for at opnå synergi og undgå forskningsoverlap. EURION er den største EU-investering i bedre regulering af hormonforstyrrende stoffer med en samlet bevilling på cirka 375 millioner DKK.

(hvor man blandt andet bruger fisk og padder). Det betyder, at nyttige data fra tests med andre hvirveldyr end pattedyr hidtil er blevet ignoreret i human sundhedsforskning.

ERGO's hypotese er, at resultater fra forsøg med fisk og padder kan forudsige skadelige effekter på hormonsystemer i pattedyr og omvendt. Vi bruger zebrafisk, sporefrøer, mus og en række cellebaserede tests til at vise dette. Nye markører udvikles ved hjælp af avan-

cerede analysemetoder for ændringer i genekspression, proteinekspression og metabolisme (transcriptomics, proteomics, metabolomics). Målet er at udvikle og forbedre OECD-tests, både for at vi får en mere effektiv identifikation af hormonforstyrrende stoffer og dermed en bedre beskyttelse af forbrugere og miljø, og desuden for at vi med tiden mindsker brugen af forsøgsdyr.

For mere information besøg ERGO: <https://ergo-project.eu/about/project-overview/> eller EURION: <https://eurion-cluster.eu/>.

E-mail:  
Henrik Holbech: [hol@biology.sdu.dk](mailto:hol@biology.sdu.dk)

Referencer

1. IPCS (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
2. Skakkebaek et al., 2015. Male reproductive

- disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility *Physiol. Rev.*, 96 (2015), pp. 55-97, 10.1152/physrev.00017.2015.
3. Blanck et al., 2000. Age at menarche and tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyl. *Epidemiology* 11(6), 641-647.
4. Metcalfe et al., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(2), 297-308.
5. Matthiessen & Gibbs, 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(1), 37-43.
6. Holbech et al., 2020. ERGO: Breaking Down the Wall between Human Health and Environmental Testing of Endocrine Disruptors. *International journal of molecular sciences*, Vol 21, Issue 8. DOI: 10.3390/ijms21082954.
7. Vergauwen et al., 2015. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. *Chemosphere* 139: 9-17.

**Hormonforstyrrende stof - definition**

Et hormonforstyrrende stof er defineret som "Et udefra kommende stof, der ændrer den endokrine funktion og som konsekvens forårsager alvorlige skadevirkninger i organismen, dens afkom og/eller i (sub)populationer af organismen". Oversat fra WHO/IPCS 2002 [1].