



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och  
husdjursvetenskap

**Humana ångestdämpande  
läkemedel orsakar  
beteendeförändringar hos fisk**  
**Oxazepam's påverkan på fiskars beteende**  
**Human anxiolytic drugs cause behavioral  
changes in fish**  
Oxazepam's impact on fish behavior

*Cecilia Rebhan*

*Uppsala  
2019*



# Humana ångestdämpande läkemedel orsakar beteendeförändringar hos fisk

## Oxazepam's påverkan på fiskars beteende

### Human anxiolytic drugs cause behavioral changes in fish

#### Oxazepam's impact on fish behavior

*Cecilia Rebhan*

**Handledare:** *Johannes Pohl, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kursansvarig institution:** Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Kurskod:** EX0862

**Program/utbildning:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2019

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** oxazepam, beteende, fiskar, bensodiazepin(er)

**Key words:** oxazepam, behavior, fishes, benzodiazepine(s)



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning .....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	3
Oxazepam.....	3
<i>Verkningsmekanism</i> .....	3
<i>Användning</i> .....	4
<i>Oxazepam i vattenmiljön</i> .....	4
Ångest och rädsla hos fiskar .....	5
Oxazepams påverkan på fiskars beteende.....	6
<i>Aktivitet</i> .....	6
<i>Mod</i> .....	6
<i>Socialt beteende</i> .....	7
<i>Migration</i> .....	7
<i>Födointag</i> .....	7
<i>Sammanställning beteende</i> .....	8
Beteendeförändringar i fält .....	8
Diskussion.....	9
Konsekvenser av beteendeförändringarna för fiskar.....	9
Variation mellan fiskarter .....	10
Konsekvenser av beteendeförändringarna för ekosystem.....	10
Faktorer som kan påverka oxazepams effekt .....	11
Slutsats .....	12
Litteraturförteckning .....	13
Bildförteckning .....	14



## **SAMMANFATTNING**

Oxazepam är ett humant ångestdämpande läkemedel som tillhör gruppen bensodiazepiner. Det verkar genom att förstärka effekten av GABA som är hjärnans huvudsakliga inhiberande neurotransmittor. Studier har visat att fiskar kan känna ångest och att de svarar på bensodiazepiner. Fiskar kan exponeras för oxazepam då läkemedlet förekommer i utgående vatten från reningsverk och i floder, i varierande koncentrationer. Syftet med detta arbete är att sammanställa information om vilka koncentrationer av oxazepam som förekommer i akvatiska miljöer, vilka effekter läkemedlet kan ha på fiskars beteende och vilka konsekvenser beteendeförändringarna kan få för fiskar och ekosystem.

Den hittills högst uppmätta koncentrationen av oxazepam i utgående vatten från reningsverk är 1.8 µg/L. Oxazepam kan persistera i vatten i allt från 54 dagar och upp till 8 månader beroende på vilka förhållanden som råder i vattnet. I sediment kan oxazepam kvarstå betydligt längre. Oxazepam kan hos fiskar ge ökat mod, ökad aktivitet, minskat socialt beteende, snabbare migration, ökat födointag, ökad miljöpreferens till ”farligare miljöer” och ökat uppehållsområde. Den koncentration av oxazepam vid vilken man kan se förändringar av beteenden varierar mellan olika fiskarter. Gemensamt är dock att flera förändringar har observerats vid koncentrationer kring eller under 1.8 µg/L, dvs vid miljömässigt relevanta koncentrationer.

Beteendeförändringarna kan ge olika effekter för enskilda fiskar, men även för ekosystemen fiskarna lever i. Ökad risk för predation av rovdjur skulle kunna bedömas som den största faran flera av beteendeförändringarna kan komma att orsaka. För ekosystem kan beteendeförändringarna exempelvis leda till förändringar i näringskedjan eller förändringar i ”det rädslobaserade landskapet”, vilket är en modell som bygger på att djur utnyttjar sin miljö baserat på deras rädsla för predation. Förändringar av dessa två kan ge rubbningar i de ekosystem som fiskarna lever i.

Det är svårt att bedöma vilka effekter oxazepam har i naturliga vattenmiljöer då flera andra faktorer som temperatur, exponeringsväg och andra läkemedel i vattnet kan spela in. Fortsatt forskning bör ta hänsyn till att oxazepams effekt varierar i kombinationer av parametrarna beteendetyper, koncentration och fiskart. Även om man hos en fiskart inte kan påvisa någon förändring av ett visst beteende vid miljömässigt relevant koncentration av oxazepam kan inte en generell slutsats dras för alla fiskarter.

## SUMMARY

Oxazepam is a human anxiolytic drug in the group benzodiazepines. It works by amplifying the effect of GABA which is the main inhibitory transmitter in the brain. Studies have shown that fish can feel anxiety and that they respond to benzodiazepines. Fish can be exposed to oxazepam when the drug occurs in outgoing water from sewage treatment plants and in rivers, in varying concentrations. The purpose of this study is to compile information about which concentrations of oxazepam occur in aquatic environments, what effects the drug can have on fish behavior and how these behavioral changes affect fishes and ecosystems.

The highest concentration of oxazepam measured in sewage treatment water is 1.8 µg/L. Oxazepam can persist in water for up to 8 months depending on the conditions prevailing in the water and it can remain in sediment significantly longer. Oxazepam affect fish behavior and can cause increased boldness, increased activity, reduced social behavior, faster migration, increased feeding-rate, increased environmental preference for more dangerous environments and increased home-range. The concentration of oxazepam at which behavioral changes have been detected varies between fish species. However, several behavioral changes have been observed at environmentally relevant concentrations.

The behavioral changes could have different effects for individual fishes, but also for the ecosystems in which the fish live. Increased risk of predation could be considered the greatest danger that may be caused by several of the behavioral changes. For ecosystems the behavioral changes could lead to changes in the food-chain and changes in “The landscape of fear”, which is a model built on animals utilizing their environment based on their fear of predation. Changes in these two may cause imbalance in the ecosystems.

It is difficult to predict what effects oxazepam might have in natural aquatic environments as several factors such as temperature, exposure pathway and other drugs in the environment can potentially change the effects of oxazepam. Future research should consider that the effects of oxazepam vary in combinations of the different parameters: behavior type, concentration of oxazepam and fish species. Thus, even though there is no detectable change of a specific behavior at environmentally relevant concentrations in one fish species, a general conclusion cannot be drawn for all fish species.



## INLEDNING

Den 14 februari 2018 publicerades ett reportage i nyheterna på Sveriges television Västmanland. Inslaget handlade om abborrar och hur de påverkas av ångestdämpande läkemedel i vatten (SVT nyheter Västmanland, 2018). Detta problem hade redan uppdagats i ett antal reportage från 2013 efter att en svensk forskargrupp fått en artikel om ämnet publicerad i tidskriften Science (Åkerman, 2013). Forskargruppens artikel fokuserade på hur oxazepam påverkade abborrars beteende (Brodin *et al.*, 2013). Sedan dess har ett antal studier om oxazepams påverkan på fiskars beteende publicerats.

Oxazepam tillhör läkemedelsgruppen bensodiazepiner (INCB, 2017) och ordineras vid behandling av oro, ångest och sömnbesvär hos människor (FASS.se, 2018-11-08). Studier har kunnat visa att människor och fiskar delar de receptorer via vilka bensodiazepiner verkar (Gunnarsson *et al.*, 2008), samt att de system som receptorerna är delaktiga i har liknande effekter på ångestdämpning hos människor och fiskar. (Stewart *et al.*, 2011) Detta indikerar att humana ångestdämpande läkemedel potentiellt påverkar ångestdämpning hos fiskar när läkemedlen kommer ut i naturliga akvatiska miljöer.

Ett flertal studier har mätt oxazepams förekomst i utgående vatten från reningsverk och i vatten från floder. I en studie från 2013 återfanns oxazepam i 90% av samtliga vattenprover tagna på utgående vatten från 90 avloppsreningsverk runt om i Europa (Loos *et al.*, 2013). Detta innebär en hög risk för att fiskar blir exponerade för läkemedlet. År 2016 var Sverige ett av de länder med högst konsumtion av oxazepam i världen (INCB, 2017) och de koncentrationer av oxazepam i vattenmiljöer som hittills uppmätts i Sverige är bland de högre som uppmätts globalt sett.

Syftet med detta kandidatarbete är att undersöka vilka koncentrationer av oxazepam som förekommer i vattenmiljöer, vilka beteendeförändringar oxazepam kan ge upphov till hos fiskar och vilka konsekvenser beteendeförändringarna kan få för fiskar och ekosystemen fiskarna lever i.

## MATERIAL OCH METODER

Vid informationssökning har sökdatabaserna Web of Science och ASFA använts. Använda sökord är som följer:

- (Oxazepam OR benzodiazepine) AND (fish OR fishes) AND (behavio\*)
- Oxazepam AND (fish OR fishes) AND (behavio\*)
- Oxazepam AND (fish OR fishes)
- (Benzodiazepine OR oxazepam) pharmacology

Referenser från de studier som gåtts igenom har sedan använts för vidare läsning om ämnet.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Oxazepam

#### **Verkningsmekanism**

Oxazepam är ett humant ångestdämpande läkemedel som tillhör gruppen bensodiazepiner. Substansen är även en av de aktiva metaboliterna från diazepam, ett annat läkemedel inom

samma grupp (Chebib and Johnston, 2000). Bensodiazepiner verkar genom att öka effekten av GABA som är hjärnans huvudsakliga inhiberande neurotransmittor (Argyropoulos and Nutt, 1999).

GABA i sig verkar genom att binda till GABA<sub>A</sub>-receptorer (Argyropoulos and Nutt, 1999), vilket är receptorer på ligandstyrda kloridjon-kanaler (Johnston, 1996). När GABA binder till receptorn öppnas kloridkanalen vilket ger ökad inströmning av kloridjoner. Detta leder till hyperpolarisering av neuronet vilket försvårar aktionspotentialen och därmed ger en inhiberande effekt. (Johnston, 1996).

Oxazepam och andra bensodiazepiner är selektiva (Argyropoulos and Nutt, 1999) och binder till  $\gamma$ 2-subenheten på GABA<sub>A</sub>-receptorn (Pritchett *et al.*, 1989). Denna bindning förstärker effekten av GABAs bindning till receptorns aktiva säte. På så sätt fås en ökad inhiberande effekt på kommunikationen mellan neuronerna och därmed en lugnande effekt i hjärnan (Huerta *et al.*, 2016). När GABA<sub>A</sub>-receptorer stimuleras av bensodiazepiner sjunker alltså ångesten hos en individ (Argyropoulos and Nutt, 1999). GABA<sub>A</sub>-receptorer finns hos akvatiska vertebrater till vilka fisk räknas, (Gunnarsson *et al.*, 2008) och på zebrafisk har man kunnat visa att GABA-systemet hos fisk har liknande effekter på ångest som hos andra vertebrater, samt att fiskar svarar på bensodiazepiner (Stewart *et al.*, 2011).

### **Användning**

Bensodiazepiner har flera användningsområden. Oxazepam ordineras vid behandling av oro, ångest, rastlöshet och sömnbesvär (FASS.se, 2018-11-08), medan andra läkemedel inom gruppen som exempelvis diazepam även används vid epileptiska anfall, feberkramper och som lugnande medel vid mindre ingrepp (FASS.se, 2012-08-14). År 2016 var Sverige ett av de länder i världen som konsumerade mest oxazepam dels vad gällde total konsumtion, men även vad gällde mängden per 1000 invånare och dag. (INCB, 2017).

### **Oxazepam i vattenmiljön**

Oxazepams förekomst i vattenmiljön har mätts i ett flertal studier, både i utgående vatten från reningsverk och vatten i floder. År 2010 gjordes en studie i Europa där prover togs på det utgående vattnet från 90 avloppsreningsverk, i 18 länder. Resultatet visade att oxazepam förekom i 90% av vattenproverna, där den högsta koncentrationen som uppmättes var 1,8 µg/L (Loos *et al.*, 2013).

Det har estimerats att oxazepam i vatten har en halveringstid på 54 dagar i rumstemperatur och läkemedlet har klassificerats som måttligt persistent i akvatiska miljöer (Löffler *et al.*, 2005). En svensk studie visade att halveringstiden kan uppgå i 3–8 månader i vatten med låg temperatur (5 grader celsius) och som inte nås av solljus (Klaminder *et al.*, 2015). I samma studie påvisades även oxazepam i sediment från en sötvattensjö som kunde dateras tillbaka till 1970-talet, vilket indikerade att oxazepam kan persistera i akvatiska miljöer under flera årtionden (Klaminder *et al.*, 2015).

Resultat från ett flertal mätningar av koncentrationen oxazepam i utgående vatten från reningsverk och i floder redovisas i Tabell 1 och Tabell 2.

Tabell 1. Maxkoncentrationer av oxazepam uppmätta i utgående vatten från reningsverk

Land	Maxkoncentration	Referens
Tyskland	0.25 µg/L	Heberer, 2002
Tyskland	0.63 µg/L	Hummel <i>et al.</i> , 2006
Storbritannien	0.08 µg/L	Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011
Slovenien	0.13 µg/L	Kosjek <i>et al.</i> , 2012
Sverige (Fyrisån)	0.73 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2013

Tabell 2. Maxkoncentrationer av oxazepam uppmätta i floder

Land	Maxkoncentration	Referens
Storbritannien	0.017 µg/L	Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011
Slovenien	0.021 µg/L (före reningsverk) 0.031 µg/L (efter reningsverk)	Kosjek <i>et al.</i> , 2012
Tyskland	0.40 µg/L	Hummel <i>et al.</i> , 2006
Sverige (Fyrisån)	0.58 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2013
Sverige (Fyrisån)	0.009 µg/L (före reningsverk) 0.21 µg/L (efter reningsverk)	Klaminder <i>et al.</i> , 2015

## Ångest och rädsla hos fiskar

Genom att applicera modeller för att mäta ångest hos däggdjur på zebrafisk har man kunnat visa att fiskar liksom andra djur kan känna ångest (Maximino *et al.*, 2010). Att fiskar svarar på bensodiazepiner (Stewart *et al.*, 2011) är ytterligare ett bevis för detta. Hos zebrafisk har det också visats att fiskarna återhämtar sig bättre efter en obehaglig upplevelse samt att de visar tecken på mindre rädsla vid närvaro av fiskstim av samma art (Faustino *et al.*, 2017). Att simma i stim är ett socialt beteende hos fisk, där stimmen i sig hålls ihop av vad man kan kalla social attraktion (Peichel, 2004). Detta sociala beteende reducerar alltså rädsla hos fisk (Faustino *et al.*, 2017) samtidigt som det fungerar som skydd mot rovfiskar (Hager and Helfman, 1991).

Vissa studier visar på att det är möjligt att skilja mellan ångest, rädsla och panik baserat på det beteende ett djur uppvisar. Exempelvis är riskbedömningsbeteende, dvs beteende baserat på en potentiell risk eller fara förknippat med ångest, medan flykt och undvikande av direkt fara är förknippat med rädsla eller panik (Maximino *et al.*, 2010).

En modell för rädsla och ångest som kan appliceras på djur, inklusive fiskar, är "Det rädslobaserade landskapet" eller "The landscape of fear". Modellen bygger på att bytesdjur utnyttjar sitt landskap baserat på rädsla, dvs risken att dödas av rovdjur (Laundre *et al.*, 2010). Djuren håller sig mer i de delar av landskap som de upplever säkra och anpassar sitt beteende i olika delar av landskapet för att undvika fara (Laundre *et al.*, 2010). Förändringar i ett djurs rädslobaserade landskap, exempelvis att djuret börjar undvika ett visst område på grund av ökat hot från rovdjur, har visats påverka växter och djur i flera delar av det ekosystem djuret befinner sig i (Laundre *et al.*, 2010).

## Oxazepams påverkan på fiskars beteende

Då GABA<sub>A</sub>-receptorer finns hos akvatiska vertebrater (Gunnarsson *et al.*, 2008) är det rimligt att anta att läkemedel utvecklade för att ge ångestdämpande effekter hos människor kan komma att ha liknande effekter på djur. Dessa ångestdämpande effekter kan ge upphov till beteendeförändringar vilket är något som ett flertal studier har utrett. Några olika beteenden som studerats är aktivitet, mod, socialt beteende, migration och födointag.

Dessa beteenden mäts oftast genom att först utföra beteendetester utan oxazepam närvarande. Därefter exponeras två eller fler grupper för olika koncentrationer av oxazepam, varpå testerna repeteras och eventuella skillnader, ökning eller minskning, av beteendet observeras dels jämfört med före exponering och dels jämfört med en kontrollgrupp.

### Aktivitet

Aktivitet kan mätas i samband med studier av andra beteenden, såsom socialt beteende (Brodin *et al.*, 2013; Klaminder *et al.*, 2014; Brodin *et al.*, 2017) och bestäms oftast genom att mäta hur mycket en fisk simmar i ett tomt akvarium (Brodin *et al.*, 2013; Klaminder *et al.*, 2014; Brodin *et al.*, 2017; Sundin *et al.*, 2019). Resultat från studier på aktivitet redovisas i Tabell 3.

Tabell 3. Sammanställning av de koncentrationer som testats och de koncentrationer där skillnad i beteende kunnat observeras i studier som mätt oxazepams påverkan på aktivitet hos fiskar

Fisk	Testade koncentrationer	Koncentration(er) där skillnad observerats	Referens
Abborre	1.8 µg/L, 910 µg/L	1.8 µg/L, 910 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2013
Abborre	1.2 µg/L, 965 µg/L	1.2 µg/L, 965 µg/L	Klaminder <i>et al.</i> , 2014
Mört	0.84 µg/L, 280 µg/L	0.84 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2017
Lake	1.1 µg/L, 97.4 µg/L	97.4 µg/L	Sundin <i>et al.</i> , 2019

### Mod

Mod kan mätas genom olika typer av försök. Gemensamt för dessa är dock att man mäter hur mycket fisken vistas på en plats där den inte är skyddad. Detta kan göras med olika metoder:

- Fisken placeras i ett akvarium där ena halvan har vit botten och andra halvan svart botten (den senare upplevs som säkrare) och tiden fisken spenderar i den halvan av akvariet som har vit botten mäts. (Brodin *et al.*, 2017)
- Shelter seeking test: ett skydd placeras i ett annars tomt akvarium och tiden fisken spenderar utanför skyddet mäts. (Huerta *et al.*, 2016)
- Novel tank diving test: tiden fisken spenderar på olika nivåer i ett akvarium mäts (mycket tid spenderad på botten visar på rädsla hos fisken). (Huerta *et al.*, 2016)
- Fisken introduceras till ett tomt akvarium i ett skydd, vartefter en lucka i skyddet öppnas och tiden det tar innan fisken vågar sig ut mäts. (Brodin *et al.*, 2013). I vissa fall finns även andra skydd i akvariet (Klaminder *et al.*, 2014).

Resultat från studier på mod redovisas i Tabell 4.

Tabell 4. Sammanställning av de koncentrationer som testats och de koncentrationer där skillnad i beteende kunnat observeras i studier som mätt oxazepamns påverkan på mod hos fiskar

Fisk	Testade koncentrationer	Koncentration(er) där skillnad observerats	Referens
Abborre	1.8 µg/L, 910 µg/L	910 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2013
Abborre	1.2 µg/L, 965 µg/L	965 µg/L	Klaminder <i>et al.</i> , 2014
Knölskallelöja	0.8 µg/L, 4.7 µg/L och 30.6 µg/L	Novel tank diving test: 4.7 µg/L Shelter seeking test: 30.6 µg/L	Huerta <i>et al.</i> , 2016
Mört	0.84 µg/L, 280 µg/L	0.84 µg/L, 280 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2017

### Socialt beteende

Socialt beteende kan studeras genom ett tomt akvarium som delas på längden i tre delar med transparenta väggar, så att det i var ände fås två mindre utrymmen och ett större utrymme i mitten. Därefter placeras 3 fiskar av den art som används i studien i ett av de mindre utrymmena, varpå en ensam fisk placeras i det större utrymmet i mitten. Utrymmet i mitten delas visuellt upp i zoner i en gradskala med olika poäng för socialitet. Den zonspecifika socialitetsfaktorn multipliceras med tiden den ensamma fisken spenderat i just den zonen. Genom att addera samtliga värden fås ett värde för fiskens sociala beteende (Brodin *et al.*, 2013; Klaminder *et al.*, 2014; Brodin *et al.*, 2017). Resultat från studier på socialt beteende redovisas i tabell 5.

Tabell 5. Sammanställning av de koncentrationer som testats och de koncentrationer där skillnad i beteende kunnat observeras i studier som mätt oxazepamns påverkan på socialt beteende hos fiskar

Fisk	Testade koncentrationer	Koncentration(er) där skillnad observerats	Referens
Abborre	1.8 µg/L, 910 µg/L	1.8 µg/L, 910 µg/L	Brodin <i>et al.</i> , 2013
Abborre	1.2 µg/L, 965 µg/L	965 µg/L	Klaminder <i>et al.</i> , 2014
Mört	0.84 µg/L, 280 µg/L	-	Brodin <i>et al.</i> , 2017

### Migration

I en studie från 2016 utvärderades hur migration hos unga laxar påverkas av oxazepam både på labb och i fält. Migrationen hos djur är ofta förknippad med fara då de färdas genom okända och ofta riskfyllda miljöer. I studien exponerades laxar för oxazepam i vatten vid en koncentration av 1.9 µg/L. Både i labb- och fältstudien sågs en snabbare migration hos laxar som exponerats med oxazepam (Hellström *et al.*, 2016).

### Födointag

I en studie från 2013 studerades födointag hos abborrar genom att mäta hur lång tid det tog för en abborre att börja äta och hur snabbt den åt upp 20 zooplankton. I studien exponerades abborrarna för oxazepam vid koncentrationerna 1.8 µg/L och 910 µg/L och ökat födointag observerades vid båda koncentrationerna (Brodin *et al.*, 2013).

## Sammanställning beteende

Tabell 6. Sammanställning av de lägsta koncentrationer där skillnad i beteende observerats för respektive beteende

Beteende	Lägsta koncentration där skillnad observerats	Fisk	Referens
Aktivitet	0.84 µg/L	Mört	Brodin <i>et al.</i> , 2017
Mod	0.84 µg/L	Mört	Brodin <i>et al.</i> , 2017
Socialt beteende	1.8 µg/L	Abborre	Brodin <i>et al.</i> , 2013
Migration	1.9 µg/L	Lax	Hellström <i>et al.</i> , 2016
Födointag	1.8 µg/L	Abborre	Brodin <i>et al.</i> , 2013

## Beteendeförändringar i fält

En studie från 2016 undersökte huruvida de beteendeförändringar som observeras i labb stämmer med vad som sker i fält (Klaminder *et al.*, 2016). I studien exponerades abborrar för oxazepam vid koncentrationen 200 µg/L. Därefter utfördes först två beteendetester i labb där mod och aktivitet undersöktes. Resultatet visade att båda beteendena ökade hos de exponerade fiskarna. Efter labbstudien utfördes en fältstudie i en fiskfri sjö till vilken man tillsatte de exponerade och oexponerade abborrarna, samt 4 gäddor för att tillföra ett realistiskt hot. I fältstudien undersöktes mod och aktivitet igen, men även miljöpreferens och uppehållsområde. Upphållsområde är det område ett djur använder för att leta mat, partner och plats att föda upp sina ungar. (Laundre *et al.*, 2010). I överrensställning med studien i labbmiljö visade de exponerade fiskarna i fältstudien på ett ökat mod och en ökad aktivitet. Mod mättes i fältstudien som den distans abborren simmade från utsläppsplatsen. Majoriteten av kontrollgruppen stannade kvar vid den delen av sjön där de släppts ut medan de exponerade fiskarna rörde sig längre bort, se bild 1 (Klaminder *et al.*, 2016).

Resultatet från fältstudien visade även att de exponerade fiskarna vistades mer i den pelagiska zonen av sjön, jämfört med kontrollgruppen. Zonen definierades som den del som inte låg inom 10 meters avstånd från stranden. Den pelagiska zonen ansågs mer förknippad med fara då den saknade skydd för fiskarna. Exponerade fiskar hade även ett större uppehållsområde. I studien drogs slutsatsen att mätningar i labb stämmer överens med de förändringar som sker i fält (Klaminder *et al.*, 2016). Dock kunde studien inte dra någon slutsats om huruvida oxazepam påverkar predationsrisken för abborrarna, då ingen predation från gäddorna observerades (Klaminder *et al.*, 2016).

En teori om varför ökad predation från gäddorna inte kunde observeras är att abiotiska (dvs icke levande) faktorer i vattenmiljön påverkade resultatet (Saaristo *et al.*, 2019). En studie från 2019 undersökte huruvida vattnets temperatur eller närvaro av faktiskt hot påverkade effekterna av oxazepam. Resultatet visade att oxazepams effekt inte påverkades av någon av faktorerna, men att fiskarnas beteende gjorde det (Saaristo *et al.*, 2019). Detta indikerar att avsaknaden av predation från gäddorna kan ha berott på att de påverkades av abiotiska faktorer i vattenmiljön.

I studien från 2016 undersökte forskargruppen även hur snabbt oxazepam går ur fiskar i rent vatten med låg temperatur (Klaminder *et al.*, 2016). Detta för att avgöra när beteendeförändringar kunde väntas avta, så observeringstiden kunde begränsas därefter. Resultatet visade att koncentrationen oxazepam i fiskarna skulle sjunka så att beteendeförändringar inte borde ses efter 9 dagar. Mätning av beteendeförändringarna begränsades därför till fältstudiens första 9 dagar. En annan studie från 2019 undersökte hur snabbt oxazepam går ur fiskar i rent vatten och huruvida effekterna av oxazepam kan reverseras. Resultatet visade att beteendeförändringar hos fiskar exponerade för oxazepam vid både koncentrationen 1.1 µg/L och 100 µg/L, reverseras efter att fiskarna vistats ett antal dagar i rent vatten (Sundin *et al.*, 2019).

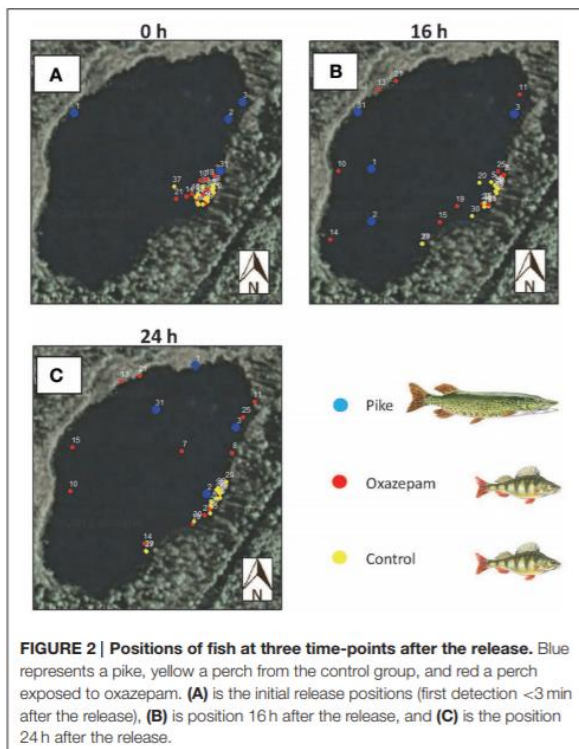


Bild 1: platsen fiskarna befann sig vid tre tidpunkter efter utsläpp (Klaminder *et al.*, 2016).

## DISKUSSION

De resultat som erhållits från beteendestudierna visar att oxazepam har påverkan på fiskars beteende, men att det verkar variera mellan fiskarter vad gäller vilket beteende som påverkas och vid vilken koncentration. Förändringar i något av de beteenden som redogjorts för kan ha konsekvenser dels för de enskilda fiskarna och för de ekosystem som fiskarna lever i.

### Konsekvenser av beteendeförändringarna för fiskar

Om vi först ser till de enskilda beteendena och vad förändringar av dessa kan innebära för enskilda fiskar, så kan många av dem ge ökad risk för predation. Ökat mod och ökad aktivitet gör det lättare för predatorer att upptäcka bytesfisken. Miljöpreferens för den pelagiska zonen där färre skydd finns, innebär att predatorer lättare kan upptäcka bytesfisken då den är mindre skyddad. Snabbare migration innebär att fiskarna är mindre försiktiga när de simmar till nya områden vilket gör de mer utsatta för predatorer. Ökat uppehållsområde kan innebära ökad risk att bytesfiskens uppehållsområde sammanfaller med en rovfisks, vilket därmed ökar risken för

predation. Vad gäller minskat socialt beteende kan detta innebära problem när fiskarna ska forma stim, som bygger på social attraktion mellan fiskarna. Stimbeteendet används som sagt som skydd mot rovfiskar, vilket innebär att ett antisocialt beteende kan, liksom tidigare beskrivna beteenden, innebära ökad risk för predation. Trots att ökad predation inte observerades i fältstudien från 2016 (Klaminder *et al.*, 2016) anser jag ändå att de beteendeförändringar läkemedlet ger kan ha den effekten. Liksom resultaten i studien från 2019 (Saaristo *et al.*, 2019) indikerade kan avsaknaden av predation från gäddorna i fältstudien berott på abiotiska faktorer i vattnet.

Även andra effekter kan komma av beteendeförändringarna. Ökat födointag kan innebära ökad tillväxt för individuella fiskar, vilket är en positiv effekt för de enskilda fiskarna. Dock kan detta innebära problem för ekosystemen (se nästa avsnitt). En minskning av socialt beteende kan ge problem vid fortplantning och problem med återhämtning efter obehagliga upplevelser. Då återhämtningen påverkas av att simma i stim och stimbeteendet påverkas av oxazepam kan återhämtningen antas bli ett problem hos exponerade fiskar. Oxazepam har dock en ångestdämpande effekt som i sig möjligtvis gör att stimbeteendet, som en del i ångestdämpning, inte blir lika nödvändigt.

De studier som gjorts för att mäta oxazepams påverkan på fiskars beteende är inte alltid relevanta i förhållande till verkligheten, då de koncentrationer som används ibland är högre än de koncentrationer som förekommer naturligt i vattenmiljöer. Om vi ser till de lägsta koncentrationer där beteendeförändringar observerats (Tabell 6) är det dock tydligt att de kan förekomma i naturliga miljöer, åtminstone hos vissa fiskarter. Detta är en slutsats jag anser rimlig att dra, då resultat från fältförsök hittills pekar på att beteendeförändringar som uppmäts på labb stämmer överens med vad som sker i fält. Jag anser att slutsatsen kan dras trots att fältförsöken är få.

### **Variation mellan fiskarter**

Resultaten från de beteendestudier som hittills gjorts visar att oxazepams effekt varierar beroende på kombinationen av de tre parametrarna art, koncentration och typ av beteende. Dels skiljer det sig vad gäller vid vilka koncentrationer ett visst beteende visar förändring, som för mod där mört visar förändrat beteende vid miljömässigt relevanta koncentrationer medan abborre visar förändrat beteende först vid väldigt höga koncentrationer (Tabell 4). Därtill skiljer det sig även vad gäller vilka beteenden som överhuvudtaget verkar påverkas av oxazepam, som för socialt beteende där det hittills inte kunnat påvisas att oxazepam påverkar beteendet hos mört, medan abborrar visar förändrat beteende vid en miljömässigt relevant koncentration (Tabell 5). Att inte se beteendeförändringar vid exponering av en viss koncentration oxazepam hos en fiskart innebär inte att den koncentrationen av oxazepam inte ger beteendeförändringar för andra fiskarter. Därför anser jag att forskning på flera olika arter är en viktig del för att vidare kartlägga hur oxazepam påverkar fiskars beteende.

### **Konsekvenser av beteendeförändringarna för ekosystem**

Förändringar av de enskilda beteendena kan ge konsekvenser för de exponerade fiskarna, men kan också komma att ha effekter på de ekosystem som fiskarna lever i. Hittills finns inga



egentliga studier som undersöker detta, vilket innebär att det i dagsläget främst går att spekulera om vilka effekter beteendeförändringarna kan ge på ekosystemnivå.

Ökat födointag har positiv effekt för de enskilda fiskarna, i och med ökad tillväxt, men för ekosystemet kan det leda till förändring av näringskedjan. Fiskens ökade födointag ger en minskning av fiskens föda, exempelvis zooplankton vilket i sin tur kan ge en ökning av zooplanktons föda, alger (Brodin *et al.*, 2013). Detta skulle kunna innebära en ökad risk för algbloomningar vilket kan ge ytterligare effekter på ekosystemet. Samtidigt kan exponerade fiskar löpa ökad risk för predation. Kombinationen av dessa förändringar, färre fiskar med högre födointag, kan möjligtvis balansera ut varandra så att ekosystemen inte påverkas i markant utsträckning. Med ökad predation finns dock även risken att en fiskart minskar drastiskt i antal eller i värsta fall försvinner helt från akvatiska miljöer där exponeringen av oxazepam är stor. Detta kan ge större skiften i ekosystem och näringskedjor i den miljön. Jag anser att det är en möjlig värsta konsekvens trots att det hittills som sagt inte visats att beteendeförändringarna ger upphov till ökad predation.

Då oxazepam påverkar ångest och rädsla kan förändringar av dessa innebära ett förändrat rädslobaserat landskap för fiskarna, där de börjar utnyttja områden av landskapet där de tidigare inte hållit till eller sällan varit i. Detta kan skapa ny konkurrens mellan arter eller resultera i att tillgången på föda förändras. Det har tidigare visats att en förändring av ett djurs rädslobaserade landskap förändrar flera delar av det ekosystem djuret lever i. Jag anser det därför rimligt att anta att både djur och växter, i det ekosystem fisken vistas, kan påverkas om fiskens rädslobaserade landskap förändras till följd av oxazepam-exponering.

### **Faktorer som kan påverka oxazepams effekt**

Vid vidare utredning av vilka effekter oxazepam kan ha i naturliga akvatiska miljöer bör hänsyn tas till att andra faktorer kan spela in. Detta har inte studerats i så stor utsträckning, men några studier har gjorts på olika aspekter.

- Påverkas oxazepams effekt av temperaturen på vattnet eller av närvaro av faktiskt hot (Saaristo *et al.*, 2019). Då båda dessa faktorer visades påverka fiskarnas beteende är det möjligt att de kan påverka de ekosystemeffekter som oxazepam kan ha.
- Är det skillnad i ackumulering hos fisken beroende på om de får i sig oxazepam från vatten eller från föda (Brodin *et al.*, 2014).
- Hur ackumuleras oxazepam i fiskar, det vill säga vilka vävnadskoncentrationer av oxazepam förekommer (Huerta *et al.*, 2016; Hellström *et al.*, 2016; Brodin *et al.*, 2017).
- Kan effekterna av oxazepam reverseras i rent vatten och hur snabbt går oxazepam ur fiskarna i rent vatten (Sundin *et al.*, 2019). Då resultatet var att effekterna reverserades indikerar det att beteendeförändringarna inte är permanenta.

Studier på dessa ämnen är få, vilket gör att det saknas tillräckligt statistiskt underlag för att dra säkra slutsatser. Dock ger de en indikation på möjliga faktorer som kan påverka oxazepams effekter i naturliga akvatiska miljöer. Hänsyn måste även tas till att andra arter kan påverkas av oxazepam. Detta är inte något jag har undersökt, men det kan ändå vara en del av hotbilden. Det finns därmed en risk att beteendeförändringar hos flera arter ger förändringar som är mer komplexa än vad som kan undersökas på labb. Att ha i åtanke är även den tid

oxazepam kan persistera i vatten och särskilt i sediment. Även om effekterna i de individuella fiskarna inte är permanenta och även om det blir möjligt att rensa bort oxazepam i reningsverken, så persisterar effekterna från tidigare utsläpp i akvatiska miljöer i allt från dagar till potentiellt år framöver.

Ytterligare en faktor som bör tas i beaktande är andra läkemedel som kan finnas i vattenmiljön. Detta är något som de flesta studier berört ytligt, men som jag tycker är viktig att ha i åtanke. Effekterna av oxazepam kan förändras när andra ångestdämpande läkemedel är inblandade. Med exempelvis två bensodiazepiner som oxazepam och diazepam i vattenmiljön kan det bli en förstärkt påverkan på fiskarnas beteende, dvs en additiv effekt. Min uppfattning är därför att det som man hittills kunnat visa vid exponering av endast oxazepam är mer av ett minimum för vilka förändringar som kan ske i akvatiska miljöer i dagsläget.

## **SLUTSATS**

Oxazepam påverkar fiskars beteende vid vissa koncentrationer. Vilken effekt som fås beror på en kombination av koncentration, beteendetyper och art. Det innebär att forskning inom ämnet på bara en fiskart inte är tillräckligt för att dra generella slutsatser om oxazepams påverkan. Utifrån de studier som genomförts och som studerats i denna rapport är det svårt att bedöma vilka effekter beteendeförändringarna kan få på fiskar i naturliga miljöer och på ekosystemnivå. Vi kan här främst spekulera om vad det kan ha för effekter i nuläget, men att oxazepam påverkar enskilda fiskar och därigenom kan påverka ekosystem anser jag är en rimlig slutsats att dra. I framtiden behövs mer forskning, på flera olika arter och utifrån kombinationen av ovan nämnda parametrar för att bättre försöka förstå vid vilka koncentrationer oxazepam påverkar fiskars beteende, samt de generella effekterna. Vidare bedömer jag att det är viktigt att undersöka andra faktorer i miljöerna som eventuellt kan förstärka eller förlänga oxazepams påverkan.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Argyropoulos, S. V. & Nutt, D. J. (1999). The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. *European Neuropsychopharmacology*, sid. 6.
- Baker, D. R. & Kasprzyk-Hordern, B. (2011). Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218(12): 1620–1631.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M. & Klaminder, J. (2013). Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science*, 339(6121): 814–815.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M. & Jonsson, M. (2014). Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 369(1656). doi: 10.1098/rstb.2013.0580. [2019-02-23].
- Brodin, T., Nordling, J., Lagesson, A., Klaminder, J., Hellström, G., Christensen, B. & Fick, J. (2017). Environmental relevant levels of a benzodiazepine (oxazepam) alters important behavioral traits in a common planktivorous fish, (*Rutilus rutilus*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(16–18): 963–970.
- Chebib, M. & Johnston, G. A. R. (2000). GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(8): 1427–1447.
- FASS.se Vårdpersonal (2012-08-14). *Diazepam Desitin*. Tillgänglig: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=19960927000126> [2019-03-11].
- FASS.se Vårdpersonal (2018-11-08). *Oxascand*. Tillgänglig: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=19900202000113> [2019-03-11].
- Faustino, A. I., Tacão-Monteiro, A. & Oliveira, R. F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/srep44329. [2019-02-25].
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O. & Larsson, D. G. J. (2008). Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environmental Science & Technology*, 42(15): 5807–5813.
- Hager, M. C. & Helfman, G. S. (1991). Safety in numbers: shoal size choice by minnows under predatory threat. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29(4): 271–276.
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3–4): 175–189.
- Hellström, G., Klaminder, J., Finn, F., Persson, L., Alanärä, A., Jonsson, M., Fick, J. & Brodin, T. (2016). GABAergic anxiolytic drug in water increases migration behaviour in salmon. *Nature Communications*, 7(1). doi: 10.1038/ncomms13460. [2019-02-22].
- Huerta, B., Margiotta-Casaluci, L., Rodríguez-Mozaz, S., Scholze, M., Winter, M. J., Barceló, D. & Sumpter, J. P. (2016). Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(11): 2782–2790.
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G. & Ternes, T. A. (2006). Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 40(23): 7321–7328.
- International narcotics control board (INCB), (2018). *Psychotropic Substances 2017, Statistics for 2016 - Assessments of Annual Medical and Scientific Requirements for Substances in Schedules II, III and IV of the Convention on Psychotropic Substances of 1971*. United Nations, New York
- Johnston, G. A. R. (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 69(3): 173–198.
- Klaminder, J., Jonsson, M., Fick, J., Sundelin, A. & Brodin, T. (2014). The conceptual imperfection of aquatic risk assessment tests: highlighting the need for tests designed to detect

- therapeutic effects of pharmaceutical contaminants. *Environmental Research Letters*, 9(8): 084003.
- Klaminder, J., Brodin, T., Sundelin, A., Anderson, N. J., Fahlman, J., Jonsson, M. & Fick, J. (2015). Long-Term Persistence of an Anxiolytic Drug (Oxazepam) in a Large Freshwater Lake. *Environmental Science & Technology*, 49(17): 10406–10412.
- Klaminder, J., Hellström, G., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., Lagesson, A., Bergman, E. & Brodin, T. (2016). Drug-Induced Behavioral Changes: Using Laboratory Observations to Predict Field Observations. *Frontiers in Environmental Science*. 4. doi: 10.3389/fenvs.2016.00081. [2019-02-22].
- Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Zanoški Hren, M., Landeka Dragičević, T., Žigon, D., Kompare, B. & Heath, E. (2012). Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Research*, 46(2): 355–368.
- Laundre, J. W., Hernandez, L. & Ripple, W. J. (2010). The Landscape of Fear: Ecological Implications of Being Afraid, *The Open Ecology Journal*, 3(3): 1–7.
- Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R. H., Schwesig, D. & Gawlik, B. M. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, 47(17): 6475–6487.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M. & Ternes, T. A. (2005). Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science & Technology*, 39(14): 5209–5218.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S. & Gouveia, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, 214(2): 157–171.
- Peichel, C. L. (2004). Social Behavior: How Do Fish Find Their Shoal Mate? *Current Biology*, 14(13): R503–R504.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R. & Seeburg, P. H. (1989). Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338(6216): 582–585.
- Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M. G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C. P., Wong, B. B. M. & Brodin, T. (2019). Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment. *Science of The Total Environment*, 655: 1311–1320.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., Carlos, D., Chang, K., Hook, M., Rhymes, C., Caffery, M., Greenberg, M., Zadina, J. & Kalueff, A. V. (2011). Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6):1421–1431.
- Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J. & Brodin, T. (2019). Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Science of The Total Environment*, 665: 390–399.
- Sveriges television nyheter Västmanland* (2018). Läkemedelsrester rubbar fiskens beteende. [TV-repportage]. Sigurjonsson, K. & Sveriges Television, SVT, 14 september.
- Åkerman, M. (2013). Fiskar blir modiga och glupska av läkemedelsrester. *Svenska Dagbladet*, 15 februari.

## BILDFÖRTECKNING

Bild 1: Används med tillstånd av Jonatan Klaminder. Tillstånd mottaget via mail 2019-02-25.