

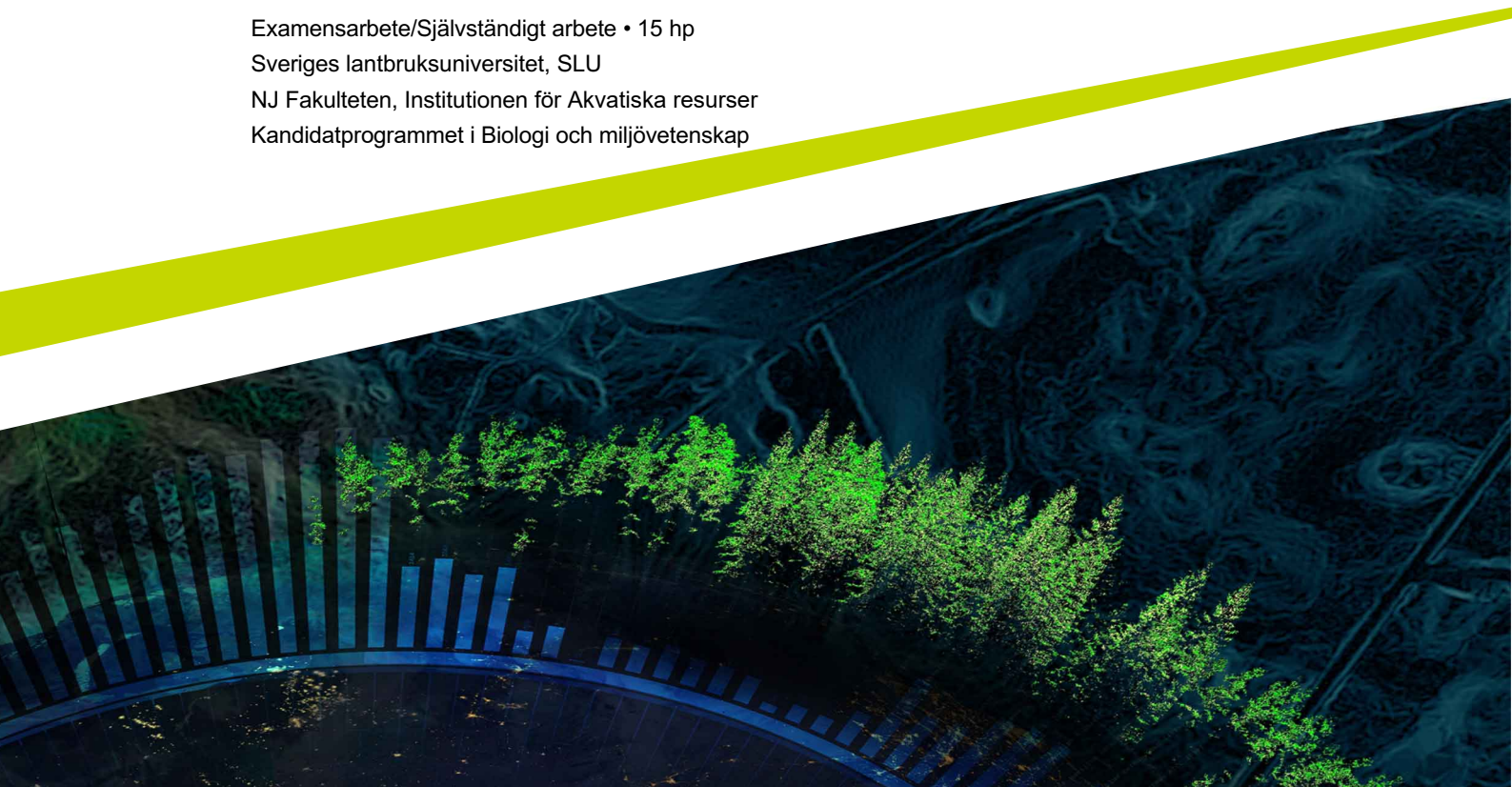


Gabapentins påverkan på fiskars beteende

Effekter på beteendemedelvärde och fiskarnas personlighet

Maja Ottander

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
NJ Fakulteten, Institutionen för Akvatiska resurser
Kandidatprogrammet i Biologi och miljövetenskap



Gabapentins påverkan på fiskars beteende. Effekter på beteendemedelvärde och fiskars personlighet

Impact of Gabapentin on fish behavior. Effects on behavioral mean and fish personality.

Maja Ottander

Handledare:	Erin McCallum, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för vilt, fisk och miljö
Bitr. handledare:	Amelia Munson, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för vilt, fisk och miljö
Bitr. handledare:	Marcus Michelangeli, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för vilt, fisk och miljö
Examinator:	Josefin Sundin, Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för akvatiska resurser

Omfattning:	15 hp
Nivå och fördjupning:	Grundnivå, G2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i Biologi
Kurskod:	EX0894
Program/utbildning:	Biologi och miljövetenskap
Kursansvarig inst.:	Institutionen för akvatiska resurser
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2024
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	Gabapentin, Salmo trutta, beteende, personlighet, förorening

Sveriges lantbruksuniversitet

NJ fakulteten

Institutionen för akvatiska resurser

Sammanfattning

”Aktiva farmaceutiska substanser” (AFS) är ett växande problem. AFS:er sprids till naturen under hela medicinens livscykel där de kan mätas i vattenmiljöer och bioackumuleras i organismer. Fiskars beteenden kan påverkas av AFS:er då de, liksom andra ryggradsdjur, delar biologiska verkningsvägar med oss människor. I ekotoxikologiska studier saknas forskning som undersöker AFS:ers påverkan på personlighet. Ett brett spektrum av personligheter ökar populationens förmåga att anpassa sig till förändringar i miljön. Syftet med denna studie är att undersöka medicinen Gabapentins effekt på fiskars beteende. Trots att Gabapentin är en av de vanligast förekommande AFS:erna i ytvatten globalt har lite forskning gjorts på dess effekt på fiskars beteende. I denna studie mäts exponering av Gabapentins påverkan på hur fiskarnas aktivitet och deras användning av skydd före och efter två veckors exponering. Även exponeringens påverkan på personlighet bedöms genom att mäta beteendesvaren hos varje fisk tre gånger både före och efter exponeringen. Vi hittade att kontrollfiskarna aklimatiserade sig till testakvariet genom att efter exponeringsperioden ha lägre aktivitet och spendera mer tid i skydd jämfört med innan exponeringsperioden (trots att kontrollfiskarna inte exponerades för någon medicin). De Gabapentin-exponerade fiskarna aklimatiserade sig däremot inte, då de inte visade någon skillnad i nyttjande av skydd före och efter exponeringen och endast viss indikation på minskad aktivitet. Analysen av deras nyttjande av skydd, gav viss indikation att tiden fiskarna spenderade i testakvariet var avgörande för mer utpräglade personligheter, men att Gabapentin-exponeringen inte hade någon effekt. Både kontrollfiskarna och de exponerade fiskarna var mer konsistenta i sina beteenden. Det är viktigt att förstå vilka effekter AFS:er har på beteenden hos akvatiska organismer då det kan leda till kaskadeffekter i ekosystemet.

Nyckelord: Gabapentin, Salmo trutta, beteende, personlighet, föroreningar.

Abstract

”Active pharmaceutical ingredients” (APIs) in aquatic systems are a growing concern. APIs are released into the environment throughout the entire life cycle of medicines where they can be measured in aquatic ecosystems and bioaccumulate in organisms. The behavior of fish can be affected by APIs since fish, like other vertebrates, share biological pathways with humans. In ecotoxicological studies, there is a need for research investigating APIs effect on animal personality. A wide range of animal personalities increases the ability of populations to adapt to changes in the environment. The aim of this study is to investigate the effect of the drug Gabapentin on fish behavior. Despite being one of the most frequently found APIs in surface waters worldwide, limited research has been done on its effect on fish behavior. In this study, the impact of Gabapentin exposure on fish activity and use of shelter is measured before and after a 2-week exposure period. The impact of exposure on personality was also assessed by measuring the behavioral responses of each fish three times both before and after exposure. We found that the control fish acclimatized to the test aquarium by being less active and spending more time in shelter after the exposure period compared to before the exposure period (although control fish received no exposure). In contrast, the Gabapentin-exposed fish showed no difference in shelter utilization before and after exposure and only slightly reduced their movement frequency, suggesting a decrease in their acclimatization. The analysis of their use of shelter gave some

indication that the time the fish spent in the test aquarium determined a more pronounced personality, but that Gabapentin did not have an effect. Both the control and the exposed fish were more consistent in their behavior after the exposure period. It is important to understand the impact of pollutants on aquatic organisms behavior as it can lead to cascading effects on the ecosystem.

Keywords: Gabapentin, Salmo trutta, behaviour, repeatability, pollution.

Innehållsförteckning

1. Introduktion.....	6
2. Material och metod.....	9
2.1 Insamling, märkning och hushållning av fiskar	9
2.2 Inspelning av beteenden	10
2.3 Gabapentin exponering	10
2.4 Beteendeanalys.....	11
2.5 Statistisk analys.....	11
2.5.1 Studiegruppens beteende	11
2.5.2 Personlighet	12
3. Resultat	13
3.1 Studiegruppens beteende	13
3.2 Personlighet.....	15
4. Diskussion	16
4.1 Studiegruppens beteende	16
4.2 Personlighet.....	17
4.3 Sammanfattning	18
Referenser.....	19
Tack	22

1. Introduktion

Läkemedel i akvatiska system är ett växande problem. ”Aktiva farmaceutiska substanser” (AFS) har hittats i ytvatten på alla kontinenter världen över, med varierad sammansättning och koncentration (Wilkinson et al. 2022). AFS:er sprids till naturen under hela medicinens livscykel. Genom allt från olyckor och utlopp under tillverkning och transport, till användandet och bortskaffandet av medicinen (Díaz-Cruz & Barceló 2004 i Gunther et al. 2010) samt genom avrinning från jordbruksmark där avloppsslam använts som gödsel (Ammar et al. 2021). Den största utsläppskällan sker dock från reningsverken. Efter förtäring bryts inte AFS:er ner fullständigt av kroppen utan de och deras metaboliter utsöndras och renas därefter inte helt i reningsverken (Gunther et al. 2010). Därifrån tar de sig ut i naturliga ekosystem där de kan mätas i vattenmiljöer och bioackumuleras i organismer (Cervený et al. 2021).

AFS:er har sedan ekologiska effekter när de kommer ut i naturen. Akvatiska organismer, framförallt ryggradsdjur som amfibier och fiskar, har liknande biologiska verkningsvägar och läkemedelsmål som människor, såsom receptorer och enzym (Fent et al. 2006; Gunnarsson et al. 2008). Läkemedelsmålen har bevarats evolutionärt men kan antingen bevarats i liknande målceller och vävnader mellan olika taxonomiska grupper, eller förekomma i andra celler och vävnader (Fent et al. 2006). Detta innebär att effekterna av AFS:er kan variera beroende på taxonomisk grupp.

Många läkemedel är dessutom särskilt utformade för att förändra människors beteende, exempelvis antidepressiva och antipsykotiska medel. Därför är det inte så överraskande att många studier visar att fiskars beteenden påverkas av närvaro av AFS:er i vattnet (Brodin et al. 2013; Polverino et al. 2021; Saaristo et al. 2018). Det kan handla om beteenden som är avgörande för individens överlevnad och reproduktion, som aggressivitet och parningsbeteende (Réale et al. 2007; Saaristo et al. 2018; Ford et al. 2021). Förändringar i sådana beteenden kan ha avgörande effekter på abundansen av en art vilket också kan ha indirekta effekter på andra trofinivåer i ekosystem (Saaristo et al. 2018). Majoriteten av ekotoxikologiska studier har fokuserat på genomsnittliga förändringar av studerade djurs beteenden, medan mindre forskning undersökt huruvida individer av samma art påverkas

olika, (Saaristo et al. 2018) samt om variationen individer emellan dämpas (Wong et al. 2005 i Polverino et al. 2021).

Individuell variation är viktigt för livskraftiga populationer. Det har länge varit känt att artdiversitet leder till mer stabila och motståndskraftiga ekosystem (MacArthur 1955), ett samband som fått begreppet portfolioeffekten (Figge 2004). På senare tid har det kommit en ökad insikt att individuell variation inom en art leder till samma portfolioeffekt på populationer (Carlson & Satterthwaite 2011). Ett brett spektrum av personligheter minskar utdöenderisken och ökar populationens förmåga att anpassa sig till förändringar i klimat och miljö (Polverino et al. 2021). Detta beror på att det finns fler varierande fenotyper i populationen, vilket innebär att vissa kan hantera snabba förändringar, även om andra inte kan det. Vid låg variation är det mer sannolikt att en stressfaktor som allvarligt påverkar den specifika fenotypen slår ut hela populationen (Wolf & Weissing 2012). Stor variation på personlighet bidrar även till snabbare tillväxttakt, högre bärkapacitet och mindre fluktuation i populationsstorlek vilket också bidrar till att minska utdöenderisken (Wolf & Weissing 2012). Hos vilda laxfiskpopulationer har fördelaktigheten av rik personlighetsvariation studerats. Carlson & Satterthwaite (2011) fann i deras studie att ökad individuell variation hos kungslax (*Oncorhynchus tshawytscha*) ledde till större populationstillväxt och mindre temporal variation i populationsstorlek. Likaså visade Schindler et al. (2010) studie att ökad variation i beteende hos indianlax (*Oncorhynchus nerka*) ledde till jämnare populationsstorlek hos återvändande laxar varje år.

Syftet med den här studien är att undersöka medicinen Gabapentins effekt på fiskars beteenden, både effekten på studiegruppen som helhet och skillnader i effekter på individer. Ett-åriga öringar (*Salmo trutta*) – en modell organism för naturvårdsstudier (Frank et al. 2011) inklusive ekotoxikologiska beteendestudier (Schwarz et al. 2017; Ziegler et al. 2021) kommer studeras. De har visats känsliga mot förorening (Schwarz et al. 2017) och har stor ekologisk betydelse på flera kontinenter (Klemetsen et al. 2003).

Gabapentin är en antiepileptisk medicin (Salahinejad et al., 2023). Wilkinson et al. (2022) undersökte förekomsten av 61 olika AFS:er i ytvatten globalt och fann att Gabapentin var den fjärde mest frekvent förekommande AFS:en, med en förekomst på 40 %, samt den AFS de fann i sjunde högst koncentration. Trots att det är en av de vanligast förekommande AFS:erna i ytvatten globalt har lite forskning gjorts på dess effekt på fiskars beteende (Li et al. 2018; Salahinejad et al. 2023). Gabapentins verkningsmekanism är dessutom annorlunda från de två mest studerade epilepsiläkemedlen, Diazepam och Karbamazepine, (Salahinejad et al., 2023) vilket ökar osissheten om vilka effekter som kan förväntas påvisas hos akvatiska organismer. Gabapentins huvudsakliga verkningsmekanism är att

den inhiberar högspänningsaktiverade kalciumkanaler, vilket leder till att färre nervsignaler skickas, det ger en sederande effekt på fysiologi och beteende (Sills 2006).

I denna studie mäts exponering av Gabapentins påverkan på hur långt fiskarna simmar (deras aktivitet) och användning av skydd före och efter exponeringen. Detta är två beteenden som visats vara avgörande för organismers överlevnad och reproduktionsframgång (Réale et al. 2007). Även effekten exponeringen har på personlighet bedöms genom att mäta beteendesvaren hos varje fisk tre gånger både före och efter exponeringen. Mina hypoteser är att Gabapentin i vattnet antingen kommer göra fiskarna 1) mindre aktiva och mer benägna att gömma sig på grund av medicinens sederande effekt. Samtidigt hittade Li m. fl (2018) i deras studie, när de undersökte Gabapentins påverkan på aktiviteten hos zebrafiskar i larvstadiet, en ökad aktivitet hos larverna vid den högsta koncentration 100 µg/L, vilket kan tyda på att fiskarna i stället kommer bli 2) mer aktiva av Gabapentin, vilket också bidrar till lägre nyttjande av skydd. Detta skulle också kunna förklaras med att Gabapentins sederande effekt gör fiskarna mindre oroliga för predation i öppet vatten. Jag förväntar mig även att 3) Gabapentin homogeniserar individernas beteende, alltså att skillnaden mellan deras individuella personligheter minskar.

2. Material och metod

2.1 Insamling, märkning och hushållning av fiskar

Uppfödda öringar (*Salmo trutta*) i storlekar från 6,7 till 9,9 cm hämtades från Lycksele Fiskodling i februari 2024 och transporterades till Sveriges Lantbruksuniversitet i Umeå där de aklimatiserades i ett 10 gradigt, c.1000 L akvarie med luftat genomflöde i en vecka. Akvariet var fyllt med ickeklorerat Svenskt grundvatten och inrett med tre artificiella växter i teracottakrukor som skydd. Fotoperioden var 12L:12D, alltså 12 timmar ljus följt av 12 timmar mörkt, och fiskarna matades med komersiellöringmat från fiskodlingen en gång per dag under hela experimentet. Ett flödesschema över metoden illustreras i figur 1.

Efter aklimatiseringen bedövades fiskarna i 150 mg/liter buffrad trikainmetansulfonat (MS-222), ett anestesimedel för fiskar som på grund av sina sura egenskaper måste buffras till neutralt pH för att inte vara skadligt för fiskarna. Under bedövningen noterades fiskarnas vikt och längd. De slumpades även i 10 grupper med fyra fiskar i varje. Därefter märktes de med två elastomer taggar från Northwest Marine Technologies, ena vid stjärten och andra på käkens högersida. Elastomer taggar är flytande färgimplantat som stelnar till en böjlig sustans efter injection och används för märkning av djur i olika taxonomiska grupper, däribland fiskar. Varje fisk i grupperna markerades med blå, orange, rosa eller gul färg för att ge en unik identitet till varje fisk.

Fiskarnas återhämtning övervakades i luftade hinkar innan de förflyttades till 10 stycken, 43 L (50 x 27 x 32 cm) akvarium. En grupp med fyra fiskar per akvarium. Akvarierna var fyllda med 30 L, 10 gradigt vatten, inredda med 3 artificiella plantor, ett PVC rör och en syresten. Akvarierna var förvarade i ett 12 gradigt klimatrum för att bibehålla vattentemperaturen. Där fick fiskarna återhämta och aklimatisera sig i 7 dagar. Hälften av akvarierna huserade kontrollgruppen och andra hälften exponeringsgruppen. Vilka akvarier som skulle husera vilken grupp slumpades. De två grupperna (kontroll och exponerad) förvarades på åtskilda hyllor för att minska risken för korskontaminering. Två tredjedelar av vattnet i akvarierna byttes ut var tredje dag.

2.2 Inspelning av beteenden

Beteendet hos varje fisk mättes totalt 6 gånger. Tre gånger innan exponeringsperioden och tre gånger efter 2 veckors exponeringsperiod. Inför mätningen fördes alla fiskar i ett akvarium över en och en till fyra vitmålade akvarium med dimensionerna 30 x 49 x 26 cm, även de med 10 gradigt vatten i samma 12 gradiga klimatrums. Längst ena kortsidan av akvarierna stod tre artificiella växter fästa med akvarieanpassat silikon. Belysningen bestod av två Godox SL60W LED lampor som lös underifrån för att undvika spegling på vattenytan. Varje akvarium filmades ovanifrån med varsin GoPro kamera (Hero 8 och Hero 10) under c. 22 minuter. Under de första 5 minuterna utfördes vattenbyte i fiskarnas hemsakvarier eftersom fiskarna då var borta, det för att minska stressen av vattenbytet. Fiskarna fördes sedan tillbaka till sina hemakvarier.

En tredjedel av fiskarna filmades varje dag och varje fisk filmades därför var tredje dag. Fiskarna filmades mellan 9.00 och 13.00 på förmiddagen. Vilken grupp som började varje dag varierade för att fördela ordningen över grupperna. Då detta var en del av en större studie, där varje fisk filmades 4 gånger innan och efter exponeringsperioden, pågick första filmningarna i 12 dagar. Omfattningen på detta kandidatarbete gjorde det dock endast möjligt att analysera tre tester före och tre tester efter exponeringsperioden. Vattnet i testakvarierna byttes varje morgon och sedan till 30 % mellan varje test.

Efter 12 dagars filmning tillsattes Gabapentin till exponeringsgruppernas hemakvarium (se nedan) i två veckor innan mätningarna upprepades. Fiskarna filmades på samma sätt i de vitmålade testakvarierna, varje individ filmades återigen 3 gånger, en gång var tredje dag. Alla experiment utfördes under etiska tillståndet DNR A5-2023. Vattenprover från både kontroll och exponerade akvarier samlades och frystes för att mäta och verifiera koncentrationen av Gabapentin senare. Vattenproverna analyserades dock inte heller i det här kandidatarbetet.

2.3 Gabapentin exponering

Fiskarna i exponeringsgruppen exponerades för 2 mg/L Gabapentin i två veckors tid samt under de 12 dagar då beteende testerna utfördes. Gabapentin (Merck, CAS ID:601 142-96-3) löstes upp i ultrarent vatten renat med UV lampor i ett Mili-Q Gradient vatten system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) för att tillhandahålla en koncentrerad stamlösning som spädes i exponeringsgruppernas husakvarier. Var tredje dag fylldes stamlösningen på av ultrarent vatten som

återdoserades med Gabapentin. Kontrollfiskarna exponerades inte för någon medicin.

2.4 Beteendeanalys

För denna uppsats analyserades en delmängd av de videor som samlats in från ett större experiment (N = 43 individer, N = 221 videor). För analysen användes programmet EthoVison XT version 16. 10 minuter av varje video analyserades. De första 11 minuterna av filmerna, då vattenbytet skedde och tiden då fisken vande sig vid det nya akvariumet, klipptes bort. Likaså den avslutande minuten, för att säkerställa att samma mängd data fanns tillgänglig för alla fiskar. Fisken spårades i majoriteten av akvariet förutom kortsidan med växtligheten. Detta för att underlätta spårandet för EthoVision. På så sätt delades akvariet upp i två zoner utan att programmet behövde tracka fisken i den visuellt förvirrande växtligheten. EthoVision granskade videorna och utdatat av varje video inspekterade jag visuellt för att hitta och korrigera fel där det behövdes. Två responsevariabler exporterades, "simmad längd" (totala längden (cm) fisken simmade i den öppna delen av akvariet) och "tid i arena" (totala tiden (sekunder) fisken befann sig i akvariets öppna del).

2.5 Statistisk analys

Den statistiska analysen utfördes med R version 4.0.0. och paketen *ggplot2*, *lmerTest*, *emmeans*, *rptR*. Genom responsvariabeln "tid i arena" beräknades tiden fiskarna spenderat i växtligheten, också kallat deras nyttjande av skydd. Fiskarnas simmade längd visade deras aktivitet. Alla statistiska analyser genomfördes sedan på båda responsvariablerna "simmad längd" (fiskarnas aktivitet) och "nyttjande av skydd" (totala tiden (sekunder) fiskarna befann sig i växtligheten).

2.5.1 Studiegruppens beteende

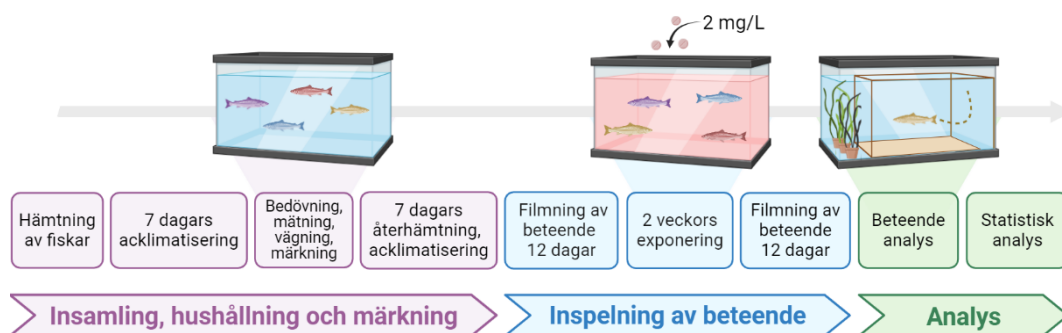
För att undersöka effekten av interaktionen mellan behandling och tidsperiod på beteende genomfördes en linear mixed model-analys där interaktionen mellan behandling och tidsperiod hanterades som fasta effekter. För att analysen skulle beakta andra potentiella faktorer på beteendet som inte enbart beror på Gabapentin-exponering inkluderades fiskarnas vikt, identitet och hemakvarium i modellen. Fiskarnas identitet och hemakvarium hanterades som slump effekter. Vikten hanterades som en fast effekt. Eftersom numeriska värden hanteras lika oavsett om de tilldelas fasta eller slump effekter påverkade detta val inte analysens

resultat. Fiskarnas hemakvarium beaktades eftersom fiskarnas beteende kan ha påverkats av de andra fiskarna som huserats i samma hemakvarium. Exempelvis, om en fisk varit aggressiv kan det ha påverkat de andra fiskarnas beteende till att nyttja skyddet mer. För att ytterligare undersöka potentiella interaktioner mellan behandling och tidsperiod genomfördes två pairwise-analyser på interaktionen mellan behandling och tidsperiod.

2.5.2 Personlighet

För att mäta huruvida fiskarnas beteenden var personliga och jämföra individuella variationen i olika behandlingsgrupper delades datat in i 6 delgrupper "Kontroll", "Exponerad", "Kontroll – Före", "Kontroll – Efter", "Exponerad – Före" och "Exponerad – Efter" där repeterbarheten beräknades på varje grupp. Repeterbarheten för varje grupp beräknades som en kvot av den andel av den totala variansen som kan hänföras till individuell varians. Vilken video i ordningen (fiskens första, andra, tredje osv) och deras vikt beaktades som fasta effekter medan deras identitet och husakvarium beaktades som slump effekter. Datatypen var "Gaussian", nboot = 100 och npermut = 0.

Då denna studie är en del av ett större forskningsprojekt har de tidigare stegen i metoden varit utförda av forskare från det större forskningsprojektet och jag har utfört de två sista delarna i metoden: 2.4 Beteende analys och 2.5 Statistisk analys.



Figur 1. Flödesschema över händelseförloppet av studiens utförande och analys.

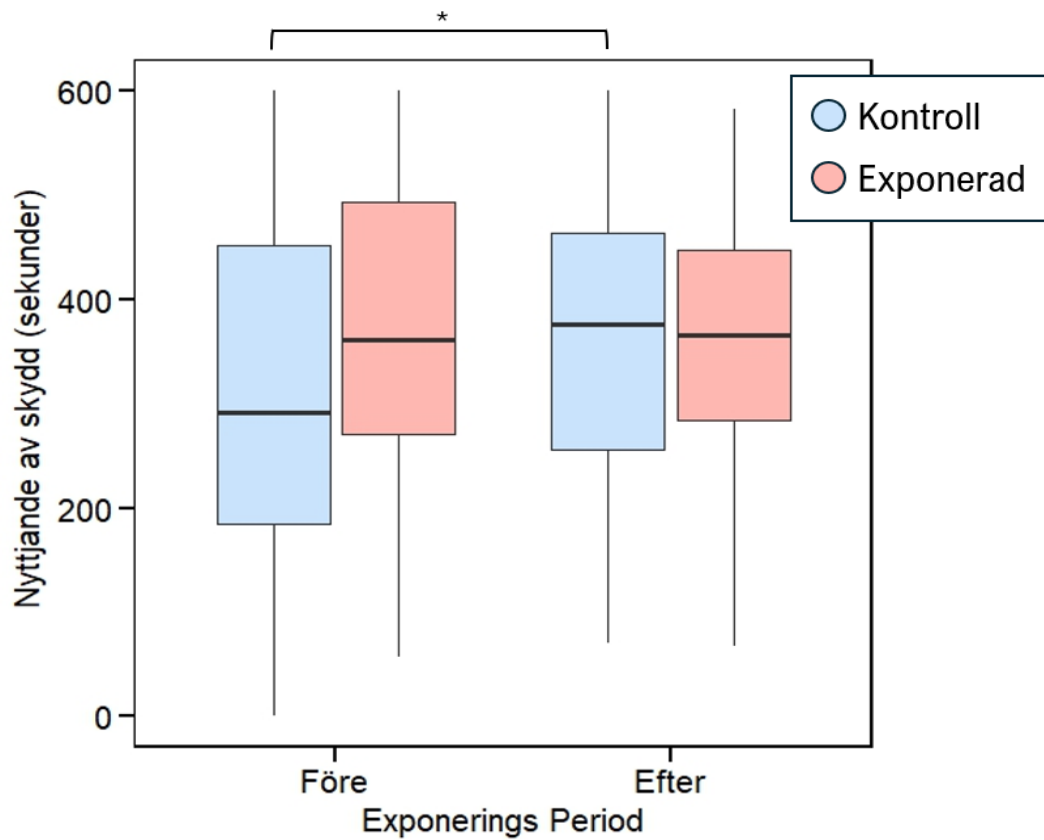
3. Resultat

Av 40 fiskar genomförde 35 alla tester. Tidig mortalitet drabbade fem fiskar varv två ersattes efter första försöket, och en ersattes efter andra försöket. Detta resulterade i ett underlag på 221 videos av 43 olika fiskar som användes i den statistiska analysen.

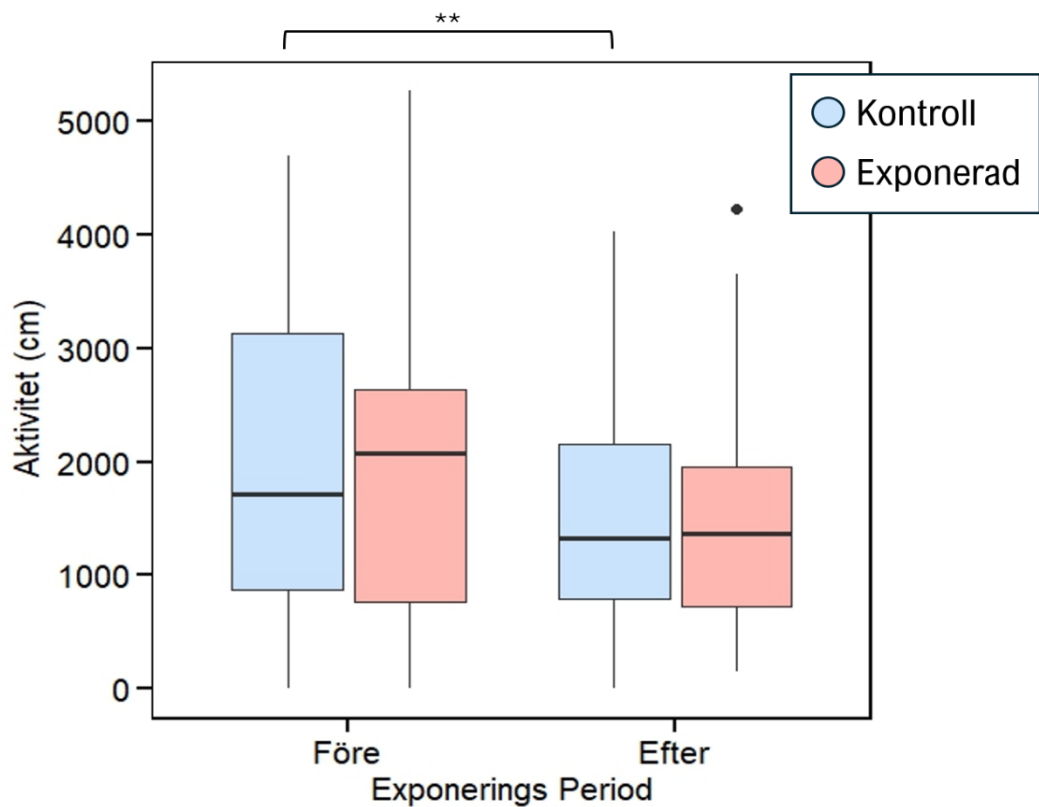
3.1 Studiegruppens beteende

Det fanns en svag indikation på att det fanns en interaktion mellan läkemedelsexponering och försöksperiod (före eller efter exponering) gällande fiskarnas nyttjande av skydd (linear mixed model, t-value = -1,68, P = 0,0949). Post hoc-jämförelser mellan modellskattningar av behandlingsgrupperna visade att kontrollfiskarna tillbringade $48,41 \pm 24$ sekunder mer i skydd efter exponeringsperioden jämfört med före exponeringsperioden, trots att de inte exponerats för någon medicin (emmeans, t-ratio = 2,020, P = 0,0449, Fig. 2). Hos Gabapentin-exponerade fiskar fanns det ingen märkbar skillnad i nyttjande av skydd i växtligheten före exponeringsperioden och efter exponeringsperioden (emmeans, medelvärde = $9,08 \pm 24,5$, t-ratio = 0,371, P = 0,7110, Fig. 2).

Den simmade längden, fiskarnas aktivitet, gavs ingen indikation på ett samband mellan läkemedelsexponering och försöksperiod (linear mixed model, t-value = 0,763, P = 0,44667). Endast en indikation att aktiviteten hos fiskarna minskade med exponeringsperioden (linear mixed model, Medelvärde = $-520,15 \pm 199,62$, t-value = -2,61, P = 0,00991). Post hoc analyserna som genomfördes på modellskattningarna av behandlingsgrupperna visade att kontrollfiskarna simmade 520 ± 200 cm kortare i akvariets öppna del efter exponeringsperioden jämfört med innan exponeringsperioden (emmeans, t-ratio = 2,61, P = 0,0099, Fig. 3). De Gabapentin-exponerade fiskarna simmade 303 ± 203 cm kortare sträcka efter exponeringen jämfört med innan exponeringen (emmeans, t-ratio = 1,495, P = 0,1366, Fig. 3).



Figur 2. Tiden de exponerade fiskarna och kontrollfiskarna nyttjade skyddet i växtligheten i sekunder före och efter exponeringsperioden av Gabapentin.



Figur 3. Boxplot över aktiviteten (fiskarnas simmade längd i akvariets öppna del) i cm för kontrollfiskarna och de Gabapentin-exponerade fiskarna före och efter exponeringsperioden.

3.2 Personlighet

Personlighet mäts med repeterbarhet, en siffra mellan 0 och 1, och beräknades som en kvot av den andel av den totala variansen som kan hänföras till individuell varians. En höjning i repeterbarhet kan därför betyda antingen minskad inom-individs-variation, ökad mellan-individs-variation eller en kombination av båda (Polverino et al. 2021). I beteendestudier är en repeterbarhet på 0,37 vanligt förekommande (Bell et al. 2009).

Personligheterna för fiskarnas nyttjande av skydd i växtligheten var mer utpräglad efter exponeringsperioden för både kontrollfiskarna och de exponerade fiskarna. Hos kontrollfiskarna var repeterbarheten för deras nyttjande av skydd innan exponeringsperioden 0,16 (rpt, CI = 0 – 0,43) och efter exponeringsperioden 0,38 (rpt, CI = 0,019 – 0,61). Gällande nyttjandet av skydd hos de exponerade fiskarna var repeterbarheten innan exponeringen 0,16 (rpt, CI = 0 – 0,41) och efter exponeringen var repeterbarheten 0,39 (rpt, CI = 0,01 – 0,61).

Repeterbarheten hos fiskarna var generellt lägre när det kom till aktivitet än nyttjande av skydd. Personlig utprägling när det gällde kontrollfiskarnas aktivitet minskade efter exponeringsperioden jämfört med innan. Innan exponeringsperioden var repeterbarheten hos kontrollfiskarnas aktivitet 0,30 (rpt, CI = 0 – 0,52) och efter exponeringstiden minskade den till 0,039 (rpt, CI = 0 – 0,25). Motsatt trend hittas hos de exponerade fiskarna där personligheterna blev mer konsistenta och utpräglade efter exponeringsperioden. Repeterbarheten hos de exponerade fiskarnas simmade längd innan exponering var 0,016 (rpt, CI = 0 – 0,27) och efter exponeringen 0,17 (rpt, CI = 0 – 0,40).

4. Diskussion

I den här studien har 221 videor av 43 fiskar analyserats för att besvara frågeställningen hur fiskars beteende påverkas av Gabapentin exponering. Både gruppernas generella förändring av beteende och individuella variationer (personlighet) har analyserats men gav skilda resultat. Gällande gruppernas generella förändring står det klart att Gabapentin påverkar fiskarnas beteende. Däremot är dataunderlaget för litet för att dra säkra slutsatser om Gabapentins påverkan på fiskarnas personlighet.

4.1 Studiegruppens beteende

Resultaten visar att Gabapentin har en påverkan på fiskarnas beteende. Effekten på deras beteende överensstämde dock inte med mina ursprungliga hypoteser. De exponerade fiskarna blev varken mer eller mindre aktiva och deras nyttjande av skydd påverkades inte heller. I stället var det kontrollfiskarna (som inte exponerades för Gabapentin) vars aktivitet minskade och nyttjande av skydd ökade. En konsekvens av att de acklimatiserade sig till testakvarierna, troligtvis eftersom de upplevde att de redan undersökt den öppna delen av akvariet tillräckligt. De Gabapentin-exponerade fiskarna visade i stället inga tecken på att acklimatisera sig till testakvarierna. När det kom till nyttjande av skydd påvisade de exponerade fiskarna ingen skillnad i beteende före och efter exponeringen. De visade viss indikation på att simma kortare sträckor efter exponeringsperioden, men skillnaden och signifikansen var inte lika stor som hos kontrollfiskarna.

Denna förändring i acklimatisering av två fitness-avgörande beteenden, kan ha både positiva och negativa effekter på de exponerade fiskarnas överlevnad och reproduktion i naturliga habitat. Att inte allokeras sin energi på att gömma sig och i stället fortsätta utforska, ökar chansen att hitta föda och partner men ökar även risken att utsättas för predation (Polverino et al. 2021). Vad som skulle väga tyngst i denna trade-off i ett naturligt habitat är svårt att förutse och kan variera mellan populationer och är baserat på olika ekologiska förutsättningarna i omgivningen, till exempel predationstryck (Réale et al. 2007). Oavsett kan en förändring av en arts beteende påverka andra arter i ekosystemet genom förändringar i bland annat konkurrens eller predation (Saaristo et al. 2018).

Resultaten från vår studie särskiljer sig delvis från tidigare forskning. Li et al. (2018) rapporterade att Gabapentin-exponering resulterade i ökad aktivitet hos larvstadiet av zebrafiskar (*Danio rerio*). I vår studie observerade vi emellertid ingen ökad aktivitet hos de exponerade öringarna jämfört med kontrollfiskarna. Vi noterade däremot en begränsning i de exponerade fiskarnas förmåga att acklimatisera sig när det gällde aktivitet. Studieart och livsstadie skiljer studierna åt, vilket kan påverka de observerade effekterna av läkemedlet (Saaristo et al. 2018). Dessutom skiljer sig studiernas utformning; Li et al. undersökte enbart larvernas beteende efter exponering, medan vårt resultat var beroende av att beteendena studerats både före och efter exponeringen. Båda studierna indikerar att Gabapentin påverkar fiskars aktivitet, hur det påverkas skiljer dock.

Gabapentins verkningsmekanism kan bidra till att förklara de observerade resultaten. Gabapentins verkningsväg och läkemedelsmål är möjligtvis annorlunda mellan fiskar och människor (möjligtvis mellan fiskarter och livsstadier också), vilket kan vara en anledning till att medicinen påverkar människor och fiskar olika. Många gemensamma biologiska läkemedelsmål har hittats hos fiskar och människor, men enligt min vetskap har högspänningsaktiverade kalciumkanaler hittills varken bekräftats eller dementerats (Gunnarsson et al. 2008). Gabapentin har också fler verkningsvägar utöver sin huvudsakliga väg (Sills 2006) som kanske kan ha andra och mer framträdande uttryck hos fiskar än hos människor.

Studie djuren i den här studien är dessutom uppfödda fiskar vilket kan leda till en underskattning av resultaten. Det finns en skillnad i beteende hos uppfödda fiskar och vilda fiskar som dels beror på olika selektionstryck, dels beror på skillnader i förutsättningar under uppväxten. Selektionen på uppfödda fiskar är konkurrensbaserad, vilket leder till aggressivare beteende medan vilda fiskars selektion är predatorbaserad (Huntingford 2004). Skillnader i beteendet hos studiedjuren jämfört med vilda populationer kan därför innebära en underskattning av Gabapentins påverkan på beteende (Saaristo et al. 2018).

4.2 Personlighet

Gabapentins effekt på fiskarnas personlighet gav osäkra och varierade resultat. Utifrån resultatet för repeterbarheten hos fiskarnas simmade längd kan ingen slutsats dras. Repeterbarheten gällande fiskarnas nyttjande av skydd gav viss indikation att tiden fiskarna spenderat i testakvariet lett till mer utpräglade personligheter men att Gabapentin-exponeringen inte hade någon effekt. Detta eftersom repeterbarheten hos både kontrollgruppen och exponeringsgruppen gick från 0,16 innan exponeringsperioden till närmare 0,4 efter exponeringsperioden.

De breda konfidensintervallen visar dock på osäkerheten i detta resultat. Enligt en metaanalys på repeterbarhet av beteende utförd av Bell et al. (2009), är aktivitet ett av de minst repeterbara beteendena, vilket kan förklara skillnaden i resultat mellan de två studerade beteendena.

Även storleken på datamängden kan påverkat osäkerheten i resultaten. Säkra repeterbarhetsmätningar kräver stor mängd data. På grund av tidsbegränsningar är antalet replikat som analyseras i denna studie en delmängd av ett större experiment. Framtida analyser av detta projekt kan därför förbättra våra nuvarande uppskattningar av repeterbarhet. Studier av AFS:ers effekt på organismers personlighet saknas till stor del i ekotoxikologiskforskning (Saaristo et al. 2018) men Polverino et al. (2021) har genomfört en av få studier som undersöker detta. De fann att variationen i beteende mellan individer minskade vid exponering av ett psykoterapeutiskt läkemedel. Homogenisering av beteende mellan individer försämrar arters anpassningsförmåga till snabba förändringar i klimatet och miljön och ökar även utdöenderisken (Wolf & Weissing 2012; Polverino et al. 2021). Därför är det viktigt att fortsätta studera mediciners effekter på personlighet och förhoppningsvis kan analyserna av den större mängden replikat som finns tillgänglig från den större studien ge klarare resultat.

4.3 Sammanfattning

Gabapentin inhiberar alltså öringars acklimatisering, framför allt avseende deras nyttjande av skydd, men har även en viss effekt på acklimatiseringen av deras aktivitet. Det begränsade dataunderlaget tillät inte en säker slutsats gällande Gabapentins påverkan på fiskarnas personlighet, men det är möjligt att fiskarnas personlighet i större utsträckning påverkas av den tid de tillbringar på en plats snarare än av Gabapentins närvaro. Beteenden är av avgörande betydelse för arters överlevnad och reproduktion, och personligheten har en betydande roll för arters anpassningsförmåga och livskraftighet. Därför kan förändringar i dessa påverka abundansen av den påverkade arten. Förändringar i abundans samt beteende kan sedan leda till indirekta effekter på andra trofiska nivåer i ekosystemet och resistenta organismer genom avvikelser från det normala predationstrycket och konkurrensen arter emellan (Saaristo et al. 2018). Den här studien visar på ytterligare ett läkemedel som närvarar i många akvatiska ekosystem och som förändrar fiskars beteende. Vidare forskning och åtgärder för att minska mänskliga påverkningar på vattenmiljöer är avgörande för att säkerställa hållbara vattenresurser för framtida generationer.

Referenser

- Ammar, E., Maury, H., Morin, L. & Sghir, A. (2021). Environmental, Economic, and Ethical Assessment of the Treated Wastewater and Sewage Sludge Valorization in Agriculture. I: Pérez Solsona, S., Montemurro, N., Chiron, S., & Barceló, D. (red.) *Interaction and Fate of Pharmaceuticals in Soil-Crop Systems: The Impact of Reclaimed Wastewater*. Springer International Publishing. 49–78.
https://doi.org/10.1007/698_2020_606
- Bell, A.M., Hankison, S.J. & Laskowski, K.L. (2009). The repeatability of behaviour: a meta-analysis. *Animal Behaviour*, 77 (4), 771–783.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.12.022>
- Carlson, S.M. & Satterthwaite, W.H. (2011). Weakened portfolio effect in a collapsed salmon population complex. Fleming, I.A. (red.) (Fleming, I. A., red.) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68 (9), 1579–1589.
<https://doi.org/10.1139/f2011-084>
- Cervený, D., Fick, J., Klaminder, J., McCallum, E.S., Bertram, M.G., Castillo, N.A. & Brodin, T. (2021). Water temperature affects the biotransformation and accumulation of a psychoactive pharmaceutical and its metabolite in aquatic organisms. *Environment international*, 155, 106705–106705.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106705>
- Fent, K., Weston, A.A. & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76 (2), 122–159.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Figge, F. (2004). Bio-folio: applying portfolio theory to biodiversity. *Biodiversity and conservation*, 13 (4), 827–849.
<https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000011729.93889.34>
- Ford, A.T., Ågerstrand, M., Brooks, B.W., Allen, J., Bertram, M.G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J.M., Ledesma, M., Melvin, S.D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G.G., Scholz, S., Saaristo, M., Smit, E., Steevens, J.A., van den Berg, S., Kloas, W., Wong, B.B., Ziegler, M. & Maack, G. (2021). The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental science & technology*, 55 (9), 5620–5628. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493>
- Frank, B.M., Piccolo, J.J. & Baret, P.V. (2011). A review of ecological models for brown trout: towards a new demogenetic model. *Ecology of Freshwater Fish*, 20 (2), 167–198. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2011.00491.x>
- 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. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
- Gunther, F.A., Whitacre, D.M., Albert, L.A., Hutzinger, O., Knaak, J.B., Mayer, F.L., Morgan, D.P., Park, D.L., Tjeerdema, R.S., De Voogt, P., Yang, R.S.H., Gerba, C.P., Giesy, J., Stevens, J.T., Ware, G., Monteiro, S.C. & Boxall, A.B.A. (2010). Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. I: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York. 53–154. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1157-5_2
- Huntingford, F.A. (2004). Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology*, 65 (s1), 122–142. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00562.x>
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O’Connell, M.F. & Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, 12 (1), 1–59. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x>
- Li, X., Zhou, S., Qian, Y., Xu, Z., Yu, Y., Xu, Y., He, Y. & Zhang, Y. (2018). The assessment of the eco-toxicological effect of gabapentin on early development of zebrafish and its antioxidant system. *RSC advances*, 8 (4), 22777–22784. <https://doi.org/10.1039/c8ra04250k>
- MacArthur, R. (1955). Fluctuations of Animal Populations and a Measure of Community Stability. *Ecology*, 36 (3), 533–536. <https://doi.org/10.2307/1929601>
- Polverino, G., Martin, J.M., Bertram, M.G., Soman, V.R., Tan, H., Brand, J.A., Mason, R.T. & Wong, B.B.M. (2021). Psychoactive pollution suppresses individual differences in fish behaviour. *Proceedings of the Royal Society. B, Biological sciences*, 288 (1944), 20202294-. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2294>
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T. & Dingemanse, N.J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82 (2), 291–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x>
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M. & Arnold, K.E. (2018). Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proceedings of the Royal Society. B, Biological sciences*, 285 (1885), 20181297-. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1297>
- Salahinejad, A., Meuthen, D., Attaran, A., Chivers, D.P. & Ferrari, M.C. (2023). Effects of common antiepileptic drugs on teleost fishes. *The Science of the total environment*, 866, 161324-. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161324>
- Schindler, D.E., Hilborn, R., Chasco, B., Boatright, C.P., Quinn, T.P., Rogers, L.A. & Webster, M.S. (2010). Population diversity and the portfolio effect in an exploited species. *Nature*, 465 (7298), 609–612. <https://doi.org/10.1038/nature09060>
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R. & Triebkorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Science of*

The Total Environment, 607–608, 1026–1036.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.042>

- Sills, G.J. (2006). The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Current Opinion in Pharmacology*, 6 (1), 108–113.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.11.003>
- Wilkinson, J.L., Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Leung, K.M.Y., Lai, R.W.S., Galbán-Malagón, C., Adell, A.D., Metian, M., Marchant, R.A., Bouzas-Monroy, A., Cuni-Sanchez, A., Coors, A., Carriquiriborde, P., Rojo, M., Gordon, C., Petrosyan, V., Perikhanyan, Y., Mahon, C.S., McGurk, C.J., Iniguez, V., Gildasio De Figueiredo, F., Dougnon, V., Gbaguidi, G., Traoré, O., Blais, J.M., Wong, M., Wong, D., Ntchantcho, R., Pizarro, J., Ying, G.-G., Chen, C.-E., Páez, M., Martínez-Lara, J., Otamonga, J.-P., Wilson, P., Echeverría-Sáenz, S., Udikovic-Kolic, N., Milakovic, M., Fatta-Kassinou, D., Ioannou-Ttota, L., Belušová, V., Cárdenas-Bustamante, M., Kassa, B.A., Garric, J., Gibba, P., Kunchulia, I., Seidensticker, S., Halldórsson, H.P., Melling, M., Shashidhar, T., Lamba, M., Nastiti, A., Supriatin, A., Pourang, N., Abedini, A., Abdullah, O., Gharbia, S.S., Pilla, F., Chefetz, B., Topaz, T., Aubakirova, B., Olaka, L., Mulu, J.K., Chatanga, P., Ntuli, V., Blama, N.T., Sherif, S., Aris, A.Z., Looi, L.J., Ogunbanwo, O., Ashfaq, M., Abdeen, Z., O’Dea, A., Morales-Saldaña, J.M., de la Cruz, H., Navarrete, I., Carvalho, F., Gogra, A.B., Cerkvénik-Flajs, V., Thwala, M., Kang, H., Ladu, J.L.C., Rico, A., Amerasinghe, P., Sobek, A., Horlitz, G., Zenker, A.K., Jiang, J.-J., Kariuki, R., Tumbo, M., Tezel, U., Onay, T.T., Lejju, J.B., Vystavna, Y., Heinzen, H., Pérez-Parada, A., Sims, D.B., Figy, M., Good, D. & Teta, C. (2022). Pharmaceutical pollution of the world’s rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 119 (8).
<https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>
- Wolf, M. & Weissing, F.J. (2012). Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27 (8), 452–461.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.001>
- Ziegler, M., Banet, M., Bauer, R., Köhler, H.-R., Stepinski, S., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C. & Triebkorn, R. (2021). Behavioral and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine. *Frontiers in Environmental Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584>

Tack

Tack till mina handledare som guidat och hjälpt mig med det här kandidatarbetet.
Och tack till mina vänner och familj som firat med mig.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.