



Vägledning För Tillämpning Av Genotox Profile® Inom Riskbedömning



Vi Moderniserar Miljödiagnostik

BioImpakt AB är ett analys- och konsultföretag inom miljöområdet. Bolaget startades 2015 av Per-Erik Olsson i samarbete med dåvarande Örebro Universitet Enterprise AB. Bakgrunden till bildandet av företaget var ett behov av att utveckla metoder som kunde stärka kopplingen mellan iakttaga effekter och orsaken bakom dessa effekter. Metoden som BioImpakt AB använder, *Genotox Profile®*, baseras på genanalys och fyller det gap som finns mellan nuvarande kemiska och biologiska metoder.

Metoden bygger på den väl beprövade PCR-tekniken som utvecklades av Dr. Kary Mullis, 1983, och för vilket han belönades med 1993-års Nobelpris i kemi. Metoden används mycket inom medicinsk diagnostik, inte minst under senare tid för att spåra t.ex. Covid-19 smitta.

Analyserna baseras på det genuttryck en miljöfaktor skapar och inte på t.ex. morfologiska förändringar som kan vara föremål för subjektiva bedömningar. *Genotox Profile®* dras inte med de osäkerheter en kemisk karaktärisering skapar i form av bedömning av miljöfaktorns biotillgängligt i olika matriser eller miljöer. Kemisk riskvärdering är beroende av att man kompenserar för biotillgänglighet och platsspecifitet med matematiska modeller.

Fördelar med Metoden:

- Direktvisande av toxisk effekt i den aktuella miljön
- Klargör vilken typ av toxisk påverkan provet uppvisar (hormonell, metalltoxicitet, mutagen, reproduktionsstörande)
- Fångar även in toxicitet hos okända ämnen som saknas i kemisk karaktärisering.
- Tar kortare tid att testa jämfört med andra toxicitetstester

Organism- och Cellmodeller:

Daphnia magna – En känslig söt- och brackvattenslevande kräftdjursart som har använts för att ta fram mycket av det regelverk som nu föreligger.

Zebrafisk – En väl karakteriserad fiskart och en bra modell för ryggradsdjur i sötvattensmiljö.

Artemia salina – En saltvattenslevande motsvarighet till *Daphnia magna*. Kan klara upp till 30% salthalt och är ett kommande modellsystem för analys av toxicitet i havsmiljö.

Caenorhabditis elegans – En jordlevande rundmask som är en användbar modell för analys av markföroreningar.

Cellmodeller – Vi kan även analysera effekter med olika cellmodeller för människa, däggdjur, fåglar och fisk, där heldjursförsök inte är önskvärda.

Innehållsförteckning

1	Sammanfattning.....	1
2	Sambandet mellan Exponering och Effekt	2
3	Koppling till Lagstiftning	5
3.1	Bakgrund till Förekommande Effektvärden och Bedömningsgrunder	5
3.2	Regelverk i Sverige och Europa.....	6
3.3	Från Förenklad till Fördjupad Riskbedömning	7
3.4	Stegvist Tillvägagångssätt i Riskbedömning	8
4	Från Exponering till Effekt	9
4.1	Kopplingen mellan Genreglering och Störningar på Individnivå	9
4.2	Reglering av Biologiska Funktioner.....	10
5	Fördelarna med Genotox Profile®-metoden.....	11
6	Presentation och Tolkning av Genotox Profile®-resultat	12
6.1	Exempel 1: Analys av Lakvatten från Fast Avfall	12
6.2	Exempel 2: Analys av Recipientvatten efter Sanering av Gruvområde	15
7	Fördjupande Information	18
7.1	Gener som Ingår i Genotox Profile®-analysen	18
7.2	Molekylärbiologisk Ordlista.....	19
7.3	Artiklar för Ytterligare Fördjupning.....	20
8	Kontaktinformation.....	21

1 Sammanfattning

BioImpakt AB erbjuder tjänster baserade på nyutvecklade biologiska analysmetoder med hög relevans som kan bidra till förbättrade miljöriskbedömningar. BioImpakt AB kan förutom utförande av analyser även vid behov bistå i planerings, utvärderings och rapporteringsuppdrag.

Metoderna är baserade på analys av hur gener svarar på exponering och finns tillgängliga för flera olika organismer. Metoderna ger ett bra underlag för riskanalys eftersom de möjliggör att exponering kan kopplas till specifik effekt, vilket minskar behovet av säkerhetsfaktorer samt ökar den platsspecifika relevansen.

Dagens riskanalyser baseras till stor del på kemiska totalhalter där biotillgänglighet inte alltid tas i beaktande och där riktvärdena ofta är baserade på traditionella toxicitetstester av enskilda ämnen i laboratoriemiljö. Traditionella toxicitetstester ger vanligen endast information om vilken koncentration som är dödlig, eller leder till minskad fortplantning, men saknar information om vilken slags toxicitet det är frågan om. Eftersom komplexiteten i miljön inte kan utvärderas med befintliga kemiska metoder så saknar dessa möjligheten till platsspecifik analys. Bristen på biologisk platsspecifik information har även lett till användandet av generella och väl tilltagna säkerhetsfaktorer i riskbedömningen.

Lagstiftning inom både vattenområdet (EU:s ramdirektiv för vatten), förorenad mark såväl som inom avfallssektorn (EU:s ramdirektiv för avfall) har identifierat och belyst behovet av bättre verktyg för att mäta biologiska effekter från en komplex miljömatris för bedömning om matrisen utgör en risk eller uppvisar farliga egenskaper. Därför finns idag incitament att tillämpa biologiska analysverktyg för en rad tillämpningar inom miljöområdet där dessa erkänns som en nödvändig komponent i riskbedömningsprocessen. Koppling till respektive frågeställning är ofta situations- eller platsspecifik och kräver fördjupade kunskaper för inkorporering av biologiska analysdata, men har ofta stora fördelar för kunden genom att bidra med ökad information om risksituationen i pågående ärenden. BioImpakt AB bistår förutom med utförande av biologiska analyser även med tolkning och kommunikation för betydelsen av data i det enskilda fallet för maximerad kundnytta.

Genotox Profile® - Tokikologiskt relevanta gener har valts ut så att det är möjligt att identifiera vilka specifika organiska (PCB, PAH, Ftalater, PFOS, flamskyddsmedel m.m.) eller oorganiska (t.ex. metaller) ämnen som påverkar systemet. Genom att koppla genanalyserna till traditionella analyser av tillväxt och överlevnad kan vi identifiera om en specifik substans bidrar till de effekter som iakttas. För att täcka olika applikationer och platsspecifika miljöer har vi utvecklat *Genotox Profile®* för flera olika organismer, från bakterier till ryggradsdjur. Urval av biomarkörer kan göras utifrån den platsspecifika situationen och riktas mot enskilda ämnen/ämnesgrupper som är av störst intresse i det enskilda fallet.

2 Sambandet mellan Exponering och Effekt

Det finns en viktig skillnad mellan att bestämma effekten av en exponering och att förstå vad det är som orsakar effekten. Effekter som orsakar skada på hela ekosystem identifieras vanligtvis genom populationsförändringar. Effekter på organism/individnivå observeras lättast av förändringar i fysiologi, morfologi eller beteende hos en organism. Eftersom miljön är mycket komplex och mycket varierande har mätningen av förändringar i ekosystem, populationer eller individer mycket liten möjlighet att identifiera orsaken till observerade effekter.

För att undvika felaktiga bedömningar är det viktigt att identifiera sambandet mellan en exponering och den observerade effekten. De mest känsliga metoderna för detta är på nivån av *budbärar-RNA* (*messenger RNA*; mRNA) och proteinreglering på gennivå. mRNA bildar länken mellan proteiner och kromosomalt DNA (gener). De kromosomalt placerade generna kan regleras på flera olika sätt, men oberoende av regleringsmekanismen kommer exponering för toxiska ämnen att resultera i en förändring av mRNA-nivåer och därmed i motsvarande protein. Analys av mRNA-nivåer är därför det mest robusta och känsliga sättet att bestämma den mekanism som leder till de effekter som observerats efter en exponering.

Kromosomer, DNA, mRNA och Proteiner

Hos högre organismer lagras informationen om våra funktioner i DNA som är förpackat i kromosomer. Kromosomerna innehåller de gener som reglerar hur organismen svarar på exponering. Vid en exponering så överförs information från generna till budbärar-RNA (mRNA) som i sin tur leder till produktion av proteiner som utför de önskade funktionerna i cellen. Genom att mäta hur mycket mRNA som bildas kan man få en uppfattning om hur organismen svarar på en exponering. Om mRNA nivåerna ökar betyder det att det specifika protein som mRNA:et kodar för behövs. Det kan exempelvis vara ett behov av att avgifva cellen eller att aktivera fortplantning. Om mRNA nivåerna går ned så betyder det att organismen inte behöver dessa proteiner och att det därför inte är ett behov av till exempel avgiftning. Om generna inte svarar på exponeringen så betyder det att organismen inte upplever ett behov av att ändra något, dvs. det är ingen effekt av exponeringen.

Som en jämförelse kan fortplantning analyseras genom att mäta antalet avkomor. Om det finns en minskning eller ökning av avkomman indikerar detta att exponeringen påverkar reproduktionen. Samtidigt kommer en kort exponering (24-96h) följt av analys av mRNA-nivåer att kunna visa om det finns en förändring i det maskineri som är nödvändig för reproduktion. En fördel med att analysera regleringen av gener är att induktionen eller reduktionen i mRNA är direkt korrelerad med specifika föreningar som kan reglera genuttrycket. Genom att kombinera analysen av mRNA kopplat till fortplantning/reproduktion med analysen av mRNA som mäter toxicitet är det möjligt att bestämma vilken typ av toxisk effekt som orsakas av de föreningar som organismen utsätts för.

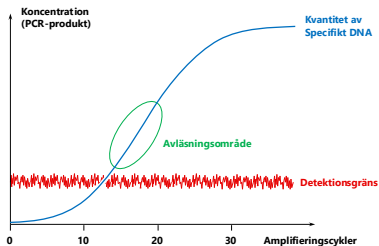
Genom att analysera mRNA-regleringen är det därför möjligt att bestämma effekter relaterade till toxicitet och störningar av fortplantning. Analyserna kan utformas baserat på kemiska bakgrundsdata som indikerar vilken typ av exponering som organismen utsätts för. Upplösningen för analysen kan ökas genom att välja specifika gener som är kända för att svara på specifika exponeringar. Genom att använda kontrollerad exponering för specifika föreningar är det dessutom möjligt att identifiera om dessa bidrar till en uppmätt biologisk effekt. Det är därigenom möjligt att avgöra om effekten orsakas av ett specifikt ämne eller en grupp av ämnen i det analyserade provet.

Både för metaller och organiska ämnen håller ett paradigmskifte på att ske i hur man bedömer risker. Under lång tid har risker med förekommande ämnen i miljön bedömts utifrån uppmätta totalhalter och gränsvärden avseende kemisk halt i olika medier. Genom forskning och utveckling vet vi idag att det finns bättre metoder för att bedöma kemiska risker där hänsyn tas till de komplexa processer som styr kemiska ämnens frisättning, kemiska form, upptag och biotillgänglighet gentemot en biologisk receptor.

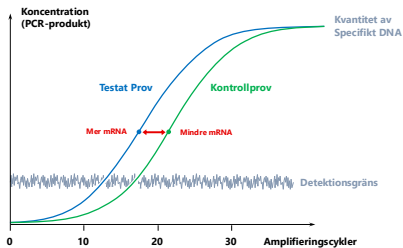
En stor mängd biologiska testsystem finns tillhanda och vissa utgör till exempel ISO- eller OECD-standarder efter att genomgått kvalitetssäkring för respektive metodik. Biologiska testsystem som anses robusta och där det finns hög tillgänglighet på dataunderlag ingår i den s.k. testförfordningen från OECD som rekommenderas i lagstiftning när biologisk testning förordas till exempel i avfallsdirektivet.

OECD:s testförfordning innehåller etablerade biologiska metoder som fanns tillhanda vid tidpunkten för fastställande av förordningen. De metoder som då blivit standard hade dessförinnan genomgått längre standardiseringsförfaranden och har sitt ursprung redan på 1970-talet till 1990-talet. Därefter har utvecklingen inom biologisk effektmätning gjort mycket stora tekniska framsteg genom satsningar inom t.ex. modern medicinsk diagnostik. Ur den aspekten är testförfordningen inte alls uppdaterad mot den teknik- och metodutveckling som idag finns tillhanda som bästa tillgängliga teknik (*Best Available Technology*; BAT) för biologisk effektmätning. De metoder som BioImpact AB tillämpar (*Genotox Profile®*) kommer från detta fält och är att betrakta som de bästa tillgängliga.

Toxicitetsanalys med hjälp av analys av genreglering används för att överbrygga gapet mellan kemiska och biologiska metoder för riskbedömning. *Genotox Profile®*-metoden bygger på beprövad PCR-teknik (ISO 20359) för analys av effekter på genuttryck till följd av olika exponeringar (figur 1 och 2). Ett förändrat genuttryck leder till en förändrad proteinproduktion, normalt för att återställa balansen i systemet. Vid en exponering för miljögifter kommer en toxisk effekt att visa sig i signifikanta förändringar i specifika geners uttrycksmönster. Om många gener påverkas betyder det ofta en kraftig toxikologisk respons som allvarligt påverkar hela organismen. Förändringarna i genuttryck är starkt kopplade till vilken exponering som organismen utsätts för (metaller, fria radikaler, organiska ämnen) och kan därför användas för att avgöra koppling mellan exponering och effekt.



Figur 1: PCR-metod. Baseras på amplifiering av DNA och avläsning under den linjära fasen. Om en mRNA molekyl finns i provet kommer den efter 30 cykler att ha amplifierats till 9.2×10^{10} molekyler. Viktigt att avläsa där DNA-mängden fördubblas för varje cykel.



Figur 2: PCR-analys. Genom att jämföra hur många cykler som krävs för detektion vid en förutbestämd nivå kan man avgöra mängden DNA i provet och därmed om genen är aktiverad eller inhiberad.

3 Koppling till Lagstiftning

3.1 Bakgrund till Förekommande Effektvärden och Bedömningsgrunder

Miljöriskbedömningens generella steg består av faroidentifiering kopplat till exponering och dos-responssamband samt riskkaraktärisering. Faroidentifiering innebär att närvaro av det ämne/ämnen med potential att skada organismer konstaterats i det prov (till exempel luft, vatten, mark, sediment) som bedöms. Vid exponeringsbedömningen mäts eller uppskattas koncentrationerna av aktuella ämnen i de olika medier som exponerade organismer lever i samt att storlek och varaktighet av exponeringen uppskattas. Analys av dos-responssamband bedöms utifrån grad och typ av skadlig effekt vid exponering av kända koncentrationer av enskilda ämnen bestäms i standardiserade ekotoxikologiska laboratorietester. Utifrån tester etableras organism-specifika dos-responssamband där nivåer för olika grad av effekt bestäms inklusive den koncentration där ingen effekt uppträder, den så kallade nolleffektnivån NOEC (*No Observed Effect Concentration*).

Flera olika tester och testsystem som undersöker samma effekt ger en variation i utfallet som måste vägas in i processen, till exempel variation utifrån utförande och testförhållanden, testorganism och resultatens kvalitet är faktorer som bidrar till variation i utfallet av toxicitet och fastställande av NOEC värden. Genom variationen brukar vanligen ett HC5 värde (*Hazardous Concentration 5*, motsvarande den koncentration där 5 % av arterna uppvisar effekt) etableras genom statistisk bearbetning av effektdata. En generell skyddsnivå härleds därefter från HC5 för att ge ett tillräckligt och allmänt skydd för alla typer av organismer som lever i det medium som nivån fastställs för, det s.k. PNEC-värdet (*Predicted No-Effect Concentration*). PNEC brukar utgöra grund för de riktvärden, gränsvärden eller miljökvalitetsnorm för medium (vatten, jord, sediment) som stipuleras i bedömningsgrunder eller föreskrifter. PNEC-värdet härleds vanligen utifrån statistisk bearbetning av dataunderlaget där en bestämd skyddsnivå väljs som anses ge tillräckligt allmänt skydd. De principer som ligger till grund för framtagande av PNEC-värden har arbetats fram inom EU för att ge vägledning och god praxis för all riskbedömning av kemiska ämnen¹. Bland annat har miljökvalitetsnormer för prioriterade ämnen inom EU:s vattendirektiv (2000/60/EG) formulerats enligt dessa principer och gäller för alla Europas ytvattenförekomster.

I PNEC värdet ligger vanligen också en så kallad *Assessment Factor* (AF) som hanterar osäkerheter i underlagsdata, till exempel beroende på antalet arter som testats och den bedömda kvaliteten i det ekotoxikologiska dataunderlaget. PNEC fastställs då genom att dela NOEC med AF. Vid stora osäkerheter i underliggande undersökningar används hög AF (till exempel 10-100) medan låg osäkerhet leder till låg AF (till exempel 1-5).

1 European Chemicals Bureau 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, part I-IV.

3.2 Regelverk i Sverige och Europa

Det pågår ett initiativ inom EU arbetar för att öka användningen av biologiska analysmetoder för att avgöra om en exponering är skadlig för organismer. Dessa metoder kommer att ges förtur före kemiska analyser i framtida riskvärdering. Detta har redan införts inom avfallsdirektivet (2008/98/EG) vid bedömning om ett avfall ska anses ha farliga egenskaper eller ej.

Bedömning av Farlighet och Klassificering

För att bedöma om ett avfall har farliga egenskaper ska avfallsinnehavaren...

- i. tillämpa bilaga III till direktiv 2008/98/EG, eller;
- ii. testa avfallet enligt förordning (EG) nr 440/2008 eller enligt andra internationellt erkända testmetoder och riktlinjer och, i fråga om försök på djur eller människor, med hänsyn till artikel 7 i förordning (EG) nr 1272/2008.

Om en bedömning har gjorts både enligt 1 och 2 ska testresultatet enligt 2 användas vid klassificeringen.

(Avfallsförordningen, SFS 2020:614, 2 kap. 2§)

Enligt *Avfallsförordningen* ska biologiska tester ges prioritet vid tolkning jämfört med enbart haltkriterier och kemiska analyser av innehållet i avfall eftersom kemisk analys aldrig kan svara på ett fast materials eller en komplex blandnings sammanvägda toxicitet. Biologiska tester ger därmed integrerade svar på provets påverkan på testorganismen och beaktar både biotiska och abiotiska faktorer som påverkar farliga ämnens biotillgänglighet och toxicitet.

Det pågår en översyn kring klassificering av Europas ytvatten inom ramdirektivet för vatten (EC2000/60/EG). Tidigare har främst gränsvärden, så kallade miljökvalitetsnormer utformats för prioriterade ämnen. Men, eftersom antalet miljöstörande ämnen kan vara många går det inte att formulera gränsvärden för alla relevanta ämnen för bedömning av vattenkvalitet. Listan på ämnen som tillkommer i gränsvärdeslistan blir därför allt längre. Även för icke prioriterade ämnen formuleras allt fler bedömningsgrunder för bedömning av miljökvalitet. I Sverige finns exempelvis en längre lista med bedömningsgrunder för så kallade särskilda förorenande ämnen (SFÄ), se Havs- och Vattenmyndighetens föreskrifter HVMFS 2019:25.

Eftersom det blir allt svårare och även mer kostsamt att analysera alla kemikalier som ingår i listorna är det därför naturligt att tillämpa effektbaserade metoder som ger ett integrerat svar på vattenkvalitet och kan användas för att avgöra om det förekommer negativ påverkan på testorganismer från en blandning av många ämnen i vattenmatrisen. Inom ramdirektivet för vatten har

det nyligen rekommenderats att effektbaserade metoder kan användas för statusbedömning, uppföljning och utvärdering av vattenkvaliteten vid genomförandet av förbättringsåtgärder².

Vid riskbedömning av förorenad mark kan platsspecifika förutsättningar som påverkar risker vägas in i bedömningen av hur farliga förekommande föroreningar är på platsen. Som exempel kan innehåll av organiskt material i mark (TOC) och grundvatten (DOC) vägas in för bedömning av hur laknings- och spridningsbenägna föroreningar är vid beräkning av sammanvägda plats-specifika riktvärden vilka ska ge en allmän skyddsnivå både avseende hälsa och miljö. Tillämpning av biologiska analysmetoder och ekotoxikologiska tester som del i miljöriskbedömning är hittills mycket sparsamt använda i svenska projekt kring förorenad mark. Inom Naturvårdsverkets kunskapsprogram *Hållbar Sanering* togs flera rapporter fram som vägledning och förslag till förbättring av undersökningsmetodik för komplicerade förorenade markförhållanden. I rapporten *Metodik för miljöriskbedömning av förorenade områden* ges en introduktion och handledning till miljöriskbedömning av förorenad mark³. Sammanfattningsvis förordar vägledningen en tillämpning av ekotoxikologiska tester som del i beslutsunderlag i alla steg av undersökning. Efter initiala screeningtester kan ytterligare tester krävas för att täcka olika ekologiska funktioner och för att beakta att olika tester har varierande känslighet för olika föroreningar. I ett fördjupat skede bör mer avancerade tester tillämpas, t.ex. reproduktionstester och flergenerationstester.

3.3 Från Förenklad till Fördjupad Riskbedömning

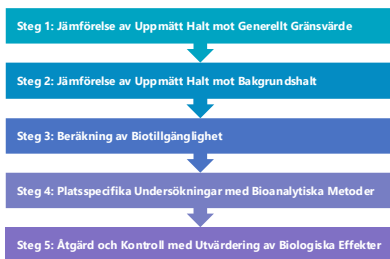
Riskkaraktärisering utförs i sin enklaste form genom att uppmätt koncentration, MEC (*Measured Environmental Concentration*) eller uppskattad koncentration, PEC (*Predicted Environmental Concentration*) jämförs (divideras) med PNEC-värdet för att räkna ut en riskkvot. När riskkvoten överstiger 1 finns en risk att negativa effekter på organismer i mediet ska uppträda och med ökande riskkvot ökar risken. När riskbedömningen konstaterat förekomst av risk kvarstår att värdera och hantera dessa vilket vanligen utmynnar i olika former av riskreducerande åtgärder. Men, med ett bättre underlag finns möjligheten att med större säkerhet avgöra om det förekommer effekter på levande organismer. Detta kan i vissa fall utmynna i att riskreducerande åtgärder inte behövs medan man i andra fall kan säkerställa att riskreducerande åtgärder måste genomföras. Om PNEC med höga säkerhetsfaktorer så kallade *Assessment Factors*, tillämpats i riskkaraktärisering och beräkning av riskkvot är det inte säkert att negativa effekter uppstår då det finns osäkerheter inbyggd i PNEC-värde och det generella tillvägagångssättet för riskbedömning. Men av praktiska skäl är det mycket användbart att kunna sälla/prioritera bort situationer där riskkvoten underskrider 1 trots de konservativa principer som metodiken bygger på. I fall där stora kostnader står på spel avseende vilka åtgärder och i vilken omfattning de behöver utföras, krävs mer underbyggda beslutsunderlag för att bedöma miljörisken. För detta krävs biologiska analysverktyg som har förmågan att ge integrerade svar kring miljömatriansens verkliga risk. Eftersom genetisk reglering är central för organismers svar på exponeringar möjliggör *Genotox Profile*® analyser ett säkrare underlag för biologisk riskanalys.

2 Brack, W., Aissa, S.A., Backhaus, T. et al. Effect-based methods are key. *Environ Sci Eur* 31, 10 (2019). <<https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>>

3 Naturvårdsverket 2009. Metodik för miljöriskbedömning av förorenade områden. Rapport 5928.

3.4 Stegvis Tillvägagångssätt i Riskbedömning

BioImpakts metodik lämpar sig mycket väl för fördjupad riskanalys med stegvist tillvägagångssätt (*Tiered Approach*), t.ex. som föreslagits i vägledningsdokument för beaktande av både lokala bakgrundshalter och biotillgänglighet som del i riskbedömningen för bl.a. metaller inom EUs ramdirektiv för vatten¹⁴. Varje steg innebär ökad komplexitet och datainsamling, och möjliggör att platsspecifika förhållanden kan lyftas in i riskanalysen. En illustration över olika steg ges i figur 3. BioImpakt ABs metodik ger fördjupade svar om integrerade risker för provmatrisen när mer underlag kring verkliga risker behöver inhämtas. Vidare kan metodiken användas för att följa en utförd åtgärd och att åtgärden ger mätbar riskreduktion och minskning av oönskade biologiska effekter.



Figur 3. Stegvis Tillvägagångssätt (*Tiered Approach*). Strategin tar hänsyn till bakgrundshalter och biotillgänglighet vid riskbedömningen. I varje steg jämförs uppmätta halter med aktuell bedömningsgrund. Överskrider uppmätta halter bedömningsgrunden går man vidare till nästa steg.

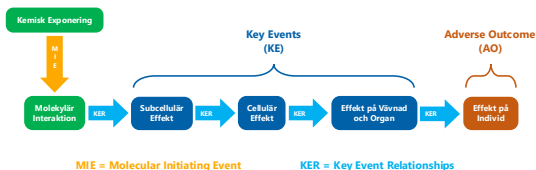
Hur många steg som ska ingå i ett stegvist tillvägagångssätt kan anpassas efter aktuellt objekt. Likaså kan specifika moment inom varje delsteg anpassas efter aktuellt objekt. Steg 3, Analys av biotillgänglighet, kan t.ex. utföras med BLM (*Biotic Ligand Model*), men även andra vetenskapligt validerade metoder är möjliga att använda. I steg 4 och 5 utgör *Genotox Profile*® ett kraftfullt verktyg för att identifiera ett platsspecifikt NOAEC (*No-observed-adverse-effect Concentration*) värde. Eftersom *Genotox Profile*® analyserna avgör den biologiska effekten så kan de med fördel även användas som ett screeningverktyg utan föregående kostsamma kemiska analyser.

14 WCA Environment/Eurometaux 2014. Technical guidance to implement bioavailability based environmental quality standards for metals. Version September 2014.

4 Från Exponering till Effekt

4.1 Kopplingen mellan Genreglering och Störningar på Individnivå

Ett toxiskt svar startar med en *Molecular Initiating Event* (MIE). Detta kan vara exponering för en oorganisk eller organisk förening. MIE följs av den molekylära interaktionen mellan föreningen som initierar MIE och en molekyl (receptoraktivering, proteinbindning, DNA-bindning) som resulterar i förändringar i en uppsättning nyckelhändelser (*Key Event*; KE). Det startar med förändringar i genuttryck som resulterar i förändrad proteinproduktion. Detta leder i sin tur till en förändrad signalkaskad som, om den överskrider homeostatisk kontroll, kan resultera i störningar hos celler, vävnader och organ. Dessa funktionsstörningar kan sedan leda till negativa effekter på organismen (*Adverse Outcome*; AO) såsom missbildning, organdysfunktion eller ökad dödlighet. Detta resulterar i en AO av relevans för riskbedömning på organism och/eller populationsnivå (figur 4).



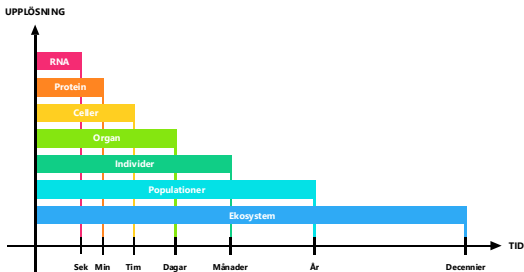
Figur 4: The Adverse Outcome Pathway (AOP). Det första steget i svaret på en kemisk exponering uppstår när kemikalien interagerar med cellens molekylära maskineri. Detta resulterar i en kaskad av effekter på ökad organismrisk nivå och kan resultera i en skadlig effekt på organismnivå.

För att en AO ska kunna inträffa måste en initial molekylär interaktion inträffa som leder till förändringar i genaktivitet. Medan AO är måttet på exponeringens skada/toxicitet är de initiala förändringarna i genaktivitet det direkta svaret på exponeringen.

Med *Genotox Profile*®-metoden är det möjligt att direkt mäta den första KE i kaskaden som leder från MIE till AO. Detta kan göras genom analys av gener som tillhör utvald AOP såsom metalltoxicitet, xenobiotisk toxicitet, stressrespons, reproduktion, metabolism, andning, cellcykel (cancer och apoptos). Genom att bestämma korrelationen mellan signifikanta förändringar i genuttryck och specifika AOP är det därigenom möjligt att identifiera den orsakande faktorn. Brist på korrelation mellan en AOP och dess MIE indikerar att det inte finns någon effekt orsakad av exponeringen på den AOP. En fördel med denna metod är att den möjliggör identifiering av orsaken till iakttagna effekter (AO) eftersom varje gen regleras av en specifik uppsättning receptorer och transkriptionsfaktorer.

4.2 Reglering av Biologiska Funktioner

DNA lagrar all nödvändig information som behövs för livet medan mRNA överför informationen till det cellulära maskineriet som syntetiserar proteiner. Proteiner utför arbetet i cellen och deras förekomst är beroende av mRNA-nivåerna i cellen eftersom alla proteiner bildas från mRNA. Eftersom mRNA är det första steget i cellens svar vid exponering för giftiga ämnen är det också en snabb, exakt och känslig biomarkör för exponering som ger information om de mekanismer som är ansvariga för responsen. Tidsåtgången för att analysera effekter på olika organisationsnivå visas i figur 5.



Figur 5: Tidsaxel för biologiska effekter. Visar tidspekter för uppkomst av fysiologisk påverkan på olika organisationsnivåer.

Organismer reagerar på förändringar i sin omgivning (detta inkluderar förekomsten av potentiellt toxiska ämnen) genom att aktivera olika fysiologiska funktioner. Dessa svar startar med en uppreglering eller nedreglering av gener vilket resulterar i förändrade mRNA nivåer. Detta kan ses som den initiala KE i kedjan. Den följs i sin tur av att proteiner bildas från mRNA. Proteinerna utför jobbet i cellerna och förändringar i proteinnivåer leder därför till förändringar (nya KE) i cellernas funktioner. Nästa KE är att förändringar i cellerna leder till ändrade funktioner hos olika organ vilket i sin tur leder till förändrad fysiologi hos individerna. Beroende på hur dessa förändringar påverkar individernas livsbetingelser kan det leda till förändringar i populationer vilket slutligen leder till påverkan på ekosystemet. Genom denna kaskad av KE kan potentiellt toxiska ämnen påverka ekosystem genom att de initialt ändrar organismens genuttryck. Eftersom olika gener påverkas av olika ämnen så utgör genuttrycket ett starkt indicie på vad som i slutändan påverkar ekosystemet.

5 Fördelarna med *Genotox Profile*[®]-metoden

Toxikogenomiska metoder möjliggör identifiering av molekylära svar på exponeringar för potentiellt giftiga ämnen genom analys av uttrycksnivåerna av specifika mRNA-molekyler.

- I. **ROBUST:** Analys på mRNA-nivå med kvantitativ realtids-PCR (*Quantitative real-time PCR*; qPCR) är en robust metod. En exponering som påverkar ett djur måste involvera biotillgängliga föreningar som kan aktivera eller hämma omvandlingen av DNA-information till mRNA. Detta ger information om svaren på exponeringen.
- II. **KVANTITATIV:** Analys på RNA-nivå är kvantifierbar. Eftersom mängden RNA är direkt proportionell mot aktiveringen av gener och sker snabbt efter en exponering är detta en lätt kvantifierbar metod.
- III. **MEKANISTISK:** Upplösningen av qPCR-matriser (inklusive många gener) möjliggör identifiering av orsaken som leder till effekten. Detta kan inte uppnås med traditionella metoder på individuell eller högre organisationsnivå.
- IV. **KÄNSLIG:** Förändringar på RNA-nivå är känsligare än analys av fysiologiska, morfologiska eller beteendemässiga effekter på nivån för enskilda organismer eller högre. Detta beror på att förändringar i RNA är det första steget i organismens svar på exponering.
- V. **KOMPLEXA BLANDNINGAR:** Genom att använda den biologiska qPCR-metoden kan effekter upptäckas, även om de orsakas av komplexa blandningar, där flera föreningar i låga doser fungerar på ett additivt, synergistiskt eller antagonistiskt sätt.
- VI. **ANDRA FÖRDELAR:** Metoden är mindre benägen för falska positiva (eller negativa) svar. Metoden är snabb. Metoden är relativt billigare än motsvarande fysiologiska analyser som kräver längre tid och därmed fler arbetstimmar att utföra.

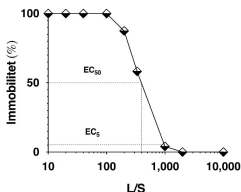
I *Genotox Profile*[®] ingår de centrala gener som är involverade i reglering av cellens försvar mot toxiska ämnen och reglering av reproduktion. Urvalet av gener kan dock anpassas till specifika exponeringsförhållanden, till exempel exponering för kända giftiga ämnen, genom att lägga till gener som är kända för att svara på en specifik förorening.

Metoden möjliggör snabb, robust och känslig detektion av molekylära svar och kan användas för att analysera de toxiska effekterna av vattenprover eller vattenlakningar från jord och avfall. Vidare ger den information om koncentrationen av ett ämne eller testvätska vid vilken toxiska effekter börjar uppstå före observationer av reproduktions- eller toxiska effekter vid högre organisationsnivåer, vilket minskar behovet av att använda säkerhetsfaktorer vid toxicitetsbedömning.

6 Presentation och Tolkning av *Genotox Profile*®-resultat

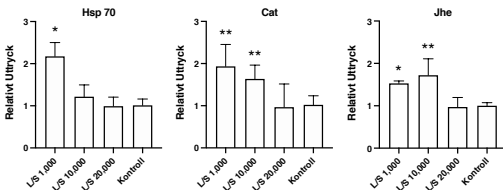
6.1 Exempel 1: Analys av Lakvatten från Fast Avfall

I exemplet nedan exponerades *Daphnia magna* för en spädningsserie av lakvatten efter kläckning i 96 timmar. Först bestämdes den akuta toxiciteten genom att utföra en 96h akut toxicitetsanalys där inhiberande koncentration (IC) av exponeringen testas och IC₅₀- och IC₅-värden tas fram. Resultaten av en sådan analys visas i figur 6.



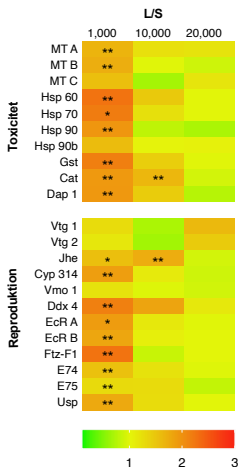
Figur 6: Akut toxicitetstest. 96h immobiliseringstest utfördes på nykläckta *Daphnia magna* med lakvatten från bottenaska. Det torra materialet lakades ut med 10 volymer vatten (flytande till fast 10; L/S 10).

Baserat på information om akut toxicitet gjordes en *Genotox Profile*®-analys vid koncentrationer som motsvarade IC₅ och spädningar därav. En detaljerad bild för tre gener visas i figur 7.



Figur 7: Genuttryck för Hsp 70, Cat och Jhe. En detaljerad bild av uttrycket av gener efter exponering kan fås genom att presentera materialet i ett stapeldiagram. Här ges exempel på uttrycket av tre gener som även ingår i heat map-figuren. Den statistiska analysen är utförd med Student's T-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) och $n=4$.

För att ge en samlad bild av påverkan på samtliga gener i en *qPCR* array använder vi en *Heat map* där generna presenteras med en färgkod som visar på upp- eller nedreglering och där den statistiska signifikansen hos förändringen inkluderas (figur 8).



Figur 8: Heat map-presentation av resultat efter analys med Genotox Profile®. Uppreglerade gener visas i rött och nedreglerade gener visas i grönt. Gener som inte är reglerade visas i gult. Statistisk signifikans bestämdes med Student's T-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) och $n = 4$.

En tolkning av resultaten ovan visar att det vid EC₅ fortfarande vid L/S 1,000 förekommer en viss immobilisering. Detta återspeglas i de starka reaktionerna hos de analyserade generna vid L/S 1,000. Efter en ytterligare en tiofaldig utspädning av lakvatten till L/S 10,000 förekom fortfarande påverkan på tre gener, kopplade till oxidativ stress (*cat*) och reproduktion (*jhe*). Eftersom effekterna på dessa tre gener var starka ($p < 0.01$) kvarstod kraftiga effekter av lakvattnet. Men, efter en ytterligare 50% spädning till L/S 20 000 upphörde alla effekter på genuttrycket och lakvattnet kan därmed anses vara ofarligt vid denna utspädning. Resultaten visar vid vilken koncentration som effekterna upphör och detta har betydelse för t.ex. vilken spädning ett material kommer att ha innan det når en recipient.

Utifrån effektnivåer vid olika spådningsgrader finns det ännu inget harmoniserat system för att avgöra till vilken avfallskategori ett lakvatten från ett testat fast material ska hänföras. Ett förslag till indelning i tre klasser har förts fram av Deventer och Zipperle⁵⁾. Deras bedömningssystem är ett sätt utifrån spådningsgrad och uppmätta biologiska effekter tolka och indela grad av effekt på en relativ skala för olika provmaterial som genomgått toxicitetstestning.

Klassificering av Avfall

KLASS 1 *Ikke toksiskt og er dermed ett ikke-farligt avfall*

- *krit.* i) *lakvattnet oppvisar ej mätbar effekt inom spådningsintervallet L/S 1-10*
ii) *lakvattnet är ikke-genotoxiskt*

KLASS 2 *Något toksiskt, **gränsar till att vara ett farligt avfall*

- krit.* i) *lakvattnet oppvisar toxicitet inom spådningsintervallet L/S 10-100*

KLASS 3 *Mycket toksiskt og er dermed ett farligt avfall*

- krit.* i) *lakvattnet oppvisar toxicitet vid en spåkning over L/S 100*

(Baserad på Deventer & Zipperle, 2004)

Den utspådningsgrad som Naturvårdsverket tillämpar i sin riktvärdesmodell för förorenade områden i ett scenario för känslig markanvändning är enligt antaget standardvärde satt till 14 gånger för transport från jordporvatten till grundvatten och 4000 gånger spådnings gällande transport från jordporvatten till ytvatten⁶⁾. Dessa gäller under vissa givna förutsättningar som t.ex. att storleken på det förorenade området är 50x50 m. För transport från jordporvatten till grundvatten förutsätts att det är 0 m till en dricksvattenbrunn som ska skyddas i ett scenario där dricksvatten via enskild brunn bör beaktas. Brunnen förutsätts kunna påverkas negativt av förorenat material via utlakning till grundvatten som sprids till brunnen och att denna ligger utanför, men i direkt anslutning till det förorenade området. Vidare antas att akvisfärens mäktighet är 10 m, grundvattnet har en gradient på 3 %, jorden på bedömt område har en hydraulisk

* Utvärderingskriterier som används i *Genotox Profile®*-metoden i förhållande till respektive avfallsklassificering

** Avfall av klass 2 utgör en gränsson mellan ikke-farligt og farligt avfall og måste bedömas från fall till fall

5 Deventer, K & Zipperle, J. (2004) Ecotoxicological characterization of waste - Method development for determining the ecotoxicological (H14) risk criterion. Herausgegeben von der, Landesanstalt für Umweltschutz, Baden-Württemberg, Karlsruhe 2004

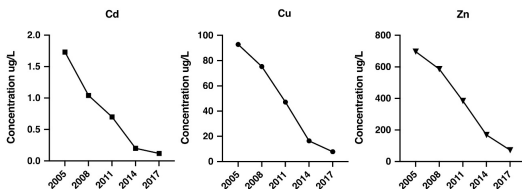
6 Naturvårdsverket 2009, Rapport 5976, Riktvärden för förorenad mark - Modellbeskrivning och vägledning

konduktivitet på 1×10^{-5} m/s (stor genomsläpplighet) samt en grundvattenbildning på 100 mm/m². Ändras sådana platsspecifika förutsättningar för nämnda parametrar ändras även utspädningsgraden vilket användaren av riktvärdesmodellen bör vara medveten om vid tillämpning av verktyget.

Till Naturvårdsverkets rapport medföljer ett excelbaserat beräkningsprogram som kan illustrera detta om man nyttjar platsspecifika indata i beräkningsmodellen. En låg L/S-kvot indikerar ett koncentrerat lakvatten nära källan till det material som lakats och med ökande avstånd kommer även utspädningsgraden öka för ett lakvatten som avgår från en specifik källa eller material. En L/S-kvot på 2 brukar nämnas som en nivå som avspeglar jordporvatten i närområdet till ett förörenat jordmaterial eller avfall som lakar. Bedömning om utspädningsförhållanden och risker i förhållande till ett material som utlakar farliga ämnen måste bedömas för varje enskilt ärende och riskbedömning. Av praktiska skäl har ändå en standard framtagits för beredning av lakvätska för testning av fasta material enligt SS-EN 14735:2005⁷. Där lakas prov enligt standardförfarande vid L/S-kvot 10 varefter lakvätskan testas i en spädningsserie. BioImpact AB utgår från den europeiska standarden vid testning av fasta material, men testar även autentiska vatten eller kan anpassa lakmetodik för att avspegla relevanta förhållanden i enskilda projekt.

6.2 Exempel 2: Analys av Recipientvatten efter Sanering av Gruvområde

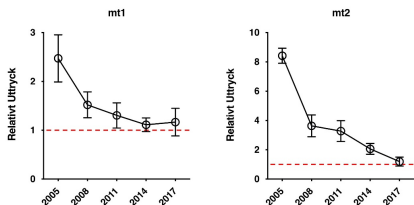
I exemplet nedan exponerades zebrafiskar och humana HepG2-celler för vatten från en recipient före och efter att urlakningen från en nedlagd gruva hade åtgärdats. Metallnivåerna i recipienten analyserades och det visade att nivåerna av kadmium, koppar och zink blev kraftigt reducerade med tid efter utförda efterbehandlingsåtgärder (figur 9). Zinknivåerna sjönk från 696 µg/L till 71,6 µg/L, kopparnivåerna sjönk från 92,8 µg/L från till 7,8 µg/L och kadmiumnivåerna sjönk från 1,7 µg/L till 0,1 µg/L. Samtliga värden ligger över de nivåer som anses vara säkra.



Figur 9: Tungmetallhalter i recipientvattnet. Koncentrationen av kadmium (Cd), koppar (Cu) och zink (Zn) under tidsperioden 2005 till 2017.

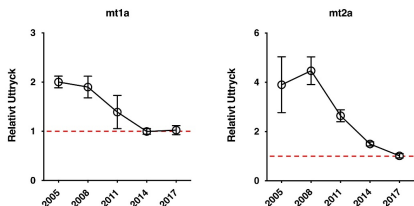
7 EN 14735:2005 Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. Europastandarden EN 14735:2005 gäller som svensk standard. SS-EN 14735:2005. Karakterisering av avfall – Preparering av avfallsprover för ekotokologisk testning

För att avgöra effekter på genuttryck hos zebrafisk och människa utfördes en *Genotox Profile®*-analys med avseende på uttrycket av *metallothioinein* (*mt*), en genfamilj vars uttryck direkt regleras av tungmetaller såsom kadmium, koppar och zink. För zebrafisk användes nykläckta fiskar som exponerades till dag 6 efter kläckning (d.v.s. n=6). För människa användes cellinje, HepG2, som har sitt ursprung i en levercancer hos en 15 år gammal argentinsk pojke. HepG2-celler är väl studerade och används bland annat för att studera hur olika miljögifter metaboliseras och vilka gener som de aktiverar. Den är därför väl lämpade för studier av miljögifters påverkan på människa. I analyserna jämförs uttrycket vid de olika tidpunkterna med genuttrycket i ett icke-förorenat referensvatten.



Figur 10: Genuttryck av *mt1* och *mt2* hos zebrafisk. Bakgrundsnivån visas med en röd linje.

Analys av genuttrycket hos zebrafisk visar att det inte kvarstår någon aktivering av *mt1* och *mt2* generna år 2017 (figur 10). Detta visar att de metaller som finns kvar i recipienten 2017 inte längre kan påverka genuttrycket hos zebrafisk.



Figur 11: Genuttryck av *mt1a* och *mt2a* hos mänskliga HepG2-celler. Bakgrundsnivån visas med en röd linje.

Analys av genuttrycket hos mänskliga HepG2-celler visar, i likhet med resultaten från zebrafisk, att det inte kvarstår någon aktivering av *mt1A* och *mt2A* generna år 2017 (figur 11). Detta visar att de metaller som finns kvar i recipienten 2017 inte längre påverkar genuttrycket hos människa.

En tolkning av resultaten ovan visar att det vid starten av studien 2005 förelåg kraftiga effekter på recipienten vilket visade sig av den kraftiga induktionen av *mt* hos både zebrafisk och människa. Vid slutet av studien, 2017, hade tungmetallnivåerna sjunkit kraftigt men totalhalterna låg fortfarande på en hög nivå. Däremot upphörde induktionen av *mt* hos både zebrafisk och människa vilket indikerar att de biotillgängliga nivåerna av zink, koppar och kadmium var låga och inte påverkade vare sig zebrafisk eller HepG2-cellerna från människa.

Exemplen visar att känsliga molekylärbiologiska tester har förmågan att avgöra om exponeringen som organismen utsätts för leder till en effekt på organismen. Genom att kombinera *Genotox Profile*®-analyser med kemiska analyser och fysiologiska analyser kan man få en fördjupad förståelse av riskproblematik och därmed avgöra om den analyserade situationen utgör en fara för djur och människor.

7 Fördjupande Information

7.1 Gener som Ingår i Genotox Profile®-analysen

Tabell 1: Gener som ingår i Genotox Profile®-analysen presenterad i de föregående figurer.

Effekt	Förkortning	Fullständigt Namn	Genernas Funktion
Toxisk Respons	MT	Metallothionein	Metals and Free Radicals
	Hsp 60	Heat Shock Protein 60	General Stress Response
	Hsp 70	Heat Shock Protein 70	General Stress Response
	Hsp 90	Heat Shock Protein 90	General Stress Response
	Hsp 90b	Heat Shock Protein 90b	General Stress Response
	Gst	Glutathione-S-transferase	Conversion of Toxic Compounds
	Cat	Catalase	Reducing Free Radicals
	Dap 1	Death-associated Protein 1	Apoptosis
Reproduktion	Vtg 1	Vitelogenin 1	Egg Yolk Protein
	Vtg 2	Vitelogenin 2	Egg Yolk Protein
	Jhe	Juvenile Hormone Esterase	Juvenile Hormone Inactivation
	Cyp 314	Cytochrome P450 314	20-Hydroxyecdysone Synthesis
	Vmo 1	Vitelline Membrane Outer Layer 1	Oogenesis
	Ddx 4	Dead-box RNA Helicase 4	Germ Cell Development
	EcR A	Ecdysone Receptor A	Molting
	EcR B	Ecdysone Receptor B	Molting
	Ftz-F1	Fushi Tarazu Factor 1	Sex Differentiation
	E74	E74	Ecdysone Regulated
	E75	E75	Regulates Molting Cycles
	Usp	Ultraspiracle	Juvenile Hormone Receptor

7.2 Molekylärbiologisk Ordlista

- * **DNA – (D)eoxyribo(n)ucleic (A)cid:** Informationen om vilka molekyler som finns i en cell lagras i form av DNA i cellens kromosomer.
- * **mRNA – (m)essenger (R)ibo(n)ucleic (A)cid:** Mellansteg i omvandlingen av information som lagras i DNA till produktion av proteiner.
- * **PCR – (P)olymerase (C)hain (R)eaction:** Metod för att amplifiera mängden DNA eller mRNA så att det går att mäta.
- * **qPCR – (Q)uantitative Real-time (PCR):** Används för direkt kvantifiering av mängden av specifika mRNA.
- * **Gener:** Informationen om varje molekyl som finns i cellen lagras i sin egen gen i form av en DNA sekvens.
- * **Proteiner:** Uppbyggda av aminosyror, utför arbetet celler.
- * **Toxikogenomik:** Studier av hur geners uttryck (mRNA) påverkas av exponeringar med möjlig toxisk effekt.
- * **Genotox Profile®:** Varumärke hos BioImpakt för toxikogenomisk analys av samband mellan exponering och effekt.

7.3 Artiklar för Ytterligare Fördjupning

- Altshuler I, Demiri B, Xu S, Constantin A, Yan ND, Cristescu ME. 2011. An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. *Integr Comp Biol*. 51, 623-33.
- Carvalho, RN., Arukwe, A., Ait-Aissa, S... Modig, C., Olsson, PE... Lettieri, T. 2014. Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: how safe are they? *Toxicol Sci*. 141(1):218-33
- George, SG. and Olsson, P.-E. 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Biomonitoring of coastal waters and estuaries. Kramer, KJM (ed.) CRC Press Inc. Library of Congress, USA.
- El Marghani, A., Pradhan, A., Seyoum, A., Khalaf, H., Ros, T., Forsberg, LH., Nermark, T., Osterman, L., Wiklund, L., Ivarsson, P., Jass, J., Olsson, PE. 2014. Contribution of pharmaceuticals, fecal bacteria and endotoxin to the inflammatory responses to inland waters. *Sci. Tot. Environ*. 488-489:228-35
- Maldonado-Alameda, A., Giro-Paloma, J., Rodríguez-Romero, A., Serret, J., Menargues, A., Andrés A., Chimenos, JM. 2021. Environmental potential assessment of MSWI bottom ash-based alkali-activated binders. *J Hazard Mater*. 416:125828
- Olsson, P.-E. 1998. Disorders associated with heavy metal pollution. In: Fish diseases and disorders, vol. 2 non-infectious disorders. Leatherland, JF and Woo, PTK (eds.). CABI publishing, New York, USA.
- Pradhan, A., Ivarsson, P., Ragnvaldsson, D., Berg, H., Jass, J., Olsson PE. 2017. Transcriptional responses of zebrafish to complex metal mixtures in laboratory studies overestimates the responses observed with environmental water. *Sci Total Environ*. 584-585:1138-1146.
- Rai N, Sjöberg V, Forsberg G, Karlsson S, Olsson PE, Jass J. (2019) Metal contaminated soil leachates from an art glass factory elicit stress response, alter fatty acid metabolism and reduce lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ*. 651:2218-2227.
- Rodrigues JD., Silvestre, JD., Viegas, CA., Ahmed, JJ., Kurda, R., de Brito J. 2020. Evaluation of the Ecotoxicological Potential of Fly Ash and Recycled Concrete Aggregates Use in Concrete. *Appl. Sci*. 10, 351
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analysing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc*. 3, 1101-1108
- Seyoum, A., Pradhan, A., Jass, J., Olsson PE. 2020. Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Sci Total Environ*. 737, 139682.

8 Kontaktinformation

Kontaktperson

Per-Erik Olsson, VD

Tel. 070-683 14 41

E-post: per-erik.olsson@bioimpakt.com

BioImpakt

E-post: Info@bioimpakt.com

Webbsida: <https://bioimpakt.com>

