



Från kemikalier till effekter och identifiering av bakomliggande mekanismer

PER-ERIK OLSSON
PROFESSOR I BIOLOGI
CENTRUM FÖR LIVSVETENSKAP
ÖREBRO UNIVERSITET

OCH

BIOIMPAKT AB

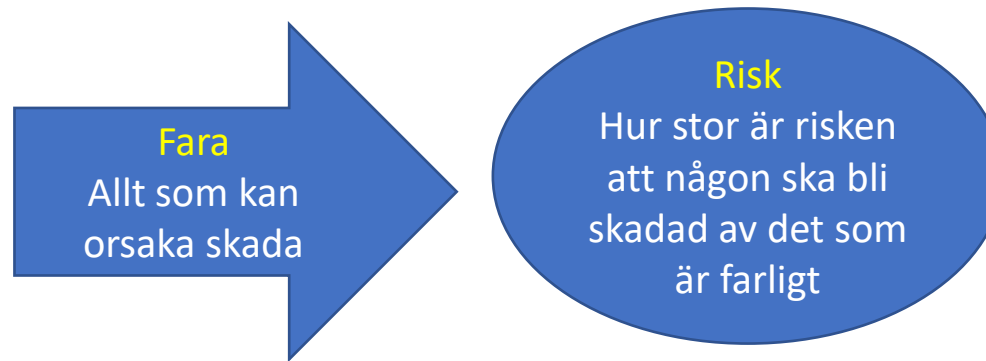


Vad är effektbaserad analys?

- Effektbaserade analyser bygger inte på identifiering av enskilda ämnen som finns i miljön genom analytisk kemi, utan snarare på att fastställa effekter som dessa ämnen orsakar i biologiska system.
- Effektbaserad analys möjliggör inkludering av okända toxiska ämnen.
- Fördjupad kunskap om molekylära principer för toxicitet krävs för att utveckla lämpliga biologiska testsystem för effekt driven analys.

Vad utgör en risk?

- **Sola docis fecit venenum** – Det är dosen som gör giftet (Paracelsus 1493-1541)
- Men, det är bara den biotillgängliga dosen som orsakar effekt!



Bedömningen av en aktiv substans farlighet

- **Persistens** – förmåga att stå emot nedbrytning i miljön.
- **Bioackumulation** – ansamling (i olika vävnader, ofta fettvävnad) hos organismer.
- **Toxicitet** – giftighet för organismer.
 - Akut toxicitet
 - Kronisk toxicitet

Hur utvärderas risk?

- **Nuläget** – Till stor del baserat på kemiska totalhalter och riktvärden baserade på laboratoriestudier med enskilda ämnen i rent vatten.
 - Använder ”osäkerhetsfaktorer” men kan inte identifiera orsak
 - Saknar platsspecifik bedömning
- Vi behöver öka relevansen i riskanalysen genom att ta både den kemiska och biologiska komplexiteten i beaktande.
 - Platsspecifika metoder krävs
 - Analys av genreglering bästa sättet att avgöra koppling mellan exponering och effekt
 - Utvärdering av populationer i miljön för att ta adaptation i beaktande
 - Endast genom att mäta biologisk aktivitet kan vi få svar på hur olika organiska och oorganiska ämnen påverkar biota. (Nu under etablering inom EU)

Organisationer med verktyg för riskbedömning

- SIS - Svenska Institutet för Standarder. Bildades 1922. År 2001 blev ytterligare en milstolpe i svensk standardiserings historia, när sju organisationer slogs samman till SIS, Swedish Standards Institute. 2019 bytte SIS tillbaka till sitt svenska namn. SIS fyllde 100 år i fjol.
- ISO - International Organization for Standardization. Oberoende icke-statlig internationell organisation där 168 nationella standardorganisationer är medlemmar. SIS deltog i bildandet av ISO 1947.
- OECD - The Organisation for Economic Co-operation and Development. 38 länder deltar från samtliga kontinenter. I Europa organiserat av ECHA (European chemical agency). Bildades 1960
- CEN - Comité Européen de Normalisation. CEN är en oberoende och icke-statlig standardiseringsorganisation med 34 medlemsländer, som företräds av sina standardiseringsorgan. Bildades 1961
- Det finns tre europeiska standardiseringsorganisationer som officiellt erkänts av EU och Efta, nämligen CEN, Cenelec (Comité Européen de Normalisation Électrotechnique) och Etsi (European Telecommunications Standards Institute)

OECD standards för vanliga analyser

Vatten – Ofta baserat på zebrafisk (*Danio rerio*) eller *Daphnia magna* (kräftdjur)

- OECD 202: *Daphnia magna* acute toxicity
- OECD 210: Fish, Early-life Stage Toxicity
- OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction
- OECD 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET)



Blir ca 5 cm

Sexuell fortplantning

Livslängd ca 2 år

Fortplantning efter 2-4 månader



Honor ca 5 mm

Hanar ca 2 mm

Asexuell fortplantning

Kan växla till sexuell fortplantning vid stress


Livslängd ca 1 månad

Fortplantning efter 10 dagar

Standard protokoll för *Daphnia magna*

ursprungligt från 1994 med mindre uppdateringar





202
Adopted:
4 April 1984

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

"*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test"

The following Test Guideline includes two parts:
Part I - the 24h EC 50 acute immobilisation test
Part II - the reproduction test (at least 14 days).

202
Adopted :
13 April 2004

***Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test**

211
Adopted:
21st September 1998

211
Adopted:
3 October 2008

211
Adopted:
2 October 2012

***Daphnia magna* Reproduction Test**



**Försummar variationer
i vattenkemi**



**Osäkerheter angående modeller för
toxicitetsbedömning**



**Brist på heltäckande
örståelse för toxicitet**

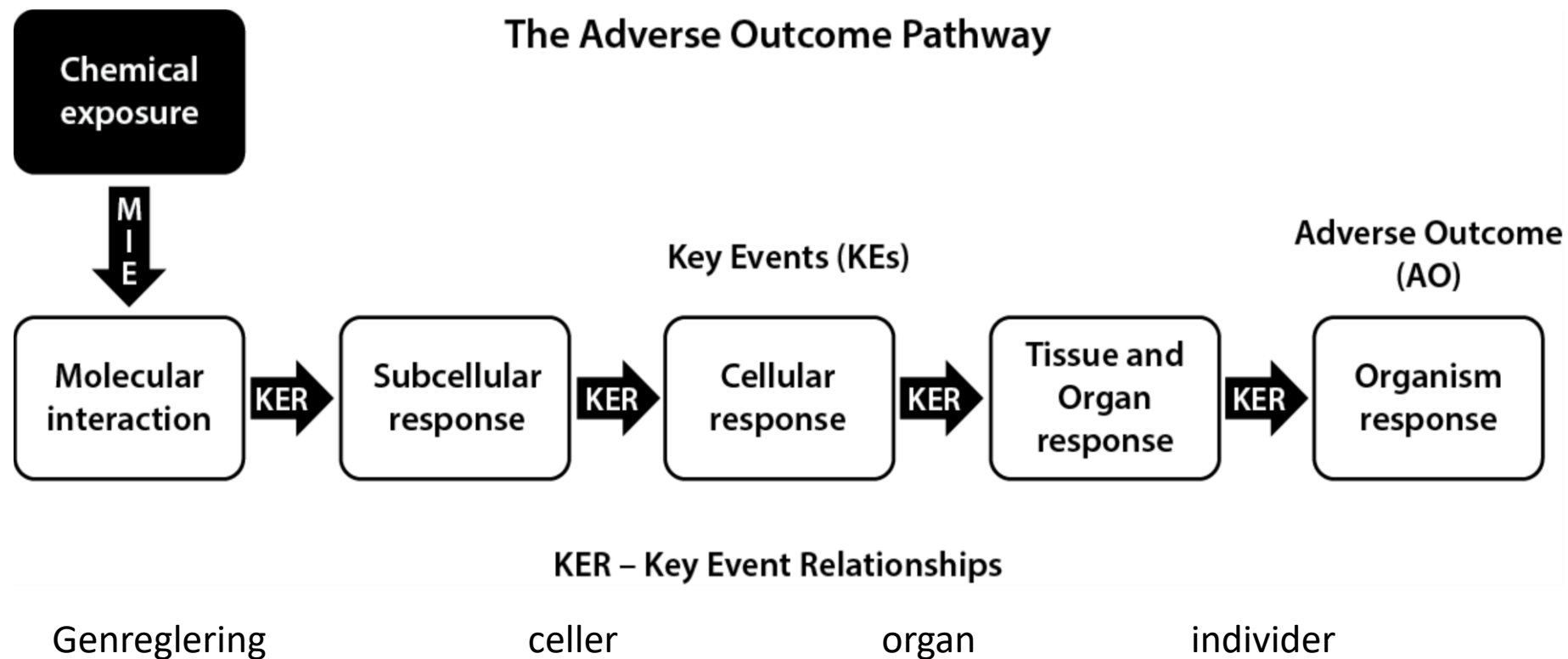
Osäkerheter angående modeller för toxicitetsbedömning

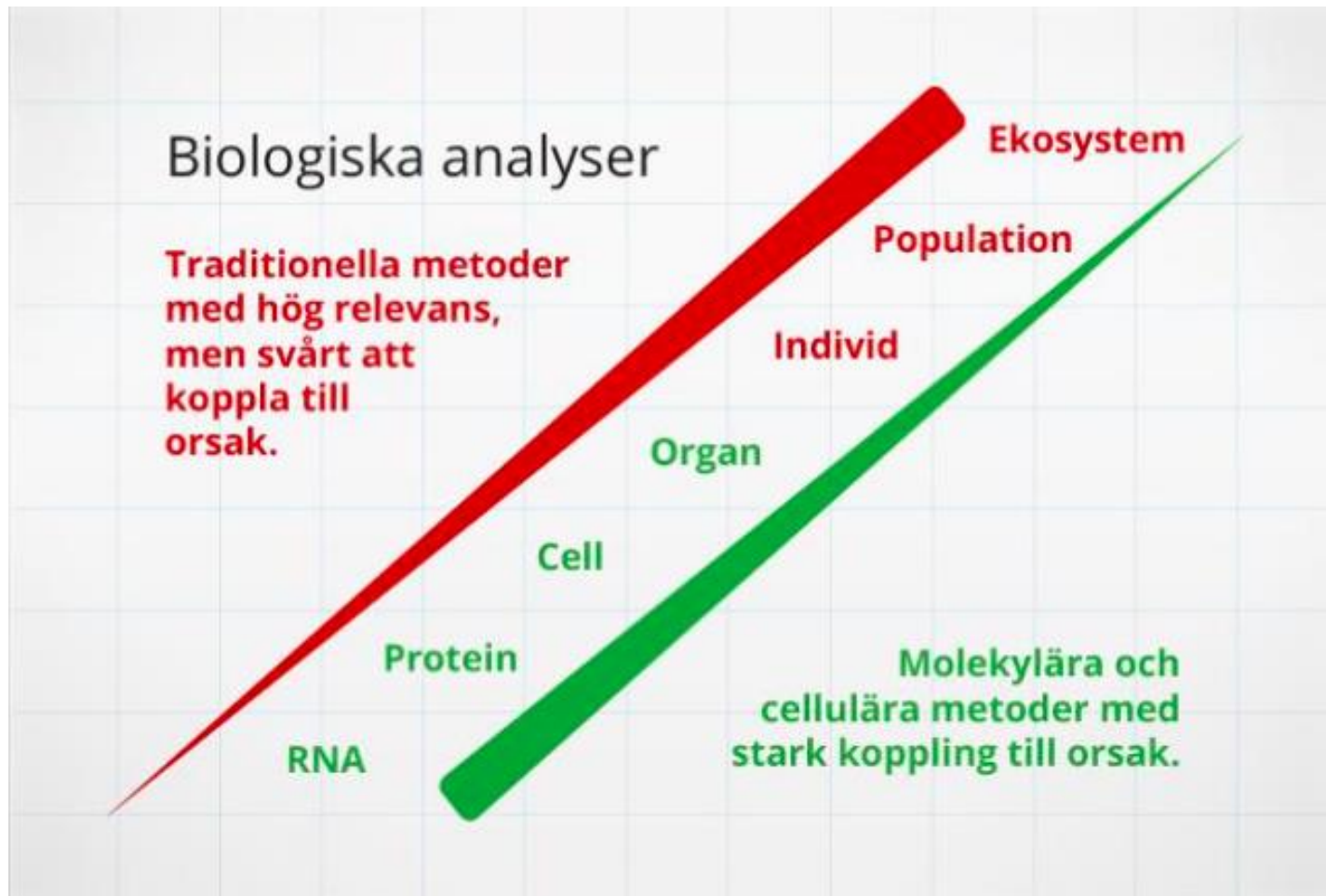
- LC_{50} Koncentration där 50 % av testorganismerna upplever dödlighet.
- Används för att fastställa exponeringsgränser och fastställa säkerhetsriktlinjer.
- **Nackdelar**
- Binär bedömning av toxicitet (säker eller osäker för en given koncentration) representerar inte existerande spektrum
- Ingen hänsyn till abiotiska miljövariationer

Brist på heltäckande förståelse för förekommande toxicitet

- Standardiserade tester använder mortalitet som en endpoint och saknar ramverk för verkningsmekanism (MoA) för att förklara den underliggande mekanismen.
- Kan kompletteras med framsteg inom genuttrycksanalys.
- Upptäckter av nya biomarkörer samt undersökning av reglerade gener och vägar skulle resultera i en mer omfattande förståelse av förekommande toxicitet.

Koppling exponering till effekt





Biologiska system påverkas av upptag, fördelning och utsöndring

Adaptation ingår i organismers försvar mot skadlig exponering

- motverkar effekterna uppkommer genom att
- skyddande gener aktiveras, och kan öka i antal (genduplicering)

Den första europeiska standarden för användandet av genuttryck i riskbedömning

SIS-CEN/TS 17883:2022

Environmental characterization of leachates from waste and soil using reproductive and toxicological gene expression in *Daphnia magna*

Teknisk specifikation
SIS-CEN/TS 17883:2022

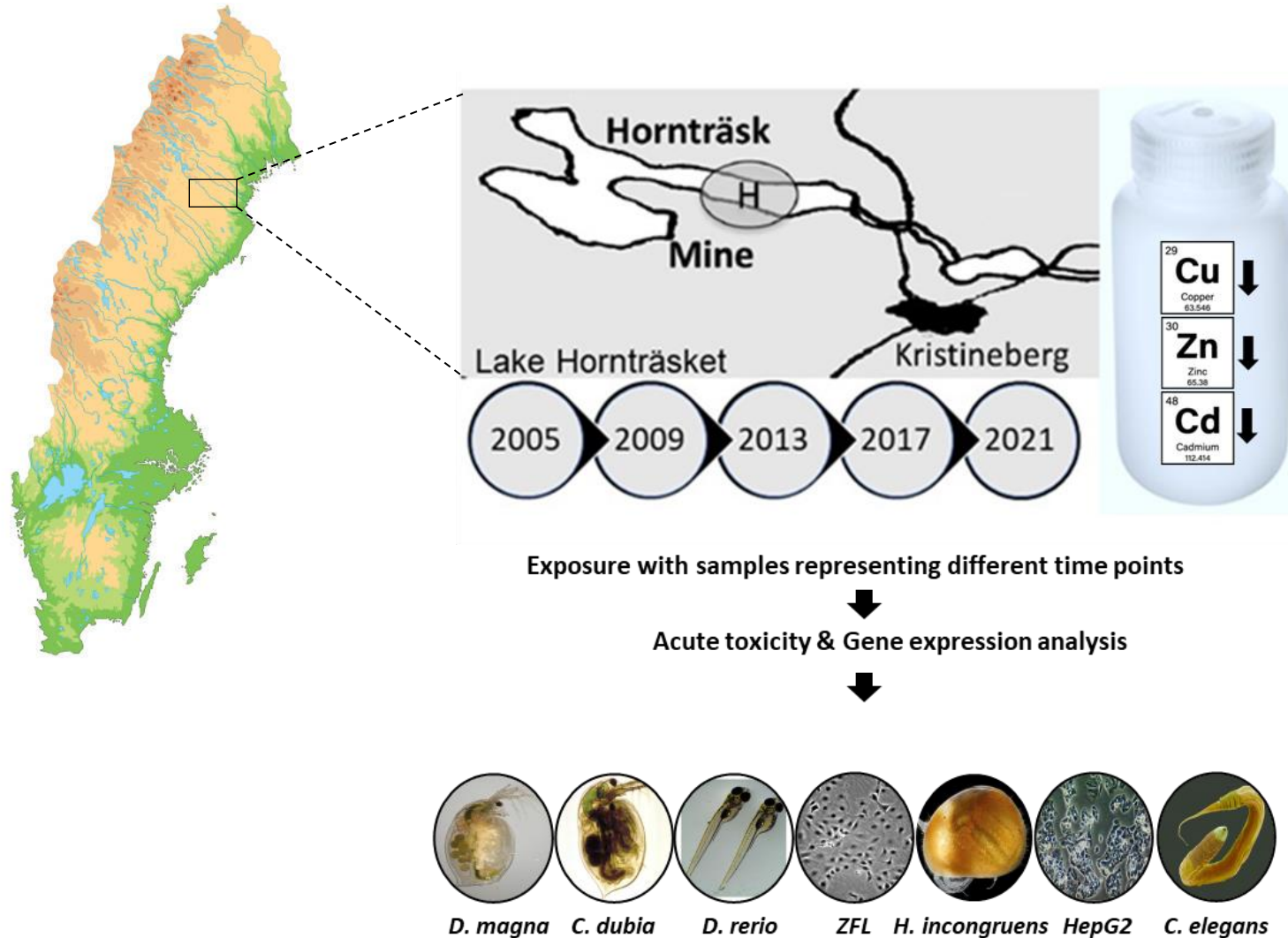
Miljökaraktärisering av lakvatten från avfall och jord med hjälp av reproduktivt och toxikologiskt genuttryck i *Daphnia magna*

Environmental characterization of leachates from waste and soil using reproductive and toxicological gene expression in *Daphnia magna*

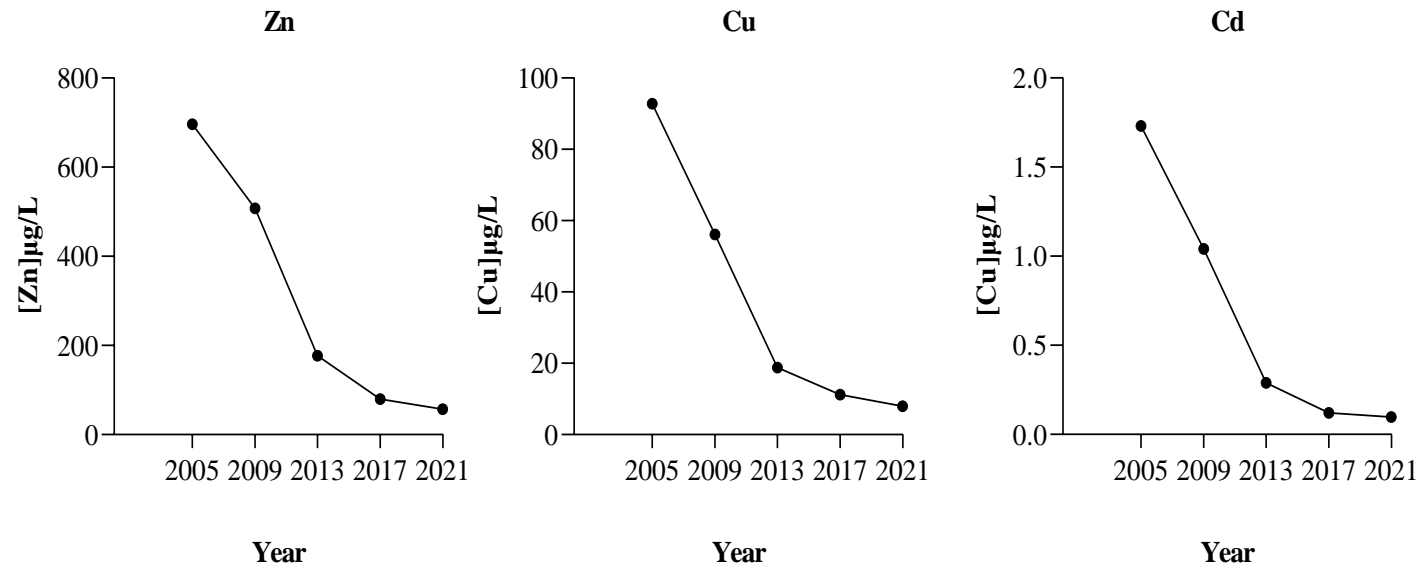


sis Svenska
Institutet för
Standarder

Exempel: Bedömning av artskillnader i metallkänslighet



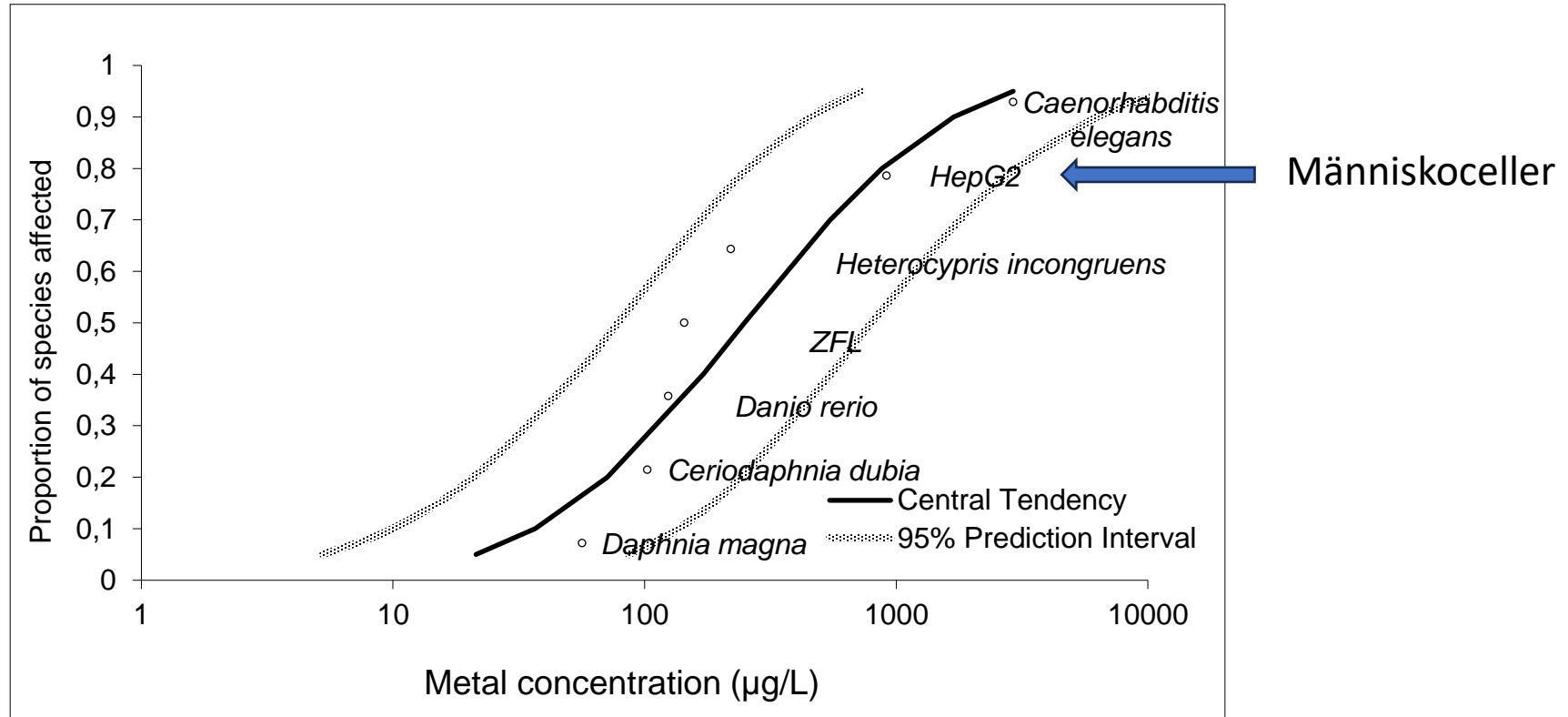
Metallkoncentrationer över tid



Spårmetaller i Hornträsket (2005-2021)

Zn-, Cu- och Cd-nivåerna minskade med tiden som ett resultat av sanering.

Akuttoxicitet för olika arter

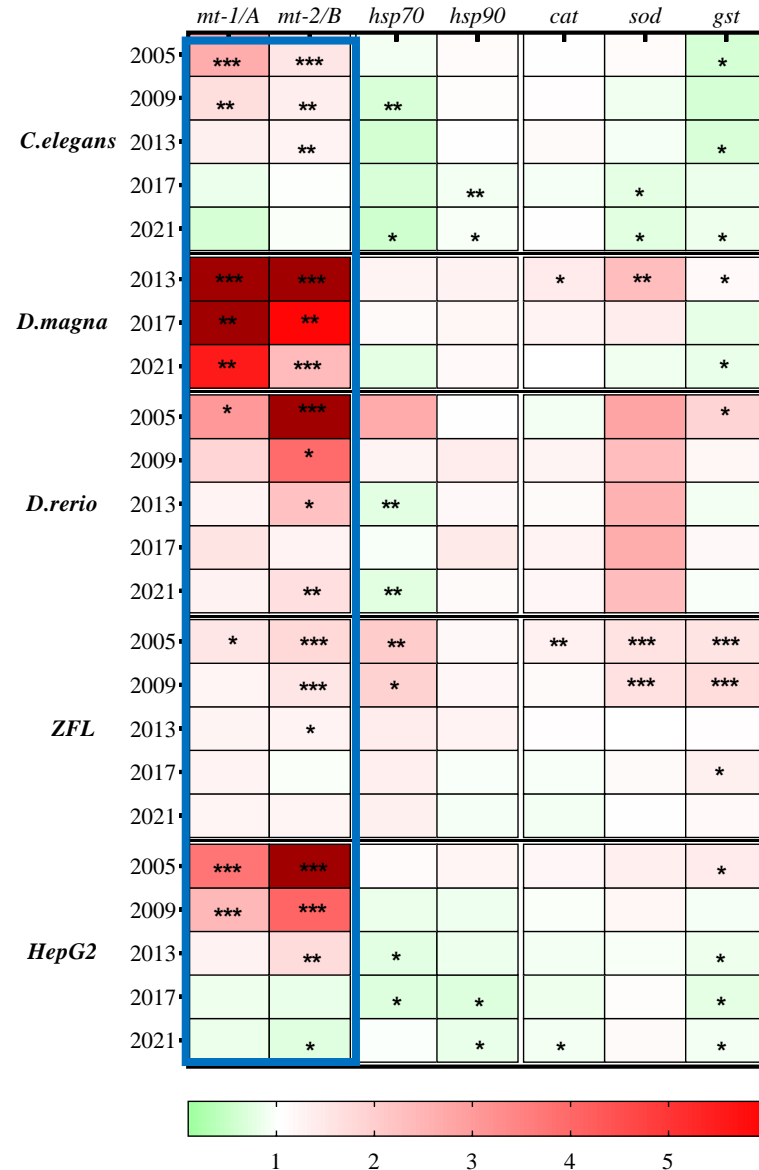
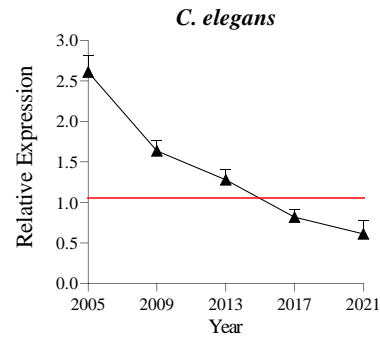
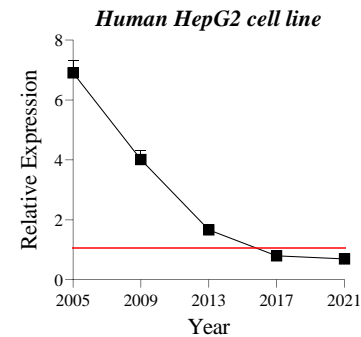
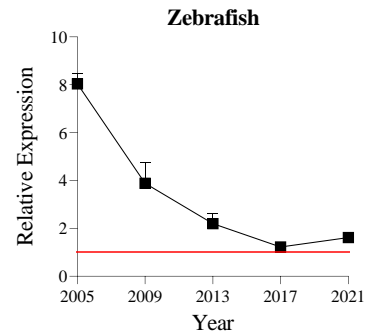
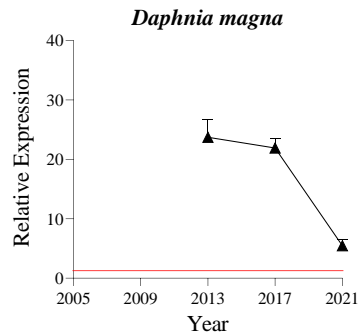


artkänslighetsfördelning (SSD), som visar fördelningen av EC₅₀ för modellorganismer exponerade för Zn, Cu och Cd blandade metaller rekonstituerade i Horsträskvatten, med 95 % konfidensintervall (prickade linjer)

***D. magna* var den mest känsliga arten medan *C. elegans* visade sig vara minst känslig.**

Likheter i genuttryck mellan arterna

Metallothionein (MT) uttryck



MT1/A och MT1/B är metallreglerande gener som återfinns hos alla arter.

Påslag i alla testade arter med uppreglering som motsvarar deras känslighet.

Visar att metallresponsen kan extrapoleras mellan arter för att avgöra om en påverkan förekommer

Exempel: Effekter av zink kopplat till dos och vattnets hårdhet

Riktvärdet (HaV, 2015) är 5,5 µg/l avser den biotillgängliga fraktionen av zink



Kiimatievanjärvi

Hardness = 1.23 mg/L

Zinc = 3.1 µg/L

Soft

H= 50 mg/L

Zn µg/L

3.1
5
10
25
50
100
500

Medium

H= 100 mg/L

Zn µg/L

3.1
5
10
25
50
100
500

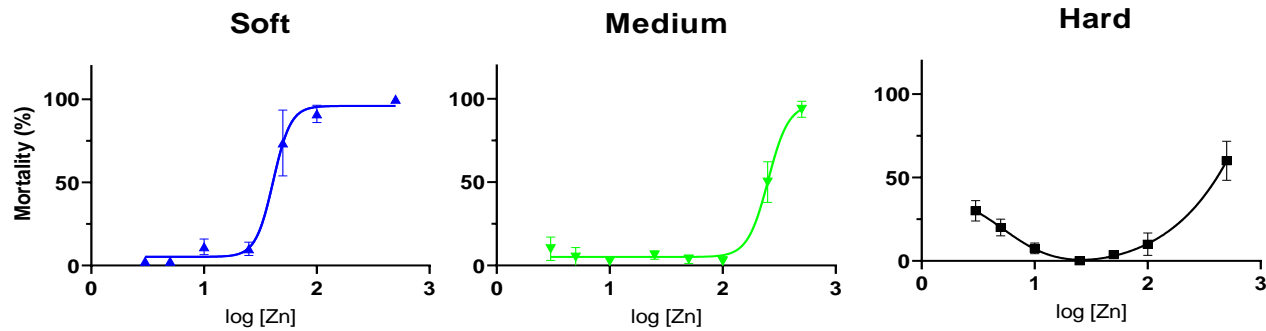
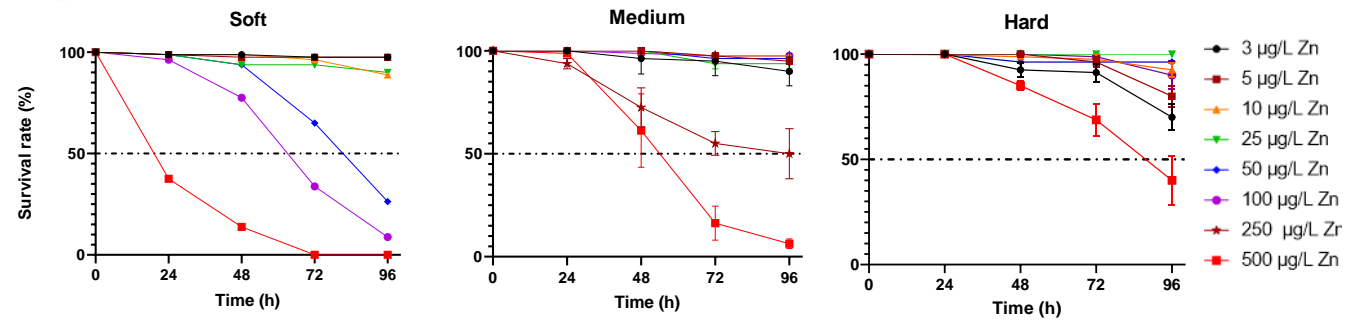
Hard

H= 200 mg/L

Zn µg/L

3.1
5
10
25
50
100
500

Zink och mortalitet hos *Daphnia magna*



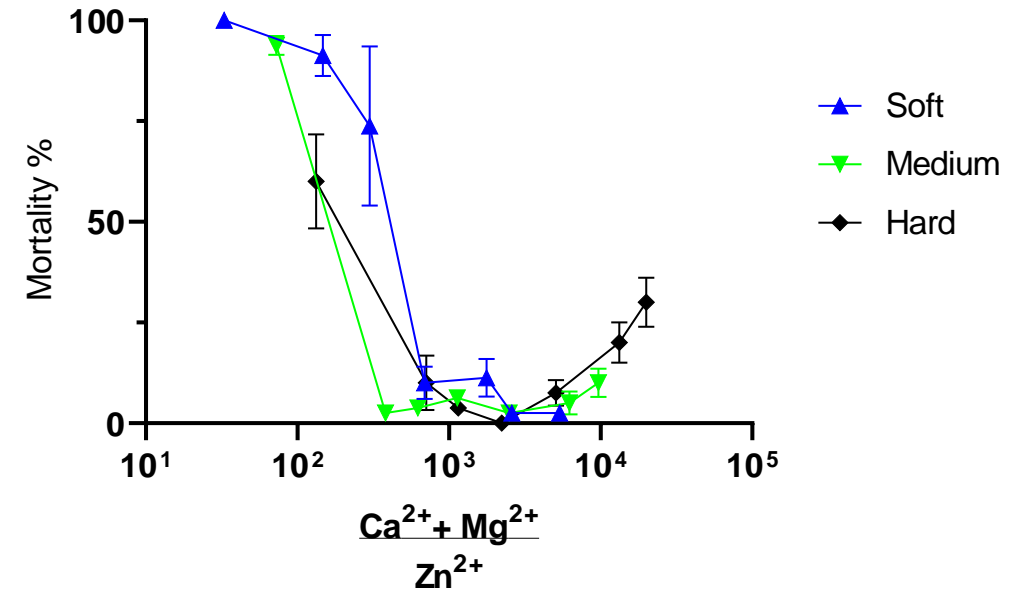
Över 25 ug/L ger toxicitet

Under 5 ug/L ger brist

Över 100 ug/L ger toxicitet

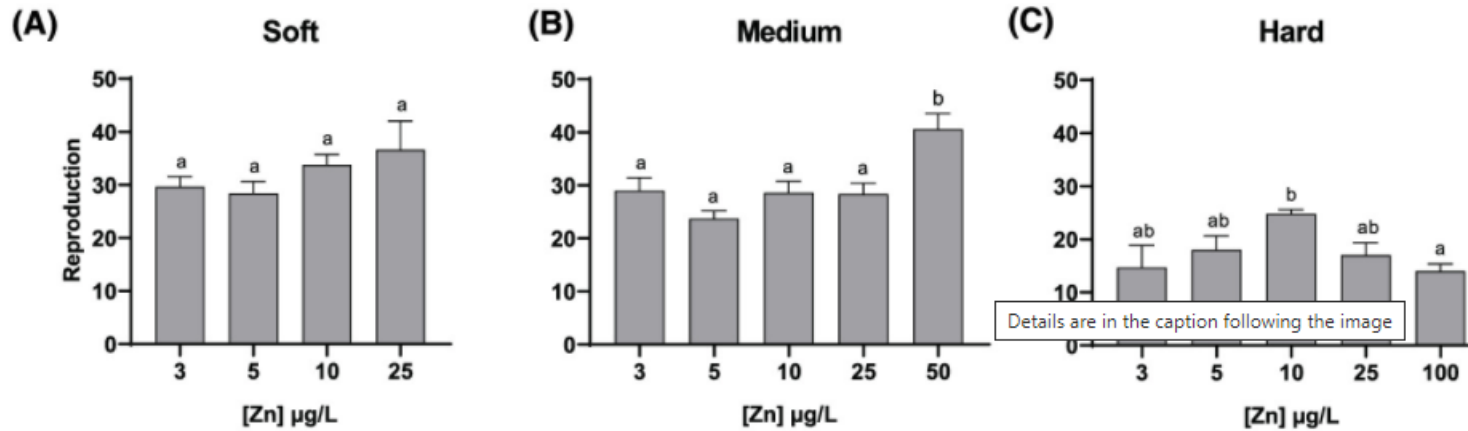
Under 10ug/L ger brist

Över 100ug/L ger toxicitet

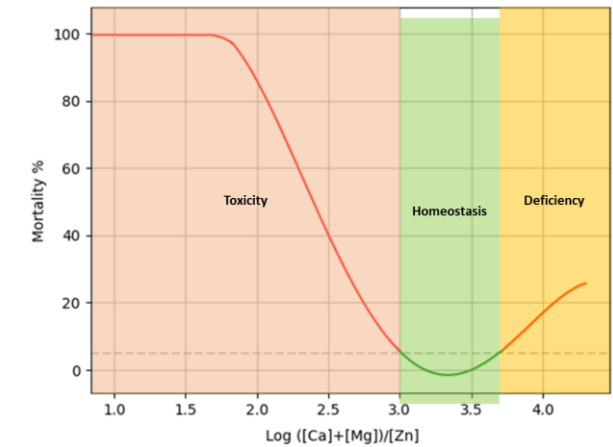
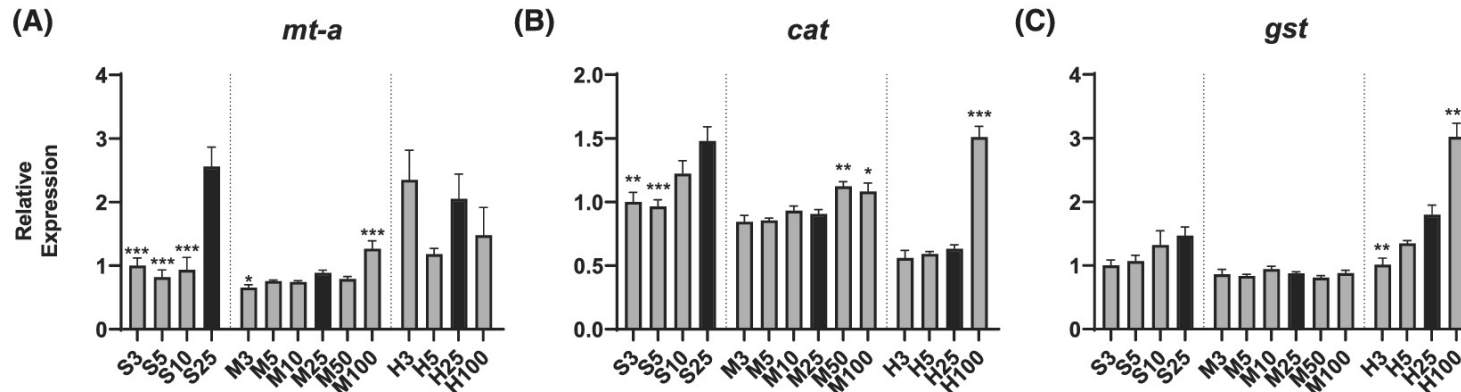


Koppling genuttryck till effekt

Fortplantning



Genuttryck

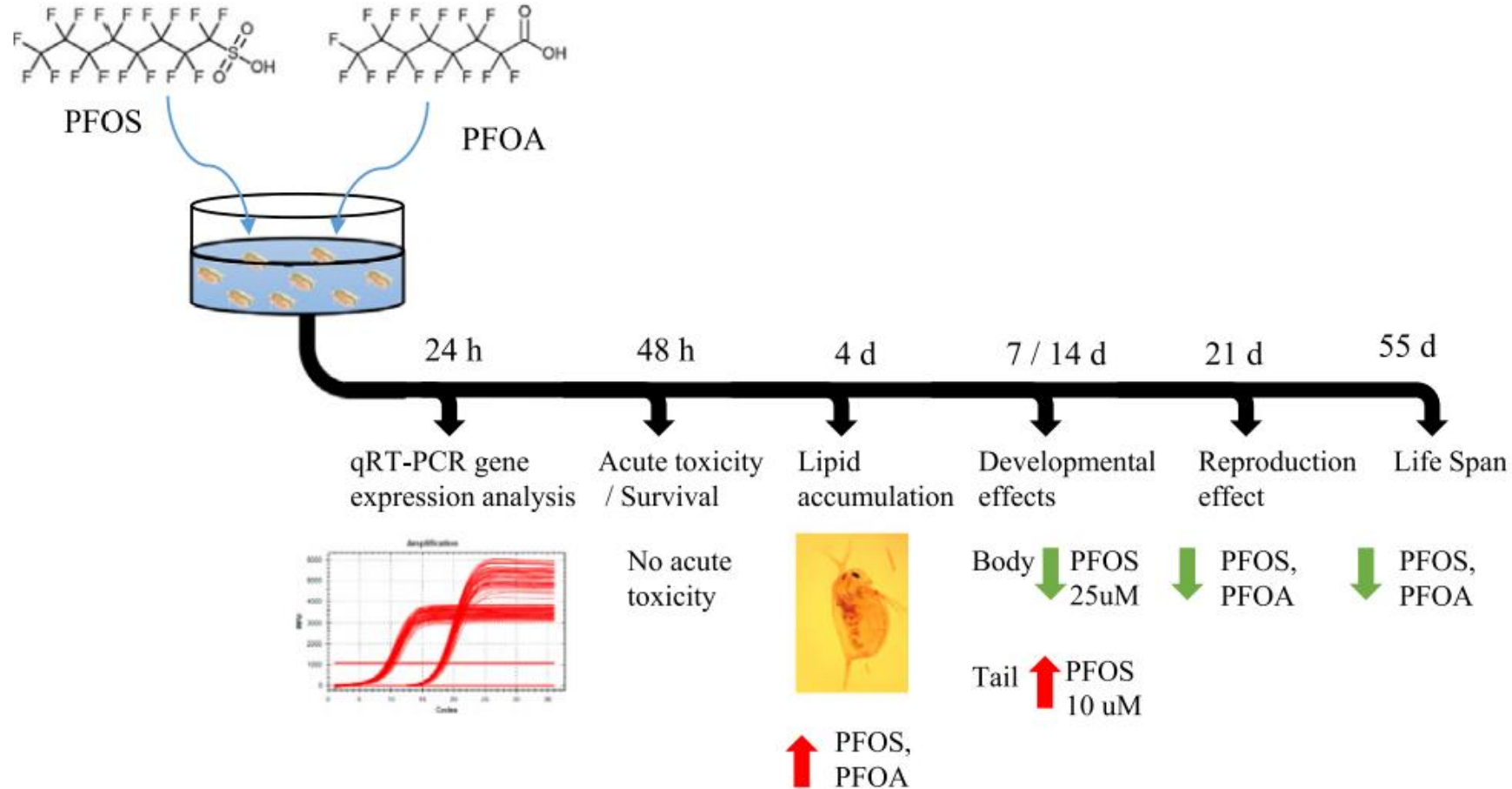


10-50 ug var optimalt för fortplantning. Därför användes ett medelvärde på 25ug Zn/L som riktmärke för genuttryck

Slutsats zink

- *Daphnia magna* har använts för att ta fram det Svenska gränsvärdet
- *Daphnia magna* klarar vatten ned till en hårdhet på ca 25 mg CaCO₃/L
- För bra fortplantning behöver *Daphnia magna* 25 µg Zn/L. 5 gånger högre än gränsvärdet!

Ett aktuellt exempel: qPCR samstämmighet med fysiologiska analyser



Sammanfattning av testmetoder

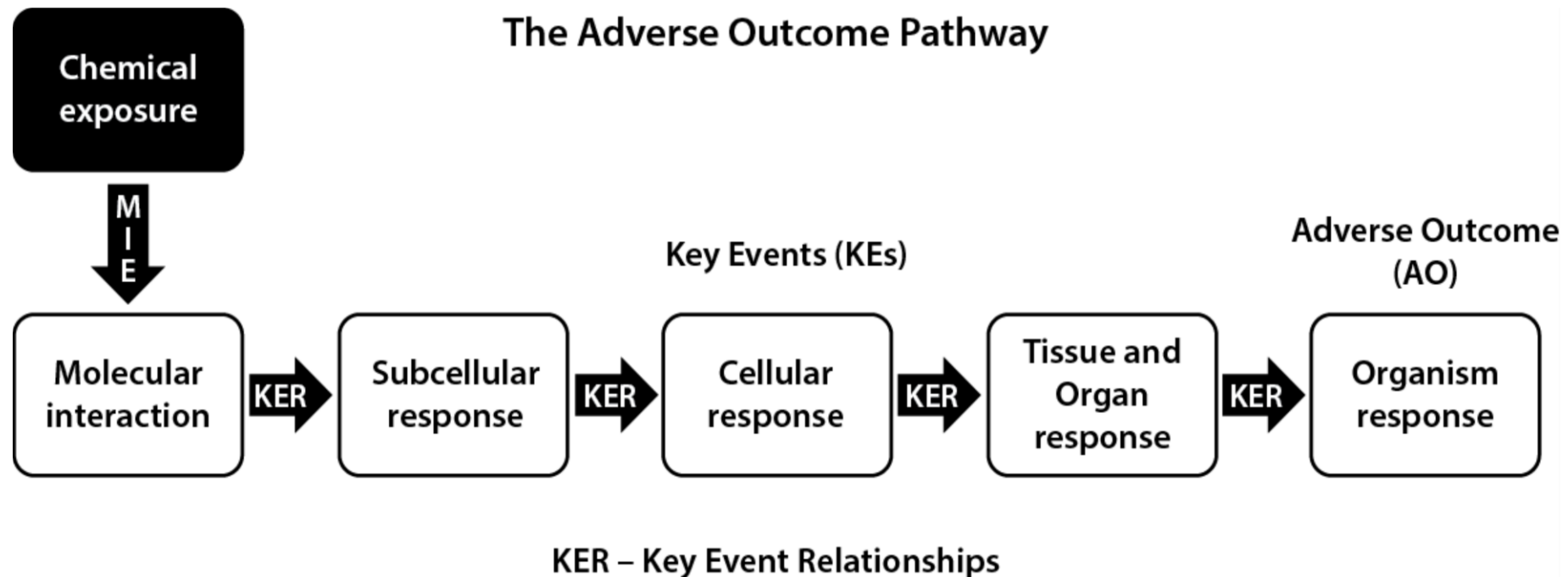
- Kemi – Ger endast svar på kemiska ämnens halter. **Ingen koppling till biologiska effekter**
- Biologi – Ger svar på organismernas respons
- Fysiologiska metoder – **Svag koppling till orsak**
 - Akuttoxicitet (Daphnia magna OECD 202)
 - Teratogenes (Zebrafisk FET assay, OECD 236)
 - Fortplantning (Daphnia magna, OECD 211)
 - Livslängd, Lipidmetaboism, Beteende
- **Genanalyser – stark koppling till orsak**
 - Genanalys enligt SIS-CEN/TS 17883:2022: Environmental characterization of leachates from waste and soil using reproductive and toxicological gene expression in Daphnia magna

Hur kan man tänka sig att använda de olika biologiska metoderna?

- Ett stegvis förfarande är att föredra
- Kemisk analys är ett naturligt första steg
- Om provet överskrider de etablerade gränsvärdena kan OECD 202 (akuttoxicitet Daphnia), OECD 210 (reproduktionstest Daphnia) och OECD 236 (embryotoxicitet hos zebrafisk) vara användbara som första val för att avgöra om några biologiska effekter förekommer. Svara dock inte på vad som orsakar effekten i ett komplext prov
- För att koppla effekten till orsak/exponering i en komplex miljö krävs genanalyser. Genanalyserna är känsligare än de fysiologiska analyserna och visar om organismen svarar på exponeringen med att ändra sina fysiologiska funktioner (innan de kan ses direkt)

Kan vi koppla effekter i organismen till effekter på populationer i miljön?

Effekter av adaptation till exponering?
eDNA och eRNA



Tack för att ni lyssnat!