

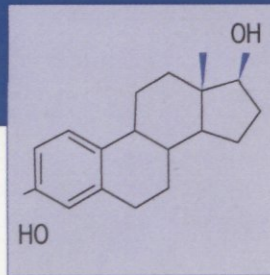
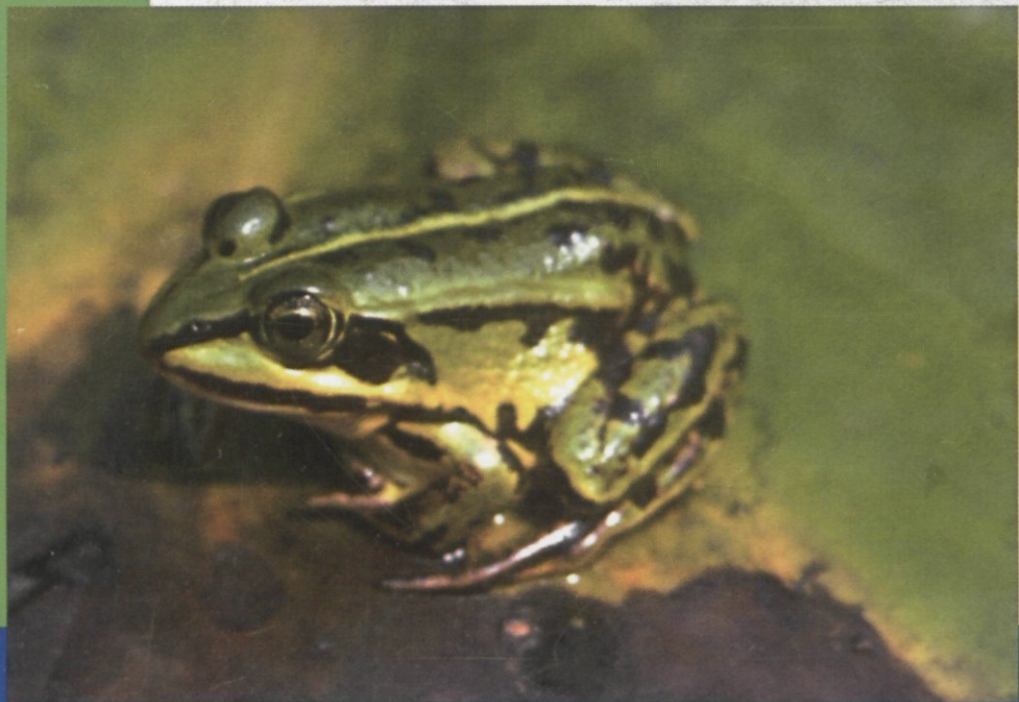
48

188

ALTERRA

Effecten van hormoonverstorende stoffen op kikkers

M.B.E. Lee-de Groot
N.W. van den Brink
A. van der Hout
P.A.F. de Bie
A.H.P. Stumpel
A.T.C. Bosveld



Alterra-rapport, Wageningen 2003

761019

WAGENINGENUR

Effecten van hormoonverstorende stoffen op kikkers

Effecten van hormoonverstorende stoffen op kikkers

**M.B.E. Lee-de Groot
N.W. van den Brink
A. van der Hout
P.A.F. de Bie
A.H.P. Stumpel
A.T.C. Bosveld**

Alterra-rapport

Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, 2003

REFERAAT

Lee-de Groot M.B.E., van den Brink N.W., van der Hout A., de Bie P.A.F., Stumpel A.H.P. en Bosveld A.T.C., 2003. *Effecten van hormoonverstorende stoffen op kikkers*. Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport, 77 blz., 28 fig., 19 tab., 50 ref.

Omdat de ontwikkeling van amfibieën sterk hormoon-gereguleerd is, is onderzocht in hoeverre de kikker een geschikte indicator is voor hormoonverstorende stoffen in het milieu. Hiertoe zijn in het laboratorium blootstellingsstudies uitgevoerd met kikkerlarven en volwassen *Rana* kikkers, welke algemeen in Nederland voorkomen. Onderzocht is in hoeverre oestradiol (E2) en tetrachloordibenzo-p-dioxine (TCDD) de ontwikkeling, overleving, lichaams- en orgaangewichten, geslachtsorganen en -hormonen, en specifieke cytochroom P450 enzymen beïnvloeden. Ook is de onderlinge samenhang van deze effectparameters bestudeerd.

In een in-situ veldstudie zijn de overleving en ontwikkeling van larven van *Rana* kikkers, die zijn uitgezet in de sterk verontreinigde Volgermeerpolder en een niet-verontreinigde referentielokatie, beschouwd. Naast dit alles zijn juveniele *Rana* kikkers gevangen uit beide lokaties, waarin interne concentraties dioxine-achtige stoffen en activiteiten van specifieke cytochroom P450 enzymen zijn bepaald.

Trefwoorden: Kikkers, *Rana*, biomarker, mortaliteit, overleving, TCDD, E2, TEQ, EROD, aromatasen, geslachtshormonen, geslachtsorganen

ISSN 1566-7197

© 2003 Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte,
Postbus 47, NL-6700 AA Wageningen.
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: info@postkamer.nl

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Alterra.

Alterra aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alterra is de fusie tussen het Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN) en het Staring Centrum, Instituut voor Onderzoek van het Landelijk Gebied (SC). De fusie is ingegaan op 1 januari 2000.

Inhoud

Inhoud	5
Woord vooraf	9
Samenvatting	11
1 Algemene Inleiding	13
1.1 Hormoonverstorende stoffen	13
1.2 Effectparameters voor hormoonverstorende stoffen	13
1.3 Vraagstelling en plan van aanpak	14
2 Algemeen gebruikte methoden	17
2.1 Biochemische respons-parameters	17
2.1.1 Ethoxyresorufine-O-dealkylase (EROD) activiteit in levers	17
2.1.2 Aromatase-activiteit in hersenen	17
2.1.3 Eiwitbepalingen	18
2.1.4 Steroidhormonen	18
2.2 Histologie	18
2.3 H4IIE-bioassay/TEQ bepaling	19
3 Effecten van TCDD en oestradiol in larven van <i>Xenopus leavis</i>	21
3.1 Inleiding	21
3.2 Materiaal en Methode	21
3.2.1 dieren, huisvesting, blootstelling en sectie	21
3.2.2 Mortaliteit en ontwikkelingsstadium	22
3.2.3 Eiwit, EROD en aromatase	22
3.2.4 Histologie van de gonaden	23
3.2.5 Statistiek	23
3.3 Resultaten	23
3.3.1 mortaliteit en geslachtsverhouding	23
3.3.2 EROD	24
3.3.3 Aromatase	25
3.3.4 Histologie van de geslachtsorganen	25
3.4 Discussie	28
4 Effecten van TCDD en oestradiol in larven van de heikikker (<i>rana arvalis</i>)	29
4.1 Inleiding	29
4.2 Materiaal en Methode	29
4.2.1 Dieren, huisvesting, blootstelling en sectie	29
4.2.2 Mortaliteit en ontwikkelings stadium	30
4.2.3 Eiwit, EROD en aromatase	30
4.2.4 Statistiek	31
4.3 Resultaten	31

4.3.1	Ontwikkeling en mortaliteit	31
4.3.2	EROD	32
4.4	Discussie	33
5	Effecten van hormoonverstorende stoffen op volwassen kikkers	35
5.1	Inleiding	35
5.2	Materiaal en Methoden	35
5.2.1	Vangen en taxonomie van de kikkers	35
5.2.2	Huisvesting	36
5.2.3	Blootstelling	36
5.2.4	Stimulatie van voortplantingsgedrag	37
5.2.5	Bepalen van actuele blootstellingsconcentraties	38
5.2.5.1	Monsternamen en extractie	38
5.2.5.2	H4IIE-bioassay/TEQ bepaling	38
5.2.5.3	Bepalen van concentraties E2 in water	38
5.2.6	Sektie	38
5.2.7	Eiwit, EROD en aromatase	39
5.2.8	Bepalingen van steroidhormonen in plasma	39
5.2.9	Histologie	39
5.2.10	Bepalingen van TEQ in vetweefsel	39
5.2.11	Statistiek	39
5.3	Resultaten	40
5.3.1	Blootstellingsconcentraties	40
5.3.2	Voeding, lichaamsgewicht en organen	40
5.3.3	Voortplantingsgedrag en geslachtorganen	42
5.3.4	Biochemische responsparameters	44
5.3.5	Interne dosis-effect relaties	45
5.4	Discussie	46
5.4.1	Voeding en gewicht van de kikkers	46
5.4.2	Aktuele concentraties E2 en TCDD in water en opname van TCDD door kikkers	46
5.4.3	EROD als biomarker bij kikkers	47
5.4.4	Reproductie-gerelateerde responsparameters	48
5.5	Conclusies met betrekking tot volwassen groene kikkers als indicator voor hormoonverstorende stoffen	52
6	Pilot experiment in situ blootstelling en ontwikkeling van larven van de groene kikker <i>Rana esculenta</i>	53
6.1	Inleiding	53
6.2	Materiaal en Methode	53
6.3	Resultaten	53
6.4	Discussie	54
7	Vergelijkende studie naar biomarkerresponsen in de groene kikker uit de Volgermeer en een referentielokatie	55
7.1	Inleiding	55
7.2	Materiaal en Methode	55
7.2.1	Vangen van kikkers en sekties	55
7.2.2	Eiwit, EROD en aromatase	56

7.2.3 H4IIE-bioassay/TEQ bepaling	56
7.2.4 Statistiek	56
7.3 Resultaten	56
7.4 Discussie	58
8 Evaluatie met betrekking tot kikkers als indicator voor hormoonverstorende stoffen en biomarkers	61
Literatuur	63
<i>Aanhangsels</i>	
1. Bepalen van de blootstellingsconcentraties TCDD en E2 in water	69
2. Afkortingen	77

Woord vooraf

Het onderwerp van hormoonverstorende stoffen (endocrine disruptors) in het milieu staat de laatste jaren volop in de belangstelling. Internationaal komen een groeiend aantal onderzoeksresultaten beschikbaar die wijzen op de aanwezigheid in het milieu van verontreinigingen met een hormoonverstorende werking.

Uit een landelijk onderzoek naar estrogene stoffen is gebleken dat oestrogene stoffen in het oppervlaktewater door heel Nederland voorkomen. In agrarische gebieden waar mest geproduceerd en gebruikt wordt en in ruw stedelijk afvalwater zijn de natuurlijke hormonen 17 β -oestradiol (E2) en oestron aangetoond. Het synthetische hormoon 17-ethinyloestradiol ("de pil") wordt in een enkel geval ook nog in het effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties aangetroffen. In verschillende industriële afvalwaterstromen worden pseudo-oestrogenen aangetroffen (o.a. alkylfenolen, bisphenol-A, gebromeerde brandvertragers (PBB's) en ftalaten).

Wanneer de mogelijke effecten van (pseudo)oestrogenen of andersoortige hormoonverstorende stoffen beschouwd worden, lijken amfibieën door hun fysiologie en levenswijze een kwetsbare groep. In het larvale stadium kan via het water een langdurige blootstelling plaatsvinden, en wanneer er hormoonverstorende stoffen in het spel zijn, kunnen deze mogelijk een grote invloed op de hormoongestuurde metamorfose en de latere geslachtelijke ontwikkeling hebben. Om die reden zijn amfibieën mogelijk een goede indicator voor verstoringen door deze stoffen.

Het in dit rapport beschreven onderzoek omvat een vijftal studies die zijn uitgevoerd bij Alterra (en het voormalige IBN) in de periode 1999-2002 in het kader van strategische expertise ontwikkeling (SEO-35333 en SEO-11704). Deze studies waren gericht op het aantonen van deze gevoeligheid en ontwikkelen van een bio-assay waarin diverse biochemische en functionele effectparameters in kikkers kunnen worden gerelateerd aan de mate van blootstelling aan hormoonverstorende stoffen.

Om een indruk te krijgen van de risico's die deze dieren lopen door blootstelling aan oestrogene stoffen in hun natuurlijke leefomgeving zijn de effecten van blootstelling aan E2 experimenteel onderzocht. Daarnaast zijn ook de effecten van 2,3,7,8-tetrachloordibenzo-p-dioxine (TCDD) onderzocht. TCDD staat in dit geval model voor een grote groep van gechloreerde organische stoffen met een overeenkomend werkingsmechanisme en een brede verspreiding in het milieu.

Na een pilot-studie met larven van de Afrikaanse klauwpad (*Xenopus laevis*) is gericht gezocht naar het ontstaan van dosis-afhankelijke afwijkingen in de ontwikkeling of overleving van kikkerlarven van inheemse kikkers (*Rana species*), en naar correlaties tussen blootstelling en verschillende biomarkers om deze in veldonderzoek toe te kunnen passen om eventuele problemen te kunnen signaleren. Om inzicht te verkrijgen in de samenhang tussen biomarkers en de mate van aantasting van de reproductiecapaciteit is een blootstellingsstudie verricht met volwassen groene kikkers (*Rana synkl. esculenta*).

Met dank aan:

Steve Wijsman (gemeente Amsterdam) voor het verlenen van toestemming voor toegang tot de Volgermeer

Piet Stolk voor het verschaffen van toegang tot de Volgermeer

Dr. Kees Olie (Universiteit van Amsterdam) voor het verstrekken van gegevens betreffende verontreinigingen in de Volgermeer

Dr. Thomas Sanderson (Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS), Universiteit van Utrecht) voor zijn hulp bij de aromatasebepalingen

Samenvatting

De in dit rapport beschreven studies naar effecten van hormoonverstorende stoffen op kikkers zijn gericht op het ontwikkelen van een bio-assay waarin diverse biochemische en functionele effectparameters kunnen worden gerelateerd aan de mate van blootstelling.

Tijdens een pilot-studie zijn eieren van de uitheemse Afrikaanse klauwpad (*Xenopus laevis*) blootgesteld aan E2 en/of TCDD. De mortaliteit was meer dan 90% onafhankelijk van blootstelling. Onder invloed van TCDD was er een significante toename van het oppervlaktepercentage lumen in de testes, welke samenging met een statistisch dalende trend (niet-significant) voor wat betreft de dichtheid aan klusters zaadcellen. Dit duidt mogelijk op een verminderde productie van zaadcellen als gevolg van blootstelling aan TCDD.

De tweede studie met larven van de inheemse *Rana arvalis* was gelijk van opzet. De overleving (15-35%) was hoger dan bij de *Xenopus*, maar ook onafhankelijk van de blootstelling. Er zijn aanwijzingen dat onder invloed van TCDD na 40 dagen de ontwikkeling van stadium 28 naar 29 (volgens Witschi, 1956) vertraagd was. De EROD-activiteit was gemiddeld een faktor 5 geïnduceerd door TCDD. De laagste nominale concentratie TCDD waarbij EROD werd geïnduceerd was ongeveer 100 pg/L.

De derde studie was een in situ veldstudie waarbij larven van de inheemse *Rana esculenta* in stalen kokers waren uitgezet in de verontreinigde Volgermeerpolder en een referentiegebied het Twiske. In beide gebieden trad een extreem hoge sterfte op binnen 3 weken (95-100%). Zuurstofgebrek of een gebrekkige zuurstofuitwisseling met het omringende water zijn hiervan mogelijk de oorzaak geweest.

Voor de vierde studie zijn juveniele kikkers (*Rana esculenta* en *temporaria*) gevangen uit de verontreinigde Volgermeerpolder en een referentielokatie, de proefsloten bij de Sinderhoeve te Renkum. De interne concentraties dioxine-achtige stoffen, uitgedrukt als het aantal TCDD-equivalenten (TEQ), in vetweefsel van kikkers uit de Volgermeer was een faktor 3 verhoogd. De EROD-activiteit in deze dieren was, echter, 2 maal lager. Dit wijst erop dat de EROD-activiteit van kikkers uit de Volgermeer geremd is door mogelijk andere stoffen. De aromatase-activiteit in kikkers uit de Volgermeer was tot een faktor 5 geremd. Ook was er een significante correlatie tussen TEQ en aromatase, die er op wijst dat dioxine-achtige stoffen betrokken zijn bij deze inhibitie.

Voor de laatste studie zijn in volwassen kikkers (*Rana synkl. esculenta*) effecten van E2 en/of TCDD bestudeerd. De nominale concentraties E2 en TCDD waren respectievelijk 500 ng/L en 500 pg/L, maar de actuele concentraties (gemiddeld 150 tot 660 ng/L E2 en 200 tot 350 pg/L TCDD) varieerden afhankelijk van het tijdstip na verschoning (direct tot 6 dagen bij 20 °C). Tijdens gevangenschap bleven de kikkers in goede conditie, doch voortplantingsgedrag bleef achterwege, hetgeen bleek uit het uitblijven van paringspogingen nadat mannelijke en vrouwelijke kikkers bij elkaar werden geplaatst. De gonadosomatische index (GSI) van de mannelijke kikkers was vergelijkbaar met wat is beschreven in de literatuur voor groene kikkers

in de vrije natuur. De GSI van de vrouwelijke kikkers uit de controle-groep was lager dan gemeten in de blootgestelde kikkers, en dan in de literatuur beschreven waarden. Concentraties TEQ in de aan TCDD blootgestelde volwassen kikkers (1.4-5 ng/g vetweefsel) waren vergelijkbaar met concentraties TEQ in de juveniele kikkers uit de Volgermeerpolder. Dit impliceert dat de interne blootstelling aan dioxine-achtige stoffen in de blootstellingsstudie en de Volgermeerpolder vergelijkbaar was.

Onder invloed van TCDD was plasma-progesteron bij de vrouwtjes 40% verlaagd, hetgeen mogelijk wijst op een verstoorde steroïdogenese. Er werden geen directe effecten op de aromatase en ethoxyresorufine-O-dealkylase (EROD) activiteiten gevonden. Uit het feit dat EROD activiteit niet was geïnduceerd, en het gegeven vanuit de literatuur dat EROD inductie in kikkers pas optreedt bij een tenminste 1600 maal hogere dosis PCB126 (Huang et al., 1999), kan worden geconcludeerd dat EROD in kikkers een ongevoelige, en dus minder geschikte, biomarker is voor blootstelling aan dioxine-achtige stoffen. Onder invloed van E2 was bij vrouwtjes het gewichtspercentage eieren (ESI) toegenomen en plasma-E2 50% verlaagd. Bij de aan E2 blootgestelde mannetjes waren geen veranderingen in de testis waargenomen na microscopische beoordeling van coupes.

1 Algemene Inleiding

1.1 Hormoonverstorende stoffen

Onderzoeken hebben aangetoond dat verontreinigingen in het milieu langs de weg van het hormoonmetabolisme een verstorende werking kunnen uitoefenen op dieren in de vrije natuur (Bauer et al., 1997, Reeder et al., 1998, Allen et al., 1999, Horiguchi et al., 1999, Borrasso et al., 2000, Noaksson et al., 2001). De aanwezigheid van dergelijke stoffen kan leiden tot een verstoorde ontwikkeling of gedragingen, of verminderde vruchtbaarheid van de wildlevende fauna. In de meest extreme gevallen kunnen vrouwtjes mannelijke en mannetjes vrouwelijke kenmerken gaan vertonen. Beide gevallen zijn beschreven in organismen die in aquatische milieus leven (Bauer et al., 1997, Reeder et al., 1998, Allen et al., 1999, Horiguchi et al., 1999, Borrasso et al., 2000). Hierbij gaat het om synthetische hormonen die zijn gebruikt in geneesmiddelen (b.v. de anticonceptiepil) of andere chemicaliën, maar ook om natuurlijke hormonen die wij zelf of onze (landbouw)huisdieren uitscheiden. Uit een recente studie is gebleken dat in wateren in Nederland, die zijn verontreinigd met een aantal (xeno)-oestrogenen, mannelijke vissen voorkomen met eicellen temidden van testisweefsel, terwijl mannetjes het typisch vrouwelijk eiwit vitellogenine produceren (Vethaak et al., 2002). Uit dit alles blijkt dat verder onderzoek naar effecten van hormoonverstorende stoffen, en goede testmethoden voor deze effecten, van belang zijn om tot een goede risicobeoordeling van deze stoffen te komen.

Hormonen spelen ook een belangrijke rol bij de ontwikkeling van kikkerlarven en hun metamorfose (Hayes, 1997, 1998). Om die reden kunnen amfibieën gevoelig zijn voor hormoonontregelende stoffen en daardoor mogelijk een goede indicator voor verstoringen door deze stoffen. De in dit rapport beschreven studies zijn gericht op het onderzoeken van dosis-effect relaties en evaluatie van de risico's van in het milieu voorkomende hormoonverstorende stoffen voor amfibieën.

1.2 Effectparameters voor hormoonverstorende stoffen

Hieronder is een aantal parameters beschreven die van belang (kunnen) zijn voor het in kaart brengen van effecten van hormoonverstorende stoffen, en waartoe verstoringen van deze parameters kunnen leiden:

Onwikkelingsduur/overleving: verlenging van de ontwikkelingsduur in de vrije natuur kan leiden tot verhoogde risico's voor predatie, en dus een verhoogde mortaliteit.

Deformaties: afwijkingen bij kikkers tijdens de metamorfose of deformaties in geslachtsorganen (gonaden) kunnen het gevolg zijn van blootstelling aan hormoonverstorende stoffen.

Genotype/fenotype: bij amfibieën kan de sexuele differentiatie worden beïnvloed door hormoonverstorende stoffen, zoals feminisatie van dieren met mannelijk genotype (Kloas et al., 1999).

Vitellogenine (VTG): VTG is een dooiereiwit dat in eileggende organismen in de lever wordt aangemaakt onder controle van de oestrogenreceptor. Normaliter wordt dit eiwit alleen in vrouwelijke dieren aangemaakt. Bij kikkers is aangetoond dat bij blootstelling aan (xeno)oestrogenen vitellogenese wordt geïnduceerd (Kloas et al., 1999 en Palmer et al., 1998). Productie van VTG kan worden beschouwd als een maat voor blootstelling aan oestrogene stoffen.

Aromatase: aromatase (CYP19) zet testosteron of androsteendion om naar respectievelijk E2 of oestrone. Deze enzymatische omzetting is medebepalend voor de verhouding tussen mannelijke (androgenen) en vrouwelijke (oestrogenen) geslachtshormonen. Inductie of inhibitie van dit enzym kan leiden tot een verstoorde balans van androgenen en oestrogenen.

Steroidhormonen: De concentraties en onderlinge verhoudingen van geslachtshormonen zijn mogelijk van belang voor de sexuele differentiatie. Afwijkende concentraties van geslachtshormonen zijn indicatief voor de mate waarin de vorming en/of afbraak zijn beïnvloed. Als maat voor de androgenen en oestrogenen worden testosteron en E2 bepaald. Ook wordt progesteron bepaald, als voorloper voor andere steroiden en stimulatiefactor bij de ovulatie en rijping van eicellen.

EROD: Onder invloed van dioxine-achtige stoffen en/of andere Ah-receptor agonisten wordt het cytochroom P450 (CYP) enzym 1A1 geïnduceerd in levers van vogels en zoogdieren. Een dergelijke inductie duidt op de aanschakeling van het arylhydrocarbon (Ah) receptor mechanisme en de mogelijke cascade aan effecten, waaronder de modulering van oestrogenreceptoren (Safe et al., 1998). Inductie van CYP1A1 wordt gemeten als de ethoxyresorufine-O-dealkylase (EROD) activiteit.

TEQ: Het aantal TCDD-equivalenten (in bijvoorbeeld vetweefsel van een dier) is een maat voor de totale concentratie dioxine-achtige stoffen in vetweefsel, en dus voor de mate van blootstelling. Dioxines, furanen en PCB's zijn allemaal vertegenwoordigers van deze groep van stoffen. Van deze stoffen is aangetoond dat deze (o.a. middels binding aan de arylhydrocarbon (Ah)-receptor) een breed scala van effecten kunnen veroorzaken waaronder effecten op de hormoonhuishouding. Voor het bepalen van TEQ worden H4IIE-cellen gebruikt (Ahlborg et al., 1994, Sanderson et al., 1996).

1.3 Vraagstelling en plan van aanpak

De vraag is of in het milieu aanwezige verontreinigingen een effect op de hormoonhuishouding bij kikkers hebben. Om dit te onderzoeken zijn dosis-effect studies uitgevoerd met een aantal modelstoffen om karakteristieke effecten en effectnivo's vast te stellen. Daarnaast zijn veldstudies uitgevoerd om de actuele effecten van in de natuur voorkomende mengsels van stoffen vast te stellen. Kikkers in verschillende ontwikkelingsstadia zijn in het laboratorium en het veld blootgesteld aan hormoonversturende stoffen. Om werkingsmechanismen via de oestrogen- en Ah-receptor te bestuderen zijn de modelstoffen E2 en TCDD of een combinatie van beide stoffen gebruikt voor de laboratoriumstudies. De nominale blootstellingsconcentraties E2 zijn gekozen in dezelfde ordes van grootte als de gemeten aantallen oestradiol equivalenten (EEQ) in ongezuiverd afvalwater (75

ng/L, Vethaak et al., 2002). De gekozen nominale blootstellingsconcentraties TCDD zijn een faktor 1000 lager. Gedurende het onderzoek zijn de aktuele blootstellingsconcentraties E2 en TCDD enkele malen vastgesteld.

Tijdens en aan het einde van een blootstellingsperiode zijn de in paragraaf 1.2 beschreven parameters bepaald. Omdat een specifiek antilichaam tegen VTG van groene kikkers niet voorhanden is, is VTG niet bepaald. De vitaliteit van de geslachtsorganen is bestudeerd, waarbij gebruik is gemaakt van histologische technieken.

Voor de ontwikkeling van de technieken voor biomarkeronderzoek en de bepaling van respons-intervallen in amfibieën zijn eerst enkele blootstellingsstudies uitgevoerd met de Afrikaanse klauwpad *Xenopus laevis*. Eieren van deze soort zijn ten allen tijden te krijgen van in gevangenschap gehouden dieren. Met de in deze studie ontwikkelde kennis en vaardigheden is een dosis-effect studie uitgevoerd met de inheemse heikikker *Rana arvalis*. Voor een verder begrip van blootstelling-effect relaties is het noodzakelijk inzicht te verkrijgen in de samenhang tussen biochemische reponsparameters en effecten die een duidelijk verband hebben met de reproductiecapaciteit. Hiertoe is een blootstellingsstudie uitgevoerd met volwassen groene kikkers (*Rana synchl. esculenta*). Op basis van de resultaten van de laboratorium studie leek de weg vrij voor een *in situ* blootstelling van larven van een nauw verwante soort, de groene kikker *Rana esculenta* om de effecten van blootstelling aan complexe mengsels van stoffen in het veld vast te stellen. Direct volgend op deze *in situ* blootstellingsexperimenten met kikkerlarven zijn juveniele individuen van de groene en bruine kikker (*Rana esculenta en temporaria*) gevangen in de verontreinigde Volgermeerpolder en een niet-verontreinigd referentiegebied voor een vergelijkend onderzoek naar effecten van verontreinigingen.

Op grond van de gevonden effecten tijdens de verschillende ontwikkelingsstadia in het veld en op het lab zijn enkele te verwachten effecten van blootstellingen aan hormoonversturende stoffen op kikkers in de vrije natuur beschreven.

2 Algemeen gebruikte methoden

Tenzij anders vermeld zijn chemicaliën afkomstig van Merck (Amsterdam, Nederland) of Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Nederland). H4IIE cellen zijn gedoneerd door dr. L.A.P. Hoogenboom van het RIKILT in Wageningen.

2.1 Biochemische respons-parameters

2.1.1 Ethoxyresorufine-O-dealkylase (EROD) activiteit in levers

Levers zijn gehomogeniseerd (gepotterd op ijs) in 0.125 M fosfaatbuffer met 0.1 M EDTA, pH 7.6. De homogenaten zijn 12 min afgedraaid bij 15000 xg bij 4 °C. De supernatants zijn verder afgedraaid gedurende 72 min bij 150.000xg. Hierna zijn de pellets (microsomen) gehomogeniseerd in fosfaatbuffer met 0.1 M EDTA, pH 7.6 met 20 % (v/v) glycerol. De microsomale suspensies zijn ingevroren bij -80 °C voor bepalingen van EROD-activiteit. Hiertoe is microsomaal eiwit geïncubeerd bij 22 tot 37 °C met 1.3 µM ethoxyresorufine en 0.3 mM NADPH (Roche Diagnostics, Almere, Nederland) in aanwezigheid van 1 mg/ml BSA in een bufferoplossing met 0.1 M Tris en 0.1 M NaCl, pH 8.0 in een eindvolume van 200 µl. De emissie bij 590 nm in wells met microsomen en wells met een concentratiereeks standaard-resorufine is gemeten na excitatie bij 530 nm. De hoeveelheid gevormd resorufine is berekend door interpolatie van de ijklijn standaard-resorufine. Omdat de vorming van resorufine na incubaties zonder NADPH te verwaarlozen was zijn geen incubaties zonder NADPH uitgevoerd. De gemeten emissie voor toevoegen van NADPH is afgetrokken van de emissie 30 min na toevoegen van NADPH. De EROD activiteit is berekend door de NADPH-afhankelijke vormingsnelheid van resorufine te normaliseren op microsomaal eiwit.

2.1.2 Aromatase-activiteit in hersenen

Hersenen zijn gehomogeniseerd in een volume van 10 maal het natgewicht 50 mM Tris en 1.15% KCl, pH 7.5. De homogenaten zijn 15 min afgedraaid bij 14000 xg bij 4 °C. De supernatanten zijn ingevroren bij -80 °C. Bepalingen van de aromatase-activiteit zijn uitgevoerd volgens de methode van Lephard en Simpson, 1991. In elke well van een 48-wellsplaat is 0.05-0.4 mg supernatant-eiwit 2 uur geïncubeerd bij 25 °C met 250 nM [1β - $^3\text{H}(\text{N})$]-Androst-4-ene-3,17-dione (NEN, Boston, MA, USA) en 0.5 mM NADPH in 50 mM HEPES en 5 mM MgCl_2 , pH 7.8 in een eindvolume van 250 µl. Ook zijn incubaties zonder NADPH uitgevoerd. Na incuberen zijn alle steroïden uit de monsters geëxtraheerd met respectievelijk chloroform en een oplossing 0.5% (w/v) dextraan en 5% (w/v) actieve kool, zodat het door aromatase afgesplitste vrije ^3H is overgebleven. Hierna zijn de monsters 15 min afgedraaid bij 11000 xg, de supernatants toegevoegd aan scintillatievloeistof, en is ^3H gemeten in

een vloeistofscintillatieteller. De aromatase activiteit is berekend door de NADPH-afhankelijke afsplitsingssnelheid van ^3H te normaliseren op eiwit.

2.1.3 Eiwitbepalingen

Eiwitgehaltenes in de 14000 xg supernatanten van levers en hersenen zijn bepaald met fluorescamine als detectiereagens volgens de methode van Lorenzen en Kennedy (1993) of met de BCA protein assay kit van Pierce (Rockford, IL, USA). Met deze kit wordt Cu^{2+} naar Cu^+ gereduceerd door eiwit onder alkalische condities (biureet reactie). Het Cu^+ reageert met bicinchoninic acid, waardoor een gekleurd complex wordt gevormd, dat bij 562 nm is gemeten in een plate reader. Runder Serum Albumine (BSA) is gebruikt als standaard.

2.1.4 Steroidhormonen

Concentraties testosteron, progesteron en E2 zijn bepaald met competitieve Enzyme Immuno Assay (EIA) kits van R&D Systems (Abington, UK). In gecoate wells van microtiterplaten zijn in duplo 100 μl van de monsters en standaardverduunningen gepipetteerd, waarna 50 μl gelabeld steroid en 50 μl anti-steroid zijn toegevoegd. Nadat de platen 2 uur zijn geincubeerd bij kamertemperatuur (21-25 °C) zijn de wells 4 maal gewassen met wasbuffer. Vervolgens is 200 μl /well pNPP substraat in de wells gepipetteerd en is 45 min geincubeerd bij kamertemperatuur, waarbij een ongekleurd substraat wordt omgezet in een geel gekleurd produkt. De kleurreactie is gestopt door 50 μl /well Stop Solution toe te voegen, waarna de lichtabsorptie bij 405 en 580 nm (A_{405} en A_{580}) is gemeten met een plate reader. A_{405} - A_{580} als maat voor de optische dichtheid in de wells in relatie tot de logaritme uit de steroid-concentratie van de standaarden is een omgekeerde S-curve. Met een 4-parameter logistic curve fit door de datapunten van de standaarden zijn de concentraties E2 in de monsters berekend.

2.2 Histologie

Na fixatie en dehydratatie zijn de geslachtsorganen ingebed in paraffine. Van de eieren, ovaria en het midden van de testes zijn coupes van 7 μm dikte gesneden met een Anglia Scientific 300 microtoom. De coupes zijn gerehydrateerd en gekleurd met een eosine-haematoxyline oplossing (Klinipath, Duiven, Nederland). Na dehydratatie zijn de coupes ingesloten met Paramount (Fisher Scientific, 's Hertogenbosch, Nederland) en geanalyseerd met een microscoop (Olympus BX40) en beeldverwerkingssoftware Analysis 3.0, versie 416 (Soft Imaging System, GmbH, Duitsland).

2.3 H4IIE-bioassay/TEQ bepaling

De H4IIE cellen zijn gekweekt tot volledige confluente in rouxflesjes bij 37 °C, 5% CO₂ in lucht. Het kweekmedium was alpha-MEM met 10% (v/v) Fetal Runder Serum (FBS), 100 U/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine. De cellen zijn van de bodem van de fles losgemaakt met Cell Dissociation Solution (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Nederland) en uitgeplaat in 96-wells platen (10⁴ cellen/well). Na een incubatietijd van 24 uren zijn (verdunde) extracten toegevoegd aan de cellen in eindconcentraties van 0.5 of 1 % (v/v) in 3 replicaties in een eindvolume van 200 µl/well. Ook zijn dosis-respons curves van standaard-TCDD gemaakt. Nadat de cellen 42 tot 48 uur zijn blootgesteld, zijn de cellen 3 maal gewassen met phosphate buffered saline (PBS), gelyseerd met water (20 µl/well) en ingevroren bij -80 °C. De cellen zijn na de blootstellingsperiode zowel voor als na het wassen geïnspekt onder de microscoop. Er waren geen tekenen waarneembaar die duiden op ernstige cytotoxiciteit (loslatende cellen of abnormale morfologie).

De EROD activiteit is bepaald nadat de cellen zijn ontdooid. De cellen zijn geïncubeerd bij 37 °C met 2 µM ethoxyresorufine en 0.17 mM NADPH in 0.1 M Tris buffer met 0.1 M NaCl, pH 8.0 in een eindvolume van 150 µl/well. Dicumarol (0.05 mM) was toegevoegd om afbraak van resorufine door het in het cytosol aanwezige enzym diaphorase te voorkomen. De vorming van resorufine voor en na 50 min incuberen is gemeten in een multi-well plate reader bij een excitatie/emissie van 530/590 nm. Omdat het eiwitgehalte per well niet wordt beïnvloed, zolang er geen sprake is van onder de microscoop waarneembare cytotoxiciteit (Hoogenboom et al., 1999), is de EROD activiteit niet genormaliseerd op eiwit. De EROD responsen (pmol RR/min) zijn – na correctie voor de blanco - geconverteerd naar pg TEQ per l water, waarbij gebruik is gemaakt van de standaardcurve TCDD (d.i. een sigmoidale S-curve nadat de EROD-responsen en logaritme uit de concentratie TCDD tegen elkaar zijn uitgezet). Alleen berekende concentraties TEQ welke na correctie voor de verdunningsfactor onafhankelijk zijn van de monsterverdunning zijn geaccepteerd als redelijk betrouwbare weergave van de TCDD concentraties. Dit geldt in het verdunningsgebied waar EROD-responsen van monsters tussen 0.1 en 1 maal EC₅₀ van de standaardcurve is, omdat in dit gebied de dosis-responscurves van monsters meestal redelijk parrallel zijn met de standaardcurve TCDD. Bij hogere EROD-responsen van monsters gaan dosis-responscurves van monsters vaak afwijken ten opzichte van de standaardcurve, waardoor de berekende concentratie TEQ afhankelijk is van de verdunningsfactor. Deze afwijkingen bij hogere concentraties wordt veroorzaakt doordat andere Ah-receptor agonisten lagere maximale EROD-responsen geven ten opzichte van TCDD.

3 Effecten van TCDD en oestradiol in larven van *Xenopus leavis*

3.1 Inleiding

Om te onderzoeken op welke wijze TCDD en E2 in amfibielarven effecten teweeg kunnen brengen is een experiment uitgevoerd met de klauwpad *Xenopus leavis*. Deze soort staat model voor de anure amfibieën en wordt algemeen gebruikt als laboratoriumproefdier, met het voordeel dat van deze gekweekte soort het gehele jaar door eieren beschikbaar zijn. Bovendien is veel kennis over deze soort aanwezig. Het huidige experiment is gericht op de aanpassing van analysemethodieken voor biomarkers en het vaststellen van de effecten van dioxinen (modelstof TCDD) en oestrogenen (modelstof E2) in amfibieën, en de concentraties waarbij deze effecten optreden.



Fig. 3.1 De Afrikaanse klauwpad

3.2 Materiaal en Methode

3.2.1 dieren, huisvesting, blootstelling en sectie

Volwassen *Xenopus* vrouwtjes zijn geïnjecteerd met Follikel Stimulerend Hormoon om de ei-afzet te stimuleren. De verkregen eieren zijn 2 dagen na eiafzet random verdeeld over de verschillende behandelingsgroepen. Iedere behandelingsgroep bestond uit 10 eieren die gezamenlijk in een weckfles met 1 l kraanwater gehouden zijn. Per behandeling zijn 7 weckflessen ingezet. Het water in de weckflessen werd één keer per week verversd. Direct na de verversing en drie dagen na de verversing werd gemalen brandnetelblad als voedsel voor de larven gegeven.

De eieren/larven zijn via het water blootgesteld aan TCDD en/of E2. Hiertoe werd de stof bij het verversen aan het water toegevoegd, voordat de dieren weer

teruggeplaatst werden in de weckflessen. Voor zowel TCDD als E2 zijn stockoplossingen in ethanol gemaakt (TCDD: 0.05, 0.5, 0.25 en 2.5 ng/l; E2: 0.05, 0.5, 0.25 en 2.5 µg/l). Voor de verschillende behandelingsgroepen is steeds 200 µl ethanol (controle) of van een van de stockoplossingen in ethanol toegevoegd (eindconc. ethanol 0.04%).

Tabel 3.1. Behandelingsgroepen

↓TCDD / E2 →	0 ng/L	10 ng/L	50 ng/L	100 ng/L	500 ng/L
0 pg/L	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7
10 pg/L	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7
50 pg/L	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7
100 pg/L	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7
500 pg/L	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7

n = het aantal weckpotten met elk 10 eieren

Om eventuele effecten van ethanol vast te stellen is ook een blanco-groep toegevoegd. Het experiment is beëindigd 10 maanden na aanvang van de blootstelling. Ter verdoving zijn de dieren overgebracht in een oplossing van MS222, pH 7 (1 g/l in leidingwater). De verdoofde dieren zijn ventraal geopend. Bloed is afgenomen, 10 min gecentrifugeerd bij 2800xg en het plasma is bewaard bij -80 °C voor bepalingen van hormoonconcentraties. Het geslacht is bepaald op basis van de aanwezigheid van testes of eileiders. De gonaden zijn *in situ* gefotografeerd en vervolgens uitgenomen en opgenomen in Unifix (Klinipath, Duiven, Nederland) voor histologische analyse van het weefsel. De hersenen en lever zijn uitgenomen, ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80°C voor latere biochemische analyses.

3.2.2 Mortaliteit en ontwikkelingsstadium

Voor iedere behandeling is de mortaliteit bepaald als zijnde het uitvalspercentage bij de beëindiging van het experiment (na 10 maanden blootstelling). Per behandeling zijn 7-8 replica's (aquariumbakken) ingezet met ieder 10 eieren/larven. Het ontwikkelingsstadium van de larve is bepaald op basis de criteria van Witschi (1956).

3.2.3 Eiwit, EROD en aromatase

De EROD- en aromatase activiteiten zijn bepaald als beschreven in paragrafen 2.1.1 en 2.1.2 Voor EROD is in elke well van een microtiterplaat 20-60 µg microsomaal eiwit 3 uren geïncubeerd bij 25 °C. Eiwit is bepaald met fluorescamine (zie paragraaf 2.1.3).

3.2.4 Histologie van de gonaden

De behandeling van de geslachtsorganen, het snijden en kleuren van coupes zijn beschreven in paragraaf 2.3. Bij de beeldanalyse van coupes van testes mannelijke dieren zijn aantal clusters spermatozoën in de tubuli seminiferi, de totale oppervlakte alsmede de oppervlakte van lumen in de coupe bepaald. De gemiddelden van het aantal clusters spermatozoën per mm^2 en oppervlaktepercentage lumen zijn gebaseerd op één coupe van elk de linker en rechtertestis van een dier.

In één coupe van de ovaria van elk vrouwelijk dier is het aantal eieren per lengte-eenheid geteld over een lengte van 2 tot 5 mm. Het gemiddelde ei-oppervlakte is gebaseerd op 20 tot 70 eieren van één coupe van elk dier.

3.2.5 Statistiek

Voor de statistische analyses is gebruik gemaakt van Genstat 6.1 (VSN International Ltd, Oxford, UK). Vanwege de heterogeniteit aan data was het niet mogelijk ANOVA uit te voeren. Effecten van E2 en TCDD afzonderlijk, ongeacht aanwezigheid van respectievelijk TCDD en E2, zijn geanalyseerd met lineaire regressie.

3.3 Resultaten

3.3.1 mortaliteit en geslachtsverhouding

Op bijna alle doseringsnivo's heeft in meer dan de helft van het aantal weckpotten geen van de larven overleefd tot het einde van de proef. Ook in de blanco's (geen toevoegingen) en controles (alleen oplosmiddel toegevoegd) is een dergelijke hoge mortaliteit opgetreden (tabel 3.2). Wanneer per behandeling het gemiddelde van de overleving per bak beschouwd wordt, blijkt deze kleiner dan 10% te zijn.

De geslachtsverhoudingen laten geen dosis-afhankelijke veranderingen zien. In de blanco en controle groepen was de gemiddelde geslachtsindex ($N_{\sigma}/N_{\sigma+\varphi}$) gelijk en 0.6. Onder de meeste behandelingsgroepen waren de geslachten min of meer gelijkelijk verdeeld (geslachtsindex = 0.5).

Tabel 3.2. Overleving en geslachtsverhoudingen

Blootstelling (E2-TCDD)	Aantal potten	potten met overleving (% van aantal potten)	Aantal (en %) overlevende kikkers	(N _♂ /N _{♂+♀})
Blanko	22	41	9 (4.1)	0.6
0-0	14	36	9 (6.4)	0.6
0-10	7	14	1 (1.4)	0
0-100	7	43	3 (4.3)	0.3
10-0	7	43	3 (4.3)	0.3
10-10	7	29	2 (2.9)	0.5
10-100	7	43	3 (4.3)	1.0
100-10	7	57	4 (5.7)	0.5
100-100	7	43	3 (4.3)	1.0
50-0	8	38	3 (3.8)	0.3
50-500	7	14	2 (2.9)	0.5
500-0	8	38	4 (5.0)	0.5
500-50	7	14	2 (2.9)	0.5
500-500	7	14	2 (2.9)	0

3.3.2 EROD

Omdat er geen verschillen waren tussen de EROD-activiteit van kikkers uit de groepen blanco en controle, zijn deze data samengevoegd. Bij de verschillende behandelingsgroepen zijn, mede door de geringe aantallen overlevenden in iedere groep, geen significante afwijkingen ten opzichte van de controle-groepen (Tabel 3.3.). Ook waren er geen verschillen tussen mannetjes en vrouwtjes (Fig. 3.2)

Tabel 3.3 EROD activiteit in lever van mannetjes en vrouwtjes gecombineerd

E2 (ng/L)	TCDD (pg/L)	EROD (fmol/uur/mg)
0	0	151 ± 135 (14)
0	10	81 (1)
0	100	134 ± 26 (3)
10	0	58 ± 46 (3)
10	10	102 ± 4 (2)
10	100	110 ± 26 (3)
100	10	124 ± 78 (4)
100	100	85 ± 31 (3)
50	0	97 ± 23 (3)
50	500	104 (1)
500	0	214 ± 187 (3)
500	50	168 ± 44 (2)

Gemiddelden ± SD zijn gegeven. De getallen tussen haakjes geven de aantallen kikkers

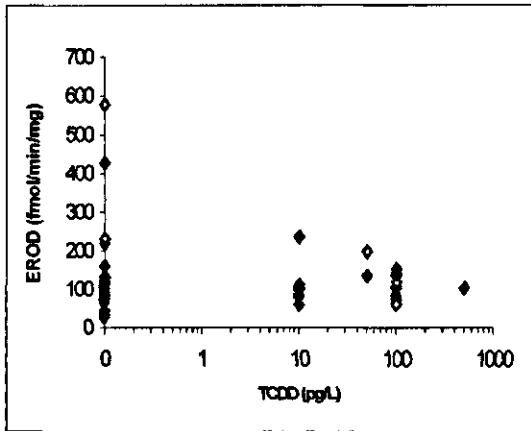


Fig 3.2. Geen relatie tussen de EROD-activiteit en waterconcentratie TCDD in mannetjes (open symbolen) en vrouwtjes (gesloten symbolen)

3.3.3 Aromatase

Er zijn geen effecten van TCDD en/of E2 op de aromatase-activiteit. Ook is de aromatase-activiteit van mannetjes en vrouwtjes vergelijkbaar.

Tabel 3.4 Aromatase-activiteit in hersenen

E2 (ng/L)	TCDD (pg/L)	Aromatase mannetjes (fmol/uur/mg)	Aromatase vrouwtjes (fmol/uur/mg)
Blanko	Blanko	157 ± 65 (4)	89 ± 56 (4)
0	0	156 ± 117 (5)	105 ± 90 (4)
0	10		163 (1)
0	100		200 (1)
10	0	31 (1)	172 ± 89 (2)
10	10	74 (1)	68
10	100	191 ± 52 (3)	
100	10	134 ± 69 (2)	51 ± 50 (2)
100	100	105 ± 21 (2)	
50	0	44 (1)	47 (1)
50	500		117 (1)
500	0	62 (1)	98 (1)
500	50	53 (1)	
500	500		94 ± 28 (2)

Gemiddelden ± SD zijn gegeven. De getallen tussen haakjes geven de aantallen kikkers

3.3.4 Histologie van de geslachtsorganen

Onderstaande foto's illustreren dat testes van aan TCDD blootgestelde kikkers meer lumen bevatten dan van niet-blootgestelde kikkers.

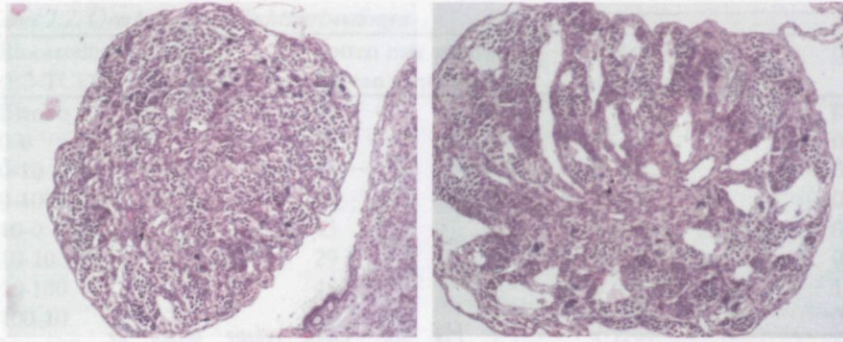


Fig. 3.3. Dwarsdoorsnede van testes van een kikker uit de controlegroep en een aan TCDD blootgestelde kikker

De beeldanalyse bevestigt dat onder invloed van TCDD het aantal lumen in de testes significant was toegenomen bij de mannelijke kikkers (Fig. 3.4 en 3.7). Er lijkt een negatieve, doch niet significante, trend voor wat betreft de invloed van TCDD op het aantal klusters zaadcellen ($P=0.09$). Er was geen correlatie tussen E2 en aantallen lumen en zaadcellen.

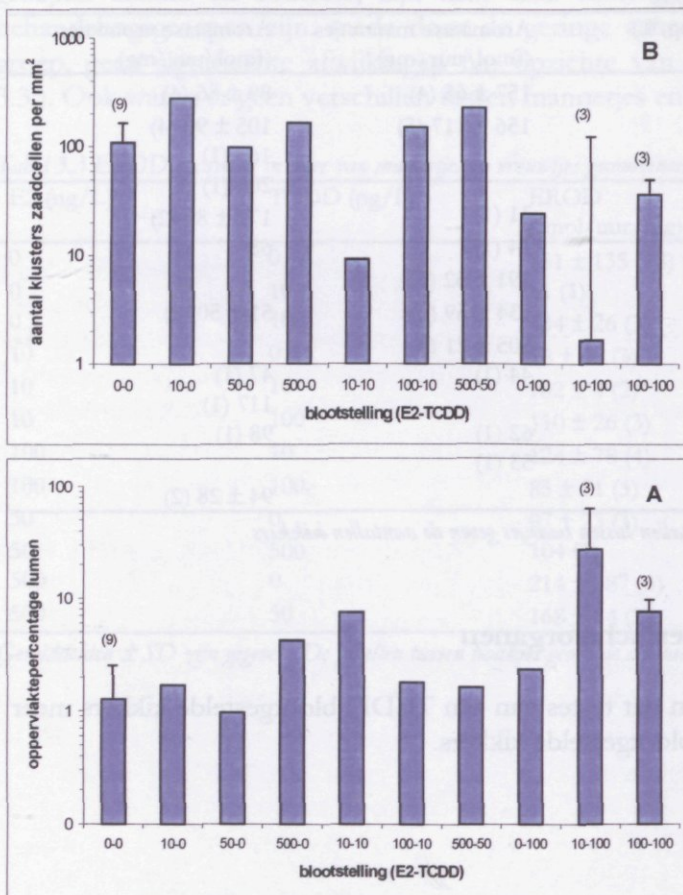


Fig. 3.4. Oppervlaktepercentage lumen (A) en dichtheid zaadcellen (B) in testes van mannelijke dieren in de verschillende blootstellingsgroepen. De nummers boven de error bars geven de aantallen kikkers. Wanneer geen nummer is vermeld betreft het één dier

Bij de vrouwelijke kikkers was er geen enkele relatie tussen TCDD of E2 met het aantal eieren per lengte-eenheid ovarium en ei-oppervlakte (Fig. 3.6).

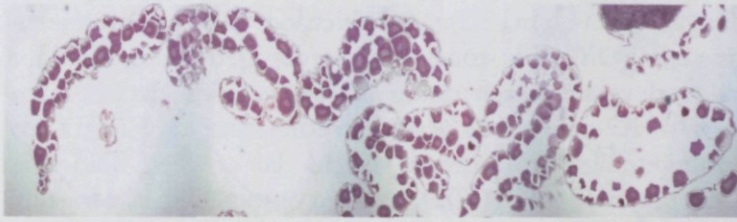


Fig. 3.5
Dwarsdoorsnede van
ovaria van een
vrouwelijke kikker

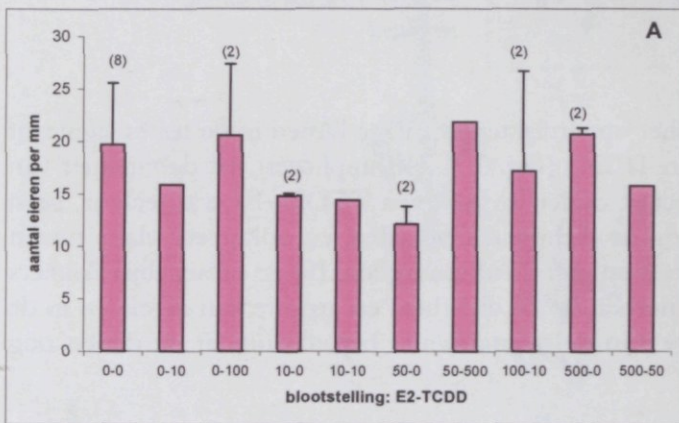
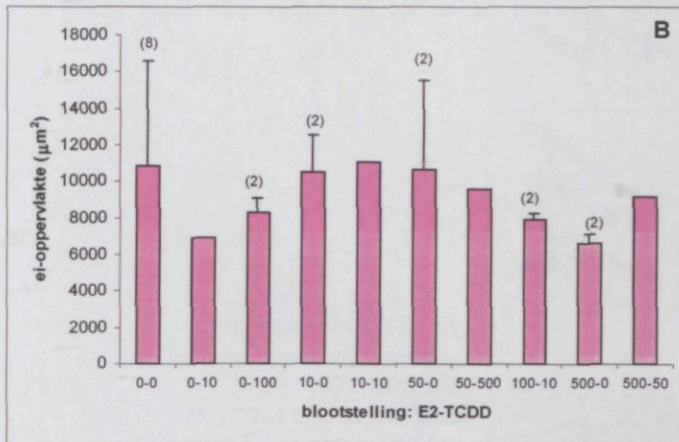


Fig. 3.6. Aantal eieren per lengte-eenheid (A) en ei-oppervlakte (B) in ovaria van vrouwelijke dieren in de verschillende blootstellingsgroepen. De nummers boven de error bars geven de aantallen kikkers. Wanneer geen nummer is vermeld betreft het één dier.

3.4 Discussie

Door de hoge mortaliteit bleven er slechts geringe aantallen dieren over op basis waarvan de effectparameters konden worden vastgesteld (9 in de controlegroepen en maximaal 4 in de blootstellingsgroepen; tabel 3.2). Mede hierdoor is de variatie tussen groepen erg groot en kunnen er geen harde conclusies worden getrokken; hiervoor zijn veel grotere aantallen overlevende dieren nodig. Deze beperkte dataset laten geen effecten van TCDD en/of E2 zien op de geslachtsverhouding, de EROD- en aromatase-activiteiten. Desalniettemin kan worden gesteld dat er geen duidelijke inductie van EROD was onder invloed van TCDD, hetgeen opmerkelijk is. Mogelijk is de uitheemse *Xenopus* een tamelijk ongevoelige soort voor wat betreft inductie van CYP1A1 door dioxine-achtige stoffen of is het gebruikte substraat (ER) niet specifiek voor *Xenopus* CYP1A1.

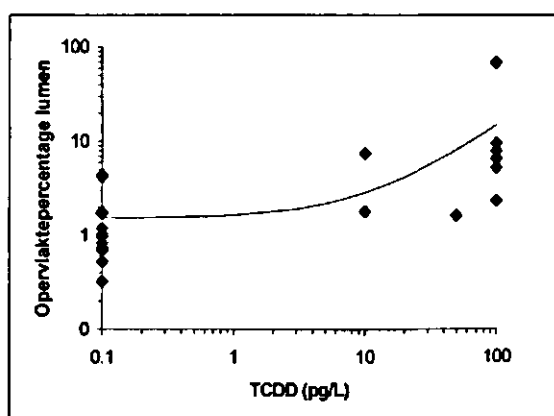


Fig. 3.7. Relatie tussen het oppervlaktepercentage lumen en TCDD:
 $lumen = 1.52 + 0.1336 * TCDD$,
 $P < 0.05$, 16% van de variatie verklaard

Bij de mannelijke kikkers was het oppervlaktepercentage lumen in de testes significant toegenomen onder invloed van TCDD (Fig. 3.7). Dit impliceert dat de vitaliteit van de testes mogelijk wordt aangetast onder invloed van TCDD. Er was, echter, geen significant effect van TCDD op de dichtheid zaadcellen, en ook geen relatie tussen het oppervlaktepercentage lumen en dichtheid zaadcellen. Bij de vrouwelijke kikkers waren er geen effecten waargenomen op de dichtheid en grootte van de eieren in de ovaria. Het gewichtspercentage van de ovaria is niet bepaald omdat de dieren nog niet geslachtsrijp waren.

4 Effecten van TCDD en oestradiol in larven van de heikikker (*Rana arvalis*)

4.1 Inleiding

In het voorgaande hoofdstuk is beschreven hoe verschillende morfologische, histologische en biochemische effectparameters geanalyseerd kunnen worden in *Xenopus* en hoe deze parameters worden beïnvloed door blootstelling aan TCDD en E2. Om een beter inzicht te krijgen hoe inheemse soorten reageren op deze blootstellingen is een gelijksoortig experiment uitgevoerd met eieren/larven van de in Nederland voorkomende heikikker (*Rana arvalis*).



Fig. 4.1 De heikikker

4.2 Materiaal en Methode

4.2.1 Dieren, huisvesting, blootstelling en sectie

Bevruchte eieren (3 eiklommen van 3 verschillende vrouwtjes) van de heikikker zijn op 16 maart 2000 verzameld uit een ven nabij Kootwijkerzand. De verzamelde eiklommen zijn met de hand opgesplitst in kleinere klommen van 5-10 eieren. Na 4 dagen zijn de uitgekomen larven (stadium 20/21, Witschi, 1956) ad random verdeeld over de verschillende behandelingsgroepen. Iedere behandelingsgroep bestond uit 10 larven die gezamenlijk in een weckfles met 1 l kraanwater gehouden zijn. Per behandeling zijn 7 replicaties ingezet. De temperatuur was 20 °C en de licht/donker cyclus 14/10 uren. Het water in de weckflessen is twee keer per week verversd. Direct na en drie dagen na de verversing is gemalen brandnetelblad als voedsel voor de larven gegeven.

De larven zijn via het water blootgesteld aan TCDD en/of E2 in ethanol. Hiertoe zijn de stoffen bij het verversen aan het water toegevoegd, voordat de dieren weer teruggeplaatst zijn in de weckflessen. Voor zowel TCDD als E2 zijn stockoplossingen in ethanol gemaakt (TCDD: 0.25 en 2.5 ng/l; E2: 0.25 en 2.5 µg/l).

Voor de verschillende behandelingsgroepen is steeds 200 µl ethanol (controle) of van een van de stockoplossingen in ethanol toegevoegd (eindconc. ethanol 0.04%).

Tabel 4.1. Behandelingsgroepen

↓TCDD / E2 →	0 ng/L	50 ng/L	500 ng/L
0 pg/L	n=7	n=7	n=7
50 pg/L	n=7	n=7	n=7
500 pg/L	n=7	n=7	n=7

n= het aantal weckpotten met elk 10 larven

Om eventuele effecten van ethanol vast te stellen is ook een blanco-groep toegevoegd. De dieren zijn individueel uit het experiment gehaald op het moment dat ze stadium 30 volgens Witschi (1956) hadden bereikt, het stadium waarbij de voorpootjes doorbreken. Na 160 dagen is het experiment beëindigd, ongeacht het ontwikkelingsstadium van de overlevende dieren.

Ter verdoving zijn de dieren overgebracht in een oplossing van MS222, pH 7 (1 g/l in leidingwater). De verdoofde dieren zijn gedecapiteerd en ventraal geopend. De levers zijn uitgenomen, ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80°C voor latere bepalingen van de EROD activiteit. Het geslacht van de dieren kon niet worden bepaald omdat de geslachtsorganen nog niet ontwikkeld waren. Ook was het niet haalbaar om bloed en hersenen uit te nemen omdat de hoeveelheden te klein waren.

4.2.2 Mortaliteit en ontwikkelings stadium

Voor iedere behandeling is de mortaliteit bepaald als zijnde het uitvalspercentage bij de beëindiging van het experiment. De verschillende ontwikkelingsstadia in elke experimentele groep zijn in kaart gebracht 40 dagen na aanvang van de blootstelling op basis van zoals beschreven door Witschi (1956). Per behandelingsgroep is het gemiddelde berekend op basis van 7 replicaties.

4.2.3 Eiwit, EROD en aromatase

De EROD- en aromatase activiteiten zijn bepaald als beschreven in paragrafen 2.1.1 en 2.1.2 De levers zijn per weckpot (met elk 2-7 levers) samengevoegd en gehomogeniseerd. Omdat de hoeveelheden van deze samenvoegsels klein waren, zijn de supernatanten na de eerste centrifugatiestap gebruikt voor de EROD bepaling. Hiertoe is in elke well van een microtiterplaat 20-60 µg supernatant-eiwit 90 min geïncubeerd bij 25 °C. Eiwit is bepaald met fluorescamine (zie paragraaf 2.1.3).

4.2.4 Statistiek

Voor de statistische analyses is gebruik gemaakt van Genstat 6.1 (VSN International Ltd, Oxford, UK). Vanwege de heterogeniteit aan data was het niet mogelijk ANOVA uit te voeren. Effecten van E2 en TCDD afzonderlijk, ongeacht aanwezigheid van respectievelijk TCDD en E2, zijn geanalyseerd met lineaire regressie.

4.3 Resultaten

4.3.1 Ontwikkeling en mortaliteit

Gemiddeld genomen bereikten de larven na 90 dagen ontwikkelingsstadium 30 (Witschi, 1956). Echter, de ontwikkelingsperiode was in sommige gevallen meer dan 160 dagen, de duur van het experiment.



Fig. 4.2 Larve van de heikikker, 7 dagen nadat de eieren waren verzameld

Onder invloed van E2 lijkt het percentage dieren in stadium 27 toegenomen (Fig 4.3). Regressieanalyse laat een net niet significante trend ($P=0.06$) zien voor wat betreft de invloed van E2 op het percentage dieren in stadium 27 (tabel 4.2). Dit gaat niet gepaard met negatieve invloeden op verdere stadia, wanneer de invloed van E2 op elk stadium afzonderlijk wordt geanalyseerd (tabel 4.2). TCDD heeft een significant negatieve invloed op het percentage dieren in stadium 29, terwijl er positieve, net-niet-significante, trend voor wat betreft het percentage dieren in stadium 28 (Fig 4.4 en tabel 4.2).

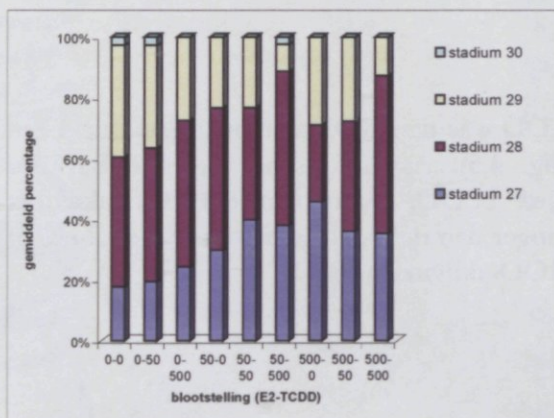


Fig. 4.3 Verdeling van ontwikkelingsstadia na 40 dagen per blootstellingsgroep

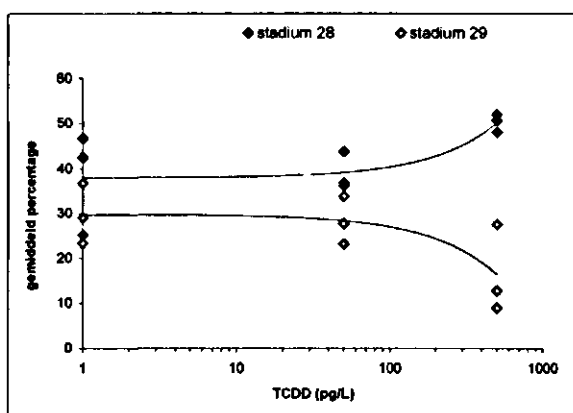


Fig. 4.4. Relatie tussen de ontwikkelingsstadia 28 en 29 na 40 dagen en TCDD (ongeacht de concentratie E2)

Tabel 4.2. Invloeden van TCDD en E2 op de ontwikkeling van larven. n.s.: niet significant

Stadium	TCDD			E2		
	P	%_var	vergelijking	P	%_var	vergelijking
27	n.s.			0.062	4.9	$Y=0.0256X + 26.72$
28	0.071	4.5	$Y=0.0246X + 38.08$	n.s.		
29	0.004	14	$Y=-0.0288X + 29.99$	n.s.		

Er zijn ook geen effecten van ethanol en/of TCDD en/of E2 op het percentage overleving na 106 dagen. De grote sterfte kan de analyse van overleving hebben gehinderd, hoewel in eerdere stadia ook geen relatie was tussen blootstelling en overleving.

Tabel 4.3. Overleving na 106 dagen in de blootstellingsgroepen kikkers

E2 (g/L)	TCDD (pg/L)	Percentage overleving
Blanko	Blanko	19 ± 16
0	0	30 ± 17
0	50	16 ± 14
0	500	23 ± 19
50	0	26 ± 14
50	50	24 ± 23
50	500	26 ± 22
500	0	34 ± 20
500	50	27 ± 16
500	500	33 ± 15

Gemiddelden ± SD van 7 weckpotten zijn gegeven

4.3.2 EROD

Onder invloed van de hoogste dosis TCDD was de EROD-aktiviteit gemiddeld een faktor 5 geïnduceerd (tabel 4.4 en Fig. 4.5). Asymptotische regressie laat een significante relatie zien tussen EROD en TCDD. De maximale EROD-aktiviteit (3500 fmol/min/mg) was een faktor 9 hoger dan de basale aktiviteit. Ethanol en/of E2 hebben geen invloed gehad op de EROD-aktiviteit.

Tabel 4.4. EROD activiteit in levers van dieren uit alle experimentele groepen

E2 (g/l.)	TCDD (pg/l.)	EROD (fmol/min/mg)
Blanko	Blanko	331 ± 102 (4)
0	0	443 ± 152 (5)
0	50	634 ± 200 (4)
0	500	2458 ± 1131 (4)
50	0	811 ± 253 (5)
50	50	499 ± 173 (4)
50	500	2535 ± 1297 (4)
500	0	752 ± 262 (5)
500	50	769 ± 203 (5)
500	500	3275 ± 2346 (4)

Gemiddelden ± SD zijn gegeven. De getallen tussen haakjes geven de aantallen samenvoegsels van levers

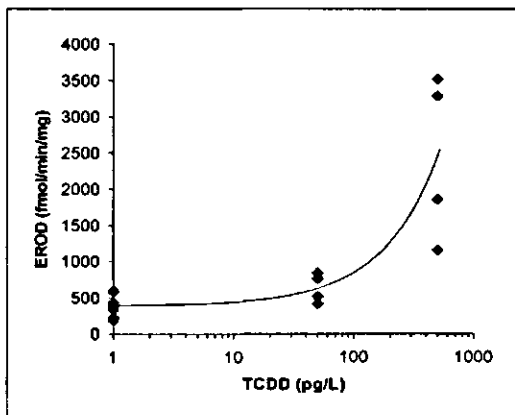


Fig. 4.5. Relatie tussen blootstelling aan TCDD en de EROD activiteit. De vergelijking van de exponentiele curve is: $EROD = 387 + 6.3 * 2.54^{ln(TCDD)}$, $P < 0.001$, 77% van de variatie verklaard

4.4 Discussie

De stoffen E2 en TCDD hadden geen invloed op de overleving. De hogere percentages dieren in stadium 27 en 28 onder invloed van respectievelijk E2 en TCDD, welke gepaard gingen met lagere percentages dieren in stadium 29 onder invloed van TCDD duiden mogelijk op een vertraagde ontwikkeling onder invloed van deze stoffen.

In tegenstelling tot de *Xenopus* was er een significante inductie van de EROD-activiteit. Dit impliceert dat effecten van dioxine-achtige stoffen in embryo's van inheemse amfibieën kunnen worden aangetoond. De inductie van EROD start bij een nominale concentratie van ongeveer 100 pg/L TCDD.

Toen stadium 30 volgens Witschi was bereikt, en het experiment was beëindigd, waren de geslachtsorganen nog niet ontwikkeld, in tegenstelling tot bij de *Xenopus*. Dit verschil in verloop van de ontwikkeling van de uitheemse *Xenopus* en de in Nederland voorkomende soorten is beschreven in de literatuur (Lofts, 1984). Het is de vraag of larves van *Rana* in deze ontwikkelingsstadia reeds vitellogenine kunnen produceren. Daarmee lijkt het beter om voor de inzet van oestrogeen-gerelateerde biomarkers studies te verrichten in latere ontwikkelingsstadia.

5 Effecten van hormoonverstorende stoffen op volwassen kikkers

5.1 Inleiding

Om verder inzicht te verkrijgen in blootstelling-effect relaties is het van belang inzicht te verkrijgen in de samenhang tussen biochemische respons parameters en effecten die een duidelijk verband hebben met de reproductiecapaciteit. Om dit te onderzoeken zijn volwassen dieren van de zeer algemeen in Nederland voorkomende groene kikker (*Rana synchl. esculenta*) blootgesteld aan E2, TCDD of een combinatie van beide stoffen.



Fig. 5.1 Een van de groene kikkers uit het blootstellingsexperiment

5.2 Materiaal en Methoden

5.2.1 Vangen en taxonomie van de kikkers

Begin oktober 2001 zijn 21 adulte groene kikkers (5 mannetjes en 16 vrouwtjes) gevangen uit de proefsloten bij de Sinderhoeve in Renkum. De vorm van elke groene kikker is geschat door de lichaamslengte van kop tot urostyl (ll) tibia-lengte (tl), digitus primus-lengte (dpl), callus internus-lengte (cil) en callus internus hoogte (cih) te meten en de ratio's tl/cil, tl/cih en dpl/cil te berekenen. Op grond van deze metingen kon bij merendeel geen onderscheid worden gemaakt tussen de taxa *esculenta* of *lessonae*, en was 1 kikker van het taxon *ridibunda* (Wijnands, 1979; Blommers-Schlösser, 1992).

5.2.2 Huisvesting

De kikkers zijn individueel gehuisvest in volglazen accubakken (zonder siliconenkit) met slootwater in een klimaatkamer bij 15 °C en een licht/donker cyclus van 10/14 uren. De kikkers zijn elke 1-4 dagen gevoerd met levende huiskrekels (grootte 7-8, dierenspecialzaak). Om de andere voeding zijn de krekels bepoederd met vitaminehoudend poeder voor amfibieën (Reptivite, Zoo Med Laboratories, San Luis Obispo, CA, USA). In elke bak was een roestvrijstalen plateau (U-profiel) gezet, zodat de kikkers de mogelijkheid hadden uit het water te gaan. Op elk plateau was een stuk katoenen kaasdoek gelegd om zoveel mogelijk te voorkomen dat de levende krekels direct in het water zouden komen (en verdrinken). Na 6 weken was het slootwater vervangen door een mengsel sloot- en leidingwater van 1:1, en na nog een periode van 2 weken zijn de kikkers in 100% leidingwater gezet. Het sloot- of leidingwater in de bakken is steeds elke 2 weken verschoond. Eind november zijn de licht/donker cyclus en temperatuur naar 6/18 uren en 10 °C gebracht in stappen van 2 uur en 2.5 °C over een periode van 2 weken. Deze omstandigheden waren opgelegd om een winterperiode te simuleren. Deze periode van "winterrust" duurde tot de start van het blootstellingsexperiment begin april 2002. Tegelijk met het starten van de blootstelling zijn de licht/donker cyclus en temperatuur aangepast naar 18/6 uren en 20 °C door deze met respectievelijk 1 uur en ten hoogste 1 °C per dag te verhogen gedurende een periode van 12 dagen. Het doel van deze verhogingen van licht/donker cyclus en temperatuur was om de overgang naar het voorjaar te simuleren en sexueel gedrag en verdere differentiatie van secundaire geslachtskenmerken bij de kikkers te stimuleren.

5.2.3 Blootstelling

Een week voordat gestart werd met de blootstelling zijn de kikkers gewogen en – ongeacht taxon - verdeeld in 4 groepen van 4 vrouwelijke kikkers en 2 groepen van 2 mannelijke kikkers volgens onderstaand schema. De verdeling van lichaamsgewichten (20-95 g) was vergelijkbaar tussen de groepen.

Tabel 5.1. Indeling kikkers naar geslacht, gewicht en blootstelling

	Controle (0.04% ethanol)	E2 (500 ng/l)	TCDD (500 pg/l)	E2 –TCDD (500 ng/l-500 pg/l)
Vrouwtjes	n=4 52 ± 24 g	n=4 50 ± 19 g	n=4 54 ± 29 g	n=4 57 ± 25 g
Mannetjes	n=2 40 en 49 g	n=2 43 g	geen	geen

Een commercieel verkregen oplossing TCDD in een ampul (50 µg/ml in n-nonaan, Radian, USA) is verdund tot 1 µg/ml met ethanol. Deze stockoplossing is vervolgens 400x verdund met ethanol tot een werkoplossing van 2.5 ng/ml TCDD. E2 in droge vorm is afgewogen opgelost in ethanol in een concentratie van 1 mg/ml. Deze stockoplossing is vervolgens 400x verdund met ethanol tot een werkoplossing van 2.5 µg/ml E2. Deze oplossingen zijn bij 4 °C bewaard.

In elk van de glazen bakken is 3 L water gebracht waaraan 600 µl van de werkoplossingen TCDD en/of E2 en/of ethanol is toegevoegd, zodat de nominale eindconcentraties TCDD, E2 en ethanol respectievelijk 500 pg/L, 500 ng/L en 0.04% bedroegen. Tijdens het blootstellingsexperiment zijn 2 series – voor elke individuele kikker gemerkte - bakken gebruikt. Pas 4-5 uur nadat de doseringen aan water zijn toegediend zijn de kikkers in het water gezet, om te voorkomen dat de kikkers zouden worden blootgesteld aan de “piek-concentratie” TCDD van 0-4 uur (zie figuur 10.1 in de appendix). Het water in de bakken met de doseringen is gedurende de eerste 8 weken van de 11 weken durende blootstellingsperiode 1x per week ververs, waarbij de kikkers steeds in de andere serie gemerkte bakken zijn gezet. Gedurende de laatste 3 weken van de blootstellingsperiode is het water in de bakken met de doseringen 2x per week ververs (zie appendix). De katoenen kaasdoeken op de plateaus zijn vervangen door glasvezelfilters, type GF/B (Whatman) om mogelijke binding van TCDD en/of E2 te minimaliseren. Deze glasvezelfilters zijn bij elke verschooning vervangen door nieuwe. Voor elke individuele kikker is een apart schepnetje gebruikt om kruiscontaminaties van stoffen en mogelijke ziekten te voorkomen. De bakken met kikkers zijn in afzuigkasten, die zijn uitgerust met koolstoffilters, geplaatst. De kikkers in de groepen E2, TCDD en E2-TCDD zijn in 3 afzonderlijke afzuigkasten gezet, terwijl de kikkers van de controlegroep zijn verdeeld over 2 afzuigkasten. De krekels zijn na starten van de blootstelling niet meer bepoederd met vitaminenhoudende poeder.

5.2.4 Stimulatie van voortplantingsgedrag

Toen na 2 maanden van blootstelling slechts één vrouwtje eieren had afgezet zijn mannetjes en vrouwtjes gecombineerd om mogelijk paring en afzetten van eieren te stimuleren, en om na te gaan of E2 en/of TCDD het paringsgedrag, mate van afzetten van eieren en/of kwaliteit van de eieren beïnvloeden. Tijdens week 9 van de blootstellingsperiode is de mannetjeskikker die is gebruikt voor metingen beschreven in hoofdstuk 2 (testmannetje) en een vrouwtje uit om beurten elke groep steeds gedurende een etmaal bij elkaar geplaatst in een bak met schoon water zonder toevoegingen. Nadat uit elke groep 2 vrouwtjes bij dat testmannetje waren geweest bleek dat er geen enkele poging werd ondernomen tot amplexus, noch eieren werden gelegd. Om de mogelijkheid uit te sluiten dat uitblijven van paring werd veroorzaakt door passiviteit van het testmannetje (onder invloed van langdurige gevangenschap en/of blootstelling aan TCDD en E2), zijn 4 andere mannetjeskikkers gevangen uit de sloot bij de Sinderhoeve, en zijn deze mannetjes gecombineerd met elk vrouwtje uit om beurten elke groep gedurende een etmaal in een bak met schoon water zonder toevoegingen. Elk vrouwtje is gecombineerd geweest met slechts 1 van deze 4 mannetjeskikkers.

5.2.5 Bepalen van actuele blootstellingsconcentraties

5.2.5.1 Monsternamen en extractie

Tijdens het blootstellingsexperiment is een watermonster van 500 ml genomen uit elk van de bakken van de 4 kikkers die aan TCDD zijn blootgesteld en een watermonster van 2 ml uit elk van de bakken van de 6 kikkers die aan E2 zijn blootgesteld. Tijdstippen van bemonsteren waren 1 uur na toevoegen van TCDD of E2, voordat de kikkers in het water werden gezet, en nadat de kikkers 6 dagen in het water hadden gezeten. Voor het bepalen van de concentraties TCDD in water is TCDD uit het water geëxtraheerd met hexaan, het hexaan drooggedampt waarna het residu is opgenomen in DMSO. Watermonsters voor bepalingen van concentraties E2 behoeven geen voorbereiding. Gedetailleerde beschrijvingen van monsternamen en extractieprocedure zijn in de appendix.

5.2.5.2 H4IIE-bioassay/TEQ bepaling

TEQ in de extracten is bepaald als beschreven in paragrafen 2.3 en 10.2.2

5.2.5.3 Bepalen van concentraties E2 in water

Concentraties E2 in de onverdunde watermonsters zijn bepaald met EIA kits van R&D Systems (Abington, UK) als beschreven in paragraaf 2.1.4

5.2.6 Sektie

Na 11 weken van blootstelling zijn de kikkers verdoofd en gedood, waarna bloed en organen zijn uitgenomen. Voor het verdoven van de kikkers is een oplossing van tricaine methanesulfonaat (TMS, Crescent Research Chemicals, Phoenix, AR, USA) van 1 g/l gemaakt, waarna de pH is gesteld op 7 met 3 N NaOH. Elke kikker is gedurende ongeveer 5 min in deze oplossing gedompeld totdat geen pootreflex meer waarneembaar was. Nadat de kikker onder anesthesie was is de buikwand geopend en is bloed is afgenomen middels hartpunctie met een spuit waarin van tevoren enige korrels EDTA zijn gebracht. Het bloed is op ijs gezet en binnen 1 uur afgedraaid gedurende 10 min bij 2800xg bij kamertemperatuur (21-25 °C). Het plasma is ingevroren bij -80 °C. De lever en hersenen zijn uitgeprepareerd, gewogen en ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80 °C. Het vetweefsel is uitgeprepareerd, gewogen en bewaard bij -20 °C. De geslachtsorganen (bij mannetjes de testes en bij vrouwtjes het oviduct en de eieren) zijn verwijderd en gefixeerd met Unifix (Klinipath, Duiven, Nederland) gedurende 7 dagen bij kamertemperatuur. De sectie is uitgevoerd op 2 achtereenvolgende dagen. Op de eerste dag is sectie verricht op de helft van de vrouwtjes uit elke groep en alle mannetjes, en op de tweede dag is sectie verricht op de overige vrouwtjes. Tussen de eerste en tweede sektiedag zijn de kikkers niet gevoerd.

5.2.7 Eiwit, EROD en aromatase

De EROD- en aromatase activiteiten zijn bepaald als beschreven in paragrafen 2.1.1 en 2.1.2. Voor EROD is in elke well van een microtiterplaat 12-20 µg microsomaal eiwit 20 min geïncubeerd bij 25 °C. Eiwit is bepaald met de BCA kit (zie paragraaf 2.1.3).

5.2.8 Bepalingen van steroidhormonen in plasma

De plasmamonsters zijn 10x verdund met assay buffer, waarna concentraties E2, progesteron en testosteron in plasma zijn bepaald met ELISA kits van R&D Systems (Abington, UK) als beschreven in paragraaf 2.1.4.

5.2.9 Histologie

De behandeling van de geslachtsorganen, het snijden en kleuren van coupes zijn beschreven in paragraaf 2.2. Bij de beeldanalyse van coupes van testes zijn aantal clusters spermatiden in de tubuli seminiferi, aantallen tubuli seminiferi met en zonder spermatiden en aantal cellagen van het tubulus epitheel bepaald. Het aantal clusters spermatiden per tubulus is geteld in minimaal 20 tubuli verdeeld over 3 coupes per dier. De aantallen tubuli met en zonder spermatiden zijn geteld in 1 gezichtsveld bij vergroting 100 maal van elk 4-6 coupes per dier. Het aantal cellagen per tubulus is per dier geteld in 2-4 coupes, 3 tubuli per coupe en op 3 plaatsen per tubulus bij een vergroting van 200 maal. In een overzichtsfoto bij vergroting 40 maal van elk van 5 coupes per dier is gekeken naar de aanwezigheid van oöcyten.

Bij de beeldanalyse zijn de coupes van ovaria en eieren niet geanalyseerd omdat de oriëntatie van weefsels van de verschillende kikkers onvergelijkbaar en niet te standaardiseren was.

5.2.10 Bepalingen van TEQ in vetweefsel

Van het vetweefsel van elke kikker is 200 mg afgewogen en gehomogeniseerd in 500 µl DMSO in een glazen potterbuis met glazen piston. In de onverdunde homogenaten was een vetlaag aanwezig bovenop de DMSO. Na goed mengen is een deel (100 µl) van elk homogenaat 5 maal verdund met DMSO. TEQ in de onverdunde en de 5 maal verdunde homogenaten is bepaald als beschreven in paragraaf 2.3.

5.2.11 Statistiek

Voor de statistische analyses is gebruik gemaakt van Genstat 6.1 (VSN International Ltd, Oxford, UK). Verschillen tussen groepen vrouwelijke kikkers zijn getest met ANOVA, waarbij data voor enzymactiviteiten en steroidconcentraties log-getransformeerd zijn (Payne, 1993). Van log-getransformeerde data zijn geometrische

gemiddelden berekend; van overige data de rekenkundige gemiddelden. Verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke kikkers zijn getest met een T-test. Correlaties tussen parameters zijn getest met lineaire en asymptotische regressie (Lane, 1993).

5.3 Resultaten

5.3.1 Blootstellingsconcentraties

Een samenvatting van de actuele blootstellingsconcentraties TCDD en E2 is gegeven in Tabel 5.2. De uitgebreide resultaten en een discussie hierover zijn te vinden in de appendix. Van de 4 watermonsters voor TCDD bepaling na 0 dagen is er 1 verloren gegaan.

Tabel 5.2 Concentraties TCDD en E2 vlak voor en 6 dagen na plaatsen van de kikker

	nominaal	aktueel na 0 dgn	aktueel na 6 dgn
TCDD (pg/L)	500	346 ± 38 (3)	202 ± 113 (4)*
E2 (ng/L)	500	662 ± 38 (6)	150 ± 59 (6)***

Gemiddelden ± SD zijn gegeven. De getallen tussen haakjes geven de aantallen watermonsters weer. *: P<0.05; ***, P<0.001

5.3.2 Voeding, lichaamsgewicht en organen

De conditie van de kikkers bleef goed tijdens de periode van 8 maanden vangenschap. Hoewel de aantallen gegeten krekels aanzienlijk varieerden tussen individuele kikkers (tot een faktor 3), waren de gemiddelde aantallen gegeten krekels tijdens de blootstellingsperiode bij mannetjes en vrouwtjes in alle groepen vergelijkbaar. Tabel 5.3 geeft de voedings- en seltieparameters van de kikkers. Omdat er (met uitzondering voor de Lever Somatische Index LSI) geen significante verschillen waren tussen mannetjes en vrouwtjes, zijn de gemiddelden van mannetjes en vrouwtjes gegeven voor parameters die gelden voor zowel mannetjes als vrouwtjes.

Tabel 5.3 Voedings- en seltieparameters

	CONTR	TCDD	E2	E2-TCDD
Eindgewicht (alleen vrouwtjes)	60 ± 16 (4)	61 ± 26 (4)	56 ± 13 (4)	59 ± 14 (4)
Aantal gegeten krekels	165 ± 47 (6)	193 ± 26 (4)	186 ± 32 (6)	190 ± 18 (4)
Gewichtstocname (%)	20.5 ± 32.9 (6)	18.7 ± 21.7 (4)	15.3 ± 11.2 (6)	12.0 ± 28.1 (4)
LSI (alleen mannetjes)	7.5 ± 1.0 (2)		9.8 ± 1.3 (2)	
LSI (alleen vrouwtjes)	6.7 ± 2.0 (4)	5.7 ± 1.1 (4)	4.8 ± 0.7 (4)	5.3 ± 1.1 (4)
BSI	0.12 ± 0.02 (6)	0.13 ± 0.04 (4)	0.12 ± 0.03 (6)	0.12 ± 0.03 (4)
VSI	3.0 ± 2.0 (6)	2.6 ± 2.5 (4)	1.8 ± 1.2 (6)	1.4 ± 0.9 (4)
OSI (alleen vrouwtjes)	1.8 ± 1.7 (4)	4.3 ± 3.7 (4)	5.8 ± 2.2 (4)	4.2 ± 1.9 (4)
ESI (alleen vrouwtjes)	2.8 ± 4.6 (4)	8.8 ± 8.0 (4)	12.1 ± 2.8 (4)*	9.9 ± 2.1 (4)*
OSI +ESI (alleen vrouwtjes)	4.6 ± 6.1 (4)	12.6 ± 11.2 (4)	17.9 ± 4.7 (4)#	14.1 ± 3.4 (4)#
TSI (alleen mannetjes)	0.32 ± 0.07 (2)		0.31 ± 0.02 (2)	

Tenzij anders vermeld zijn gemiddelden ± SD van mannetjes en vrouwtjes gegeven. Getallen tussen haakjes geven de aantallen kikkers weer. LSI: Lever Somatische Index; BSI: Hersenen Somatische Index; VSI: V et Somatische Index; OSI: Oviduct Somatische Index; ESI: Eieren Somatische Index; TSI: Testes Somatische Index *: P<0.05, #: P=0.056

Het gewicht van 17 van de 21 kikkers was toegenomen tijdens blootstelling. Er waren geen significante verschillen in gewichtstoename tussen groepen en geslachten, mede omdat de spreiding binnen groepen zeer hoog was. Er is een positieve, maar niet significante correlatie tussen de gewichtstoename tijdens blootstelling en het aantal gegeten krekels ($P=0.053$; tabel 5.4). Opmerkelijk is dat de gewichtstoename hoger was naarmate het gewicht van de kikkers aan het begin van de blootstelling lager was (Fig 5.2). Tegelijkertijd was het vetpercentage (VSI) hoger naarmate de kikkers kleiner waren. De gewichtstoename van de kikkers wordt voor 60% verklaard door het vetpercentage van de kikkers (tabel 5.4).

Van 4 kikkers was het lichaamsgewicht met maximaal 25% afgenomen. Opvallend was dat op alle kikkers, waarvan het gewicht was afgenomen, op de tweede dag sectie (paragraaf 5.1.6) was verricht. Bij nadere bestudering van de data bleek dat sectie van de kleinste kikkers op dag 1 was verricht (zwarte symbolen in Fig. 5.2). Er waren, echter, geen significante verschillen tussen de regressielijnen voor gewichtstoename als functie van gewicht bij start na sectie op alleen dag 1 en na sectie op beide dagen. Om die reden is de regressielijn in Fig 5.1 door alle data gefit. Bovendien is het onwaarschijnlijk dat de dieren in 1 dag 25% van hun lichaamsgewicht aan vet zouden hebben verbrand.

Verder hebben TCDD en/of E2 geen invloed gehad op de Lever, Hersenen en Vet Somatische Index (LSI, HSI en VSI) (tabel 5.3). De LSI van de 4 mannetjes (8.6 ± 1.6) was, echter, hoger dan van 20 vrouwtjes (5.9 ± 1.3), $P < 0.001$.

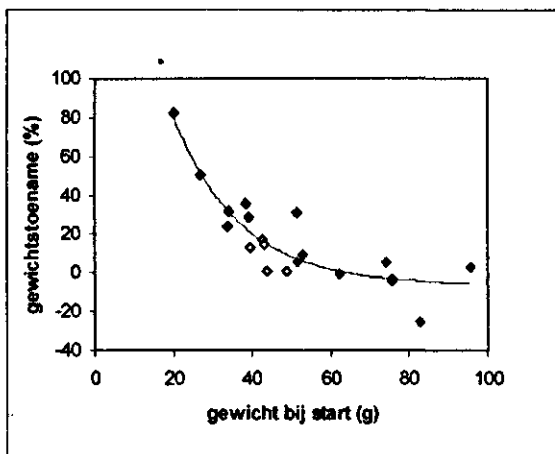


Fig. 5.2 Relatie tussen gewicht en gewichtstoename van de mannetjeskikkers na sectie op dag 1 (open symbolen) en vrouwtjeskikkers na sectie op dag 1 (zwarte symbolen) en dag 2 (grijze symbolen). Het testmannetje dat is gebruikt voor de metingen die zijn beschreven in de appendix is ook bij de data. Door de data zijn asymptotische curves gefit: $\text{gewichtstoename} = -6.4 + 279.9 * 0.9432^{\text{startgewicht}}$, $p < 0.001$, variatie voor 81% verklaard

Tabel 5.4 Relaties tussen sektieparameters in kikkers (alleen vrouwtjes (V), of mannetjes en vrouwtjes gecombineerd (MV))

Verklarende parameter (X-as)	Respons-parameter (Y-as)	Significantie	%_var	Vergelijking	Data van
Gegeten krekels	Gewichtstoename	n.s. (P=0.053)	14	$Y = -33.2 + 0.275 \cdot X$	MV
Gegeten krekels	VSI	n.s.	1.5		MV
Gewicht bij start	Gewichtstoename	***	81	$Y = 6.4 + 279.9 \cdot 0.9432^X$	MV
Gewicht bij start	VSI	***	49	$Y = 5.39 - 0.0619 \cdot X$	MV
Gewicht bij start	OSI	**	34	$Y = -0.05 + 0.076 \cdot X$	V
Gewichtstoename	VSI	***	59	$Y = 1.287 + 0.058 \cdot X$	MV
Gewichtstoename	ESI	n.s.	0		V
ESI	Gegeten krekels	n.s. (P=0.113)	11	$Y = 158.9 + 2.49 \cdot X$	V
VSI	ESI	**	37	$Y = 12.32 - 1.977 \cdot X$	V
OSI	ESI	***	66	$Y = 1.31 + 1.733 \cdot X$	V

n.s.: niet significant; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; %_var.: te verklaren percentage

5.3.3 Voortplantingsgedrag en geslachtorganen

Na 6 weken van de blootstellingsperiode had een kikker uit de groep TCDD-E2 eieren afgezet. Toen de mannetjes die uit de sloot bij de Sinderhoeve waren gevangen met de vrouwtjes werden gecombineerd werden door 3 van de 4 mannetjes pogingen tot paren (amplexus) ondernomen. De vrouwtjes, echter, reageerden geen van allen op de mannetjes. Tijdens de laatste week van de blootstelling – na combinatie met een mannetje - heeft een vrouwtjeskikker uit de TCDD groep een klein beetje eieren afgezet.

Bij sectie bleek dat de kleinste kikker uit zowel de groepen controle en TCDD (gewichten bij sectie respectievelijk 36 en 41 g) geen zichtbaar oviduct hadden, en dat het aantal eieren zeer gering was. In een andere – vrij grote - kikker uit de controlegroep (bij sectie 62 g) was het oviduct vrij klein, en waren er geen eieren. In alle overige kikkers (bij sectie 41-100 g) waren duidelijk oviduct en eieren (buiten het oviduct in de buikholte) aanwezig (Fig 5.3 A en B). Ook zijn er significant positieve correlaties tussen gewichtspercentage oviduct (OSI) en gewichtspercentage eieren (ESI), en OSI en het gewicht van de kikkers aan het begin van de blootstelling. (tabel 5.4).

Onder invloed van E2 was ESI bijna verdubbeld, en was er een toenemende – doch niet significante - trend voor wat betreft OSI aanwezig ($P=0.14$; tabel 5.3). Log-transformatie van ESI en OSI voegt niets toe aan de mate van significantie van de effecten van E2. Het gewichtspercentage eieren heeft niet significant bijgedragen aan de gewichtstoename tijdens blootstelling (tabel 5.4). Het vetpercentage, echter, was significant lager naarmate het gewichtspercentage eieren hoger was. Tegelijkertijd was er een – niet significante – trend ($P=0.11$) dat, naarmate vrouwtjes meer eieren hadden geproduceerd, ook meer krekels hadden gegeten (tabel 5.4).

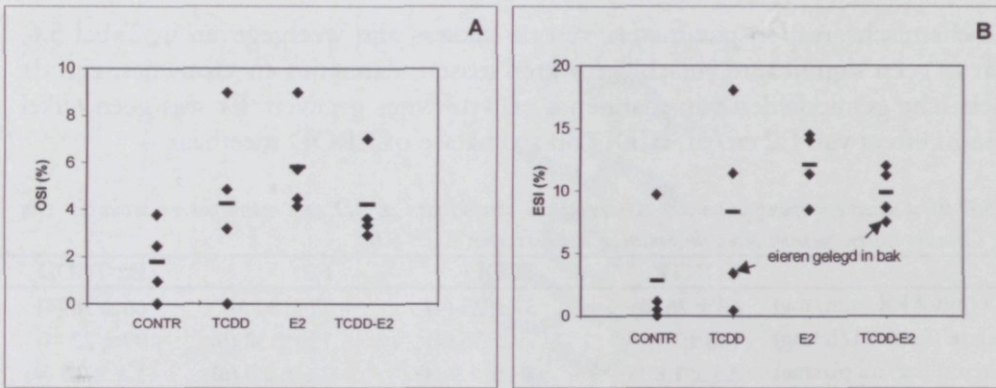


Fig 5.3 Ovarium (A) en Eieren (B) Somatische Index (OSI en ESI) van de vrouwtjeskikkers. De liggende symbolen geven de gemiddelden weer. De pijltjes geven de kikkers weer die eieren hadden gelegd tijdens de blootstellingsperiode, waardoor de ESI is onderschat

Tabel 5.5 Morfologische parameters in testes. Gemiddelden \pm SD zijn gegeven (zie paragraaf 7.1.9)

	CONTR		E2	
	Kikker 1	Kikker 2	Kikker 1	Kikker 2
Aantal clusters spermatiden per tubulus	18.2 \pm 6.1	22.0 \pm 3.1	20.8 \pm 5.3	16.6 \pm 4.4
Aantal tubuli met spermatiden per gezichtsveld	13.5 \pm 2.6	14.3 \pm 2.1	13.3 \pm 3.8	15.0 \pm 0.7
Aantal tubuli zonder spermatiden per gezichtsveld	9.8 \pm 4.7	4.7 \pm 2.9	7.5 \pm 2.1	6.5 \pm 2.6
Dikte epitheelwand (aantal cellagen)	4.6 \pm 1.3	5.1 \pm 1.9	5.7 \pm 2.3	5.4 \pm 2.0

In de testes van de mannelijke kikkers zijn geen tekenen van intersex (oöcyten) aangetroffen. Ook zijn geen effecten van E2 op de in Tabel 5.5 vermelde morfologische parameters waargenomen.

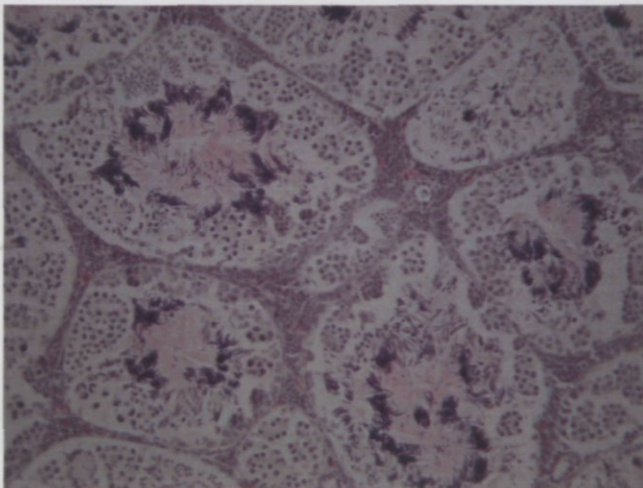


Fig 5.4 Dwarsdoorsnede van de testis van een mannelijke kikker uit de controlegroep bij een vergroting van 200 maal

5.3.4 Biochemische responsparameters

De biochemische responsparameters van de kikkers zijn weergegeven in Tabel 5.6. Omdat er geen significante verschillen waren tussen mannetjes en vrouwtjes, zijn de geometrische gemiddelden van mannetjes en vrouwtjes gegeven. Er was geen enkel significant effect van E2 en/of TCDD op aromatase of EROD meetbaar.

Tabel 5.6 Biochemische responsparameters. Geometrische gemiddelden \pm SD van mannetjes en vrouwtjes zijn gegeven. Getallen tussen haakjes geven de aantallen kikkers weer. *: $P < 0.05$

	CONTR	TCDD	E2	E2-TCDD
EROD (pmol RR/min/mg)	68 \pm 26 (6)	57 \pm 25 (4)	77 \pm 80 (6)	66 \pm 16 (4)
Aromatase (fmol 3 H/h/mg)	106 \pm 27 (6)	79 \pm 35 (4)	120 \pm 32 (6)	99 \pm 22 (4)
Testosteron (ng/ml plasma)	2.3 \pm 1.8 (6)	1.4 \pm 1.9 (4)	2.6 \pm 2.0 (6)	1.1 \pm 0.3 (4)
Progesteron (ng/ml plasma)	2.9 \pm 3.0 (6)	1.4 \pm 0.8 (4)*	3.3 \pm 1.1 (6)	2.0 \pm 0.8 (4)*
E2 (ng/ml plasma)	5.6 \pm 5.3 (6)	11.9 \pm 6.4 (4)	4.1 \pm 3.5 (6)*	3.8 \pm 5.0 (4)*

De gehalten van de steroidhormonen testosteron, progesteron en E2 in plasma waren vergelijkbaar tussen mannetjes en vrouwtjeskikkers (Fig 5.5). Ook waren er geen effecten van E2 of TCDD op testosteron. Onder invloed van TCDD was progesteron 40% verlaagd. Opmerkelijk was dat onder invloed van E2 in water het plasma-E2 gemiddeld ruim 50% verlaagd was bij de vrouwtjes. Bovendien zijn er significant negatieve correlaties tussen E2, aromatase en ESI, zoals vermeld in tabel 7.7. Progesteron, testosteron en cytochroom P450 enzymen correleren niet met elkaar.

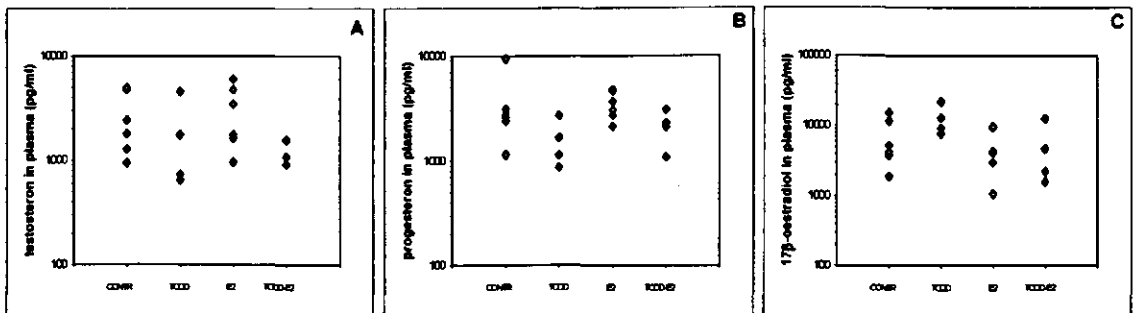


Fig 5.5 Testosteron (A), progesteron (B) en E2 (C) in plasma van vrouwtjes- (gesloten symbolen) en mannetjeskikkers (open symbolen)

Tabel 5.7 Relaties tussen sectie- en/of biochemische parameters in kikkers (alleen vrouwtjes (V), of mannetjes en vrouwtjes gecombineerd (MV))

Verklarende parameter (X-as)	Respons-parameter (Y-as)	Significantie	%_var	Vergelijking	Data van
E2	ESI	*	21	$Y = 12.44 - 0.000513 \cdot X$	V
Testosteron	aromatase	n.s.	0		MV en V
Progesteron	aromatase	n.s.	0		MV en V
E2	aromatase	*	17	$Y = 126.3 - 0.00256 \cdot X$	MV
E2	aromatase	n.s. ($P=0.087$)	13.7	$Y = 126.3 - 0.00260 \cdot X$	V
EROD	aromatase	n.s.	0		MV en V
Testosteron	E2	n.s.	0		MV

n.s.: niet significant; *: $P < 0.05$; %_var.: te verklaren percentage

5.3.5 Interne dosis-effect relaties

Als controle of TCDD überhaupt wel was opgenomen door de kikkers is TEQ in vetweefsel bepaald. TEQ was gemiddeld ruim 10x hoger bij kikkers die waren blootgesteld aan TCDD ($P < 0.001$; Fig. 5.6).

Tabel 5.8 laat zien dat er een negatieve correlatie is tussen TEQ en progesteron. Testosteron, E2, ESI en cytochroom P450 enzymen correleren niet met TEQ.

Omdat er verschillen waren tussen mannetjes en vrouwtjes voor wat betreft LSI, zijn alleen voor LSI mannetjes en vrouwtjes apart geanalyseerd. De in tabel 5.8 vermelde correlatie tussen TEQ en LSI bij alleen mannetjes is gebaseerd op datapunten van 4 kikkers die niet en 1 kikker die wel was blootgesteld aan TCDD. Het te verklaren percentage wordt dus vooral bepaald door het ene meetpunt met hoge TEQ.

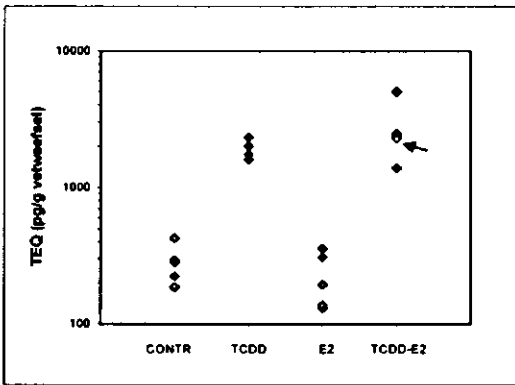


Fig 5.6 TEQ in vetweefsel van vrouwtjes- (gesloten symbolen) en mannetjeskikkers (open symbolen). De pijl geeft TEQ van de mannetjeskikker, die voor de aanvang van het blootstellings-experiment 5 weken lang was blootgesteld aan TCDD, en daarna niet meer (zie appendix), weer

Tabel 5.8 Relaties tussen TEQ als verklarende parameter en seksie- en biochemische respons-parameters in kikkers van alleen vrouwtjes (V), mannetjes (M), of mannetjes en vrouwtjes gecombineerd (MV). n.s.: niet significant; *: $P < 0.05$; %_var.: te verklaren percentage

Respons-parameter (Y-as)	Significantie	%_var.	Vergelijking	Data van
LSI	n.s.	0		V
LSI	0.06	88	$Y = 5.332 + 10.67 * 0.99^X$	M
ESI	n.s.	0		V
aromatase	n.s.	5.9		MV en V
EROD	n.s.	0		MV
Testosteron	n.s.	6.3		MV
Progesteron	n.s. ($P = 0.063$) ¹	19.3		MV
Progesteron	*	34.2	$Y = 1877 + 2486 * 0.99642^X$	V
E2	n.s.	3.3		MV

1: Asymptotische regressie; bij lineaire regressie bij alleen vrouwtjes werd geen significantie aangetoond

5.4 Discussie

5.4.1 Voeding en gewicht van de kikkers

Gemiddeld genomen zijn de kikkers in gewicht toegenomen tijdens de blootstellingsperiode. De eetlust van de kikkers werd niet beïnvloed door E2 en/of TCDD, zoals blijkt uit een vergelijkbare gemiddelde krekelconsumptie in alle groepen (tabel 5.3). Het is niet verbazingwekkend dat 60% van de gewichtstoename wordt verklaard door vetpercentage (tabel 5.4). De activiteit van de kikkers was mogelijk vergelijkbaar met die onder natuurlijke omstandigheden in de winter, waarbij de ze wegkruipen in de modder. De voedselinname was, echter, hoger in vergelijking met onder natuurlijke omstandigheden.

De negatieve correlatie tussen ESI en vetpercentage en de positieve trend tussen ESI en het aantal gegeten krekels impliceren dat de vrouwtjes die de meeste eieren hebben geproduceerd het minst vet waren en het meest hebben gegeten. Het lijkt er dus op de productie van eieren veel energie vergt, hetgeen niet verbazingwekkend is. Immers, de vitellogenese en vorming van ei-dooier vereisen veel energie.

5.4.2 Aktuele concentraties E2 en TCDD in water en opname van TCDD door kikkers

Tijdens de blootstelling daalde de TCDD concentratie van gemiddeld 346 naar gemiddeld 202 pg/L, en E2 van gemiddeld 662 naar gemiddeld 150 ng/L na 6 dagen. Er is dus sprake geweest van een “zaagtandverloop” van de concentraties. Tijdens de laatste 3 weken, toen de bakken 2 maal per week werden verschoond, zijn deze fluktuaties naar verwachting met een faktor 2 gereduceerd. Het verschil tussen aktuele (gemiddeld 346 pg/L) en de nominale beginconcentratie TCDD (500 pg/L) wordt verondersteld veroorzaakt te zijn door binding van TCDD aan het glasvezelfilter (zie discussie in appendix). Ook is duidelijk aangetoond dat TCDD is opgenomen door de kikker en is opgeslagen in vetweefsel. Opmerkelijk is TEQ van het mannetje (2260 pg/g vet) dat voor aanvang van het blootstellings-experiment gedurende 5 weken was blootgesteld aan TCDD (zie appendix), en tijdens het blootstellingsexperiment niet meer, vergelijkbaar was met TEQ van de kikkers die tot de sekte gedurende 11 weken zijn blootgesteld aan TCDD (1400-5000 pg/g vet; Fig. 5.5). Dit is een aanwijzing dat de meeste TCDD is opgenomen aan het begin van de blootstellingsperiode en dat, zolang er geen voedselgebrek is, eenmaal in vet opgeslagen TCDD daar blijft.

De opname van TCDD heeft voornamelijk plaatsgevonden via de huid en niet via het voedsel. In de vrije natuur worden contaminanten waarschijnlijk via beide routes opgenomen, waarbij de effectiviteit van beide routes naar alle waarschijnlijkheid verschillend is. Met andere woorden: gelijke concentraties TEQ in vetweefsel van dieren uit het veld duiden niet persé op gelijke concentraties TEQ in het water. Concentraties in vetweefsel zijn dus een betere maat voor de uiteindelijke belasting. Totaal TEQ in vetweefsel van de aan TCDD blootgestelde kikkers, na aftrek van gemiddelde TEQ van de controlegroep (d.i. de procedure-blanko omdat de controle kikkers niet waren blootgesteld aan TCDD) en vermenigvuldiging met de totale hoeveelheid vetweefsel, varieerde tussen 600 en 3600 pg (gemiddeld 1858 pg).

Aangenomen dat er nauwelijks vet is verbrand, en dat 50% van de door de kikkers opgenomen TCDD in vet is opgeslagen (zie Huang et al., 2000), en nauwelijks is gemetaboliseerd, zou de totale hoeveelheid opgenomen TCDD die is opgenomen door een kikker, gedurende 11 weken, gemiddeld tenminste 3700 pg bedragen, en dus gemiddeld ongeveer 340 pg per week bedragen. De totale beginhoeveelheid TCDD in 3 L water van ongeveer 1000 pg was na 6 dagen gedaald tot 600 pg. Deze afname is in dezelfde orde van grootte als de veronderstelde opname door de kikker. Deze resultaten tonen aan dat de blootstelling en opname is geweest zoals verondersteld.

Bovendien is TEQ in vetweefsel van de aan TCDD blootgestelde kikkers uit de huidige studie in dezelfde orde van grootte als wat is gevonden in juveniele kikkers uit Volgermeerpolder (640 en 4300 pg/g vet; Van den Brink et al., 2002). Dit impliceert dat de belasting die in het huidige experiment is opgelegd vergelijkbaar is met de belasting in sterk verontreinigde oppervlaktewateren.

5.4.3 EROD als biomarker bij kikkers

Ondanks dat duidelijk is vastgesteld dat er meetbare hoeveelheden E2 en TCDD aanwezig waren in het water waarin kikkers zaten, en dat TCDD is opgenomen door de kikkers, blijken deze concentraties te laag om EROD te beïnvloeden. In de literatuur is reeds beschreven dat kikkers veel minder gevoelig zijn voor TCDD dan vogels en zoogdieren (Huang et al., 1999). De TEQ's (1.4-5 ng/g vetweefsel; totaal TEQ in vetweefsel maximaal 3.6 ng) die wij detekteerden zijn veel lager dan ED₅₀ van PCB126 (700 - 2300 ng/g natgewicht karkas) voor EROD-inductie in kikkers (Huang et al., 1999). Een ED₅₀ van 700 - 2300 ng/g natgewicht karkas komt overeen met 11000-38000 ng/g orgaanvet (bij VSI van 3% en 50% van opgenomen PCB's in vet). Er vanuit gaande dat 50% van de door de kikkers opgenomen TCDD in orgaanvet is opgeslagen (zie Huang et al., 2000), zouden de kikkers uit ons experiment maximaal 2 maal 3.6, ongeveer 7 ng TCDD hebben opgenomen. Wij meten dus tenminste een 1600 maal lagere concentratie TEQ in vergelijking met de ED₅₀ van PCB126 die door Huang en collega's zijn bepaald. Op grond van deze resultaten is het onwaarschijnlijk te achten dat er inductie van EROD optreedt, gegeven dat TCDD een factor 10 maal potenter is dan PCB126 (Safe, 1990).

Het is ook niet aannemelijk dat dat productie van cytochroom P450 eiwitten wordt gestimuleerd bij de door ons opgelegde belasting. Huang en collega's (2001) hebben middels immunohistochemie aangetoond dat er zowel EROD activiteit als cytochroom P4501A wordt geïnduceerd in de levers van kikkers na orale toediening van (de extreem hoge dosis van) 5 mg/kg kikker PCB126. Met inachtneming van het lichaamsgewicht van de kikkers (ca. 40 g), en ervan uitgaande dat de TEF-waarde van PCB126 0.1 is (Safe, 1990), was het aantal TEQ van deze dosis (20 µg per kikker) tenminste 2800 maal hoger dan wat maximaal aan TCDD is opgenomen door de kikkers van ons experiment. Helaas is door Huang en collega's (2001) de immunoreactiviteit van anti-CYP1A in levers van kikkers die een lagere dosis PCB126 kregen toegediend, waarbij geen inductie van EROD-activiteit optreedt, niet bestudeerd.

Het is wel mogelijk dat de substratspecificiteit van lever cytochroom P450 enzymen van kikkers anders is als van zoogdieren. Anders uitgedrukt: mogelijk zijn bij kikkers, in vergelijking met zoogdieren, inducties van omzettingen van andere substraten dan ethoxyresurufine gevoeliger biomarkers voor blootstellingen aan dioxine-achtige stoffen. Een andere studie (Schwen en Mannering, 1982) laat zien dat 3-methylcholanthrene p-nitrophenetole- en benzo[a]pyreen hydroxylase activiteiten in kikkers en ratten worden geïnduceerd met respectievelijk voor kikkers een faktor 1.8 en 2.6 en ratten een faktor 3.9 en 3.3. Een dosis van 5 mg/kg lichaamsgewicht 3-methylcholanthrene (200 µg per kikker bij lichaamsgewicht van 40 g) bleek in deze studie voldoende voor een significante inductie van en benzo[a]pyreen hydroxylase activiteit in kikkers. Echter, de hoeveelheid TCDD die maximaal is opgenomen door de kikkers uit ons experiment van maximaal 7 ng is tenminste 28000 maal lager. Er is niets bekend over de potentie van TCDD in vergelijking met 3-methylcholanthrene. Tenzij 3-methylcholanthrene meer dan een faktor 28000 potenter is dan TCDD is een inductie van de benzo[a]pyreen hydroxylase activiteit in levermicrosomen van kikkers uit dit experiment niet te verwachten.

Uit dit alles kan worden afgeleid dat de EROD activiteit bij kikkers een minder geschikte biomarker is voor blootstelling aan Ah-receptor agonisten

5.4.4 Reproductie-gerelateerde respons-parameters

Het feit dat, noch door het testmannetje, noch door de vrouwtjeskikkers pogingen tot paren werden ondernomen impliceert dat tijdens de gevangenschap het natuurlijke voortplantingsgedrag niet is gestimuleerd door verhoging van de overwinteringstemperatuur van 10 naar 20 °C. In vergelijking met de wintertemperatuur in West-Europa is 10 °C vrij warm. Mogelijk is een lagere wintertemperatuur vereist om tot een effectieve prikkeling van voortplantingsgedrag te komen na verhoging van de temperatuur. Verandering van lichtregime, daarentegen, heeft weinig invloed op het voortplantingsgedrag (Lofts, 1984).

Een sterke daling van androgenen bij mannetjes tijdens gevangenschap van kikkers is reeds beschreven (zie Lofts, 1984). Echter, de door ons gevonden plasmaconcentraties testosteron in mannetjes zijn in dezelfde orde van grootte als gevonden door Polzonetti-Magni et al. (1984, 1998) in "vers" uit de vrije natuur gevangen groene mannelijke kikkers. (Deze onderzoekers detekteerden weinig fluktaties in plasma-testosteron en TSI gedurende verschillende seizoenen). Het uitblijven van voortplantingsgedrag bij mannetjes lijkt op grond van deze resultaten niet te zijn veroorzaakt door lage androgeen-nivo's. Om dit te bevestigen zou een vergelijking in onze EIA van plasma van de kikkers in gevangenschap met "vers"gevangen kikkers moeten worden uitgevoerd.

De TSI van mannetjes (0.26-0.37 %) was in dezelfde orde van grootte als gevonden door Polzonetti-Magni et al. (1984). Afwezigheid van oöcyten in de testes, alsmede uitblijven van effecten van E2 op het aantal spermatiden en de morfologie van de testes van mannelijke kikkers suggereert dat de reproductiecapaciteit van volwassen mannetjeskikkers onaangetast is gebleven. Verschijnselen van intersex na blootstelling aan hormoon-verstorende stoffen zijn eerder te verwachten in juveniele dan in volwassen kikkers (Bauer et al., 1997).

Het feit dat in de buikholte van bijna alle vrouwelijke kikkers eieren zijn aangetroffen impliceert dat ei-afzetting nabij was. In de aan E2 blootgestelde dieren was de ESI bijna verdubbeld en was er een toenemende trend voor wat betreft OSI. Een toename van OSI onder invloed van E2 is te verwachten omdat groei van het oviduct wordt gestimuleerd door oestrogenen (Lofts, 1984). De door ons gevonden som OSI en ESI (tabel 7.3) zijn in dezelfde ordes van grootte als de gonadosomatische index (GSI) van die is gevonden door Mosconi et al. (1994) en Polzonetti-Magni et al. (1998) (17-22% vlak voor ei-afzetting, 2-5% vlak na ei-afzetting en 12-17% tijdens overwintering). Opmerkelijk is dat ESI + OSI van de kikkers van de groepen controle (gemiddeld 5 %) en E2 (met of zonder TCDD, gemiddeld 16 %) vergelijkbaar zijn met de GSI van kikkers respectievelijk vlak na ei-afzetting en tijdens overwintering. Gezien de tijd van het jaar (juni), en dat, op twee na, geen van de kikkers eieren hadden afgezet, zou men op basis van de waarnemingen uit de literatuur een OSI + ESI van tenminste 17% verwachten (vergelijkbaar met vlak voor ei-afzetting). Omdat deze kikkers naar alle waarschijnlijkheid een hoger vetpercentage hadden in vergelijking met kikkers na overwintering in de vrije natuur, is de GSI waarschijnlijk onderschat ten opzichte van de studies van Polzonetti-Magni met kikkers uit de vrije natuur.

Zelfs na correctie voor verschillen in vetpercentage (0.4 - 7) was OSI + ESI van kikkers uit de controle-groep en twee kikkers uit de TCDD-groep laag in vergelijking met de natuurlijke cyclus en de overige kikkers uit deze studie. Bovendien was er een positieve correlatie tussen ESI en OSI (tabel 5.4): de ESI van de kikkers met de laagste OSI was het laagst. Bij deze kikkers was de groei van het oviduct en vitellogenese kennelijk veel minder dan onder natuurlijke omstandigheden. Wanneer, echter, de positieve correlatie tussen OSI en lichaamsgewicht nader wordt bekeken (Fig. 5.7), valt op dat de twee kikkers (uit de controle- en TCDD-groepen) waarin geen zichtbaar oviduct werd aangetroffen (en waarvan ESI het laagst was), het laagste lichaamsgewicht hadden. Mogelijk was de leeftijd van deze twee vrouwtjes het laagst, waren de dieren net volwassen, en was de seksuele potentie ook lager in vergelijking met de andere vrouwtjes. Wanneer de data van deze twee kikkers buiten beschouwing worden gelaten, blijkt nog steeds dat ESI + OSI van controle-kikkers (tabel 5.9) lager was, en vergelijkbaar is met met de GSI van kikkers vlak na ei-afzetting (3.5-5%).

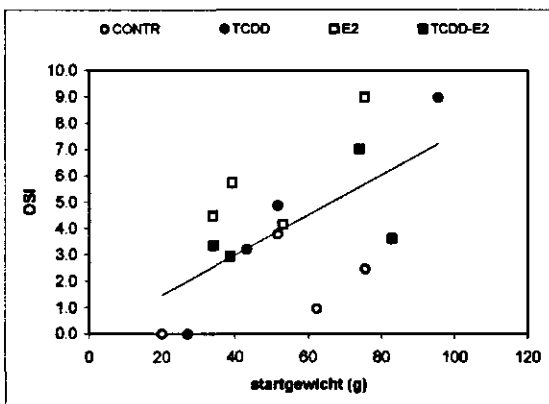


Fig. 5.7. Relatie tussen gewicht van kikkers bij start blootstelling en de OSI

Tabel 5.9 Gonadosomatische parameters van vrouwtjes zonder data van kikkers met OSI=0

	CONTR	TCDD	E2	E2-TCDD
OSI	2.4 ± 1.4(3)	5.7 ± 3.0 (3)	5.8 ± 2.2 (4)	4.2 ± 1.9 (4)
ESI	3.6 ± 5.3 (3)	11.0 ± 7.3 (3)	12.1 ± 2.8 (4)	9.9 ± 2.1 (4)
OSI +ESI	6.0 ± 6.6 (3)	16.6 ± 9.5 (3)	17.9 ± 4.7 (4)	14.1 ± 3.4 (4)

ANOVA zonder de data van deze twee kikkers detecteert geen significante effecten van E2 of TCDD ($P > 0.15$), maar een net-niet-significante positieve trend van E2xTCDD op de OSI, ESI en OSI+ESI (P respectievelijk 0.076, 0.063 en 0.052). De verdeling van data voor ESI en OSI zonder data van kikkers met OSI=0 (Fig. 7.2 zonder de punten OSI=0) laten zien dat er geen verschillen zijn tussen de 3 aan TCDD en/of E2 blootgestelde groepen onderling, maar dat 2 van de 3 overgebleven controle-kikkers een lagere OSI en ESI hadden dan van alle overige kikkers. Onder invloed van beide, TCDD of E2, lijkt er een toenemende trend voor wat betreft ESI en OSI.

De door ons gevonden plasma-concentraties progesteron (1-10 ng/ml) en E2 (1-22 ng/ml) zijn in de meeste gevallen hoger, en testosteron (0.7-5 ng/ml) is in dezelfde orde van grootte als gevonden door Polzonetti-Magni et al. (1984) in "vers" uit de vrije natuur gevangen groene kikkers in de maanden april tot en met september (tijdens en vlak na het voortplantingsseizoen). In deze studie van Polzonetti-Magni et al. piekte plasma-E2 tijdens de maand juli van 0.2-0.9 naar 2-7 ng/ml. De E2-concentraties die door Polzonetti-Magni et al. zijn gepubliceerd in 1998 zijn lager dan 1 ng/ml, maar pieken tot 2 en 7 ng/ml in respectievelijk de december en maart (maar niet in juli). Ondanks dat de kikkers uit beide studies van Polzonetti-Magni et al. zijn gevangen uit hetzelfde gebied is het verloop van de concentraties E2 tijdens de maanden april-september verschillend. Hierdoor is het lastig om hormoonconcentraties tijdens verschillende voortplantingsseizoenen uit verschillende studies te vergelijken. Desondanks is het niet uit te sluiten dat de hormoonhuishouding op andere nivo's is beïnvloed door gevangenschap. Het uitblijven van natuurlijk voortplantingsgedrag wijst hier op.

De verlaging van progesteron onder invloed van TCDD wordt bevestigd door de significant negatieve correlatie tussen TEQ en progesteron (tabel 5.8). De TCDD-gerelateerde afname van vrij progesteron impliceert dat TCDD mogelijk de steroïdogenese beïnvloedt. In vitro studies met granulosa cellen laten inderdaad effecten van TCDD op steroïdproductie zien (Moran et al., 2000, Gregoszczuk et al., 2001). Een lagere plasma-concentratie progesteron heeft niet geleid tot een lagere ESI. Immers, de eirijping, ovulatie en coating van eieren met slijm zijn processen welke in sterke mate door progesteron (via stimulatie door gonadotrofines) worden gestimuleerd (Lofts, 1984). Hierbij dient te worden opgemerkt dat met de EIA geen totaal-progesteron, maar alleen vrij in plasma aanwezig (dus niet aan b.v. receptoren gebonden) progesteron wordt gedetecteerd.

Het negatieve effect van E2 in water op plasma-E2 is opmerkelijk. Mogelijk wordt de vorming van plasma-E2 geremd via een negatief feedbackmechanisme. Ondanks het feit dat er geen direct effect van E2 in het water op aromatase is vastgesteld, is er een significant negatieve correlatie tussen aromatase en plasma-E2 (Tabel 5.7). De

aromatase activiteit in de hersenen is lager bij een hogere plasmaconcentratie E2 (Fig 5.8). Deze correlatie toont niet persé een direct causaal verband aan tussen aromatase en plasma-E2, mede omdat plasma-E2 slechts de concentratie vrij E2 weerspiegelt. Een factor die mogelijk een rol speelt is negatieve feedback van aromatase door E2.

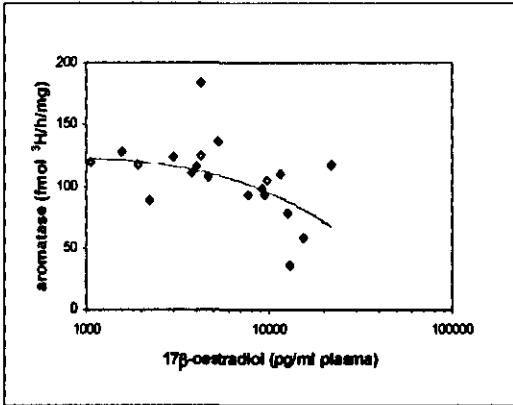


Fig 5.8 Correlatie tussen E2 en aromatase in mannetjes- (open symbolen) en vrouwtjeskikkers (gesloten symbolen). Regressielijn: $\text{aromatase} = 126 - 0.0026 * E2$, 17% van de variatie verklaard, $P < 0.05$

Ook is het mogelijk dat het aantal oestrogeenreceptoren toeneemt onder invloed van extern E2, waarna E2 daaraan bindt, zodat minder vrij E2 wordt gedetecteerd met de EIA, terwijl de productie van eieren wordt verhoogd. Uit een studie van Guerriero et al. (2000) blijkt namelijk dat het aantal oestrogeenreceptoren een factor 20 kan variëren tijdens voortplantingscyclus van groene kikkers. De negatieve correlatie tussen plasma-E2 en ESI (Fig 5.9) lijkt dus de uiteindelijke resultante van deze factoren. Omdat bij bepalingen van plasma-E2 alleen het vrije E2, en niet het (aan b.v. receptoren) gebonden E2 wordt gedetecteerd kan men op grond van metingen van alleen plasma-E2 niet concluderen dat er een causaal verband is tussen een verlaagd plasma-E2 (ongebonden) en productie van eieren.

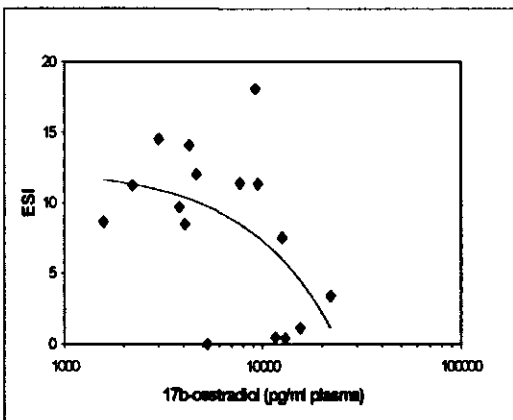


Fig 5.9 Correlatie tussen ESI en E2 bij vrouwtjeskikkers. Regressielijn $\text{ESI} = 12.4 - 0.00051 * E2$, 21% van de variatie verklaard, $P < 0.05$

5.5 Conclusies met betrekking tot volwassen groene kikkers als indikator voor hormoonverstorende stoffen

Tijdens de periode van gevangenschap bleven de kikkers in goede conditie, maar voortplantingsgedrag werd niet gestimuleerd door verhoging van de overwinteringstemperatuur van 10 °C naar 20 °C tijdens de voorjaarsmaanden. De GSI van mannelijke kikkers was vergelijkbaar, en van de vrouwelijke kikkers uit de controlegroep lager dan op grond van het jaargetijde verwacht kan worden in de vrije natuur.

Blootstelling van volwassen groene kikkers gedurende 11 weken aan 200-350 pg/L TCDD in water resulteert in een 40% verlaging van plasma-progesteron bij vrouwtjes.

Blootstelling van volwassen groene kikkers gedurende 11 weken aan 150-660 ng/L E2 in water resulteert in een verdubbeling van ESI en halvering van plasma-E2 bij vrouwtjes. Tevens is er een significant negatieve correlatie tussen ESI en plasma-E2.

Er zijn geen effecten van TCDD en/of E2 op:

- voedselconsumptie en gewichtstoename
- de gewichtspercentages van vet, hersenen en lever
- de EROD- en aromatase activiteiten.
- plasma-testosteron
- de morfologie van de de testes van mannetjes

De negatieve correlatie tussen plasma-E2 en de aromatase activiteit weerspiegelt wel een indirect effect.

6 Pilot experiment in situ blootstelling en ontwikkeling van larven van de groene kikker *Rana esculenta*

6.1 Inleiding

Na de voorafgaande studies met larven van de *Xenopus* en *Rana* is duidelijk geworden dat TCDD, en naar alle waarschijnlijkheid ook andere dioxine-achtige stoffen, de ontwikkeling mogelijk remmen, de vitaliteit van de testes mogelijk aantasten en de EROD-activiteit induceren. Om na te gaan in hoeverre dergelijke effecten optreden in het milieu is een in situ blootstellingsstudie uitgevoerd waarbij larven van de algemeen in Nederland voorkomende groene kikker *Rana esculenta* zijn gebruikt. Deze larven zijn uitgezet in de wateren van de sterk verontreinigde (met onder andere dioxine-achtige stoffen) Volgermeerpolder in roestvrijstalen kokers waarbij een vrije uitwisseling van water en klein materiaal mogelijk is via kleine gaasopeningen. Als referentie zijn larven uitgezet in het niet-verontreinigde recreatiegebied het Twiske in dezelfde regio.

6.2 Materiaal en Methode

Larven (stadium 20/21, Witschi, 1956) van de groene kikker zijn in mei 2001 verzameld uit een niet-verontreinigde proefsloot bij de Sinderhoeve, nabij Renkum. De verzamelde larven zijn met een penseel opgesplitst in groepen van 50-70 exemplaren. Iedere groep larven was uitgezet in een stalen koker (doorsnede 10 en lengte 40 cm) met gaasopeningen van ca. 1 mm. In elke koker was een streng waterpest (*Elodea nuttallii*) gebracht. De kokers waren schuin in het water opgehangen, waarbij de bovenkant net uit het water was, en de diepte varieerde tussen 0 en 40 cm. Op elke lokatie (Volgermeer en Twiske) zijn 7 kokers uitgezet. Elke week zijn de aantallen nog levende kikkervisjes geteld, waarbij ook gelet is op eventuele afwijkingen. Ook zijn de temperatuur en geleidbaarheid van het water gemeten. Zodra kikkervisjes een lengte van 3 cm hadden bereikt zijn ze overgeplaatst naar stalen kooien (30x30x30 cm) met gaasopeningen van ca. 3 mm. Deze kooien zijn opgehangen in het water op een diepte van ca. 10 cm tot de bovenkant.

In augustus 2001 is besloten het experiment te beëindigen. De nog in leven zijnde kikkervisjes zijn verdoofd met een oplossing van tricaine methanesulfonaat (TMS, Crescent Research Chemicals, Phoenix, AR, USA) van 1 g/l, pH 7, en in Unifix (Klinipath, Duiven, Nederland) gebracht. De morfologie van de gefixeerde kikkervisjes is kwalitatief beoordeeld.

6.3 Resultaten

Tijdens de veldstudie bleek de grote sterfte het belangrijkste probleem. De larven in het Twiske waren allen dood na reeds 3 weken, terwijl er na 8 weken nog een paar

larven in de Volgermeer overleefd hadden (Tabel 6.1). Toen na die 8 weken het experiment werd beëindigd hadden de overlevende larven een lengte van ca. 3 cm bereikt. Tijdens de controles was in het water van het Twiske een duidelijke geur van zwavelverbindingen aanwezig, welke mogelijk duidt op anaerobe condities. In de Volgermeerpolder was hiervan in veel mindere mate sprake. Zuurstofgebrek heeft naar alle waarschijnlijkheid een belangrijke rol gespeeld bij de hoge mortaliteit van larven in het Twiske. De overlevende kikkervisjes uit de Volgermeer vertoonden geen duidelijke afwijkingen.

Tabel 6.1. Overleving in procenten van larven in de mestvrijstalen kokers. De overleving op dag 0 is 100%

Dag	Volgermeer	Twiske
8	72.5 ± 15.5	57.9 ± 30.6
21	30.3 ± 17.3	3.4 ± 5.9
37	7.1 ± 10.2	0
55	3.1 ± 4.7	0

6.4 Discussie

Een hoge mortaliteit onder kikkerlarves lijkt een vrij natuurlijk fenomeen en onderdeel van de voortplantingsstrategie van *Rana*-amfibieën. Vergeleken met deze studie was de overleving tijdens de experimenten in het laboratorium hoog. In vergelijking met deze in situ veldstudie waren de condities (b.v. de zuurstofconcentratie, afwezigheid van andere organismen) in het laboratorium veel gecontroleerder en waarschijnlijk gunstiger. Vanwege de hoge mortaliteit is inzetten van kikkerlarven voor blootstellingsstudies in het veld erg moeilijk en onder de hier beschreven condities niet aan te bevelen.

7 Vergelijkende studie naar biomarkerresponsen in de groene kikker uit de Volgermeer en een referentielokatie

7.1 Inleiding

Om inzicht te verkrijgen in hoeverre specifieke biomarkerresponsen beïnvloed worden door verontreinigingen in het milieu is het van belang deze te bepalen in kikkers uit vervuilde en referentie lokaties. In vervolg op de voorgaande studies zijn subadulte groene en bruine kikkers (*Rana esculenta en temporaria*) gevangen uit de sterk verontreinigde Volgermeerpolder en niet-verontreinigde proefsloten bij de Sinderhoeve te Renkum. In deze dieren zijn de EROD en aromatase activiteiten bepaald in respectievelijk de lever en hersenen. Als marker voor blootstelling aan dioxine-achtige stoffen zijn concentraties TEQ in vetweefsel bepaald.



Fig. 7.1 De groene en bruine kikker (respectievelijk foto links en rechts)

7.2 Materiaal en Methode

7.2.1 Vangen van kikkers en sekties

Begin oktober 2001 zijn uit een niet-verontreinigde proefsloot bij de Sinderhoeve, nabij Renkum 3 juveniele bruine en 11 juveniele groene kikkers, en uit de verontreinigde Volgermeerpolder 2 bruine en 12 juveniele groene kikkers gevangen. De kikkers zijn verdoofd met een oplossing van tricaine methanesulfonaat (TMS, Crescent Research Chemicals, Phoenix, AR, USA) van 1 g/l, pH 7. De levers en hersenen zijn uitgenomen, ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80°C voor latere biochemische analyses. Orgaanvet was uitgenomen en bewaard bij -20°C voor latere bepaling van concentraties TEQ. Het geslacht van de dieren kon niet worden bepaald omdat de geslachtsorganen nog niet ontwikkeld waren. Ook was het niet haalbaar om bloed af te nemen omdat de hoeveelheden te klein waren.

7.2.2 Eiwit, EROD en aromatase

De EROD- en aromatase activiteiten zijn bepaald als beschreven in paragrafen 2.1.1 en 2.1.2 Voor EROD is in elke well van een microtiterplaat 20-60 µg microsomaal eiwit 20 min geïncubeerd bij 37 °C. Eiwit is bepaald met de BCA kit (zie paragraaf 2.1.3).

7.2.3 H4IIE-bioassay/TEQ bepaling

Vetweefsel (10-55 mg) was gepotterd in een glazen potterbuis met glazen piston in een volume (µl) van 15-20 maal het gewicht DMSO totdat het vet was opgelost. TEQ in de onverdunde en de 5 maal verdunde homogenaten is bepaald als beschreven in paragraaf 2.3

7.2.4 Statistiek

Voor de statistische analyses is gebruik gemaakt van Genstat 6.1 (VSN International Ltd, Oxford, UK). Verschillen tussen lokaties zijn getest met ANOVA (Payne, 1993), waarbij data voor enzymactiviteiten log-getransformeerd zijn. Relaties tussen parameters zijn getest met lineaire regressie (Lane, 1993).

7.3 Resultaten

Er waren geen significante verschillen detecteerbaar tussen parameters van bruine en groene kikkers (zie ook Fig. 7.2). De kikkers uit beide lokaties waren gemiddeld even zwaar, en er waren ook geen verschillen tussen de Lever en Hersen Somatische Index (LSI en HIS). Om die reden zijn per lokatie alle data samengevoegd, waarvan tabel 7.1 een samenvatting geeft.

*Tabel 7.1. Gemiddelden van parameters van kikkers uit de referentielokatie Sinderhoeve en de verontreinigde Volgermeer. (LSI en BSI: Lever en Hersen Somatische Index. Getallen tussen haakjes geven de aantallen kikkers. ***: $P < 0.001$, n.s.: niet significant.)*

	Sinderhoeve	Volgermeer	significantie
Lichaamsgewicht (g)	1.65 (17)	1.64 (16)	n.s.
LSI (%)	4.60 (17)	4.21 (16)	n.s.
BSI (%)	1.38 (17)	1.03 (16)	n.s.
TEQ (pg/g vetweefsel)	534 (13)	1533 (14)	***
EROD (pmol/min/mg)	103 (14)	62 (14)	***
Aromatase (fmol/uur/mg)	142 (14)	82 (13)	***

De concentratie TEQ in vetweefsel van kikkers uit de Volgermeer was gemiddeld een faktor 3 hoger vergeleken met kikkers uit de controlelokatie Sinderhoeve. Tegelijkertijd waren de EROD- en aromatase-activiteiten van kikkers uit de Volgermeer lager (zie tabel 7.1 en Fig. 7.2).

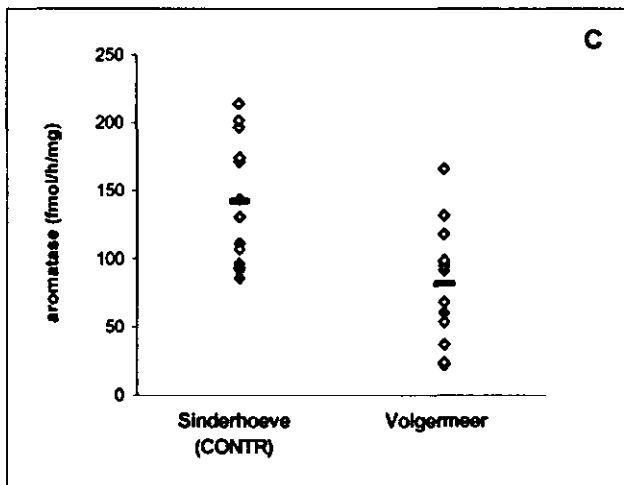
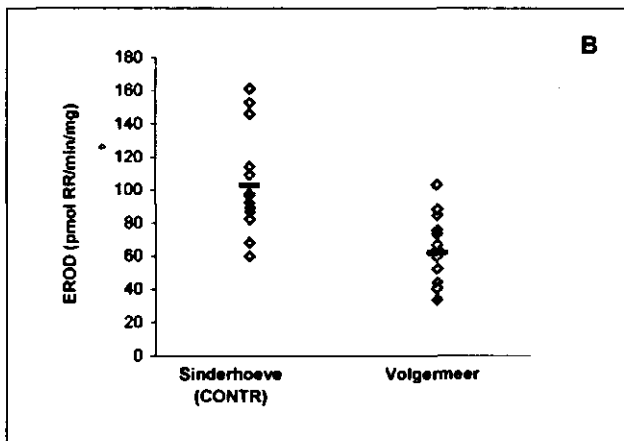
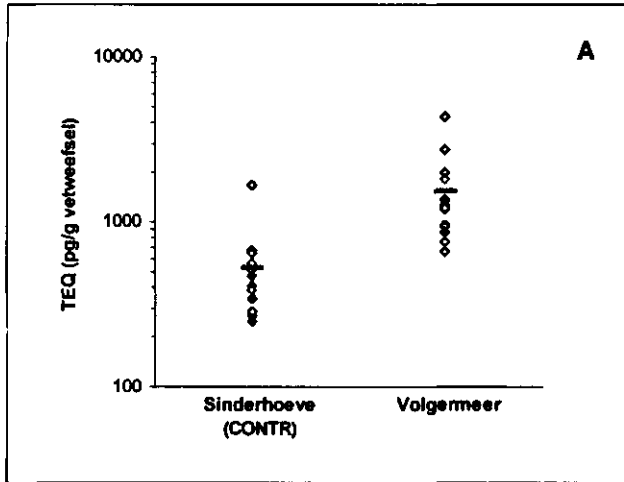


Fig. 7.2. TEQ (A), EROD (B) en aromatase (C) in juveniele groene (open symbolen) en bruine kikkers (gesloten symbolen) uit de controlelocatie Sinderhoeve en verontreinigde Volgermeerpolder. De liggende symbolen geven de gemiddelden van alle kikkers per lokatie. Let bij TEQ op de logaritmische as!

Er is geen significante relatie tussen de EROD-aktiviteit en TEQ concentratie van dieren uit beide lokaties (asymptotische regressie, $P > 0.05$).

De relatie tussen de aromatase-aktiviteit en de log-getransformeerde TEQ is significant negatief voor de beide lokaties (onderbroken lijn in Fig. 7.3). Voor alleen dieren uit de Volgermeer is deze relatie ook significant negatief (continue lijn in Fig. 7.3). De parameters van beide regressielijnen zijn niet significant verschillend. Dit impliceert een vergelijkbare regressie.

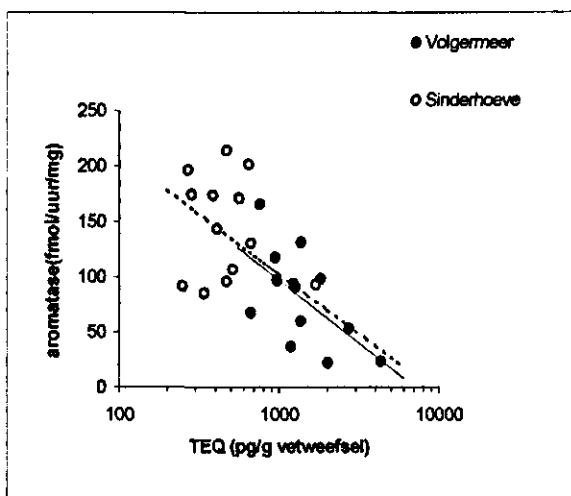


Fig. 7.3. Relaties tussen de aromatase-aktiviteit en TEQ in juveniele kikkers uit de controlelokatie Sinderhoeve en verontreinigde Volgermeerpolder. Voor de Sinderhoeve de relatie niet-significant. Voor de Volgermeer:
 $\text{aromatase} = 439 - 49.5 \cdot \ln(\text{TEQ})$,
 $P < 0.05$, 30% van de variatie verklaard.
 Voor beide lokatie gecombineerd:
 $\text{Aromatase} = 426.1 - 46.8 \cdot \ln(\text{TEQ})$,
 $P < 0.001$, 39% van de variatie verklaard

7.4 Discussie

De concentratie TEQ in vetweefsel van kikkers uit de Volgermeer was 3 maal hoger dan van kikkers uit de Sinderhoeve. Op grond hiervan zou men inductie van de EROD-aktiviteit in kikkers uit de Volgermeer verwachten. Verassend genoeg was de EROD-aktiviteit van kikkers uit de Volgermeer significant lager dan van kikkers uit de Sinderhoeve, en was er geen significante correlatie met TEQ. De EROD-aktiviteiten die in deze studie zijn gemeten zijn in dezelfde orde van grootte als basale aktiviteiten die zijn gemeten in *Rana pipiens* (Huang et al., 1998, 1999). Om die reden wordt de lagere EROD-aktiviteit van kikkers uit de Volgermeer verondersteld eerder remming te zijn dan uitblijven van inductie. Er is namelijk een aantal stoffen dat EROD kan remmen: organofosfaten (Flammarion et al., 1998), oestradiol (Navas en Segner, 2000), koper (Stien et al., 1997), het fungicide clomatrizol (Levin en Oris, 1999) en organotine verbindingen (Fent et al., 1998). Het is onbekend welke typen verbindingen uit de Volgermeer EROD zouden kunnen remmen. De verhoogde TEQ-nivo's in kikkers uit de Volgermeer na een bepaling die gebaseerd is op inductie van EROD in H4IIE-cellen impliceren dat het onwaarschijnlijk is dat dit stoffen betreft die zich gemakkelijk ophopen in vetweefsel of oplossen in DMSO. Bij veldonderzoek moet men dus voorzichtig zijn met het interpreteren van alleen de EROD-aktiviteit als biomarker.

In hersenen van de kikkers uit de Volgermeer was de aromatase-activiteit significant lager dan van kikkers uit de Sinderhoeve, en was er een significante relatie met TEQ (Fig. 7.3). Nadat de data uit de Sinderhoeve waren toegevoegd veranderde de regressielijn niet. Dit impliceert dat het effect volgens een vergelijkbaar mechanisme verloopt op beide lokaties, doch alleen significant is voor de Volgermeer. Dit is in tegenstelling voor betreft de relatie tussen EROD en TEQ. Uit de correlatie tussen aromatase en TEQ kan worden afgeleid dat dioxine-achtige stoffen een rol spelen bij de remming van aromatase. Bovendien kunnen andere groepen verbindingen die cytochroom P450 enzymen beïnvloeden bijdragen aan de remming van aromatase.

Er zijn geen literatuurgegevens bekend over effecten van dioxine-achtige stoffen op aromatase in kikkers. In vitro studies hebben aangetoond dat TCDD aromatase in humane JEG3-cellen en ratten granolosa cellen remmen (Drenth et al., 1998 en Dasmahapta et al., 2000). Deze remming wordt verondersteld te worden gereguleerd via het mRNA, dat mogelijk wordt gemoduleerd door dioxine-achtige stoffen via de Ah-receptor (Dasmahapta et al., 2000). De aromatase-activiteit was tot een faktor 4-5 geremd bij kikkers uit de Volgermeer. Dit kan gevolgen hebben voor de sexe-ratio. Bij reptielen ging remming van aromatase gepaard met een verhoogde incidentie mannelijke dieren (Wibbels en Crews, 1994, Crews en Bergeron, 1994). Omdat aromatase in kikkers de omzetting van testosteron in oestradiol katalyseert (Miano et al., 1999), kan worden verwacht dat veranderingen in de aromatase-activiteit de sexuele ontwikkeling van kikkers beïnvloedt. Voorts is verondersteld dat inductie van aromatase in de lever van vrouwelijke kikkers een belangrijke schakel is voor de productie van vitellogenine (Assisi et al., 2000). Remming van aromatase door contaminanten in het milieu zou dus kunnen leiden tot een gereduceerde productie of kwaliteit van dooierewit en overleving van embryo's.

Alleen uit de combinatie van de gegevens voor TEQ, EROD en kan worden afgeleid dat dioxine-achtige stoffen, maar ook andere, niet geïdentificeerde verbindingen, de reproductie van kikkers uit de Volgermeer negatief kunnen beïnvloeden.

8 Evaluatie met betrekking tot kikkers als indicator voor hormoonverstorende stoffen en biomarkers

Ondanks de hoge mortaliteit die optrad tijdens de studies met larven van heikikkers (*Rana arvalis*) zijn er aanwijzingen dat TCDD en E2 de ontwikkeling vertragen. Ook was de EROD-aktiviteit van de juveniele heikikkers (*Rana arvalis*) geïnduceerd na blootstelling aan TCDD gedurende de ontwikkelingsstadia 20 tot 30 (Witschi, 1956). Bovendien waren in juveniele groene en bruine kikkers (*Rana esculenta* en *Rana temporaria*), die gedurende de gehele ontwikkeling zijn blootgesteld aan het milieu van de sterk verontreinigde Volgermeerpolder, remmende effecten op de cytochroom P450 enzymen CYP1A1 en aromatase aangetoond. Bij volwassen kikkers (*Rana esculenta*) werden, echter, geen inducties van EROD en aromatase waargenomen. Uit studies van Huang et al. (1998, 1999 en 2001) kan worden opgemaakt dat volwassen kikkers relatief ongevoelig zijn voor inductie van EROD. Inductie van EROD in volwassen kikkers treedt op bij veel hogere concentraties PCB's dan in de onderzochte verontreinigde lokaties (Huang, 1999). Uit de gegevens dat aromatase en EROD van juveniele wel, en van volwassen *Rana* species niet zijn beïnvloed bij vergelijkbare interne TEQ concentraties zou men kunnen opmaken dat kikkers gevoeliger lijken te zijn voor dioxine-achtige stoffen tijdens de metamorfose en/of seksuele differentiatie.

Bij vergelijkbare interne TEQ concentraties was EROD in volwassen *Rana*-kikkers onveranderd en juveniele *Rana*-kikkers uit de Volgermeer geremd. Tegelijkertijd was EROD bij vergelijkbare nominale waterconcentraties TCDD in volwassen *Rana*-kikkers onveranderd en juveniele *Rana*-kikkers (heikikkers) geïnduceerd. (De interne TEQ concentraties in de juveniele heikikkers is helaas onbekend.) Uit een combinatie van deze gegevens kan worden afgeleid dat EROD als effectparameter voor hormoonverstorende stoffen minder geschikt is in kikkers. Bepaling van concentraties TEQ in vetweefsel geeft wel een goed beeld van de uiteindelijke blootstelling aan dioxine-achtige stoffen.

Onder invloed van TCDD waren de plasma-concentraties progesteron 40% gedaald bij volwassen vrouwelijke kikkers. Dit duidt mogelijk op een verstoorde steroïdogene. Bij volwassen vrouwtjes waren de plasma-concentraties E2 gehalveerd onder invloed van extern E2. Ook was er een E2-gerelateerde verdubbeling van ESI bij volwassen vrouwtjes. Mogelijk zijn dergelijke effecten van TCDD en E2 nog duidelijker bij blootstelling tijdens de ontwikkeling van kikkers.

Om een vertaalslag te maken naar de vrije natuur: er zijn inderdaad negatieve effecten van oestrogene of dioxine-achtige verontreinigingen te verwachten op de ontwikkeling van kikkers, alsmede een mogelijk verstoorde steroïdogene. Bovendien kan remming van aromatase leiden tot een verstoorde balans tussen androgenen en oestrogenen. Er zijn, echter, meer studies nodig om effecten op de reproductiecapaciteit in kaart te brengen.

Bij het verrichten van studies in verschillende ontwikkelingsstadia zijn er beperkingen waarmee rekening moet worden gehouden. Studies waarbij wordt uitgegaan van larves worden belemmerd door een hoge (natuurlijke) mortaliteit. Bij juveniele Rana-kikkers zijn de geslachtsorganen nog niet ontwikkeld en onvoldoende hoeveelheden bloed voor hormoonbepalingen. Bij volwassen kikkers zijn er geen directe effecten op de morfologie van de testes, en aromatase- en EROD-activiteiten na een 11-weken durende belasting die vergelijkbaar is met sterk verontreinigde lokaties in het milieu. Bovendien is het achterwege blijven van voortplantingsgedrag in gevangenschap een belemmering om effecten van hormoonverstorende stoffen op voortplantingsgedrag en kwaliteit van bevruchte eieren te bestuderen. Mogelijk zijn er grotere effecten op volwassen kikkers na langere periodes van blootstelling of kunnen juveniele (1 jaar oude) Rana-kikkers worden ingezet tijdens de ontwikkeling van de geslachtsorganen.

Voor een adequate beoordeling van risico's van hormoonverstorende stoffen moeten combinaties van biomarkers worden ingezet omdat dan een beter totaalbeeld van mogelijke effecten, alsmede meer inzicht in mogelijke causale verbanden, wordt verkregen. Bovendien hebben bepalingen van elke afzonderlijke biomarker hun beperkingen en/of kunnen deze zelfs worden verstoord door tegenovergestelde effecten van verschillende categorieën contaminanten in het milieu. Dit laatste wordt geïllustreerd door remming van EROD in kikkers uit de Volgermeer.

Literatuur

Ahlborg U.U., Becking G.C., Birnbaum L.S., Brouwer A., Derks H.J.G.M., Feeley M., Golor G., Hanberg A., Larsen J.C., Liem A.K.D., Safe S.H., Schlatter C., Wærn F., Younes M. and Yrånheikki E., 1994. Toxic equivalency factors for dioxin like PCBs. *Chemosphere* 28:1049-1067.

Allen Y., Matthiessen P., Scott A.P., Haworth S., Feist S. and Thain J.E., 1999. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments – further surveys of flounder. *Science of the Total Environment* 233 (1-3): 5-20

Assisi L., Di fiore M.M., Lamanna C. and Botte V., 2000. Relationships between liver testosterone receptor isoforms and aromatase activity in female green frog, *Rana esculenta*. *Life Sciences* 67:373-382.

Bauer B., Fioroni P., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J. and Kalbfus W., 1997. The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring: results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments. *Environmental Pollution* 96 (3): 299-309

Borrasso C.M., Moreira M.H. and Gibbs P.E., 2000. Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a Southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Marine Ecology Progress Series* 201: 221-232

Blommers-Schloesser R., 1992. De groene kikkers in Nederland; samenstelling van populaties, ecologie, verspreiding en bedreiging. *De Levende Natuur* 93 (1): 2-9.

Bosveld A.T.C., Maissan V., Naber A.B., De Poorte J. and Stumpel A.H., 1999. Developmental effects of xeno-estrogens in *Rana temporaria* tadpoles. *Keystone symposium on Endocrine Disruptors*. Granlibaken Resort California Januari, Abstract book p. 40.

Crews D. and Bergeron J.M., 1994. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature dependent sex determination. *J. Endocrinol.* 143:279-289.

Dasmahaptra A.K., Wimpee B.A.B., Trewin A.L., Wimpee C.F., Ghorai J.K. and Hutz R.J., 2000. Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Mol. Cell. Endocrin.* 164:5-18.

Dasmahaptra A.K., Wimpee B.A.B., Trewin A.L. and Hutz R.J., 2001. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases steady-state estrogen receptor- mRNA levels after CYP1A1 and CYP1B1 induction in rat granulosa cells in vitro. *Mol. Cell Endocrin.* 182:39-48.

Drenth H.J., Bouwman C.A., Seinen W., and Vandenberg M., 1998. Effects of some persistent environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148:50-55.

Ertl R.P. and Winston G.W., 1998. The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121: 85-105

Fent K., Woodin B.R. and Stegeman J.J. 1998. Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121:277-288.

Flammarion P., Migeon B., Urios S., Morfin P. and Garric J. 1998. Effect of methidathion on the cytochrome P-450A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42:93-102.

Gregoraszczyk E.L., Zabelny E. and Ochwat D., 2002. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-linked inhibition of luteal cell progesterone secretion in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin treated cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 52(2): 303-311

Guerriero G., Roselli C.E., Paolucci M., Botte V. and Ciarcia G., 2000. Estrogen receptors and aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle, *Brain Research* 880: 92-101

Hayes T.B., 1997. Steroids as potential modulators of thyroid hormone activity in anuran metamorphosis. *Amer. Zool.* 37: 185-194

Hayes T.B., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetical and developmental mechanisms. *J. Exp. Zool.* 281: 373-399

Hoogenboom, L.A.P., Hamers, A.R.M. and Bovee, T.F.H., 1999. Bioassays for the detection of growth-promoting agents, veterinary drugs and environmental contaminants in food. *Analyst* 124: 79-85

Horiguchi T., Takiguchi N., Cho H.S., Kojima M., Kaya M., Shiraishi H., Morita M., Hirose H. and Shimizu M., 1999. Ovo-testes and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Marine Environmental Research* 50: 1-5, 223-229

Huang Y.W., Melancon M.J., Jung R.E. and Karasov W.H., 1998. Induction of Cytochrome P450-associated monooxygenases in Northern Leopard frogs, *Rana pipiens*, by 3,3', 4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environ. Toxicol. and Chem.* 17 (8): 1564-1569

Huang Y.W., Karasov W.H., Patnode K.A. and Jefcoate C.R., 1999. Exposure of Northern Leopard Frogs in the Green Bay ecosystem to polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans is measured by

direct chemistry but not hepatic ethoxyresorufin-o-deethylase activity. *Environ. Toxicol. and Chem.* 18 (10): 2123-2130

Huang Y.W. and Karasov W.H., 2000. Oral bioavailability and toxokinetics of 3,3', 4,4', 5-pentachlorobiphenyl in Northern Leopard frogs *Rana pipiens*, *Environ. Toxicol. and Chem.* 19 (7): 1788-1794

Huang Y.W., Stegeman J.J., Woodin B.R. and Karasov W.H., 2001. Immunohistochemical localization of cytochrome P4501A induced by of 3,3', 4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in multiple organs of Northern Leopard frogs *Rana pipiens*, *Environ. Toxicol. and Chem.* 20 (1): 191-197

Kloas W.T., Lutz I. and Einspanier R., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *The Science of the Total Environment* 225: 59-68

Lane, P.W., 1993. Regression analysis. In: *Genstat 5 Committee, (Eds), Genstat 5 release 3: reference manual*, Oxford Science Publications, Oxford, UK, pp 359-460.

Lephart, E.D. and Simpson, E.R., 1991. Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol.* 206: 477-483

Levine S.L. and Oris J.F. 1999. Noncompetitive mixed-type inhibition of rainbow trout CYP1A catalytic activity by clotrimazole. *Comp. Biochem. Physiol. C* 122:205-201.

Lofts B., 1984. Reproductive cycles of vertebrates. In: *Marshalls's Physiology of Reproduction*, Vol 1, 4th edition, Edited by Lamming G.E., Churchill Livingstone.

Lorenzen A. and Kennedy S.W. 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal. Biochem.* 214:346-348.

Miano A., Gobbetti A., Zerani M., Quassinti L., Maccari E., Murri O., Amici D. and Bramucci M. 1999. Different modulation of aromatase activity in frog testis in vitro by ACE and ANG II. *Am. J. Physiol.* 277:1261-1267.

Moran F.M., Conley A.J., Corbin C.J., Enan E., VandeVoort C. Overstreet J.W. and Lasley B.L., 2000. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases estradiol production without altering the enzyme activity of cytochrome P450 aromatase of human luteinized granulosa cells in vitro. *Biol. of Repr.* 62(4): 1102-1108

Mosconi G., Yamamoto K., Carnevali O., Nabissi M., Polzonetti-Magni A. and Kikuyama S., 1994. Seasonal changes in plasma growth hormones and prolactin concentrations of the frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 380-387

Navas J.M. and Segner H. 2000. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar. Environ. Res.* 50:157-162.

Noaksson E., Tjänlund U., Bosveld A.T.C. and Balk L., 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol. And Appl. Pharmacol.* 174: 160-176

Palmer B.D., Huth L.K., Pioto D.L. and Selcer K.W., 1998. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 30-36

Payne R.W., 1993. Design and analysis of experiments. In: . Genstat 5 Committee, (Eds), Genstat 5 release 3: reference manual) Oxford Science Publications, Oxford, UK, pp 461-538.

Polzonetti-Magni A. M., Botte V., Bellini-Cardelli L., Gobetti A. and Crasto A., 1984. Plasma sex hormones and post-reproductive period in the green frog, *Rana esculenta* complex. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 372-377

Polzonetti-Magni A. M., Mosconi G., Carnevali O., Yamamoto K., Hanoaka Y. and Kikuyama S., 1998. Gonadotrophins and reproductive function in the anuran amphibian *Rana esculenta*. *Biology of Reproduction* 58: 88-93

Reeder A.L., Foley G.L., Nichols D.K., Hansen L.G., Wikoff B., Fach S., Eisold J., Wheeler M.B., Warner R., Murphy J.E. and Beasley V.R., 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexually in cricket frogs (*Acris crepitans*). *Environmental Health Perspectives* 106: 261-266

Safe S., Wang F., Porter W., Duan R., McDougal A., 1998. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: Anti-estrogenic activity and mechanisms. *Toxicology Letters*: 102-103 (0) 343-347.

Safe, S., 1990. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalence factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21:51-87.

Sanderson J.T., Aarts, J.M.M.J.G., Brouwer, A., Froese, K.L., Denison, M.S. and Giesy, J.P., 1996. Comparison of Ah-receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137: 316-325

Schwen R.J. and Mannering G.J., 1982. Hepatic Cytochrome P450-dependent monooxygenase systems of the trout, frog and snake-III Induction. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B (3): 445-453

Stien X., Risso C., Gnassia-Barelli M., Roméo M. and Lafaurie M. 1997. Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 214-219.

Van den Brink N.W., Lee-de Groot, M.B.E., De Bie P.A.F. and Bosveld, A.T.C., 2001. The use of amphibians as indicators for the quality of freshwater: the pros and cons. Aquatic Ecosystem Health and Management, Amsterdam, the Netherlands. Program Book pp 34-35

Van den Brink N.W., Lee-de Groot, M.B.E., De Bie P.A.F. and Bosveld, A.T.C., 2002. Enzyme markers in frogs (*Rana spec*) for monitoring of risks of aquatic pollution. AEHM, submitted

Vethaak A.D., Rijs G.B.J., Schrap S.M., Ruiter H., Gerritsen A. and Lahr J., 2002. Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands: occurrence, potency and biological effects. RIZA/RIKZ-report no. 2002.001

Wijnands H.E.J., 1979. De 'Groene kikker' bestaat niet. Vakblad voor Biologen 59(18): 308-311

Witschi E., 1956. Development of vertebrates. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA

Aanhangsel 1 Bepalen van de blootstellingsconcentraties TCDD en E2 in water

Inleiding

Alvorens werd gestart met de blootstellingsstudie met volwassen kikkers werd het van belang geacht meer inzicht verkrijgen in wat de actuele blootstellingsconcentraties TCDD en E2 in water waren, en hoe deze concentraties verlopen in de tijd, teneinde de vervangingsfrequentie van water met stoffen vast te stellen. Ook was het van belang te weten hoeveel van deze stoffen werden opgenomen door de kikkers en/of werden afgebroken.

Om deze vraagstellingen te beantwoorden was water met de blootstellingsdoses TCDD of E2 bemonsterd uit een glazen bak zonder, en een glazen bak met een kikker, op verschillende tijdstippen tot 8 dagen nadat het water met TCDD of E2 was ververst. De bepalingen van concentraties TCDD en E2 waren ieder afzonderlijk uitgevoerd met één en dezelfde kikker, om storingen van E2 in de H4IIE-bioassay of van TCDD in de EIA te voorkomen.

De watermonsters voorafgaand aan de start van het blootstellingsexperiment waren bij 10 °C – tijdens de winterperiode - genomen, waarna de verschoningsfrequentie was vastgesteld. Echter, het blootstellingsexperiment was bij 20 °C uitgevoerd, en bij die temperatuur is het metabolisme van de kikkers hoger en groeien bacteriën sneller. Opname van stoffen door de kikkers en/of degradatie van, met name E2, door bacteriën spelen dus een grotere rol bij 20 °C. Om dergelijke eventuele afwijkingen vast te stellen waren tijdens het blootstellingsexperiment watermonsters genomen voor metingen van respectievelijk TCDD en E2 concentraties, direct en 6 dagen na toevoegen van deze stoffen. De concentraties E2 en TCDD bij 20 °C waren respectievelijk tijdens het blootstellingsexperiment en achteraf bepaald.

Materiaal en methoden

Monsternames en extracties voor metingen van concentraties TCDD in water voorafgaand aan het blootstellingsexperiment bij 10°C

De bepalingen van concentraties TCDD in water waren in de periode februari en maart 2002 uitgevoerd. De temperatuur in de klimaatkamer was toen 10 °C. In 2 glazen accubakken was 3 l water gebracht, waaraan 600 µl TCDD-oplossing (2.5 ng/ml in ethanol) was toegevoegd, zodat de eindconcentratie TCDD in water 500 pg/L bedroeg. In beide bakken was een roestvrijstalen plateau gezet, met daarop een glasvezelfilter. In 1 van de 2 bakken was een (mannelijke) kikker gezet. Direct na toevoegen van TCDD en na periodes van 4, 20, 24 uren, 2, 3 en 7 dagen was het water met TCDD in de bakken met en zonder kikker verschoond en het glasvezelfilter vervangen. De eerste verversing van water met TCDD was na 4 uur, waarna schone bakken waren gebruikt voor de volgende metingen. Voor de bepalingen van TCDD concentraties was steeds al het water uit een bak gebruikt. Bij de daaropvolgende verversing na 20 uur waren de bakken die waren gebruikt voor de

4-uurs-metingen weer gebruikt. Steeds waren deze twee series bakken om en om gebruikt.

Al het water uit een bak (3 l) was in 5 porties van 600 ml geëxtraheerd met 200 ml hexaan in een scheitrechter door steeds 1 min te schudden. Na scheiding van de water- en hexaanfase was de waterfase steeds verwijderd, waarna een volgende portie water was geëxtraheerd. De hexaan was drooggedampt middels rotatiefilmverdamper, en het residu was kwantitatief opgenomen in 300 µl DMSO. Als blanco was in duplo 3 l water, waaraan alleen ethanol (oplosmiddel) was toegevoegd, geëxtraheerd op dezelfde wijze.

Ook waren de opbrengsten TCDD na droogdampen en extraheren bepaald. Hiervoor was 600 µl van de werkoplossing 2.5 ng/ml TCDD rechtstreeks in hexaan gebracht, drooggedampt en opgenomen in DMSO. Tevens was dezelfde hoeveelheid TCDD rechtstreeks in DMSO gebracht. Van een deel van elk monster waren verdunningen gemaakt met DMSO voor de H4IIE-bioassay (zie paragraaf 2.3)

Monsternames en extracties voor metingen van TCDD concentraties tijdens het blootstellingsexperiment bij 20 °C

Tijdens het blootstellingsexperiment was *eenmalig* bij het verversen van water in elke bak voor de kikkers (TCDD_1 t/m TCDD_4) uit de groep die aan TCDD was blootgesteld 3.5 L in plaats van 3 L (dus 500 ml *extra*) water, en 100 µl *extra* TCDD in ethanol (2.5 ng/ml) en 100 µl *extra* ethanol toegevoegd. De roestvrijstalen plateaus met daarop de glasvezelfilters waren geplaatst, en 1 uur later (voordat de kikkers in het water waren gezet) was uit elke bak 500 ml water genomen en geëxtraheerd met hexaan. Zes dagen nadat de kikkers in het water hadden gezeten was weer uit elke bak 500 ml water geschud met 100 ml hexaan. Water uit een bak voor een kikker uit de controlegroep (waaraan 500 ml *extra* water en 2 maal 100 µl *extra* ethanol waren toegevoegd) was op dezelfde wijze behandeld.

Tijdens extractie waren de watermonsters van 500 ml geschud met 100 ml hexaan gedurende 2 min. Tijdens schudden met hexaan van water waarin kikkers 6 dagen hadden gezeten, en dat veel eiwit bevatte, ontstond een emulsie in de hexaanfase. Deze emulsie was verbroken door 1-2 ml verzadigde NaCl oplossing toe te voegen en door te trillen in een ultrasoonbad. Water was uit de hexaanfase verwijderd met over Na₂SO₄, waarna deze was drooggedampt en het residu was opgenomen in 300 µl DMSO. De watermonsters voor TCDD waren in mei 2002 geëxtraheerd, en in augustus 2002 (dus achteraf) was het de TEQ concentratie bepaald in onverdunde en 4 maal verdunde extracten in een eindconcentratie van 0.5% bij de H4IIE-cellen.

Monsternames voor metingen van E2 voorafgaand en tijdens het blootstellingsexperiment

Nadat de monsterserie voor de TCDD bepalingen voorafgaand aan het blootstellingsexperiment was genomen (paragraaf 10.2.1), was in elk van 2 schone glazen accubakken 3 l water gebracht, waaraan 600 µl van een E2-oplossing (2.5 µg/ml) in ethanol was toegevoegd, zodat de eindconcentratie E2 in water 500 ng/L bedroeg. In beide bakken was een schoon roestvrijstalen plateau gezet, met daarop een nieuw glasvezelfilter. In 1 van de 2 bakken was de kikker gezet. Direct na

toevoegen van E2, en na periodes van 4 en 24 uren, 2, 3 en 7-8 dagen was uit elke bak een monster van ca. 2 ml genomen met een glazen pasterspriet, in een glazen buis gedaan, en ingevroren bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na 7 dagen was het water met E2 in beide bakken verschoond, het glasvezelfilter vervangen en was deze procedure herhaald. Als blanco was een monster genomen uit water waaraan alleen ethanol (oplosmiddel; 0.04%) was toegevoegd.

Tijdens het blootstellingsexperiment waren watermonsters (2 ml) genomen uit elke bak voor de kikkers (E2_1 t/m E2_6) uit de groep die aan E2 was blootgesteld, 1 uur na toevoegen van E2 (voordat de kikkers in het water waren gezet), en nadat de kikkers 6 dagen in het water met E2 hadden gezeten. Ook waren op dezelfde tijdstippen monsters genomen uit 1 bak water met 0.04% ethanol (van een kikker uit de controlegroep). De concentraties E2 voorafgaand en tijdens het blootstellingsexperiment waren bepaald met EIA (zie paragraaf 2.1.4), respectievelijk in maart en mei 2002.

Resultaten

TCDD

Bij toevoegen van een nominale (berekende) concentratie 500 pg/L TCDD aan water, waarna de TCDD direct weer uit het water werd geëxtraheerd, was de teruggemeten concentratie 450-470 pg/l (extractie in triplo; zie ook Fig 10.1). Nadat de werkoplossing van 2.5 ng/ml TCDD rechtstreeks in DMSO was gebracht (dus geen mogelijke binding van TCDD aan een glazen bak), werd 2.1 ng/ml TCDD teruggevonden. Na terugrekening zou de concentratie TCDD 420 pg/l bedragen bij gebruik van een werkoplossing van 2.1 ng/ml. Andere metingen lieten ook opbrengsten TCDD van 95 tot 100 % zien na extraheren en/of droogdampen.

Figuur 10.1 laat zien dat de concentratie TCDD na 1 dag was gedaald tot 50% van de oorspronkelijke concentratie, waarna deze nagenoeg constant bleef gedurende 6 dagen. De daling van TCDD concentratie verliep volgens een asymptotisch curve. In 5 van de 7 gevallen waren de gemeten TCDD concentraties in de bak met kikker lager (10 tot 40%) dan in de bak zonder kikker, maar in 2 van de 7 gevallen was TCDD in de bak met kikker 30% hoger. Een eenzijdige gepaarde T-toets wees uit dat er geen significante verschillen waren tussen water met en zonder kikker op TEQ ($P=0.13$).

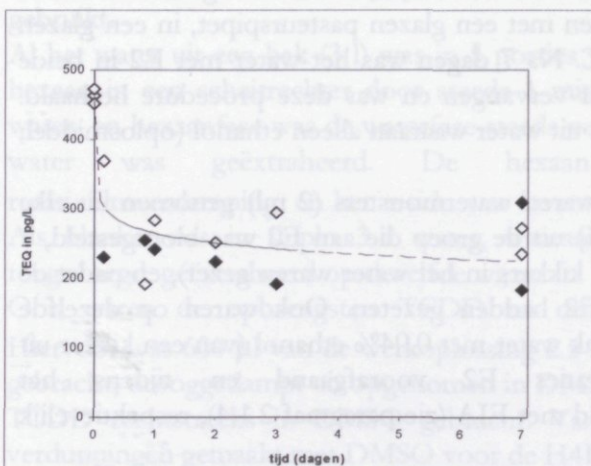


Fig. 10.1. Concentraties TCDD in water zonder (open symbolen) en met kikker (gesloten symbolen) na periodes van 0-7 dagen bij 10 °C na verversen van water met TCDD. Asymptotische curvefit door alle datapunten: $TEQ = 245 + 217 * 0.00026^{t/d}$, variatie voor 77% verklaard, $P < 0.001$

Na bemonstering van water met TCDD bij 20 °C werd in de bakken met de kikkers TCDD1 tot en met TCDD4 uit het blootstellingsexperiment direct na toevoegen 318-389 (gemiddeld 346) pg/L TEQ, en na 6 dagen werd 29-335 (gemiddeld 202) pg/L TEQ gedetecteerd, zoals weergegeven in Fig. 10.2. Na 0 en 7 dagen bij 10 °C werd gemiddeld 600 en 271 pg/L TEQ gemeten (zie ook Fig. 10.1). Er was een geringe respons meetbaar in water van de kikker uit de controlegroep na 6 dagen, mogelijk door allerlei organische verontreinigingen die uit het water waren geëxtraheerd.

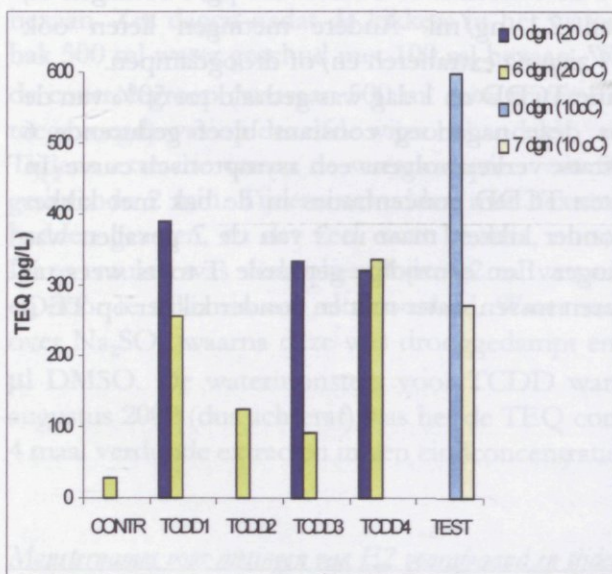


Fig. 10.2. Gemiddelde concentraties TCDD in bakken water met individueel gehuisveste kikkers, direct en 6 dagen na toevoegen. CONTR: water met 0.04% ethanol bij 20 °C; TCDD_1 t/m TCDD_4: water met TCDD bij 20 °C. Het monster TCDD_2 na 0 dagen is verloren gegaan. TEST: water met TCDD bij 10 °C. TEQ na 0 dagen bij 10 °C was direct na toevoegen van TCDD en **vóór** het plaatsen van de glasvezelfilters. TEQ na 0 dagen bij 20 °C was 1 uur na toevoegen van TCDD en **na** plaatsen van de glasvezelfilters.

E2

De responsen (optische dichtheden) van de watermonsters in de EIA waren allen in het lineaire deel van de standaardcurve E2. De gemeten concentratie E2 direct na toevoegen aan water bedroeg gemiddeld ca. 700 ng/l en de concentratie E2 in de bak zonder kikker nam niet af na een periode van 7-8 dagen, zoals weergegeven in Fig 10.3. In de bak met kikker bij 10 °C was tot 2 dagen na toevoegen van E2 aan water nauwelijks een afname meetbaar. Vanaf 2 dagen na toevoegen van E2 in de bak met kikker af tot 450-250 ng/l (65-35% van de oorspronkelijke concentratie) na 7-8 dagen. In water waaraan alleen oplosmiddel (ethanol) was toegevoegd werd geen E2 gedetecteerd.

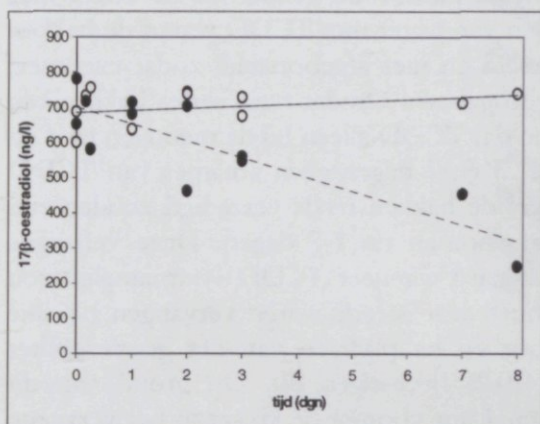


Fig. 10.3 Concentraties E2 tot 8 dagen na toevoegen aan water in een glazen bak zonder (open symbolen) en met kikker (gesloten symbolen) bij 10 °C. Onderbroken en continue regressielijn van respectievelijk meetpunten met en zonder kikker: respectievelijk $E2=6.2 \cdot \text{tijd} + 685$, 1.5% van variatie verklaard (niet significant) en $E2=-48 \cdot \text{tijd} + 702$, 70% van variatie verklaard ($P < 0.001$).

Na bemonstering van water met E2 bij 20 °C werd in de bakken met de kikkers E2_1 tot en met E2_6 uit het blootstellingsexperiment direct na toevoegen 620-700 (gemiddeld 662) ng/l E2 gedetecteerd, en na 6 dagen werd 46-218 (gemiddeld 150) ng/l E2 gedetecteerd, zoals weergegeven in Fig. 10.4. In de bak met de kikker uit de controlegroep werd geen E2 gedetecteerd. Vergeleken met na 7-8 dagen bij 10 °C neemt de concentratie E2 na 6 dagen bij 20 °C sneller af.

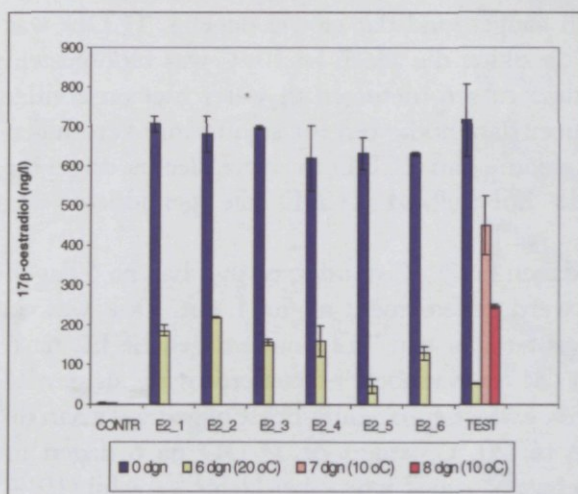


Fig. 10.4. Gemiddelde concentraties E2 (\pm SD van de duplo metingen) in bakken water met individueel gehuisveste kikkers bij 20 °C, direct en 6 dagen na toevoegen. CONTR: water met 0.04% ethanol met een kikker uit de controlegroep van het blootstellingsexperiment; E2_1 t/m E2_6: water met de kikkers uit de E2-groep van het blootstellingsexperiment; TEST: water met E2 met kikker na 7 en 8 dagen bij 10 °C (data ook in Fig App2).

Discussie

De resultaten laten zien dat het mogelijk was om TCDD uit het water te extraheren zonder dat daarbij noemenswaardige hoeveelheden TCDD verloren gingen. De terugvinding van TCDD bij rechtsreeks toevoegen van werkoplossing aan DMSO was niet hoger dan de hoeveelheid TCDD die werd gedetecteerd na extraheren van werkoplossing TCDD uit water en droogdampen. Dit impliceert dat TCDD niet direct bond aan glas, en dat de opbrengst van TCDD na de extractie- en droogdampprocedures ongeveer 100% was.

Het feit dat de TCDD concentratie voornamelijk daalde gedurende de eerste dag, waarna deze vrij constant bleef, wijst erop dat binding van TCDD aan glas en/of alles dat zich in de bak bevond voornamelijk plaatsvond gedurende de eerste dag, waarna evenwicht optrad. Tijdens verversen van water met TCDD waren de bakken en plateaus steeds alleen met water gespoeld en niet afgeborsteld, zodat eventueel gebonden TCDD waarschijnlijk niet was losgelaten. Omdat twee series bakken om en om waren gebruikt zou men verwachten dat TCDD alleen bij de metingen na 4 en 20 uur zou afnemen, en dat na 24 uur, 2, 3 en 7 dagen geen afnames van TCDD meer meetbaar zouden zijn, omdat immers de bakken reeds verzadigd zouden zijn met TCDD. Echter, TCDD was ook afgenomen na 1-7 dagen. Deze verlaagde TCDD concentraties kunnen worden verklaard wanneer TCDD voornamelijk zou zijn gebonden aan de glasvezelfilters, omdat deze steeds waren vervangen bij elke verversing. Het verschil tussen TEQ voor en na plaatsen van het glasvezelfilter (respektievelijk 600 en 350 pg/L; Fig. 10.2) bevestigen dit. Op grond van dit concentratieverval van TCDD was besloten 4 uur voordat de kikker in het ververst water zou worden gezet de stoffen toe te voegen aan water. Hiermee was voorkomen dat de kikkers zouden worden blootgesteld aan de concentratiepiek TCDD tussen 0 en 4 uur (Fig. 10.1).

De TCDD-concentraties in water met en zonder kikkers bij 10 °C na 4 uur tot 7 dagen (respektievelijk gemiddeld 234 en 271 pg/L) waren niet-significant verschillend, hetgeen impliceert dat de testkikker weinig TCDD zou hebben opgenomen. Het is onwaarschijnlijk te achten dat er sprake was van een eenmalige doseringsfout. Immers, op elk tijdstip was steeds al het water met TCDD in de bakken ververst, waardoor alle meetpunten onafhankelijk waren van elkaar. Echter, TEQ bepalingen in vetweefsel hebben aangetoond dat er wel degelijk TCDD was opgenomen door de kikkers, inclusief de kikker die alleen bij 10 °C was blootgesteld geweest aan TCDD. Omdat de spreiding tussen metingen in water met en zonder kikker groot was (zie Fig. 10.1), zijn meer data nodig om tot significante verschillen te komen. Bij 20 °C was de gemeten afname van TCDD in water slechts ongeveer 15% groter dan de geschatte totale hoeveelheid TCDD die gemiddeld was opgenomen per kikker.

Fig 10.2 laat zien dat in 3 bakken na 6 dagen bij 20 °C minder, en in 1 bak na 6 dagen bij 20 °C dezelfde hoeveelheid TEQ werd gedetecteerd als na 1 uur. Ook was de spreiding van TEQ na 6 dagen veel groter dan van TEQ na 0 dagen of E2 na 6 dagen (Fig. 10.4). Dit doet vermoeden dat een variabele extractierecovery als gevolg van vorming van eiwittemulsies tijdens de extractieprocedure heeft bijgedragen aan de grote spreiding van TEQ na 6 dagen bij 20 °C, waardoor TCDD na 6 dagen in sommige bakken mogelijk was onderschat. Mogelijk wordt het kleine verschil (15%)

tussen de gemeten afname TCDD in water en geschatte opname TCDD door de kikker verklaard door overschatting van de gemiddelde afname in water.

De gemeten concentratie E2 van tussen de 660 en 700 ng/l direct na toevoegen aan water was ruim 35% hoger dan de berekende concentratie van 500 ng/l. Het constant blijven van de concentratie E2 in de bak zonder kikker impliceert dat er nauwelijks sprake was van binding van E2 aan glas en/of glasvezelfilters. In water met een kikker bij 10 °C nam E2 af tot gemiddeld 50% van de oorspronkelijke concentratie na 7-8 dagen. Op basis van de resultaten van de TEQ en E2 bepalingen bij 10 °C, voorafgaand aan het blootstellingsexperiment, was besloten het water in eerste instantie 1 maal per week te verversen.

Metingen van E2 tijdens het blootstellingsexperiment lieten zien dat de concentratie E2 bij 20 °C was afgenomen tot gemiddeld 22 % van de oorspronkelijke concentratie na 6 dagen. Dit geeft aan dat E2 meer dan 2 maal sneller werd afgebroken en/of opgenomen door kikkers bij 20 °C. Nadat deze verhoogde afbraak van E2 bij 20 °C was vastgesteld was besloten om de resterende periode (de laatste 3 weken) van de 11 weken durende blootstellingsperiode het water met al dan niet toegevoegde stoffen (E2 en/of TCDD) 2 maal per week te verversen.

Aanhangsel 2 Afkortingen

Ah-receptor	Arylhydrocarbon receptor
CYP	Cytochroom P450
DMSO	Dimethylsulfoxide
E2	17 β -oestradiol
EIA	Enzyme Immuno Assay
EROD	Ethoxyresorufine-O-dealkylase
NADPH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
TCDD	2,3,7,8-tetrachloordibenzo p-dioxine
TEQ	TCDD-equivalenten
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan