

bij mannelijke regenboogforellen na langdurige blootstelling, is aangetoond.

Belangrijk bij het beoordelen van de concentratieranges van de overige (xeno)-oestrogene stoffen is de zogenaamde relatieve oestrogene potentie (EEF-factor) van een verbinding. Zoals de naam al doet vermoeden zijn de oestrogene hormonen zeer potent als oestrogene stof, waardoor deze bij lage concentraties al een feminiserend effect zouden kunnen veroorzaken. De andere xeno-oestrogene verbindingen in deze studie bezitten een veel lagere relatieve oestrogene potentie. (Zie tabel 2 in vorig artikel). Een nadere toelichting van het meten van oestrogene potenties met behulp van *in vitro*-testen wordt in het hiernavolgende artikel gegeven.

Ontregeling van de hormoonhuishouding door (xeno)-oestrogene stoffen in een organisme wordt bovendien niet alleen door de potentie van een stof en de concentratie in het milieu bepaald, maar ook door het milieuchemische gedrag van deze stof, haar biologische beschikbaarheid en de kinetiek en afbraak in het organisme zelf. Al deze gegevens zijn nog grotendeels onbekend voor de (xeno)-oestrogene stoffen in deze studie. Of de gemeten concentratieniveaus aan (xeno)-oestrogene stoffen ook werkelijk kunnen resulteren in ecologische consequenties kan op basis van deze studie dan ook niet worden bepaald. Hiervoor is inzicht noodzakelijk in de relatie tussen gehalten van hormoonontregelende stoffen en in het veld geconstateerde effecten, alsmede inzicht in de betekenis van deze effecten op populatie- en ecosysteemniveau. Evenmin kan op basis van de gemeten gehalten (xeno)-oestrogene stoffen in oppervlaktewater en afvalwater een uitspraak worden gedaan over de risico's van deze stoffen in het Nederlands milieu. Voor beide vragen zijn aanvullende studies nodig. ■

LITERATUUR

Ahel M., Giger W. en M. Koch (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28 (5), pagina 1131-1142.

Belfroid A., Murk T., de Voogt P., Schäfer A., Rijs G. en D. Vethaak (1999). Hormoonontregelaars in water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland. RIZA/RIKZ-rapport 99.007/99.024 (in druk).

Giger W., Brunner P. en C. Schaffner (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225, pagina 623-625.

Thiele B., Gunther K. en M. Schwuger (1997). Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* 97, pagina 3247-3272.



## Hormoonontregelaars in water opsporen met biologische effectmetingen

T. MURK, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, SECTIE TOXICOLOGIE

A. BELFROID, VRIJE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, INSTITUUT VOOR MILIEUVRAAGSTUKKEN

D. VETHAAK, RIJKSINSTITUUT VOOR KUST EN ZEE

*Van sommige in Nederland voorkomende milieuverontreinigingen is bekend dat ze een hormoonverstorende werking kunnen hebben. Er wordt met name veel aandacht besteed aan stoffen die de werking van vrouwelijke hormonen kunnen nabootsen, de xeno-oestrogenen. De groep van verdachte xeno-oestrogene stoffen groeit nog steeds. Onduidelijk is wat de totale verstoring van alle stoffen samen is. Door gebruik te maken van biologische effectmetingen wordt het mogelijk de totale 'oestrogene potentie' van mengsels van stoffen te bepalen en onbekende (xeno)-oestrogene stoffen op te sporen.*

Hiervoor worden zowel laboratoriumtesten met vissen (*in vivo*) als voor dit doel ontwikkelde *in vitro*-testen met speciaal gekweekte cellen gedaan. Het is ook mogelijk om in natuurlijke vispopulaties biomarkers voor oestrogene effecten te bepalen. In een voorstudie voor LOES (Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen) zijn de voor- en nadelen van een aantal *in vitro*-testen met elkaar vergeleken. De gemeten oestrogene potentie is, vergeleken met de berekende oestrogene potentie, gebaseerd op gemeten chemische concentraties van enkele verdachte (xeno)-oestrogene stoffen.

Ontregeling van geslachtshormonen zou een serieuze bedreiging kunnen vormen voor de voortplanting en daarmee voor het voortbestaan van soorten. Door het wegvallen van diersoorten kunnen natuurlijke evenwichten in kwetsbare ecosystemen ontregeld raken en dit kan op zijn beurt weer het voortbestaan van andere soorten onder druk zetten. De beschikbare kennis over hormoonontregeling is op dit moment nog zeer beperkt. Zo is er tot nu toe vrijwel uitsluitend aandacht besteed aan het chemisch meten van gehalten van een klein aantal zogenoemde (xeno)-oestrogenen. Waarschijnlijk nog maar een fractie van de potentiële probleemstoffen is ook werkelijk

onderzocht op oestrogene werking.

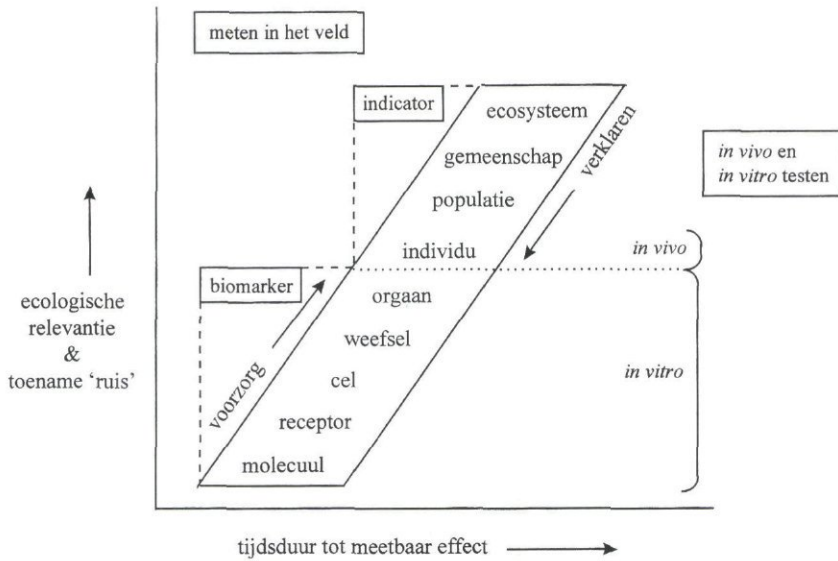
Het onderzoek naar hormoonverstoring met behulp van effectmetingen kent verschillende niveaus. Elk niveau vertegenwoordigt een graad van (biologische) organisatie van molecuul (stof) tot ecosysteem. Naarmate het niveau hoger wordt neemt de voorspellende waarde en daarmee de ecologische relevantie toe. Anderzijds neemt de verstoring door andere (fysiologische en ecologische) factoren ook toe en daarmee de mogelijkheid om een effect te koppelen aan een stofgroep) juist af (afb. 1). Al naar gelang de doelstelling, kunnen verschillende niveaus worden ingezet voor effectmeting. De keuze wordt daarbij in belangrijke mate bepaald door de soort informatie die men wenst, het beschikbare budget en de termijn waarop een resultaat gewenst is.

Effectmetingen worden binnen LOES ingezet met verschillende doelstellingen. De oestrogene potentie van monsters uit verschillende milieu matrices van verschillende locaties worden bepaald met *in vitro*-testen. De vergelijking van deze resultaten met de chemisch vastgestelde concentraties aan (xeno)oestrogene stoffen zullen inzicht verschaffen in de aanwezigheid van (xeno)-oestrogenen en de al dan niet corresponderende oestrogene potentie in het watermilieu. Hieruit kan men onder andere afleiden of er nog verder naar onbekende xeno-oestrogene stoffen moet worden gezocht.

Metingen aan natuurlijke vispopulaties moeten inzicht geven in de daadwerkelijke oestrogene effecten in de Nederlandse wateren. Experimenten waarbij vissen, op locatie en in het lab, worden blootgesteld aan biologisch gezuiverde effluënten zullen informatie verschaffen over de bijdrage van deze lozingen aan de in het veld waargenomen effecten.

### Principes van de *in vitro*-testen

Om een indicatie te krijgen van de oestrogene potentie van stoffen in bepaalde milieu-matrices is het gebruik van *in vitro*-testen zeer



Afb.1 De ecologische relevantie en tijdsduur tot dat een effect gemeten kan worden bij meting van biologische effecten in het veld op verschillende niveau's van biologische organisatie. Rechts staat aangegeven op welk niveau *in vivo*- en *in vitro*-testen uitgevoerd kunnen worden, lokaal of in het lab met materiaal uit het veld. Bij risicobeoordeling wordt stapsgewijs het 'voorzorg'-traject gevolgd, terwijl voor het verklaren van daadwerkelijk waargenomen effecten in het veld het omgekeerde traject wordt doorlopen.

geschikt. De testen zijn snel, relatief goedkoop en er is meestal maar weinig materiaal nodig.

In het vooronderzoek voor LOES (Belfroid e.a., 1999a) zijn drie *in vitro*-testen toegepast: de 'estrogenreceptor'-bindingstest (Schwartz e.a., 1993), de 'yeast estrogen'-test (Routledge e.a., 1996) en de 'chemical activated luciferase gen expression'-test (Legler e.a., 1999a). In het kader van een STOWA-onderzoek (Belfroid e.a., 1999b) naar biomarkers voor oestrogen-actieve stoffen is bovendien de E-screen (Soto, 1995) toegepast. De ER-bindingstesten en E-screen zijn uitgevoerd aan de Vrije Universiteit Amsterdam; de ER-calux en YES-testen door Wageningen Universiteit.

De genoemde testen meten alle vier verschillende aspecten van de effectketen van een stof die een cel binnenkomt en uiteindelijk tot oestrogene verstoring kunnen leiden. Ter toelichting is in afbeelding 2 het principe van de werking van een (xeno)-oestrogene stof beschreven. Wanneer (xeno)-oestrogene stoffen de celmembraan passeren, kunnen deze binden aan de oestrogeen-receptor in het cytosol van de cel. Vervolgens kan de receptor worden geactiveerd waarna een complex ontstaat van twee beladen receptoren aan elkaar. Dit complex migreert naar de celkern, waar het bindt aan een specifiek stukje DNA, het 'estrogen responsive element'(ERE). Bij het 'uitlezen' van DNA worden eiwitten gevormd zoals in een normale reactie op oestrogene hormonen in een vrouwjesdier. Eén van de eiwitten die gevormd kunnen worden, is vitellogenine. Dit is een dooier-eiwit dat van nature alleen in de lever van vrouwelijke vissen wordt aangemaakt, maar bij blootstel-

ling aan (xeno)-oestrogene stoffen uit het omringende milieu ook door mannelijke vissen kan worden geproduceerd. Het vormt derhalve een goede indicator voor oestrogene effecten.

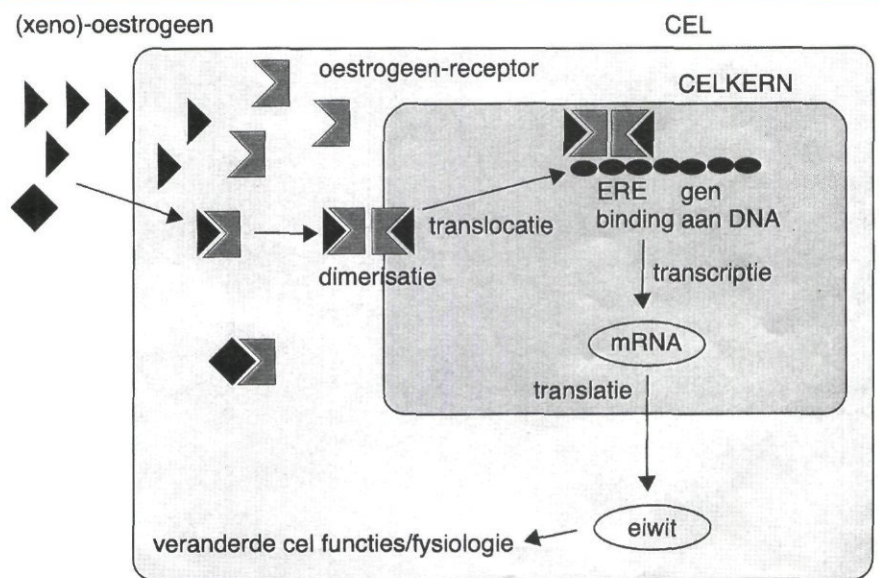
De oestrogeen-receptor-bindingstest (ER) geeft informatie over het binden van een stof aan een uit cellen geïsoleerde oestrogeen-

receptor. Geen informatie wordt gegeven over de activering of remming van de receptor. In de praktijk geven hierbij zowel actieve (xeno)-oestrogenen als anti-oestrogenen een positieve respons.

In de 'yeast estrogen'-test (YES) meet men de binding van een oestrogene stof aan een in de cel gebrachte humane oestrogeen-receptor (de gistcel heeft deze zelf niet) inclusief de activatie van deze receptor en het eveneens ingebrachte reporter-gen. Dit geeft dus een maat voor de stimulerende (agonistische) werking van de (xeno)oestrogenen. Doordat de gistcel een relatief moeilijk doorlaatbare celwand heeft, passeren zowel grotere moleculen als vrij lipofiele moleculen niet of nauwelijks de celmembraan. Als deze dus in het milieu-extract aanwezig zijn, zullen ze geen respons geven in deze test. Voor zover bekend geven stoffen met anti-oestrogene werking geen verlaging van de respons.

In de 'chemical activated luciferase gen expression'-test (ER-CALUX) wordt in een humane borstkankercellijn ook het hele proces van binding aan de receptor tot en met de activatie van de genen gemeten. Dit gaat ook op basis van het ingebrachte reporter-gen, maar de receptor zit van nature al in de cel. De respons is een resultante van zowel oestrogene en anti-oestrogene activiteit. Voor zover bekend passeren zowel hydrofiele als lipofiele stoffen zonder probleem de celwand. Dit betekent dat alle stoffen die in een extract aan de cellen worden aangeboden de celwand ook daadwerkelijk

Afb. 2 Principe van werkingsmechanisme van natuurlijke oestrogenen en xeno-oestrogenen in een cel.



LEGENDA

- oestrogeen receptor
- anti-oestrogeen
- (xeno)-oestrogeen
- geblokkeerde receptor
- geactiveerde receptor

kunnen passeren. Ook kan er in de cellen omzetting van de stoffen plaatsvinden waardoor effecten van metabolieten (afbraakproducten) meegemeten kunnen worden.

De E-screen maakt gebruik van een borstkankercellijn die oestrogenen in het groeimedium nodig heeft om te kunnen delen. (Xeno)oestrogenen uit een milieu-extract zullen in principe dus ook de celgroei stimuleren. De E-screen is een relatief bewerkelijke *in vitro*-test, omdat onder andere controles moeten worden uitgevoerd op stoffen die mogelijk de groei van de cellen remmen.

Niet in de voorstudie meegenomen maar wel in het LOES-onderzoek. Wordt in een nieuw ontwikkelde *in vitro*-test de productie van het dooier-eiwit vitellogenine in celcultures van vissenlevers bepaald door blootstelling aan (xeno)-oestrogenen uit milieu-extracten. Deze test is weliswaar (nog) moeilijk uitvoerbaar, maar de vergelijkbaarheid met *in vivo*-testen, eveneens uitgevoerd met vissen, wordt hiermee eenvoudiger.

### Resultaten vooronderzoek

Omdat de genoemde vier *in vitro*-testen nog niet eerder toegepast waren op de geselecteerde milieumonsters, moesten de voorwerkingsmethoden van de monsters nog worden ontwikkeld. Waterige monsters werden na filteren over glasvezelfilters geëxtraheerd met een SDBXC-disk en geëluëerd met methanol. Zwevend stof, sediment en zuiveringsslib werden na vriesdrogen geëxtraheerd in een 'accelerated solvent extractor' met dichloormethaan/acetone (1:1). Alle extracten werden uiteindelijk in DMSO aan de *in vitro*-testen toegevoegd. In het vorige artikel was te lezen welke locaties zijn bemonsterd.

### Prestatiekarakteristieken van de *in vitro*-testen

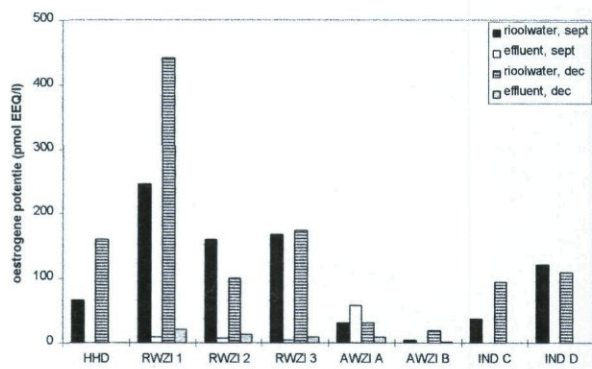
Alle *in vitro*-testen bleken goed te kunnen worden uitgevoerd met extracten van alle milieumonsters. De respons van deze tests worden steeds uitgedrukt ten opzichte van het natuurlijke oestrogene hormoon 17 $\beta$ -oestra-

diol, als oestradiol equivalenten (EEQ's). Zoals verwacht is de oestrogene potentie, gemeten met de ER-bindingstest, veel hoger dan die gemeten met de andere testen. Dit komt doordat stoffen niet zoals bij levende systemen een celwand hoeven te passeren en binding van anti-oestrogenen op dezelfde wijze bijdragen aan het signaal als oestrogenen. De ER-CALUX en de YES-test geven resultaten te zien die vrij goed overeenkomen, hoewel de respons op de laatste test wat vaker onder de detectielimiet lag.

Doordat karakteristieken zoals detectielimiet, maximale inductiefactor en spreiding nogal verschillen tussen de *in vitro*-testen is ook de hoeveelheid monstermateriaal, die bewerkt moet worden, per test sterk verschillend. Tabel 1 geeft een overzicht van de hoeveelheden materiaal die gemiddeld nodig zijn om de oestrogene potentie goed te kunnen bepalen. In deze tabel is tevens de detectielimiet en benodigde blootstelduur weergegeven.

### Oestrogene potentie in afvalwater

Zoals in afbeelding 3 te zien is verschilt de oestrogene potentie van het afvalwater sterk per monsterperiode. Voor gefiltreerd stedelijk rioolwater ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van 1 tot 300 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en YES. Deze waarde van de oestrogene potentie is equivalent aan 0,3 tot 90 ng 17 $\beta$ -oestradiol/l. Voor de ER-bindingstest bedroeg deze waarde 500 tot 2500 pmol EEQ/l. In de rwzi's vindt een aanzienlijk reductie plaats (met een factor tien tot 20), wat resul-



Afb. 3 Aanwezigheid van oestrogene potentie in afvalwater, gemeten met ER-CALUX in vijf rwzi/awzi's en in drie rioolputten. HHD is ruw rioolwater van woonwijk, RWZI 1-3 zijn stedelijke rwzi's, AWZI A en B zijn industriële awzi's en IND C en D zijn locaties voor rioolwater van twee industrieterreinen.

teert in lagere gehalten in effluent in de orde van grootte van 1 tot 30 pmol EEQ voor ER-CALUX en YES. De oestrogene potentie van het gefiltreerde rioolwater vanaf industrieterreinen ligt met 1 tot 75 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en YES beduidend lager dan ruw stedelijk rioolwater. Ook zuiveringsslib bevat nog vrij veel oestrogene potentie.

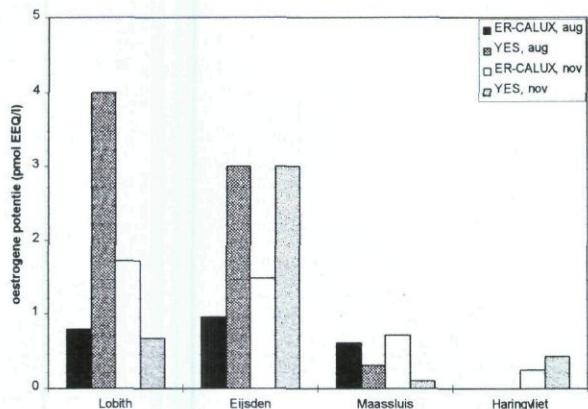
Deze gemeten responsen van de *in vitro*-testen zijn hoger dan wordt berekend op basis van chemisch gemeten gehalten. Deze gehalten aan individuele stoffen worden vermenigvuldigd met de relatieve oestrogene potentie (EEF) van deze individuele stoffen, waarna alle producten van de afzonderlijke stoffen in een mengsel bij elkaar worden opgeteld. Afhankelijk van het type screeningstest alsmede de matrix is het percentage van de oestrogene potentie, wat verklaard kan worden, wisselend. Zo is voor het effluent van een rwzi/awzi het berekende percentage van het chemisch verklaarde deel slechts 30 procent van de gemeten oestrogene potentie met de ER-CALUX. Dit betekent dat 70 procent van de gemeten oestrogene potentie waarschijnlijk veroorzaakt wordt door nog onbekende stoffen. Voor het influent is het chemisch te verklaren deel een factor twee groter. Een belangrijk deel van deze berekende oestrogene potentie wordt bepaald door de aanwezigheid van de oestrogene hormonen.

### Oestrogene potentie in oppervlaktewater

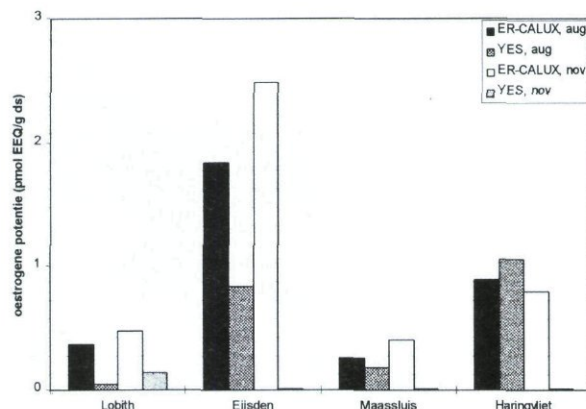
Ook in oppervlaktewater en zwevend stof blijkt de oestrogene potentie tussen de bemonsteringslocaties sterk te kunnen verschillen, maar ook de matrix waarin deze voorkomt (zie afb. 4 en 5). In oppervlaktewater is de oestrogene potentie over het algemeen laag: 0,1 tot 1,7 pmol EEQ/l voor ER-CALUX en waarden tot 4 pmol EEQ/l voor YES. Voor zwevend stof lag de oestrogene potentie tussen 0,1 en 2,5 pmol EEQ/g droog materiaal. Bij

Tabel 1: Enkele prestatiekarakteristieken en per matrix de hoeveelheid benodigd materiaal van vier *in vitro*-tests.

	ER-binding	YES	ER-CALUX	E-screen
blootstelduur	3 uur	3 dagen	1 dag	8 dagen
detectielimiet (pM)	1000	10	0,5	3,3
oppervlaktewater (ml)	± 950	60 - 250	6 - 30	15 - 90
zwevend stof (g)	± 1500	50 - 400	16 - 40	45 - 120
ruw rioolwater (ml)	± 400	4 - 100	0,2 - 2,5	0,6 - 7,5
effluent (ml)	± 400	10 - 100	0,9 - 9	3 - 18
zuiveringsslib (g)	± 150	5 - 40	0,5 - 4	1,5 - 12



Afb. 4 Aanwezigheid van oestrogene potentie in oppervlaktewater op vier locaties in Nederland, gemeten met ER-CALUX en YES.



Afb. 5 Aanwezigheid van oestrogene potentie in zwevend stof op vier locaties in Nederland, gemeten met ER-CALUX en YES.

Eijsden is de gemeten oestrogene potentie in zowel de waterige als vaste fractie over het algemeen hoger dan bij de andere drie locaties. Met de ER-bindingsassay zijn de gemeten niveau's, indien deze boven de detectielimiet uitkwamen, altijd veel hoger (tot 10 pmol EEQ/l en 300 pmol EEQ/g droge stof voor respectievelijk de waterige fractie en zwevend stof) dan gemeten met de YES of ER-CALUX.

De berekende oestrogene potentie uitgaande van de chemisch gemeten gehalten van de individuele stoffen in oppervlaktewater waren enkele factoren hoger dan de daadwerkelijk gemeten responsen met de *in vitro*-testen. Mogelijke verklaring is dat de chemisch gemeten gehalten van de diverse stoffen in oppervlaktewater dicht tegen de detectielimiet liggen, waardoor de onzekerheid in de berekende potentie vrij groot wordt.

**Betekenis van de resultaten**

Zoals uit het vooronderzoek blijkt zijn in het Nederlandse milieu stoffen aanwezig met oestrogene potentie. Zelfs in rivierwater kon soms een oestrogene potentie worden gemeten die op het niveau lag van 1.1 pmol EEQ/l (equivalent aan 0,3 ng 17β-oestradiol/l), het niveau waarbij in het laboratorium met oestrogene hormonen als zuivere stof is aangetoond dat bij mannelijke forellen vitellogenine productie optreedt. Of dit ook bij vissen in deze rivieren op zal treden is nog niet bekend, omdat niet precies bekend is welke stoffen deze oestrogene potentie vormen en of ze goed zullen worden opgenomen door vissen. Daarom is het van belang om naast *in vitro*-testen met extracten ook *in vivo*-experimenten met dezelfde extracten en niet-geëxtraheerd water uit te voeren. Een ecologisch relevantere parameter is een nadelig reproductie-effect op lokaal levende vissen met effecten op de populatie. Dit is methodisch echter vaak zeer moeilijk vast te stellen. In het LOES-project zal echter een goede schatting kunnen worden gemaakt van de risico's van de huidige niveaus

aan (xeno)oestrogene stoffen op de reproductie van vissen in Nederland. Tevens zal het de mogelijkheid bieden voor nadere biologische en ecologische validatie van de gebruikte screeningstesten.

De volgende validatiestappen zullen worden uitgevoerd:

- *in vitro*-respons met extracten (ER-CALUX, YES, vitellogenine-inductie in karperscellen),
- *in vivo*-respons met extracten (transgene zebrafis). Zeer recentelijk is een transgene genetisch gemanipuleerde zebrafis ontwikkeld in respons vergelijkbaar met de ER-CALUX. Hiermee kunnen in alle levensstadia van de vis de orgaanspecifieke effecten van oestrogeen-actieve stoffen bepaald worden (Legler, 2000),
- *in vivo*-respons met compleet water (lifecycle test met zebrafis). Tijdens deze test worden zebrafissen gedurende een hele levenscyclus blootgesteld aan niet-geëxtraheerd water, waarbij de effecten op het voortplantingssucces van deze dieren en hun nakomelingen worden bekeken, biomarker-effecten door in kooien uitgangenen vis (karpers en regenboogforel). Gekeken zal worden naar de vitellogenine-inductie na drie weken blootstelling. Daarnaast zullen bepaalde inteelt-karpers, waarvan de nakomelingen honderd procent mannelijk of honderd procent vrouwelijk zijn, lokaal worden uitgezet in kooien of blootgesteld onder laboratoriumomstandigheden. Deze dieren zijn zeer geschikt om naast vitellogenine-inductie de mate van interseksualiteit ten gevolge van de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen te bepalen
- en vitellogenine-inductie, histologisch onderzoek aan gonaden en afwijkingen aan geslachtsverhoudingen bij lokaal in het wild levende vissen.

Door de toenemende complexiteit wordt het met toenemende ecologische relevantie steeds moeilijker om de relatie met de chemisch bepaalde gehalten aan (xeno)-oestrogene stoffen vast te stellen. Door de chemisch-biologische geïntegreerde benadering in het LOES-project zal het echter mogelijk zijn na ecologische validatie van de *in vitro*-testen voor bepaalde matrices een grenswaarde aan te geven, waaronder geen nadelige oestrogene effecten te verwachten zijn.

**LITERATUUR**

Belfroid A., Murk T., de Voogt P., Schäfer A., Rijs G. en D. Vethaak (1999a). Hormoononregelaars in water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland. RIZA/RIKZ-rapport 99.007/99.024 (in druk).

Belfroid A., van Hattum A. en J. Meerman (1999b). Pilot-studie biomarkers voor oestrogeen-actieve stoffen. STOWA-rapport (in druk).

Legler J., van den Brink C., Brouwer A., Murk T., van der Saag P., Vethaak D. en B. van der Burg (1999a). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Tox. Sciences*, 48, pagina 55-66.

Legler J., Broekhof J., Brouwer A., Lanser P., Murk T., van der Saag P., D. Vethaak en B. van der Burg (2000). Male reproductive organs are the main target for estrogens in novel transgenic zebrafish model. Submitted.

Routledge E. en J. Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Tox. Chem.* 15, pagina 241-248.

Schwartz J. en D. Skafar. Ligand-mediated modulation of estrogen receptor conformation by estradiol analogs. *Biochemistry*, 32, pagina 10109-10115.

Soto A., Sonnenschein C., Chung K., Fernandez M., Olea N. en F. Serrano (1995). The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 103 Suppl 7, pagina 113-122.