

# VU Research Portal

## Tracing endocrine disruptors

Houtman, C.J.

2007

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Houtman, C. J. (2007). *Tracing endocrine disruptors: Identification and effects of endocrine disrupting compounds in the aquatic environment*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Hormoonverstorende stoffen op het spoor

## *Inleiding*

Sinds het begin van de jaren negentig van de vorige eeuw is er met zekere regelmaat melding gemaakt van voortplantingsproblemen bij verschillende in het wild levende diersoorten op verschillende plaatsen in de wereld. Verminderde vruchtbaarheid en achteruitgang van de omvang van populaties zijn hiervan voorbeelden. Ze zijn waargenomen bij bijvoorbeeld zeearenden, panters, schildpadden en vissen. De verschijnselen worden gezamenlijk aangeduid met de term hormoonverstoring ('endocrine disruption'). Een van de mogelijke oorzaken is de blootstelling van in het wild levende dieren aan chemische verbindingen in het milieu die door hormonen aangestuurde processen in het lichaam verstoren (hormoonverstorende stoffen), bijvoorbeeld door de werking van vrouwelijke geslachtshormonen (oestrogenen) na te bootsen of te remmen. Inmiddels is van veel stoffen vastgesteld dat ze inderdaad hormoonverstorende eigenschappen hebben en dat blootstelling eraan mogelijk tot hormoonverstorende effecten zou kunnen leiden. Voorbeelden van hormoonverstorende stoffen zijn organochloorpesticiden, alkylphenolen (afbraakproducten van oppervlakteactieve stoffen) en stoffen met een dioxineachtige activiteit, zoals polygehalogeneerde aromatische koolwaterstoffen en sommige polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's).

Een van de meest opvallende voorbeelden

van hormoonverstoring in het aquatische milieu is de vervrouwelijking van mannelijke vissen. Ovotestis (ook wel intersexualiteit genoemd, een aandoening waarbij er eicellen ontstaan in het testisweefsel) is een frequent waargenomen verschijnsel bij mannetjesvissen in rivieren en kustwateren. Een andere waarneming is de aanmaak van het dooierewit vitellogenine (VTG) door mannetjesvissen. Omdat de aanmaak van dit eiwit normaal gesproken alleen plaatsvindt in volwassen vrouwtjesvissen en onder controle staat van oestrogene hormonen wordt de aanmaak van VTG in mannetjesvissen gebruikt als biomarker voor blootstelling aan oestrogene stoffen.

Ook in Nederland zijn oestrogene effecten waargenomen bij vissen. Het was echter nog niet bekend welke stoffen deze effecten in het Nederlandse aquatische milieu veroorzaken. Het onderzoek in dit proefschrift was er daarom op gericht de verantwoordelijke stoffen op te sporen en te identificeren. Er is gebruik gemaakt van zowel biologische als chemisch-analytische meettechnieken. Met oestrogeenresponsieve (ER) en dioxineresponsieve (DR) CALUX-assays, is hormoonverstorende activiteit in sediment- en vismonsters uit het Nederlandse milieu gemeten. Om de stoffen met hormoonverstorende activiteit te identificeren zijn analytisch-chemische technieken, zoals gaschromatografie-massaspectrometrie en vloeistofchromatografie, gebruikt. Om uit het grote aantal verschillende stoffen in een milieumonster de actieve stoffen aan te kunnen

wijzen, is een benadering gekozen waarbij de biologische en analytisch-chemische technieken werden gecombineerd tot een bioassay-gestuurde identificatiemethode ('bioassay directed identification'). Hierbij worden door middel van fractionering de in het monster aanwezige stoffen in groepen (fracties) verdeeld. Iedere fractie wordt getest met een CALUX-assay om zo duidelijk te maken in welke fracties actieve verbindingen zijn terechtgekomen. Deze fracties worden eventueel nog verder gefractioneerd en getest totdat de complexiteit van de actieve fracties laag genoeg is om daarin de stoffen die verantwoordelijk zijn voor de hormoonverstorende activiteit te identificeren.

### ***Doelstellingen***

Dit proefschrift beschrijft de verschillende studies die zijn uitgevoerd om stoffen met een hormoonverstorende werking en hun effecten in het milieu te onderzoeken. De doelstellingen van het onderzoek waren driedig.

Het eerste doel was het verkrijgen van een algemeen beeld van de aanwezigheid van verschillende typen hormoonverstorende activiteit in het aquatische milieu in Nederland. De vraag was of verder onderzoek naar hormoonverstorende activiteit gerechtvaardigd was en, zo ja, op welke van de onderzochte soorten hormoonverstorende activiteit dan de nadruk moest komen te liggen.

Het tweede doel was het ontwikkelen van een door een bioassaygestuurde identificatiemethode om stoffen aan te tonen die verantwoordelijk zijn voor de in milieumonsters gemeten hormoonverstorende activiteit.

Het derde doel was de identificatie van stoffen die verantwoordelijk zijn voor hormoonverstorende activiteit in het aquatisch milieu. Hiertoe is de ontwikkelde methode toegepast op sedimentmonsters en op verschillende vismatrices.

### ***Hormoonverstorende activiteiten in het aquatische milieu***

Als eerste is de aanwezigheid van verschillende soorten hormoonverstorende activiteit in het Nederlandse aquatische milieu onderzocht (hoofdstuk twee). Op vijftien locaties in het mondingsgebied van de Rijn en Maas is sediment verzameld. Met *in vitro* bioassays zijn hierin vier soorten hormoonverstorende activiteit gemeten, namelijk dioxineachtige activiteit, oestrogene en anti-oestrogene activiteit en capaciteit om het schildklierhormoon van zijn transporteiwit te verdringen. Om het belang van de mate waarin hormoonverstorende activiteit gevonden wordt te vergelijken met dat van andere toxische activiteiten in het milieu zijn ook genotoxische en a-specifieke toxiciteit in de sedimentmonsters gemeten. Alle onderzochte soorten toxische activiteit werden aangetroffen. Met name oestrogene en dioxineachtige activiteit kwamen veel voor. Dit rechtvaardigde de focus op deze soorten hormoonverstorende activiteit in de rest van het onderzoek. Hoewel oestrogene en dioxineachtige activiteit wijdverspreid bleken te zijn, was niet bekend welke stoffen op de onderzochte locaties deze activiteiten veroorzaakten. Sediment uit de binnenhaven van Zierikzee, een van de locaties met hoge dioxineachtige en oestrogene activiteit, is daarom later in het onderzoek gebruikt voor een bioassaygestuurde identificatiestudie teneinde de verantwoordelijke verbindingen te identificeren.

### ***Ontwikkeling van de bioassaygestuurde identificatiemethode***

De in het eerste deel van het onderzoek gebruikte ER- en DR-CALUX-assays bleken in staat zeer gevoelig en specifiek respectievelijk oestrogene en dioxineachtige activiteit te meten.

Deze assays werden daarom uitgekozen in de te ontwikkelen methode om de identificatie van hormoonverstorende stoffen aan te sturen. Vervolgens is er een methode ontwikkeld voor de monstervoorbewerking van sediment (hoofdstuk drie). De methode moest een zo breed mogelijke groep van stoffen uit het monster kunnen extraheren, zodat zoveel mogelijk actieve verbindingen meekomen. Met name bij de analyse van oestrogene activiteit is dit belangrijk, aangezien oestrogene verbindingen onderling zeer verschillen in fysisch-chemische eigenschappen. De ontwikkelde methode bestaat uit een accelerated solvent (ASE)- of soxhletextractie gevolgd door een niet-destructieve opzuivering van het extract op een gelpermeatiechromatografi kolom. Met chemische analyse is vastgesteld dat de methode goede opbrengsten oplevert voor stoffen in een breed spectrum van fysisch-chemische eigenschappen. Hierdoor kan extract dat met deze methode bereid is, gebruikt worden voor de identificatie van zowel oestrogene als dioxineachtige stoffen.

In het milieu is blootstelling aan een mengsel van verschillende stoffen een reële mogelijkheid. Hierom is bij de biologische validatie van de methode speciale aandacht besteed aan het gedrag van mengsels van (xeno-)oestrogene stoffen tijdens monstervoorbewerking en analyse in de ER-CALUX-assay (hoofdstuk vier). Mengsels van xeno-oestrogene stoffen bleken zich additief te gedragen in de ER-CALUX-assay. Hun gezamenlijke effect kwam goed overeen met dat wat berekend kon worden op basis van hun individuele activiteit en concentratie volgens het concentratie-additieconcept. Ook wanneer de ontwikkelde monstervoorbewerkingmethode werd toegepast op een mengsel van xeno-oestrogenen of op een sedimentmonster waaraan een mengsel van xeno-oestrogenen was toegevoegd bleek hun additieve

mengselgedrag in de ER-CALUX-assay behouden te blijven. Om te komen tot een volledige bioassaygestuurde identificatiemethode is de ontwikkelde monstervoorbewerkingmethode gekoppeld aan verschillende combinaties van reversed phase en normal phase HPLC fractionering en een- en tweedimensionale gaschromatografietechnieken.

#### ***Toepassingen van bioassaygestuurde identificatie op milieumonsters***

De eerste toepassing van bioassaygestuurde identificatie die beschreven is, is de identificatie van oestrogene en dioxineachtige stoffen in sediment uit de binnenhaven van Zierikzee (hoofdstuk vijf). Het natuurlijke oestrogene hormoon  $17\beta$ -E<sub>2</sub> en zijn afbraakproduct E<sub>1</sub> bleken verantwoordelijk te zijn voor het grootste deel van de oestrogene activiteit in relatief polaire fracties van het extract van dit monster. De natuurlijke oestrogene hormonen zijn zeer potente oestrogenen. Daardoor waren de zeer lage concentraties waarin deze stoffen aanwezig waren (tienden van nanogrammen per gram sediment) genoeg om meetbare oestrogene activiteit te veroorzaken. Ook in een relatief apolaire extractfractie werd wat oestrogene activiteit gemeten. Hiervan is de identiteit echter niet achterhaald. Dioxineachtige activiteit werd gemeten in relatief apolaire fracties. Deze activiteit kon worden toegeschreven aan de aanwezigheid van verschillende gealkyleerde en ongealkyleerde PAK's. In de binnenhaven van Zierikzee hebben in het verleden verschillende activiteiten plaatsgevonden die bijgedragen kunnen hebben aan het vrijkomen van PAK's. Zo hebben er vroeger een brandstofdepot en een gasfabriek gestaan en werden er meerpalen met teer behandeld.

Vervolgens zijn twee veldstudies beschreven waarbij bioassaygestuurde identificatie is toegepast om oestrogene effecten in

vispopulaties te onderzoeken. Een grootschalig onderzoek naar oestrogene stoffen en effecten in Nederlandse oppervlaktewateren (het LOES-project) had het voorkomen aangetoond van extreem verhoogde concentraties VTG in plasma en van ovotestis in mannetjesbrasem van locaties die effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie ontvangen, zoals het riviertje de Dommel bij Eindhoven. De concentratie VTG in plasma bleek toen sterk gecorreleerd aan de oestrogene activiteit in gal van mannetjesbrasem. In het onderzoek beschreven in hoofdstuk zes is gal daarom gebruikt als matrix waarin de stoffen konden worden aangetoond die verantwoordelijk zijn voor de oestrogene effecten in mannetjesvissen op drie locaties in Nederland. Net als bij het sedimentmonster uit hoofdstuk vijf bleken de natuurlijke oestrogenen  $17\beta$ -E<sub>2</sub> en E<sub>1</sub> de grootste bijdrage te leveren aan de oestrogene activiteit in gal. Bij vissengal uit de rivier de Dommel bleek bovendien het synthetische oestrogeen ethynylöstradiol in werkzame concentraties aanwezig. Behalve de actieve oestrogene stoffen leverde chemische analyse van de galextractfracties ook de identificatie op van andere xenobiotische stoffen in relatief hoge concentraties, bijvoorbeeld de desinfectiemiddelen triclosan, chloorxylenol en chlorofoen.

De laatste veldstudie is uitgevoerd om vier jaar na het LOES-project de blootstelling van brasems aan oestrogene stoffen en de effecten daarvan in Nederlandse oppervlaktewateren opnieuw te onderzoeken (hoofdstuk zeven). Verhoogde concentraties VTG in plasma zijn gemeten bij mannetjesbrasems uit de effluent ontvangende riviertjes de Aa en de Dommel, maar ook bij brasems uit de Biesbosch. Intersexualiteit kwam echter nauwelijks voor. Oestrogene activiteit is gemeten in sediment, vissenplasma, -lever en -maagdarminhoud. In

tegenstelling tot die in lever en plasma, bleek de oestrogene activiteit in maagdarminhoud sterk gecorreleerd aan de concentratie VTG in plasma. Daarom is de oestrogene activiteit in maagdarminhoud gebruikt als biomarker voor recente interne blootstelling van de vis aan oestrogene stoffen. De vervolgens uitgevoerde bioassaygestuurde identificatiestudie wees opnieuw  $17\beta$ -E<sub>2</sub> en E<sub>1</sub> aan als stoffen die de gemeten oestrogene activiteit grotendeels kunnen verklaren. Dit bevestigt de belangrijke rol die de aanwezigheid van natuurlijke oestrogene hormonen mogelijk heeft ter verklaring van het optreden van oestrogene effecten in het Nederlandse aquatische milieu.

#### *Slotopmerkingen*

Dit onderzoek heeft aangetoond dat hormoonverstorende activiteiten wijdverbreid zijn in het Nederlandse aquatische milieu. De nadruk in dit onderzoek heeft gelegen op oestrogene en dioxineachtige stoffen. Dit betekent echter niet dat andere soorten hormoonverstorende stoffen in het milieu geen aandacht verdienen. De ervaring die nu is opgedaan voor oestrogene en dioxineachtige stoffen in het milieu, samen met het groeiende aantal gevoelige bioassays dat beschikbaar komt voor steroidhormoonachtige activiteiten, vormt een goede basis voor het onderzoek naar andere soorten hormoonverstorende activiteit in het aquatisch milieu, zoals (anti-)androgene en progestagene activiteit.

De natuurlijke oestrogenen  $17\beta$ -E<sub>2</sub> en E<sub>1</sub>, samen met het synthetische oestrogeen ethynylöstradiol, zijn in dit onderzoek geïdentificeerd als stoffen die de belangrijkste bijdrage leverden aan de oestrogene activiteit in het milieu. Ook in buitenlandse studies is dit vaak het geval geweest, hoewel in zeer specifieke gevallen oestrogene activiteit soms grotendeels kon worden toegeschreven aan alkyphenolen.

In het algemeen kunnen natuurlijke en synthetische steroïdale oestrogenen dus beschouwd worden als de meest waarschijnlijke veroorzakers van oestrogene activiteit in het aquatisch milieu.

Oestrogene hormonen kunnen via verschillende routes in het milieu terecht komen. Een belangrijke route vormt uitscheiding door de mens. Natuurlijke oestrogenen, maar ook synthetische, zoals ethynyl-oestradiol, voornamelijk gebruikt als anticonceptivum en hormoonvervanger, kunnen via het rioolwater in het milieu terecht komen. In dit onderzoek zijn deze stoffen inderdaad aangetroffen in brasems in wateren waarop effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties wordt geloosd, zoals de Dommel en de Aa. Door landbouwhuisdieren uitgescheiden oestrogenen, vaak niet opgevangen in een riool, vormen echter ook een belangrijke bron van oestrogenen in het milieu. Mogelijk is dit van invloed geweest op het aantreffen van natuurlijke oestrogene hormonen op locaties die geen effluent ontvangen, zoals de Biesbosch en de haven van Zierikzee.

Effecten van blootstelling aan oestrogene stoffen op brasem, zoals ovotestis en verhoogd VTG, zijn in dit onderzoek aangetoond op het niveau van de individuele vis. Of in de huidige situatie blootstelling aan oestrogene stoffen ook effecten op populatieniveau veroorzaakt, is echter nog grotendeels onbekend. Nader onderzoek is dan ook nodig om vast te stellen of vispopulaties gevaar lopen en hoe we ze kunnen beschermen. Een van de middelen om populaties tegen hormoonverstorende effecten

te beschermen is het invoeren van normen voor hormoonverstorende stoffen in bijvoorbeeld oppervlaktewater en sediment. Het verdient de voorkeur zulke normen uit te drukken in een eenheid van activiteit, zoals EEQ en TEQ, aangezien de norm dan betrekking heeft op de som van alle actieve verbindingen en er zo ook rekening kan worden gehouden met de risico's van blootstelling aan mengsels van stoffen met een bepaalde activiteit.

Dit onderzoek toont aan dat de bioassaygestuurde identificatiemethode zeer geschikt is voor het identificeren van stoffen met een specifiek werkingsmechanisme, zoals oestrogene en dioxineachtige stoffen, in complexe milieumonsters. Door de integratie van biologische en chemisch-analytische technieken worden de sterke kanten van beide technieken in deze methode optimaal benut. De methode zou nog verder verbeterd kunnen worden door verhoging van de identificatieve en interpretatieve kracht van chemisch-analytische technieken en door nader onderzoek naar de vertaling van *in vitro* effecten, bijvoorbeeld die in CALUX-assays, naar de *in vivo* situatie in het veld. De ervaring die nu is opgedaan met bioassaygestuurde identificatie van oestrogene en dioxineachtige stoffen in het milieu geeft aan dat deze benadering ook in de toekomst, zowel in een wetenschappelijke context als van overheidswege, ingezet kan worden voor onderzoek naar effecten in het milieu die vermoedelijk worden veroorzaakt door onbekende verbindingen.