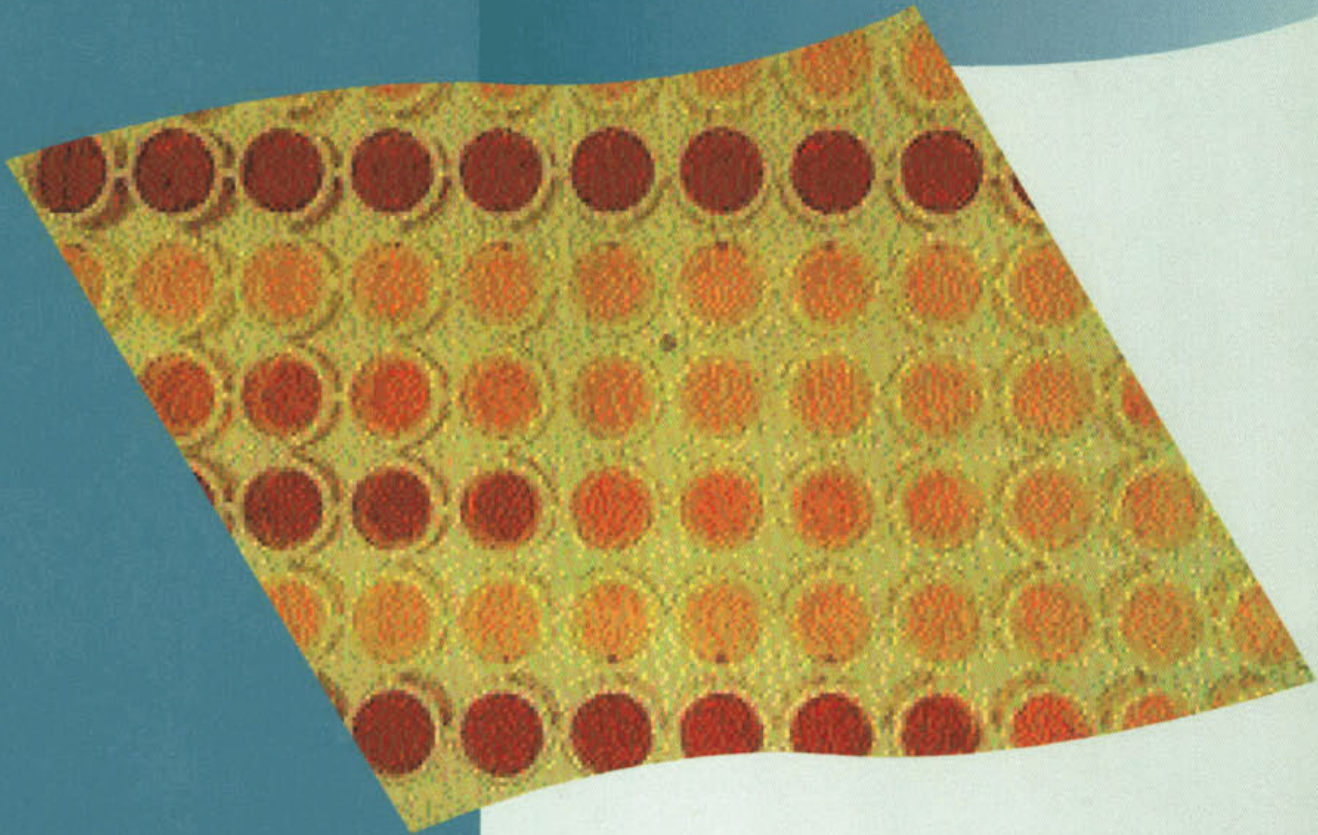


1999-18\_detectie-oestrogeen-actieve-stoffen

## Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met *in vitro* bioassays



99

18

**Detectie van oestrogeen-actieve stoffen  
met *in vitro* bioassays**

Arthur van Schendelstraat 816  
Postbus 8090, 3503 RB Utrecht  
Telefoon 030 232 11 99  
Fax 030 232 17 66  
E-mail [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl)  
<http://www.stowa.nl>

Publicaties en het publicatie-  
overzicht van de STOWA kunt u  
uitsluitend bestellen bij:

*Hageman Fulfilment*  
Postbus 1110  
3300 CC Zwijndrecht  
tel. 078 - 629 33 32  
fax 078 - 610 42 87  
e-mail: [hff@wxs.nl](mailto:hff@wxs.nl)

o.v.v. ISBN- of bestelnummer en  
een duidelijk afleveradres.  
ISBN 90.5773.073.1

99 18

## Ten geleide

De voor u liggende rapportage is het resultaat van twee jaar onderzoek uitgevoerd door het Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM) in samenwerking met sectie Moleculaire Toxicologie van het Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (MT-LACDR), beiden gesitueerd aan de Vrije Universiteit te Amsterdam. Doel van het onderzoek was een aantal technieken voor het opsporen van oestrogene potentie in het milieu te testen op hun bruikbaarheid, alsmede een indruk te krijgen van het voorkomen van oestrogene potentie en de daarvoor verantwoordelijke componenten in oppervlaktewater en afvalwater in Nederland.

Het onderzoeksteam bestond uit Dr. A.C. Belfroid, Drs. S. Kools, B. van der Horst en Dr. A.G.M. van Hattum (IVM), Dr. J.H.N. Meerman, S. Lemstra en ir. M. M. H. van Lipzig (MT-LACDR). Voor de inhoudelijke begeleiding en afstemming is teruggevallen op het netwerk van onderzoekers die zich bezig houden met onderzoek naar oestrogene stoffen in de context van het door Rijkswaterstaat (RIZA en RIKZ) gecoördineerde project Oriënterend Onderzoek Oestrogene Stoffen (voorloper van LOES). In dit kader is ook het veldwerk uitgevoerd in nauwe samenwerking met het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling (RIZA). Daarnaast is in de eindfase van dit project een deelonderzoek uitbesteed bij de vakgroep Toxicologie van de LUW. Binnen de STOWA werd dit project in eerste instantie geïnitieerd en gecoördineerd door Dr. S. Klapwijk. Na zijn overlijden is zijn taak in deze overgenomen door Drs. B. van der Wal.

De STOWA is de volgende personen en instanties erkentelijk voor hun bijdragen: Dr. A. Murk en ir. J. Legler (vakgroep Toxicologie, LUW), A. Schäfer en G. Rijs (RIZA), D. Vethaak (RIKZ), Marcel Hermanns en andere medewerkers van rwzi's die bij dit onderzoek betrokken waren. Bijzondere dank gaat uit naar Prof. Sumpter en Dr. N. Beresford van het Department of Biology and Biochemistry van de Brunel University in de UK voor het beschikbaar stellen van de YES-assay, naar Dr. P. Mager van de vakgroep Biochemie van de VU voor de gastvrijheid op het laboratorium en naar Dr. A.J. Murk voor de beschikbaar gestelde kennis.

Utrecht, november 1999

De directeur van de STOWA

Ir. J.M.J. Leenen

Dit rapport kan geciteerd worden als: Belfroid, A.C., A.G.M. van Hattum en J.H.N. Meerman (1999). Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met *in vitro* bioassays. STOWA rapport 99-18, Utrecht.

## Inhoud

Ten geleide

Samenvatting	iii
1. Inleiding	1
1.1 Algemene probleemstelling	1
1.2 Mogelijkheden van <i>in vitro</i> bioassays voor oestrogene werking	2
1.3 Doel van dit onderzoek	3
1.4 Opbouw van dit rapport	4
1.5 Het <i>in vitro</i> assay concept	4
2. Materiaal en methoden	7
2.1 Laboratoriumstudies	7
2.1.1 ER-bindingsassay	7
2.1.2 YES-assay	7
2.1.3 E-screen (MCF-7 celproliferatie assay)	9
2.2 Veldstudies	10
2.2.1 Preconcentrerings van monsters	10
2.2.2 Veldstudie 1: Oestrogene potentie in rwzi-Amsterdam-Oost met YES	10
2.2.3 Veldstudie 2: Oestrogene potentie in Nederland met ER-bindingsassay	10
2.3 Fractioneringsstudie	12
2.3.1 Principe van proef opzet	12
3. Resultaten	15
3.1 Laboratoriumstudies	15
3.1.1 ER-bindingsassay	15
3.1.2 YES-assay	15
3.1.3 MCF-7 celproliferatie assay (E-screen)	19
3.1.4 Vaststellen relatieve oestrogene potentie	19
3.2 Veldstudies	20
3.2.1 Preconcentrerings.	20
3.2.2 Veldstudie 1	21
3.2.3 Veldstudie 2	21
3.3 Fractioneringsstudie	23
3.3.1 Resultaten biologische assays	23
3.3.2 Resultaten chemische analyses	25
4. Discussie	27
4.1 Prestaties van de <i>in vitro</i> assays	27
4.1.1 ER-bindingsassay.	27
4.1.2 YES	27

*Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays*

4.1.3 E-screen	28
4.1.4 Relatieve oestrogene potentie (EEF)	28
4.1.5 Oestrogene potentie van mengsels	30
4.2 Bruikbaarheid van de <i>in vitro</i> assays voor de veldsituatie	30
4.3 Voorkomen van oestrogene potentie in watersystemen en rwzi's	33
4.4 Verantwoordelijke componenten voor oestrogene potentie in rwzi's	36
4.4.1 Vergelijking tussen gemeten oestrogene potentie en berekende potentie.	36
4.4.2 Relatieve belang van hormonen voor oestrogene potentie	37
4.4.3 Integratie chemische en biologische resultaten	38
5. Conclusies en aanbevelingen	41
Literatuur	43
Bijlage 1 Overzicht preconcentrerings technieken	47

## Samenvatting

Dit rapport bevat resultaten van een onderzoek naar het voorkomen van stoffen met oestrogene potentie in Nederlands oppervlakte- en afvalwater. Een belangrijk deel van het onderzoek betrof het opzetten en valideren van biologische technieken (*in vitro* bioassays) voor het meten van oestrogene potentie in extracten van oppervlaktewater en afvalwater.

Geconcludeerd wordt dat in principe alle onderzochte bioassays (ER-bindingsassay, YES, E-screen en ER-CALUX) gebruikt kunnen worden voor het bepalen van oestrogene potentie in veldmonsters. Echter op basis van criteria zoals gevoeligheid en selectiviteit lijken ER-bindingsassay en ER-CALUX het meest geschikt voor vervolgonderzoek en routinematige monitoring van de situatie in het veld.

Daarnaast is een begin gemaakt met de inventarisatie van oppervlakte- en afvalwater op het voorkomen van stoffen met oestrogene potentie. Deze bleek bij een aantal oppervlakte wateren gering te zijn (equivalent aan 0 - 2.7 ng/l 17 $\beta$ -oestradiol). Echter, in de meeste van de onderzochte influenten en effluenten van RWZI's werden hogere oestrogene potenties gemeten. In de RWZI's vindt wel een aanzienlijke (factor 10 tot 20) reductie van oestrogene potentie plaats, hetgeen resulteert in lagere gehalten in effluent (equivalent aan 0-1500 ng/l 17 $\beta$ -oestradiol) dan in influent.

Het is waarschijnlijk dat de natuurlijke oestrogenen (17 $\beta$ -oestradiol, oestron) en 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol uit de anticonceptiepil in belangrijke mate voor de oestrogene potentie verantwoordelijk zijn. De gemeten oestrogene potentie in influent en effluent kan echter niet geheel worden verklaard door de gemeten gehalten natuurlijke hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenolen. Nader onderzoek naar andere mogelijk verantwoordelijke componenten lijkt wenselijk en wordt aanbevolen. Een geschikte aanpak lijkt fractioneringstudies gecombineerd met *in vitro* bioassays en chemische analyses.

Daarnaast wordt aanbevolen om verder onderzoek te doen naar de temporele en spatiële verschillen in het voorkomen van oestrogene potentie en naar de afbraak en/of persistentie van oestrogene stoffen in het milieu. Deze laatste gegevens zijn mede noodzakelijk voor een goede risicoschatting.

Tevens wordt aanbevolen om monitoring van oestrogene potentie voort te zetten en zelfs uit te breiden. Het onderzoek zou zich daarbij moeten richten op het opsporen van zogenaamde hotspots en risicogebieden. In het huidige onderzoek is niet specifiek gekeken naar hotspots.

Tenslotte wordt aanbevolen om onderzoek te doen naar de relatie tussen aanwezigheid van oestrogene potentie in het milieu en een werkelijk actueel risico voor aquatische ecosystemen, zodat oestrogene potentie, gemeten met *in vitro* bioassays, beter kan worden geïnterpreteerd in het licht van risicobeoordeling.

## 1. Inleiding

### 1.1 Algemene probleemstelling

Wereldwijd bestaat veel belangstelling voor de problematiek van chemicaliën met oestrogene werking, de zogenaamde xeno-oestrogenen, en andere hormoonhuishouding verstorende stoffen (*hormoonontregelende stoffen, endocrine disrupters*). Studies in de UK en VS bij in het wild levende vissen, reptielen en zoogdieren, allen toppredatoren van aquatische ecosystemen, tonen voor een toenemend aantal soorten effecten op de voortplanting aan die mogelijk geassocieerd zijn met blootstelling aan xeno-oestrogenen. In de UK, bijvoorbeeld, werden bij in het wild levende populaties van de blankvoorn (*Rutilus rutilus*) in riviersystemen waarop afvalwater werd geloosd zeer hoge incidenties intersexualiteit vastgesteld (Jobling *et al.*, 1998). Ook in Nederland zijn er duidelijke aanwijzingen dat xeno-oestrogenen op aquatische ecosystemen inwerken. Voorbeelden zijn de in het verleden waargenomen afname van de vruchtbaarheid, en mogelijk ook de verminderde immuunsysteemfunctie, bij zeehonden in de Waddenzee en het verminderde broedsucces van verschillende soorten visetende vogels (Reijnders, 1996; Murk, 1997). Tevens zijn in Nederland bij bepaalde vispopulaties in sterk verontreinigde gebieden relatief hoge concentraties van het vrouwelijke dooierewit vitellogenine in het bloed van mannelijke dieren gevonden, hetgeen wijst op blootstelling aan xeno-oestrogenen vanuit het milieu (RIKZ, ongepubliceerde gegevens). Of deze oestrogene effecten ook nadelige gevolgen hebben voor het voortplantingssucces en de populatieomvang van de vissen is nog niet duidelijk (Gezondheidsraad, 1999). De dalende spermaproductie en -kwaliteit en toenemende incidentie van bepaalde carcinomen bij de mens tenslotte wordt vaak eveneens in relatie gebracht met blootstelling aan xeno-oestrogenen, hoewel een oorzakelijk verband nog niet is aangetoond (Gezondheidsraad, 1997).

Nieuw in deze problematiek is dat het hierbij niet (alleen) om de meer klassieke organochloorverbindingen gaat, maar om een nieuwe heterogene groep niet chloorbevattende verbindingen met als enige gezamenlijke kenmerk hun oestrogene werking in organismen. De natuurlijke oestrogene (vrouwelijke) geslachtshormonen, waaronder  $17\beta$ -oestradiol en oestron, worden in alle gewervelde dieren geproduceerd en spelen een primaire rol in de ontwikkeling en functie van voortplantingsorganen en voortplantingsgedrag. Een aantal industriële chemicaliën kunnen deze hormonen imiteren en hebben daardoor eveneens een oestrogene werking. Voorbeelden van deze stoffen zijn de bekende organochloorverbindingen zoals PCB's, dioxines en pesticiden, maar ook minder bekende verbindingen zoals bisfenol-A, ftalaten en alkylfenolen waaronder nonylfenol (zie ook Gezondheidsraad, 1999).

Naast de aandacht voor de oestrogenen van industriële oorsprong, blijken ook natuurlijke oestrogene hormonen op onverwachte plaatsen voor effecten te kunnen zorgen. Studies in de UK hebben vastgesteld dat bijna alle effluënten van rioolwaterzuiverings-

inrichtingen (rwzi's) in dit land oestrogeen zijn voor vis (Purdom *et al.*, 1994; Sumpter and Jobling, 1995) en dat gekooide mannelijke regenboogforellen *Oncorhynchus mykiss* in deze effluënten het (vrouwelijke) dooierewit vitellogenine aanmaken. Hoewel in eerste instantie alkylfenolderivaten als bron werden geïdentificeerd (Jobling *et al.*, 1996), is later, met behulp van effluentfractionering en oestrogeniteit-identificatie (oestrogeniteit-gestuurde fractionering), vastgesteld dat de oestrogene potentie van de watermonsters mede kan worden verklaard door de aanwezigheid van natuurlijke oestrogenen (17 $\beta$ -oestradiol en oestron) en in mindere mate van synthetische oestrogenen afkomstig van de anticonceptiepil (17 $\alpha$ -ethynyl-oestradiol) (Desbrow *et al.*, 1997).

Een complicerende factor in de studie naar oestrogenen en xeno-oestrogenen is dat dit een heterogene groep van verbindingen betreft met uiteenlopende structuren en fysisch-chemische eigenschappen. Bovendien zijn er meerdere aangrijpingspunten voor verstoring van de hormoonhuishouding mogelijk en kunnen zeer kleine hoeveelheden (ppb, ppt) van oestrogeen-actieve stoffen effecten op de voortplanting en ontwikkeling hebben, terwijl de uiteindelijke gevolgen zich zeer geleidelijk of pas op latere termijn op populatie- of ecosysteemniveau zullen manifesteren. Hierdoor is het lastig onderzoek naar het voorkomen van xeno-oestrogenen te doen.

Een belangrijk hulpmiddel bij het screenen van (xeno-)oestrogene stoffen en van oestrogene potentie in het ecosysteem vormen *in vitro* bioassays. Het gemeenschappelijke kenmerk van deze assays is dat zij een meetbare (biologische) respons geven op een stof met oestrogene werking. Er is inmiddels een aantal goed gedefinieerde, betrouwbare bioassays voor oestrogene werking ontwikkeld. In deze rapportage worden de resultaten beschreven van een eerste oriënterende studie naar de bruikbaarheid van deze assays voor de detectie van oestrogene potentie in afvalwater. Daarnaast is, in samenwerking met Rijkswaterstaat, in een oriënterende studie het voorkomen van oestrogene potentie in oppervlaktewater en afvalwater in Nederland in kaart gebracht. Tenslotte is getracht de verantwoordelijke componenten van oestrogene potentie in milieumatrices in Nederland te identificeren.

## **1.2 Mogelijkheden van *in vitro* bioassays voor oestrogene werking**

Voor de bepaling van oestrogene potentie in milieumonsters kunnen verschillende methodes worden gebruikt, namelijk chemische analyse van bekende componenten of bepaling van oestrogene potentie met behulp van *in vitro* bioassays.

Bij chemische analyses wordt in een milieumonster de concentratie bepaald van een of meerdere stoffen waarvoor de analyse wordt uitgevoerd. Indien gewenst kan deze gemeten concentratie worden "vertaald" naar de (biologisch effectieve) oestrogene potentie van de verbinding in het milieumonster. Hiervoor is informatie over de relatieve oestrogene potentie van de verbinding noodzakelijk die kan worden bepaald met behulp van een bioassay. Chemische analyses hebben echter een aantal beperkingen. De belangrijkste daarvan is dat onbekende stoffen met oestrogene potentie in chemische analyses niet worden opgemerkt, terwijl ze desondanks wel bijdragen aan de totale oestrogene potentie in een milieumonster. Evenzo is het mogelijk dat concentraties van een aantal indivi-



duale oestrogenen ieder onder de drempelwaarde blijft waarbeneden geen oestrogene effecten optreden, terwijl de som van deze verbindingen wel de drempelwaarde overschrijdt en oestrogene potentie veroorzaakt. Bovendien is het op dit moment nog lang niet mogelijk te voorspellen van welke componenten de effecten bij elkaar optellen (additief zijn) of elkaar zelfs kunnen versterken (synergistisch zijn).

De oestrogene potentie in het milieumonster kan ook worden bepaald met behulp van een of meerdere *in vitro* bioassays. Het voordeel van deze methode is dat de totale oestrogene gemeten wordt, terwijl ook de kosten minder zijn dan bij chemische analyses van individuele componenten. Het nadeel is dat eventueel storende componenten in de milieumonsters de respons in de bioassays kunnen beïnvloeden (zowel positief als negatief). Dit is echter met controles te ondervangen. Omdat de respons in een bioassay het resultaat kan zijn van de bijdragen van verschillende in het milieumonster aanwezige stoffen, bestaat ook hier weer de mogelijkheid van additiviteit en synergisme. Daarmee wordt echter een reëel beeld van de oestrogene potentie in een bepaald milieumonster verkregen zoals die ook door organismen in het betreffende milieu kan worden gevonden.

### **1.3 Doel van dit onderzoek**

Het doel van het in deze studie uitgevoerde onderzoek was het ontwikkelen en uittesten van een aantal assays voor oestrogene potentie in aquatische monsters en een eerste inventarisatie van aard en omvang van oestrogene stoffen in enkele rwzi's en Nederlandse oppervlaktewateren. In detail waren de specifieke doelen van deze pilot-studie:

- Vaststellen van de mogelijkheden en gevoeligheden van *in vitro* bioassays voor het detecteren van oestrogene stoffen in het aquatische milieu;
- Implementeren en uittesten van deze bioassays voor het meten van oestrogene potentie in effluent van rwzi's en enkele Nederlandse wateren. Hierbij is tevens aandacht besteed aan de techniek van voorconcentreren van het monster;
- Verkrijgen van een eerste indruk van de aanwezigheid van oestrogene potentie in Nederlandse watersystemen en afvalwater met de ER-bindingsassay. Dit onderdeel van het onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Rijkswaterstaat (Oriënterend Onderzoek Oestrogene Stoffen, Belfroid *et al.*, 1999a), waarbij door een consortium van onderzoeksinstituten op een aanzienlijk aantal locaties het voorkomen van de oestrogene stoffen bisfenol-A, ftalaten, alkylfenolen en natuurlijke hormonen is vastgesteld, alsmede de oestrogene potentie gemeten met drie assays, waaronder de YES en ER-bindingsassay;
- Verkrijgen van inzicht in de vraag welke verbindingen verantwoordelijk zijn voor de oestrogene potentie in Nederlands afvalwater en oppervlaktewater;
- Evaluatie van de bruikbaarheid van *in vitro* bioassays voor detectie van oestrogene potentie in afvalwater.

## 1.4 Opbouw van dit rapport

Het onderzoek in dit rapport valt uiteen in drie deelstudies, namelijk een laboratoriumstudie, twee veldstudies en een fractioneringstudie.

De laboratoriumstudie is uitgevoerd met drie *in vitro* bioassays: de YES-assay door het laboratorium van het Instituut voor Milieuvraagstukken (IVM) en de ER-bindingsassay en E-screen door het laboratorium van de sectie Moleculaire Toxicologie van de Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (MT-LACDR), beiden op de VU.

Veldstudie 1 is uitgevoerd met de YES-assay die op dat moment als enige operationeel was. Veldstudie 2 is door de VU-laboratoria alleen uitgevoerd met de ER-bindingsassay, omdat de YES assay niet stabiel was en de E-screen nog niet voldoende gevalideerd. Dit veldonderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Rijkswaterstaat (project Oriënterend Onderzoek Oestrogene Stoffen 1997-1998), waarbij door een consortium van onderzoeksinstituten op een aanzienlijk aantal locaties het voorkomen van de oestrogene stoffen bisfenol-A, ftalaten, alkylfenolen en natuurlijke hormonen is vastgesteld, alsmede de oestrogene potentie gemeten met drie assays, waaronder de ER-bindingsassay. De twee andere assays in dit veldonderzoek, de YES-assay en ER-CALUX, zijn in opdracht van Rijkswaterstaat uitgevoerd door de LUW (Vakgroep Toxicologie). Deze YES-assay en ER-CALUX resultaten vormen dus geen onderdeel van het onderhavige onderzoek dat IVM en MT-LACDR in opdracht van STOWA hebben uitgevoerd. Wel zullen beide assays daar waar dit nuttig is in de discussie van dit rapport worden betrokken. De resultaten van het gehele Rijkswaterstaat onderzoek "Oriënterende Onderzoek Oestrogene Stoffen 1997-1998" zijn terug te vinden in de rapportage van Belfroid *et al* (1999a).

De fractioneringstudie tenslotte is grotendeels op de VU uitgevoerd. De verschillende fracties zijn gemaakt door het IVM laboratorium en gemeten met de E-screen door MT-LACDR. De metingen van de fracties zijn in opdracht van IVM in de vorm van een uitbesteding tevens met de ER-CALUX uitgevoerd door de vakgroep Toxicologie van de LUW. Hoewel de ER-CALUX tot nu toe geen onderdeel van dit STOWA onderzoek heeft uitgemaakt is er toch voor gekozen deze assay in dit laatste deelonderzoek mee te nemen, omdat de ER-CALUX bewezen geschikt is voor metingen van oestrogene potentie in afvalwater (Belfroid *et al*, 1999a) en dat op deze wijze een vergelijking tussen E-screen en ER-CALUX mogelijk wordt. De ER-bindingsassay is in deze benadering niet meegenomen, omdat onvoldoende materiaal aanwezig was. De YES assay is afgevallen vanwege technische problemen nader beschreven in deze rapportage.

## 1.5 Het *in vitro* assay concept

In de literatuur is een aantal *in vitro* bioassays beschreven voor het screenen van milieumatrices op oestrogene potentie (Reed *et al.*, 1996).

### Binding aan de receptor

De eerste stap van oestrogene werking is binding van de stof aan de oestrogeenreceptor in het cytosol van de cel. Deze binding wordt gemeten in de *ER-bindingsassay* (Swartz

and Skafar, 1993). Deze assay geeft uitsluitend informatie over het binden van stoffen aan een uit cellen geïsoleerde oestrogeen receptor, en niet over de activatie of remming van de receptor. Zowel actieve (xeno-)oestrogenen als anti-oestrogenen geven een respons.

Een voordeel van de ER-bindingsassay is dat in principe alle aanwezige (xeno-)oestrogenen ongehinderd de receptor kunnen bereiken omdat ze geen celwand hoeven te passeren. Mede om deze reden is de ER-bindingsassay geselecteerd voor dit onderzoek. Andere overwegingen waren dat deze assay in principe ongevoelig is voor toxiciteit van stoffen in milieumonsters en dat de ER-bindingsassay ook een respons geeft bij anti-oestrogene stoffen. Stoffen met anti-oestrogene potentie (antagonisten) kunnen op een zelfde manier aan de oestrogeen receptor binden als stoffen met oestrogene potentie maar induceren géén biologisch effect. De ER-bindingsassay is in staat in een dergelijke complexe situatie een juiste indicatie te geven voor het totaal van stoffen dat aan de oestrogeen receptor bindt. De ER-bindingsassay geeft echter geen indicatie van de totale oestrogene potentie van deze stoffen tezamen.

### Inductie van biologische werking

De tweede stap van oestrogene werking bestaat eruit dat het complex van (xeno-)oestrogeen-receptor naar de celkern wordt getransporteerd, waar het biologische activiteit induceert. Deze biologische activiteit kan worden gemeten. Van dit type functionele testen bestaan meerdere varianten. Voor dit onderzoek is gekozen voor YES-assay en de E-screen, omdat deze testen tot de meest gevoelige technieken behoren om oestrogene potentie vast te stellen (Toppari *et al.*, 1996) en omdat ze door de US-EPA worden aanbevolen (Reeler *et al.*, 1996). Daarnaast is een klein deel van het onderzoek (Fase III: fractioneringstudie) tevens uitgevoerd met de functionele test ER-CALUX. Hieronder worden de testen nader toegelicht.

In de *YES-assay* (Routledge and Sumpter 1996) wordt gebruik gemaakt van een gistcel waarin een humane oestrogene receptor geïntroduceerd is (de gistcel heeft deze zelf niet) tezamen met een plasmide met de ERE ('estrogen responsive element') en een reporter gen (in dit geval het LacZ gen dat codeert voor  $\beta$ -galactosidase). De activatie van de ER-receptor leidt tot toenemende productie van het enzym  $\beta$ -galactosidase, dat middels een kleurreactie zichtbaar wordt gemaakt. Hiermee wordt een maat verkregen voor de daadwerkelijke agonistische (stimulerende) werking van de (xeno-)oestrogenen. Doordat de gistcel een relatief moeilijk permeabele membraan heeft passeren grotere moleculen en lipofiele moleculen de celmembraan niet of nauwelijks. In het geval dat deze verbindingen in het milieu-extract aanwezig zijn zullen ze geen respons geven in de YES-assay. Het gevolg is een onderschatting van de oestrogene potentie. In de YES-assay blijken stoffen met anti-oestrogene werking (antagonisten) geen respons te geven. Dit hangt waarschijnlijk samen met het beperkte stukje DNA dat in de cellen is ingebracht of met de beperkte doorlaatbaarheid van de celmembraan. Hierdoor zullen anti-oestrogenen geen rol spelen in de YES-respons.

De *E-screen* is gebaseerd op de oestrogeen-afhankelijke groeistimulans (cel proliferatie) van MCF7 borstkanker cellen, waarbij het aantal cellen na celproliferatie wordt gemeten (Soto, 1995). Het aantal cellen is een maat voor de oestrogene potentie van het aangeboden milieuextract. Het hele proces van celmembraanpassage, binding aan de receptor tot en met de activatie van de genen vormt onderdeel van de keten. Voor zover bekend kunnen zowel hydrofiele als lipofiele stoffen de celwand passeren. Dit betekent dat alle stoffen die in een extract aan de cellen worden aangeboden in principe de celwand ook daadwerkelijk kunnen passeren. De assay is gevoelig voor agonisten en antagonist. De respons is dus een resultante van zowel oestrogene en anti-oestrogene potentie.

Vanwege praktische voordelen is tenslotte tevens de *ER-CALUX* ('chemical activated luciferase gene expression' assay) meegenomen in de laatste fase III (fractioneringstudie) van dit onderzoek. De ER-CALUX assay (Legler *et al.*, 1999) wordt uitgevoerd in de humane borstkanker T47D cellijn waarin van nature de oestrogeen receptor aanwezig is. In de celkern is stabiel een reporter gen met daarvoor 3 herhalingen van de ERE (Estrogen Responsive Element) ingebracht. Activatie resulteert in de productie van luciferase, waarvan de hoeveelheid een maat is voor de oestrogene potentie van het aangeboden milieuextract. Ook bij deze assay wordt de gehele keten gemeten. Evenals bij de *E-screen* is de assay voor agonisten en antagonist gevoelig. De respons is dus een resultante van zowel oestrogene en anti-oestrogene potentie. De ER-CALUX assay gebruikt een humane borstkanker cellijn die in grote lijnen identiek is aan de *E-screen*, doch de eindparameter is niet cel proliferatie maar inductie van het enzym luciferase. In de vergelijking tussen *E-screen* en ER-CALUX wordt van stoffen en monsters dus een vergelijkbare respons verwacht.

In onderstaande tabel 1.1 worden nog kort de belangrijkste verschillen tussen de assays en het effect van de verschillende componenten weergegeven.

Tabel 1.1 Kenmerken van de vier in deze studie toegepaste in vitro bioassays.

<i>In vitro</i> bioassay	Type membraan	Type test	Oestrogenen	Anti-oestrogenen
ER-bindingsassay	geen	receptor bindingsstudie	+	+
YES assay	gistcelwand	functionele test	+	respons afwezig
<i>E-screen</i>	humane celmembraan	functionele test	+	-
ER-CALUX	humane celmembraan	functionele test	+	-

+ is positieve respons, - is negatieve respons of te wel remming.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.1 Laboratoriumstudies

Op de VU-laboratoria zijn drie bioassays voor oestrogene potentie geïmplementeerd en geoptimaliseerd: de ER-bindingsassay, de gistassay YES en de E-screen. Van een groot aantal bekende of verdachte xeno-oestrogene verbindingen is de oestrogene potentie met deze bioassays vastgesteld. Voor de stofselectie is gebruik gemaakt van de wetenschappelijke literatuur op dit gebied en overlegd met experts. Doel van dit deel van het onderzoek was om een indruk te krijgen in de mogelijkheden van de assays (gevoeligheid, selectiviteit, herhaalbaarheid) en de relatieve potentie van de stoffen ten opzichte van de natuurlijke oestrogene hormoon  $17\beta$ -oestradiol (benchmarkverbinding).

#### 2.1.1 ER-bindingsassay

De ER-bindingsassay is een competitieve verdringingsassay, waarmee de binding van zowel oestrogene als anti-oestrogene potentie aan de ER wordt gemeten. Beide soorten stoffen geven een vergelijkbare respons, zodat het uiteindelijke resultaat een maat is voor de som van oestrogenen en anti-oestrogenen in het monster.

De methode is als volgt: uterus cytosol, waarin zich de ER bevindt, is gedurende 3 uur bij  $4^{\circ}\text{C}$  geïncubeerd met oplopende concentraties xeno-oestrogeen opgelost in DMSO en met een vaste concentratie radioactief [ $^3\text{H}$ ]-oestradiol in Tris-EDTA buffer. Na afloop van de reactie werd de hoeveelheid radioactiviteit gemeten die niet receptor gebonden is. Het % ongebonden radioactief gelabeld oestradiol is vervolgens grafisch uitgezet tegen de gebruikte concentraties xeno-oestrogeen. Uit de gefitte curve kan vervolgens de  $\text{IC}_{50}$  worden berekend (concentratie van de verbinding die resulteert in 50% verdringing van [ $^3\text{H}$ ]-oestradiol van de oestrogeen receptor).

In 1997 werd de bindingsassay uitgevoerd met oestrogeen receptoren afkomstig van ratenuterus cytosol. In het kader van het verminderen van het proefdiergebruik is in 1998 onderzocht of de ER-bindingsassay ook kan worden uitgevoerd met cytosol afkomstig van kalfsuterussen. Kalfsuterussen zijn gemakkelijk verkrijgbaar bij het slachthuis en zijn een bijproduct van de slacht. Door een andere manier van opwerken werd een preparaat verkregen dat een hoge specifieke binding vertoonde waardoor de assay reproduceerbare resultaten opleverde. Alle assays zijn in duplo uitgevoerd.

#### 2.1.2 YES-assay

In de gist-assay (YES-assay) zal een (xeno)-oestrogene stof die de celwand kan passeren binden aan de aanwezige humane oestrogeen receptor, deze activeren, waarna het complex aan de ERE bindt. Omdat deze op een plasmide zit met het LacZ reporter gen zal als gevolg hiervan  $\beta$ -galactosidase worden gesynthetiseerd en uitgescheiden in het groeimedium van de gist. In dit groeimedium bevindt zich ook het gele substraat CPRG

wat onder invloed van  $\beta$ -galactosidase rood kleurt en gemeten kan worden bij 540 nm. Deze roodkleuring is een maat voor de hoeveelheid (xeno-)oestrogenen aanwezig in het monster, met uitzondering van grotere moleculen en vrij lipofiele moleculen die niet of nauwelijks de celmembraan passeren. In de YES-assay kan geen antagonisme optreden.

De gistcellen voor de YES assay zijn afkomstig van de groep van Sumpter van de Brunel University, Uxbridge, UK en werden opgeslagen bij  $-80^{\circ}\text{C}$ . Voor het verkrijgen van een gistculture werden gistcellen in een groeimedium gebracht en bij  $30^{\circ}\text{C}$  langzaam geschud tot een YES-gistcelsuspensie van circa 1 AU bij 640 nm. Van deze suspensie werd 200  $\mu\text{l}$  steriel gepipetteerd in een 96-wells plaat. In het medium is het gele substraat (chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside, CPRG) aanwezig dat onder invloed van eventueel gevormd  $\beta$ -galactosidase (de reporter) rood kleurt. Van ieder substraat of milieumonster werd in triplo 4  $\mu\text{l}$  toegevoegd aan een well. Na goed schudden is de plaat 2 dagen geïncubeerd bij  $30^{\circ}\text{C}$  waarbij iedere dag 5 minuten wordt geschud op een plaat-schudder. Na 2 dagen wordt de  $\text{OD}_{540}$  (optische dichtheid bij 540 nm) gemeten voor de kleur en de  $\text{OD}_{640}$  voor de gistcelgroei. De hoeveelheid gemeten licht wordt geïnterpoleerd in de ijklijn van oestradiol, waarna de hoeveelheid oestradiol-equivalenten kan worden afgelezen.

Met de geoptimaliseerde YES is een reeks van benchmark- en individuele stoffen getest. De stoffen zijn meestal in de zuivere vorm zoals deze worden verkocht getest, met uitzondering van PAK-metabolieten (zie hierna). Het testen bestaat over het algemeen eerst uit een range finding studie waarbij de verbinding bij 3 concentraties wordt getest. Een positieve uitslag van de range finding wordt gevolgd door de definitieve test waarbij de verbinding in een reeks van 8-10 concentraties wordt getest. Doordat de testrange vaak niet helemaal de juiste concentraties bevat, is het meestal noodzakelijk gebleken de YES een aantal keren te herhalen voordat een betrouwbaar resultaat wordt verkregen. Alle testen zijn in triplo uitgevoerd.

De YES assay is in 1997 geïmplementeerd in het IVM laboratorium. In het eerste jaar van het onderzoek werden goede resultaten behaald (zie hoofdstuk 3), doch in 1998 bleek de gemeten  $\text{EC}_{50}$  en de inductie niet stabiel en duidelijk afwijkend van de stabiele waarde in 1997. Uiteindelijk bleek deze instabiliteit terug te voeren te zijn op de kwaliteit van de gist en de gebruikte oplossingen. Door deze problemen is de YES-assay binnen het kader van het STOWA-project alleen toegepast bij de laboratoriumstudies en veldstudie 1.

### Testen van PAK-metabolieten

In een recentelijk verschenen review (Santodonato 1997) werd beschreven dat een aantal PAK-metabolieten oestrogene potentie hebben. Deze veronderstelling is getest met behulp van gal-extracten van vissen die met steeds een bepaalde PAK zijn ingespoten (Ariese, 1997). In de vis vormen zich vervolgens de metabolieten, die zich als glucuroniden in de gal concentreren. In deze studie is gekozen om de oestrogene potentie van de gal te meten als maat voor de oestrogene potentie van PAK-metabolieten, wat veel goedkoper is dan het meten van de gesynthetiseerde individuele PAK-metabolieten. De

galextracten zijn gemaakt door het RIKZ ten behoeve van een project waarbij verschillende analytische methoden voor PAK-metabolieten met elkaar zijn vergeleken. Het materiaal is tevens voor het onderzoek hier gebruikt. Individuele botten (*Platichys flesus*) geïnjecteerd met 1 µg van een individuele PAK en na 2 dagen zijn de botten opgeofferd en is met een injectienaald gal verzameld en ingevroren. De geglucuronideerde PAK-metabolieten zijn gedeglucuronideerd met β-glucuronidase (20 µl gal + 20 µl enzym van *Helix pomatia* + 60 µl water overnacht bij 37°C). Het enzym β-glucuronidase werd geïnactiveerd door het gal-enzym-water monster 10 minuten te verhitten bij 100°C. Bekend is dat dit niet resulteert in verlies van PAK metabolieten (Stroomberg, persoonlijke mededeling). Na verhitting werd het volume aangevuld tot 100 µl en verdund met 100 µl DMSO. Dit werd volgens standaard procedure toegepast in de YES.

### 2.1.3 E-screen (MCF-7 celproliferatie assay)

De humane tumorcel MCF-7 bevat van nature een oestrogeen receptor. Activatie van deze receptor leidt tot groei van de MCF-7 cellen. Hiervoor zijn echter nog andere factoren nodig welke aanwezig zijn in foetaal kalfserum of humaan serum dat aan het kweekmedium wordt toegevoegd. Na vijf dagen wordt het medium verwijderd, en de cellen worden blootgesteld aan de kleurstof sulforodamine B. Na wegwassen van de overmaat aan kleurstof wordt de resterende kleurstof in de cellen bepaald door de absorptie te meten m.b.v. een microplate reader bij 595 nm. De hoeveelheid kleurstof is een maat voor de hoeveelheid cellen en dus een maat voor de celgroei. De assay werd in het kader van dit STOWA project gemodificeerd zodat nu getest kan worden in 96 wells platen (in plaats van 12 wells platen) wat een grote besparing oplevert van materiaal, arbeid en tijd.

De E-screen werd opgezet met een goed groeiende MCF-7 cellijn (afkomstig van de afdeling pathologie, AZL, Leiden; origineel van de American Type Culture Collection). Ingevroren cellen (bewaard bij -195°C) worden ontdooid en toegevoegd aan kweekmedium (DMEM met 5% foetaal kalfserum; 4 mM L-glutamine; penicilline en streptomycine). De cellen worden vervolgens overgebracht in een kweekfles van 20 ml en gedurende 24 uur geïncubeerd bij 37°C. De cellen worden vervolgens d.m.v. een trypsine behandeling losgemaakt en in een 96 wells plaat overgebracht (2000 cellen per well). Na 24 uur aanhechten wordt het kweekmedium vervangen door medium zonder oestrogenen (DMEM met 5% humaan serum, ontdaan van oestrogenen en andere hormonen; 4 mM L-glutamine; penicilline en streptomycine) en de cellen worden 72 uur geïncubeerd bij 37°C. Testverbindingen (opgelost in DMSO of ethanol; maximaal 2 µl per well) worden toegevoegd in verschillende concentraties en er wordt 5 dagen geïncubeerd bij 37°C. Iedere concentratie wordt getest in duplo, op twee verschillende platen. Aan het eind van de incubatie periode worden de cellen gefixeerd in 10% trichloorazijnzuur oplossing bij 4°C. De cellen worden gekleurd met een 0,4 % sulforodamine B oplossing in 1% azijnzuur. Na wassen met 1% azijnzuur en drogen wordt een 10mM Tris buffer toegevoegd (pH 10,5) en wordt na 20 minuten de absorptie gemeten bij 595 nm. De gemeten absorptie is een maat voor de hoeveelheid gebonden kleurstof en daarmee ook een maat voor de hoeveelheid cellen. De absorptiewaarden worden ingevoerd in een ijklijn van

oestradiol en de hoeveelheid oestradiol-equivalenten worden afgelezen. Range finding wordt gedaan zoals beschreven bij de YES assay.

## **2.2 Veldstudies**

### **2.2.1 Preconcentrerings van monsters**

Ten behoeve van de bioassays is het noodzakelijk het effluent van de rwzi eerst te concentreren. Hiertoe zijn verschillende benaderingen mogelijk. Een overzicht van de methodes afkomstig uit de literatuur die worden ingezet voor zeer verschillende assays en metingen is gegeven in Bijlage 1. Bij de uiteindelijke keus van de meest geschikte preconcentreringsmethode zijn, naast efficiëntie, bewerkelijkheid en kosten tevens het type bioassay waarvoor de preconcentrerings wordt uitgevoerd van belang.

Uiteindelijk is uit praktische overwegingen gekozen voor de preconcentreringsmethode die ook is gebruikt in de analysemethode voor hormonen en die voor deze verbindingen goed is gevalideerd (Belfroid *et al.*, 1999b). De monsters worden na aankomst in het laboratorium gefiltreerd over een gecombineerde 0.45µm en 1.2 µm glasfilter en vervolgens geëxtraheerd met een SDB-XC disk. De disks worden geëluëerd met methanol, het extract wordt ingedampt en vervolgens opgenomen in DMSO. Per 1.5 liter oppervlaktewater en per 1 liter influent of effluent wordt steeds 1 extractiedisk gebruikt. Van de monsters met een groter volume worden de extracten die zijn opgenomen op meer dan 1 disk later samengevoegd. De zwevend stof monsters worden geëxtraheerd met een accelerated solvent extractor (ASE) met een mengsel van dichloormethaan en aceton (1/1). Na indampen worden deze monsters eveneens opgenomen in DMSO.

### **2.2.2 Veldstudie 1: Oestrogene potentie in rwzi-Amsterdam-Oost met YES**

Van de rwzi-Amsterdam Oost zijn influent, water uit de actief slibtank en effluent betrokken en getest op oestrogene potentie. Van elke matrix is 500 ml voorgefilterd (0.45 µm) en gepreconcentreerd zoals hierboven beschreven. De monsters zijn tevens gezuiverd over een silica-kolom (1,5% gedeactiveerd, elutie met hexaan/aceton 65/35), een procedure die bij de latere monsters achterwege is gelaten. Het experiment is in enkelvoud uitgevoerd. Er zijn geen blanco's meegenomen.

### **2.2.3 Veldstudie 2: Oestrogene potentie in Nederland met ER-bindingassay**

#### **Selectie locaties**

Bij de selectie van locaties voor de veldstudie is aangesloten bij de pilot-studie "Oriënterend Onderzoek oestrogene Stoffen" van Rijkswaterstaat. In dit onderzoek werd oppervlaktewater van 11 locaties en afvalwater afkomstig van 8 locaties onderzocht op het voorkomen van oestrogenen stoffen en oestrogenen potentie. Een gedetailleerde be-



schrijving van dit onderzoek is gegeven door Belfroid *et al.* (1999a). In het hierna volgende wordt kort ingegaan op de geselecteerde locaties.

De meetlocaties voor het afvalwater zijn zodanig geselecteerd dat deze een zo goed mogelijke afspiegeling geven van de afvalwaterstromen in de Nederlandse situatie. Er is doelbewust niet gekozen voor afvalwaterstromen waarvan op basis van de samenstelling of diverse activiteiten een hoge oestrogene potentie mag worden verwacht.

Het huishoudelijk afvalwater is afkomstig van de woonwijk Oostermeente te Steenwijk en wordt zonder bijmenging met regenwater afgevoerd via een gescheiden rioolstelsel. Naast rioolwater zijn ook monsters genomen van het rioolslib. De volgende drie communale rwzi's zijn geselecteerd: rwzi Eindhoven, rwzi Kralingseveer en rwzi A'dam-Westpoort (huishoudelijk). Voor industrieel afvalwater zijn twee afvalwaterzuiveringsinstallaties (awzi's) en twee persleidingen van industrieterreinen in beschouwing genomen. De lay-outs, kentallen en de zuiveringsrendementen alsmede de gebruikte acroniemen van de geselecteerde rwzi's staan eveneens in tabel 2.1.

Tabel 2.1. Karakteristieken van de meetlocaties voor afvalwater (uit Belfroid *et al* 1999a).

Locatie	Acroniem	Type riolering	Type rwzi	Ontwerp belasting (i.e.)	Gem. belasting (%)	Aandeel huishoudelijk (%)
woonwijk Oostermeente	OOST	gescheiden	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	100
rwzi Eindhoven	EIND	gemengd	aeratie tank	557.000	74	69
rwzi Kralingseveer	KRAL	gemengd	carrousel	301.500	97	79
rwzi A'dam-Westpoort (huishoudelijk)	WEST	gescheiden	aeratie tank	390.000	80	95
awzi A	AWZI A	gemengd	aeratie tank	72.000	95	<5
awzi B	AWZI B	gemengd	aeratie tank	1.000.000	80	<5
industrieterrein C	IND C	gemengd	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	
industrieterrein D	IND D	gemengd	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	

De oppervlaktewater-locaties Lobith en Eijsden zijn gekozen op grond van het feit dat ze de belangrijkste grensoverschrijdende punten in respectievelijk de Rijn en de Maas zijn. Stroomopwaarts van deze twee punten bevinden zich het Ruhrgebied (D) en de dichtbevolkte en sterk geïndustrialiseerde stad Luik en omgeving (B). De locaties Maassluis en Haringvlietsluizen zijn gelegen nabij de belangrijkste mondingen van Rijn en Maas. De gehalten die op deze meetpunten worden gemeten geven aan wat ervan uit de Nieuwe Waterweg (verlengde van Rijn), en het Haringvliet (vervolg van Rijn en Maas) de Noordzee instroomt.

### Monsterbehandeling

De monsters zijn genomen in glazen flessen door Tauw in september/oktober 1997 (3 liter) en in december 1997 (1 liter). De flessen werden zo snel mogelijk gekoeld getransporteerd naar het IVM, alwaar de preconcentrering plaats vond. In de afvalwaterextrac-

ten van de september/oktober serie is tevens  $\beta$ -glucuronidase toegevoegd. Met dit enzym worden hormoonglucuronides, de vorm waarin hormonen door mens en dier worden uitgescheiden, teruggevormd in het oorspronkelijke hormoon. Door hetzelfde extract onbehandeld en behandeld met  $\beta$ -glucuronidase in de bioassays te testen, wordt een indruk verkregen van de hoeveelheid hormonen die als glucuronides aanwezig is. Bij de pre-concentrerende en deglucuroniderende voor de assays is gebruik gemaakt van dezelfde techniek die wordt toegepast bij de chemische bepaling van hormonen in influent en effluent (Belfroid *et al.*, 1999a,b). De zwevend stof monsters zijn geëxtraheerd met een accelerated solvent extractor met een mengsel van dichloormethaan en aceton. Na indampen zijn deze monsters eveneens opgenomen in DMSO.

In totaal zijn op twee tot drie tijdstippen 8 monsters ongezuiverd afvalwater/influenten van rwzi's en awzi's, 5 monsters biologisch gezuiverd effluent, 4 monsters zwevend stof en 4 monsters oppervlaktewater getest met de ER bindingsassay. Hiertoe worden een aantal verdunningen van het monster getest in de assay. Op basis hiervan en de  $17\beta$ -oestradiol verdringingscurve (referentie) kan vervolgens het aantal oestrogenen equivalenten (EEQ) in het oorspronkelijke milieumonster worden berekend. Op deze wijze wordt een eventueel probleem van de verschillende vorm (hellinghoek) van de dosis-effect curven omzeild. Het resultaat is uitgedrukt in pmol/l wat een maat is voor totale hoeveelheid aan de ER gebonden stoffen, en in ng/l oestradiol equivalenten, zodat direct een vergelijking met de resultaten van de chemische analyses van  $17\beta$ -oestradiol mogelijk is.

## **2.3 Fractioneringsstudie**

### **2.3.1 Principe van proef opzet**

In de laatste fase van het praktische onderzoek is aandacht besteed aan de identificatie van oestrogene stoffen die verantwoordelijk zijn voor de gemeten oestrogene potentie in afvalwater. De globale lay-out van deze studie is de volgende: Een influent en een effluentmonster zijn geconcentreerd volgens standaardprocedure (zie 2.2), het influentmonster en de bijbehorende blanco zijn voorafgaand aan de fractionering gezuiverd over een combinatie van C18 en NH<sub>2</sub> kolommen die tevens worden gebruikt bij de chemische analyse van hormonen en bisfenol-A (Belfroid *et al.*, 1999b). De monsters zijn vervolgens gefractioneerd met behulp van HPLC eveneens volgens de methode van Belfroid *et al.* (1999b). De volgende 5 fracties zijn opgevangen: Fractie 1 is 0-3.50 minuten, fractie 2 is 3.51-4.50 minuten (bisfenol-A fractie), fractie 3 is 4.51 tot 8.00 minuten, fractie 4 is 8.01 tot 12.50 minuten (hormonen fractie) en fractie 5 is 12.51 tot 15 minuten. Daarnaast zijn ook van een ongefractioneerd influent en effluent extracten gemaakt.

De oestrogene potentie in de verschillende fracties is gemeten met de E-screen en voor de ER-CALUX (Legler *et al.*, 1999) omdat beide assays als zeer gevoelig bekend staan en relatief weinig materiaal nodig hebben. Naast de bioassays is in de fracties tevens het gehalte van de natuurlijke hormonen ( $17\beta$ -oestradiol,  $17\alpha$ -oestradiol, oestron en  $17\alpha$ -ethinyloestradiol) en bisfenol-A bepaald volgens Belfroid *et al.* (1999b), wat mogelijk

## *Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays*

was doordat de gekozen techniek van voorbehandeling en fractionering identiek was aan die van de chemische analyse. Op basis van deze analyseresultaten en de EEF's uit de laboratoriumstudie is getracht de oestrogene potentie in rwzi's te verklaren en verantwoordelijke componenten te identificeren.

De influent- en effluentmonsters waren afkomstig van rwzi Amsterdam Westpoort (huishoudelijk) en zijn genomen op 21 september 1998. De ER-CALUX bepalingen zijn uitgevoerd in november 1998 (de fracties 4 zijn gemeten in juni 1999, omdat de eerste meting resulteerde in getallen die buiten het lineaire bereik lagen), de E-screen bepalingen zijn uitgevoerd in februari 1999. In totaal is 1 influent en 1 effluent gefractioneerd. Daarnaast zijn op identieke wijze blanco's gemaakt en gemeten, om later gehalten en oestrogene potentie te kunnen corrigeren. Een overzicht van de gemaakte monsters, fracties en blanco's is gegeven in tabel 2.2.

*Tabel 2.2 Overzicht monsters, fracties, en blanco's t.b.v. de fractioneringstudie.*

Code	Soort	Volume (ml)	Beschrijving	Opmerking*
1-1a	effluent	118		
1-1b	effluent	44	duplo van 1-1a	
2-1	blanco	165	hoort bij 1-1a en b	
10-1a	blanco	88	hoort bij 1-1a en b	
10-1b	blanco	45	hoort bij 1-1a en b	
1-1d	effluent	190	5 fracties	
10-1d	blanco	160	5 fracties, hoort bij 1-1d	
5-1c1	influent	83,7		
6-1	blanco	460	hoort bij 5-1c1	
5-1c3	influent	63,9	5 fracties	gezuiverd
6-2	blanco	238	5 fracties, hoort bij 5-1c3	gezuiverd

- De stappen in de procedure van het maken van extracten zijn: filtratie, extractie, eventueel zuivering over C18/NH<sub>2</sub> kolom en fractionering met HPLC. Bij elke stap bestaat gevaar voor achtergrondcontaminatie. Daarom heeft elk monster zijn eigen specifieke blanco.

## 3. Resultaten

### 3.1 Laboratoriumstudies

#### 3.1.1 ER-bindingsassay

Een overzicht van verbindingen die zijn getest met de ER-bindingsassay is weergegeven in tabel 3.2. Vrijwel alle stoffen hebben een hogere IC50 dan 17 $\beta$ -oestradiol, wat betekent dat ze een lagere oestrogene potentie hebben. Alleen ethinyloestradiol, met een vergelijkbare oestrogene potentie als 17 $\beta$ -oestradiol, heeft een vergelijkbare lage IC50 als 17 $\beta$ -oestradiol. Zoals verwacht heeft 17 $\alpha$ -oestradiol een hogere IC50 dan 17 $\beta$ -oestradiol. Verder bezitten de fyto-oestrogeen genistein en de industriële verbindingen nonylphenol en bisfenol A een redelijke affiniteit, overeenkomstig met hun matige oestrogene potentie. Bijna geen verdringing werd gezien bij DEHP, overeenkomstig de negatieve resultaten van deze verbinding in de YES assay (zie 3.1.2).

Een reeks van ftalaten, pesticiden en PAK's waren niet actief. Dit is in overeenstemming met literatuurwaarden en met resultaten uit de YES. Uit recente experimenten uitgevoerd door de sectie MT-LACDR van de VU is gebleken dat b.v. benz[ $\alpha$ ]anthraceen na metabole omzetting door cytochroom P450 enzymen afkomstig uit rattenlever wél in staat is 17 $\beta$ -oestradiol van de ER te verdringen. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de vorming van gehydroxyleerde metabolieten die een hogere affiniteit tot de ER hebben dan benz(a)anthraceen zelf.

Tamoxifen, een verbinding met een hoge affiniteit tot de oestrogeen receptor en die geen oestrogene potentie heeft maar juist een sterke anti-oestrogene potentie, heeft zoals verwacht eveneens een lage IC50. Ook andere stoffen met een anti-oestrogene werking (Toremifen en Cyclofenil) gaven een positief resultaat in de bindingsassay. Hierbij moet opgemerkt worden dat met Cyclofenil geen volledige verdringing werd verkregen, waarschijnlijk omdat het niet in staat is aan alle oestrogene bindingsplaatsen te binden, of omdat het de binding van oestradiol versterkt. De IC50 waarden gemeten met rat uterus en kalfsuterus geven vergelijkbare waarden.

#### 3.1.2 YES-assay

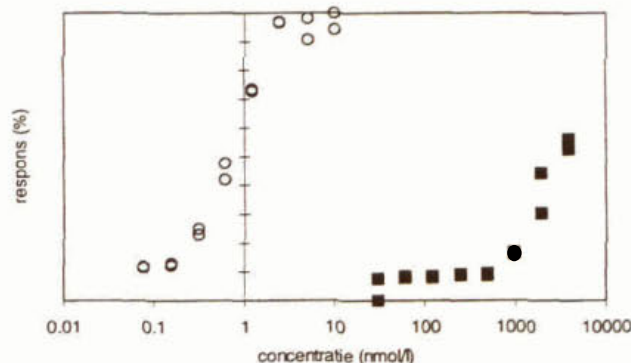
De gevoeligheid (EC50) voor 17 $\beta$ -oestradiol die in 1997 werd gehaald met de YES is niet zo gevoelig als die van Routledge and Sumpter (1996) van wie de gistcellen afkomstig zijn. Daarentegen bleek de inductiefactor hoger dan die van Sumpter (zie tabel 3.1). In 1998 waren de gemeten EC50 en de inductie niet stabiel en duidelijk afwijkend van de zeer stabiele waarde in 1997 (zie eveneens tabel 3.1). Uiteindelijk bleek deze instabiliteit terug te voeren te zijn op de kwaliteit van de gist en de gebruikte oplossingen. Gebleken is dat de YES-assay bijzonder gevoelig is voor oudere oplossingen, hoewel ogenschijnlijk aan deze oplossingen niets mankeert. Bij de laatste serie gemeten in oktober

1998 zijn de problemen onder controle gekomen, echter helaas is in deze serie de ijklijn niet compleet, waardoor de EC50 slechts globaal kan worden aangegeven. Desalniettemin komt de curve overeen met die bepaald in 1997.

Tabel 3.1 Variabiliteit in de ijklijn met de in vitro YES-assay.

Datum	Aantal replica's	EC50 (nmol/l)	Inductie-factor	Maximale respons	Interpretatie
1997	36	1.14 ± 0.52	15	ca 1.0	reproduceerbaar
maart 1998	4	25 ± 15	5	ca 0.6	gevoeligheid lijkt veranderd
mei 1998	1	69	2	ca 0.05	geen inductie
juni 1998	2	7 ± 6	5	ca 0.2	weinig inductie
september 1998	2		8	ca 0.8	alle monsters geïnduceerd
oktober 1998	4	ca 2	6	ca 0.6	inductie niet volledig, curve vrijwel identiek met 1997
Routledge and Sumpter (1996)		0.08	5	ca 1.8	

Een voorbeeld van een curve die wordt verkregen met 17 $\beta$ -oestradiol in de YES assay is weergegeven in figuur 3.1. In deze figuur is tevens de inductie van nonylfenol opgenomen. Een overzicht van verbindingen die zijn getest met de YES-assay is weergegeven in tabel 3.2. Hieruit blijkt dat vrijwel alle verbindingen minder tot veel minder oestrogeen potent zijn dan 17 $\beta$ -oestradiol. Alleen 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol is even potent als 17 $\beta$ -oestradiol. Het natuurlijke oestrogeen oestron is 3 tot 16 keer minder potent (gemiddeld 9.4 keer). Opmerkelijk is dat het afbraakproduct 17 $\beta$ -oestradiol-glucuronide licht oestrogeen potent lijkt te zijn. De potentie ligt een factor 25 lager dan van 17 $\beta$ -oestradiol zelf. Mogelijk is 17 $\beta$ -oestradiol-glucuronide voor enkele procenten verontreinigd met 17 $\beta$ -oestradiol. Dit kon echter niet bevestigd worden met dunne laag chromatografie, waarmee de eventuele aanwezigheid van 17 $\beta$ -oestradiol in de oestradiol-glucuronide oplossing werd uitgesloten (detectiegrens < 0.5%). Een andere mogelijkheid is dat gedurende de tijd dat de assay loopt (2 dagen), 17 $\beta$ -oestradiol wordt gevormd. Het is echter niet uit te sluiten dat de glucuronidevorm toch ook potent is.



Figuur 3.1 Respons van 17 $\beta$ -oestradiol (open rondjes) en nonylfenol (gesloten vierkantjes) in YES assay. Beide stoffen zijn hier in duplo getest. De curve van nonylfenol kon niet verder worden afgemaakt doordat cytotoxiciteit optrad bij hogere concentraties.

Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays

Tabel 3.2 Oestrogene potentie van een aantal geselecteerd stoffen in de ER-bindingsassay (uitgedrukt in de IC50 in nM) en de YES-assay en E-screen (uitgedrukt in de EC50 in nM).

stof	ER-bindingsassay		YES-assay	E-screen
	rat	kalf		
<i>hormonen</i>				
17 $\beta$ -oestradiol	3.6 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.7	1.14 $\pm$ 0.52	0.028 $\pm$ 0.008
17 $\alpha$ -oestradiol		26	>11	1.46
oestradiol-glucuronide			26	
17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (pil)	3.0		1.4	
oestron			3.4 en 18	
<i>fyto-oestrogenen en aanverwante verbindingen.</i>				
$\beta$ -sitosterol			>6.4	
genistein	3200	740	35.000 en 60.000	29
biochanine a			>70.000 <sup>3</sup>	55
formononetine			7.500	55
daidzeine		4200	39.000	230
coumestrol			<2.000	
<i>stoffen in plastic</i>				
nonylphenol	2370	66300	ca. 2000 <sup>3</sup>	440
octylphenol			niet potent bij 48.000	
bisfenol-A	2300	5020	ca 100.000 minder potent <sup>2</sup>	4.7
DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate)		>100.000	niet potent bij 6.5 <sup>4</sup>	
dimethylftalaat (DMP)		niet potent	niet potent bij 4.2E5	
dimethylisofthalaat		niet potent		
di-n-butylftalaat (DBP)		>1E7	niet potent bij 1.9E8	
di-iso-butylftalaat		>1E7		
ftaalzuur		>5E6		
<i>pesticiden</i>				
dieldrin		niet potent		
atrazine + transform.prod.			niet potent bij 5.6E5	
o,p'DDT			280.000 <sup>2</sup>	
p,p'DDT		>1E6	niet potent bij 7.8E5	
malathion			niet potent bij 7.900	
hexachloorbenzeen			niet potent bij 7E5	
<i>androgenen</i>				
tributyltin (TBT)			niet potent bij 1E4	
trifenyln (TPT)			niet potent bij 1E4	
<i>diverse</i>				
PAK's en PAK metabolieten		>1E6	niet potent	
<i>anti-oestrogenen</i>				
tamoxifen	36	127		toxisch
toremifen		72		
cyclofenil		86		

<sup>1</sup> De EC50 van oestradiol was in 1997 stabiel met een zeer kleine standaarddeviatie. In 1998 daarentegen ontstond veel variatie in de EC50. Alle YES data zijn gebaseerd op resultaten uit 1997, tenzij anders aangegeven. Elke verbinding is in duplo of triplo bepaald Zie verder tekst

<sup>2</sup> Deze data zijn gebaseerd op de laatste meetserie in oktober en zijn derhalve minder betrouwbaar

<sup>3</sup> Verbinding beïnvloedt gistgroei of veroorzaakt lysis waardoor inductiecurve niet volledig was

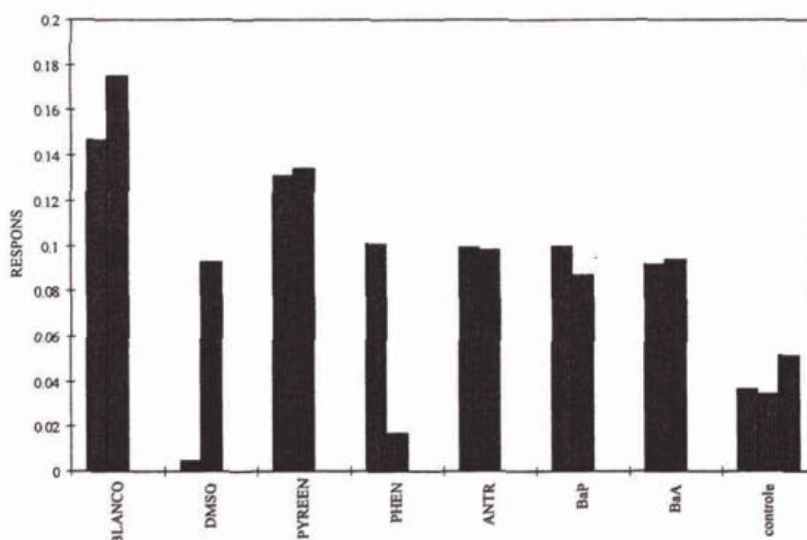
<sup>4</sup> maximale oplosbaarheid bereikt

De geteste fyto-oestrogenen lijken allen oestrogeen potent, hoewel in veel mindere mate dan de natuurlijke oestrogene hormonen. De gist-inductiecurve voor biochanine A en daidzeine is niet compleet, doordat bij de hogere concentraties remming van de gistgroei optrad, waardoor de inductie terugliep. Bovendien lijken deze stoffen niet stabiel. In dezelfde serie werd  $\beta$ -sitosterol bepaald, die minder potent lijkt dan de overige fyto-oestrogenen. De gebruikte blootstellingsconcentratie van  $\beta$ -sitosterol lagen echter veel lager, zodat een goede vergelijking niet mogelijk is. Coumestrol is in 1998 meegenomen, en is potent bij 2  $\mu\text{mol/l}$ , lagere gehalten zijn echter niet getest. De potentie kon door problemen met de ijklijn niet exact worden vastgesteld maar ligt bij benadering rond de 300 tot 500 minder potent dan 17 $\beta$ -oestradiol.

De EC<sub>50</sub> van nonylfenol ligt rond de 2000 nmol/l, waarmee deze stof een factor 2000 minder potent is dan 17 $\beta$ -oestradiol (zie ook figuur 3.1). Bij hogere gehalten treedt sterfte van de gistcellen op (lysis). Dit verschijnsel is ook door andere groepen waargenomen en wordt beschreven in de literatuur (Routledge and Sumpter 1996). Een aantal andere stoffen blijken niet potent in de YES. Het gaat hierbij om ftalaten, een aantal pesticiden en de androgenen TBT en TPT. Van de laatste groep verbindingen werd geen oestrogene potentie verwacht, omdat bekend is dat deze androgene stoffen niet via het receptormechanisme werken. Voor de overige stoffen kan niet worden uitgesloten dat zij wel degelijk oestrogeen potent zijn, maar pas na bioactivering in het lichaam van organismen. Dit wordt in een *in vitro* bioassay niet opgemerkt omdat de benodigde metabole activiteit in dit systeem ontbreekt.

Op basis van de resultaten van de oktober serie in 1998 tenslotte bleek dat octylphenol niet oestrogeen potent is bij gehalten onder 10 mg/l (48.000 nM), DBP niet bij gehalten onder de 40 g/l (1.9 E8 nM), DMP niet onder de 83 mg/l (4.2 E5 nM) en p,p'-DDT niet onder de 280 mg/l (7.8 E5 nM). De EC<sub>50</sub> van o,p'-DDT en van bisfenol-A liggen rond respectievelijk 280.000nM en 100 nM, waarmee deze stoffen een factor 280.000 en 100.000 minder potent zijn. De exacte EC<sub>50</sub> kan echter niet worden bepaald, doordat niet volledige inductie is verkregen.

De PAK-metaboliëten in deze studie blijken geen noemenswaardige oestrogene potentie te hebben vergeleken bij de blanco's (figuur 3.2). Het betreft hier de PAK-metaboliëten 1-hydroxypyreen in de met pyreen geïnjecteerde vissen en trans-7,8-dihydrodiol-, 1-hydroxy- en 3-hydroxy-benzo[a]pyreen in de benzo[a]pyreen geïnjecteerde vissen (Oudhoff 1997). In de vissen geïnjecteerd met fenantreen, anthraceen en benzo[a]anthraceen werden geen metaboliëten in de gal aangetroffen, wat overigens niet wil zeggen dat deze niet gevormd zijn (Oudhoff 1997). Op basis van de resultaten uit de YES-assay kan derhalve geconcludeerd worden dat de metaboliëten van pyreen en benzo[a]pyreen niet oestrogeen potent zijn, terwijl er geen duidelijkheid bestaat over de metaboliëten van de PAK's fenantreen, antraceen en benzo[a]anthraceen.



*Figuur 3.2 Respons (OD<sub>540</sub>) van YES-assay op PAK metabolieten gevormd in de gal na injectie van PAK's in mannelijke bot (Platichys flesus). Voor toelichting zie tekst. Blanco is niet geïnjecteerde vis, DMSO is vis geïnfecteerd met DMSO, PHEN is fenanthreen, ANTR is antraceen, BaP is benzo[a]pyreen, BaA is benzo[a]antraceen en controle is onbehandelde gist. De volgende PAK-metabolieten zijn aangetoond: 1-hydroxypyreen in de met pyreen geïnjecteerde vissen en trans-7,8-dihydrodiol-, 1-hydroxy- en 3-hydroxy-benzo[a]pyreen in de met BaP geïnjecteerde vissen.*

### 3.1.3 MCF-7 celproliferatie assay (E-screen)

De resultaten van de gemodificeerde E-screen laten zien dat de assay zeer gevoelig is (EC<sub>50</sub> voor 17 $\beta$ -oestradiol 0.028 nM). Ook de andere geteste verbindingen geven een lage EC<sub>50</sub>. Dit betekent dat relatief kleine hoeveelheden materiaal nodig zijn om een betrouwbare meetwaarde voor milieumonsters te verkrijgen met de E-screen. De E-screen kent echter wel een flinke variabiliteit. Dit geldt met name voor de inductiefactor (verhoging van respons t.o.v. blanco). Normaal ligt deze tussen de 3 - 5, soms echter is deze veel kleiner (1 - 2). Dit lijkt veroorzaakt te worden door het (noodzakelijk) gebruik van humaan serum. Binnen een periode van een week kan de inductiefactor sterk variëren als een nieuwe batch serum wordt gebruikt. Alhoewel dit serum steeds commercieel werd verkregen, blijkt dit nog geen garantie te zijn voor een constant resultaat. In de praktijk betekent dit dat vóór elke test éérst het beschikbare serum moet worden gecontroleerd.

### 3.1.4 Vaststellen relatieve oestrogene potentie

Op basis van de resultaten in deze studie zijn oestrogene equivalentie factoren (Estrogen Equivalence Factors, EEF) voor alle geteste stoffen bepaald. Deze zijn samengevat in tabel 3.3. Uitgangswaarde is 17 $\beta$ -oestradiol die in alle assays per definitie is vastgesteld



op 1. Uit dit overzicht blijkt dat de meest potente oestrogene stoffen in de groep van natuurlijke hormonen zitten. Fyto-oestrogenen, nonylfenol en bisfenol-A zijn ook nog tamelijk potent, terwijl andere chemische verbindingen veel minder potent zijn dan 17 $\beta$ -oestradiol. Omdat deze laatste twee groepen verbindingen echter in veel grotere concentraties voorkomen in het milieu (Belfroid *et al* 1999a) kan op basis van deze tabel geen conclusie worden getrokken over het risico van de verschillende verbindingen.

Tabel 3.3 *Relatieve oestrogene potentie, uitgedrukt in EEF, voor de gemeten xeno-oestrogene stoffen in de ER-bindingsassay, YES-assay en E-screen.*

verbinding	EEF ER-bindingsassay	EEF YES	EEF E-screen
17 $\beta$ -oestradiol	1	1	1
17 $\alpha$ -oestradiol	0.11		0.02
17 $\alpha$ -ethinyloestradiol	0.8	1.2	
oestron		0.1	
17 $\beta$ -oestradiol-glucuronide		0.04	
genistein	0.001	2.4E-5	
biochanine A		1.6E-5	
formononetine		1.5E-4	
daidzeine		2.9E-5	
coumestrol		>5.7E-4	
nonylfenol (NP)	1.5E-3 / 4.3E-5	5.7E-4	6.4E-5
octylfenol (OP)		<2E-5	
bisfenol-A	0.58 - 1.57E-3	ca 1 E-5	6E-3
dimethylftalaat (DMP)	0	<2E-6	
di-n-butylftalaat (DBP)	<3E-7	<5E-9	
DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate)	< 3 E-5	0	
<i>o,p'</i> DDT		4E-6	
<i>p,p'</i> DDT	0	<1.3E-6	
tamoxifen	0.02 - 0.1		
toremifen	0.04		
cyclofenil	0.03		

## 3.2 Veldstudies

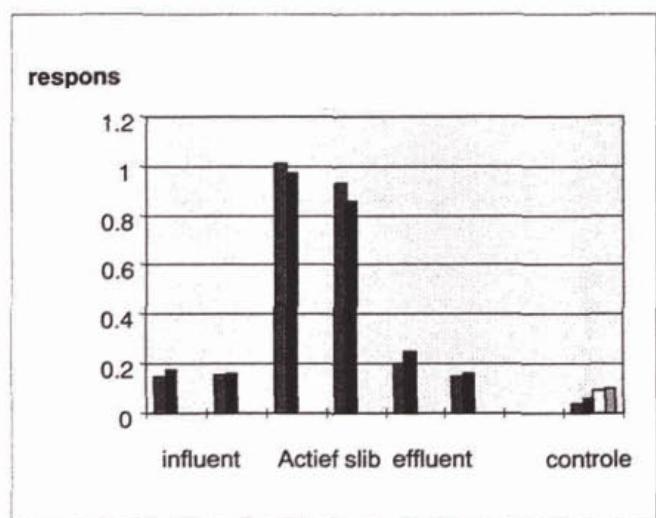
### 3.2.1 Preconcentrerings.

Een overzicht van in de literatuur gepubliceerde preconcentrerings technieken die zijn ingezet bij zeer verschillende assays en metingen is gegeven in Bijlage 1. Bij de uiteindelijke keus van de meest geschikte preconcentreringsmethode zijn, naast efficiëntie, bewerkelijkheid en kosten tevens het type bioassay waarvoor de preconcentrerings wordt uitgevoerd van belang. Uiteindelijk is voor de vergelijkbaarheid gekozen om voor de preconcentrerings voor de bioassays gebruik te maken van dezelfde techniek die wordt toegepast bij de chemische bepaling van oestrogene hormonen in influent en effluent. De achterliggende idee hierbij was dat de methode van voorconcentreren van het monster die geschikt is voor de chemische analyse van hormonen, in ieder geval resulteert in de

aanwezigheid van deze zeer potent oestrogene stoffen in het extract. Omdat de methode tevens gebruikt wordt voor de analyse van bisfenol-A zal deze xeno-oestrogene stof eveneens in het extract aanwezig zijn. Tenslotte is verondersteld dat de meeste xeno-oestrogene stoffen in hun fysisch-chemische gedrag lijken op hormonen en/of bisfenol-A en dus eveneens met deze techniek uit het watermonster worden geëxtraheerd. De uiteindelijke methode is beschreven in 2.2.1.

### 3.2.2 Veldstudie 1

Van de rwzi-Amsterdam Oost zijn influent, het water (gefilterd over  $0.45\mu\text{m}$ ) uit de potent slib bassin en effluent geconcentreerd en vervolgens gezuiverd over silica. Figuur 3.3 laat de oestrogene potentie gemeten met YES in deze watermonsters zien. Uit deze zeer voorlopige eerste screening blijkt dat zowel in influent als effluent weinig oestrogene potentie aanwezig is. In de fractie potent slib daarentegen was wel oestrogene potentie aanwezig, namelijk 9 keer hoger dan de controle. De oestradiol equivalenten die corresponderen met deze respons zijn respectievelijk 0.08, 1.5 en 0.13 ng EEQ/l. Deze lage activiteit houdt wellicht verband met verlies van verbindingen tijdens de zuiveringsstap over silica (zie 4.3).



*Figuur 3.3 Respons (OD540) gemeten met YES in drie gefilterde afvalwatermonsters van een rwzi.*

### 3.2.3 Veldstudie 2

In het kader van het project voor het RIZA zijn een aantal rwzi-afvalwatermonsters getest m.b.v. de ER-bindingsassay. De resultaten zijn samengevat in tabel 3.4. Uit de resultaten blijkt dat de oestrogene potentie in afvalwater hoger is dan in oppervlaktewater. Voor het gefiltreerde stedelijke rioolwater en influent ligt de oestrogene potentie in de orde van grootte van kleiner dan de detectielimiet tot 5300 pmol EEQ/l, wat een equivalent is van 0-1500 ng/l  $17\beta$ -oestradiol. In de rwzi's vindt een aanzienlijke reductie

plaats (factor 10 tot 20), hetgeen resulteert in lagere gehalten in effluent. De oestrogene potentie van rioolwater afkomstig van industrieterreinen ligt over het algemeen beduidend lager dan bij stedelijk afvalwater. Uit tabel 3.4 blijkt overigens ook dat behalve spatiële verschillen in oestrogene potentie tevens sprake is van aanzienlijke temporele verschillen. Uiteraard betreft het hier slechts twee momentopnames op 4 zoetwaterlocaties, 5 awzi/rwzi's en 3 rioolwaterlocaties, zodat over de werkelijke range waarin oestrogene potentie in watersystemen en rwzi's voorkomt niet met zekerheid gesteld kan worden.

*Tabel 3.4 Oestrogene potentie gemeten met ER-bindingsassay in zwevend stof, ongezuiverd afvalwater/influent en effluent van awzi/rwzi's. Getallen tussen haakjes betreffen monsters behandeld met  $\beta$ -glucuronidase.*

monsternamepunt	EEQ in pmol/l	
	augustus	november
<b>oppervlaktewater</b>		
Haringvlietsluizen	-	0.3
Maassluis	<16	5.8
Eysden	0	2.3
Lobith	0	9.4
<b>zwevend stof</b>	augustus	
Haringvlietsluizen	67	
Maassluis	302	
Eysden	0	
Lobith	-	
<b>rioolwater/influent</b>	oktober	december
rwzi Eindhoven	5270 (2100)	1110
rwzi Kralingseveer	1370 (730)	727
rwzi A'dam Westpoort.	1130 (1840)	2360
woonwijk Oostermeente	4370 (3170)	n.d.
awzi A	138 (610)	1000
awzi B	450	101
industrieterrein C	1070 (730)	802
industrieterrein D	1520	n.d.
<b>effluent</b>	oktober	december
rwzi Eindhoven	<140	230
rwzi Kralingseveer	<99 (36)	58
rwzi A'dam Westpoort.	<110	17.4
awzi A	101	116
awzi B	<100	0

Oestrogene hormonen worden in het lichaam geconjugeerd met glucuroniden en in deze inactieve vorm uitgescheiden. Dit betekent dat in het milieu mogelijk een aanzienlijk deel van de hormonen als glucuroniden aanwezig kan zijn, die mogelijkerwijs onder bepaalde omstandigheden snel teruggevormd kunnen worden tot de actieve hormonen. Deze hypothese is getest door een aantal monsters te behandelen met het enzym  $\beta$ -glucuronidase, waardoor alle glucuroniden worden teruggevormd in de oorspronkelijk actieve hormonen. Door hetzelfde extract onbehandeld en behandeld met  $\beta$ -glucuronidase te testen in bioassays, wordt een indruk verkregen van de hoeveelheid hormonen

die als glucuronides aanwezig zijn. Behandeling van het afvalwater met het enzym  $\beta$ -glucuronidase resulteerde niet in consistente verhogingen van de oestrogene potentie, m.u.v. rioolwater van de woonwijk. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat hormonen in de monsters niet als hormoonglucuroniden aanwezig zijn, maar alleen als vrije (actieve) hormonen. Dit is in overeenstemming met de resultaten van de chemische analyses, waarbij evenmin hormoonglucuroniden werden gedetecteerd (Belfroid *et al.*, 1999a, b).

### 3.3 Fractioneringsstudie

#### 3.3.1 Resultaten biologische assays

De oestrogene potentie die met de E-screen en ER-CALUX werd gemeten in de monsters van de fractioneringstudie zijn samengevat in onderstaande tabel 3.5. Uit de resultaten blijkt dat de blanco's vrijwel allen laag zijn, met uitzondering van de potentie in de blanco's na HPLC fractionering die relatief hoog zijn vergeleken bij niet-gefractioneerde blanco's. Vooral in fractie 4 werd een zeer hoge potentie in de blanco aangetroffen (zie tabel 3.6).

De resultaten tonen verder dat met de ER-CALUX gemeten oestrogene potentie in twee identieke totaal effluentmonsters behoorlijk uiteen lopen: 5.8 en 0.69. Deze waarden zetten enige vraagtekens bij ofwel de reproduceerbaarheid van de ER-CALUX test, de reproduceerbaarheid van de voorconcentrerings ofwel bij de homogeniteit van de monsters. Over het algemeen kan echter verondersteld worden dat de ER-CALUX reproduceerbaar is (variatiecoëfficiënt is 5-10%, zie tabel 4.1). De E-screen heeft hier een waarde die ligt tussen de uitersten van de ER-CALUX. Een goede verklaring voor de waargenomen spreiding in de ER-CALUX data ontbreekt.

Tabel 3.5 Oestrogene potentie in totaal influent en gefractioneerd influent (gesommeerd) en in totaal effluent en gefractioneerd effluent (gesommeerd) gemeten met E-screen en ER-CALUX.

omschrijving monster	E-screen (pmol/l)		ER-CALUX (pmol/l)	
	monster	blanco	monster	blanco
totaal influent	16	0.04	195	0.02
gefractioneerd influent <sup>1</sup>	$\Sigma$ is 49	$\Sigma$ is 2.2	$\Sigma$ is 97	$\Sigma$ is 16
excl. fractie 4	$\Sigma$ is 2.87	$\Sigma$ is 0.90	$\Sigma$ is 41	$\Sigma$ is 1.21
totaal effluent	1.45	<0.25	0.69 en 5.81 <sup>2</sup>	0.08, 0.08, 0.16
gefractioneerd effluent	$\Sigma$ is 18	$\Sigma$ is 3.3	$\Sigma$ is 17	$\Sigma$ is 7.5
excl. fractie 4	$\Sigma$ is 0.77	$\Sigma$ is 1.10	$\Sigma$ is 1.12	$\Sigma$ is 0.27

<sup>1</sup> Influent monster gezuiverd over C18/NH2 kolommen.

<sup>2</sup> Dit monster is twee maal gemaakt, en in de ER-CALUX twee maal gemeten.

De resultaten tonen dat de oestrogene potentie zoals gemeten met de E-screen en ER-CALUX hoger is in de gefractioneerde monsters van influent en effluent dan in de totaalmonsters (zie tabel 3.5). Hiervoor zijn 2 verschillende verklaringen mogelijk: 1) De

potentie in de totale influent en effluent monsters is onderschat. Gezien de spreiding in de ER-CALUX meting van het effluent is deze verklaring niet uit te sluiten. Veel waarschijnlijker is echter verklaring 2), namelijk dat tijdens het fractioneren activiteit in de monsters is gevormd afkomstig van de HPLC. De gebruikte HPLC wordt veelvuldig gebruikt voor de fractionering t.b.v. hormoonanalyses. Gewoonlijk wordt voorafgaand aan elke fractioneringserie een monster met een hoog gehalte aan de natuurlijke hormonen en bisfenol-A ingespoten om de 'windows' van de verschillende componenten te bepalen. Het is zeer waarschijnlijk dat hierdoor hormonen zijn achtergebleven in de injector, die vervolgens steeds tijdens fractie 4 elueren en zodoende zowel de fractie 4 van de blanco's als die van de monsters verontreinigen. Deze verklaring wordt onderbouwd door de data in tabel 3.6, waarin hoge activiteit in de blanco's van fractie 4 werd aangetroffen. Derhalve lijkt verontreiniging vanuit de HPLC een goede verklaring voor enerzijds de verhoogde activiteit in het gefractioneerde monster t.o.v. het ongefractioneerde monster, anderzijds van de hoge activiteit in de blanco fracties van de gefractioneerde monsters. De verklaring wordt bovendien onderbouwd met resultaten van in de chemische analyse (3.3.2).

Tabel 3.6 toont ook dat de oestrogene potentie gemeten met de E-screen en met de ER-CALUX vergelijkbaar is. Uitzondering is fractie 1 van het influent, die in de ER-CALUX resulteerde in hoge potentie (38 pM) en in de E-screen slechts een potentie van 0.76 vertoonde. Mogelijk houdt dit verband met de tijdspanne van 2 maanden die tussen de ER-CALUX en E-screen bepalingen lagen en is de potentie in fractie 1 gemeten met de ER-CALUX veroorzaakt door instabiele verbindingen.

*Tabel 3.6 Oestrogene potentie in pM in de HPLC fracties van influent en effluent zoals gemeten met E-screen en ER-CALUX.*

Type monster	fractie	E-screen monster	E-screen blanco	ER-CALUX monster	ER-CALUX blanco
effluent	1	0.136	0.726	0.593	0.049
	2	0.182	0.371	0.158	0.048
	3	0.369	0.000	0.203	0.081
	4	17.711	2.231	16.084	7.200
	5	0.083	0.000	0.164	0.088
influent <sup>1</sup>	1	0.764	0.440	38.423	0.830
	2	0.901	0.187	0.959	0.173
	3	1.005	0.000	0.938	0.145
	4	46.479	1.290	56.714	15.227
	5	0.197	0.274	0.729	0.062

<sup>1</sup> Influent monster gezuiverd over C18/NH2 kolommen.

Vanwege de verontreiniging van fractie 4 is ervoor gekozen de gemeten data voor deze fracties verder niet in beschouwing te nemen, maar te berekenen op basis van het verschil in potentie tussen het ongefractioneerde monster en het gefractioneerde monster zonder fractie 4. Verondersteld wordt dat het verschil tussen deze twee wordt veroorzaakt door potentie aanwezig in fractie 4. Hierbij worden een aantal belangrijke aannames gedaan, namelijk 1) dat tijdens het zuiveren van het influent en het fractioneren in

geen van de andere fracties oestrogene potentie is verloren of toegevoegd en 2) dat alle oestrogene potentie van het oorspronkelijke monster terecht is gekomen in een van de fracties 1 t/m 5. Deze aannames zijn niet getoetst. De berekening van de oestrogene potentie in fractie 4 is uitgewerkt in tabel 3.7.

*Tabel 3.7 Berekening van oestrogene potentie in fractie 4. Voor toelichting zie tekst.*

Code	Omschrijving monster	E-screen (pmol/l) monster	ER-CALUX (pmol/l) monster
5-1c2	Influent <sup>1</sup>	15.6	195
5-1c3	gefractioneerde influent <sup>1</sup> excl. fractie 4 verschil veroorzaakt door fractie 4	<u>1.97-</u> 13.6	<u>40-</u> 155
1-1a/b	totaal effluent	1.45	gem. 3.25
1-1d	gefractioneerde effluent excl. fractie 4 verschil veroorzaakt door fractie 4	<u>0-</u> 1.45	<u>0.85-</u> 2.40

<sup>1</sup> Influent monster gezuiverd over C18/NH2 kolommen.

In tabel 3.8 tenslotte is de relatieve bijdrage van de verschillende fracties aan de totale oestrogene potentie weergegeven. Bij deze berekening is aangenomen dat het verschil in potentie tussen het ongefractioneerde monster en het gefractioneerde monster zonder fractie 4 wordt veroorzaakt door potentie aanwezig in fractie 4. Uit deze rekenexcursie blijkt dat de hoogste oestrogene potentie wordt veroorzaakt door fractie 4, namelijk 70 tot 90 %. Daarnaast lijken ook de fracties 1 t/m 3 van belang. In alle gevallen valt op dat fractie 5 weinig bijdraagt aan de oestrogene potentie. Belangrijk is hierbij te benadrukken dat de aanname dat geen verlies of vorming van oestrogene potentie optreedt tijdens de zuivering (alleen influent) en fractionering in de fracties 1 t/m 3 en 5 niet is getoetst.

*Tabel 3.8 Relatieve potentie in de fracties 1 t/m 5 (in %) van het gefractioneerde influent en effluent monster (fractie 4 is geschat op basis van berekening zoals toegelicht in de tekst).*

Fractie	Influent Escreen	Influent ER-CALUX	Effluent E-screen	Effluent ER-CALUX
1	2	19	0	17
2	5	0	0	3
3	6	0	25	4
4	87	80	69	74
5	0	0	6	2

### 3.3.2 Resultaten chemische analyses

De resultaten van de chemische analyses (hormonen en bisfenol-A) zijn samengevat in tabel 3.9. Ook bij de chemische analyses wordt het extract gefractioneerd met de HPLC. Fractie 2 is de fractie met bisfenol-A, fractie 4 bevat de oestrogene hormonen. Voor de chemische analyse van hormonen en bisfenol-A zijn de overige fracties niet interessant en derhalve niet verder geanalyseerd.

De gehalten van de hormonen en bisfenol-A in het influent zijn hoog, met name van bisfenol-A. In effluent zijn de gehalten veel lager en liggen soms dicht bij de gehalten in het blancomonster. Overigens is het gehalte van bisfenol-A in het blancomonster hoog, waardoor het gehalte van bisfenol-A in effluent niet goed kan worden geïnterpreteerd. Onderzoek heeft bevestigd dat de HPLC verontreinigd is met zowel bisfenol-A als hormonen door het gebruik van standaardoplossingen en dat hierdoor sporen in de blanco's terecht komen. Inmiddels is dit probleem door het aanpassen van het spoelregime opgelost. Dit bevestigt de verklaring dat de oestrogene potentie in fractie 4 mogelijk is veroorzaakt door achtergrondcontaminatie. Voor bisfenol-A in fractie 2 lijkt dit probleem minder te spelen, omdat bisfenol-A veel minder oestrogeen potent is (EEF is  $1E-5$ ). Een verhoogde potentie in fractie 2 is dan ook niet waargenomen.

De verhoogde oestrogene activiteit in fractie 4 komt dus overeen met de aanwezigheid van oestrogene hormonen in deze fractie.

*Tabel 3.9 Gehalten van bisfenol-A en hormonen in ng/l in influent en effluent (overgenomen uit Belfroid et al 1998).*

Omschrijving monster	Bisfenol-A (fractie 2)	17 $\beta$ -oestradiol (fractie 4)	Oestron (fractie 4)	17 $\alpha$ -ethinyloestradiol (fractie 4)
influent (n=2)	1795	49	130	4.3
effluent (n=4)	56 $\pm$ 13	4.2 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 2.3	2.5 (n=2)
blanco (n=1)	60	1.2*	2.0*	<1.2

\* Gehalte tussen aantoonbaarheids grens en bepalingsgrens.

## 4. Discussie

### 4.1 Prestaties van de *in vitro* assays

#### 4.1.1 ER-bindingsassay.

Voordelen van de ER-bindingsassay zijn dat het een relatief veel gebruikte assay is en er daardoor een grote database bestaat met gegevens over affiniteiten van allerlei oestrogene en niet-oestrogene verbindingen in deze assay, de gemakkelijke en snelle uitvoerbaarheid (2 dagen) en reproduceerbaarheid. Dit laatste blijkt uit het feit dat over een periode van 2 jaar geen grote veranderingen in de IC50 voor 17 $\beta$ -oestradiol werden gemeten. De assay is ook zonder bezwaren discontinu uit te voeren, d.w.z. er is in tegenstelling tot de YES, ER-CALUX en E-screen geen opstartperiode nodig waarin nieuwe groeimedia moeten worden gemaakt en cellen moeten worden gekweekt. Nadelen zijn het gebruik van radiopotent materiaal ( $^3\text{H}$ -oestradiol) en de relatieve ongevoeligheid vergeleken met de YES, ER-CALUX en E-screen. Ook de gevoeligheid van de assay voor anti-oestrogene verbindingen lijkt een nadeel omdat immers bij een bepaalde respons niet duidelijk is of het hier de aanwezigheid betreft van een oestrogene verbinding of juist een anti-oestrogene verbinding. Echter, in combinatie met assays die in de standaard uitvoering alléén gevoelig zijn voor oestrogene verbinding, is een differentiatie aan te brengen. De noodzaak om ook anti-oestrogene potentie in milieumonsters te bepalen lijkt geïndiceerd omdat zulke stoffen evengoed als hormoonontregelaar kunnen werken in dieren en in de mens als oestrogene verbindingen.

#### 4.1.2 YES

Ook de gistassay wordt internationaal regelmatig gebruikt, hoewel minder dan de ER-bindingsassay. De test vereist weinig specifieke celkweekfaciliteiten, hoewel de aanwezigheid van deze wel praktisch zijn. Nadelen zijn dat de test 1 week duurt, waardoor eventuele problemen ook pas na 1 week zichtbaar worden en de bewerkelijkheid van de test, doordat steeds alle oplossingen en media nieuw gemaakt moeten worden (zie hieronder). Vergeleken met de ER-CALUX is de gevoeligheid van de assay laag, evenals de inductie die wordt bereikt. Nadeel tenslotte is dat stoffen met grote moleculen de gistwand slecht passeren. *Dit nadeel geldt overigens in meer of mindere mate voor alle in vitro assays met celwand/membraan.*

Gebleken is bovendien dat de YES-assay bijzonder gevoelig is voor oudere oplossingen of gist, hoewel ogenschijnlijk aan deze oplossingen niets mankeert. Daarnaast bleek de gist een aantal malen geïnfecteerd, en daardoor onbruikbaar. Ook andere groepen, zoals die van Prof. Guillette en Prof Sumpter, hebben regelmatig met beide problemen te maken. In het gespecialiseerde celkweeklaboratorium van de LUW zijn nog geen problemen geconstateerd, wat waarschijnlijk komt doordat daar bij elke YES-assay serie met vers-gemaakte oplossing en verse gist wordt gewerkt en doordat onder optimale omstan-



digheden wordt gewerkt. Geconcludeerd kan worden dat het discontinu draaien van deze assay (een keer wel, en dan een aantal weken niet, etc.) alleen in de praktijk werkt indien alle media en oplossingen steeds opnieuw worden gemaakt. Daar dit een aanzienlijke hoeveelheid werk is, is dit scenario nauwelijks realistisch te noemen.

#### 4.1.3 E-screen

Na adaptatie van de E-screen voor gebruik met 96 wells platen lijkt ook de E-screen bruikbaar voor routine bepalingen. Een groot nadeel blijft ook bij deze assay (net als bij de YES assay) de lange tijdsduur van de assay en het gebruik van speciale celweek faciliteiten. Ook variabiliteit die kan optreden, mogelijk als gevolg van variaties in de samenstelling van het bij de assay gebruikte humane serum, en het afnemen van de respons bij latere passages van de MCF-7 cellijn, zijn belangrijke nadelen. Hierdoor is het noodzakelijk om vóór elke assay het humane serum en de cellen te testen.

Een voordeel van de E-screen is zijn hoge gevoeligheid en de beschikbaarheid van literatuur data m.b.t. oestrogene potentie van allerlei verbindingen in de E-screen.

#### 4.1.4 Relatieve oestrogene potentie (EEF)

Voor verschillende verbindingen is oestrogene potentie waargenomen met behulp van de drie assays. In tabel 4.1 worden deze waarnemingen vergeleken met de literatuur. Ter vergelijking zijn tevens EEF's voor de ER-CALUX assay opgenomen. Over het algemeen werden vergelijkbare oestrogene potenties verkregen in verschillende assays, hoewel voor een aantal stoffen de EEF afwijkend is (nonylfenol, bisfenol-A). Ook valt op dat waarden gerapporteerd in de literatuur soms afwijkend zijn van de EEF gevonden in deze studie. Dit laatste duidt op de noodzaak om EEF waarden in meerdere onafhankelijke series vast te stellen.

Bij deze waarnemingen moet echter wel de kanttekening geplaatst worden dat oestrogene potentie ook door verontreinigingen kan worden veroorzaakt. Hoewel steeds met zo veel mogelijk zuivere verbindingen is gewerkt, kan een verontreiniging van 1% van een zeer oestrogeen-actieve stof toch een potentie veroorzaken die gemeten kan worden. *Vooraf bij de beoordeling van lage EEF's moet hiermee rekening gehouden worden. Het is zeer waarschijnlijk dat dit fenomeen in ieder geval geldt voor oestradiolglucuronide dat 98% zuiver is en een respons van 0.01 van 17 $\beta$ -oestradiol vertoonde.*

Belangrijk tenslotte is de constatering dat voor een aantal stoffen de EEF's in de verschillende assays, alsmede die gerapporteerd in de literatuur, behoorlijk kunnen variëren. Verschillen in EEF tussen de ER-bindingsassay en de overige assays kunnen mogelijk worden verklaard door de afwezigheid van een te passeren barrière zoals een celmembraan in de eerste assay. De verschillen tussen de drie overige functionele assays en vooral de verschillen van dezelfde verbindingen met dezelfde assay gemeten door verschillende laboratoria kunnen niet goed hiermee worden verklaard. Deze geconstateerde verschillen maken wel duidelijk dat het noodzakelijk is om EEF waarden in meerdere onafhankelijke series vast te stellen.

*Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays*

*Tabel 4.1 Relatieve oestrogene potentie t.o.v. 17β-oestradiol, uitgedrukt in EEF, voor een aantal (verdacht) xeno-oestrogene stoffen in de ER-bindingsassay, YES assay, E-screen en ER-CALUX assay. Waarden in italics betreffen literatuurwaarden.*

verbinding	EEF ER-bindingsassay	EEF YES	EEF E-screen	EEF ER-CALUX
17β-oestradiol	1	1	1	1
17α-oestradiol	0.11	<i>ca. 0.01<sup>a</sup></i> <i>0.05<sup>b</sup></i>	0.02	<i>0.016<sup>p</sup></i>
17α-ethinyloestradiol	0.8	1.2 <i>0.9<sup>b</sup></i>		<i>0.81<sup>p</sup></i>
oestron		0.1 <i>0.096<sup>b</sup></i>		<i>0.058<sup>p</sup></i>
17β-oestradiol-glucuronide		0.04 <i>0.0032<sup>b</sup></i>		
genistein	0.001-0.004	2.4E-5 <i>4.9E-4<sup>b</sup></i>	0.001 <i>1E-4<sup>g</sup></i> <i>8E-4<sup>h</sup></i>	<i>6E-5<sup>q</sup></i>
biochanine A		1.6E-5 <i>9.1E-5<sup>b</sup></i>	5E-4 <i>1.2E-5<sup>g</sup></i> <i>4.8E-5<sup>h</sup></i>	
formononetine		1.5E-4 <i>5.6E-5<sup>b</sup></i>	5E-4	
daidzeine	7E-4	2.9E-5 <i>1.3E-5<sup>b</sup></i>	1E-4 <i>2E-5<sup>g</sup></i> <i>7E-6<sup>h</sup></i>	
coumestrol		>5.7E-4 <i>0.0067<sup>b</sup></i>	<i>0.003<sup>g</sup></i> <i>0.001<sup>h</sup></i> <i>1E-5<sup>i</sup></i>	
nonylfenol (NP)	1.5E-3 / 4.3E-5 <i>3E-4<sup>o</sup> (forel)</i>	5.7E-4 <i>1.4E-4<sup>a</sup></i> <i>5E-5<sup>b</sup></i>	6.4E-5 <i>3E-6<sup>h</sup></i> <i>1E-4<sup>n</sup></i>	<i>2.3E-5<sup>q</sup></i>
octylfenol (OP)		<2E-5 <i>6.7E-4<sup>a</sup></i> <i>3E-5<sup>b</sup></i>		
nonylfenol ethoxylaten (NPE)	<i>1E-5 tot 3E-5<sup>e</sup></i>	<i>4E-6<sup>c</sup></i>		
octylfenol ethoxylaten (OPE)		<i>4E-6<sup>c</sup></i>		
bisfenol-A	0.58 - 1.57E-3	<i>ca 1 E-5</i> <i>ca E-3<sup>a</sup></i> <i>5E-5<sup>b</sup></i>	6E-3	<i>7.8E-6<sup>q</sup></i>
dimethylftalaat (DMP)	0	<2E-6		
di-ethylftalaat (DEP)		<i>5E-7<sup>d</sup></i>		
di-n-butylftalaat (DBP)	<3E-7	<5E-9 <i>1E-7<sup>d</sup></i> <i>0<sup>b</sup></i>		
butylbenzylftalaat (BBP)		<i>1E-6<sup>d</sup></i> <i>4E-6<sup>b</sup></i>		
DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate)	< 3 E-5	0 <i>0<sup>b</sup></i>		
di-octylftalaat (DOP)				

Tabel 4.1 Relatieve oestrogene potentie, uitgedrukt in EEF, voor een aantal (verdacht) xeno-oestrogene stoffen in de ER-bindingsassay, YES assay, E-screen en ER-CALUX assay. Waarden in *italics* betreffen literatuur waarden (vervolg).

verbinding	EEF ER-bindingsassay	EEF YES	EEF E-screen	EEF ER-CALUX
<i>o,p'</i> DDT	<i>6.8E-5<sup>f</sup></i> <i>0.001<sup>k</sup></i> <i>8.6E-4<sup>m</sup></i> <i>4E-5<sup>j</sup></i>	4E-6	<i>1E-6<sup>h</sup></i> <i>4E-4<sup>l</sup></i>	<i>9.1E-6<sup>q</sup></i>
<i>p,p'</i> DDT	0 <i>1E-4<sup>k</sup></i> <i>&lt;1.6E-4<sup>m</sup></i>	<1.3E-6	<i>1E-6<sup>h</sup></i>	
tamoxifen	0.02 - 0.1			
toremifen	0.04			
cyclofenil	0.03			

<sup>a</sup> Routledge and Sumpter, 1996; <sup>b</sup> Coldham *et al.*, 1997; <sup>c</sup> Routledge and Sumpter, 1996; <sup>d</sup> Harris *et al.*, 1997; <sup>e</sup> Müller en Kim, 1978; <sup>f</sup> Danzo, 1997; <sup>g</sup> Mayr *et al.*, 1992; <sup>h</sup> Welshons *et al.*, 1990; <sup>i</sup> Soto *et al.*, 1992; <sup>j</sup> Hammond *et al.*, 1979; <sup>k</sup> Klotz *et al.*, 1996; <sup>l</sup> vom Saal *et al.*, 1995; <sup>m</sup> Vonier *et al.*, 1996; <sup>n</sup> Villalobos *et al.*; <sup>o</sup> Sumpter & Jobling, 1995; <sup>p</sup> Murk, persoonlijke mededeling; <sup>q</sup> Legler *et al.*, 1999.

#### 4.1.5 Oestrogene potentie van mengsels

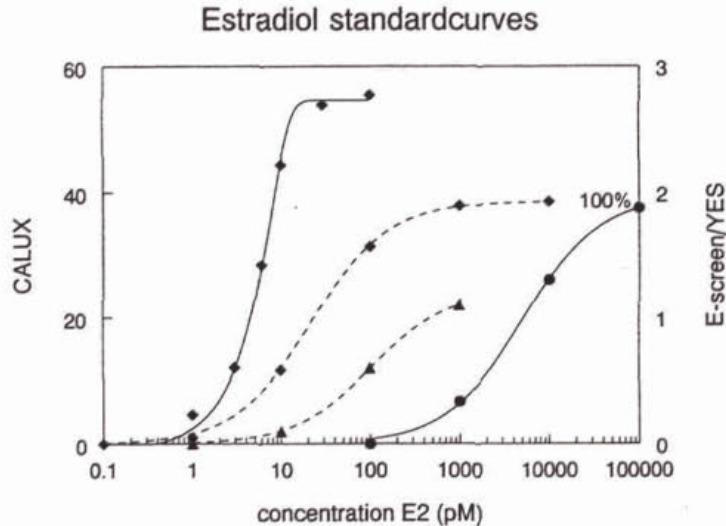
Milieuverontreinigingen worden zelden veroorzaakt door een enkelvoudige verbinding maar vrijwel altijd in mengsels. Een groot probleem bij risicoschattingen is de zogenaamde combinatietoxiciteit. De gezamenlijke werking van twee stoffen kan bestaan uit de som van werking van de twee afzonderlijke verbindingen (additie), maar ook versterking van deze werking (synergisme) of afzwakking van elkaars werking (antagonisme) komen voor.

Bij *in vitro* bioassays gebaseerd op receptormodellen is synergisme theoretisch weliswaar mogelijk, maar komt waarschijnlijk minder vaak voor dan additiviteit. Voor de aanvang van deze studie was een publicatie in Science verschenen waarin synergisme van oestrogene stoffen in de YES-assay werd beschreven (Arnold *et al.*, 1996). Inmiddels is in een aantal andere studies gebleken dat dit op een interpretatiefout van de auteurs moet berusten, daar in andere proeven geen synergisme in de YES-assay kon worden herhaald maar slechts additiviteit werd waargenomen (o.a. Gaido *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 1997). Ook is duidelijk dat in biologische systemen (vissen) wel sprake kan zijn van synergisme (Routledge *et al.*, 1998).

#### 4.2 Bruikbaarheid van de *in vitro* assays voor de veldsituatie

De ER-bindingsassay toont oestrogene potentie in milieumatrices. Vergeleken met de andere assays YES en ER-CALUX is de respons in de ER-bindingsassay over het algemeen groter (zie ook Belfroid *et al.* 1999a voor volledige dataset). Dit houdt waarschijn-

lijk verband met het feit dat zowel agonisten als antagonisten in de ER-bindingsassay op dezelfde wijze aan de respons bijdragen. Ook bevat het *in vitro* systeem van de ER-bindingsassay geen natuurlijke barrières voor stoffen in de vorm van een celwand. De ER-CALUX en YES-assay geven over het algemeen een vergelijkbare respons, vooral bij de wat sterker verontreinigde matrices waar de concentraties boven de detectielimiet van de YES -assay lagen (Belfroid *et al.*, 1999a).



Figuur 4.1 IJklijnen van  $17\beta$ -oestradiol in de ER-CALUX assay (ruiten en doorlopende lijn), E-screen (ruiten en gestippelde lijn), YES-assay (driehoeken en gestippelde lijn) en de ER-bindingsassay (cirkels en doorlopende lijn). De lijn van de bindingsassay loopt van 0 tot 100% verdringing, die van de ER-CALUX, Escreen en YES van de respons van de blanco t/m de maximale respons. Op de Y-assen staat de inductiefactor.

Figuur 4.1 geeft een gebruikelijke ijklijn voor  $17\beta$ -oestradiol in de verschillende assays. De prestatiekenmerken zijn samengevat in tabel 4.1. Op basis van de variatiecoëfficiënt CV en de inductiefactor kan worden afgeleid dat het onderscheidend vermogen voor de ER-CALUX het hoogste is, terwijl deze voor de E-screen en YES weinig verschilt. Wel is de detectielimiet van de E-screen veel lager en daarmee vergelijkbaar met de ER-CALUX (beiden 1 pM). De ER-bindingsassay heeft een detectielimiet van 1000 pM en bereikt de maximale verdringing pas bij een concentratie van 100.000 pM oestradiol. Dit lijkt vreemd omdat bij deze *in vitro* assay de toegankelijkheid van de receptor veel groter is dan bij celsystemen waar een celwand moet worden gepasseerd. De aard van het type assay, een competitieve bindingsassay waarbij het gaat om een evenwicht tussen oestradiol en de xeno-estrogenen, impliceert echter dat relatief veel oestrogene verbinding nodig is om alle oestradiol van de receptor te verdringen.

De hoeveelheid materiaal die nodig is van iedere matrix voor een ER-bindingsassay, ER-CALUX of YES assay is als gevolg van de verschillende prestatiekenmerken

eveneens verschillend, zoals weergegeven in tabel 4.2. Het meeste materiaal is nodig voor de ER-bindingsassay omdat de maximale verdringing pas bij een hoge concentratie wordt bereikt en bovendien een hele verdunningsreeks wordt gemaakt zodat ook gecorrigeerd kan worden voor specifieke binding.

*Tabel 4.1 Prestatiekarakteristieken van de gebruikte bio-assays (gemodificeerd van Belfroid et al 1999a).*

	CV (%)	Detectielimiet (pM E2)	Maximale inductie factor. (bij conc. pM)	Hoeveelheid DMSO/well (µl)
ER-bindingsassay	15-25	1000	n.v.t. (100.000)	12.5
YES	10-25	10	2-3 (1000)	4
E-screen	15-25	1	3-5 (1000)	0.2
ER-CALUX	5-10	1	80-100 (30)	0.2-0.4

*Tabel 4.2 Benodigde hoeveelheid materiaal van verschillende matrices (range van een relatief schoon monster tot een relatief verontreinigd monster) voor het bepalen van oestrogene potentie met verschillende bio-assays (uit Belfroid et al 1999b).*

	Oppervlakte wa- ter ml	Zwevendstof g	Ruw rioolwater influent/ ml	Effluent ml
ER-bindingsassay	± 950	± 1500	± 400	± 400
YES	60-250	50-400	4-100	10-100
ER-CALUX/E-screen	6-30	16-40	0.2-2.5	0.9-9

Alle assays die in dit onderzoek de revue zijn gepasseerd hebben voor- en nadelen, alleen de kosten van de assays liggen allen in dezelfde grootte orde. Een overzicht van deze voor- en nadelen is weergegeven in tabel 4.3. Op basis van dit overzicht lijken de ER-bindingsassay en ER-CALUX beiden veelbelovend voor onderzoek in de toekomst. De ER-bindingsassay heeft als voordeel dat alle verbindingen die aan de oestrogeen receptor binden worden opgemerkt, waarbij bovendien door afwezigheid van het celmembraan geen barrière gepasseerd hoeft te worden. Voordeel van de ER-CALUX is dat dit een functionele test betreft die de netto respons van oestrogenen en anti-oestrogenen met hoge gevoeligheid en hoge inductie meet. Doordat eerst een membraan gepasseerd moet worden staat dit systeem dicht bij een intacte zoogdiercel dan de andere assays. Een voordeel van de ER-bindingsassay en ER-CALUX ten opzichte van YES en E-screen is bovendien dat de eerste twee stabiel zijn.

Tenslotte is het interessant om ook nader aandacht te besteden aan de techniek van voorconcentrerend. In beide veldstudies is gebruik gemaakt van voorconcentrerend met behulp van een SDB-XC disk. Bij de eerste veldstudies is het met methanol geëluëerde extract gezuiverd over silica, terwijl dit in de grote veldstudie 2 achterwege is gelaten. Hoewel hier sprake is van verschillende monsters is duidelijk dat de absolute oestrogene potentie die met de gistassay werd gedetecteerd in de eerste serie aanmerkelijk lager ligt dan in de tweede serie. Blijkbaar gaat met het zuiveren over silica een aanzienlijk deel

### Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays

van de potentie verloren. Ook valt niet uit te sluiten dat het gekozen elutiemiddel (hexaan/acetone 65/35) niet optimaal is. Het verdient desalniettemin aanbeveling om monsters zo min mogelijk stappen te laten doorgaan, voordat zij worden gebruikt in bioassays.

Tabel 4.3 Voor- en nadelen van 4 soorten in vitro assays.

	ER-bindingsassay	YES	E-screen	ER-CALUX
internationaal geaccepteerd en veel gebruikt	ja	ja	nee	nog niet
type test	receptor bindingsstudie	functionele test	functionele test	functionele test
type membraan/ kinetische beperkingen	geen membraan, geen kinetische beperking	gistcel, mogelijk niet passabel voor alle stoffen	celmembraan, mogelijk niet passabel voor alle stoffen	celmembraan, mogelijk niet passabel voor alle stoffen
meet	som er binding van oestrogenen en anti-oestrogenen	inductie na oestrogenen	resultante inductie van oestrogenen en anti-oestrogenen	resultante inductie van oestrogenen en anti-oestrogenen
speciale celkweek faciliteiten noodzakelijk	nee	nee	ja	ja
discontinue series	mogelijk	lastig	lastig	lastig
reproduceerbaarheid	goed	matig	matig	goed
gevoeligheid	laag	gemiddeld	hoog	hoog
inductie	n.v.t.	laag	laag	hoog
hoeveelheid monsters nodig	veel	gemiddeld	weinig	weinig
gevoelig voor cytotox van monster	nee	nee	soms	soms
bioactivatie	nee	nee	gering	gering
overige nadelen	radiopotent afval			

### 4.3 Voorkomen van oestrogene potentie in watersystemen en rwzi's

Uit de resultaten in deze studie en de studie van Rijkswaterstaat (Belfroid *et al* 1999a) blijkt dat oestrogene potentie in oppervlaktewater en afvalwater voorkomt. De resultaten van de gezamenlijke studie, waarvan de resultaten van de ER-bindingsassay tevens onderdeel uitmaken van dit project, zijn samengevat in onderstaande tabel 4.4. Oestrogene potentie is het hoogste in influent (tot 5300 pmol/l wat equivalent is aan 1500 ng/l 17 $\beta$ -oestradiol). In effluent daarentegen vindt een aanzienlijke reductie in potentie plaats (potentie tot 230 pmol/l wat equivalent is aan 62 ng/l 17 $\beta$ -oestradiol). De potentie in effluent ligt daarmee tot gemiddeld een factor 10 hoger dan in oppervlaktewater (potentie tot 10 pmol/l wat equivalent is aan 2.7 ng/l 17 $\beta$ -oestradiol). Oestrogene potentie in zwevend stof uitgedrukt als pmol EEQ/g ligt in dezelfde orde als in oppervlaktewater (pmol/l), met uitzondering voor de ER-bindingsassay, waar dit veel hoger is. Zoals al eerder gesteld kan de exacte range waarin oestrogene potentie in watersystemen en rw-

zi's voorkomt niet met zekerheid gesteld worden, doordat het hier slechts twee momentopnames op 4 zoetwaterlocaties en 8 rwzi's betreft. Uit de gegevens set kan wel geconcludeerd worden dat oestrogene potentie in oppervlaktewater en afvalwater aanwezig is.

Vergeleken bij deze resultaten valt overigens op hoe weinig oestrogene potentie werd bepaald in het afvalwater van veldstudie 1, respectievelijk 0.1 en 0.2 pmol/l voor influent en effluent. Het is echter zeer waarschijnlijk dat dit is veroorzaakt door de zuiveringsstap over silica die voor dit monster is toegepast. Inmiddels is duidelijk geworden dat zuivering over silica voor hormonen resulteert in 90% verlies. Waarschijnlijk is door deze zuiveringsstap een groot deel van de oestrogene potentie verloren gegaan.

Tabel 4.4 Resultaten van de ER-bindingsassay, ER-CALUX en YES-assay (in pmol EEQ/l) in diverse matrices (uit Belfroid et al 1999a).

	ER-bindingsassay	ER-CALUX	YES-assay
<b>milieumatrices</b>			
oppervlaktewater	<d.l. - 9.4	<d.l. - 1.72	0.10 - 4
zwevend stof <sup>1</sup>	<d.l. - 302	0.26 - 2.49	<d.l. - 1.06
<b>stedelijk afvalwater</b>			
influent/rioolwater	n.d.-5270	66-441	0.5 - 317
rioolslib <sup>2</sup>	2745-20.000	26-156	<d.l.-14
effluent	<d.l.-230	4.7-20.5	1.4-29
<b>industrieel afvalwater</b>			
influent/rioolwater	<d.l.-1520	4.3-121	<d.l.-77
rioolslib <sup>2</sup>	2772-90.000	12-1850	<d.l.-120.000
effluent	<d.l.-116	0.11-59	0.35-58

<sup>1</sup> in pmol EEQ/g droge stof.

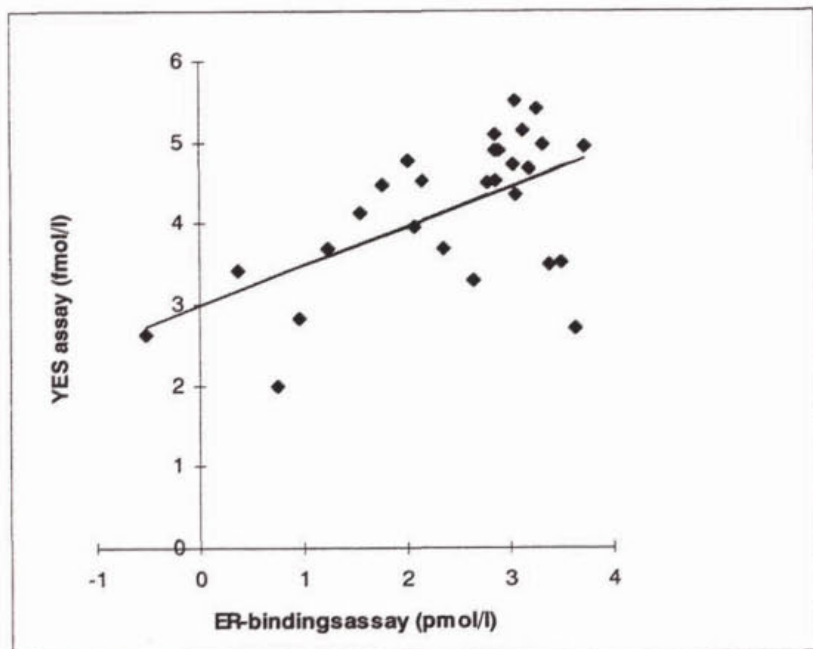
<sup>2</sup> in pmol EEQ/l; gehalte bepaald in representatieve suspensie rioolslib.

De resultaten met de ER-bindingsassay vertonen een duidelijk hogere potentie (factor 14 met uitschieters tot 8000) dan dezelfde monsters gemeten met de YES-assay en de ER-CALUX (Belfroid et al., 1999a). Dit is goed verklaarbaar omdat de ER-bindingsassay een gelijke respons geeft bij zowel oestrogenen als anti-oestrogenen. Het geconstateerde verschil lijkt echter te groot om geheel toe te schrijven aan de aanwezigheid van anti-oestrogenen. Het verschil kan mogelijk verder worden verklaard doordat de ER-bindingsassay geen celmembraan of celwand heeft in tegenstelling tot beide andere assays. Hierdoor hoeven stoffen in de ER-bindingsassay geen barrière te passeren alvorens het aangrijpingspunt van de assay wordt bereikt en kunnen alle stoffen die op de receptor aangrijpen resulteren in een respons. De YES en CALUX assay hebben deze barrière wel, waardoor mogelijk niet alle stoffen die in theorie kunnen aangrijpen op de receptor in deze assays, dit aangrijpingspunt bereiken. Het resultaat is dan dat de respons in deze twee assays lager zal zijn dan in de ER-bindingsassay.

De ER-bindingsassay resultaten vertonen een matige correlatie ( $r^2$  is 0.32,  $n=27$ ) met de resultaten verkregen in de YES assay (zie figuur 4.2). Een vergelijkbare correlatie werd gevonden met de ER-CALUX.

## Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met *in vitro* bioassays

In enkele studies in andere landen is eveneens oestrogene potentie in afvalwater geconstateerd. Desbrow *et al.*, (1998) toonde in de UK oestrogene potentie met de YES aan in fracties van effluents afkomstig van 7 rwzi's. Koistinen *et al.*, (1998) toonde oestrogene potentie met behulp van de ER-CALUX in Fins bleached kraft pulp en paper mill effluent. In Canada werd daarentegen een verwaarloosbare oestrogene potentie gemeten in 'paper mill' effluent, met uitzondering van de zogenaamde 'black liquor' afvalstroom die gehalten equivalent aan 4 ng/l EEQ bevatte (Zacharewski *et al.*, 1995).



Figuur 4.2 Correlatie tussen ER-bindingsassay en YES assay resultaten voor alle waterige monsters (influent, effluent, oppervlaktewater). ( $r^2$  is 0.32 waarbij alle resultaten van 0 of beneden de detectielimiet niet zijn meegenomen).

In oppervlaktewater is oestrogene potentie meestal gedetecteerd met behulp van de vitellogenine assay. Het dooierewit vitellogenine (VTG) wordt gewoonlijk door vrouwelijke vissen aangemaakt. Aanmaak door mannelijke vissen gebeurt wanneer deze worden blootgesteld aan (xeno-)oestrogene stoffen. Daarmee is de productie van VTG een goede en inmiddels algemeen geaccepteerde marker van oestrogene potentie (Sumpter and Jobling 1995). Op deze manier is oestrogene potentie gevonden in rivieren in zuidoost Engeland (Harries *et al* 1996, 1997), in de estuaria in Zuid Oost Engeland (Lye *et al* 1998) en in twee rivieren met relatief grote effluent inbreng van rwzi's in de USA (Folmar *et al* 1996). Op dit moment worden wereldwijd vele studies naar VTG productie bij mannelijke vissen uitgevoerd zodat naar verwachting meer data in de toekomst beschikbaar zullen komen.

Op basis van *in vitro* bioassay resultaten kan geen uitspraak gedaan worden over het type verbinding dat in het milieu deze oestrogene potentie veroorzaakt. In paragraaf 4.4



wordt ingegaan op mogelijk verantwoordelijke stoffen van deze oestrogene potentie. Evenmin kan op basis van deze bioassays een uitspraak gedaan worden over het risico dat oestrogene potentie voor het milieu en/of ecosysteem kan zijn. Op dit moment zijn geen gegevens bekend die een koppeling leggen tussen respons in een *in vitro* bioassay en de oestrogene respons in een organisme. Of een dergelijke relatie in de toekomst wel gelegd zal kunnen worden is moeilijk te zeggen, omdat de oestrogene respons in een compleet organisme door een complex aan factoren bepaald wordt, zoals bioactivatie, kinetiek in het organisme en biodegradatie. Ook is het waarschijnlijk dat verschillende oestrogene stoffen zich in een compleet organisme verschillend zullen gedragen door een verschil in kinetiek en affiniteit, terwijl dit verschil in bioassays zich beperkt tot verschil in affiniteit voor de receptor. Samenvattend kan derhalve gesteld worden dat bioassays voorlopig vooral geschikt zijn voor het detecteren van oestrogene potentie in milieumatrices, waarbij de individuele componenten onbekend blijven.

#### **4.4 Verantwoordelijke componenten voor oestrogene potentie in rwzi's**

##### **4.4.1 Vergelijking tussen gemeten oestrogene potentie en berekende potentie.**

In de monsters van veldstudie 2 (tabel 3.4) zijn met behulp van chemische analyses tevens de gehalten bepaald van bisfenol-A, ftalaten, alkylfenolen en natuurlijke hormonen (Belfroid *et al.*, 1999a). Hierdoor is het mogelijk om de biologische data te vergelijken met de chemische data. Dit is op twee manieren gedaan, namelijk 1) door het vergelijken van patronen van voorkomen van de verschillende gemeten componenten met de patronen van oestrogene potentie en 2) door het berekenen van de totale oestrogene potentie van de geanalyseerde verbindingen en deze te vergelijken met de gemeten oestrogene potentie.

Belfroid *et al.* (1999a) concludeerden in hun rapportage dat de patronen van voorkomen van oestrogene potentie het beste overeen komen met die van het voorkomen van hormonen, met name  $17\beta$ -oestradiol en oestron. De overeenkomst bleek het sterkst te zijn voor de ER-CALUX, maar ook voor de ER-bindingsassay was sprake van een enigszins vergelijkbaar patroon.

De vergelijking tussen berekende en gemeten oestrogene potentie van deze dataset is eveneens beschreven in Belfroid *et al.*, 1999a, die betrekking had op niet alleen de ER-bindingsassay maar ook op ER-CALUX en YES assay data gemeten door de LUW in opdracht van RIZA. Hieronder wordt ingegaan op de methode en de resultaten, waarbij ter vergelijking tevens gegevens van de ER-CALUX en YES assay zijn meegenomen.

De totale oestrogene potentie van de individuele stoffen is berekend door de chemisch gemeten gehalten van bisfenol-A, ftalaten (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP en DOP), alkylfenolen (octylfenol en nonylfenol) en alkylfenoethoxylenen en natuurlijke hormonen ( $17\beta$ -oestradiol,  $17\alpha$ -oestradiol en oestron) en  $17\alpha$ -ethinyloestradiol te vermenigvuldigen met de relatieve oestrogene potentie (EEF, zie tabel 3.3) van deze individuele

stoffen (in oppervlaktewater alleen hormonen en bisfenol-A). Deze berekening is noodzakelijkerwijs uitsluitend gebaseerd op de gemeten stoffen. Monsters waarin 17 $\beta$ -oestradiol per abuis niet is gemeten, zijn niet meegenomen in deze data analyse. Tevens zijn alle oppervlaktewater monsters waarin 17 $\beta$ -oestradiol gehalten onder de detectielimiet bleven niet meegewogen. Dit laatste is gedaan omdat het gehalte weliswaar onder de 0.3 ng/l ligt, maar dan bijvoorbeeld 0.2 ng/l kan zijn en derhalve nog een flinke oestrogene potentie kan hebben. Bij de oppervlaktewater monsters is de oestrogene potentie zo laag dat een dergelijke lage concentratie van de natuurlijke hormonen een grote rol kan spelen in de uitkomst. Tenslotte zijn alle gedeglucuronideerde monsters wel meegewogen, omdat gebleken is dat deglucuronideren geen verandering in oestrogene potentie of specifieke stofgehalten oplevert.

Tabel 4.5 toont per matrix in welke mate de bioassay-respons verklaard wordt door de berekende respons de chemische analyses. Een laag % betekent dus dat de berekende oestrogene potentie op basis van chemische analyse lager lag dan wat de biologische EEQ aangeeft.

*Tabel 4.5 Percentage oestrogene potentie dat kan worden verklaard op basis van chemische analyses, gemiddeld per matrix (YES en ER-CALUX data uit Belfroid et al 1999a)<sup>1</sup>.*

Matrix	ER-bindingsassay	YES	ER-CALUX
oppervlakte water	159 en 886 (n=2)	544 $\pm$ 520 (n=5)	602 $\pm$ 202 (n=5)
influent	10 $\pm$ 10 (n=8)	2262 $\pm$ 5129 (n=15) (127 $\pm$ 136) <sup>2</sup>	67 $\pm$ 46 (n=15)
effluent	6 $\pm$ 4 (n=3)	76 $\pm$ 88 (n=6)	28 $\pm$ 27 (n=6)

<sup>1</sup> Als voorbeeld: In het influent kan gemiddeld 10 % van de met de ER-bindingsassay gemeten oestrogene potentie verklaard worden door de berekende oestrogene potentie.

<sup>2</sup> Dit hoge percentage met hoge standaard deviatie wordt veroorzaakt door 4 uitbijters. Deze 4 uitbijters hadden in de YES assay een veel lagere respons dan in de ER-CALUX assay. Hiervoor is geen goede verklaring. Omdat op grond van de meting in de YES assay geen goede grond bestaan om deze getallen te verwerpen, zijn ze in deze berekening toch meegenomen. Indien ze niet zouden worden meegewogen dan zou het % verklaard 127  $\pm$  136 % zijn.

Uit deze berekening kan worden geconcludeerd dat in influenten en effluenten een hoge oestrogene potentie met de ER-bindingsassay is vastgesteld dan op basis van de chemische analyses kan worden berekend. Dit geldt in mindere mate ook voor de ER-CALUX assay. Deze waarneming betekent dat een aanzienlijk deel van de oestrogene potentie in deze matrices niet wordt verklaard door de chemische analyses.

#### 4.4.2 Relatieve belang van hormonen voor oestrogene potentie

Op basis van de chemie (geanalyseerde gehalten van diverse oestrogene stoffen) en de EEF's die zijn bepaald in deze studie kan worden vastgesteld in welke mate een gemeten verbinding in verhouding bijdraagt aan de oestrogene potentie in de geselecteerde monsters. Hierbij wordt de totale theoretische oestrogene potentie van elk monster berekend

door de gehalten met de EEF's te vermenigvuldigen. Vervolgens is nagegaan hoe groot de bijdrage van de natuurlijke hormonen is aan deze theoretische oestrogene potentie. Onderstaande formule maakt dit nog eens duidelijk:

$$\frac{\sum (EEF \times concentration) \text{ voor oestronene hormonen}}{\sum (EEF \times concentration) \text{ voor alle gemeten oestrogene hormonen en xeno - oestrogenen}} \quad (4.1)$$

De resultaten van deze data analyse zijn samengevat in tabel 4.6. Deze data analyse is niet toegepast op de oppervlaktewater data, omdat in deze monsters alleen de oestrogene hormonen zijn bepaald. Uit deze resultaten blijkt dat de gehalten van oestrogene hormonen veruit de belangrijkste lijken voor de aanwezigheid van de oestrogene potentie ten opzichte van de andere gemeten oestrogene verbindingen, te weten bisfenol-A, ftalaten of alkylfenolen.

Tabel 4.6 *Relatieve bijdrage van oestrogene hormonen aan totale berekende oestrogene potentie gebaseerd op analyse van hormonen, ftalaten, bisfenol-A en alkylfenolen, gemiddeld per matrix. (data mede gebaseerd op Belfroid et al 1999a)*

matrix	Aantal monsters n=	Relatieve bijdrage van oestrogene hormonen aan totale berekende oestrogene potentie (%)		
		ER-bindingsassay	YES	ER-CALUX
influent	15	94 ± 11	96 ± 10	99 ± 3
effluent	6	77 ± 17	90 ± 12	94 ± 6

#### 4.4.3 Integratie chemische en biologische resultaten

Op basis van de analyseprocedure werd in de bioassays potentie verwacht in fractie 2 (bisfenol-A) en fractie 4 (hormonen) in met name het influent monster. De resultaten van de in vitro bioassay vertonen echter geen verhoogde oestrogene potentie in fractie 2. Wel werd verhoogde oestrogene potentie gemeten in de fracties 4. De hoge potentie is zeer waarschijnlijk deels veroorzaakt door achtergrond contaminatie met hormonen veroorzaakt door fractioneren. Als hiervoor wordt gecorrigeerd dan blijkt dat de relatieve bijdrage van fractie 4 aan de totale oestrogene potentie 70% is bij effluent en 80-90% bij influent. Omdat fractie 4 overeen komt met de fractie waarin oestrogene hormonen (17β-oestradiol, oestron en 17α-ethinyloestradiol) zitten, ligt het voor de hand te veronderstellen dat deze potentie wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van hormonen.

De overige potentie (13 tot 30%) wordt veroorzaakt door verbindingen in fractie 1 t/m 3. Dit betreffen verbindingen die hydrofieler zijn dan de natuurlijke hormonen en die qua fysisch-chemische eigenschappen meer lijken op bisfenol-A (fractie 2). Een voor de hand liggende groep verbindingen die aan deze eigenschappen voldoen zijn de fyto-

oestrogenen, oestrogenen van plantaardige oorsprong, zoals genisteine en biochanine A. Deze zeer hydrofiele stoffen zijn oestrogeen potent, hoewel minder dan de hormonen (zie hfdst 3). Het voorkomen van fyto-oestrogenen is echter nog geen onderwerp van studie geweest. Derhalve kan niet met zekerheid worden gesteld dat fyto-oestrogenen verantwoordelijk zijn voor de geconstateerde oestrogene potentie in fractie 1.

De waarneming dat hormonen een belangrijk deel van de oestrogene potentie in de extracten veroorzaakt komt overeen met de berekening zoals uitgevoerd in 4.4.2. Uit deze berekening werd geconcludeerd dat bij de huidige gehalten van hormonen, ftalaten, APE's en bisfenol-A in het afvalwater, de hormonen 90-99% van de oestrogene potentie veroorzaken. Ook voor de monsters van de fractioneringstudie is op basis van de chemische analysedata de verwachte oestrogene potentie berekend. Uit de resultaten van deze berekening in tabel 4.7 blijkt dat in deze specifieke monsters alle oestrogene potentie verklaard kan worden met de aanwezige gehalten hormonen en bisfenol-A, of dat zelfs een hogere activiteit werd verwacht dan werd gemeten. Op basis van deze eerste resultaten lijkt het dus aannemelijk te veronderstellen dat de natuurlijke hormonen (of verbindingen die daar zeer veel op lijken) een groot deel van de oestrogene potentie in het afvalwater veroorzaakten.

*Tabel 4.7 Berekende en gemeten oestrogene potentie (in pM) in afvalwatermonsters van de fractioneringstudie.*

Monster	Gemeten oestrogene potentie	Berekende oestrogene potentie
totaalinfluent	195	216
totaaleffluent	0.69 en 5.81	19

Deze waarneming komt goed overeen met wat eerder in een Engelse studie werd gevonden. Desbrow *et al.* (1998) toonde dat de oestrogene potentie in steeds één fractie van gefractioneerde effluënten verhoogd leek ten opzicht van de overige fracties. De verhoogde oestrogene potentie bleek uiteindelijk te correleren met de aanwezigheid van de drie natuurlijke hormonen  $17\beta$ -oestradiol, oestron en  $17\alpha$ -ethinyloestradiol.

Tenslotte is het belangrijk nog de kanttekening te plaatsen dat het hier om slechts 2 monsters gaat, namelijk 1 influent en 1 effluent. Bovendien is een extra onzekerheid geïntroduceerd tijdens het fractioneren en zijn de extractie- en fractioneringsmethode geoptimaliseerd voor de analyse van hormonen en bisfenol-A. Enige voorzichtigheid bij de conclusies lijkt daarom op zijn plaats. Een herhaling van dit onderzoek, met meer monsters en meer controles, wordt sterk aanbevolen als een goede benadering om inzicht te verkrijgen in verantwoordelijke componenten van oestrogene potentie. Nader onderzoek naar de verschillende (groepen) verbindingen die oestrogene potentie veroorzaken is eveneens wenselijk. De methode van fractioneringstudie is daarbij een goed hulpmiddel.

## 5. Conclusies en aanbevelingen

Uit deze studie kan het volgende geconcludeerd worden:

- De drie in de laboratoriumstudie geteste *in vitro* bioassays (ER-bindingsassay, E-screen en YES) zijn allen geschikt voor het bepalen van oestrogene potentie van enkelvoudige verdachte stoffen.
- Van de geteste verbindingen zijn oestrogene hormonen (met name  $17\beta$ -oestradiol en  $17\alpha$ -ethinyloestradiol) het meest potent. Andere potent oestrogeen-actieve stoffen zijn een aantal fyto-oestrogenen, nonylfenol en bisfenol-A.
- EEF's zijn voor veel stoffen vergelijkbaar in de assays. Voor andere stoffen, waaronder nonylfenol en bisfenol-A, zijn de EEF's in de verschillende assays gerapporteerd in de literatuur variabel. Het is derhalve noodzakelijk om EEF waarden in meerdere onafhankelijke series vast te stellen, zodat de nauwkeurigheid wordt vergroot.
- *In vitro* bioassays zijn eveneens in principe allen geschikt voor het bepalen van oestrogene potentie in veldmonsters. De assays geven een verschillende grootte van respons doordat zij verschillen in gevoeligheid, kinetische beperkingen en mogelijkheid tot detectie van anti-oestrogenen. Wel was sprake van een lineair verband in respons tussen de assays. Op basis van criteria zoals gevoeligheid en selectiviteit en type test worden ER-bindingsassay en ER-CALUX aanbevolen voor vervolgonderzoek en routinematige monitoring van de situatie in het veld.
- De hoogste oestrogene potentie werd gemeten in influent van huishoudelijke oorsprong. Potentie in oppervlakte water en effluentwaren beiden lager. In de rwzi's vindt een aanzienlijke (factor 10 tot 20) reductie van oestrogene potentie plaats, hetgeen resulteert in lagere gehalten in effluent. Oestrogene potentie in rioolslib was ook hoog, deze is door manier van voorbereiden niet vergelijkbaar met waterige monsters. Overigens is er sprake van aanzienlijke temporele en spatiële verschillen in oestrogene potentie in de verschillende matrices.
- De gemeten oestrogene potentie in influenten en effluenten bleek hoger dan de berekende potentie op basis van de chemische analyses van hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenolen en -ethoxylaten. Dit verschil is met name voor de ER-bindingsassay erg groot, hier kon slechts circa 10% van de gemeten oestrogene potentie worden verklaard. Deze waarneming betekent dat een aanzienlijk deel van de oestrogene potentie niet wordt verklaard door de chemische analyses. Nader onderzoek naar de 'missende oestrogene stoffen' lijkt wenselijk.
- In oppervlakte water daarentegen was de berekende oestrogene potentie (hormonen en bisfenol-A) hoger dan de gemeten oestrogene potentie. Het is waarschijnlijk dat dit verband houdt met onnauwkeurigheden in de meting van oestrogene potentie,

oestrogene potentie of gehalte van verbinding. Ook naar dit punt lijkt nader onderzoek wenselijk.

- Het is waarschijnlijk dat de natuurlijke oestrogenen ( $17\beta$ -oestradiol, oestron) en  $17\alpha$ -ethinyloestradiol uit de anticonceptiepillen in belangrijke mate voor de oestrogene potentie verantwoordelijk zijn. Op basis van gehalten van oestrogene stoffen die zijn gemeten in influent en effluent (hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenolen) is berekend dat hormonen -in theorie- voor 80-98% verantwoordelijk zijn voor oestrogene potentie. Dit ondanks het feit dat de gehalten van hormonen een factor 1000 of meer lager liggen dan de overige verbindingen. Uit de fractioneringsstudie blijkt dat 70 tot 90% van de oestrogene potentie afkomstig is uit de fractie van de natuurlijke hormonen.
- Op basis van de met deze bioassays gemeten oestrogene potentie kan geen uitspraak gedaan worden over het risico voor het milieu en/of ecosysteem. Hiervoor is nader onderzoek naar de relatie tussen deze *in vitro* assays en *in vivo* effecten op ecosysteem niveau noodzakelijk.

Aanbevelingen die uit deze studie voortkomen zijn:

Voor vervolgonderzoek en routinematige monitoring van de situatie in het veld wordt de toepassing van ER-bindingsassay en ER-CALUX aanbevolen. Omdat deze assays geheel verschillend zijn in aard verdient een gecombineerde aanpak van beide assays de voorkeur. Op dit moment wordt de ER-CALUX door de vakgroep Toxicologie van de LUW en het Hubrecht laboratorium te Utrecht geoptimaliseerd en gestandaardiseerd.

Nader onderzoek naar verantwoordelijke componenten voor oestrogene stoffen anders dan natuurlijke hormonen, bisfenol-A, ftalaten en alkylfenolen lijkt wenselijk en wordt aanbevolen. Op basis van deze studie is duidelijk dat de gemeten oestrogene potentie in influent en effluent niet altijd geheel kan worden verklaard door de gemeten gehalten en dat ook andere verbindingen met oestrogene potentie hiervoor verantwoordelijk zijn. Fractioneringstudies gecombineerd met bioassays en chemische analyses zijn hierbij een geschikte benadering.

Daarnaast wordt aanbevolen om verder onderzoek te doen naar de temporele en spatiële verschillen in het voorkomen van oestrogene potentie en naar de afbraak en/of persistentie van oestrogene stoffen in het milieu. Deze laatste gegevens zijn mede noodzakelijk voor een goede risicoschatting.

In deze studie is niet geconcentreerd op locaties met hoge oestrogenen belasting. Het verdient derhalve aanbeveling om monitoring van oestrogene potentie voort te zetten en zelfs uit te breiden. Het onderzoek zou zich daarbij moeten richten op het opsporen van zogenaamde hotspots en risicogebieden.

Tenslotte, de relatie tussen aanwezigheid van oestrogene potentie in het milieu en een werkelijk actueel risico voor ecosystemen is nog niet bekend. Nader onderzoek zou zich op dit aspect moeten richten, zodat oestrogene potentie gemeten in bioassays beter kan worden geïnterpreteerd in het licht van risicobeoordeling.

## Literatuur

- Ariese, F., I. burgers, K. Oudhoff, T. Rutten, G. Stroomberg and D. Vethaak (1997). *Comparison of analytical approaches for PAH metabolites in fish bile samples for marine and estuarine monitoring*. IVM-R97/9, VU Boekhandel/Uitgeverij, Amsterdam, 39 p.
- Arnold S.F., D.M. Klotz, B.M. Collins, P.M. Vonier, L.J. Guillette Jr., J.A. McLachlan (1997). Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 277, p. 462-463.
- Belfroid, A.C., M. van Velzen en A. van der Horst (1998). *Voorstudies t.b.v. Landelijk Onderzoek Oestrogene Stoffen. Analyse van hormonen en bisfenol-A*. IVM rapport W98-34.
- Belfroid, A.C., A. Murk, P. de Voogt, A. Schäfer, G. Rijs and A.D. Vethaak (1999a). *Hormoonontregelaars in ons water. Oriënterende studie naar de aanwezigheid van oestrogeen-actieve stoffen in watersystemen en afvalwater in Nederland*. RIZA-rapport 99.007; RIKZ rapport 99.024.
- Belfroid, A.C., A. van der Horst, A.D. Vethaak, A. Schäfer, G. Rijs and W.P. Cofino (1999b). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci. Total Environ.*, 225, p. 101-108.
- Coldham, N.G., M. Dave, S. Sivapathasundaram, D.P. McDonnell, C. Connor and M.H. Sauer (1997). *Environ. Health Perspectives*, Vol. 105, No. 7, p. 734-742.
- Danzo, B.J. (1997). Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspectives*, Vol. 105, No. 3, p. 294-301.
- Desbrow, C., Routledge, E., Sheehan, D., Waldock, M. and J. Sumpter (1997). *The identification and assessment of oestrogenic substances in sewage treatment works effluents*. MAFF report P2-i490/7, Bristol, UK.
- Duax, W.L. and J.F. Griffin (1987). Structural features which distinguish estrogen agonists and antagonists. *J. Steroid Biochem.*, 27, p. 271.
- Folmar, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino and L.J. Guillette Jr. (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspectives*, Vol. 104, No. 10, p. 1096-1101.
- Gezondheidsraad. (1997). Hormoonontregelaars in de mens. Publ. nr. 1997/08.
- Gezondheidsraad. (1999). Hormoonontregelaars in ecosystemen. Publ. nr. 1999/13.
- Giado, K.W., D.P. McDonnell, K.S. Korach and S.H. Safe (1997). Estrogenic activity of chemical mixtures: Is there synergism? *CITT Activities*, Vol. 17, No. 2, p. 1-7.
- Hammond, B., B.S. Katzenellebogen, N. Krauthammer, and J. McConnell (1979). *Estrogenic activity of the insecticide chlordane (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors*. PNAS, 76, p. 6641-6645.
- Harries, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Mathiessen, P. Neall, J.P. Sumpter, T. Tylor and N. Zaman (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, No. 1, p. 534-542.

- Harries, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Mathiessen, P. Neall, E.J. Routledge, R. Rycroft, J.P. Sumpter, (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 15, No. 11, p. 1993-2002.
- Harries, C.A., P. Henttu, M.G. Parker and J.P. Sumpter (1997). The estrogen activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspectives*, Vol. 105, No. 8, p. 802-811.
- Helma, C., V. Mersch-Sundermann, V.S. Houk, U. Glasbrenner, C. Klein, L. Wenqing, F. Kassie, R. Schulte-Hermann and S. Knasmüller (1996). *Environ. Science & Technology*, Vol. 30, No. 3, p. 897-907
- Jobling, S., D.A. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen and J.P. Sumpter (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkyphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: p. 194-202.
- Jobling, S., C.R. Tyler, M. Nolan and J.P. Sumpter (1998). *The identification of oestrogenic effects in wild fish*. R&D Technical Report W119, Environment Agency, Bristol, UK.
- Klotz, D.M., B.S. Beckman, S.M. Hill, J.A. McLachlan, M.R. Walters and S.F. Arnold (1996). Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. *Environ. Health Perspect.* 104, p. 1084-1089.
- Legler, J. and R. Luit (1997). *Concept rapportage: Ontwikkeling van een extractie/fractioneeringschema met diverse milieumatrices voor xeno-oestrogene stoffen*. Landbouwniversiteit Wageningen, 13 p.
- Legler, J., C.E. van den Brink, A. Brouwer, A.J. Murk, P. T. van der Saag, A.D. Vethaak, B. van der Burg (1999). Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Tox. Sci.* 48: p. 55-66.
- Lye, C.M., C.L.J. Frid and M.E. Gill (1998). Seasonal reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to sewage effluent. *Marine Ecology-Progress Series*. 170: p. 249-260.
- Mayr, U., A. Butsch and S. Schneider (1992). Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal abstracts. *Toxicology*, 74, 135.
- Murk, A.J. (1997). *Biomarkers for the assessment of exposure and sublethal effects of PHAHs in Wildlife - With special emphasis on the aquatic foodchain*. PhD Thesis, Landbouwniversiteit Wageningen, ISBN 90-5485-636-x.
- Oudhoff, K.A. (1997). *Het ontwikkelen van een scheidingsmethode voor HPLC voor het identificeren van PAK-metaboliëten in de bot (Platichthys flesus)*. Afstudeerscriptie. IVM.
- Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye *et al.* (19994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8: p. 275-285.
- Ramamoorthy, K., F. Wang, and S. Safe (1997). Potency of Combined Estrogenic Pesticides. *Science*, 275, p. 405-406.
- Routledge, E.J. and J.P. Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 15, No. 3, p. 241-248.
- Santodonato, J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 34: p. 835-848.
- Schwartz, J.A. and D.F. Skafar (1993). Ligand-mediated modulation of estrogen receptor confirmation by estradiol analogs. *Biochem.*, 32, p. 10109-10115.



*Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays*

- Soto, A.M., T.J.H. Lin, R.M. Silvia and C. Sonnenschein (1992). An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-Screen). In: T. Colburn and C. Clement (Eds.), *Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection*. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, 295 p.
- Soto, A.M., C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernandez, N. Olea and F.O. Serrano (1995). The E-screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 103(Suppl 7): p. 113-122.
- Sumpter, J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103, p. 173-177.
- Villalobos, M., N. Olea, J.A. Brotons, M. Olea-Serrano, J.M. Ruiz de Almodovar, and V. Pedraza (1995). The E-screen assay: a comparison of different cell stocks. *Environ. Health Perspect.* 103, p. 844-850.
- Villaneuve *et al*, SETAC (1996).
- Vonier, P.M., D.A. Crain, J.A. McLachlan, L.J. Guillette and S.F. Arnold (1996). Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the american alligator *Environm. Health Perspect.* 104, p. 1318-1322.
- Vom Saal, F.S., S.C. Nagel, P. Palanza, M. Boechler, S. Parmigiani, and W.V. Welshons (1995). Estrogenic pesticides - binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicology Letters* 77: p. 343-350.
- Welshons, W.V., G.E. Rottinghaus, D.J. Nonneman, M. Dolan-Timpe and P.F. Ross (1990). A sensitive bioassay for detection of dietary estrogens in animal feeds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2, p. 268.
- Zacharewski, T.R., K. Berhane and B.E. Gillesby (1995). Detection of estrogen- and dioxin-like activity in pulp and paper mill black liquor and Effluent using *in vitro* recombinant receptor/reporter gene assays. *Environ. Science & Technology*, Vol. 29, No. 8, p. 2140-2146.
- Zacharewski, T. (1997). *In Vitro* Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. *Environ. Science & Technology*, 31, p. 613-623.

## Bijlage 1 Overzicht preconcentreringstechnieken

Ten behoeve van de bio-assays is het noodzakelijk het effluent van de rwzi eerst te concentreren. Hiertoe zijn verschillende benaderingen mogelijk zoals hieronder is samengevat. Deze methodes zijn afkomstig uit de literatuur en worden voor zeer verschillende assays en metingen ingezet. De uiteindelijke keus van de meest geschikte preconcentreringmethode zal, naast efficiëntie, bewerkelijkheid en kosten tevens bepaald worden door het type bioassay waarvoor de preconcentrering wordt uitgevoerd.

Zacharewski *et al.*, 1995

Type materiaal: Effluent van paper mill.

Doel preconcentrering: CALUX assay voor zowel oestrogenen als dioxines.

Methode: Het extract werd gefiltreerd over 0.2 - 1.0 µm filter van Millipore om alle zwevend stof kwijt te raken. Het filtraat werd in een aantal verdunningsstappen met ethanol rechtstreeks gebruikt.

Villaneuve *et al.*, SETAC 1996

Type materiaal: effluenten

Doel preconcentrering: CALUX assay voor zowel oestrogenen als Ah agonisten.

Methode: 1.5 - 5 liter waste water werden ter plaatse geëxtraheerd met Empore<sup>TM</sup> voor de opgeloste fase en met glas fiber filter voor zwevend stof. Het extract werd geconcentreerd in 1.0 ml in ACN. GPC fractionering.

*Conclusie van dit onderzoek:* Oestrogene stoffen in afvalwater komen alleen in de opgeloste fase voor en niet in het zwevende stof. In oppervlakte water zat de oestrogene potentie de rivier zat oestrogeen effect voornamelijk in de opgeloste fase maar ook in het zwevende stof doch lag de potentie in de laatste een factor 10 tot 100 lager. Het bleek onmogelijk het monster zo ver voor te concentreren dat maximale respons werd gevonden.

Helma *et al.*, 1996

Type materiaal: oppervlaktewater

Doel preconcentrering: genotox assay

Methode: Water met zwevend stof werd voorgefilterd over een glas filter. XAD resins (XAD-2 en XAD-7 kolommen, 20 g/60ml) werden geactiveerd met 200 ml aceton en 200 ml bidistilled water. 5 tot 100 liter water werd zonder pH bijstelling over deze kolommen geleid. XAD kolommen werden gedroogd met N<sub>2</sub> en geëlueerd met 200 ml aceton. De aceton werd ingedampt met een Rotavapor tot het juiste volume.

Legler, 1997

Type materiaal: poriewater.

Doel preconcentrering: CALUX assay voor zowel oestrogenen als dioxines.

Methode: 9 ml poriewater werd geëxtraheerd met 4.5 ml ethanol en 13.5 ml hexaan/diethylether (97/3) door te schudden. De extractie werd 3x herhaald. Het extract werd ingedampt en opgenomen in DMSO. Dit is de hydrofobe fractie.

9 ml poriewater werd geëxtraheerd met 4.5 ml ethanol en 13.5 ml diethylether door te schudden. De extractie werd 3x herhaald. Het extract werd ingedampt en opgenomen in ethanol. Dit is hydrofiele fractie 1.

9 ml poriewater werd geëxtraheerd met 18 ml diethylether door te schudden. De extractie werd 3x herhaald. Het extract werd ingedampt en opgenomen in ethanol. Dit is hydrofiele fractie 2.

### Discussie

Globaal zijn er twee methoden voor preconcentrering: concentreren over extractiedisk/kolom of vloeistof/vloeistof extractie. Bij het afwegen van voor- en nadelen is uitgegaan dat 1 liter water geconcentreerd moet worden. Bij de extractiedisk betekent dat 1 liter wordt geëxtraheerd met een SDB-XC extractiedisk, die volgens wordt geëluëerd met methanol. De methanol wordt ingedampt en opgenomen in DMSO. Bij de vloeistof/vloeistof extractie wordt 1 liter water geschud met 10 ml aceton en ingedampt.

#### *Voor/nadelen extractiedisk/kolom en vloeistof/vloeistof extractie.*

Extractiedisk/kolom	Vloeistof/vloeistof extractie
f25 per disk, voor 5 liter 5 disks nodig met 5 filteropstellingen snel nauwkeurig (zeker als doorslag moment bekend is) is ook de eerste stap voor chemische analyse en vergroot vergelijkbaarheid	goedkoop snel, maar grote indampstap die tijd kost elke keer recovery bepaling nodig, gevaar voor verdamping, lijkt minder nauwkeurig niet geschikt voor polaire verbindingen

In de afweging is het van belang mee te nemen dat grote hoeveelheden water tot 5 liter snel en efficiënt verwerkt kunnen worden. Hiertoe zal telkens 5 keer 1 liter effluent geëxtraheerd worden. Vanwege het optreden van 'doorslag' (de maximale absorptiecapaciteit van de disk is bereikt zodat het overleiden van meer water niet leidt tot meer opbrengst) over de extractiedisk bij deze matrix, dat op lijkt te treden bij 1 liter effluent (Belfroid *et al* 1997), is het niet zinvol 5 liter water over 1 disk te leiden, maar wordt gekozen voor 5 keer 1 liter over verschillende extractiedisks te leiden. De geëluëerde extracten worden dan later samengevoegd. De belangrijkste afweging is echter dat vloeistof/vloeistof extractie vooral geschikt is voor apolaire verbindingen en niet voor polaire verbindingen. Op grond van deze en andere bovenstaande overwegingen is gekozen voor concentrering met behulp van een extractie disk, waarbij gekozen is voor dezelfde tech-

*Detectie van oestrogeen-actieve stoffen met in vitro bioassays*

niek als die gebruikt is in de analyse van hormonen en bisfenol-A (Belfroid *et al.*, 1999a,b), opdat een optimale vergelijkbaarheid bestaat.

