

Schadelijke stoffen in scholekstereieren

**Responsmetingen in bioassays ter bepaling van risico's van contaminanten
in eieren van scholeksters uit het Zeehavenkanaal**

D. de Roode¹

S. Crum¹

T. Rouhani Rankouhi²

T. Sanderson²

A.T.C. Bosveld¹

¹ Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte

² IRAS, Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht Universiteit

Alterra-rapport 402

Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte, Wageningen, 2001

REFERAAT

Roode, D. de, Steven Crum, Tanja Rouhani Rankouhi, Thomas Sandersson, Albertus T.C. Bosveld, 2001. *Schadelijke stoffen in scholekstereieren; responsmetingen in bioassays ter bepaling van risico's van contaminanten in scholekstereieren uit het Zeehavenkanaal*. Wageningen, Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte. Alterra-rapport 402. 38 blz. 9 fig.; 2 tab.; 23 ref.

In het verleden zijn door het RIKZ in het Zeehavenkanaal te Delfzijl hoge hexachloorbenzeen (HCB)-gehalten gemeten. Na sanering voldeed de onderwaterbodem voor HCB echter nog steeds niet aan de normen voor het baggerbeheer. In eieren van scholeksters die foerageren in het met HCB verontreinigde gebied zijn ook verhoogde concentraties gemeten. De vraag is of deze verhoogde concentraties HCB en eventuele andere verontreinigingen nadelige effecten hebben op de scholeksters. Uit het onderzoek waarvan de resultaten in dit rapport beschreven staan, blijkt dat de in de eieren aanwezige stoffen in staat zijn om effecten bij vogels te veroorzaken.

Trefwoorden: anti-oestrogeniteit, Bursa van Fabricius, CARPHEP bioassay embryotoxiciteit, EROD, hexachloorbenzeen, kippenembryotest, oestrogeniteit, porfyryne, thiamine.

ISSN 1566-7197

Dit rapport kunt u bestellen door NLG 31,00 (€14) over te maken op banknummer 36 70 54 612 ten name van Alterra, Wageningen, onder vermelding van Alterra-rapport 402. Dit bedrag is inclusief BTW en verzendkosten.

© 2001 Alterra, Research Instituut voor de Groene Ruimte,
Postbus 47, NL-6700 AA Wageningen.
Tel.: (0317) 474700; fax: (0317) 419000; e-mail: postkamer@alterra.wag-ur.nl

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

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

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

Inhoud

Woord vooraf	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 Achtergrond	9
1.2 Vraagstelling en plan van aanpak	9
1.3 Beschouwingen over de toegepaste werk en of berekeningsmethodiek	10
1.3.1 CARPHEP bioassay	10
1.3.2 Aromatase	10
1.3.3 Kippenei-injectie bioassay	11
2 Materiaal en methoden	13
2.1 Extractie scholekstereieren	13
2.2 CARPHEP bioassay	13
2.3 Aromatase	13
2.4 Kippenei-injectie assay	15
2.4.1 Blootstelling	15
2.4.2 Dissectie	15
2.4.3 Biochemische effect parameters	15
2.4.3.1 Acetylcholinesterase	15
2.4.3.2 EROD/porfyrynes	16
2.4.3.3 Eiwitbepaling	16
2.4.4 Histologie	18
2.4.5 Statistiek	18
3 Resultaten	19
3.1 CARPHEP bioassay	19
3.1.1 Mitochondriële activiteit	20
3.2 Aromatase	20
3.3 Kippenei bioassay	21
3.3.1 Mortaliteit, biometrie	21
3.3.2 Misvormingen	22
3.3.3 Enzymbepalingen	22
3.3.3.1 EROD activiteit	22
3.3.3.2 Acetylcholinesterase activiteit	23
3.3.4 Porfyrynestapeling	23
3.3.5 Histologie	24
4 Discussie	25
5 Conclusies	29
Literatuur	31

Woord vooraf

In het verleden zijn door het RIKZ in het Zeehavenkanaal te Delfzijl hoge hexachloorbenzeen (HCB)-gehalten gemeten. Na sanering voldeed de onderwaterbodem voor HCB echter nog steeds niet aan de normen voor het baggerbeheer. In eieren van scholeksters die foerageren in het met HCB verontreinigde gebied zijn ook verhoogde concentraties gemeten. De vraag is of deze verhoogde concentraties HCB en eventuele andere verontreinigingen nadelige effecten hebben op de scholeksters. Om een antwoord op deze vraag te krijgen is een tweeledig onderzoek uitgevoerd. Het eerste deelonderzoek heeft zich gericht op de bepaling van de potentiële effecten van HCB (als belangrijkste verontreiniging) in verschillende bioassays. Het tweede deel van het onderzoek richt zich op de effecten van extracten van scholekstereieren in diezelfde bioassays. In deze extracten zijn naast HCB nog tal van andere, deels onbekende, stoffen aanwezig. Beide deelonderzoeken zijn in opdracht van het RIKZ uitgevoerd door Alterra, in samenwerking met het Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS, Utrecht Universiteit). De *in vitro* bioassays voor de bepaling van de (anti-) oestrogeniteit en aromatase inhibitie en/of inductie zijn uitgevoerd op het IRAS; de *in ovo* bioassays zijn uitgevoerd op Alterra. Het eerste deelonderzoek naar de effecten van HCB in verschillende bioassays is in januari 2001 afgerond. De resultaten van dit onderzoek zijn neergelegd in een eerder, intern rapport (de Roode et al 2001). Het tweede deelonderzoek is afgerond in augustus 2001. De resultaten daarvan zijn beschreven in het huidige rapport.

Samenvatting

Op de schermdijk van het Zeehavenkanaal te Delfzijl leeft een populatie scholeksters. Het sediment van het Zeehavenkanaal bevat tal van milieoverontreinigende stoffen. Na sanering van de waterbodem bleken de concentraties hexachloorbenzeen (HCB) nog steeds te hoog. Veel van de aanwezige verontreinigingen kunnen doorgegeven worden naar de opeenvolgende schakels in de voedselketen. Uit onderzoek naar de concentraties in scholekstereieren bleken de HCB gehalten hierin ook verhoogd te zijn. De eventuele effecten van de verontreinigingen zijn onderzocht met behulp van verschillende bioassays waarin het mengsel van stoffen getest is dat als extract uit de scholekstereieren verkregen is. Uit twee verschillende *in vitro* bioassays, de CARPHEP assay voor de meting van (anti-)oestrogeniteit en het H295 aromatase assay voor de meting van effecten op de steroidhormoon genese, bleek dat de aanwezige stoffen langs deze mechanismen geen effecten veroorzaken. Uit het *in ovo* bioassay, waarbij kippeneieren met het extract ingespoten zijn bleek een effect op de EROD activiteit en een effect op de bursa van Fabricius. Andere effectparameters die gemeten zijn (sterfte, embryo- en dooiergewicht, orgaangewichten, activiteit van acetylcholinesterase, porfyriene stapeling in de lever) lieten geen verandering zien na injecteren van het extract.

De resultaten geven aan dat in de eieren van scholeksters die langs het Zeehavenkanaal broeden stoffen aanwezig zijn die effecten kunnen veroorzaken in vogelembryo's.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Op de schermdijk van het Zeehavenkanaal te Delfzijl leeft een populatie scholeksters. Het sediment van het Zeehavenkanaal bevat tal van milieaverontreinigende stoffen, die zich via de voedselketen in de scholeksters ophopen (voor HCB beschreven in: Eggens et al. 2000). Dergelijke contaminanten hopen op in vetweefsels en komen dus ook terecht in de vetten die aanwezig zijn in het ei dat door de moedervogel geproduceerd wordt. Tijdens de ontwikkeling van het vogelembryo wordt de dooier als voedselbron gebruikt. Daardoor komen de stoffen vrij, wat leidt tot verhoogde blootstelling van het embryo. Onderzoek aan visdieven heeft aangetoond dat vooral de embryonale stadia gevoelig zijn voor schadelijke effecten van met name gechlloreerde koolwaterstoffen (Bosveld et al. 2000).

De contaminanten die bij scholeksters in het Zeehavenkanaal mogelijk een rol spelen, zijn hexachloorbenzeen (HCB), 1,1-dichlorodifenyldichloroethaan (DDT), 1,1-dichlorodifenyldichloroethaan (DDD), 1,1-dichloro-2,2-bis(*p*-chlorofenyl)ethyleen (DDE), octachloorstyreen (OCS), pentachloorfenol (PCP), tributyltin (TBT) en trifenyltin (TPT). Met name het gehalte aan hexachloorbenzeen is verhoogd in scholekstereieren afkomstig van de dijk van het Zeehavenkanaal in vergelijking met die van het Eems-Dollard kanaal. Van hexachloorbenzeen is bekend dat dit in vogels (en in vogelembryo's) effecten heeft op de heemsynthese (porfyriene stapeling), activiteit van cytochroom P450 enzymen (AHH, EROD, ECOD), en verschillende aan immuunactiviteit gerelateerde parameters (gewicht van lymfeknopen en milt, serumgehalten IgM en IgA) (Schielen et al. 1995; Carpenter et al 1985a, 1985b; Machala et al. 1996).

Om de risico's van contaminanten in het Zeehavenkanaal voor de aldaar broedende scholeksters vast te stellen kan langs twee sporen onderzoek uitgevoerd worden. Enerzijds is (semi)veldonderzoek nodig om inzicht te krijgen in de daadwerkelijke optredende effecten ter plaatse. Daarnaast kunnen bioassaytesten met extracten van in het veld verzamelde scholekstereieren uitwijzen of de daarin aanwezige contaminanten een potentieel gevaar opleveren voor de vogels. In de huidige studie is de aanpak gericht op het aantonen van potentiële effecten in bioassays. Wanneer op deze wijze effecten worden aangetoond, pleit dit voor een uitgebreider vervolgonderzoek op basis van (semi)veldonderzoek om de daadwerkelijke effecten in de scholeksters vast te kunnen stellen.

1.2 Vraagstelling en plan van aanpak

De bioassays die uitgevoerd zijn om de potentiële effecten van de in de eieren aanwezige chemicaliën aan te tonen zijn 1) *in vitro* inhibitie/inductie van steroid genese in H295R aromatase bioassay, 2) *in vitro* inductie/inhibitie van vitellogenine

productie in CARPHEP bioassay en 3) *in ovo* inductie van effecten op de embryonale ontwikkeling in de kip met inbegrip van biometrie, afwijkingen, sterfte, histologie en biochemie.

1.3 Beschouwingen over de toegepaste werk en of berekeningsmethodiek

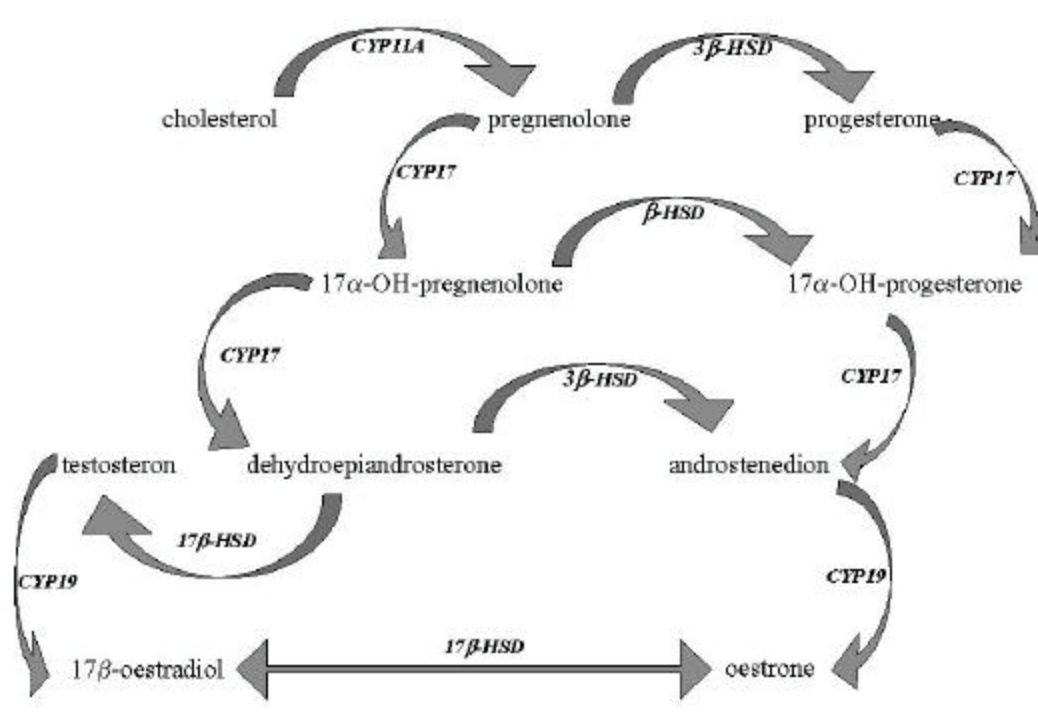
1.3.1 CARPHEP bioassay

Het CARPHEP bioassay (Smeets et al. 1999) maakt gebruik van het feit dat eileggende organismen het dooierewit vitellogenine (vtg) produceren. De vitellogenine synthese wordt gestuurd door de aanwezigheid van vrouwelijke geslachtshormonen. Een van de meest belangrijke vrouwelijke geslachtshormonen hierbij is oestradiol (E2). Door de vitellogenineproductie onder invloed van verschillende doseringen van het extract te meten en te vergelijken met de productie onder invloed van verschillende concentraties E2 wordt een indruk verkregen van de mate waarin contaminanten in de scholeksterieieren als "pseudooestrogenen" optreden en de oestrogenafhankelijke processen mogelijk kunnen verstoren. Daarnaast kan in het bioassay onderzocht worden of de contaminanten ook een anti-oestrogene werking bezitten, waarbij de werking van E2 onderdrukt wordt. In dit geval worden verschillende doseringen van het extract toegediend in aanwezigheid van een vaste hoeveelheid E2 en wordt de eventuele dosis-afhankelijke afname van de vitellogenineproductie gemeten.

1.3.2 Aromatase

Een juiste hormoonstatus in een organisme is van cruciaal belang voor de normale ontwikkeling van voortplantingsorganen en -functies. De handhaving van een gewenste homeostase is voor een belangrijk deel afhankelijk van het functioneren van een aantal cytochroom P450 enzymen die de omzettingen catalyseren waarbij uit cholesterol achtereenvolgens verschillende androgenen en oestrogenen gevormd kunnen worden (zie fig 1)

De aantasting van de steroïdgenese door milieucontaminanten is recentelijk aangegeven als een mogelijke oorzaak van effecten op de reproductie (Sanderson et al. 2000). Voor onderzoek naar de potentie van een stof om middels dit mechanisme de vorming van oestradiol uit testosteron te blokkeren of te stimuleren is een bioassay ontwikkeld dat gebruikt maakt van de humane adrenocorticocarcinoma cellijn H295R waarin het enzym Cyp19 tot expressie komt en waarin de effecten van blootstelling aan milieucontaminanten op dit mechanisme gemeten kunnen worden.



Figuur 1. Steroidgenese. Vorming van de verschillende steroiden vanuit cholesterol en de daarbij betrokken enzymen.

1.3.3 Kippenei-injectie bioassay

Een standaard ei-injectie bioassay is ontwikkeld dat gebruik maakt van de kip als modelsoort voor vogels (Bosveld et al. 1992). In vergelijking met verschillende wilde vogelsoorten is de kip relatief gevoelig voor gechlloreerde koolwaterstoffen (Brunström 1988; Bosveld 1995; Sanderson and Bellward 1995). Mede om deze reden is de kip geschikt als modelorganisme om eventuele effecten van deze contaminanten op te sporen. Het ei-stadium leent zich goed voor experimentele blootstellingsstudies. Blootstelling vanaf het allervroegste begin van de ontwikkeling (dag 0) is hierbij van groot belang omdat gebleken is dat vooral de vroege ontwikkelingsstadia gevoelig zijn voor effecten van contaminanten. Daarnaast kunnen alleen na injectie op dag 0 eventuele effecten op de aanleg van organen en lichaamsdelen, zogenaamde teratogene effecten, worden bestudeerd (Brunström 1986).

Op basis van de te verwachten specifieke effecten worden in het ei-injectie bioassay de microsomale EROD activiteit in de lever gemeten als maat voor de potentie van de contaminanten in het extract om te binden aan de Ah-receptor (dioxine-achtige stoffen) en de porfyriestapeling in de lever als maat voor verstoring van de heemsynthese. Remming van het enzym acetylcholinesterase in de hersenen is onderzocht als een maat voor de aanwezigheid van verschillende organofosfaten en carbamaten (Busby et al. 1991; Hart 1993; Matz et al. 1998; Parsons et al. 2000; Bishop et al. 2000). Het enzym speelt een belangrijke rol in de neurotransmissie en

verstoring van zijn activiteit is in verband gebracht met afwijkingen in gedrag en ontwikkeling (Cho en Lee 1990; Hart 1993). Daarnaast worden enkele specifieke toxicologische parameters beschouwd waaronder lichaamsgewicht, dooiergewicht en orgaangewichten van lever, hersenen, en de bursa van Fabricius. De bursa heeft een belangrijke immunofunctie bij vogels (productie van B-lymfocyten). Microscopisch onderzoek aan dit orgaan kan uitwijzen of het weefsel normaal ontwikkeld is.

Op grond van de resultaten van de genoemde bioassays kunnen conclusies getrokken worden over de potentie waarmee de stoffen die aanwezig zijn in scholekstereieren, effecten in het zich ontwikkelende embryo kunnen induceren.

2 Materiaal en methoden

2.1 Extractie scholekstereieren

Ten behoeve van de *in vitro* assays zijn eieren verzameld in mei 2000. Ten behoeve van het ei-injectie bioassay zijn in juni 2001 op de dijk langs het Zeehavenkanaal eieren verzameld.

De dooiers van 15 eieren werden gecombineerd, gemengd en gedroogd met natriumsulfaat, dat vooraf gegloeid was bij 550°C. Het mengsel werd gedurende 6 uur via soxhlet geëxtraheerd met gedestilleerde hexaan. Met behulp van rotatiefilm verdamping werd alle hexaan uit het extract verwijderd; vervolgens werd het extract uitgeschud met acetonitril bij 4°C. De acetonitril fracties werden gecombineerd en via rotatie film verdamping drooggedampt. Uiteindelijk werd het extract opgenomen in hexaan en gezuiverd over een aluminiumoxide kolom volgens de methode van van den Brink (1997). De elutievloeistof was hexaan. Na indampen van het eluens was het eindvolume 5 ml.

2.2 CARPHEP bioassay

Vitellogenine productie door karper hepatocyten onder invloed van de extracten werd gemeten volgens een methode gemodificeerd naar Smeets et al (1999).

Met behulp van een collagenase perfusie werden karper-hepatocyten geïsoleerd en in 96-well platen uitgezaaid. Drie en zeven dagen na isolatie van de levercellen werden de cultures blootgesteld aan verschillende concentraties van het extract al dan niet in combinatie met 100nM estradiol (E2). Voor iedere concentratie werden de blootstellingen in zesvoud uitgevoerd. De geproduceerde hoeveelheid vitellogenine (VTG) werd bepaald met behulp van een indirecte, competitieve ELISA. De meetwaarden werden vervolgens uitgezet tegen de hoeveelheid VTG die bij een blootstelling aan 1000nM estradiol wordt bereikt.

Ter controle op de algemene gesteldheid van de cellen werd op de laatste dag van het experiment (8 dagen na isolatie) met behulp van de MTT- test de mitochondriële activiteit van de hepatocyten bepaald. De mitochondriële activiteit van hepatocyten die blootgesteld waren aan extract werd gerelateerd aan de mitochondriële activiteit van hepatocyten die alleen aan medium waren blootgesteld (controle cellen).

2.3 Aromatase

H295R cellen zijn verkregen van de American Type Culture Collection (ATCC # CRL-21228) en zijn gekweekt in 75cm² flessen van Greiner (Duitsland), in 1:1 (v/v) Dubelco's modified Eagle medium/Ham's F-12 nutrient mix (DMEM/F12) met 365

mg/ml L-glutamine en 15 mM HEPES (GibcoBRL 31300-038). Aan het medium werd verder toegevoegd 10 mg/l insuline, 6.7 µg/l sodiumselenite, 5.5 mg/l transferrin (ITS-G GibcoBRL 41400-045), 1.25 mg/l bovibe serum albumine (Sigma A9647), 100U/l penicilline, 100 µg/l streptomycine (GibcoBRL 15140-114 en 2% steroid-vrij replacement serum Ultrosor SF (Soprachem, Fr.) Voor de aromatase experimenten werden de cellen behandeld zoals eerdere beschreven (Sanderson et al. 2000).

De cellen werden in 24 wells celweekplaten (1 ml medium en ca. $1-2 \times 10^5$ cellen per well) gedurende een periode van 24 uur blootgesteld aan de ei-extracten in verschillende concentraties opgelost in 1 µl dimethylsulfoxide (DMSO), waarbij een 14 mM DMSO concentratie in het medium ontstond (0.1%). Voor negatieve en positieve controles werd respectievelijk 1µl DMSO en 100 µM 8-bromo-cyclic adenosine monofosfaat (8-Br-cAMP) aan de cellen toegevoegd. 8-Br-cAMP stimuleert de CYP19 gen transcriptie en induceert de catalytische activiteit van het enzym. Als positieve controle op enzym-inhibitie werd 1 µM 4-hydroxyandrostenedion (4-HA) toegevoegd (Brodie et al. 1977). De cellen werden gedurende 24 uur blootgesteld aan de verschillende oplossingen.

Alle behandelingen werden getest in viervoud. 0.1% DMSO had geen effect op de aromatase activiteit in vergelijking tot de niet blootgestelde cellen. Eiwit concentraties werden bepaald middels de fluorimetrische methode volgens Udenfriend et al. (1972), met bovine serum albumine (A9647 Sigma-Aldrich, USA) als standaard.

Naast de omzetting van testosteron in 17β -oestradiol, catalyseert aromatase eveneens de omzetting van androstenedion in oestrone. De catalytische activiteit van aromatase werd bepaald volgens de methode van Lephart and Simpson (1991). De cellen werden geïncubeerd met 54 nM 1β - ^3H -androstenedion (New England Nuclear Research Products, USA) in serum-vrij medium (Ultrosor SF-free) gedurende 1.5 uur bij 37°C in een atmosfeer van 5% CO_2 en 95% lucht. Alle andere stappen werden uitgevoerd zoals eerder beschreven (Letcher et al. 1999; Sanderson et al. 2000). Aromatase activiteit is uitgedrukt in de omzetting van androstenedion in pmol per uur per milligram cellulair eiwit. De specificiteit van de aromatase assay zoals gebaseerd op de afsplitsing van getritieerd water werd geverifieerd door de productie van oestrone (het aromataseproduct van androstenedion) te meten met behulp van een ^{125}I -gelabeld dubbel-antilichaam radioimmunoassay kit (DSL-8700; Diagnostic Systems Inc, USA), onder toevoeging van 4-hydroxyandrostenedione, dat de catalytische activiteit van aromatase irreversibel inhibeert en de vorming van getritieerd water blokkeert (Brodie et al. 1977).

2.4 Kippenei-injectie assay

2.4.1 Blootstelling

Kippenembryo's werden op dag 0 van de ontwikkeling blootgesteld aan 3 verschillende concentraties van het scholeksterei-extract. Tevens werd een groep blootgesteld aan de carrier (controle). De concentraties werden verkregen door steeds een deel van het extract onder steriele omstandigheden droog te dampen en op te nemen in steriele propyleenglycol (PG). Op die manier werden drie oplossingen gemaakt die per 50 µl PG (benodigde volume voor injectie van één ei) 0.01, 0.1 en 1 ei-equivalent (eq) van de contaminanten bevatten.

Blootstelling gebeurde door injectie (50 µl) van de oplossing in de dooier van bevruchte eieren, uitgevoerd onder steriele omstandigheden. Hiertoe werd eerst een gat van 2 mm. boven de luchtkamer in de eischaal geboord, waarbij het ondergelegen membraan intact werd gelaten. Voor en na injectie werd de eischaal afgenomen met 70% alcohol. Het gat werd na injectie afgesloten met een stickertje en de eieren werden gedurende 19 dagen bebroed bij 37 ° C en een relatieve luchtvochtigheid van 50 tot 60%.

Elke concentratie werd geïnjecteerd in tenminste 10 eieren (de controlegroep en de hoogste dosis groep bestonden elk uit 11 eieren). Uitgaande van een percentage van 20% onbevruchte eieren, wat normaal is, zouden er op die manier voldoende embryo's moeten overleven om analyses te kunnen uitvoeren.

2.4.2 Dissectie

Op dag 19 werden de eieren geopend, de embryo's werden geïnspecteerd op afwijkingen en levende embryo's en hun dooiers werden gewogen. Daarna werden de lever, bursa van Fabricius en hersenen verwijderd en gewogen. Lever en hersenen werden bevroren in vloeibare stikstof en tot analyse bewaard bij -80 °C. Bursa van Fabricius werd gefixeerd in unifix (Klinipath).

2.4.3 Biochemische effect parameters

2.4.3.1 Acetylcholinesterase

Hersenen werden op ijs ontdooid en met een potter S (Braun Biotech International GmbH) gehomogeniseerd in kaliumfosfaat buffer (0,1 M, pH 7,4). Dit homogenaat werd gecentrifugeerd in de ultracentrifuge bij 15.000 g en 4°C. Het supernatant werd tot analyse bewaard bij -80°C.

Het enzymassay voor de meting van acetylcholinesterase werd uitgevoerd volgens Ellman (1961). De monsters werden op een microtiter plaat in 20 µl fosfaatbuffer (0,1 M, pH 8,0) gebracht. Vervolgens werden dithiobisnitrobenzoesaat (DTNB) en

acetylthiocholine toegevoegd; het afbraakproduct van acetylthiocholine, thiocholine, reageert met DTNB en het complex veroorzaakt een gele kleur. De toename van dit complex werd gedurende 5 minuten spectrofotometrisch (Versamax, Molecular Devices Corporation) bepaald bij 37°C en 405 nm.

2.4.3.2 EROD/porfyrynes

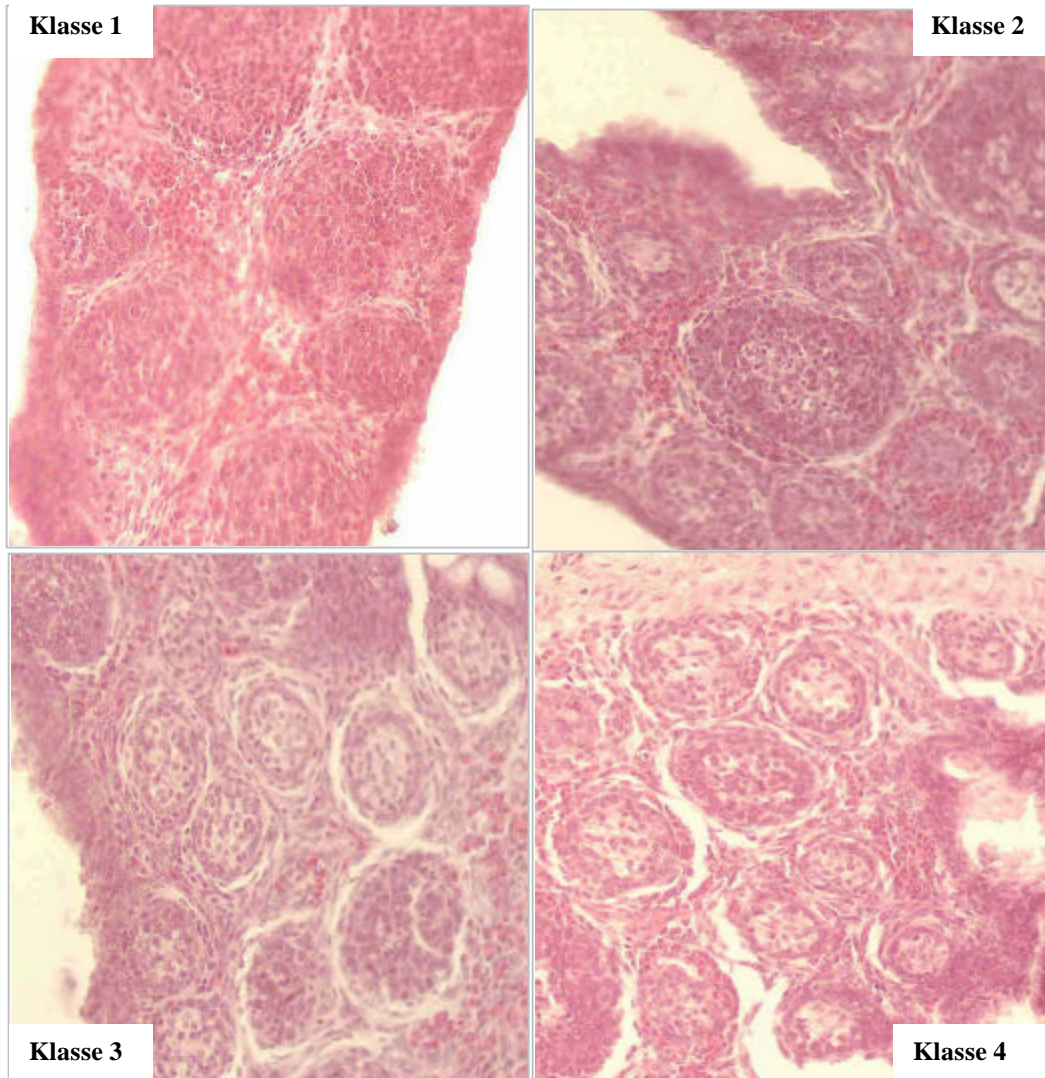
Levers werden door centrifugale fractionering opgewerkt tot microsomen. Daartoe werden de levers ontdooid op ijs en met een potter S gehomogeniseerd in een fosfaatbuffer met EDTA (0,125M/0,1M, pH=7,6). Van het homogenaat werd een monster genomen voor de bepaling van de porfyryneconcentratie; de rest werd gecentrifugeerd in de ultracentrifuge bij 15.000 g en 4°C. Het verkregen supernatant werd gecentrifugeerd bij 150.000 g. De pellet die aldus ontstond werd opgenomen in fosfaatbuffer met glycerol (20%) en geresuspendeerd met de potter S. De zo verkregen microsomen werden bewaard bij -80°C.

Porfyrynes werden uit leverhomogenaat geëxtraheerd in een mengsel (3:5) van tris buffer (50 mM, pH 8,0) en trichloorazijnzuur (25 %). In een microtiter plaat werd 20 µl 0,9% NaCl en 180 µl extract gepipetteerd, de plaat werd geschud en vervolgens 5 minuten op een UV lichtbron geplaatst om eventueel niet omgezet uroporfyrinogeen om te zetten in uroporfyryne. Daarna werd de plaat gecentrifugeerd bij 5000 g, en de concentratie porfyrynes in het supernatant werd in een cytofluor II multiwell platerader (Perseptive Biosystems, USA) gemeten tegen een ijklijn van coproporfyryne (0,5 µg/ml in 1 N HCl) bij een excitatiegolflengte van 400 nm. en een emissiegolflengte van 590 nm.

Ethoxy-resorufine-*O*-deethylase (EROD) activiteit werd bepaald in de microsomale fractie van de lever. Hiertoe werd 10 µl microsomen opgenomen in 230 µl van een oplossing van trisbuffer (80 mM, pH=8), bovine serum albumine (BSA, 1,14 mg/ml) en 7-ethoxyresorufine (4,5 µM). De reactie werd gestart door toevoeging van 20 µl NADPH (3 mM) en de vorming van resorufine werd gedurende 30 minuten gemeten bij een excitatiegolflengte van 530 nm. en een emissiegolflengte van 590 nm.

2.4.3.3 Eiwitbepaling

Eiwitconcentraties in microsomen werden op microtiter platen bepaald met de BCA protein assay reagent van Pierce. Na toevoeging van 200 µl reagens aan 25 µl (20x verdunde) microsomen werd de multiwell plaat 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Daarna werd de plaat afgekoeld tot kamertemperatuur en de absorptie werd gemeten tegen een ijklijn van BSA in een spectrofotometer (Versamax, Molecular Devices Corporation) bij een golflengte van 562 nm.



Figuur 2. Klassificering van de bursa van Fabricius, gebaseerd op lymfocytendichtheid. Klasse 1: normale follikels, gelegen aan de rand van het weefsel, en met een hoge dichtheid aan lymfocyten; Klasse 4: duidelijk afwijkend, weinig follikels, die ook kleiner zijn en een lagere dichtheid aan lymfocyten bevatten. Klassen 2 en 3 zijn gradaties tussen deze twee uitersten.

Eiwitconcentraties in hersensupernatant werden fluorimetrisch bepaald door 50 μl van het (verdunde) monster op te nemen in 150 μl van een oplossing van 33,3 mM natriumfosfaatbuffer (pH=8) en 33,3 mM NaOH. Na toevoeging van 50 μl fluorescamine (1,08 mM in aceton) werd de eiwitconcentratie gemeten tegen een standaard van BSA (2 mg/ml) bij een excitatiegolflengte van 360 nm. en een emissiegolflengte van 460 nm.

2.4.4 Histologie

De in unifix gefixeerde organen (bursa van Fabricius) werden gedehydrateerd met behulp van oplopende concentraties alcohol en ingebed in paraffine. Coupes van 4-5 μm werden gesneden op een microtoom en gekleurd met haematoxyline en eosine. De coupes werden bij een vergroting van 200x beoordeeld op lymfocytendichtheid. Hiertoe werd de volgende klassificering gebruikt: 1, normale follikels, gelegen aan de rand van het weefsel, en met een hoge dichtheid aan lymfocyten; 4, duidelijk afwijkend, weinig follikels, die ook kleiner zijn en een lagere dichtheid aan lymfocyten bevatten. Klassen 2 en 3 zijn gradaties tussen deze twee uitersten. Figuur 2 geeft de verschillende klassen weer.

2.4.5 Statistiek

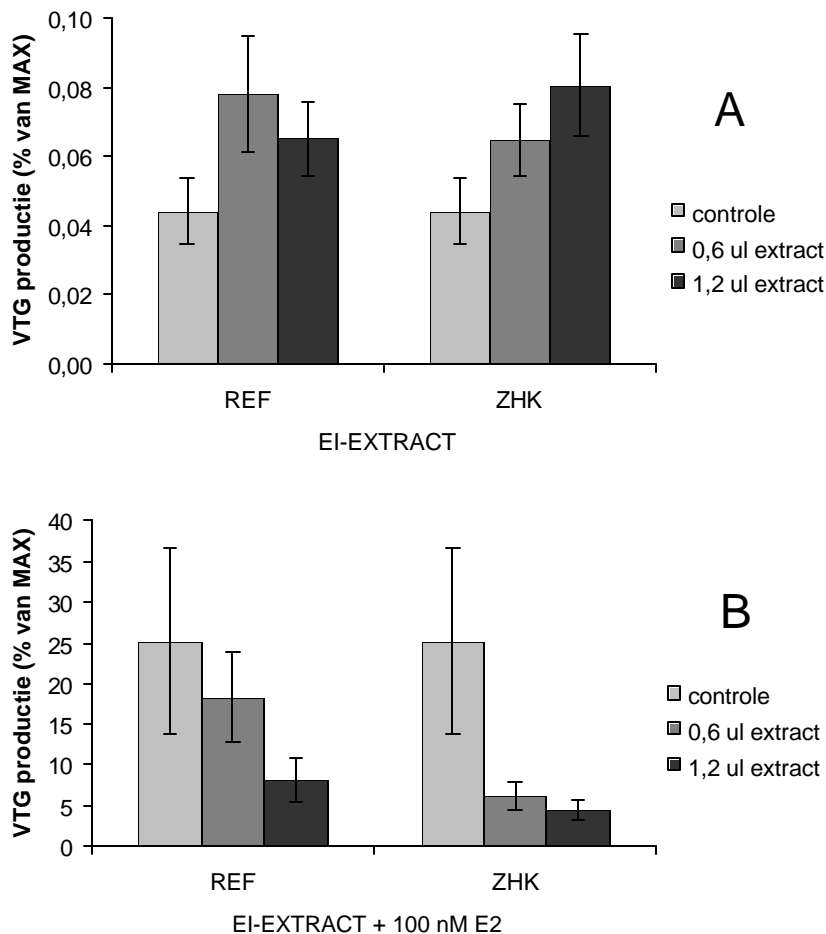
Verschillen in mortaliteit en bursa index tussen de verschillende groepen werden getest met een t test na logit transformatie van de data. Embryo-, dooier- en orgaangewichten werden getest met een ANOVA. Enzymactiviteiten en porfyriengehalten werden getest met een ANOVA om verschillen tussen groepen te vinden en met een regressie analyse om trends te achterhalen. Deze analyses werden uitgevoerd na logtransformatie van de doseringen. Hierbij werd een overschreidingskans (α) van 0,05 aangehouden.

3 Resultaten

3.1 CARPHEP bioassay

Figuur 3 toont de resultaten van de vtg inductie in de CARPHEP assay. Het oestrogene effect van de ei-extracten is niet significant afwijkend van het effect van DMSO (zie figuur 3a). De waargenomen verhoging tot circa 0.08% ligt binnen het bereik van de normale achtergrondschommelingen.

Wel is een anti-oestrogeen effect van de ei-extracten te zien (figuur 3b). Het extract van de eieren uit het zeehavenkanaal gaf in beide verdunningen een significante afname van de E2 geïnduceerde VTG productie te zien. Het extract van de referentie eieren gaf alleen bij de hoogste toediening (1.2 µl) een afname van de Vtg productie te zien. Bij een lagere concentratie (0.6 µl) was geen significante afwijking van de controle te zien.

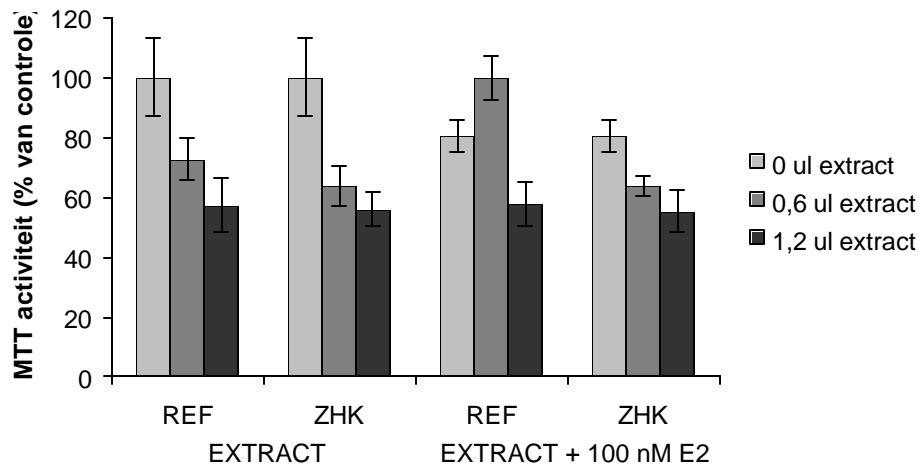


Figuur 3. Oestrogene (A) en anti-oestrogene (B) activiteit van scholekster-ei extracten; gemiddelden met standaarddeviaties. Vtg productie in CARPHEP assay zonder (A) of met (B) toevoeging van 1000 nM E2 aan het incubatiemengsel.

3.1.1 Mitochondriële activiteit

De afname van de mitochondriële activiteit van de cellen na blootstelling aan de ei-extracten (figuur 3) in combinatie met geen of nauwelijks vitellogenine productie kan duiden op een mogelijk cytotoxisch effect van de extracten. In dit geval kan niet worden uitgesloten dat de anti-estrogene effecten die hiervoor zijn beschreven, gedeeltelijk veroorzaakt worden door de cytotoxische effecten van de milieu-monsters. Om eventuele cytotoxiciteit vast te stellen is de mitochondriële activiteit van de hepatocyten bepaald op de laatste dag van het experiment (8 dagen na isolatie). De mitochondriële activiteit is met behulp van de MTT- test bepaald. De mitochondriële activiteit van hepatocyten die blootgesteld waren aan milieu-monsters is gerelateerd aan die van hepatocyten die alleen aan medium waren blootgesteld (controle cellen).

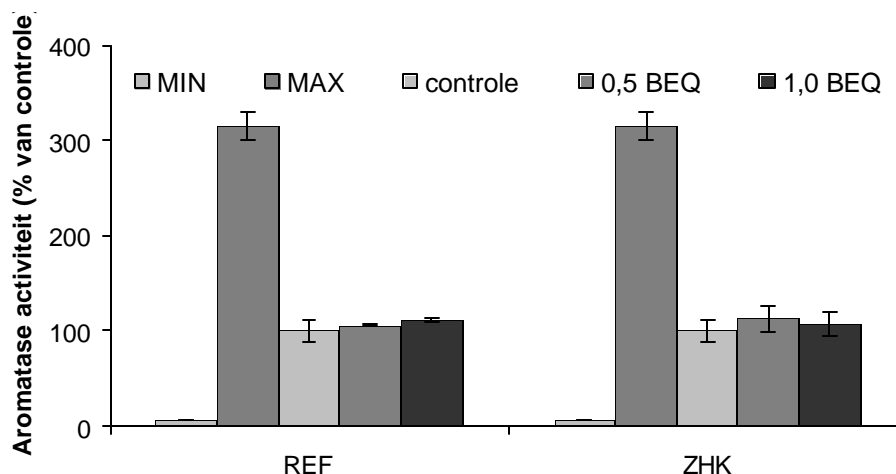
Uit de figuren 3b en 4 blijkt, dat in de gevallen waarin een anti-oestrogene werking van de extracten is waar genomen, de MTT activiteit verlaagd was.



Figuur 4. Mitochondriële (MTT) activiteit van cellen in CARPHEP assay.

3.2 Aromatase

De resultaten van het aromatase assay (figuur 5) laten zien dat de scholekster-ei extracten geen effect op de aromatase activiteit veroorzaken. 4-HA remt de aromatase activiteit sterk en 8-Br-cAMP veroorzaakt een sterke stijging van de activiteit. Dit duidt erop dat het systeem beïnvloedbaar is door toevoeging van remende of inducerende stoffen. De aromatase activiteit in de aan de ei-extracten (0.5 en 1.0 ei-equivalent) blootgestelde cellen is echter niet verschillend van de activiteit in de controle cellen



Figuur 5. Aromatase activiteit in H295R aromatase assay na blootstelling aan scholekster-ei extract. MIN = respons na blootstelling aan aromatase remmer 4-hydroxy androsteendion; MAX = respons na blootstelling aan aromatase inductor 8-bromo-cyclic adenosine monofosfaat (8-Br-cAMP); controle = respons van controle cellen; 0.5 EEQ = respons na blootstelling aan 0.5 ei-equivalent ; 1.0 EEQ = respons na blootstelling aan 1.0 5 ei-equivalent (1 ei-equivalent = gemiddeld extract van één ei).

3.3 Kippenei bioassay

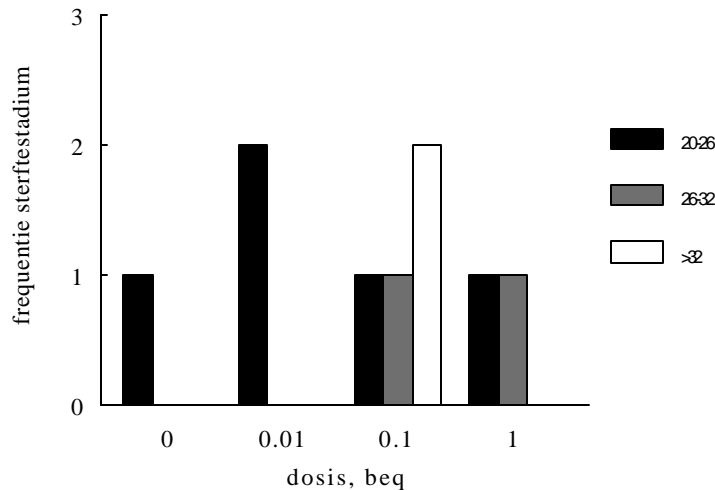
3.3.1 Mortaliteit, biometrie

De mortaliteit onder de embryo's in het bioassay varieerde van 10 % in de controlegroep tot 50% in de middelste dosisgroep (tabel 1). Er werd geen dosis afhankelijke toename gevonden ($p=0.325$). Wel was er een lichte trend te zien met betrekking tot tijdstip van overlijden: in de controle groep en de laagste dosisgroep trad sterfte in de vroegste stadia op, terwijl in de hogere dosisgroepen ook enkele embryo's tijdens een later stadium stierven (figuur 6). Er werden geen significante verschillen gevonden voor embryogewicht of dooiergewicht ($p>0,7$). Ook de orgaangewichten waren voor de verschillende doseringsgroepen niet significant verschillend van elkaar ($p>0,5$; tabel 1).

Tabel 1. Mortaliteit, het aantal levende embryo's en bevruchte eieren, en biometrische gegevens (gemiddelde \pm standaard deviatie) van 19 dagen oude kippenembryo's na blootstelling aan scholeksterei-extract. Waarnemingen van gewichten zijn gebaseerd op levende embryo's.

Dosis (eeq)	Mortaliteit (%)	N_{lvd}/N_{bvrcht}	Embryo (g)	Dooier (g)	Lever (mg)	Hersenen (mg)	Bursa (mg)
0	10	9/10	23,6 \pm 3,6	13,2 \pm 2,6	521 \pm 81	756 \pm 76	27,8 \pm 8,2
0,01	25	6/8	25,4 \pm 5,6	11,5 \pm 3,6	526 \pm 108	774 \pm 122	31,0 \pm 6,7
0,1	50	4/8	22,8 \pm 3,1	12,1 \pm 3,3	500 \pm 64	758 \pm 84	29,0 \pm 11,2
1,0	18	9/11	23,6 \pm 5,8	12,2 \pm 2,0	507 \pm 140	734 \pm 119	26,0 \pm 11,6

NB. $N_{lvd}/N_{bvrcht} = N \text{ levend} / N \text{ bevrucht}$



Figuur 6. Frequentieverdeling van stadia van overlijden van embryo's blootgesteld aan verschillende concentraties scholeksteri-extract. Stadium 20 komt overeen met ± 3 dagen, stadium 26 met ± 5 dagen, stadium 32 met $\pm 7,5$ dagen.

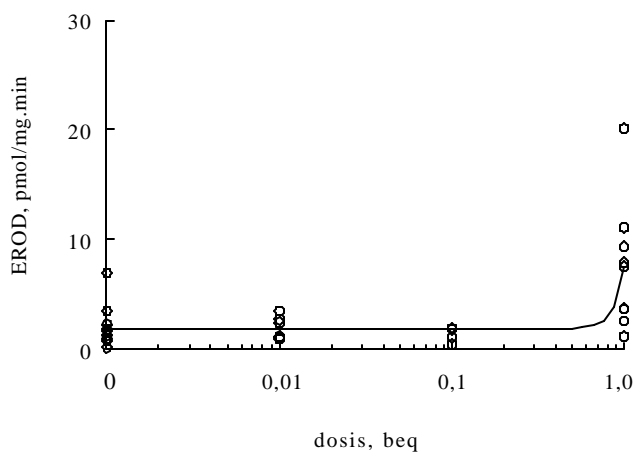
3.3.2 Misvormingen

In de controlegroep kwamen geen misvormingen voor. In de laagste dosisgroep (0,01 eeq) werden ook geen misvormde embryo's aangetroffen. In de groep die aan 0,1 eeq was blootgesteld, vertoonden twee van de acht embryo's onderhuidse bloedingen; deze embryo's waren gestorven na stadium 32. Twee van de vier overlevende embryo's in deze groep hadden tenen die naar de verkeerde kant bogen en een slappe nek; één van deze twee miste bovendien een schedeldak. In de hoogste dosisgroep vertoonden drie van de negen levende embryo's misvormingen: twee van de drie hadden oedeem in het hartzakje en de derde had tenen die naar de verkeerde kant bogen en miste een schedeldak.

3.3.3 Enzymbepalingen

3.3.3.1 EROD activiteit

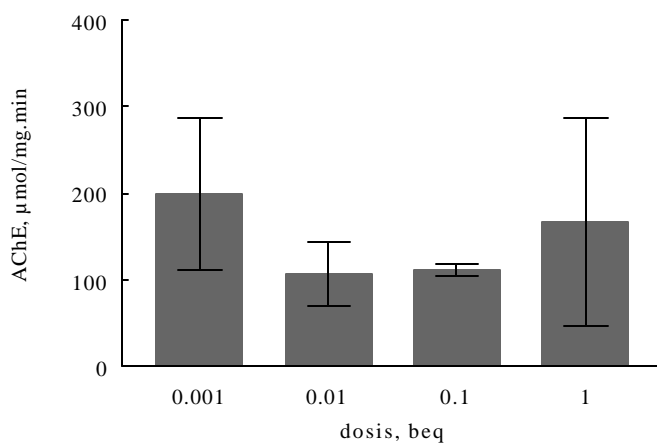
De EROD activiteit is weergegeven in figuur 7. In de hoogste dosisgroep was de activiteit significant verhoogd ten opzichte van zowel controles als lagere dosisgroepen ($p=0.008$); de inductiefactor ten opzichte van de controles bedroeg $\pm 3,5x$. De toename met oplopende dosis kon met een exponentieel regressiemodel worden beschreven volgens de formule: $EROD=5.515*57306355^{\log(eeq)+1.926}$; $p=0.003$.



Figuur 7. EROD activiteit in microsomale fractie van levers van 19 dagen oude kippenembryo's blootgesteld aan verschillende concentraties scholeksterei-extract. Regressie is exponentieel, $p=0.003$.

3.3.3.2 Acetylcholinesterase activiteit

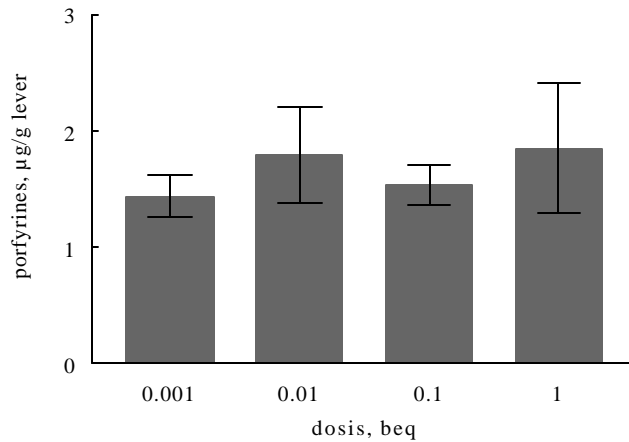
De activiteit van acetylcholinesterase werd niet geremd door de stoffen in het scholeksterei-extract. Figuur 8 geeft de gemeten activiteiten in embryoherenen weer; er bestonden geen significante verschillen in activiteit tussen de verschillende dosisgroepen ($p=0.181$).



Figuur 8. Activiteit van acetylcholinesterase in hersenen van 19 dagen oude kippenembryo's blootgesteld aan verschillende concentraties scholeksterei-extract.

3.3.4 Porfyriestapeling

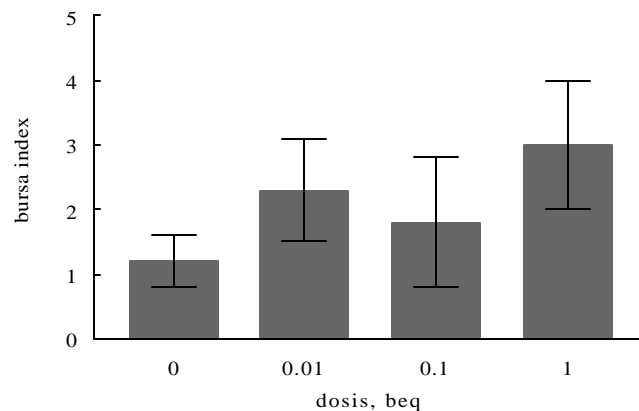
De porfyrieneconcentraties in de levers zijn weergegeven in figuur 9. Er werden geen significante verschillen gevonden ten opzichte van de controlegroep ($p=0.141$).



Figuur 9. Porphyrineconcentraties in levers van 19 dagen oude kippenembryo's blootgesteld aan verschillende concentraties scholeksterei-extract.

3.3.5 Histologie

De bursa van Fabricius is een orgaan dat in gezonde dieren een duidelijk herkenbare structuur bezit. Het orgaan bestaat uit een omhullend, geplooid weefsel van licht gekleurde cellen en bloedsinussen met daarin duidelijk afgegrensde, dichtbevolkte en daardoor donkergekleurde follikels met B-lymfocyten. Deze structuur (klasse 1) werd met name in de controlegroep gevonden, en veel minder in blootgestelde embryo's. De mate van afwijking van het normale beeld werd geklassificeerd van normaal (klasse 1) tot duidelijk afwijkend (klasse 4), met twee tussenklassen (2 en 3). In klasse 4 werden follikels aangetroffen die lichter gekleurd waren en veel minder B-lymfocyten bevatten, en bovendien minder abundant over het bursaweefsel verspreid waren. In figuur 9 wordt de gemiddelde klasse (bursa index) per dosis groep vermeld. Deze index bleek dosisafhankelijk toe te nemen ($p=0.002$).



Figuur 9. Bursa index in 19 dagen oude kippenembryo's blootgesteld aan verschillende concentraties scholeksterei-extract. De toename is significant ten opzichte van de controle (regressie analyse onder binomiale verdeling: $p=0.002$).

4 Discussie

In het CARPHEP assay is geen dosis-afhankelijke toename van de vittelogenine productie waargenomen. De variaties die wel zijn waargenomen (verhoging tot circa 0.08%) liggen binnen het bereik van de normale achtergrondsommelingen en duiden dus niet op een oestrogene potentie van de ei-extracten. Ter vaststelling van een eventuele anti-oestrogene werking is het effect gemeten bij gelijktijdige blootstelling aan oestradiol. De resultaten hiervan suggereren een anti-oestrogeen effect van de extracten. Een remming van de vtg productie werd waargenomen na blootstelling aan beide doseringen van het zeehavenkanaal ei-extract en na blootstelling aan de hoogste dosering van het referentie ei-extract. De effecten zijn echter gecorreleerd aan de mitochondriële activiteit in de cellen zoals gemeten in het MTT assay. Deze resultaten duiden op het optreden van cytotoxiciteit ten gevolge van blootstelling aan de extracten, waarbij vervolgens de vtg productie in de celcultuur sterk gereduceerd wordt. Een dergelijk cytotoxisch effect zou het schijnbare afwezig zijn van oestrogene effecten (waarvan het optreden gebaseerd wordt het uitblijven van een verhoogde vtg productie) en het schijnbaar aanwezig zijn van anti-oestrogene effecten (waarvan het optreden gebaseerd wordt op een afgenomen vtg productie) kunnen verklaren. Het assay geeft op grond van de uitkomsten van het MTT assay dus niet eenduidig aan of de in het ei aanwezige stoffen een oestrogene of anti-oestrogene potentie bezitten. Een uitgebreidere concentratie-respons experiment met subcytotoxische concentraties extract zou hierover uitsluitsel kunnen geven. Wel geeft het aan dat bepaalde stoffen in het ei-extract, welke in eieren uit het zeehaven kanaal in hogere mate aanwezig zijn dan in eieren uit het referentie gebied, een schadelijke invloed hebben op de viabiliteit van de cellen. De concentraties waarbij een dergelijk effect optreedt in het vogelembryo en de consequenties van een dergelijk effect zijn onbekend.

Uit de resultaten van het aromatase assay blijkt geen effect van het ei-extract op de omzetting van androgenen in oestrogenen. Hiermee lijkt het niet waarschijnlijk dat de steroidgenese langs deze weg verstoord wordt in scholeksters langs het zeehavenkanaal.

Uit het kippenei-injectie assay bleek dat de mortaliteit niet toeneemt met toenemende dosis van het extract. Dit is in tegenstelling met eerdere bevindingen van een toegenomen sterfte na blootstelling aan oplopende concentraties hexachloorbenzeen (de Roode et al 2001). In dat experiment, waarin zuiver HCB werd toegediend, bedroeg de hoogste concentratie HCB 167 µg/kg (gebaseerd op een extreem hoge concentratie in één ei); in het huidige experiment was de concentratie HCB in 1 eeq van het extract in ieder geval lager dan 167 µg/kg, omdat 1 eeq was gebaseerd op de concentratie in een gemiddeld ei. Bovendien leek de concentratie in het extract lager te zijn dan die in het eerste extract (met een gemiddelde waarde van 70 µg/kg in het ei), hoewel er geen volledige analyse is uitgevoerd. Waarschijnlijk ligt de hoogste concentratie HCB in het huidige experiment tussen de laagste drie doseringen van het beschreven experiment (11-77 µg/kg), waarbij geen verhoging van de mortaliteit

werd geconstateerd. Daarmee ligt de concentratie HCB beneden de daar berekende LD50 van 86 µg/kg HCB in kippeneieren. Overigens is het opvallend dat in tegenstelling tot de eerder waargenomen toename in sterfte tijdens de vroege ontwikkelingsstadia na toenemende blootstelling aan HCB, in het huidige experiment een toename in sterfte tijdens de latere ontwikkelingsstadia werd gevonden. Mogelijk is dit het gevolg van de lagere concentraties contaminanten in het huidige experiment en een aselekt optredende sterfte binnen de verschillende groepen; een verhoging van de sterfte in de vroege stadia is eerder beschreven als effect bij toenemende concentraties aan contaminanten (Carlson en DUBY 1973).

Uit literatuurgegevens is bekend dat de kip in vergelijking met andere vogelsoorten extreem gevoelig is voor gechloreerde koolwaterstoffen (Brunström en Reuthergård 1986; Brunström 1988; Bosveld 1995; Sanderson and Bellward, 1995; Powell et al. 1997, Hoffman et al 1998). Op basis daarvan is het aannemelijk dat, bij de huidige HCB concentraties, scholeksterembryo's geen effecten op overleving zullen ondervinden. Een studie naar het reproductiesucces van een andere vogelsoort, de Californische slechtvalk, onderschrijft dit. In eieren van deze valken werden in de periode van 1989-1991 concentraties van 17-800 µg/kg (natgewicht) aan HCB gemeten; geen van deze eieren kwam uit (Jarman et al 1996). Bij een gemiddelde concentratie van 11 µg/kg kwamen bijna alle eieren uit. De concentraties in deze studie waren gemeten in het hele ei en zijn te converteren naar concentraties in de dooier door vermenigvuldiging met 3 (de dooier maakt 33% van het eigewicht uit en HCB concentreert zich met name in de dooier); bij een concentratie van 33 µg/kg werden dus geen effecten op overleving waargenomen.

Er werden geen significante effecten gevonden op orgaangewichten of embryogewichten. Dit is geheel in overeenstemming met de verwachting, gezien het ontbreken van dergelijke effecten na blootstelling aan hogere concentraties HCB dan aanwezig in het huidige extract (de Roode et al 2001). Blijkbaar zijn er in het extract ook geen andere contaminanten in zodanige hoeveelheden aanwezig dat zij effect hebben op de groei. Dit is in overeenstemming met een studie waarin kippenembryo's werden blootgesteld aan extract van Baltische zeekoeten; in deze extracten waren hoge concentraties aan contaminanten aanwezig (de concentratie aan PCBs bedroeg ±7 µg/g vet, dioxines en furanen (1-8 ng/g vet) en HCB 430 ng/g vet), maar die resulteerden niet in effecten op groei of energieverbruik (de Roode et al, submitted).

De misvormingen die werden waargenomen in embryo's blootgesteld aan 0,1 en 1,0 eeq, kwamen niet overeen met misvormingen die werden waargenomen na blootstelling aan HCB alleen, waarin embryo's andere misvormingen vertoonden (de Roode et al 2001). Ze zijn echter wel bekend van andere studies, waarin bij embryo's na blootstelling aan contaminanten als PCBs, dioxinen, PAKs en olie een heel scala aan misvormingen werd aangetroffen (voor overzicht zie Gilbertson et al 1991).

Een overeenkomst tussen het vorige en het huidige experiment is dat alle embryo's met misvormingen in ieder geval tot en met stadium 32 hadden geleefd. Mogelijk

heeft dit te maken met de moeilijkheid om misvormingen bij jongere embryo's vast te stellen, in verband met hun geringe afmetingen.

De EROD activiteit was significant verhoogd in embryo's die waren blootgesteld aan 1 eeq. Hoewel de concentratie van HCB in het huidige experiment te laag was om EROD te induceren (Machala et al 1996; de Roode et al 2001), waren er in het extract ook andere stoffen aanwezig, die mogelijk aan de Ah receptor binden en EROD induceren. EROD inductie is in verschillende studies in verband gebracht met een toename in sterfte en abnormaliteiten onder embryo's (Hoffman et al 1987, Sanderson et al 1994). De waargenomen EROD inductie in het huidige bioassay duidt dus op een verhoogd risico op dergelijke toxische effecten.

Het is bekend dat de kip met betrekking tot EROD inductie veel gevoeliger is dan wilde vogels; voor eenzelfde mate van inductie was in visdieren een 250x zo hoge concentratie PCB126 nodig (Brunström en Halldin 1998). In primaire hepatocyten van verschillende vogelsoorten bleken de effectieve concentraties voor eenzelfde mate van inductie ook tussen wilde vogelsoorten sterk te verschillen: de effectieve concentratie van PCB126 was in visdieren 80x zo hoog als in de kip, en in de zilvermeeuw zelfs 450x (Bosveld, 1995). Een aan de visdief verwante soort, de Forster's stern bleek 200 x minder gevoelig dan de kip (Sanderson et al 1998). Ook de reiger en de aalscholver bleken 10-100x minder gevoelig voor EROD inductie dan de kip (Sanderson en Bellward 1995).

Scholeksters zijn in staat organochloorverbindingen te metaboliseren (Everaarts et al 1991), maar hun relatieve gevoeligheid ten opzichte van de kip is niet bekend. Echter, gebaseerd op de lage EROD inductiefactor (3,5x), die alleen optrad in de hoogste doseringsgroep (1 eeq), en het grote verschil in gevoeligheid tussen kip en wilde vogels, lijkt het niet waarschijnlijk dat scholeksters een verhoging van de EROD activiteit zullen ondervinden. Daarmee zijn eventueel aan EROD inductie gerelateerde toxische effecten in de scholekster evenmin waarschijnlijk.

Porfyriestapeling in levers van vogels is een bekend effect van hexachloorbenzeen (Vos en Koeman 1970; Vos et al. 1971; Carpenter et al. 1985). Ook PCBs veroorzaken, mogelijk via een ander mechanisme, porfyriestapeling in de lever (Marks 1985; Miranda et al. 1987). In het huidige experiment werd geen accumulatie van porfyrienes gevonden, waarschijnlijk omdat concentraties van porfyriogene contaminanten lager waren dan de minimum effectieve concentraties. Porfyriestapeling is beschreven in studies waarin concentraties van 500 mg/kg HCB of PCBs in het voedsel werden toegediend (Carpenter et al 1985, Miranda et al 1987), wat voor PCBs resulteerde in een concentratie van 50 µg/g in de lever (Elliott et al 1990). In de veldsituatie is porfyriestapeling gevonden in zilvermeeuwen met leverconcentraties van 35 µg/g aan PCBs en 0,8 ng/g dioxines (Fox et al 1998). Hoewel de kip gevoeliger is voor effecten zoals EROD inductie dan wilde vogels, is gebleken dat ze niet eenduidig gevoeliger is voor porfyriestapeling (Sanderson et al 1998). De relatieve gevoeligheid van de scholekster voor porfyriogene stoffen is niet bekend. Dit gegeven, en het ontbreken van actuele concentraties van PCBs en andere contaminanten, maakt het moeilijk een voorspelling te doen met betrekking tot het

risico op verstoring van de heemsynthese bij scholeksters. Aannemende dat de kip en de scholekster niet veel verschillen in gevoeligheid, lijkt er op grond van de resultaten van het kippenembryo bioassay geen risico te bestaan. Dit wordt bevestigd door een studie aan reigers, waarin wel een inductie van EROD activiteit van 2,5x, maar geen effecten op porfyryneconcentraties werd gemeten (Bellward et al 1990).

In het bioassay werden geen effecten gevonden op het enzym acetylcholinesterase. Dit duidt erop dat organofosfaten of carbamaten niet in effectieve concentraties in het scholeksterei-extract aanwezig waren. Tot nog toe is er geen duidelijkheid betreffende soortafhankelijke verschillen in gevoeligheid voor acetylcholinesterasremming; daarom is het moeilijk een extrapolatie te maken naar de scholekster. Als echter de kip ook voor deze parameter de meest gevoelige soort is, is op grond van de resultaten van het bioassay niet te verwachten dat er effecten in scholeksterembryo's zullen optreden. Veranderingen in gedrag en ontwikkeling zijn beschreven in vogels waarin de acetylcholinesterase activiteit ongeveer 30% geremd was (Cho en Lee, 1990, Hart, 1993). Dergelijke veranderingen zullen dus waarschijnlijk niet in de scholeksters voorkomen.

De bursa van Fabricius is een belangrijk orgaan in vogelembrयो's en kuikens. Het is het orgaan waarin de B-lymfocyten rijpen (Glick 1983, Nikolaidis et al 1988), en daardoor bepalend is voor de immunocompetentie van de vogel. Met name tijdens de embryonale ontwikkeling en de eerste weken na uitkomen is de bursa van belang, omdat het evenals de thymus verdwijnt bij het ouder worden van de vogel. Daarmee is de status van het orgaan tijdens de vroege levensstadia mede bepalend voor de weerstand van de vogel tijdens de rest van zijn leven.

Effecten op de bursa van Fabricius zijn beschreven voor verschillende contaminanten. Een verlaagd bursagewicht werd gevonden in aalscholvers die aan TCDD en PCB126 waren blootgesteld, alsook in kuikens van visdieren, die via het voedsel verschillende contaminanten binnen kregen (Powell et al 1998, Bosveld et al 2000). Verlaging van de lymfocytendichtheid lijkt een gevoeliger parameter en is beschreven voor onder andere PCBs (Brunström et al 1990, Andersson et al 1991, Hoffman et al 1996, Grasman et al 2001), TCDD (Nikolaidis et al 1988 en 1990) en hexabroombiphenyl (Vos en van Genderen 1973). Uiteindelijk kan een verlaging van de lymfocytendichtheid, zoals bij blootstelling aan scholeksterei gevonden is, negatieve gevolgen hebben voor de immunocompetentie van de kuikens (Hoffman et al 1996, Grasman et al 2001). Om te achterhalen in hoeverre de immunocompetentie is aangetast, zouden functietesten moeten worden uitgevoerd. Bij dergelijke testen wordt de immunorespons gemeten na blootstelling aan een actief agens. Zonder functietesten is niet bewezen dat scholeksterembryo's in de kolonie op de schermduik bij het Zeehavenkanaal een verlaagde immunocompetentie hebben. Gebaseerd op de waargenomen afname in lymfocytendichtheid in het huidige experiment, kan een verlaagde weerstand echter niet worden uitgesloten.

5 Conclusies

Uit in vitro assays waarin de ei-extracten onderzocht zijn op hun potentie om oestrogene of anti-oestrogene effecten te veroorzaken, of om de hormoon synthese te dereguleren, is niet eenduidig gebleken dat stoffen aanwezig in de ei-extracten langs een van deze mechanismen effecten in het organisme kunnen veroorzaken.

Uit het in ovo kippenembryo bioassay zijn wel effecten van de ei-extracten gebleken. Een verhoging van de EROD activiteit en een afname van de lymfocytendichtheid in de bursa van Fabricius is waargenomen, met name in de embryo's die waren blootgesteld aan 1 ei equivalent van het extract van scholekstereieren uit de kolonie op de scherm dijck bij het Zeehavenkanaal te Delfzijl. Blootstelling aan het extract resulteerde niet in effecten op embryo-, dooier- of orgaangewichten. Er werden ook geen effecten gevonden op de heemsynthese (geen porfyriestapeling), en de activiteit van acetylcholinesterase was niet geremd. De waargenomen afname van de dichtheid van B-lymfocyten in de bursa van Fabricius kan resulteren in een verlaagde immunocompetentie, hetgeen problemen kan opleveren als de kuikens worden blootgesteld aan infecties door bacteriën of virussen. Op basis van voornoemde resultaten is het niet uit te sluiten dat de contaminanten die aanwezig zijn in eieren van scholeksters in het Zeehavenkanaal negatieve effecten veroorzaken bij de ontwikkeling van scholeksterembryo's.

Literatuur

- Andersson, L., Nikolaidis, E., Brunström, B., Bergman, Å. and Dencker, L. Effects of polychlorinated biphenyls with Ah receptor affinity on lymphoid development in the thymus and the bursa of Fabricius of chick embryos in ovo and in mouse thymus anlagen in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 107, 183-188. 1991.
- Bellward, G.D., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., Elliott, J.E., Bandiera, S.M., Dworschak, C., Chang, T., Forbes, S. and Cadario, B. Correlation of polychlorinated dibenzodioxin levels with hepatic mixed function oxidase induction in great blue herons. *Chemosphere* 20 (7-9), 1087-1090. 1990.
- Bishop, C.A., Ng, P., Mineau, P., Quinn, J.S. and Struger, J. Effects of pesticide spraying on chick growth, behavior, and parental care in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) nesting in an apple orchard in Ontario, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (9), 2286-2297. 2000.
- Bosveld, A. T. C. Determination of toxic equivalency factors (TEFs) of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar biphenyls in the chicken embryo. *Chemosphere* 25, 911-916. 1992.
- Bosveld, A. T. C., Nieboer, R., de Bont, A., Mennen, J., Murk, A. J., Feyk, L. A., Giesy, J. P., and van den Berg, M. Biochemical and developmental effects of dietary exposure to polychlorinated biphenyls 126 and 153 in common tern chicks (*Sterna hirundo*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(3), 719-730. 2000.
- Bosveld, A.T.C. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on piscivorous avian wildlife. Ph.D. Thesis, Utrecht University, faculty of veterinarian sciences, Utrecht, the Netherlands. ISBN 90-393-0647-8. 1995.
- Brodie, A.M., Schwarzel, W.C., Shaikh, A.A. and Brodie, H.J., (1977). The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer. *Endocrinology* 100, 1684-1695.
- Brunström, B. Activities in chick embryos of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase and their induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in early embryos. *Xenobiotica* 16 (9), 865-872. 1986.
- Brunström, B. and Halldin, K. EROD induction by environmental contaminants in avian embryo livers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121, 213-219. 1998.
- Brunström, B. and Reutergårdh, L. Differences in sensitivity of some avian species to the embryotoxicity of a PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, injected into the eggs. *Environmental Pollution Series A* 42, 37-45. 1986.
- Brunström, B. Sensitivity of embryos from duck, goose, herring gull, and various chicken breeds to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Poultry Science* 67(52), 57. 1988.
- Brunström, B., Andersson, L., Nikolaidis, E., and Dencker, L. Non-*ortho*- and mono-*ortho*-chlorine-substituted polychlorinated biphenyls - embryotoxicity and inhibition of lymphoid development. *Chemosphere* 20(7-9), 1125-1128. 1990.

- Busby, D.G., White, L.M. and Pearce, P.A. Brain acetylcholinesterase activity in forest songbirds exposed to a new method of UUVL fenitrothion spraying. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20, 25-31. 1991.
- Carlson, R.W., and Duby, R.T. Embryotoxic effects of three PCBs in the chicken. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 9, 261-266. 1973.
- Carpenter, H. M., Williams, D. E., and Buhler, D.R. Hexachlorobenzene-induced porphyria in Japanese Quail: changes in microsomal enzymes. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 15, 431-444. 1985.
- Cho, J.-H. and Lee, C.-E. Effects of diazinon on the anatomical and embryological changes in the developing chick embryo. *RDA Journal of Agricultural Science* 32 (3), 35-47. 1990.
- De Roode, D.F., Gustavsson, B., Rantalainen, A.-L., Klomp, A.V., Koeman, J.H., Bosveld, A.T.C. Effects of persistent organic pollutants present in extracts of guillemots (*Uria aalge*) from the Baltic Sea and the Atlantic Ocean, on the developing chicken embryo. Submitted to *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- De Roode, D.F., Klomp, A.V., Rouhani Rankouhi, T., van den Berg, M. and Bosveld, A.T.C. Embryotoxische en (anti-)oestrogene effecten van hexachloorbenzeen. Responsmetingen in bioassays ter bepaling van risico's van HCB in het Zeehavenkanaal voor scholeksters. Intern rapport. 2001.
- Eggen, M., Janssen, G. en Bakker, J. Biomagnificatie van HCB in scholeksters. Poster, Bodembreed, november 2000.
- Elliott, J.E., Kennedy, S.W., Peakall, D.B. and Won, H. Polychlorinated biphenyl (PCB) effects on hepatic mixed function oxidases and porphyria in birds. I. Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96C (1), 205-210. 1990.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V. and Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95. 1961.
- Everaarts, J.M., de Buck, A., Hillebrand, M.Th.J. and Boon, J.P. Residues of chlorinated biphenyl congeners and pesticides in brain and liver of the oystercatcher (*Haematopus ostralegus*) in relation to age, sex and biotransformation capacity. *The Science of the Total Environment* 100, 483-499. 1991.
- Fox, G.A., Kennedy, S.W., Norstrom, R.J. and Wigfield, D.C. Porphyria in herring gulls: a biochemical response to chemical contamination of Great Lakes food chains. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 831-839. 1998.
- Gilbertson, M., Kubiak, T. J., Ludwig, J., and Fox, G. Great Lakes Embryo Mortality, Edema, and Deformities Syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 33, 455-520. 1991.
- Glick, B. Bursa of Fabricius. In: Farner, D.S., King, J.R. and Parkes, K.C., (Eds.) *Avian Biology*, Volume VII, pp. 443-500. New York: Academic Press. 1983.
- Grasman, K.A. and Whitacre, L.L. Effects of PCB 126 on thymocyte surface marker expression and immune organ development in chicken embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 62A, 191-206. 2001.

- Hart, A.D.M. Relationships between behaviour and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 321-336. 1993.
- Hoffman, D.J., Melancon, M.J., Klein, P.N., Eisemann, J.D. and Spann, J.W. Comparative developmental toxicity of planar polychlorinated biphenyl congeners in chickens, American kestrels, and common terns. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (4), 747-757. 1998.
- Hoffman, D.J., Melancon, M.J., Klein, P.N., Rice, C.P., Eisemann, J.D., Hines, R.K., Spann, J.W. and Pendleton, G.W. Developmental toxicity of PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in nestling American kestrels. *Fundamental and Applied Toxicology* 34, 188-200. 1996.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Sileo, L., Docherty, D. and Kubiak, T.J. Embryotoxicity, teratogenicity, and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in Fortster's tern on Green Bay, Lake Michigan. *Environmental Research* 42, 176-184. 1987.
- Jarman, W.M., Burns, S.A., Bacon, C.E., Rechten, J., DeBenedetti, S., Linthicum, J.L., and Walton, B.J. High levels of HCB and DDE associated with reproductive failure in prairie falcons (*Falco mexicanus*) from California. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 8-15. 1996.
- Krekels, M.D.W.G., Wouters, W., DeCoster, R., Van Ginckel, R., Leonaers, A. and Janssen, P.A.J., (1991). Aromatase in the human choriocarcinoma JEG-3, inhibition by R 76 713 in cultured cells and in tumors grown in nude mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 415-422.
- Lephart, E.D. and Simpson, E.R., (1991). Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol.* 206, 477-483.
- Machala, M., Matlova, L., Svoboda, I., and Nezveda, K. Induction effects of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and other widespread aromatic environmental pollutants on microsomal monooxygenase activities in chick embryo liver. *Archives of Toxicology* 70, 362-367. 1996.
- Marks, G.S. Exposure to toxic agents: the heme biosynthetic pathway and hemoproteins as indicator. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 15:151-179. 1985.
- Matz, A.C., Bennett, R.S. and Landis, W.G. Effects of azinphos-methyl on northern bobwhite: a comparison of laboratory and field results. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (7), 1364-1370. 1998.
- Miranda, C.L., Henderson, M.C., Wang, J.-L., Nakaue, H.S. and Buhler, D.R. Effects of polychlorinated biphenyls on porphyrin synthesis and cytochrome P450-dependent monooxygenases in small intestine and liver of Japanese quail. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 20, 27-35. 1987.
- Nikolaidis, E., Brunström, B. and Dencker, L. Effects of the TCDD congeners 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene on lymphoid development in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92, 315-323. 1988.
- Nikolaidis, E., Brunström, B., Dencker, L. and Veromaa, T. TCDD inhibits the support of B-cell development by the bursa of Fabricius. *Pharmacology and Toxicology* 67, 22-26. 1990.

- Parsons, K.C., Matz, A.C., Hooper, M.J. and Pokras, M.A. Monitoring wading bird exposure to agricultural chemicals using serum cholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (5), 1317-1323. 2000.
- Powell, D.C., Aulerich, R.J., Meadows, J.C., Tillit, D.E., Kelly, M.E., Stromborg, K.L., Melancon, M.J., Fitzgerald, S.D. and Bursian, S.J. Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin injected into the yolks of double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*) eggs prior to incubation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (10), 2035-2040. 1998.
- Rainey, W.E., Bird, I.M. and Mason, J.I., (1994). The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100, 45-50.
- Rainey, W.E., Bird, I.M., Sawetawan, C., Hanley, N.A., McCarthy, J.L., McGee, E.A., Wester, R. and Mason, J.I., (1993). Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 731-737.
- Sanderson, J.T. and Bellward, G.D. Hepatic microsomal ethoxyresorufin-O-deethylase-inducing potency in ovo and cytosolic Ah receptor binding affinity of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: comparison of four avian species. *Toxicology and Applied Pharmacology* 132, 131-145. 1995.
- Sanderson, J.T., Elliott, J.E., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., Hart, L.E., Cheng, K.M. and Bellward, G.D. Monitoring biological effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in great blue heron chicks (*Ardea herodias*) in British Columbia. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 41, 435-450. 1994.
- Sanderson, J.T., Kennedy, S.W. and Giesy, J.P. In vitro induction of ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrins by halogenated aromatic hydrocarbons in avian primary hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (10), 2006-2018. 1998.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P. and Van den Berg, M., (2000). 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121-127.
- Schielen, P., DenBesten, C., Vos, J.G., van Bladeren, P., Seinen, W., and Bloksma, N. Immune effects of hexachlorobenzene in the rat: role of metabolism in a 13-week feeding study. *Toxicology and Applied Pharmacology* 131, 37-43. 1995.
- Smeets, J.M.W., Rouhani Ranhouhi, T. et al. (1999). "In vitro vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti-) estrogenic activity of xenobiotics." *Toxicol. Appl. Pharmacol*
- Van den Brink. Probing for the invisible. The development of a monitoring system for global background levels of organochlorine pollutants in Antarctica. Ph. D. Thesis, Groningen University, Groningen, the Netherlands. ISBN 90-801112-9-5. 1997.
- Vos, J. G. and van Genderen, H. Toxicological aspects of immunosuppression. *Inter-American conference on toxicology and occupational medicine* , 527-545. 1973. *Pesticides and the Environment: a continuing controversy*, Conference Proceeding.

- Vos, J. G., van der Maas, H. L., Musch, A., and Ram, E. Toxicity of hexachlorobenzene in Japanese quail with special reference to porphyria, liver damage, reproduction, and tissue residues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 18, 944-957. 1971.
- Vos, J.G. and Koeman, J.H. Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chickens with special reference to porphyria, edema formation, liver necrosis, and tissue residues. *Toxicology and Applied Pharmacology* 17, 656-668. 1970.

