



Polluenten in paling – Onderzoek naar effecten van endocrien verstorende stoffen in paling uit Vlaamse oppervlaktewateren

Eindrapport

Versonnen B., Janssen C.

Universiteit Gent, Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie

Goemans G., Belpaire C.

Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer

December 2001

ONDERZOEKSOPDRACHT TWOL 2000 AMINAL/BG/IBW/2000-4

IBW.Wb.V.R.2002.92

Polluenten in paling – Onderzoek naar effecten van endocrien versturende stoffen in paling uit Vlaamse oppervlaktewateren.

IBW.Wb.V.R.2002.92

1. Inleiding

Dit onderzoek werd door het Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie van de Universiteit Gent uitgevoerd, in het kader van de onderzoeksopdracht TWOL 2000 Aminoal/BG/IBW/2000-4, in opdracht van het Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer.

In dit onderzoek wordt de mogelijkheid nagegaan om paling (*Anguilla anguilla*) te gebruiken bij het monitoren van hormoonverstoring, meer bepaald verstoring door stoffen met xeno-oestrogene werking, in Vlaamse oppervlaktewateren. Paling heeft als testsoort een aantal voordelen: vooreerst komt hij algemeen voor in Vlaanderen, is hij relatief eenvoudig te bemonsteren, is de soort vrij robuust en niet al te gevoelig aan behandelings-stress en heeft de soort zijn nut al bewezen bij eerdere biomarkerstudies (Van der Oost *et al.* 1997, Livingstone *et al.* 2000, Peyon *et al.* 1998, Huang *et al.* 1997, Ikeuchi *et al.* 1999,). Bovendien zijn de kenmerken van vitellogenine (de biomarker gebruikt in dit onderzoek), zoals het moleculair gewicht en de subunits, gekend, zodat gericht onderzoek naar deze biomarker kan gevoerd worden (Livingstone *et al.* 2000, Hara *et al.* 1980). Daarnaast bevinden deze vissen zich gedurende een lange tijd in een soort van ‘interseks’ toestand (hoewel hierover nog discussie bestaat) waarbij het voortplantingsstelsel zowel mannelijke als vrouwelijke kenmerken vertoont (Peters *et al.* 2001). Verder is geweten dat paling met oestrogene stoffen kan geïnduceerd worden zodat hij vitellogenine produceert (Livingstone *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001). In vergelijking met andere soorten (zoals b.v. blankvoorn, *Rutilus rutilus*) is paling minder gevoelig aan vervuiling en verwacht men dat hij ook minder gevoelig is voor hormoonverstoring (Livingstone *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001). Eerder vernoemde kenmerken van paling (algemeen voorkomen, bemonsterbaar...) maken echter dat hij – ondanks zijn relatieve ongevoeligheid voor vervuiling – een goede monitoringssoort zou kunnen zijn.

2. Doelstelling

Het doel van dit onderzoek was het ontwikkelen van technieken om verstoring door xeno-oestrogene stoffen te detecteren en het nagaan of en in hoeverre paling effecten vertoont, veroorzaakt door endocrien versturende stoffen (xeno-oestrogenen in het bijzonder). Hiervoor werd het specifiek-vrouwelijk eiwit vitellogenine (VTG) op verschillende manieren gedetecteerd in palingen.

- Eiwitelektroforese: bepaling van de concentratie VTG in het bloedplasma.
- Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction: aanwezigheid van het VTG messenger RNA in de lever.
- Alkali Labile Phosphate: onrechtstreekse maat voor het VTG-gehalte, via de meting van alkali labiel fosfaat in bloedplasma.

3. Materiaal en methode

3.1. Bloedafname en dissectie lever

Na verdoving van de palingen (bewaren bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), werd met heparine-gespoelde naalden bloed afgenomen via de caudale ader. Dit bloed werd overgebracht in steriele 2 ml eppendorf recipiënten en op ijs bewaard. Na de bloedafnames werden de stalen gecentrifugeerd ($2000 \times g$, 10 minuten). Het plasma werd overgebracht in een nieuw eppendorffje, bevroren in vloeibare stikstof en na transport bewaard bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Een stukje lever werd steriel gedissecteed en overgebracht in een eppendorffje, waarna het onmiddellijk bevroren werd in vloeibare stikstof. Na transport in vloeibare stikstof werden deze stalen bewaard bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Staalvoorbereiding

Alvorens tot de meting van VTG over te gaan, werd het eiwitgehalte van de verschillende stalen nagegaan. Deze meting gebeurde via de zgn. Bradford-methode (Bradford 1976). Leverstalen gebruikt voor eiwitelektroforese werden gehomogeniseerd in Tris-HCl.

3.3. Eiwitelektroforese

Denaturerende Sodium-Dodecyl-Sulfaat Polyacrylamide Gel Electroforese (SDS-PAGE) werd uitgevoerd op de verschillende plasmastalen met een Bio Rad Protean II xi Cell elektroforese toestel (Bio Rad, Eke, België). Per staal werd een hoeveelheid plasma geladen op de gel, overeenkomend met $10\text{ }\mu\text{g}$ eiwit en eiwitelektroforese werd uitgevoerd volgens Laemmli (1970). De gels bestonden uit een scheidende gel (33,5 ml gedestilleerd water; 25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 1 ml 10 % SDS-oplossing; 40 ml 30 % acrylamide/bis; 500 μl 10% ammoniumpersulfaat; 50 μl TEMED) en een 'stacking' gel (12,2 ml gedestilleerd water; 5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 200 μl 10 % SDS-oplossing; 2,6 ml 30 % acrylamide/bis; 100 μl 10 % ammoniumpersulfaat; 20 μl TEMED). Per plasmastaal werden twee replica's geladen. Er werd een constant voltage van 200 V gebruikt en de gels werden gekleurd met Coomassie blauw: 1,2 g Coomassie Briljant Blue R-250 (ICN Biomedicals, Asse, Belgium), opgelost in 500 ml methanol en 200 ml azijnzuur (Merck-Eurolab, Overijse, Belgium). Ontkleuring werd uitgevoerd in een 40 % methanol, 10 % azijnzuur waterige oplossing.

De eiwitgels werden vervolgens gescand met een GelDoc 2000 systeem en geanalyseerd met Quantity One[®] software (Bio-Rad, Eke, België). Het relatieve VTG-gehalte werd berekend t.o.v. de totale eiwitconcentratie.

3.4. RT-PCR

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) werd uitgevoerd op het leverweefsel.

RNA werd geëxtraheerd met TriReagent (Sigma-Aldrich, Leuven, België), volgens de richtlijnen van de producent. Alle oplossingen voor de extractie werden aangekocht bij

Sigma (Leuven, België), behalve RNase erase, diethylpyrocarbonaat (DEPC, ICN Biochemical, Asse, Belgium) and 96 % ethanol (Merck-Eurolab, Overijse, België). De RNA-concentratie werd gemeten met een Perkin Elmer Lambda UV/Vis spectrofotometer bij 260 nm en de solventconcentratie in de geëxtraheerde stalen werd gecontroleerd via de 260/280 nm ratio. RNA elektroforese werd uitgevoerd om de integriteit van RNA te controleren.

Reverse transcriptie werd uitgevoerd met producten van Life Technologies (Merelbeke, België). 2,5 µl oligo dT primer en een volume geëxtraheerd RNA overeenkomend met 5 µg RNA werden samengebracht in een PCR recipiënt en water behandeld met DEPC werd toegevoegd tot een finaal volume van 10 µl. Dit mengsel werd 5 minuten geïncubeerd bij 65 °C in een Amplitron II Thermolyne PCR Cycler. Tien microliter van volgende mix werd toegevoegd aan elk staal: 4 µl 5x cDNA synthese buffer, 1 µl Thermo Script RT 15 U/µl. De stalen werden opgewarmd tot 60 °C gedurende 60 minuten en 85 °C gedurende 5 minuten. Vervolgens werd een hot-start protocol uitgevoerd. Eerst werd hiervoor volgende mix aangemaakt: 5 µl buffer zonder Mg, dNTP mengsel (0,8 mM), MgCl₂ (1,5 mM) en primer (2,5 mM) en 2 µl cDNA. Deze mix werd aangelengd tot 50 µl met geautoclaveerd gedesoniseerd water. Dit mengsel werd opgewarmd tot 95 °C gedurende 3 minuten, waarna 1,25 U van *Taq* polymerase werd toegevoegd en 30 cycli werden voltooid (94 °C gedurende 45 seconden, 45 °C gedurende 30 seconden, 72 °C gedurende 90 seconden). Na deze 30 cycli werd een past-dwell van 10 minuten bij 72 °C uitgevoerd. DNA elektroforese werd uitgevoerd op een 2 % agarose gel met 25 µl DNA staal en Sybr Green (Molecular Probes, Leiden, Nederland) als kleuring. Gels werden gescand onder UV licht met een Bio Rad GelDoc 2000 systeem (Eke, België).

Verschillende andere combinaties van annealing temperatuur, aantal cycli, primerconcentraties, mengselconcentraties werden uitgetest.

3.5. ALP

De reagentia werden aangekocht bij Merck-Eurolab (Overijse, België). Het bloedplasma werd ontdooid op ijs. De eiwitten werden geprecipiteerd door 1 ml 20% TCA toe te voegen aan 30 µl bloedplasma en 15 min. te incuberen bij kamertemperatuur. Vervolgens werd gecentrifugeerd (2000 x g, 10 minuten, 4°C) en het supernatans werd voorzichtig verwijderd. De pellet werd gewassen met 1 ml van de volgende solventen om de vetfractie (fosfolipiden) te verwijderen:

- Absolute ethanol (60°C), 10 minuten;
- Chloroform, diëthylether, ethanol (1:2:2), 5 minuten;
- Aceton, 5 minuten;
- Diëthylether, 5 minuten.

Na het toevoegen van elk solvent werd enkele malen gevortext, na de incubatietijd werd gecentrifugeerd (7000 x g, 2 minuten, 4°C) en het supernatans werd voorzichtig verwijderd. De pellet werd dan gedurende één uur gedroogd onder vacuüm. De pellet werd heropgelost in 500 µl 2N NaOH en 15 minuten in een warmwaterbad van 100°C geplaatst. Na afkoeling werd NaOH geneutraliseerd met 500 µl 2N HCl.

Tenslotte werden de aanwezige fosfaten bepaald via de fosfomolybdenum methode (Sigma Cat # 670-A) volgens de handleiding. De meting gebeurde bij 660 nm in een Perkin Elmer Lambda UV/Vis spectrofotometer.

4. Resultaten en bespreking

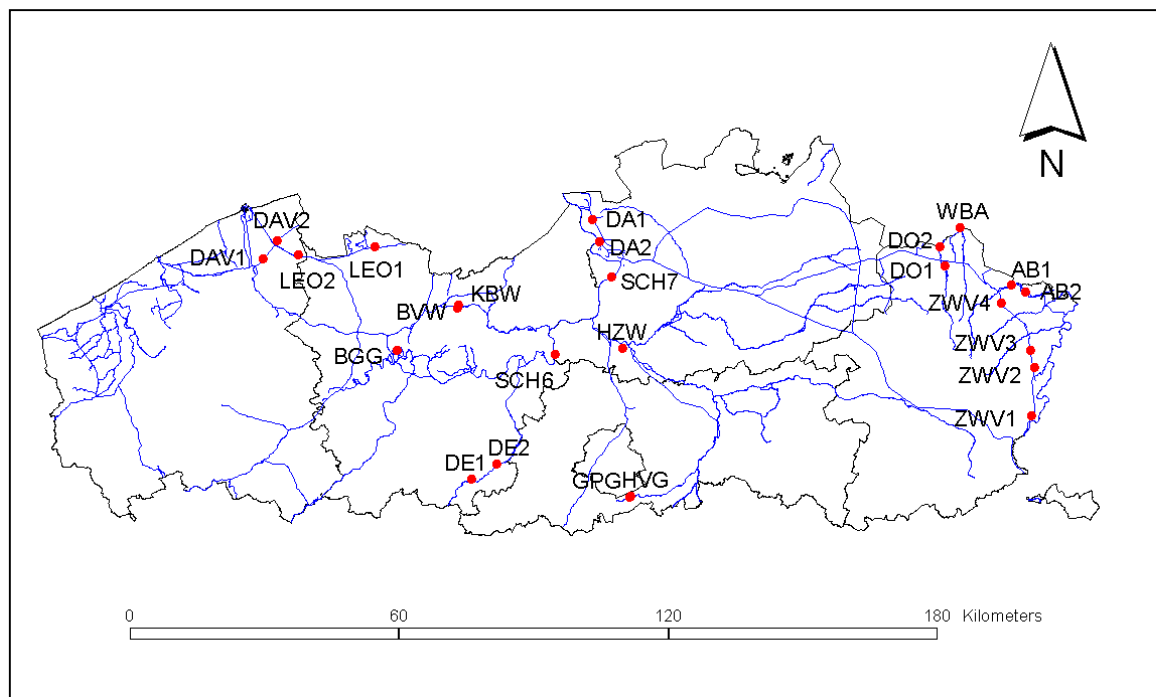
Alle gegevens bekomen tijdens dit onderzoek zijn weergegeven in de tabel 1 van de bijlage.

4.1. Staalvoorbereiding

De bepaling van de eiwitconcentratie in plasma- en leverstalen voor paling werd op punt gesteld. Voor deze stalen werd gewerkt met een reeks van zes $\frac{1}{2}$ verdunningen in een multiwell-plaat om via Bradford-kleuring het eiwitgehalte te berekenen. De plasmastalen werden 30 tot 1600 maal verdund om binnen het lineaire bereik van de methode te vallen. Deze verdunningen werden uitgevoerd met Tris/HCl. De leverstalen werden gehomogeniseerd in 100 μ l Tris/HCl. Deze stalen werden 50 tot 1600 maal verdund voor de meting.

4.2. Eiwitelektroforese

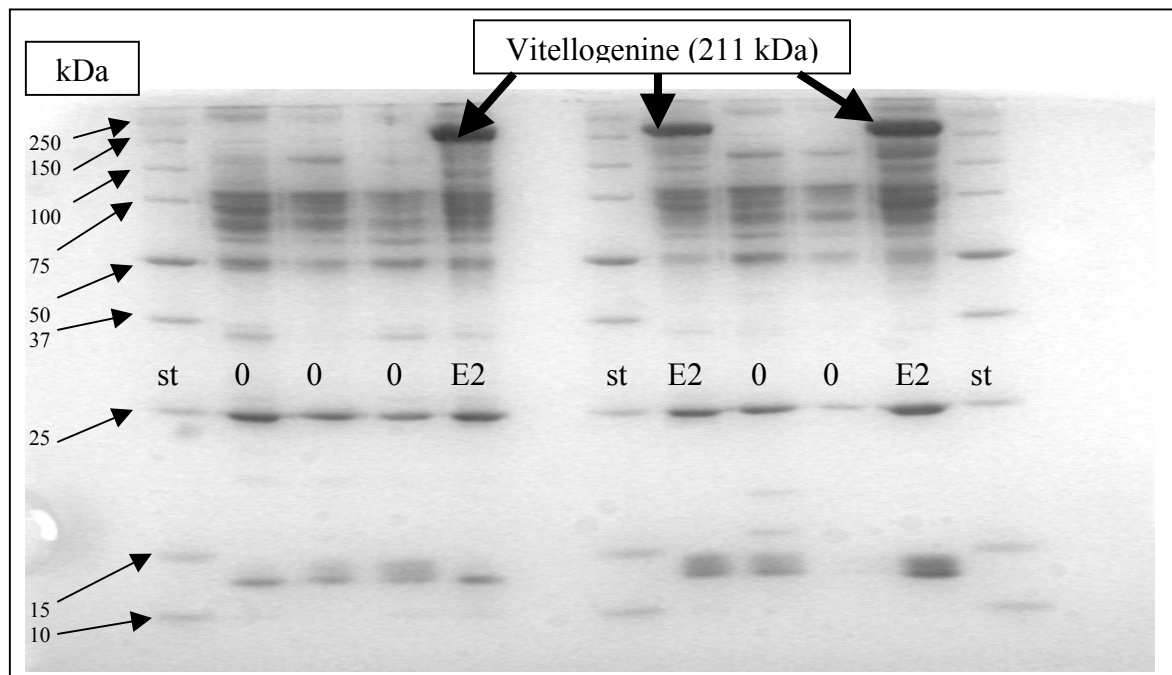
Via eiwitelektroforese werd in geen van de onderzochte stalen (plasma en leverextracten) VTG aangetoond. Een kaart met de verspreiding van de staalnameplaatsen is weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: Locatie van de verschillende staalnameplaatsen met hun respectievelijke codes.

Het moleculair gewicht van VTG van paling is gekend (211 kDa, Livingstone et al. 2000) en in geen van de stalen werd dit eiwit in significante hoeveelheden teruggevonden. Een

voorbeeld van een eiwitgel waarop VTG van paling aanwezig is, is weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: Eiwitgel van paling waarbij st = standaard; 0 = blanco vis; E2 = oestradiol-geïnduceerde vis; de moleculaire gewichten zijn weergegeven in kilodalton (kDa).

In ander onderzoek (Hara et al. 1980) was echter sprake van een moleculair gewicht van 350 kDa, met 4 gelijke subunits van 85 kDa bij *Anguilla japonica*. Daarom werd ook naar specifieke eiwitten met dergelijk moleculair gewicht gezocht. Ook hierbij werden geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van VTG gevonden. In alle stalen bleef de VTG-concentratie onder de achtergrondconcentratie van 4 %. Gezien de aard van de staalnameplaatsen (de palingen werden ook in sterk vervuilde oppervlaktewateren bemonsterd, zie tabel 1 in bijlage), lijkt paling relatief ongevoelig voor vervuiling met xeno-oestrogene stoffen. De zeer lage concentraties VTG zijn in overeenstemming met literatuurgegevens (Livingstone et al. 2000, Peters et al. 2001). VTG werd door Livingstone en medewerkers (2000) gedetecteerd met eiwitelektroforese, gecombineerd met Western blotting. Ook in dat onderzoek op niet seksueel gedifferentieerde palingen die in oppervlaktewateren werden gevangen, kon VTG niet worden aangetoond. Wel werd VTG aangetoond in vissen die werden geïnjecteerd met hoge concentraties oestradiol. Peters en medewerkers (2001) toonden aan dat er geen verschillen in VTG-concentratie waren tussen de verschillende staalnameplaatsen, noch seizoensverschillen. Deze onderzoekers detecteerden met Western blot geen VTG, wel met de nog gevoeliger dot blot procedure. De gevonden concentraties waren echter bijzonder laag (11 tot 165 ng/ml) vergeleken met concentraties gedetecteerd in oestradiol-gestimuleerde vissen (17-50 mg/ml). Ook bij *in vitro* onderzoek met hepatocyten van paling, werd enkel VTG gemeten, na stimulatie met oestradiol (Peyon et al. 1998).

Uit deze resultaten blijkt dat paling waarschijnlijk relatief ongevoelig is voor effecten van xeno-oestrogene stoffen en van nature slechts lage concentraties VTG aanmaakt buiten de paaitijd.

Onderzoek op gekweekte paling werd ook uitgevoerd. De resultaten hiervan kunnen nuttig zijn bij de interpretatie van de gegevens van voorliggend onderzoek. Extracten van levers en gonaden (in Tris-HCl) van vissen gekocht bij een kweker, werden getest op de aanwezigheid van VTG. Blanco vissen bleken geen VTG te produceren in detecteerbare hoeveelheden.

4.3. RT-PCR

De techniek van RT-PCR zoals beschreven in Materiaal en methode werd uitgevoerd op levermateriaal van paling. Deze techniek werd reeds met succes toegepast op verschillende vissoorten uit verschillende families (*Cyprinidae* en *Salmonidae*) (Ren et al. 1996, Versonnen et al. 2000). Aangezien echter geen VTG werd gedetecteerd bij de palingstalen, werden de PCR-omstandigheden aangepast. Het aantal cycli werd gevarieerd van 30 tot 38 (30, 31, 32...) om eventuele fragmenten toch op te kunnen amplificeren. Bovendien werd ook de Mg-concentratie gewijzigd van 1 tot 2 mM (1; 1,25; 1,50...) bij zowel 30 als 35 cycli. Verder werd ook de primer-concentratie aangepast van 2 tot 5 μ M (2; 2,5; 3...) bij 30 en 35 cycli en een Mg-concentratie van 1,5 mM. VTG werd nooit gedetecteerd. Waarschijnlijk ligt de reden hiervoor aan het feit dat er geen VTG geproduceerd werd door de vissen (zie ook resultaten eiwitelektroforese). Een andere mogelijkheid is echter dat de primers – die oorspronkelijk ontwikkeld werden voor Regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) – niet geschikt zijn voor Paling. Verder onderzoek met oestradiol-gestimuleerde vissen moet uitwijzen of deze laatste hypothese correct is of niet.

4.4. ALP

De methode om via ALP VTG in paling op te sporen werd op punt gesteld. Deze techniek is echter minder gevoelig dan eiwitelektroforese en daarom werden niet alle stalen gescreend met ALP (zie tabel 1 in bijlage). In de onderzochte stalen werd geen VTG gedetecteerd.

5. Conclusies

In de onderzochte palingen werden geen aanwijzingen voor verstoring door xeno-oestrogene stoffen gevonden. Literatuurgegevens bevestigen dat paling relatief ongevoelig is voor hormoonverstorende stoffen. Er kan besloten worden dat het niet zinvol lijkt onvolwassen of niet-seksueel gedifferentieerde palingen systematisch te screenen op de aanwezigheid van VTG in bloedplasma of lever. Wel kan het nuttig zijn om selectief palingen te onderzoeken op de aanwezigheid van VTG (hoge concentraties pollutanten in water of weefsel, aanwijzingen voor hormoonverstoring bij andere vissoorten...). De aangewezen techniek lijkt hiervoor

eiwitelektroforese, aangezien deze techniek goedkoper is dan RT-PCR en gevoeliger dan ALP.

Bovendien lijkt het erop – gezien de relatieve ongevoeligheid van Paling – dat Paling een doorgeefluik voor endocrien versturende stoffen naar andere diersoorten of de mens kan zijn. Palingen vertonen geen effecten van endocrien versturende stoffen, maar kunnen deze wel accumuleren.

6. Aanbevelingen

Zoals reeds aangegeven lijkt het niet zinvol paling systematisch te screenen op de aanwezigheid van VTG in bloed of lever. Gericht onderzoek naar hormoonverstoring (b.v. enkel wanneer er duidelijke aanwijzingen zijn dat de vissen blootgesteld zijn aan hoge concentraties toxicanten) lijkt meer aangewezen.

Voor routinematig onderzoek lijkt een vis als blankvoorn (*Rutilus rutilus*) een nuttigere soort. Deze vis komt ook algemeen voor in Vlaamse waterlopen, is niet overdreven gevoelig aan behandelingsstress, en is gevoelig voor hormoonversturende stoffen (Persoon 2000, Rodgers-Gray *et al.* 2001, Routledge *et al.* 1998). Dezelfde techniek als deze gebruikt in dit onderzoek kan toegepast worden, met name eiwitelektroforese (eventueel aangevuld met parameters als het calcium-gehalte van het plasma, de gonadosomatische index, de conditiefactor e.a.).

Referenties

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Hara A., Yamauchi K., Hirai H. 1980. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 65, 315-320.
- Huang Y.S., Schmitz M., Le Belle N., Chang C.F., Quérat B., Dufour S. 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II β -subunit in eel pituitary cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131, 157-166.
- Ikeuchi T., Nagae M., Lokman P.M., Adachi S., Yamauchi K. 1999. Specific antibodies against synthetic oligopeptides of eel GTH/TSH subunits. *Fisheries Science*, 65, 871-877.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Livingstone D.R., Mitchelmore C.L., Peters L.D., O'Hara S.C.M., Shaw J.P., Chesman B.S., Doyotte A., McEvoy J., Ronisz D., Larsson D.G.J., Förlin L. 2000. Development of hepatic CYP1A and blood vitellogenin in eel (*Anguilla anguilla*) for use as biomarkers in the Thames Estuary, UK. *Marine Environmental Research*, 50, 367-371.
- Persoon G. 2000. Evaluatie van de effecten van endocriene verstorende stoffen op inheemse zoetwatervissen. Eindwerk, Gent, 138 pp.
- Peters L.D., Doyotte A., Mitchelmore C.L., McEvoy J., Livingstone D.R. 2001. Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. *The Science of the Total Environment*, 279, 137-150.
- Peyon P., Calvayrac R., Baloché S., Burzawa-Gérard E. 1998. Metabolic studies on eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes in primary culture: effect of 17 β -oestradiol and growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 121, 35-44.
- Ren L., Lattier D., Lech J.J., 1996. Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new cDNA probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 287-294.

Rodgers-Gray T.P., Jobling Z., Kelly C., Morris S., Brighty G., Waldock M.J., Sumpter J.P., Tyler C.R. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science and Technology*, 35, 462-470.

Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, 32, 1559-1565.

Van der Oost R., Vindimian E., Van den Brink P.J., Satumalay K., Heida H., Vermeulen N.P.E. 1997. *Aquatic Toxicology*, 39, 45-75.

Versonnen B.J., Janssen C.R. 2000. Detection of vitellogenin mRNA in estradiol-exposed zebrafish (*Danio rerio*). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, 65, 63-67.