

DISS. ETH NO. 17756

Endocrine disrupting chemicals – linking internal exposure to effects in wild fish

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of
Doctor of Natural Science

Presented by

Anja Christiane Vögeli

Dipl. Ing.-Agr. ETH

Born 01.09.1975

Citizen of Volketswil (ZH), Leibstadt (AG)
and Hergiswil bei Willisau (LU)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Rik I. L. Eggen, examiner
Dr. Marc J.-F. Suter, co-examiner
Prof. Dr. Jukka Jokela, co-examiner
Prof. Dr. Helmut Segner, co-examiner

Zurich 2008

Zusammenfassung

Chemikalien mit hormonaktiver Wirkung (EDCs) sind Substanzen, welche das endokrine System nachteilig beeinflussen können, indem sie eine ähnliche Wirkung wie endogene Hormone zeigen oder ihnen entgegenwirken. Nahezu alle Lebewesen sind ihnen heutzutage in mehr oder weniger starkem Ausmass, durch kontaminierte Nahrung, Luft und Wasser, ausgesetzt und reichern sie im Körper an. Gesundheitliche Auswirkungen, die in Verdacht stehen, durch bioakkumulierte EDCs (interne Exposition) hervorgerufen zu sein, sind über die Art-grenzen hinaus bereits auf der ganzen Welt entdeckt worden, wobei noch nicht alle Effekte spezifischen EDCs haben zugeordnet werden können. Die Ursache liegt unter anderem darin, dass die Gesamtheit der EDCs nicht bekannt und eine Identifizierung durch die Tatsache erschwert ist, dass die chemische Struktur einer Substanz keine eindeutige Bestimmung als EDC zulässt.

Wird bei einem beobachteten Effekt davon ausgegangen, dass er hormonaktiven Ursprungs ist, müssen potentiell verantwortliche, bioakkumulierte Substanzen durch effektorientierte Bestimmungsmethoden herauskristallisiert und mittels chemischer Analytik identifiziert werden. Eine dementsprechend kombinierte Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für östrogene EDCs entwickelt und validiert. Angewendet wurde sie bei verschiedenen Effekten in Fischen und bei Brustkrebs von Frauen. Als Untersuchungsmaterial diente entweder die Galle (Fisch) oder das Fettgewebe (Mensch und Fisch).

Die entwickelte Methode umfasst mehrere Schritte, beginnend mit einer Extraktion des Untersuchungsmaterials, welche eine Dekonjugation (im Fall der Galle), eine Öl - Extraktion (im Falle vom Fett) und eine Festphasenanreicherung beinhaltet. Der zweite Schritt setzt sich einerseits aus der Bestimmung der drei Steroide Östron, Östradiol und Ethinylöstradiol mittels Tandemmassenspektrometrie, andererseits aus der Messung der gesamten Östrogenität im Extrakt durch einen Östrogen-Hefetest zusammen. Östrogen aktive Extrakte werden in einem dritten Schritt mit Hilfe der Flüssigchromatographie fraktioniert, um in einem vierten Schritt die resultierenden Fraktionen wiederum auf ihre Steroide und Östrogenität hin zu prüfen. Eine gefundene Östrogenität, welche sich nicht durch die drei gemessenen Steroide erklären lässt, macht in einem fünften Schritt die Analyse der entsprechenden Fraktion mit einem hochauflösenden Orbitrap nötig, um die für die Östrogenität verantwortliche Substanz zu finden.

Es handelt sich hierbei also um eine effektorientierte Methode, welche die biologische und chemische Analyse miteinander kombiniert. Die Separierung der Substanzen durch eine Fraktionierung und die Messung der östrogener Aktivität *in vitro* ermöglichen es, auch

unbekannte EDCs mittels chemischer Analyse zu identifizieren. Diese Methode kam in den unten aufgeführten Studien zur Anwendung.

In einer ersten *Case-Control* Studie wurde das Phänomen der Mischgonaden untersucht, welches durch EDCs ausgelöst werden kann. In dieser Arbeit wurde die Hypothese getestet, ob männliche Brachsen mit Mischgonaden (Wildfänge), im Gegensatz zu denjenigen mit normalen Gonaden, unterschiedliche, östrogene Substanzen in der Galle und im Fett akkumuliert haben. Zusätzlich sollten diese identifiziert werden. Die Fettuntersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede. In der Galle konnten als einzige für die östrogene Aktivität verantwortliche Substanzen die Steroide Östron (E1), Östradiol (E2) und Ethinylöstradiol (EE2) gemessen werden, wobei E1 und EE2 in der Galle von Brachsen mit Mischgonaden signifikant stärker akkumuliert worden waren.

Eine zweite *Case-Control* Studie sollte Auskunft darüber geben, welche östrogenen EDCs für die Induktion von Vitellogenin in männlichen Brachsen aus einem Naturschutzgebiet ohne offensichtlichen Kläranlageneinfluss verantwortlich sein können. Im Fett konnte, vermutlich aufgrund der hohen Matrixeffekte, keinerlei Östrogenität gemessen werden, wohingegen in der Galle sowohl E1, E2 als auch EE2 quantifiziert werden konnte, als Verantwortliche für die Östrogenität. Aufgrund der höheren Konzentration in der Galle der Control- Fische, konnten sie jedoch nicht als Verantwortliche der Vitellogenininduktion identifiziert werden.

In einer dritten Studie ging es darum, die Bioakkumulation von EDCs als mögliche Ursache für die Gonadenveränderungen, welche seit einigen Jahren in Felchen im Thunersee für Aufsehen sorgen, näher zu untersuchen. Die durchgeführten Untersuchungen diesbezüglich in der Galle von betroffenen Felchen, im Vergleich zu Felchen mit normalen Gonaden, ergaben keine eindeutigen Beweise dafür. Jedoch konnte eine höhere E1 und E2 Konzentration in der Galle von gesunden Fischen detektiert werden. Zusätzliche Untersuchungen wurden im Plankton, der Nahrungsgrundlage der Felchen, erhoben. Planktonextrakte wiesen eine geringe Östrogenität im E-screen auf. Aufgrund der planktoneigenen β -Galactosidase, welche eine falsche positive Aktivität im Östrogen-Hefetest erzeugte, wurde der E-Screen als zweites Testsystem gewählt. Die Östrogenität war nicht auf die Steroide E1, E2 und EE2 zurückzuführen, möglicherweise aber auf N-acetyltyramin, was noch geprüft werden muss.

Eine weitere Studie beschäftigt sich mit Brustkrebs, welcher als mögliche, teilweise Folge einer EDC Akkumulation im Körper, schon länger untersucht wird. Die Hypothese, dass sich einerseits die Steroide E1, E2 und EE2 und andererseits weitere Umwelthormone mit ähnlicher Polarität im Fettgewebe von Brustkrebspatientinnen und von gesunden Frauen unterschiedlich stark anreichern, konnte hier durch die zu geringen Konzentrationen nicht bestätigt werden.

Summary

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are exogenous substances that can disrupt the endocrine system of organisms by acting as hormone agonists or antagonists. EDCs are ingested mainly via food, air and water and bioaccumulate in the body. Effects suspected of being caused by bioaccumulated EDCs (internal exposure) are found in all taxa of organisms around the world. However, specific EDCs as the causative agent have not yet been identified for all these effects. The fact that it is not possible to identify EDCs using their chemical structure alone makes the search for EDCs more difficult.

For the identification of EDCs, chemical analysis has to be combined with an *in vitro* test that determines estrogenicity. In the present work, such an identification method has been developed, validated and adopted for the investigation of different effects observed in fish and in human breast cancer. The specimens examined were bile (from fish) or adipose tissue (from humans and fish).

The method developed has four to five steps. It begins with the extraction either of the bile, including the deconjugation of glucuronides, sulphates and glucosides, or adipose tissue using an oil-extraction process prior to a solid extraction phase. The second step indicates the presence of the three steroid hormones, estrone, estradiol and ethinylestradiol (E1, E2 and EE2), using tandem mass spectrometry and measures the total estrogenicity of the extracts with a yeast estrogen screen (YES). In the third step, the estrogenic active extracts are fractionated using liquid chromatography. The resulted fractions are tested again in the fourth step for their steroids and estrogenicity. In the case of estrogenic active fractions, where the estrogenicity cannot be explained by the steroids E1, E2 and EE2, a fifth step follows comprised of the analysis of the respective fractions with a high-resolution Orbitrap to search for the substances responsible.

An effector-oriented method could be developed, combining biological and chemical analysis. Due to a separation of the chemicals using fractionation and the detection of the estrogenic activity *in vitro* prior to chemical analysis, this method allows the chemical identification of unknown EDCs. Furthermore the method had been applied to the following studies.

The first case-control study investigated the phenomenon of ovotestis in the Rivers Aare, Dommel, and the Brabantse Biesbosch; ovotestis is one of the proven possible effects caused

by EDCs. In this work, the hypothesis is that wild male bream showing ovotestis accumulate estrogenic substances in their bile or adipose tissue that are different from those in male bream with normal gonads. Estrogens were found that had to be identified. The adipose tissue showed no significant differences between the case groups and the control groups. However, the concentrations in the bile showed a higher bioaccumulation of estrone and ethinylestradiol in the bile of bream with ovotestis than in the bile of bream without ovotestis. Estradiol accumulation both in the case pool and the control pool was equal. Other estrogens were not detectable.

The second case-control study dealt with male bream from the wetlands nature reserve, Brabantse Biesbosch in The Netherlands. The aim of this study was to identify the estrogens that could be responsible for the induction of vitellogenin in male bream at this site that has no obvious impact of sewage treatment plant. No estrogens could be identified in the adipose tissue, whereas estrone, estradiol and ethinylestradiol were quantified in the bile, however, the accumulated concentrations were lower in the case pool than in the control. Therefore the reason for the induction of vitellogenin could not be discovered.

The third study concerned gonad malformations in whitefish from Lake Thun, Switzerland. These gonad malformations have drawn media attention since the year 2000 and the cause has still not been identified. One of the hypotheses is that these gonad malformations are caused by EDCs. This was addressed in this study through an analysis of the bile of male and female whitefish from Lake Thun for EDCs. Our results show that estrone and estradiol were the only estrogens found in measurable concentrations in the bile of all fish caught. However, the concentrations were higher in the bile of whitefish with normal gonads compared to fish with malformations. In addition, the main food source of the fish, plankton, was analysed. The estrogenicity had to be measured with a test other than the YES, due to the high concentrations of β -galactosidase found in plankton, which interfere with the YES. The E-screen showed a slight estrogenicity of the plankton extracts, which was not caused by one of the three steroids E1, E2 and EE2. N-acetyltyramine could be identified as a possible EDC candidate.

In another case-control study with breast cancer specimens, measurements were done in polar fractions of adipose tissue from breast cancer patients and women without any history of breast cancer. Due to insufficient sensitivity of the YES, no estrogenicity could be measured in the cases or in the controls.