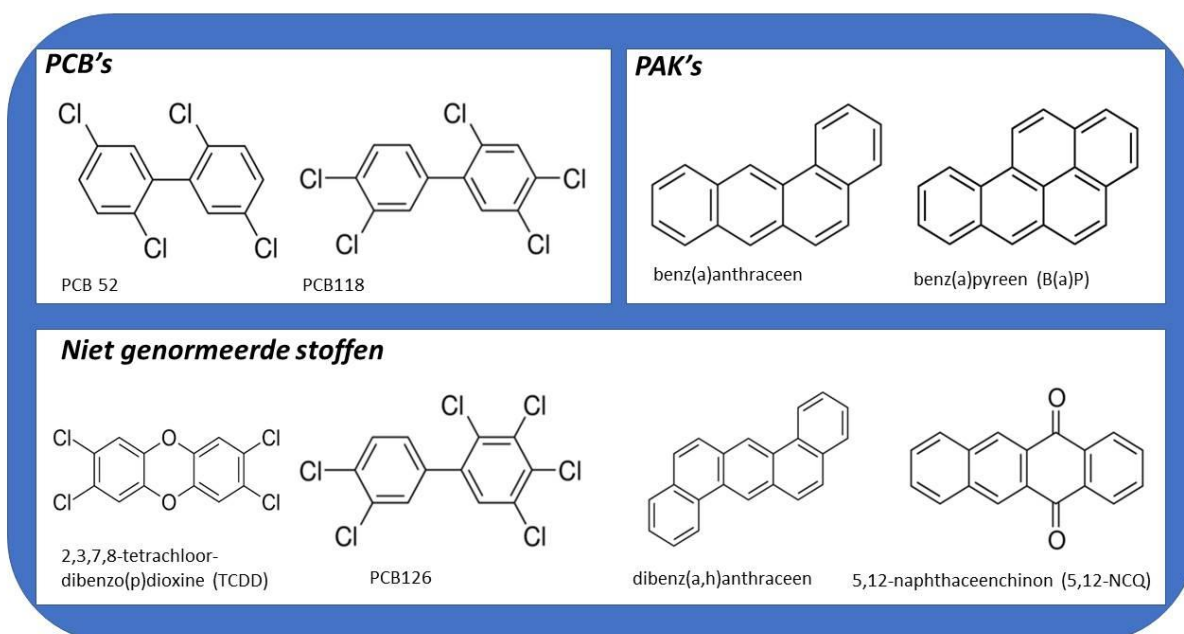


Bioassays als alternatief voor chemische monitoring van PCB's en PAK's?

Corine Houtman, Jan Kroesbergen (Het Waterlaboratorium), Peter Behnisch, Bram Brouwer, Emiel Felzel (BioDetection Systems B.V.)

Het Drinkwaterbesluit verplicht chemische monitoring van specifieke PCB's en PAK's in drinkwater. Dit is echter weinig zinvol omdat de genoemde stoffen niet de meest toxische en meest voorkomende zijn. De auteurs onderzochten of monitoring met CALUX-bioassays beter zou zijn, uitgaand van de werkingsmechanismen van de Arylhydrocarbon- en PXR-receptor en antagonisme op de androgeenreceptor. De PAH-CALUX en anti-AR-CALUX blijken hiervoor veelbelovende assays. Groot voordeel is de beoordeling op totale toxiciteit in plaats van op concentraties individuele stoffen, inclusief actieve maar niet-genormeerde stoffen en stoffen die niet in chemische doelstoffenanalyses zijn opgenomen.



Afbeelding 1. Chemische structuren van voorbeelden van wettelijk genormeerde PCB's en PAK's (boven) en niet-genormeerde stoffen (beneden) die qua toxiciteit minstens zo relevant zijn

Polychloorbifenylen (PCB's) en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) hebben vanaf de jaren zestig van de vorige eeuw veel aandacht gekregen als groepen toxische en milieuvervuilende stoffen. PCB's bestaan uit twee benzeenringen waarbij H-atomen zijn gesubstitueerd door één of meerdere chlooratomen. PAK's bestaan uit twee of meer gekoppelde benzeenringen (zie afbeelding 1). Door de vele mogelijke manieren waarop de benzeenringen aan elkaar kunnen zijn verbonden en bovendien de mogelijkheid van alkylering of substitutie van een C- door een ander atoom als N of O, is het aantal verschillende congenere enorm groot. PCB's zijn van 1929 tot het verbod in 1985 op grote schaal industrieel als mengsel geproduceerd en toegepast. PAK's zijn gebruikt in koolteer en bitumen, maar ontstaan in tegenstelling tot PCB's ook op natuurlijke wijze, bij onvolledige verbranding van onder anderen fossiele brandstoffen, hout en voedingsmiddelen.

PCB's en PAK's hebben meerdere toxische eigenschappen. Voor PCB's hangen deze nauw samen met het aantal en de positie van chlooratomen. Zogenaamde 'dioxineachtige' PCB's, die een vlakke structuur kunnen aannemen, activeren in het lichaam de Arylhydrocarbonreceptor (AhR) op dezelfde wijze als het extreem giftige 2,3,7,8-tetrachloordibenzo(p)dioxine (TCDD, zie afbeelding 1). Dit zorgt voor verhoogde activiteit van leverenzymen (cytochroom P450) die lichaamsvreemde stoffen omzetten en leidt tot nadelige effecten op ontwikkeling en reproductie, immuunsysteem, lever, huid en tot carcinogeniteit [1]. De 'niet-dioxineachtige' PCB's (niet-vlakke PCB's door meerdere chlooratomen op orthoposities (zoals PCB 52, afbeelding 1)) vertonen een ander spectrum van toxiciteit. Dit leidt tot schadelijke effecten voor lever, immuunsysteem en zenuwstelsel en tot hormoonverstoring en tumorpromotie [1]. Ook sommige PAK's hebben een vlakke structuur waarmee ze enigszins op dioxine lijken en de AhR activeren. Veel PAK's worden omgezet tot carcinogene stoffen met een genotoxisch werkingsmechanisme [2]. Een belangrijk verschil met PCB's is dat veel PAK's minder persistent zijn en ook gemakkelijker uit het lichaam verwijderd worden.

Monitoring voor Drinkwaterbesluit

Het Nederlandse Drinkwaterbesluit stelt normen voor verschillende PCB's en PAK's; de Europese wetgeving doet dit alleen voor PAK's. Dit zijn echter niet de meest toxische congenen of diegenen die specifiek het meest voorkomen in water (3)]. Daarnaast zijn ook de hoogtes van de normen meer gebaseerd op chemisch-analytische aantoonbaarheid van enkele decennia geleden dan op toxiciteit. Het gevolg hiervan is dat de Nederlandse drinkwaterbedrijven per jaar duizenden euro's steken in de monitoring van PCB's en PAK's en zich daarmee aan de wet houden, maar zonder dat het veel bruikbare informatie oplevert. PCB's heeft Het Waterlaboratorium in de bronnen van Dunea, PWN en Waternet al jaren niet meer aangetroffen boven de rapportagegrens van 0,01 µg/L en van de PAK's worden met name congenen zonder wettelijke norm aangetroffen 3].

De inzet van zogeheten bioassays is mogelijk een betere manier om te onderzoeken of drinkwater(bronnen) stoffen bevatten met toxiciteit als die van PCB's en PAK's. Bioassay-analyse zou voorzien in zeer gevoelige en meer risicogestuurde monitoring, waarbij de gemeten respons de gezamenlijke activiteit weerspiegelt van alle aanwezige actieve stoffen met een specifiek werkingsmechanisme, waarbij de congenen met de hoogste toxiciteit het meeste bijdragen aan de respons. De Inspectie van het Ministerie voor Infrastructuur, Leefomgeving en Transport heeft desgevraagd aangegeven dat de drinkwaterbedrijven hun huidige chemische monitoring (nog) niet mogen stoppen en dat alvorens daartoe eventueel toestemming verleend zal worden de geschiktheid van bioassays voor dit doel nader onderzocht moet zijn [3].

Onderzoek

Het Waterlaboratorium heeft samen met BioDetection Systems BV onderzocht of CALUX-bioassays een goed alternatief zouden kunnen zijn voor de chemische monitoring van PCB's en PAK's. Er zijn vier reporter-gen-assays getest. Deze maken gebruik van genetisch gemodificeerde cellen en meten de mate van activerende binding van een stof aan een specifieke receptor in de cel met een lichtreactie [4].

- *DR-CALUX*: meet activatie van de AhR door dioxines, PCB's en andere dioxineachtige stoffen. In de monstervoorbewerking van water worden minder persistente stoffen, waaronder

eventueel aanwezige PAK's, met affiniteit voor de AhR afgebroken, waardoor ze niet bijdragen aan de gemeten respons [2].

- *PAH-CALUX*: meet eveneens activatie van de AhR, maar is speciaal ontwikkeld voor minder persistente verbindingen zoals PAK's [2].
- *PXR-CALUX*: meet activatie van de pregnane X-receptor, die leidt tot verhoogde activiteit van het enzym cyp3A4. Dit enzym metaboliseert diverse lichaamsvreemde stoffen. Verschillende niet-dioxineachtige PCB's activeren deze receptor [5].
- *AR-CALUX*: meet de activatie van de androgeen- (mannelijk geslachtshormoon) receptor [6]. Van veel met name PCB's is bekend dat ze deze receptor juist blokkeren (antagonistisch binden) [7]. Vandaar dat deze assay in de antagonistische modus is getest (anti-AR-CALUX).

De onderzoeksvragen waren:

1. Zijn de genormeerde PCB's en PAK's actief op de AhR, PXR en AR en detecteerbaar met de geselecteerde bioassays?
2. Zijn er ook niet-genormeerde stoffen actief? Dit zou aantonen dat de huidige normering mogelijk relevante stoffen over het hoofd ziet.
3. Hoe gedragen mengsels van stoffen zich in de assays? Vervuilende stoffen, in het bijzonder PCB's en PAK's, komen in het milieu als mengsels voor. Mengsels zijn daarom een betere benadering van watermonsters uit de praktijk dan individuele stoffen.
4. Hoe vergelijkbaar zijn meetresultaten van de chemische analyse met die van bioassays bij toepassing op een watermonster?

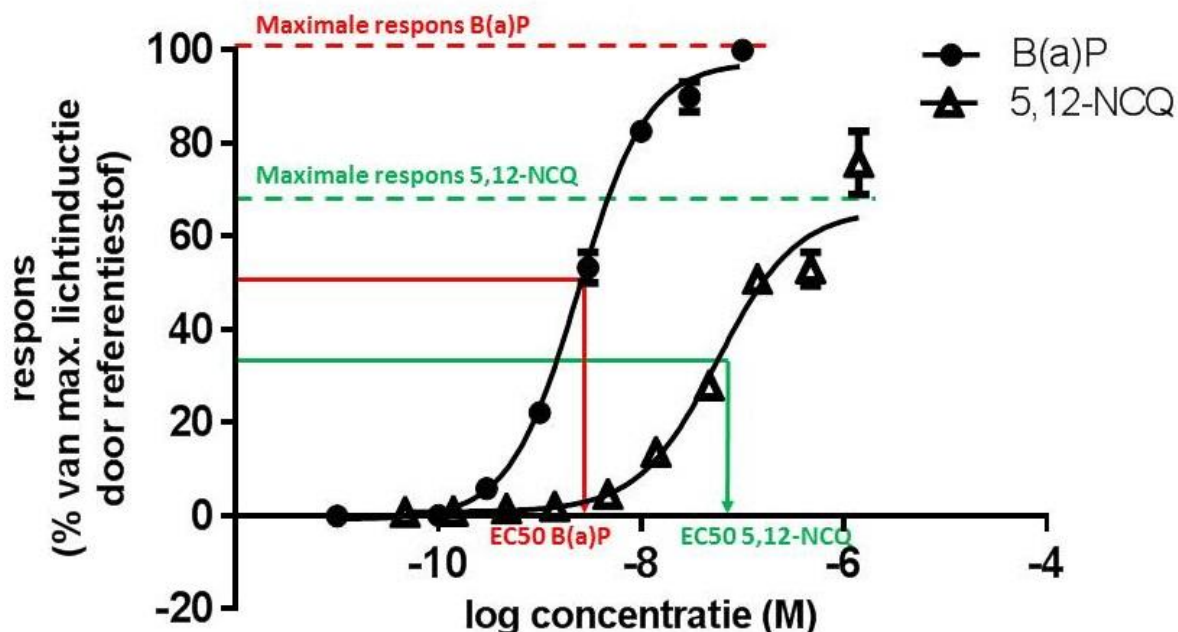
Aanpak

Individuele stoffen

Voor de beantwoording van de eerste twee onderzoeksvragen zijn van alle zeven genormeerde PCB's en elf genormeerde PAK's concentratiereeksen gemeten in de bioassays, tenzij al literatuurdata beschikbaar waren. Daarnaast zijn vijf niet-genormeerde stoffen getest. De activiteit is steeds vergeleken met die van de vaste referentieverbinding van de assays, namelijk TCDD voor de DR-CALUX, benz(a)pyreen (B(a)P) voor de PAH-CALUX, nicardipine voor de PXR-CALUX en flutamide voor de anti-AR-CALUX.

Voor iedere stof is de maximale respons berekend, waarbij die van de referentiestof op 100% werd gesteld. Hiermee is vervolgens de concentratie waarbij de helft van het maximale effect wordt bereikt (EC50) afgeleid. Dit is in afbeelding 2 als voorbeeld voor de PAH-CALUX weergegeven in rood voor de referentiestof B(a)P en in groen voor de geteste stof 5,12-naphthaceenchinon. De relatieve potentie (REP) van de geteste stof *i* is uitgerekend volgens:

$$\text{Relatieve potentie}_i (\text{REP}_i) = \frac{\text{EC50}_{\text{referentiestof}}}{\text{EC50}_i}$$



Afbeelding 2. Voorbeeld van concentratieresponscurves van twee PAK's in de PAH-CALUX. Met rood is de interpolatie van de EC50 voor referentiestof benz(a)pyreen (B(a)P) weergegeven en met groen die voor 5,12-naphthaceenchinon (5,12-NCQ), één van de geteste stoffen

Mengsels

Om het gedrag van mengsels te beoordelen (onderzoeksvraag drie) zijn er PCB- en PAK-mengsels bereid van de 7 genormeerde PCB's en van de zogeheten 'EPA-PAK's' (waaronder de 11 (EU:5-) genormeerde). Iedere stof was in dezelfde concentratie in het mengsel aanwezig. Met de relatieve potenties van de individuele stoffen kon berekend worden wat er voor het mengsel aan totale activiteit verwacht werd. Hierbij is uitgegaan van het mengselmodel Concentratie Additie, dat geldt voor stoffen met dezelfde werking in reportergeren-assays als deze [8], [9].

Watermonster

Voor onderzoeksvraag vier is een watermonster bereid met een hoge PAK-belasting. Bij spuiwerkzaamheden kunnen PAK's vrijkomen uit gecorrodeerde, met bitumen gecoate gietijzeren leidingen. [10]. Dit kunnen meer verschillende isomeren zijn dan die in de wet staan. Deze situatie is in een extreme variant nagebootst met een stuk sterk gecorrodeerde leiding waarin water gedurende een week is geschud. Dit water is geëxtraheerd en getest met bioassays en met de chemische analyse om de resultaten te vergelijken.

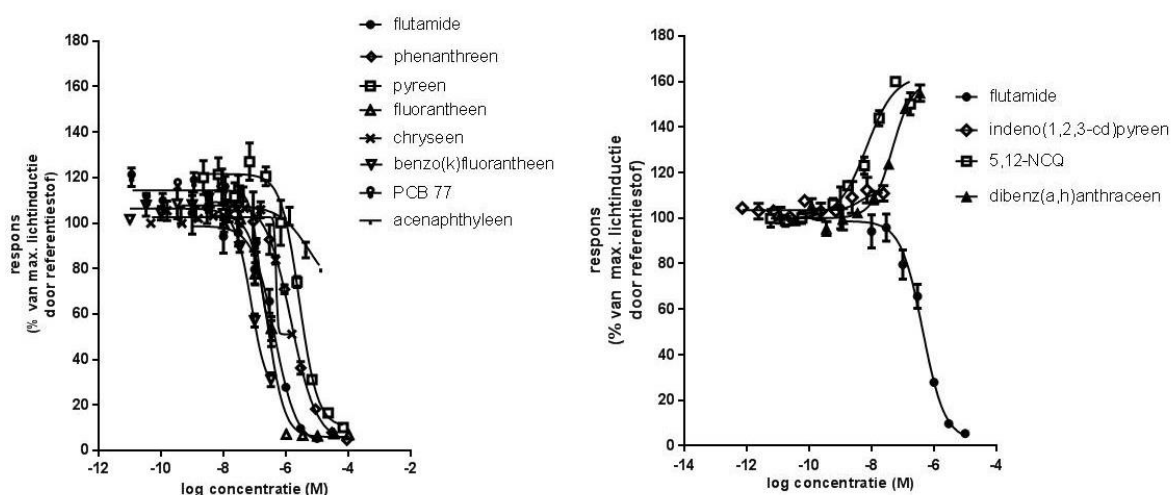
Resultaten en discussie

Individuele stoffen

De onderzochte individuele stoffen waren alle actief in minstens één CALUX-assay. De REP's van de stoffen zijn weergegeven in tabel 1. In de DR-CALUX waren 13 stoffen actief en in de PAH-CALUX 11. In beide assays waren van de genormeerde stoffen met name de zwaardere PAK's actief en de dioxineachtige PCB's (118, 77 en 126), de meeste genormeerde (en niet-dioxine-achtige) PCB's niet

[11]. De resultaten van de PCB's komen zoals verwacht goed overeen tussen de DR-CALUX en de PAH-CALUX. Beide testen immers activiteit op dezelfde receptor. Wanneer watermonsters getest worden met de DR-CALUX zullen PAK's zoals genoemd echter de monstervoorbewerking met zwavelzuur (nu niet uitgevoerd voor de zuivere stoffen) niet overleven. De PAH-CALUX, waarbij in de voorbewerking zwavelzuur niet gebruikt wordt, zal dus in de praktijk op meer stoffen respons geven. De PXR-CALUX is getest als mogelijk geschikte assay voor niet-dioxineachtige PCB's. Geen van de geteste PCB's bleek echter in de maximale testbare concentratie (0,1 - 0,4 μM) respons te geven. Mogelijk zou dit bij nog hogere concentraties wel gebeuren, overeenkomstig resultaten gerapporteerd over PCB's op deze receptor in een andere cellijn ($>1 \mu\text{M}$) [5].

Bijna alle stoffen reageerden antagonistisch in de AR-CALUX. Dit is te zien aan de dalende responscurven in afbeelding 3 (links). Drie PAK's bleken echter juist androgeen (rechts). Activiteit werd zowel gevonden voor wel en niet-genormeerde stoffen. De anti-AR-CALUX blijkt in dit onderzoek een gevoeliger assay voor niet-dioxineachtige PCB's dan de PXR-CALUX.



Afbeelding 3. Concentratie-responscurves van verschillende PAK's en een PCB in de antagonistische modus van de AR-CALUX-assay. Links stoffen met een anti-androgeen effect, rechts met een androgeen effect

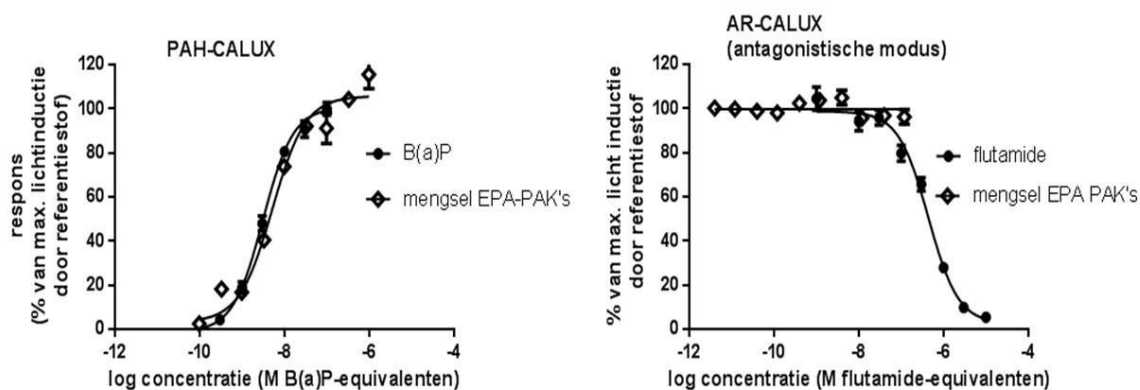
Tabel 1. Activiteiten van PCB's en PAK's in vier CALUX-bioassays. Resultaten zijn weergegeven als relatieve potenties (REP) ten opzichte van de referentiestoffen van de assays (DR: TCDD, PAH: B(a)P, PXR: nicardipine, anti-AR: flutamide). Groen: geen activiteit waargenomen, geel: lage activiteit ($REP < 10^{-4}$), rood: hoge activiteit ($REP > 10^{-4}$), grijs: niet getest, lila: agonistisch effect. Bij waarden met '<' is de EC50 niet behaald en kon geen REP berekend worden. REP's met een * zijn eigen resultaten, de andere waarden komen uit de literatuur (a:[12], b: [7] c: [13], d: [2], e: [11], f: [14], g:[15])

Stof	REP DR-CALUX	REP PAH-CALUX	REP PXR CALUX	REP anti-AR-CALUX
<i>genormeerd in het Drinkwaterbesluit:</i>				
pcb 28	<1.0E-4 e	<7.8E-4 *	<0.77 *	4.6E+00 b
pcb 52	<1.0E-4 e	<8.8E-4 *	<0.87 *	1.1E+00 b
pcb 101	<1.0E-4 e	<9.9E-4 *	<0.98 *	1.1E+00 b
pcb 138	<1.0E-4 e	<1.1E-3 *	<1.08 *	3.2E+00 b
pcb 153	<1.0E-4 e	<1.1E-3 *	<1.08 *	4.3E-01 b
pcb 180	<1.0E-4 e	<3.2E-2 *	<4.05 *	1.4E+00 b
pcb 118	6.3E-06 c	1.6E-03 c	<0.98 *	7.0E+00 b
anthraceen	<1.0E-4 a	<1.0E-4 d		2.2E-01 *
phenanthreen	1.3E-06 a	<1.0E-4 d		2.9E-01 *
pyreen	1.4E-06 a	<1.0E-4 d		1.6E-01 *
fluorantheen	<1.0E-4 f	<1.0E-4 d		8.5E-01 g
benzo(a)anthraceen	1.7E-04 a	3.0E-01 d		1.5E+00 *
chryseen	<1.0E-4 a	8.0E-01 d		9.0E-01 *
benzo(b)fluorantheen (EU)	4.2E-03 a	5.0E+00 d		<1.3 *
benzo(k)fluorantheen (EU)	4.1E-03 a	3.7E+00 d		5.7E+00 *
benzo(a)pyreen (EU)	5.8E-04 a	1.0E+00 d		2.7E+00 *
benzo(ghi)peryleen (EU)	3.3E-06 *	<1.0E-4 d		<17 *
indeno(1,2,3-cd)pyreen (EU)	1.3E-07 *	1.3E+00 d		licht androgeen *
<i>niet genormeerd in het Drinkwaterbesluit:</i>				
pcb 77	1.3E-03 *		<1.70 *	3.1E+00 *
pcb 126	6.7E-02 *	5.0E+00 c	<1.30 *	5.7E+00 b
acenaphthyleen		<1.0E-4 d		7.3E-02 *
dibenz(a,h)anthraceen	6.4E-05 *	1.3E+00 *		androgeen *
5,12-naphthaceenchinon	4.0E-06 *	4.3E-02 *	<1.70 *	androgeen *

Mengsels

Het PCB-mengsel was niet actief in de DR-, PAH- en PXR-CALUX, aangezien de individuele stoffen dat ook niet waren. In de anti-AR-CALUX zou activiteit mogelijk zijn, maar hiervoor was de hoogst beschikbare mengselconcentratie te laag. Het PAK-mengsel was actief in de DR- en PAH- CALUX. Door de concentratie van het mengsel uit te drukken in equivalenten van de referentiestof zou mengselgedrag volgens het model van Concentratie Additie moeten leiden tot overlap van de mengselcurve met die van de referentiestof. Dit is inderdaad het geval voor de PAH-CALUX (afbeelding 4, links).

In de PXR-CALUX gaf het PAK-mengsel geen activiteit. Vermoedelijk zijn de individuele PAK's uit het mengsel ook niet actief. In de anti-AR-CALUX werd ook geen activiteit gevonden voor het PAK-mengsel (rechts), hoewel dit qua concentratie net had gekund. Mogelijk gedraagt het mengsel zich wel additief, maar is dat door experimentele spreiding net nog niet zichtbaar, of is er sprake van compensatie van het effect door de licht androgene werking van indeno(1,2,3,-c,d)pyreen.



Afbeelding 4. Concentratie-responscurves van een mengsel van 16 EPA-PAK's in gelijke concentraties in de PAH- en de anti-AR-CALUX. Concentraties zijn uitgedrukt in equivalenten van referentiestof B(a)P en flutamide

Watermonster

In het watermonster uit de gecorrodeerde leiding werden met de chemische analyse zoals verwacht sterk verhoogde PAK-concentraties aangetroffen, met name pyreen (9,4 µg/L) en anthraceen (5,5 µg/L) en zeven andere PAK's in concentraties ≤0,4 µg/L. Hiervan werd activiteit verwacht in de PAH- en anti-AR-CALUX. De daadwerkelijk gemeten activiteit in deze assays was inderdaad zeer hoog (tabel 2, 3^e kolom), zelfs veel hoger dan met de chemisch aangetroffen PAK's of PCB's verklaard kon worden (kolom 4,5 en 6). In de DR-CALUX werd geen activiteit gevonden. Dit laat zien dat er geen persistente AhR-actieve stoffen aanwezig waren. De lage activiteit in de PXR-CALUX is in overeenstemming met de negatieve resultaten in het eerste deel van dit onderzoek. Dit experiment laat zien dat er in het watermonster veel meer AhR-actieve en anti-androgene stoffen zijn vrijgekomen dan in de huidige wetgeving en daarop afgestemde chemische analyse zijn opgenomen. Dit is een sterke aanwijzing dat monitoring met bioassays een betere indicatie geeft van een mogelijk risico dan chemische analyse van een beperkte selectie PAK's en PCB's.

Tabel 2. Samenvatting van de resultaten van de chemische en bioassay-analyse van een worst case-watermonster uit een sterk gecorrodeerd en extreem geschud stukje drinkwaterleiding

Assay	Eenheid	Gemeten concentratie	Verklaard door chemisch gemeten PAK's	Belangrijkste bijdragen van	% onverklaarde activiteit	Verklaring
DR-CALUX	pg TCDD-eq/L	<detectielimiet	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	Geen dioxineachtige PCB's aangetroffen, aanwezige PAK's niet persistent in monstervoorbewerking
PAH-CALUX	µg B(a)P-eq/L	32	1,7 (5%)	Benzo(k)fluorantheen, benzo(b)fluorantheen, chryseen	95	Er zijn veel meer dioxineachtige PAK's (of andere stoffen met een soortgelijke werking) vrijgekomen dan opgenomen in de chemische analyse en de wet
PXR-CALUX	µg nicardipine-eq/L	5	0	n.v.t.	100	Lage activiteit, geen actieve PCB's aangetroffen
Anti-AR-CALUX	µg flutamide-eq/L	489	7 (1%)	Pyreen, anthraceen, benz(k)fluorantheen	99	Er zijn veel meer anti-androgene PAK's vrijgekomen dan opgenomen in de chemische analyse en de wet

Conclusie en vooruitblik

In dit onderzoek is de geschiktheid bepaald van vier CALUX-bioassays om de wettelijke chemische monitoring van PCB's en PAK's te vervangen.

Daarvoor is in de eerste plaats belangrijk dat de stoffen goed detecteerbaar zijn. In dit onderzoek bleek dat alle genormeerde PCB's en PAK's actief zijn in één of meerdere van de geteste bioassays. Het hoogst hierop scoorden de PAH-CALUX en de anti-AR-CALUX. Deze assays zijn veelbelovend voor de genoemde doelstelling. Ze dekken samen ook zowel het dioxineachtige als een niet-dioxineachtig effect af. De DR-CALUX detecteert geen minder persistente verbindingen. Deze assay ligt daarom minder voor de hand voor reguliere monitoring van drinkwater(bronnen). De assay is wel zeer geschikt voor specifiek onderzoek naar persistente dioxineachtige stoffen. PXR-activatie is weliswaar een relevant effect voor niet-dioxineachtige PCB's, maar de meerwaarde van de PXR-CALUX is voor onze toepassing beperkt aangezien in de anti-AR-CALUX van dezelfde stoffen bij lagere concentraties effecten gemeten worden.

Naast de genormeerde stoffen bleken ook andere stoffen, zoals andere PAK- en PCB-congeneren en een hetero-PAK (5,12-NCQ), activiteit in de bioassays te veroorzaken. De lijst wettelijk genormeerde verbindingen voor de onderzochte effecten is dus inderdaad niet volledig. Dit werd bevestigd in het onderzoek met het watermonster, waar de gemeten activiteiten slechts voor <5% verklaard kon worden door wettelijk genormeerde stoffen.

Aangezien bioassays bij blootstelling aan mengsels, zoals meestal in watermonsters, één totaalrespons geven, is het belangrijk het gedrag van mengsels in de bioassays te kennen. Bovendien komen voor zowel de AhR- als de androgeenreceptor in het milieu zowel agonisten als antagonist

voor. In dit onderzoek bleken PAK-mengsels (alle agonistisch) zich zoals verwacht in de PAH-CALUX additief te gedragen. Dit kan anders zijn wanneer in een mengsel zowel agonistische als antagonistische stoffen aanwezig zijn, zoals bij de anti-AR-CALUX. In dat geval zal het gemeten effect de resultante zijn van beide typen effecten.

In het extreem vervuilde watermonster lieten de bioassays zien dat er veel meer dioxineachtige activiteit (of stoffen) aanwezig waren dan gemeten met de chemische analysetechniek. Identificatie van actieve stoffen is echter met bioassays niet mogelijk. Bij reguliere monitoring is identificatie van actieve stoffen echter pas nodig als er een hoge activiteit wordt gemeten.

Samengevat lijken de PAH-CALUX en anti-AR-CALUX veelbelovende assays voor de monitoring van stoffen met toxiciteiten zoals die van PCB's en PAK's in drinkwater(bronnen). Vanwege de noviteit van de assays, moeten nog enkele stappen gezet worden voor ze voor wettelijke monitoring ingezet kunnen worden. Hier wordt op verschillende fronten al aan gewerkt. Wanneer deze stappen met goed gevolg zijn genomen zullen de drinkwaterbedrijven de assays voordragen bij de Inspectie IL&T als vervanging en verbetering van de wettelijke monitoring van PCB's en PAK's.

Verantwoording

Dit project is uitgevoerd in opdracht van het DPWE-onderzoeksprogramma van de drinkwaterbedrijven Dunea, PWN, Waternet en Evides, onder de begeleidingsgroep Waterkwaliteit.

Referenties

1. Robertson, L, Hansen, L. (2001). *Recent advances in the environmental toxicology and health effects of PCBs*. Lexington: University Press of Kentucky.
2. Pieterse, B., Felzel, E., Winter, R., Burg B. van der, Brouwer, A. (2013). PAH-CALUX, an Optimized Bioassay for AhR-Mediated Hazard Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) as Individual Compounds and in Complex Mixtures. *Environmental Science & Technology* 8/29/2013: American Chemical Society; p. 11651-9.
3. Houtman, C.J., Velzeboer, I., Sloopweg, T., Kroesbergen, J. (2015). Organische stoffen in het Drinkwaterbesluit: 2. Monitoring van 'oude' stoffen. *H2O-online*, 12 oktober 2015.
4. Murk, A. et al. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Toxicological Sciences* 33(1):149-60.
5. Al-Salman, F., Plant. N. (2012). Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner. *Toxicology and applied pharmacology* 263(1):7-13.
6. Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., Brouwer, A., Burg, B. van der (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicological Sciences* 83(1):136-48.
7. Hamers, T. et al. (2011). In vitro toxicity profiling of ultrapure non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners and their relative toxic contribution to PCB mixtures in humans. *Toxicol Sci.* 121(1):88-100.

8. Houtman, C.J. et al. (2006). Biological validation of a sample preparation method for ER-CALUX bioanalysis of estrogenic activity in sediment using mixtures of xeno-estrogens. *Environ Sci Technol.* 40(7):2455-61.
9. Houtman, C.J. et al. (2009). Detection of anabolic androgenic steroid abuse in doping control using mammalian reporter gene bioassays. *Anal Chim Acta.* 637(1-2):247-58.
10. Blokker, E.M., Ven, B.M. van de, Jongh, C.M. de, Slaats, P.N. (2013). Health implications of PAH release from coated cast iron drinking water distribution systems in the Netherlands. *Environmental Health Perspectives* 121(5):600.
11. Brenerová, P. et al. (2016). Pure non-dioxin-like PCB congeners suppress induction of AhR-dependent endpoints in rat liver cells. *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(3):2099-107.
12. Behnisch, P.A., Hosoe, K., Sakai, S-i. (2003). Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environment International.* 29(6):861-77.
13. Vugt-Lussenburg, B.M.A. van, Pieterse, B., Middelhof, I., Behnisch, P.A., Burg, B. van der (2014). The "dirty dozend" pops & other pollutants: toxicological profiling by CALUX panel. *Organohalogen compounds* 2014.
14. Hinger, G. et al. (2011). Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. *Environmental Science and Pollution Research* 18(8):1297-304.
15. Vinggaard, A.M., Hnida, C., Larsen, J.C. (2000). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology* 145(2):173-83.