

Hyppigt anvendte svampemidler har hormonforstyrrende egenskaber

Af

Mia Birkhøj Kjærstad og Helle Raun Andersen, Miljømedicin, Syddansk Universitet samt Camilla Taxvig, Ulla Hass, Marta Axelstad, Stine Metzdorff og Anne Marie Vinggaard Fødevareinstituttet, DTU.

Svampemidler (fungicider) anvendes til at bekæmpe svampeangreb i korn, frugt og grøntsager og der kan derfor være rester af svampemidler i disse fødevarer. De bruges også i vid udstrækning ved dyrkning af prydplanter og grøntsager i drivhuse, hvorved de ansatte kan blive udsat for stofferne. Nogle af de mest anvendte svampemidler i Danmark tilhører gruppen af azol-fungicider, der kemisk set ligner hinanden. Vi har tidligere undersøgt et af disse, prochloraz, og fundet at stoffet påvirker syntesen af kønshormoner og udviklingen af kønsorganer i ungerne, når drægtige rotter har været udsat for stoffet.

I projektet 'Effekter af Azol-fungicider på køns- og thyreoidahormoners funktion' har vi undersøgt yderligere tre azol-fungicider: epoxiconazol, propiconazol, og tebuconazol. I cellebaserede testsystemer reagerede alle stofferne med forskellige hormonreceptorer og de påvirkede syntesen af kønshormoner. I forsøg med rotter, øgede epoxiconazol og tebuconazol drægtighedslængden, forøgede progesteronniveauet hos moderdyrene samt maskuliniserede hunungerne. Tebuconazol medførte desuden en feminisering af hanungerne. Alle disse effekter har vi også set for prochloraz. Resultaterne tyder på at azol-fungicider generelt har hormonforstyrrende egenskaber.

Baggrund og formål

Der er en stigende bekymring for, at selv lave eksponeringer for pesticider under udviklingen af forplantningsorganer og nervesystem, kan medføre vedvarende skader på disse organsystemer. Fostre og børn antages derfor at være særligt sårbare overfor pesticideksponering.

Flere pesticider har vist sig at have hormonforstyrrende egenskaber i cellebaserede testsystemer, men kun et fåtal af disse er undersøgt og fundet hormonforstyrrende i forsøgsdyr. Et af disse er fungicidet, vinclozolin, som blev forbudt i EU på grund af disse egenskaber. Vi har for nylig vist at azol-fungicidet, prochloraz, kan interagere med forskellige receptorer, heriblandt østrogenreceptoren og androgenreceptoren og derved modvirke virkningen af henholdsvis østrogen og testosteron. Desuden virkede prochloraz antiandrogen i voksne hanrotter og påvirkede serumkoncentrationen af skjoldbruskkirtelhormonerne. Ved eksponering i drægtighedsperioden og under diegivningen medførte stoffet en maskulinisering af hunungerne og en feminisering af hanungerne.

Prochloraz anvendes især indenfor prydplanteproduktionen, mens andre azol-fungicider anvendes i store mængder til bekæmpelse af svampesygdomme i kornafgrøder samt inden for gartneriområdet. I 2005 blev der samlet anvendt over 100 tons aktivstof af disse midler i Danmark. Azol-fungiciderne er relativt fedtopløselige og optages derfor let over mave-tarmkanalen, hvorfor befolkningen kan blive eksponeret, hvis stofferne findes som rester i fødevarer.

Det overordnede formål med projektet var derfor, at undersøge om tre hyppigt anvendte azol-fungicider, tebuconazol, propiconazol og epoxiconazol, har tilsvarende hormonforstyrrende egenskaber som prochloraz. Dette ville i givet fald tyde på, at hormonforstyrrende egenskaber er generelle for azol-fungicider.

Undersøgelsen

Østrogene og antiøstrogene egenskaber samt påvirkning af enzymet aromatase, som omdanner testosteron til østrogen, blev undersøgt i humane brystkræftceller (MCF-7) på Miljømedicin på Syddansk Universitet. Evnen til at interagere med androgenreceptoren, receptoren for skjoldbruskkirtlens hormoner, samt arylhydrocarbon (Ah)-receptoren blev undersøgt i celler som er genetisk modificeret til at udtrykke og respondere på aktivering af den pågældende receptor. Ah-receptoren er involveret i reguleringen af nogle enzymer som omsætter fremmedstoffer og hormoner. Disse undersøgelser fandt sted på Danmarks Fødevareforskning, som også stod for undersøgelse af stoffernes evne til at påvirke syntesen af kønshormoner i humane binyrebark-cancerceller samt antiandrogene virkninger i voksne hanrotter og effekter på afkommets udvikling hos rotter efter eksponering i drægtigheds- og diegivningsperioden.

Hovedkonklusioner

Propiconazol, tebuconazol og epoxiconazol havde stort set samme virkningsprofil i celleforsøgene som prochloraz.

I modsætning til prochloraz, virkede tebuconazol og propiconazol ikke antiandrogene i korttidsundersøgelser i kastrerede voksne hanrotter.

I lighed med prochloraz, øgede epoxiconazol og tebuconazol drægtighedslængden, forøgede progesteronniveauet hos moderdyrene samt maskuliniserede hunungerne. Tebuconazol medførte desuden feminisering af hanungerne, hvilket også er set for prochloraz.

Epoxiconazol virkede generelt fosterskadende, og denne effekt overskyggede den hormonforstyrrende effekt af stoffet.

Effekterne på rotteungernes udvikling kan skyldes et samspil af flere virkningsmekanismer, men samlet tyder resultaterne på, at en af hovedmekanismerne er forstyrrelse af nogle-enzymet i steroidhormonsyntesen.

Resultaterne peger kraftigt i retning af, at gruppen af azol-fungicider generelt har hormonforstyrrende egenskaber. Vi anbefaler derfor, at hele denne gruppe betragtes som havende hormonforstyrrende egenskaber indtil undersøgelser af enkeltstoffer eventuelt måtte vise noget andet.

Resultaterne fra projektet har givet ny viden om azol-fungiciders toksiske virkningsmekanismer og mulige sundhedsmæssige virkninger på forplantnings- og hormonsystemet. Resultaterne vil derfor kunne bidrage til en bedre risikovurdering for denne meget udbredte gruppe af svampemidler.

Projekresultater

Cellebaserede testsystemer

For at undersøge hormonforstyrrende virkningsmekanismer blev svampemidlerne testet i en række cellebaserede testsystemer. Propiconazol, tebuconazol og epoxiconazol udviste alle stort set samme virkningsprofil som prochloraz. Dog havde prochloraz en kraftigere effekt i nogle testsystemer. Dette var mest markant for aktiveringen af Ah-receptoren (Tabel 1).

Alle fire azol-forbindelser blokerede østrogen – og androgen receptorerne og modvirkede derved virkningen af henholdsvis østrogen og testosteron. Ligesom prochloraz hæmmede de tre øvrige azol-forbindelser enzymet aromatase og derved omdannelsen af testosteron til østrogen.

I humane binyrebark-cancerceller øgede azol-forbindelserne produktionen af progesteron mens produktionen af testosteron og østrogen var reduceret. Dette indikerer en hæmning af enzymer som er involveret i omdannelsen af progesteron til testosteron.

Der sås ingen interaktion af stofferne med receptoren for skjoldbruskkirtlens hormoner.

Tabel 1. Opsummering – *celleforsøg*

	Prochloraz	Tebuconazol	Epoxiconazol	Propiconazol
Androgen receptor	↓	↓	↓	↓
Østrogen receptor	↓	↓	↓	↓
aromatase	↓	↓	↓	↓
Steroid syntese				
Testosteron	↓	↓	↓	↓
Østradiol	↓	↓	↓	↓
Progesteron	↑	↑	↑	↑
T-screen	↔	(↓)	↔	↔
Ah-receptor	↑↑	↑	↑	↑

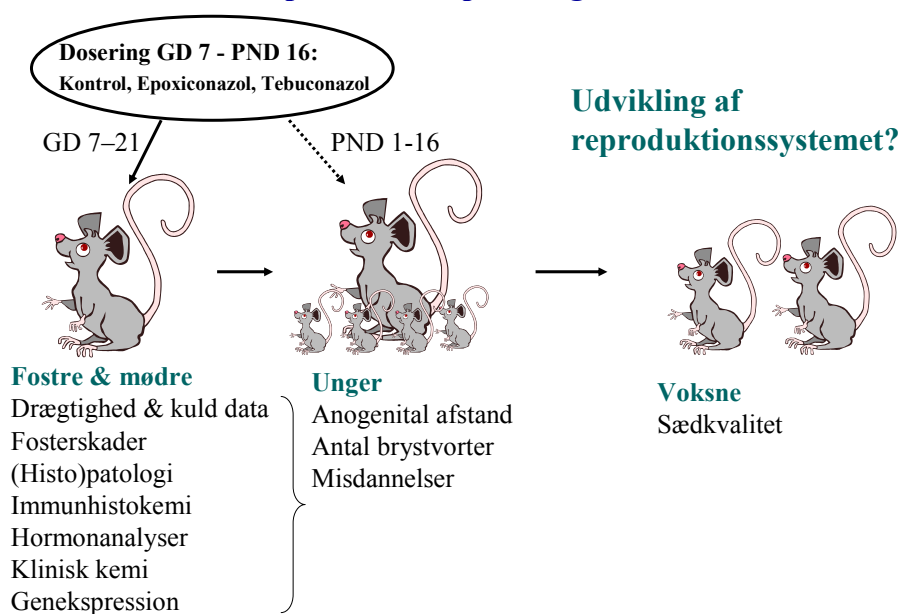
Anti-androgene virkninger i voksne hanrotter (Hershberger testen)

Hverken propiconazol eller tebuconazol i doserne 50, 100 eller 150 mg/kg lgv/dag modvirkede testosterons virkning i voksne kastrerede hanrotter der ikke har nogen naturlig produktion af steroidhormoner. Dette er i modsætning til prochloraz som medførte markante antiandrogene effekter i form af nedsat vægt af reproduktionsorganer og ændringer af hormonniveauer (Tabel 2).

Effekter på afkommet efter eksponering i drægtigheds- og diegivningsperioden

Drægtige rotter blev doseret med epoxiconazol (15 eller 50 mg/kg lgv/dag) eller tebuconazol (50 eller 100 mg/kg lgv/dag). Nogle dyr fik udført planlagt kejsersnit på gestationsdag (GD) 21 for at undersøge effekter på fostrene. Andre dyr fødte normalt og afkommet blev undersøgt enten ved fødslen eller 13 eller 16 dage efter fødslen (postnatal dag, PND) efter at havde været yderligere eksponeret gennem modermælken (Figur 1).

Figur 1. Studiedesign for undersøgelse af effekter på afkommet efter perinatal eksponering:



I lighed med prochloraz, forlængede epoxiconazol og tebuconazol drægtighedsperioden, hvilket sandsynligvis hænger sammen med et øget progesteronniveau hos moderdyrene.

Hos rotter er afstanden mellem anus og kønsorganerne ('anogenital distance', AGD) længere hos hanner end hos hunner. Både tebuconazol og epoxiconazol øgede AGD i hunungerne, hvilket tyder på en maskulinisering. Tebuconazol medførte desuden en stigning i antallet af brystvorter samt nedsat testosteronniveau hos hanungerne, hvilket tyder på en feminisering af hanungerne. Virkningen af tebuconazol ligner virkningen af prochloraz, som tidligere er påvist at maskulinisere hununger og feminisere hanunger i samme type undersøgelse (Tabel 2). Hoved mekanismen bag tebuconazols feminisering af hanungerne er sandsynligvis påvirkningen af steroidsyntesen, da der ikke sås nogen antiandrogen virkning i voksne, kastrerede hanrotter.

Epoxiconazol viste sig at være markant fosterskadende og den højeste dosis af epoxiconazol medførte øget fosterdød og problemer med at føde ungerne. Hvilke mekanismer der ligger til grund for dette og om hormonforstyrrelser er en del af årsagen, kan ikke siges ud fra vores forsøg (Tabel 2).

Tabel 2. Opsummering – dyreforsøg

	Prochloraz	Tebuconazol	Epoxiconazol*	Propiconazol
Antiandrogen virkning i kastrerede voksne hanrotter (Hersberger test)	++	↔	Ikke undersøgt	↔
Eksposering under drægtige rotter				
AGD hununger	↑	↑	↑	Ikke undersøgt
AGD hanunger	↓	↔	↔	Ikke undersøgt
Brystvorter hanunger	↑	↑	↔	Ikke undersøgt
Testosteron hanfostre	↓	↓	↔	Ikke undersøgt
Progesteron hanfostre	↑	↑	↔	Ikke undersøgt
Gestationslængde	↑	↑	↑	Ikke undersøgt
Testosteron - mødre	Ikke undersøgt	↔	↑	Ikke undersøgt
Progesteron -mødre	Ikke undersøgt	↑	↑	Ikke undersøgt

* Epoxiconazol var kraftigt fosterskadende ved højeste dosis på 50mg/kg.