



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Hormonforstyrrende effekter af anvendte pesticider fra forskellige pesticidgrupper

Bekæmpelsesmiddelforskning fra
Miljøstyrelsen nr. 152, 2013

Titel:

Hormonforstyrrende effekter af anvendte pesticider fra forskellige pesticidgrupper

Forfattere:

Forfattere er opsat i henhold til institutionstilknytning

Eva C. Bonefeld Jørgensen¹, Lisbeth S. Kjeldsen¹, Mandana Ghisari¹, Manhai Long¹, Rossana Bossi², Lisbeth E. Knudsen³, Line Mathiesen³, Anne Marie Vinggaard⁴, Camilla Taxvig⁴, Christine Nellemann⁴.

1 Institut for Folkesundhed, Aarhus Universitet

2 Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet

3 Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet

4 Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2013

ISBN nr.

978-87-93026-69-8

Ansvarsfraskrivelse:

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Forord	5
Forkortelser	7
Sammenfatning	9
Summary	15
1. Introduktion	21
1.1 Baggrund.....	21
1.1.1 Faktorer af betydning for ekstrapolation fra <i>in vitro</i> til <i>in vivo</i> undersøgelser: potensforskelle og sikkerhedsgrænser	22
1.2 Arbejdshypotese, målsætning og projektstrategi	23
1.2.1 Arbejdshypotese.....	23
1.2.2 Målsætning og projektstrategi.....	23
1.3 Biomarkør endpoints.....	24
1.4 Valg af pesticider til studiet.....	26
1.4.1 Beskrivelse af de udvalgte pesticider/pesticidgrupper.....	28
2. Metoder	35
2.1 <i>In vitro</i> cellekultur analyser	35
2.1.1 Effekter på ER-, AR- og AhR funktion	35
2.1.2 Effekter på TH funktion.....	37
2.1.3 Effekter på aromatase aktivitet	37
2.1.4 Effekter på kønshormonsyntese.....	38
2.1.5 Cytotoksicitet.....	38
2.1.6 Evaluering af blandingseffekter: koncentrations addition (CA) modellen.....	39
2.2 QSAR analyser	39
2.3 Transport over human placenta.....	39
2.3.1 Perfusionssystemet	40
2.3.2 BeWo cellemonolag systemet	40
2.4 <i>In vivo</i> rotte pesticid eksponeringer	42
2.5 Analyse af pesticider og metabolitter i væske fra placenta perfusioner og BeWo celleforsøg samt i urin og fostervand fra rotter.	42
2.6 Statistisk analyse.....	43
2.6.1 <i>In vitro</i> cellekultur analyser	43
2.6.2 <i>Ex vivo</i> placenta overførsel.....	44
2.6.3 <i>In vivo</i> rotte pesticideksponeringer	44
3. Resultater	45
3.1 <i>In vitro</i> cellekultur analyser	45
3.1.1 Valg af pesticider til blandingsanalyser	45
3.1.2 Effekter på ER funktion	45
3.1.3 Effekter på AR funktion.....	46
3.1.4 Effekter på AhR funktion.....	49
3.1.5 Effekter på TH funktion.....	50
3.1.6 Effekter på aromatase aktivitet	54
3.1.7 Effekter på kønshormonsyntesen.....	55

3.2	QSAR analyser	60
3.2.1	Opsummering af <i>in vitro</i> og <i>in silico</i> analyserne	60
3.3	Transport over human placenta	62
3.3.1	Valg af pesticider til analyser af transport over human placenta.....	62
3.3.2	Cypermethrin	63
3.3.3	Propiconazol.....	64
3.3.4	Bitertanol.....	66
3.3.5	Human placenta perfusion: pesticid metabolitter i Mix3	68
3.3.6	Opsummering af analyser af transport af pesticider over human placenta	69
3.4	<i>In vivo</i> rotte pesticideksponeringer	70
3.4.1	Valg af pesticiddoser og design af <i>in vivo</i> forsøg	70
3.4.2	Drægtighedsparametre	70
3.4.3	Anogenital afstand (AGD) og føtal legemsvægt	71
3.4.4	Hormonmålinger	71
3.4.5	Genekspression	72
3.4.6	Histopatologi på testikler	73
3.4.7	Pesticidanalyser i urin og fostervand fra rotter	73
3.4.8	Opsummering af <i>in vivo</i> rotte analyser.....	75
4.	Diskussion	77
4.1	<i>In vitro</i> og <i>in silico</i> prædiktivitet.....	77
4.1.1	Effekter på ER funktion	77
4.1.2	Effekter på AR funktion	78
4.1.3	Effekter på AhR funktion.....	79
4.1.4	Effekter på TH funktion.....	80
4.1.5	Effekter på aromatase aktivitet	82
4.1.6	Opsummering af effekter <i>in vitro</i> på ER-, AR-, AhR- og TH funktion samt aromatase aktivitet.....	83
4.1.7	Pesticideffekter på kønshormonsyntese i H295R celler, rotte <i>in vivo</i> forsøg og QSAR model analyse.....	84
4.2	Pesticider og metabolitter i fostervand og urin fra rotter	85
4.3	<i>Ex vivo</i> placenta overførsel	85
5.	Konklusioner	87
6.	Perspektivering	89
	Referencer	91

Bilag 1: Oversigt over bekæmpelsesmidler, der anvendes i Danmark vurderet i forbindelse med hormonforstyrrende effekter.

Bilag 2: Oversigt over de valgte pesticider og deres effekter baseret på tidligere litteratursøgning, de nye EU Assessment Reports og ny PubMed søgning.

Bilag 3: Revurdering af pesticid metabolitter.

Forord

Projektet om hormonforstyrrende effekter af anvendte pesticider fra forskellige pesticidgrupper blev gennemført i perioden september 2009 til september 2012 og er finansieret af Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning.

Projektet blev udført som et samarbejde mellem Institut for Folkesundhed, Aarhus Universitet (professor Eva C. Bonefeld-Jørgensen), Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet (seniorforsker Rossana Bossi), Institut for Folkesundhedsvidenskab, Københavns Universitet (professor Lisbeth E. Knudsen), og Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (professor Anne Marie Vinggaard og seniorforsker, nu afdelingschef, Christine Nellemann).

Fra disse fire institutioner har en række personers indsats været absolut nødvendig for projektets gennemførelse:

Institut for Folkesundhed (Aarhus Universitet). Projektleder/koordinator professor Eva C. Bonefeld-Jørgensen, lektor Manhai Long, post doc Mandana Ghisari, cand.scient. Lisbeth S. Kjeldsen og laborant Dorte Olsson.

Institut for Miljøvidenskab (Aarhus Universitet). Delprojektleder seniorforsker Rossana Bossi og laboranterne Inga Jensen og Kitty K. Petersen.

Institut for Folkesundhedsvidenskab (Københavns Universitet). Delprojektleder professor Lisbeth E. Knudsen, adjunkt Line Mathiesen, PhD Tina Mose, cand.scient. Jeanette K. S. Nielsen og cand.scient. Marie S. Poulsen.

Fødevareinstituttet (Danmarks Tekniske Universitet). Delprojektlederne afdelingsleder Christine Nellemann og professor Anne Marie Vinggaard, post doc Camilla Taxvig, seniorforsker Julie Boberg, laboranterne Birgitte Møller Plesning, Heidi Letting og Dorte Lykkesgaard Korsbech, leder af dyrestalden Anne Ørngreen og hele teamet i dyrestalden, samt seniorforsker Gunde Egeskov Jensen og post doc Niels Hadrup.

Tak til medlemmer af følgegruppen "Sundhed og Pesticider" for kommentarer og forslag i projektperioden: Jørn Kirkegaard (formand, Miljøstyrelsen), dyrlæge Grete Østergaard (Afdeling for Eksperimentel Medicin, Københavns Universitet), professor Christian Friis (Institut for Sygdomsbiologi, Københavns Universitet), seniorforsker Karin Sørig Hougaard (Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø), lektor Henrik Leffers (Biologisk Institut, Københavns Universitet), lektor Helle Raun Andersen (Institut for Sundhedstjenesteforskning, Syddansk Universitet), cand.scient. Rikke Donchil Holmberg (Miljøstyrelsen), cand. scient, PhD Susanne Hougaard (Miljøstyrelsen), Martin Larsson (BASF A/S), specialkonsulent Michael Nielsen (Videncentret for Landbrug), overlæge Jesper Bælum (Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik, Odense Universitetshospital), Seniorforsker Martin Tang Sørensen (Institut for Husdyrvidenskab, Aarhus Universitet), lektor Christian Ritz (Institut for Grundvidenskab og Miljø, Københavns Universitet), professor Ulla Hass (Fødevareinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet) og professor Eva C. Bonefeld-Jørgensen (Institut for Folkesundhed, Aarhus Universitet).

Forkortelser

3-BPA	3-Phenoxy-benzoesyre
ADME	Absorption, distribution, metabolisme og ekskretion
AGD	Anogenital afstand
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AR	Androgen receptor
CA	Koncentrations addition
cAMP	Cyklisk adenosin monofosfat
CYP	Cytochrome P450
DHT	Dihydrotestosteron
E2	17 β -Østradiol
EC50	Halv maksimal effekt koncentration
ER	Østrogen receptor
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
ETU	Ethylthiourea
FM	Føtal-maternel
GD	Gestationsdag
HF	Hydroxyflutamide
IC50	Halv maksimal inhibitorisk koncentration
LDH	Lactate dehydrogenase
LOEC	Lowest observed effect concentration
MCPA	2-Methyl-4-chlorophenoxyacetic acid
Mix3	Tre-komponent pesticidblanding
Mix4	Fire-komponent pesticidblanding
Mix5	Fem-komponent pesticidblanding
MOEC	Maximum observed effect concentration
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
PXR	Pregnan X receptor
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
R1881	Methyltrienolone
RPE	Relativ proliferativ effekt
SC	Solventkontrol
T3	Triiodothyronin
T4	Thyroxin
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TH	Thyroideahormon
TR	Thyroideahormon receptor

Sammenfatning

BAGGRUND

Hormonforstyrrende effekter, som følge af eksponering til pesticider, er i søgelyset som muligt bidrag til hæmmet reproduktion (f.eks. nedsat fertilitet og forringet sædkvalitet), øget forekomst af misdannede kønsorganer hos drengebørn samt en række andre sygdomme som bl.a. bryst- og testikelkræft. Tidligere undersøgelser *in vitro*, samt i dyr og i mennesker har indikeret, at en række nuværende anvendte pesticider besidder et hormonforstyrrende potentiale (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Long et al., 2003; Nellemann et al., 2003; Birkhøj et al., 2004; Grunfeld and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Hofmeister and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Vinggaard et al., 2005a; Vinggaard et al., 2005b; Andersen et al., 2008).

I 2002 blev der i et dansk studie rapporteret, at syv ud af 24 analyserede pesticider viste hormonforstyrrende potentiale i mere end én ud af fire *in vitro* analyser (Andersen et al., 2002). Der er en stadig stigende bekymring for, at eksponeringer til selv lave pesticidkoncentrationer i fosterperioden, under udvikling af reproduktionsorganer og nervesystem, kan medføre vedvarende skader på disse organsystemer. Derfor antages det, at børn og fostre (og hermed gravide kvinder) er særlige sårbare grupper i forhold til pesticideksponering. For nyligt blev der i en dansk undersøgelse vist en hæmmet reproduktionsudvikling (øget forekomst af kryptorkisme) hos sønner af kvinder, der arbejder i gartneri og dermed er eksponeret til pesticider under graviditeten (Andersen et al., 2008).

Den humane population er gennem livet eksponeret for blandinger af hormonforstyrrende stoffer, inklusive en række pesticider. Virkningskraften af disse kemikalier er relativ svag i forhold til effekten af de naturlige kønshormoner som cirkulerer i kroppen, hvilket har gjort det vanskeligt at forklare eventuelle sundhedsskadelige effekter alene på baggrund af effekter af de enkelte kemikalier. De hormonforstyrrende stoffer mistænkes for at kunne agere sammen og bevirke en samlet forøget effekt - en mistanke der bl.a. støttes af tidligere studier *in vitro* og *in vivo* i rotter, som har påvist kombinationseffekter af pesticider (Nellemann et al., 2003; Birkhøj et al., 2004; Kjaerstad et al., 2010a; Hass et al., 2012; Jacobsen et al., 2012).

FORMÅL

Det overordnede formål med dette projekt var at udføre en første screening af det hormonforstyrrende potentiale samt at belyse eventuelle virkningsmekanismer af 13 pesticider [2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), terbuthylazin, iodosulfuron-methyl-natrium, mesosulfuron-methyl, metsulfuron-methyl, chlormequat chlorid, bitertanol, propiconazol, prothioconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion] og én metabolit [ethylthiourea (ETU)] for at skabe et solidt fundament for videre prioritering af dybdegående undersøgelser af pesticidernes mulige hormonforstyrrende effekter. Målet var *ikke* at gennemføre en human risikovurdering, og resultaterne fra denne undersøgelse kan derfor hverken frikende eller forbyde nogen af pesticiderne.

Foruden malathion (dansk anvendelsesforbud siden 2008) og ETU, repræsenterer de undersøgte stoffer aktive ingredienser i almindeligt anvendte pesticidprodukter i Danmark. De valgte bekæmpelsesmidler udgør stoffer fra otte forskellige pesticidgrupper, og blev undersøgt ved såvel *in*

vitro, *in silico*, *ex vivo* som *in vivo* metoder. Pesticiderne blev vurderet både som enkeltstoffer samt i to relevante blandinger.

I projektet blev fokuseret på pesticider, som er relevante i forhold til human eksponering. Ved udvælgelse af stoffer blev der lagt vægt på anvendelse og forbrug i Danmark, behandlet areal i hektar, om der var tilgængelige analysemetoder for stoffet i blod/urin, samt om der fandtes viden om hormonforstyrrende effekter af pesticiderne fra litteraturen eller igangværende projekter.

PROJEKTSTRATEGI OG METODER

Indledningsvist blev pesticiderne analyseret *in vitro* som enkeltstoffer i seks allerede etablerede mammale cellekultursystemer. Disse *in vitro* screeninger havde til formål at belyse mulige virkningsmekanismer samt potens af pesticiderne. Blandt de *in vitro* aktive stoffer blev hernæst udvalgt pesticider til to forskellige blandinger, Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin) og Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion), som ligeledes blev analyseret i det respektive batteri af *in vitro* tests.

Resultater fra *in vitro* forsøgene blev sammenholdt med undersøgelser af pesticiderne *in silico* i en række QSAR (quantitative structure-activity relationship) modeller til forudsigelse af effekter på relevante endpoints for endokrin aktivitet.

Potentialet af de tre *in vitro* aktive pesticider bitertanol, propiconazol og cypermethrin (samt en 1:1:1 blanding af disse svarende til Mix3) til at passere human placenta blev ligeledes undersøgt. Som model for pesticideksponering af humane fostre, blev anvendt et veletableret *ex vivo* testsystem til undersøgelse af transport af stofferne over human placenta ved brug af moderkager fra vaginale fødsler og ukomplicerede kejsersnit. Resultater opnået ved anvendelse af dette system blev suppleret med data fra en etableret *in vitro* model af transport af fremmedstoffer over et monolag af BeWo celler af human placental oprindelse.

Data fra *in vitro* analyser og undersøgelser af human placenta transport, blev sammenholdt med viden fra egne og andres dyreforsøg med de valgte eller relaterede pesticider. På basis heraf blev udført et *in vivo* forsøg med fokus på antiandrogene effekter. Effekter af de to pesticidblandinger på den føtale steroidsyntese i drægtige Wistar hunrotter og deres afkom blev analyseret. Forsøgene blev udført med blandinger (Mix3 og Mix5), i hvilke kemikalierne var til stede i lige store mængder (i mg/kg), hvilket betød, at den maksimale dosis af blandingen blev begrænset af den tilladelige maksimale dosis af det mest toksiske kemikalie. Parallelt med disse rotteforsøg, blev der som eksponeringsmarkør bestemt koncentrationer af pesticider og udvalgte metabolitter i rotteurin og fostervand.

RESULTATER

In vitro og *in silico* analyser

De 14 testede stoffer blev analyseret *in vitro* for effekter på østrogen receptor (ER)-, androgen receptor (AR)-, aryl hydrocarbon receptor (AhR)- og thyroidea hormon (TH) funktion samt for effekter på aromatase aktivitet og kønshormonsyntese. Alle 13 pesticider udviste aktivitet i mindst én ud af de seks cellekultur modeller, hvorimod metabolitten (ETU) var inaktiv i alle assays. Otte af pesticiderne (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, prothioconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion) viste effekt på flere *in vitro* endpoints, hvilket indikerer et bredere hormonforstyrrende potentiale af disse forbindelser. Dog var effekterne af de *in vitro* aktive pesticider svage relativt til effekterne af de naturlige hormoner, som cirkulerer i kroppen.

Vi fandt signifikante AR blokerende blandingseffekter *in vitro* for begge pesticidblandinger (Mix3 og Mix5) - dvs. at komponenterne agerede sammen, hvilket bevirkede en samlet forøget effekt på AR funktion.

Mix3 og Mix5 havde markant forskellige effekter på kønshormonsyntesen *in vitro*, idet der sås en signifikant reduktion af østradiolniveauet med Mix3, mens Mix5 gav anledning til en øget produktion af østradiol. Dette skyldes efter al sandsynlighed den CYP19 (aromatase) inducerende effekt af terbuthylazin og malathion, som var til stede i Mix5 men ikke i Mix3.

I QSAR analyserne blev pesticiderne cypermethrin og malathion forudsagt positive for pregnan X receptor (PXR) agonisme, hvilket indikerer, at disse stoffer er i stand til at inducere leverenzymet CYP3A4, som bl.a. er involveret i metabolismen af visse kønshormoner samt en lang række udefrakommende stoffer.

Ex vivo: Transport over human placenta

Begge placenta transportmodeller viste en overførsel af de tre undersøgte pesticider *ex vivo*:

Propiconazol og bitertanol ved fri diffusion, mens cypermethrin viste en mere begrænset transport med binding til det placentale væv. Vi fandt ingen blandingseffekter af Mix3, hvilket kan skyldes, at to af pesticiderne bliver overført ved fri diffusion og dermed ikke er afhængige af interaktion med receptorer og transportfaktorer.

Begge placenta transportmodeller viste en betydelig metabolisme af pesticiderne: Metabolitterne 1,2,4-triazol (nedbrydningsprodukt af propiconazol og bitertanol) og 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) blev fundet med stigende koncentration over tid i prøverne fra placenta perfusionerne af pesticidblandingen. 3-PBA blev ligeledes fundet på både på den materielle og den føtale side i BeWo transportforsøgene, hvilket indikerer, at placenta delvist metaboliserer de tre undersøgte pesticider til stoffer, der kan have andre egenskaber end det originale stof. Både moderen og fosteret udsættes for disse metabolitter.

In vivo: Effekter på den føtale steroidsyntese i drægtige rotter og deres afkom

Rottforsøgene viste ingen antiandrogene effekter *in vivo* af de to pesticidblandinger (Mix3 og Mix5). Der blev hverken fundet effekter på anogenital afstand (AGD), testosteronniveauer eller histopatologiske forandringer i testiklerne. I rottemødrene blev der fundet et svagt, men signifikant nedsat blodniveau af østradiol efter dosering med den højeste dosis af Mix5, samt en signifikant stigning i T4 ved de to højeste doser af Mix 5. I rottfostrene blev der målt østradiol i blod fra hanfostre, men der blev ikke fundet nogen signifikante effekter.

Der blev observeret en markant stigning i aromatase (CYP19) mRNA niveauet i binyrerne fra hunfostre eksponeret til Mix5. Dette er i overensstemmelse med resultaterne fra H295R assayet, der ligeledes viste CYP19 induktion med Mix5 (men ikke med Mix3). I hunfostre blev der desuden målt østradiol i ovarier og her sås en tendens til en stigning, især ved de laveste doser af både Mix3 og Mix5, men denne stigning var ikke signifikant. Niveauet af progesteron blev også målt i binyrer fra hunfostre og om end en tendens til en stigning, især for den midterste dosis af Mix 5 (15 mg/kg) var der ikke signifikante effekter.

Pesticiderne og metabolitter blev fundet i fostervand og urin - generelt med stigende koncentrationer i forhold til stigende dosering af rotterne. Pesticiderne i urinen dokumenterede såvel eksponeringen som evnen til at udskille stofferne. Desuden indikerede målingen af stofferne i fostervand, at fosteret var eksponeret til både pesticiderne og deres metabolitter.

Ved eksponering til Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin, malathion) fandt vi, at koncentrationerne af bitertanol, propiconazol og cypermethrin i fostervæsken var relativt lavere, end hvis en blanding af de tre pesticider (Mix3) blev givet til dyrene. Dette er en klar indikation af ADME (absorption, distribution, metabolisme og ekskretion) interaktion *in vivo* mellem de fem pesticider, som kan føre til non-additive effekter af stofferne.

Overordnet blev følgende observeret for de enkelte pesticider:

- **MCPA** (phenoxyresyre herbicid) aktiverede *in vitro*, dog kun ved en relativ høj koncentration af pesticidet (1×10^{-4} M), AhR i muse hepatoma cellelinjen Hepa1.12cR.
- **Terbuthylazin** (triazin herbicid) udviste *in vitro* svage koncentrations-afhængige agonistiske effekter på ER og AhR samt TH-lignende aktivitet. Ydermere blev terbuthylazin fundet at inducere aromatase enzymet (CYP19) i de humane cellelinjer, JEG-3 og H295R, og *in vivo* i binyrer fra rottefostre. Denne effekt er ligeledes tidligere set for triazin herbicidet atrazin.
- **Iodosulfuron-methyl-natrium, mesosulfuron-methyl og metsulfuron-methyl** (sulfonylurea herbicider), samt **chlormequat chlorid** (vækstregulator), blev vist at kunne aktivere AhR *in vitro*. For pesticiderne mesosulfuron-methyl og metsulfuron-methyl blev denne effekt dog kun observeret ved højeste forsøgs-koncentration af stofferne (1×10^{-4} M).
- **Bitertanol** (azolfungicid) udviste koncentrations-afhængige blokerende effekter på AR i hamster ovarieceller (CHO-K1). Resultatet understøttes af data fra QSAR analyser, hvor bitertanol ligeledes blev forudsagt positiv for AR antagonisme. Bitertanol havde en nedregulerende effekt på AhR og TH funktion *in vitro* samt forårsagede en nedsat produktion af kønshormonerne testosteron og østradiol i humane H295R celler. *Ex vivo* og *in vitro* studiet, af transplacental transport af bitertanol, viste passage over placenta ved fri diffusion, hvorved en eksponering af fosteret til azolfungicidet er meget sandsynlig.
- **Propiconazol** (azolfungicid) var aktivt *in vitro* i alle seks mammale cellekultur modeller (ER, AR, AhR, TH, aromatase, kønshormonsyntese). En svag koncentrations-afhængig østrogen-lignende aktivitet samt hæmmende effekter på AR blev observeret. I overensstemmelse med dette blev propiconazol forudsagt at være positiv for AR antagonisme i QSAR analysen. Azolfungicidet viste hormonforstyrrende effekter på AhR- og TH funktion samt aromatase aktivitet. I humane H295R celler forårsagede propiconazol en nedsat produktion af kønshormonerne testosteron og østradiol. *Ex vivo* studiet af transport af propiconazol over human placenta viste overførsel ved fri diffusion, og dette resultat blev understøttet af data fra BeWo celletransport modellen. Dette indikerer, at en eksponering af fosteret til azolfungicidet er meget sandsynlig.
- **Prothioconazol** (azolfungicid) udviste *in vitro* en svag østrogen-lignende aktivitet samt opregulerende effekter på aromatase aktiviteten, hvilket samlet set indikerer en svag østrogen effekt af dette pesticid. Prothioconazol havde ligeledes TH-lignende effekt samt hæmmede AhR funktion (kun højeste testkoncentration (1×10^{-4} M)).
- **Mancozeb** (dithiocarbamat fungicid) havde *in vitro* svage opregulerende effekter på AhR og TH funktion samt en hæmmende effekt på AR ved en høj koncentration af pesticidet, hvilket dog ikke kan udelukkes at skyldes et begyndende cytotoxisk respons af mancozeb. Metabolitten **ETU** var inaktiv *in vitro* i alle seks mammale cellekultur modeller.
- **Cypermethrin** (pyrethroid insekticid) udviste *in vitro* en meget svag østrogen-lignende aktivitet samt opregulerende effekter på AhR og TH funktion. Cypermethrin bevirkede en induceret kønshormonsyntese (progesteron, testosteron og østradiol) i humane H295R celler og blev forudsagt at aktivere PXR *in silico*, hvormed insekticidet formodes at kunne inducere leverenzymet CYP3A4, som bl.a. er involveret i metabolismen af visse kønshormoner. *Ex vivo* studiet af transplacental transport af cypermethrin viste en begrænset overførsel af insekticidet med binding til det placentale væv. Dette resultat blev understøttet af data fra BeWo celle transportmodellen og tyder på en aktiv transport af cypermethrin over human placenta.
- **Tau fluvalinat** (pyrethroid insekticid) udviste *in vitro* en markant aktiverende effekt på AhR funktion samt en stimulerende effekt på TH-afhængig GH3 cellevækst. I tilstedeværelse af det naturlige thyroideahormon triiodothyronin (T₃) hæmmede

pesticidet den T₃-inducerede GH₃ cellevækst, hvilket antyder, at stoffet har potens til at hæmme det naturlige T₃.

- **Malathion** (organofosfat insekticid) udviste *in vitro* svag østrogen-lignende aktivitet og en aktiverende effekt på AhR funktion samt en øget proliferation af TH-afhængig GH₃ cellevækst i T-screen assayet. Malathion bevirkede en markant forøget kønshormonsyntese (progesteron, testosteron, østradiol) i H295R celler, som muligvis kan forklare den observerede vækst af brystcancer celler i et tidligere studie. I QSAR blev pesticidet forudsagt at aktivere PXR, hvormed det formodes at kunne inducere leverenzymet CYP3A4, som bl.a. er involveret i metabolismen af visse kønshormoner.

OPSUMMERING OG KONKLUSIONER

Flere af de undersøgte pesticider viste *in vitro* potentialet til at forstyrre en bred vifte af hormonforstyrrende mekanismer - dog med en væsentlig svagere effekt sammenlignet med effekten af de naturlige hormoner, som blev analyseret parallelt.

Der blev fundet flest *in vitro* aktive pesticider blandt azolfungicider (*bitertanol*, *propiconazol*, *prothioconazol*), dernæst i gruppen af pyrethroid insekticider (*cypermethrin*, *tau fluvalinat*), hvorimod kun ét pesticid blev fundet aktivt i herbicid gruppen (*terbuthylazin*) og begrænsede og svage effekter blev observeret for dithiocarbamat fungicidet (*mancozeb*) og organofosfat insekticidet (*malathion*).

De to udvalgte blandinger bestående af *in vitro* aktive pesticider (Mix3: *bitertanol*, *propiconazol*, *cypermethrin*; Mix5: *terbuthylazin*, *bitertanol*, *propiconazol*, *cypermethrin*, *malathion*) viste additive effekter (blokerende) på AR funktion. Ligeledes viste en special sammensat fire-komponent pesticidblanding (Mix5 uden bitertanol: *terbuthylazin*, *propiconazol*, *cypermethrin*, *malathion*) additive effekter (stimulerende) på TH funktion.

Vores *in vitro* data, for hormonforstyrrende potentiale på TH funktion af otte af de undersøgte pesticider viser, at der bør etableres nye analysemodeller såvel *in vitro*, *ex vivo* som *in vivo* med fokus på specifikke biomarkører for TH-forstyrrende mekanismer.

Der konkluderes, at *in vitro* og *in silico* analyserne er gode redskaber til en første screening af en række pesticider, og vores undersøgelser har givet en ide om, hvilke blandt de testede pesticider som måtte have problematiske endokrine effekter. Dog skal man være opmærksom på begge analysers begrænsning i henhold til den anvendte model. Analyserne *in vitro* er baserede på cellekulturer fra et bestemt væv (ofte fra forskellige arter) og adskiller sig fra de sædvanlige *in vivo* regulerende mekanismer. *In silico* modeller er udelukkende baserede på stoffernes kemiske struktur og giver alene blot indikationer for en effekt.

Ex vivo human placenta transport analyser, af tre valgte pesticider, viste at de to azolfungicider, *propiconazol* og *bitertanol*, blev overført fra det maternelle til det føtale rum via fri diffusion, hvorimod pyrethroid insekticidet *cypermethrin* viste en begrænset overførsel, der tyder på en aktiv transport af stoffet over human placenta. Der blev ikke set nogen effekter af de tre pesticider i blanding (Mix3) - sandsynligvis pga. forskellige overførselsmekanismer. Der blev endvidere observeret, at placentavæv metaboliserer de tre pesticider. En god overensstemmelse mellem de to anvendte modeller, *ex vivo* human placenta perfusion og *in vitro* BeWo cellekultur, blev observeret.

Der konkluderes, at de tre undersøgte pesticider alle har potentialet til at blive overført via placenta til fosteret, samt at placenta danner pesticidmetabolitter, hvilket indikerer, at såvel mødre som fostre kan blive eksponeret til de kemiske stoffer. De opnåede data bør følges op af yderligere humane studier for måling af eventuelle pesticidkoncentrationer i moderens blod, og navlestrengsblod af mulige eksponerede individer, for at studere eventuelle effekter på føtal

udvikling. BeWo cellemodellen synes, fra de opnåede data, at være en god, hurtigere og derfor mere effektiv screeningsmodel til test af pesticiders potentiale til at blive overført fra moder til foster.

In vivo forsøg med eksponering af drægtige rotter til de to pesticidblandinger, Mix3 og Mix5, viste ingen antiandrogene effekter eller ændrede blodniveauer af de målte kønshormoner i afkommet. Derimod var østradiol blodniveauet hos mødrene svagt nedsat ved eksponering til den højeste dosis af Mix5, som muligvis kan være en medvirkende årsag til den stigning i aromatase mRNA niveauet, som blev fundet i binyrer fra hunfostre ved den højeste dosis af Mix5. Yderligere blev der i mødrene fundet en signifikant stigning i T4 blodniveauet efter eksponering til Mix5. I hunfostre sås også en ikke signifikant stigning i østradiol i ovarier ved de midterste doser af både Mix3 og Mix5, samt en tendens til en stigning i progesteron i binyrer. Disse data antyder, at de anvendte pesticidblandinger, på de undersøgte end points, primært måtte have effekter på hunkønnet, men kræver yderligere studier. Pesticiderne og deres metabolitter blev fundet i såvel fostervand som urin fra mødrene med stigende koncentrationer i takt med stigende eksponeringer. Dette viser, at både moderen, såvel som fosteret er eksponeret til disse kemikalier, samt dokumenterer, at moderen er i stand til at udskille stofferne.

Der konkluderes, at de valgte blandinger, af *in vitro* aktive pesticider, ingen effekter har på androgene endpoints i *in vivo* rottestudiet, hvorimod det kunne tyde på, at Mix5 har et potentiale til at udøve hormonforstyrrende effekter i hunner. Denne hypotese kræver dog yderligere studier i en model med fokus på mere specifikke østrogene biomarkører i hunner (mødre og fostre). Endvidere viser både *ex vivo* human placenta analyser og rotte studierne, at de undersøgte *in vitro* aktive pesticider og deres metabolitter overføres fra moder til foster. Fremtidige undersøgelser bør foretages for nærmere at evaluere, hvilke effekter disse metabolitter kan have på såvel moder som foster.

Summary

BACKGROUND

Endocrine-disrupting effects, as a result of pesticide exposure, is in the spotlight as possible contribution to the impaired reproduction (e.g. reduced fertility and impaired semen quality), increased incidence of malformed genitalia in boys and a number of other diseases such as breast and testicular cancer. Previous studies *in vitro* as well as in animals and humans have indicated that a number of currently used pesticides possess endocrine-disrupting potential (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Long et al., 2003; Nellemann et al., 2003; Birkhoj et al., 2004; Grunfeld and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Hofmeister and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Vinggaard et al., 2005a; Vinggaard et al., 2005b; Andersen et al., 2008).

In 2002, a Danish study reported that seven out of 24 analyzed pesticides showed an endocrine-disrupting potential in more than one of four *in vitro* analyses (Andersen et al., 2002). There is a continuous growing concern that exposure to even low concentrations of pesticides during the fetal period, as reproductive organs and nervous system are developed, may cause permanent damage on these organ systems. Therefore, it is assumed that children and fetuses (i.e. pregnant women) are particular vulnerable groups regarding pesticide exposure. Recently, a Danish study demonstrated an impaired reproductive development (increased incidence of cryptorchidism) in sons of women who work in horticulture and thus, are occupationally exposed to pesticides during pregnancy (Andersen et al., 2008).

Throughout life, the human population is exposed to mixtures of endocrine disruptors, including several pesticides. The effects of these chemicals are relatively weak compared to the effects of the natural sex hormones in the body, making it difficult to explain the possible harmful effects solely on the basis of the action of the individual chemicals. Thus, the endocrine-disrupting compounds are suspected to act together and cause an overall increased effect - a suspicion supported by previous studies *in vitro* and *in vivo* in rats which have demonstrated combination effects of pesticides (Nellemann et al., 2003; Birkhoj et al., 2004; Kjaerstad et al., 2010a; Hass et al., 2012; Jacobsen et al., 2012).

OBJECTIVES

The overall aim of this project was to conduct an initial screening of the endocrine-disrupting potential and clarify possible mechanisms of action of 13 pesticides [2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), terbuthylazine, iodosulfuron-methyl-sodium, mesosulfuron-methyl, metsulfuron-methyl, chlormequat chloride, bitertanol, propiconazole, prothioconazole, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinate and malathion] and one metabolite [ethylenehiourea (ETU)] to create a reliable foundation for further prioritization of thorough investigations of the possible endocrine-disrupting effects the pesticides. The aim was *not* to carry out a human risk assessment, and the results from this report can neither give acceptance of nor preclude any of the pesticides.

Besides malathion (banned in Denmark since 2008) and ETU, the compounds tested represent active ingredients in pesticide formulations commonly used in Denmark. The selected pesticides comprise compounds from eight different pesticide groups and were studied using *in vitro*, *in silico*,

ex vivo as well as *in vivo* methods. The pesticides were assessed as single compounds and in two relevant mixtures.

The project focused on pesticides that are relevant to human exposure. When selecting the compounds, emphasis was placed on the use and consumption in Denmark, treated area in hectares and on whether there were available analytical detection methods of the compound in blood/urine as well as the existence of knowledge about endocrine-disrupting effects of the pesticides from the literature or ongoing projects.

PROJECT STRATEGY AND METHODS

Initially, the pesticides were analyzed *in vitro* as single compounds in six well-established mammalian cell culture systems. The purpose of these *in vitro* screenings was to clarify possible mechanisms of action as well as to determine the potency of the pesticides. Subsequently, among the compounds shown to be active *in vitro*, pesticides for two different mixtures, termed as Mix3 (bitertanol, propiconazole and cypermethrin) and Mix5 (terbuthylazine, bitertanol, propiconazole, cypermethrin and malathion) were selected, and the mixtures were analyzed in the respective battery of *in vitro* tests as well.

Results from the *in vitro* experiments were compared to *in silico* analyses of the pesticides in a number of QSAR (quantitative structure-activity relationship) models for prediction of effects on endpoints that are relevant to endocrine activity.

Furthermore, the potential of the three *in vitro* active pesticides bitertanol, propiconazole and cypermethrin (and a 1:1:1 mixture of these pesticides corresponding to Mix3) to pass the human placenta was assessed. As a model of human fetal exposure to pesticides, a well-established *ex vivo* model system was used for the study of transport of compounds across human placenta, using placentae from vaginal births and uncomplicated caesareans. Results obtained with this system were supplied with data from a well-established *in vitro* model of transport of xenobiotics across a monolayer of BeWo cells of human placental origin.

Data from *in vitro* analyses and studies of human placental transport were compared with knowledge obtained from our own and other animal experiments, involving the pesticides chosen for this study or compounds related to these pesticides. Based on these findings, an *in vivo* experiment, focusing on antiandrogenic effects, was conducted. The effects of the two pesticide mixtures on fetal steroidogenesis in pregnant Wistar rats and their offspring were analyzed. The experiments were carried out using mixtures (Mix3 and Mix5) in which the chemicals were found in equal amounts (in mg/kg) which meant, that the maximum dose of each mixture was limited by the maximum permissible dose of the most toxic chemical. In parallel to these rat experiments, concentrations of pesticides and selected metabolites in rat urine and amniotic fluid were determined as biomarker.

RESULTS

In vitro and *in silico* analyses

The 14 test compounds were analyzed *in vitro* for effects on estrogen receptor (ER)-, androgen receptor (AR)-, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-, and thyroid hormone (TH) function as well as for effects on aromatase activity and synthesis of sex hormones in H295R cells. All 13 pesticides showed activity in at least one out of six *in vitro* cell culture analyses, whereas the metabolite (ETU) was inactive in all assays. Eight of the pesticides (terbuthylazine, bitertanol, propiconazole, prothioconazole, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinate and malathion) showed an effect on several *in vitro* endpoints which indicate a more extensive endocrine-disrupting potential of these

compounds. However, the effects of the *in vitro* active pesticides were relatively weak compared to the effects of the natural hormones circulating in the body. We found significant AR blocking mixture effects *in vitro* for both pesticide mixtures (Mix3 and Mix5) – that is, the components of the mixtures acted together, causing an overall increased effect on AR function.

Mix3 and Mix5 showed notably different *in vitro* effects on the synthesis of sex hormones, given that a significant reduction in estradiol levels was seen for Mix3, whereas Mix5 caused an increased production of estradiol. This is probably due to the CYP19 (aromatase) inducing effect of terbuthylazine and malathion which were present in Mix5 but not in Mix3.

In the QSAR analyses, the pesticides cypermethrin and malathion were predicted to be positive for pregnane X receptor (PXR) agonism which indicate, that these compounds are capable of inducing the liver enzyme CYP3A4 which is involved in the metabolism of certain sex hormones and a wide range of xenobiotics.

Ex vivo: Transport across human placenta

Both placental transport models showed a transfer of the three pesticides studied *ex vivo*:

Propiconazole and bitertanol by free diffusion, whereas cypermethrin showed a more limited transport indicating an active transport, as well as binding to the placental tissue. We found no combination effects of Mix3 probably because of different placenta transport mechanisms; two of the pesticides are transferred by free diffusion and one by active transport. Free transport does not depend on interactions with receptors and transport factors.

Both placental transport models showed a significant metabolism of the pesticides: The metabolites 1,2,4-triazole (degradation product of propiconazole and bitertanol) and 3-PBA (degradation product of cypermethrin) were found with increasing concentration over time in samples from the placental perfusions of the pesticide mixture. Likewise, 3-PBA was found on both the maternal and fetal side in the BeWo transport experiments, indicating that the placenta partially metabolize the three tested pesticides into compounds which might have different characteristics than the original substance. Both the mother and the fetus are exposed to these metabolites.

In vivo: Effects on fetal steroidogenesis in pregnant rats and their offspring

The rat experiments showed no antiandrogenic effects *in vivo* of the two pesticide mixtures (Mix3 and Mix5). There were neither found effects on anogenital distance (AGD), testosterone levels or histopathologic changes in the testes. In the rat mothers, a weak but significant decrease in estradiol blood levels was found upon administration of the highest dosage of Mix5. We found no significant effects on measured hormone levels in the rat fetuses.

In the adrenal glands of the female fetuses exposed to Mix5, a significant increase in the aromatase (CYP19) mRNA level was observed. This is in line with results from the H295R assay which also showed a CYP19 induction with Mix5 (but not Mix3).

The pesticides and their metabolites were found in amniotic fluid and urine – generally with increasing concentrations in correlation with increasing dosage of the rats. The pesticides detected in urine demonstrated the exposure as well as the ability of the rat to excrete these compounds. Moreover, the measurement of the substances in amniotic fluid indicated, that the fetus was exposed to the pesticides as well as their metabolites.

Upon exposure to Mix5 (terbuthylazine, bitertanol, propiconazole, cypermethrin, malathion), we found that the concentrations of bitertanol, propiconazole and cypermethrin in the amniotic fluid were relatively lower than if a mixture of the three pesticides (Mix3) were administered to the animals. This is a clear indication of ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) interactions *in vivo* between the five pesticides, which might lead to non-additive effects of the compounds.

Overall, the following observations were made for the single pesticides:

- **MCPA** (phenoxy acid herbicide) activated *in vitro*, although at a relatively high concentration of the pesticide (1×10^{-4} M), the AhR in the mouse hepatoma cell line Hepa1.12cR.
- **Terbuthylazine** (triazine herbicide) elicited weak concentration-dependent agonistic effects on the ER and AhR as well as TH-like activity *in vitro*. Moreover, terbuthylazine was found to induce the aromatase enzyme (CYP19) in the human cell lines, JEG-3 and H295R, and *in vivo* in adrenal glands from rat fetuses. This effect is previous seen for the triazine herbicide atrazine.
- **Iodosulfuron-methyl-sodium, mesosulfuron-methyl and metsulfuron-methyl** (sulfonylurea herbicides) as well as **chlormequat chloride** (growth regulator) were shown to activate AhR *in vitro*. For the pesticides mesosulfuron-methyl and metsulfuron-methyl, this effect was only observed at the highest concentration of the compounds tested (1×10^{-4} M).
- **Bitertanol** (azole fungicide) elicited concentration-dependent blocking effects on the AR in hamster ovary cells (CHO-K1). This result is supported by data from the QSAR analyses, in which bitertanol was predicted to be an AR antagonist as well. Bitertanol elicited a down-regulating effect on AhR and TH function *in vitro* and caused a decrease in the production of the sex hormones testosterone and estradiol in human H295R cells. The *ex vivo* and *in vitro* study of the transplacental transport of bitertanol showed a transfer across the placenta by free diffusion, and thus, a fetal exposure to the azole fungicide is very likely.
- **Propiconazole** (azole fungicide) was active *in vitro* in all six mammalian cell culture models (ER, AR, AhR, TH, aromatase, synthesis of sex hormones). A weak concentration-dependent estrogenic activity, as well as inhibiting effects on the AR, was observed. In accordance to this, propiconazole was predicted to be an AR antagonist in the QSAR analysis. The azole fungicide elicited endocrine-disrupting effects on AhR and TH function as well as on aromatase activity. In human H295R cells, propiconazole caused a decrease in the production of the sex hormones testosterone and estradiol. The *ex vivo* study of transport of propiconazole across the human placenta showed a transfer by free diffusion, and this result was supported by data from the BeWo cell transport model. This indicates that a fetal exposure to the azole fungicide is very likely.
- **Prothioconazole** (azole fungicide) elicited weak estrogenic activity and up-regulating effects on the aromatase activity *in vitro* which indicate an overall weak estrogenic effect of this pesticide. Moreover, prothioconazole was found to have TH-like effects and inhibit AhR function (only at the highest test concentration (1×10^{-4} M)).
- **Mancozeb** (dithiocarbamate fungicide) showed *in vitro* weak up-regulating effects on AhR and TH function as well as an inhibiting effect on the AR at a high concentration of the pesticide, which might be due to an incipient cytotoxic response of mancozeb. The metabolite **ETU** was inactive *in vitro* in all six mammalian cell culture models.
- **Cypermethrin** (pyrethroid insecticide) elicited very weak estrogenic activity and up-regulating effects on AhR and TH function *in vitro*. Cypermethrin caused an induced synthesis of sex hormones (progesterone, testosterone and estradiol) in human H295R cells and was predicted to activate PXR *in silico*, and thus, the insecticide is presumed to induce the liver enzyme CYP3A4 which is involved in the metabolism of certain sex hormones. The *ex vivo* study of transplacental transport of cypermethrin showed a limited transfer of the insecticide, indicating an active transport and binding to the placental tissue. This result was supported by data from the BeWo cell transport model and indicates an active transport of cypermethrin across the human placenta.

- **Tau fluvalinate** (pyrethroid insecticide) showed *in vitro* a notably activating effect on AhR function and a stimulating effect on TH-dependent GH3 cell growth. In the presence of the natural thyroid hormone triiodothyronine (T₃), the pesticide inhibited the GH3 cell growth which indicate, that the compound has the potency to inhibit the natural T₃.
- **Malathion** (organophosphate insecticide) elicited weak estrogenic activity and an activating effect on AhR function *in vitro* as well as an increase in proliferation of TH-dependent GH3 cell growth in the T-screen assay. Malathion caused a pronounced increased synthesis of sex hormones (progesterone, testosterone and estradiol) in H295R cells which might explain the observed induced growth of breast cancer cells seen in a previous study. In QSAR analyses, the pesticide was predicted to activate the PXR and thus, is presumed to induce the liver enzyme CYP3A4 which is involved in the metabolism of certain sex hormones.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Several of the tested pesticides showed the potential to disrupt a wide range of endocrine-disrupting mechanisms *in vitro* – however, the effects of the compounds were significantly weaker compared to the effects of the natural hormones which were analyzed in parallel.

Most *in vitro* active pesticides were found among the azole fungicides (*bitertanol*, *propiconazole*, *prothioconazole*), followed by the group of pyrethroid insecticides (*cypermethrin*, *tau fluvalinate*), whereas only one pesticide was found to be active in the herbicide group (*terbuthylazine*), and weak effects were observed for the dithiocarbamate fungicide (*mancozeb*) and the organophosphate insecticide (*malathion*).

The two selected mixtures consisting of *in vitro* active pesticides (Mix3: *bitertanol*, *propiconazole*, *cypermethrin*; Mix5: *terbuthylazine*, *bitertanol*, *propiconazole*, *cypermethrin*, *malathion*) showed additive effects (blocking) on AR function. Likewise, a special combined four-component pesticide mixture (Mix5 without bitertanol: *terbuthylazine*, *propiconazole*, *cypermethrin*, *malathion*) showed additive effects (stimulating) on TH function.

Our *in vitro* data, of the endocrine-disrupting potential of eight of the pesticides on TH function, demonstrate that new models for *in vitro*-, *ex vivo*- and *in vivo* analyses, focusing on specific biomarkers for TH-disrupting mechanisms, should be established.

It is concluded that the *in vitro* and *in silico* analyses are useful tools for an initial screening of a number of pesticides. However, one must be aware of the limitations of each analysis, according to the model used. The analyses *in vitro* are based on cell cultures representing a particular tissue (often derived from different species) and differ from the normal *in vivo* regulatory mechanisms. *In silico* models are solely based on the chemical structure of the compounds and just simply give indications of an effect.

Ex vivo human placental transport analyses of the three selected pesticides showed that the two azole fungicides, *propiconazole* and *bitertanol*, were transferred from the maternal to the fetal system by free diffusion, whereas the pyrethroid insecticide *cypermethrin* showed a limited transfer, suggesting an active transport of the compound across the human placenta and/or binding to the placental tissue. There were no effects of the three pesticides in the mixture (Mix3) - probably due to different transfer mechanisms. Moreover, it was observed that the placental tissue metabolize the three pesticides. A good agreement between the two models used, *ex vivo* human placental perfusion and *in vitro* BeWo cell culture, was observed.

It is concluded that the three pesticides tested all have the potential to be transferred across the placenta to the fetus, and that the placenta forms pesticide metabolites, indicating that both the mother and fetus may be exposed to these chemical compounds. The data obtained should be

followed up by additional human studies to measure possible pesticide concentrations in maternal blood and umbilical cord blood of potentially exposed individuals, to study possible effects on fetal development. The BeWo cell model appears, from the data obtained, to be a good, rapid and therefore more effective model for screening of the potential of the pesticides to be transferred from the mother to the fetus.

In vivo studies with exposure of pregnant rats to the two pesticide mixtures, Mix3 and Mix5, showed no antiandrogenic effects or changes in sex hormone levels in the offspring. In contrast, the estradiol blood level in the dams was decreased upon exposure to the highest concentration of Mix5, which also led to an induction of aromatase expression in the adrenal glands of female fetuses. These data suggest that the pesticide mixtures used in this study, on the investigated endpoints, may primarily have effects on the female sex. The pesticides and their metabolites were found in both amniotic fluid and urine from mothers, with increasing concentrations in correlation to increasing exposure. This shows that both the mother as well as the fetus are exposed to these chemicals, and demonstrates that the mother is able to excrete the components.

It is concluded that the selected mixtures of *in vitro* active pesticides have no effects on androgenic endpoints *in vivo* in the rat study, whereas Mix5 appears to have a potential to exert endocrine-disrupting effects in females. However, this hypothesis requires further studies in a model with focus on more specific cellular estrogenic biomarkers in females (dams and offspring). Furthermore, both the *ex vivo* human placenta analyses and the rat studies show that the *in vitro* active pesticides and their metabolites are transferred from the mother to the fetus. Future studies should be conducted to further evaluate the effects of these metabolites on both the mother and the fetus.

1. Introduktion

1.1 Baggrund

Kemikalier, som er i stand til at ændre den normale funktion af det endokrine system og dermed forårsage sundhedsskadelige effekter hos mennesker og dyr, kaldes for hormonforstyrrende stoffer. Et stort antal miljøbelastende kemikalier er tidligere blevet identificeret som værende hormonforstyrrende, og blandt dem findes adskillige pesticider (Mnif et al., 2011).

Hormonforstyrrende effekter ved udsættelse for kemikalier, herunder pesticider, er i søgelyset som muligt bidrag til hæmmet reproduktion (f.eks. nedsat fertilitet og sædkvalitet) og en række andre sygdomme som bl.a. kræft. Tidligere undersøgelser *in vitro*, i forsøgsdyr og undersøgelser i mennesker, som arbejder med pesticider, har indikeret, at en række nuværende anvendte pesticider har hormonforstyrrende potentiale (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Long et al., 2003; Birkhøj et al., 2004; Grunfeld and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Hofmeister and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Nellemann et al., 2005; Sumbayev et al., 2005; Vinggaard et al., 2005a; Vinggaard et al., 2005b; Andersen et al., 2008). *In vitro* og *in vivo* studier har vist, at effekten af nogle hormonforstyrrende stoffer er additiv, dvs. at effekten af stofferne i blandinger agerer sammen, hvilket bevirker en forøget effekt af blandinger af stofferne i forhold til effekten af de enkelte stoffer alene (Nellemann et al., 2003; Birkhøj et al., 2004; Kruger et al., 2008; Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009; Kjaerstad et al., 2010a; Hass et al., 2012; Jacobsen et al., 2012).

I et dansk studie fra 2002, blev 24 pesticider, som på daværende tidspunkt var almindeligt anvendt i landbrug/havebrug og i gartnerier, analyseret *in vitro* i en række cellebaserede testsystemer (Andersen et al., 2002). 14 af pesticiderne viste signifikante effekter i mindst én af analyserne, og syv af pesticiderne viste et positivt respons i mere end én ud af fire *in vitro* tests, hvilket indikerede et bredere hormonforstyrrende potentiale *in vitro*.

Der er en stadig stigende bekymring for, at eksponeringer i fosterperioden til selv lave pesticidkoncentrationer, under udviklingen af reproduktionsorganer og nervesystem, kan medføre vedvarende skader på disse organsystemer. Derfor antages det, at børn og fostre (og hermed gravide kvinder) er særlige sårbare grupper i forhold til pesticideksponering. En række studier har vist, at hormonforstyrrende stoffer kan have skadelige virkninger på fosteret tidligt i graviditeten, idet vækst og udvikling i de tidlige livsstadier i høj grad er kontrolleret af det endokrine system (Bigsby et al., 1999; Skakkebaek et al., 2001; Swan et al., 2005).

Adskillige studier har indikeret en hæmmet reproduktionsudvikling - herunder en stigende forekomst af kryptorkisme, dvs. manglende nedstigning af testiklerne til pungen - af sønner af kvinder, der arbejder i gartnerier eller bor på lokaliteter, hvor pesticider bliver anvendt (Kristensen et al., 1997; Weidner et al., 1998; Carbone et al., 2007; Andersen et al., 2008; Komarek et al., 2010; Wohlfahrt-Veje et al., 2011). Dog har andre studier ikke kunne påvise en lignende sammenhæng (Bhatia et al., 2005; Zhu et al., 2006). Ligeledes har epidemiologiske studier indikeret et link mellem pesticideksponering og risikoen for en række hormonrelaterede kræftformer såsom brystkræft og prostatakræft (Xu et al., 2010; Mnif et al., 2011; Alavanja and Bonner, 2012).

I relation til den stigende bekymring omkring eksponering til miljøkontaminanter i fostertilstanden, er viden om transport af specifikke pesticider og kombinationer af pesticider over moderkagen (placenta) aktuell. Placentatransport i begrænset omfang af azolfungicid tebuconazol og carbamat

insekticid metiocarb er for nyligt blevet rapporteret i forbindelse med et Miljøstyrelsen-finansieret projekt om transport af udvalgte pesticider over placenta og hud (Andersen et al., 2009). Adskillige studier har undersøgt en række azolfungicider *in vitro* og i rotteforsøg, og data peger kraftigt i retning af, at gruppen af azolfungicider generelt besidder hormonforstyrrende egenskaber (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Vinggaard et al., 2005a; Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007; Taxvig et al., 2008; Kjaerstad et al., 2010b).

Der er tidligere fundet ændret reproduktiv udvikling i rotter udsat for azolfungicidet prochloraz i fosterperioden (Vinggaard et al., 2002; Vinggaard et al., 2005a). Bl.a. er det vist, at prochloraz sænker testikel- og plasmaniveauer af testosteron og forøger niveauer af progesteron samt reducerer *ex vivo* syntesen af begge steroidhormoner (Vinggaard et al., 2005a). Mekanismen, der ligger til grund for den forøgede progesteron og den reducerede testosteron, er efter al sandsynlig en hæmning af enzymet CYP17, der metaboliserer progesteron (Laier et al., 2006).

I lighed med prochloraz, er der i et Miljøstyrelsen-finansieret studie fundet, at epoxiconazol og tebuconazol øger drægtighedslængden hos rotter, forøger progesteronniveauet hos moderdyrene samt maskuliniserer hununger ved at forlænge den anogenitale afstand (AGD) (Taxvig et al., 2007). Desuden blev der observeret, at tebuconazol feminiserer hanunger (Taxvig et al., 2007), hvilket også tidligere er set for prochloraz (Vinggaard et al., 2005a).

Et nyligt dansk studie har rapporteret, at en blanding af fem pesticider (epoxiconazol, mancozeb, prochloraz, tebuconazol og procymidone) i lave doser kan forårsage toksiske effekter på udviklingen i rotter (Hass et al., 2012). I rottemødre blev pesticidblandingen fundet at forårsage en signifikant forlænget drægtighedsperiode, og i det hanlige afkom blev observeret en stigning i forekomsten af brystvorter (feminiserende effekt) og en øget forekomst af genitale misdannelser. Effekterne af pesticidblandingen blev observeret ved doser, hvor de enkelte pesticider alene forårsagede mindre eller slet ingen effekter.

På DTU Fødevarerinstitutionen er netop afsluttet et projekt, der har undersøgt effekterne af dithiocarbamat fungicid mancozeb på doserede drægtige Wistar hunrotter og deres afkom (Axelstad et al., 2011). I studiet er der bl.a. blevet vist, at eksponering til mancozeb reducerer plasmaniveauet af thyroideahormonet thyroxin (T4) i afkommet, hvilket indikerer, at fungicid potentielt kan bidrage til forstyrrelser i thyroideahormon systemet i mennesker, og dermed kan påvirke udviklingen af nervesystemet. Ligeledes har en række studier for mancozeb givet utvetydige effekter på thyroidea biomarkører (EU assessment report).

1.1.1 Faktorer af betydning for ekstrapolation fra *in vitro* til *in vivo* undersøgelser: potensforskelle og sikkerhedsgrænser

Laboratorieundersøgelser involverer oftest meget kortere eksponeringstider (eksempelvis 4-24 timer ved *in vitro* analyser og 21 dage ved rotte eksponeringer) sammenlignet med det humane eksponerings scenarie. For humane eksponeringer er der oftest tale om forholdsvis lavere koncentrationer men med meget længere tids eksponering fra uger/måneder/år til en kontinuerlig/livsvarig eksponering. Denne tidsmæssige eksponeringsforskel tages i betragtning bl.a. ved at anvende højere doser i *in vitro* og dyreforsøg.

Ud over forskelle i eksponeringstid og -niveauer mellem *in vitro*, *in vivo* og human eksponering, er der ligeledes artsforskelle, der skal tages i betragtning. Det er velkendt, at der er toksikodynamiske og toksikokinetiske forskelle (og dermed potensforskelle) mellem diverse arter (rotte vs. mennesker) og i forskellige cellemodeller afhængig af væv og art. Med potensforskelle menes, at et givent kemikalie, der viser en effekt ved en lavere koncentration end et andet kemikalie i en cellemodel (og dermed virker kraftigere), godt kan virke svagere i et dyreforsøg (højere koncentration for at opnå effekt). Ved fastsættelse af humane sikkerhedsgrænser korrigeres der

normalt for artsforskelle og individuelle forskelle ved at multiplicere med en faktor 10 for hver - altså i alt en faktor 100. Denne faktor er dog primært baseret på undersøgelser af enkeltstoffer, hvor der ikke er taget hensyn til mulige additive effekter stofferne imellem, når de testes i blandinger.

Cellekultur modeller er typisk baseret på undersøgelser af en specifik virkningsmekanisme. Dog tages der i *in vitro* situationen ikke højde for alle de faktorer, som vil kunne påvirke den aktuelle virkningsmekanisme *in vivo* - eksempelvis samspillet med andre biologiske signalveje, regulatoriske feedback mekanismer og toksikokinetiske faktorer. Mange studier har dog vist, at stoffer med effekt på en given mekanisme *in vitro*, ofte også forårsager tilsvarende effekt i dyreforsøg (*in vivo*), såfremt stoffet har en vis potens og virkningskraft. Til gengæld viser flere undersøgelser (Folmar et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Andersen et al., 2006), at man ikke altid kan forudsige potensen *in vivo* ud fra data fundet i en cellemodel. Forskellen kan skyldes organismens evne til at påvirke stoffernes **a**bsorption, **d**istribution (fordeling), **m**etabolisme og **e**liminering (ADME), hvilket man ikke kan tage højde for i de fleste cellemodeller. Så på trods af den store anvendelighed af *in vitro* cellemodeller som et førstehånds screeningsværktøj til bestemmelse af stoffer med potentiel hormonel aktivitet, så har denne form for analysemetode sine begrænsninger i forbindelse med evalueringen af stofferne egentlige effekt i dyr og mennesker. På den anden side kan cellemodeller baserede på humane celler vise sig at have en bedre prædiktivitet for human toksicitet i forhold til gnavermodeller (O'Brien et al., 2006). Derfor er det i studier som dette essentielt at inkludere både *in vitro* samt *in vivo* analyser for at danne sig et mere fuldendt billede af stoffernes hormonforstyrrende potentiale.

1.2 Arbejdshypotese, målsætning og projektstrategi

1.2.1 Arbejdshypotese

Baseret på tidligere studier af pesticider enkeltvis og i blandinger var hypotesen for dette projekt, at en række nuværende anvendte pesticider i Danmark har hormonforstyrrende potentiale, som kan øges via additivitet, når pesticiderne forekommer i blandinger, som er relevante for human eksponering.

1.2.2 Målsætning og projektstrategi

Det overordnede mål med projektet var at lave en første screening af det hormonforstyrrende potentiale af 13 forskellige pesticider og én metabolit - med fokus på, hvad der kan være relevant for human eksponering. Altså var målet at skabe et solidt fundament for videre prioritering af dybdegående undersøgelser af pesticidernes mulige hormonforstyrrende effekter. Målet var *ikke* at gennemføre en human risikovurdering, og resultaterne fra denne undersøgelse kan derfor hverken frikende eller forbyde nogen af pesticiderne.

Udvælgelseskriterierne for de undersøgte bekæmpelsesmidler er beskrevet i afsnit 1.4. Foruden metabolitten ETU og malathion, som har været forbudt at anvende i Danmark siden 2008, udgør de undersøgte stoffer pesticider, som er almindeligt anvendt i Danmark. Pesticiderne er undersøgt både som enkeltstoffer og i udvalgte blandinger baseret på deres potens *in vitro*. De undersøgte stoffer inkluderede pesticider fra grupperne phenoxysyrer, triaziner, sulfonylurea stoffer, vækstregulatorer, azoler, dithiocarbamater, pyrethroider og organofosfater.

Det overordnede mål blev søgt nået ved brug af nedenstående analysestrategier:

In vitro:

Projektet blev indledt med analyser af det hormonforstyrrende potentiale af de 13 pesticider (og én metabolit) som enkeltstoffer i seks allerede etablerede mammale cellekultursystemer. Disse screeninger havde til formål at belyse eventuelle virkningsmekanismer og potens af

pesticiderne. Blandt de *in vitro* aktive stoffer blev hernæst udvalgt pesticider til relevante blandinger, som ligeledes blev analyseret i det respektive batteri af *in vitro* tests. Ved valg af sammensætning af de *in vitro* aktive stoffer, blev der så vidt muligt taget hensyn til den nuværende erfaring om human eksponering til pesticider i Danmark.

QSAR:

QSAR (quantitative structure-activity relationship) modeller til forudsigelse af pesticidernes effekt på relevante endpoints for endokrin aktivitet blev anvendt.

Transport over human placenta:

Potentialet af tre udvalgte *in vitro* aktive pesticider - samt en blanding af disse - til at passere human placenta blev ligeledes undersøgt. Som model for pesticideksponering af humane fostre, blev anvendt et veletableret *ex vivo* testsystem til undersøgelse af transport af stofferne over human placenta ved brug af moderkager fra vaginale fødsler og ukomplicerede kejsersnit. Kredsløb, svarende til henholdsvis fosterets og moderens kredsløb, blev etableret i et udsnit af placenta, og ved tætte systemer blev transporten fra moderens kredsløb til fosterets kvantificeret. Resultater opnået ved anvendelse af dette system blev suppleret med data fra en veletableret *in vitro* model af transport af fremmedstoffer over et monolag af BeWo celler af human placenta oprindelse.

In vivo rotte studier:

Data fra *in vitro* analyser dannede basis for udvælgelse af pesticider til dyreforsøg. På basis heraf blev udført et *in vivo* forsøg, hvor effekter af to pesticidblandinger på den føtale steroidsyntese i drægtige Wistar hunrotter og deres afkom blev analyseret.

Parallelt med disse rotteforsøg, blev der som eksponeringsmarkør bestemt koncentrationer af pesticider og udvalgte metabolitter i rotteurin og fostervand.

Ved udvælgelse af de *in vitro* aktive hormonforstyrrende pesticider til videre analyse i blandinger i *in vitro*, *ex vivo* og *in vivo* studier, blev der ved evaluering og udvælgelse taget hensyn til de enkelte pesticiders aktivitet og potens i batteriet af *in vitro* tests.

1.3 Biomarkør endpoints

Østrogen receptoren (ER) er udtrykt i stort set alle væv og aktiveres bl.a. af de naturlige østrogener, hvoraf 17 β -østradiol (E2) er den mest potente. Receptoren er bl.a. involveret i udviklingen af hjernen, reproduktive funktioner og den seksuelle adfærd. Forstyrrelser af den normale ER funktion antages at være involveret i reproduktive anomaliteter, forstyrrelser i hjernefunktionen samt udviklingen af visse hormon-relaterede kræftformer (Mueller, 2004; McCarthy, 2008). Det er tidligere påvist, at pesticider kan påvirke ER funktionen (Soto et al., 1994; Andersen et al., 2002; Grunfeld and Bonefeld-Jorgensen, 2004; Hofmeister and Bonefeld-Jorgensen, 2004).

Androgen receptoren (AR) er udtrykt i en lang række væv såsom prostata, binyre, skeletmuskulatur, lever, centralnervesystem (CNS), hjerte, knogle og fedtvæv (Gao et al., 2005; Davison and Bell, 2006). Receptoren er bl.a. ansvarlig for den seksuelle udvikling af hanfosteret og den seksuelle modning i puberteten (Dehm and Tindall, 2007). Det antages, at forstyrrelser af den normale AR funktion er involveret i den stigende forekomst af hypospadi, kryptorkisme og prostatakræft samt den faldende sædkvalitet, der er observeret i vestlige lande (Skakkebaek, 2003). Det er tidligere påvist, at mange miljøkontaminanter kan påvirke AR funktionen (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Birkhoj et al., 2004; Vinggaard et al., 2005b; Bonefeld-Jorgensen et al., 2007; Kruger et al., 2008; Vinggaard et al., 2008; Luccio-Camelo and Prins, 2011).

Aryl hydrocarbon receptoren (AhR) er udtrykt i en lang række væv såsom placenta, lunge, lever, bugspytkirtel og hjerte (Dolwick et al., 1993; Jiang et al., 2010). Receptoren er involveret i reguleringen af en række enzymer, som omsætter fremmedstoffer og hormoner i kroppen (Poland and Knutson, 1982; Safe, 1990; Schmidt and Bradfield, 1996). Ved binding af en ligand til AhR induceres transkriptionen af gener fra CYP1 familien, og hermed øges aktiviteten af visse cytochrome P450 enzymer, som er involveret i syntesen/metabolismen af steroidhormoner (Rifkind, 2006). Der er ikke identificeret nogen endogene ligander af AhR. Receptoren aktiveres af stoffer med en specifik kemisk struktur, hvoraf det mest kendte er 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Derfor betegnes effekten af stoffer, som kan aktivere AhR, oftest som dioxin-lignende. Det er tidligere påvist, at kemikalier fundet i miljøet og i fødevarer, inklusive pesticiderne prochloraz, chlorpyrifos og iprodion, kan påvirke AhR funktionen (Denison et al., 1998; Denison and Nagy, 2003; Long et al., 2003).

Thyroideahormon (TH) spiller en vigtig rolle for bl.a. den prænatale og postnatale udvikling af centralnervesystemet (CNS) og normal hjerneudvikling hos fostre (Boas et al., 2006). Thyroideahormon receptoren (TR) er udtrykt i en lang række væv såsom skjoldbruskkirtel, hjerne, prostata, lever, nyre og placenta (Sakurai et al., 1989). Hypothyroidisme hos mødre er vist at kunne resultere i mental retardering og problemer med motorikken hos deres afkom (Howdeshell, 2002). Selv moderate og forbigående fald i moderens T4-niveauer under graviditeten kan have negative indflydelse på barnets neurologiske udvikling. Der er stigende beviser på, at miljøgifte kan påvirke TH funktion (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009; Boas et al., 2012) og dermed påvirke udvikling af egenskaber som adfærd og intellekt med fx nedsat indlæring som følge (Zoeller et al., 2002).

Aromatase enzymet findes i mange forskellige væv inklusive æggestokkene, testiklerne, moderkagen, hjernen, huden, fedtvævet og knoglerne. Enzymet omdanner mandlige kønshormoner (androgen) til kvindelige kønshormoner (østrogener) og er derfor en vigtig faktor i bl.a. kønsudviklingen (Jones et al., 2006). Miljøgifte kan indvirke på aromatase aktivitet (Bonefeld-Jorgensen et al., 2007) og pesticiderne methomyl, pirimicarb, propamocarb og iprodion er vist at kunne stimulere funktionen af aromatase (Andersen et al., 2002).

Kønshormonsyntesen. Ud over at hormonforstyrrende effekter kan ses på receptorfunktions niveau, har det vist sig, at kemikalier også kan virke hormonforstyrrende ved at påvirke selve syntesen af kønshormoner, som er essentiel for vores reproduktion og vækst. Fx er en række kemikalier i stand til at hæmme produktionen af testosteron og dermed forårsage feminisering af det hanlige afkom (Vinggaard et al., 2002; Taxvig et al., 2007).

Placenta transport. For at kvantificere føtal eksponering er det vigtigt at undersøge den placental transport. Placenta er det organ, der udviser flest forskelle mellem dyrearter, både ved antal cellelag mellem moder og foster, og maternelt flow af blod igennem placenta. Derfor undersøges human placental transport af udvalgte pesticider i en human placenta transport model (Mathiesen et al., 2010). Transport over human placenta fra moder til foster og adhæsion til placenta, samt evt. metabolisme af de studerede pesticider er analyseret. Placental transport af pesticiderne undersøges hver for sig og i blanding. Der suppleres med *in vitro* analyser af transport af de samme stoffer i en mere forsimplet monocellelagsmodel med BeWo celler. De to systemer er komparable og eksponeringstiden er henholdsvis seks timer *ex vivo* og 24 timer *in vitro* (Poulsen et al., 2009; Correia Carreira et al., 2011).

Rotte-reproduktions undersøgelse. Projektet har undersøgt effekterne af udvalgte pesticidblandinger på kønshormonsyntese, drægtighedsdata, histopatologi af testikler, samt på parametre såsom føtal legemsvægt og anogenital afstand (AGD), i drægtige Wistar hunrotter og deres afkom. Hæmning af testosteronproduktion i føtale testikler har vist sig at kunne fremkalde misdannelser af kønsorganer i hanfostre og feminisering af hanner, som er blandt de dysfunktioner,

der er et problem i mennesker. Denne mekanisme er vigtig at undersøge, fordi den kan være af relevans for den øgede forekomst af misdannede kønsorganer i drengebørn og den generelt ringe sædkvalitet.

1.4 Valg af pesticider til studiet

I dette afsnit præsenteres de kriterier, som ligger til grund for udvælgelsen af de relevante pesticider/pesticidgrupper, som er blevet analyseret i projektet. Ved første udvælgelse af pesticider til studiet blev der lagt vægt på følgende kriterier (se Bilag 1):

- Anvendelse og forbrug i Danmark.
- Behandlet areal i hektar.
- Om der var tilgængelige analysemetoder for stoffet i blod og/eller urin.
- Viden om tidligere analyser for hormonforstyrrende effekter fra litteratur og igangværende pesticidprojekter.

Før projektstart blev der foretaget en revurdering med hensyn til effekter af stofferne (inklusive hormonforstyrrende) af de i ansøgningen foreslåede pesticider (Bilag 1). Revurderingen er vist i Bilag 2. Relevante EU Assessment Reports blev i den forbindelse modtaget fra Miljøstyrelsen. Ligeledes blev der foretaget en revurdering af de relevante pesticidmetabolitter samt eksisterende analysemetoder i blod og urin (Bilag 3). Ud fra angivne kriterier i afsnit 1.2.2, samt opgørelserne i Bilag 1, 2 og 3, blev 13 pesticider og én metabolit udvalgt til studiet (Tabel 1).

Tabel 1. Pesticider udvalgt til studiet (kemisk struktur, CAS nummer og pesticidgruppering)

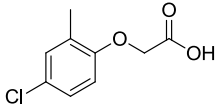
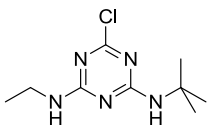
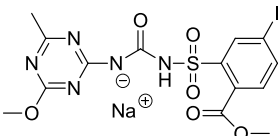
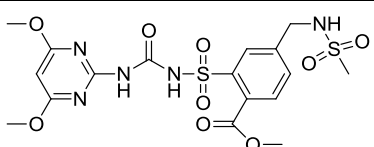
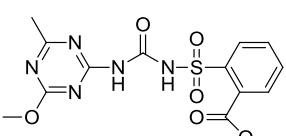
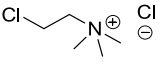
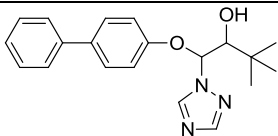
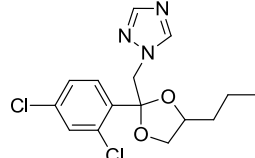
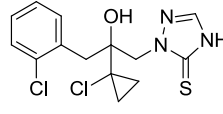
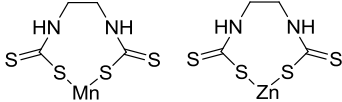
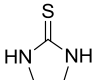
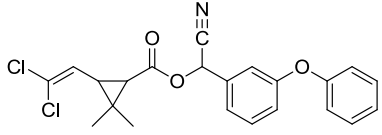
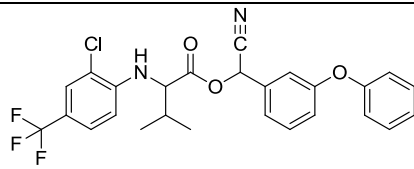
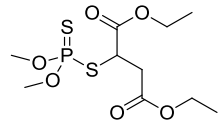
Pesticid	Kemisk struktur	CAS nummer	Pesticidgruppe
MCPA (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid)		94-74-6	Phenoxyacetic herbicid
Terbuthylazin		5915-41-3	Triazin herbicid
Iodosulfuron-methyl-natrium		144550-36-7	Sulfonylurea herbicid
Mesosulfuron-methyl		208465-21-8	Sulfonylurea herbicid
Metsulfuron-methyl		74223-64-6	Sulfonylurea herbicid

Table 1. (fortsat)

Pesticid	Kemisk struktur	CAS nummer	Pesticidgruppe
Chlormequat chlorid		999-81-5	Vækstregulator
Bitertanol		55179-31-2	Azolfungicid
Propiconazol		60207-90-1	Azolfungicid
Prothioconazol		178928-70-6	Azolfungicid
Mancozeb		8018-01-7	Dithiocarbamat fungicid
ETU (ethylthiourea, mancozeb metabolit)		96-45-7	-
Cypermethrin		52315-07-8	Pyrethroid insekticid
Tau fluvalinat		102851-06-9	Pyrethroid insekticid
Malathion		121-75-5	Organofosfat insekticid

1.4.1 Beskrivelse af de udvalgte pesticider/pesticidgrupper

I nedenstående gennemgang er der lagt fokus på hormonforstyrrende effekter af de udvalgte pesticider/pesticidgrupper. For andre effekter end de hormonforstyrrende - eksempelvis carcinogene og genotoksiske - henvises der til Bilag 1 og 2.

1.4.1.1 Phenoxyure herbicider

Pesticidet 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (*MCPA*) tilhører gruppen af phenoxyure herbicider, der kategoriseres som post-emergente, væksthæmmende stoffer (Barr and Needham, 2002). Pesticidet er selektivt for bredbladede planter og udnytter en kompleks auxin-lignende mekanisme. *MCPA* akkumuleres i plantens vækstcentre, hvor det stimulerer frigivelsen af plantehormoner. Resultatet er en ukoordineret plantevækst, som forstyrrer både nye skud og eksisterende planter.

Et to-generationsstudie i rotter fandt ingen reproduktionstoksiske effekter af *MCPA* ved den højeste eksponering (450 ppm svarende til ca. 22 mg/kg/dag). Dog blev der i undersøgelsen observeret effekter på legemsvægten i begge generationer ved den højeste eksponering (EU Assessment Report). Ligeledes er der udført en række teratologiske¹ undersøgelser af *MCPA* i rotter, mus og kaniner, men ingen af disse studier har rapporteret om misdannende effekter af *MCPA* på fosteret (EU Assessment Report) (Ujhazy et al., 2006).

Ved eksponering af gravide mus til en blanding af herbiciderne 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), mecoprop og dicamba samt inaktive ingredienser, sås et fald i kuld størrelse, som kunne relateres til et fald i implantation ved miljørelevante doser (Cavieres et al., 2002).

Phenoxyurer bliver kun i ringe grad metaboliseret og udskilles næsten uændret i urinen. Der findes metoder til analyse af stofferne *MCPA*, mechlorprop og dichlorprop (Barr and Needham, 2002) og deres metabolitter (Lindh et al., 2008) i urin.

I et nyligt *in vitro* studie blev *MCPA* undersøgt i gærceller, som udtrykker humane ER eller AR. Studiet viste hverken (anti)østrogene eller (anti)androgene effekter af stoffet testet ved koncentrationer på 0,01-1000 µM (Orton et al., 2009). Dog udviste *MCPA* i samme studie en effekt på kønshormonsyntesen i frø oocyter, idet pesticidet blev observeret at forårsage en stigning i koncentrationen af det mandlige kønshormon testosteron (Orton et al., 2009). Til vores kendskab udgør observationerne fra dette nylige *in vitro* studie de eneste specifikke data vedrørende det hormonforstyrrende potentiale af *MCPA*.

1.4.1.2 Triazin herbicider

Terbuthylazin hører til gruppen af triazin herbicider, som virker ved at hæmme den fotosyntetiske elektrontransport i visse planter (Barr and Needham, 2002).

De fleste eksponeringsundersøgelser har fokuseret på triazin herbicidet atrazin, som har udbredt anvendelse i Nordamerika. Tidligere undersøgelser af atrazin har vist anormal udvikling i en række arter, inkluderende forsinket pubertet i rotte (Stoker et al., 2000; Ashby et al., 2002), forstyrrelse af organogenesen i zebrafisk (Wiegand et al., 2001) og en reduktion af størrelsen af grå træfrøer under metamorfogenesen (Diana et al., 2000). Det er tidligere observeret, at atrazin inducerer aromatase aktiviteten i humane H295R adrenokortikale carcinoma celler samt øger koncentrationen af cyklisk adenosin monofosfat (cAMP), hvilket bevirker en øget produktion af aromatase mRNA (Sanderson et al., 2000; Sanderson et al., 2002). Efterfølgende er det vist *in vitro*, at atrazin - og i mindre grad dets metabolitter inkl. *terbuthylazin* - hæmmer enzymet fosfodiesterase, som er ansvarligt for nedbrydelsen af cAMP (Roberge et al., 2004), hvilket er foreslået som en mulig forklaring på den

¹ Angående læren om misdannelser

observerede øgede koncentration af cAMP og dermed øgede produktion af aromatase mRNA som følge af eksponering til atrazin. Fluorescens polariseringsundersøgelser har vist, at bindingen af østrogen til ER ikke forstyrres af atrazin og dets metabolitter (Roberge et al., 2004).

Atrazin-merkapturat er den væsentligste metabolit af atrazin i human urin (Lucas et al., 1993). Dealkylerede metabolitter af triaziner kan måles i urinprøver som mål for eksponering, men de er ikke specifikke for den enkelte triazinforbindelse (Barr and Needham, 2002).

Et multi-generationsstudie har fundet reproduktive effekter af *terbuthylazin* (300 ppm), idet pesticidet er blevet vist at nedsætte fertiliteten i hunrotter (fald i antallet af drægtige dyr) gennem flere generationer (EU Assessment Report). Et lignende multi-generationsstudie fandt derimod ingen reproduktionstoksicitet i rotter som følge af eksponering (200 ppm) til pesticidet (EU Assessment Report). Flere studier i rotter og kaniner har indikeret maternal toksicitet (effekter på legemsvægt og fødeindtagelse) af *terbuthylazin* (EU Assessment Report).

Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for mekanistiske undersøgelser af det hormonforstyrrende potentiale af *terbuthylazin in vitro*. På baggrund af det veldokumenterede hormonforstyrrende potentiale af triazin herbicidet atrazin, som strukturelt ligner *terbuthylazin*, er det relevant at screene *terbuthylazin* for hormonforstyrrende effekter.

1.4.1.3 Sulfonylurea herbicider

Sulfonylurea stoffer er en enestående gruppe af herbicider, som anvendes til at kontrollere en bred vifte af ukrudt og græsser i forskellige afgrøder og grøntsager. De har været meget populære globalt set, da de udviser lav mammal toksicitet, har lavt forbrugsniveau (g/ha) og høj herbicidaktivitet (Healy et al., 2004). Stofferne bliver hurtigt nedbrudt i miljøet.

Der er ikke udført undersøgelser, som specifikt vurderer den østrogene/hormonforstyrrende effekt af sulfonylurea herbicidet sulfosulfuron. Dog har reproduktionsundersøgelser i rotter, kaniner, snegle, dafnier (små krebsdyr) og ørreder ikke vist tydelige tegn på endokrine forstyrrelser som følge af eksponering til stoffet. Derimod er skadelige effekter blevet observeret på urinveje i gnavere (Healy et al., 2004). For sulfonylurea herbicidet tribenuron-methyl er blevet påvist en svag østrogen-lignende effekt i humane MCF-7 celler ved øget cellevækst, hvorimod der ikke blev fundet effekter af stoffet på transaktivering af ER (Andersen et al., 2002).

Et to-generationsstudie i rotter af sulfonylurea herbicidet *iodosulfuron-methyl-natrium* viste ingen effekter på fertilitet, reproduktion eller parringsadfærd og ingen misdannelser af afkommet ved dosering på op til 5000 ppm (svarende til mellem ca. 300-1100 mg/kg/dag afhængig af fødeindtagelsen i de forskellige faser af studiet). Dog blev der ved denne højeste dosering observeret en nedsat optagelse af legemsvægt i forældredyrene samt en øget dødelighed blandt afkommet (EU Assessment Report). Studier i rotter og kaniner har ligeledes rapporteret om problemer med knogleudviklingen i afkommet som følge af eksponering til *iodosulfuron-methyl-natrium* (EU Assessment Report).

Sulfonylurea herbicidet *mesosulfuron-methyl* er undersøgt i rotter og kaniner, men der er hverken fundet toksiske effekter på reproduktion eller udvikling af fosteret (EU Assessment Report).

Rottestudier af *metsulfuron-methyl* har rapporteret om svag maternal toksicitet (nedsat legemsvægt), men ellers ingen toksiske effekter hos afkommet (EU Assessment report). I kaniner sås ingen dosis-relaterede trends for de undersøgte reproduktionsparametre, og herbicidet viste heller ingen teratologiske effekter på afkommet ved doser op til 700 mg/kg/dag (EU Assessment Report).

Metabolitter af sulfonyleurea stoffer (ikke specifikke for det enkelte stof, men for hele gruppen) kan måles i urin (Nguyen et al., 2007).

Til vores kendskab findes der ingen specifikke data fra *in vitro* undersøgelser af det hormonforstyrrende potentiale af de tre sulfonyleurea herbicider udvalgt til studiet. Det er derfor relevant at screene stofferne i det respektive batteri af *in vitro* analyser for at få belyst mulige mekanistiske cellulære hormonforstyrrende effekter af pesticiderne.

1.4.1.4 Vækstregulatorer

Chlormequat chlorid er en vækstregulator (væksthæmmer), som virker ved at hæmme biosyntesen af en bestemt gruppe af plantehormoner kaldet gibberelliner (Rademacher, 2000).

Tilstedeværelsen af rester af *chlormequat chlorid* antages at være uundgåelig, og forbindelserne har vist sig at være til stede i visse relaterede fødevarerprodukter til dyr såvel som til mennesker. Metaboliske produkter af *chlormequat chlorid* er blevet fundet i æg og kød fra høns fodret med foder tilsat pesticidet (Songsang et al., 2002; Chakeredza et al., 2006). Ligeledes er der fundet en hæmning af kropsvægt og en øget østrogenkoncentration i blod fra høns fodret med *chlormequat chlorid* (Gultom et al., 2001).

Et to-generationsstudie har vist, at drægtige hunmus, der fik foder/vand indeholdende relativt lave koncentrationer af *chlormequat chlorid* - dvs. koncentrationer tilladte for mennesker - fik hanligt afkom med væsentlig forringet sædkvalitet (nedsat fertilitet af spermatozoa påvist *in vitro*) (Torner et al., 1999). Et to-generationsstudie af fertiliteten af hunmus fodret med hvede behandlet med *chlormequat-chlorid*, viste dog ingen effekter mht. general toksicitet (udvikling af legemsvægt), kønsudvikling samt prenatal og postnatal fertilitet (Langhammer et al., 1999). Multi-generations studier i rotter har rapporteret om toksiske effekter i både forældredyr og afkom (ændringer i legemsvægt og kliniske symptomer) samt om effekter på reproduktion (færre undfangelser pr. parring samt nedsat gennemsnitsstørrelse af kuld) som følge af eksponering til *chlormequat chlorid* (EU Assessment Report). Dog blev disse effekter på reproduktionen kun observeret ved en relativt høj dosis af stoffet. I svin er der ikke blevet fundet effekter på den hanlige reproduktionsevne ved eksponering til *chlormequat chlorid* (Sorensen et al., 2009), hvorimod data fra et andet studie tydede på, at pesticidet havde effekter på reproduktionen (hovedsageligt manglende brunst) i søer (Sorensen and Danielsen, 2006).

På baggrund af den megen diskussion om stråforkortere og en potentiel effekt af *chlormequat-chlorid* på reproduktionen, er det relevant at screene for hormonforstyrrende effekter. I et tidligere dansk studie viste *chlormequat chlorid* ingen effekter *in vitro* på ER og AR funktion samt aromatase aktivitet (Andersen et al., 2002), men derimod en hæmning af dioxin-aktiveret AhR funktion i humane TV101L celler (Long et al., 2003).

Til vores kendskab udgør observationerne fra dette studie de eneste specifikke data vedrørende det hormonforstyrrende potentiale *in vitro* af *chlormequat-chlorid*.

1.4.1.5 Azolfungicider

Azolfungicider udøver deres svampedræbende effekt ved at hæmme cytochrome P450 (CYP) enzymet 14 α -demethylase (CYP51) i svampe og gær, hvorved biosyntesen af den essentielle membrankomponent ergosterol blokeres (Zarn et al., 2003).

Adskillige studier har undersøgt en række azolfungicider *in vitro* og i rotteforsøg, og data peger kraftigt i retning af, at gruppen af azolfungicider generelt besidder hormonforstyrrende egenskaber

(Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Vinggaard et al., 2005a; Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007; Taxvig et al., 2008; Kjaerstad et al., 2010b).

Et multi-generations rottestudie af azolfungicid *bitertanol* viste ingen klare tegn på specifikke reproduktive effekter af stoffet over tre generationer (EU Assessment Report). I forældredyr blev hovedsageligt observeret et progressivt fald i optagelsen af legemsvægt gennem generationerne (hunmus tilsyneladende mere sensitive overfor denne effekt end hanmus) samt en øget vægt af lever og nyrer. I afkommet sås en nedsat fødselsvægt og forsinket optagelse af legemsvægt i dieperioden. Ligeledes har andre rottestudier rapporteret om knogleforandringer og misdannelser af fosteret som følge af eksponering til *bitertanol* (EU Assessment Report). I kaniner er ligeledes påvist misdannelser af lunger og skelet samt effekter på fostervægt, antallet af levende fostre, antallet af aborter og forsinkelse af knogledannelse ved eksponering til *bitertanol* (EU Assessment Report).

Propiconazol (azolfungicid) er i muse samt rotte lever og testis vist at påvirke ekspressionen af en række CYP gener, inklusive gener involveret i metabolismen af steroidhormoner (Goetz et al., 2006; Tully et al., 2006). *Propiconazol* er ligeledes relateret til en maskuliniserende effekt i hanrotter (øget anogenital afstand, øget testes vægt og øget serum testosteron) samt leverhypertrofi (Goetz et al., 2007). Et nyligt rottestudie fandt dog ingen antiandrogene effekter af *propiconazol* (doser op til 150 mg/kg/dag) ved brug af Hershberger assay (Taxvig et al., 2008). Et multi-generations rottestudie rapporterede om fosterskader (færre unger født og nedsat overlevelsessevne) i afkommet (F2 generation) ved højeste eksponering på 2500 ppm (EU Assessment Report). Ligeledes har teratologiske studier i rotter vist en øget forekomst af fostre født med ganespalte som følge af eksponering til *propiconazol* (EU Assessment Report).

Prothioconazol (azolfungicid) er ligeledes undersøgt for toksiske effekter på udviklingen i rotter og kaniner og klassificeret med R63 (mulig risiko for det ufødte barn). Stoffet viste ingen misdannende effekter på det udviklende afkom ved doser ikke-toksiske for forældredyrene (EU assessment report).

Bitertanol og *propiconazol* har tidligere vist hæmmende effekter på aromatase (CYP19) aktiviteten i humane placentale mikrosomer (Vinggaard et al., 2000; Trosken et al., 2006). Ligeledes har *propiconazol* vist sig at hæmme aromatase aktiviteten i humane H295R celler (Sanderson et al., 2002), i humane JEG-3 celler (Vinggaard et al., 2000; Laville et al., 2006) og i ørred hjerne og ovarier (Hinfray et al., 2006). I et nyligt studie blev der fundet, at *propiconazol* udviser antiandrogene effekter i hamster ovarieceller (CHO-K1) samt østrogene/antiøstrogene effekter i humane brystcancer celler (MCF-7) (Kjaerstad et al., 2010b). Ligeledes blev det vist, at pesticidet påvirker kønshormonsyntesen i humane H295R adrenocorticale carcinoma celler (Kjaerstad et al., 2010b).

Foruden en hæmmende effekt af bitertanol på aromatase aktiviteten, findes der til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af det hormonforstyrrende potentiale af azolfungiciderne *bitertanol* og *prothioconazol in vitro*. På baggrund af de mange studier, som har indikeret, at gruppen af azolfungicider generelt besidder et hormonforstyrrende potentiale, er det relevant at få klarlagt mulige bagvedliggende virkningsmekanismer af de tre udvalgte stoffer, *bitertanol*, *propiconazol* og *prothioconazol*.

1.4.1.6 Dithiocarbamat fungicider

Mancozeb (dithiocarbamat fungicid) er i adskillige rottestudier rapporteret for reproduktive effekter - bl.a. forstyrrelse af østrus cyklus, fald i organvægt (æggestok, testikel og epididymis) samt histopatologiske ændringer i de reproduktive organer (Kackar et al., 1997a; Mahadevaswami et al., 2000; Baligar and Kaliwal, 2001; 2004). I hanmus er ligeledes fundet effekter på reproduktionssystemet (hæmmet spermatogenese samt antiandrogene effekter i form af nedsat

vægt af prostata og cowperske kirtler) samt effekter på vitale organer (Ksheerasagar and Kaliwal, 2003). Teratologiske rottestudier af *mancozeb* har desuden rapporteret om misdannende effekter på afkommet, inklusive udvikling af ganespalte og ufuldstændig knogledannelse, hvorimod der ikke er blevet fundet lignende teratologiske effekter i kaniner (EU Assessment Report).

Ligeledes har en række undersøgelser rapporteret om toksiske effekter af *mancozeb* på funktionen af skjoldbruskkirtlen. For nyligt blev udført et dansk studie af effekter af *mancozeb* på doserede drægtige Wistar hunrotter og deres afkom (Axelstad et al., 2011). I studiet blev det bl.a. vist, at eksponering til *mancozeb* reducerer plasmaniveauet af thyroideahormonet thyroxin (T₄). Andre undersøgelser har vist lignende toksiske effekter af *mancozeb* på funktionen af skjoldbruskkirtlen – eksempelvis et fald i thyroidea-peroxidase aktivitet og iodoptag, øget produktion af thyroidea-stimulerende hormon (TSH), hyperplasi og hypotrofi af follikelceller i skjoldbruskkirtlen samt skjoldbruskkirtelkræft (Trivedi et al., 1993; Kackar et al., 1997b; Hurley, 1998; Cecconi et al., 2007; Axelstad et al., 2011).

Ethylthiourea (ETU) er den væsentligste metabolit af dithiocarbamater som *mancozeb*. *ETU* er blevet målt i human urin (Sottani et al., 2003). TTCA ((2-thiazolidinethione-4-carboxylic acid) er en anden metabolit af dithiocarbamater, hvor analysemetoder er tilgængelige.

I et nyligt studie udviste *mancozeb* antiandrogene effekter i muse cellelinjen NIH3T3 i et receptor-rapportergen assay (Viswanath et al., 2010). Dette studie udgør til vores kendskab den eneste *in vitro* undersøgelse af dithiocarbamat fungiciditet. På baggrund af de observerede effekter på reproduktion og udvikling samt effekter på funktionen af skjoldbruskkirtlen, er det relevant at yderligere undersøge *mancozeb in vitro* for at belyse bagvedliggende biologiske virkningsmekanismer.

1.4.1.7 Pyrethroid insekticider

Pyrethroider er blandt de mest almindeligt anvendte pesticider. Insekticiderne fungerer som nervetoksiner, idet de interfererer med natrium transporten i insekters nerveceller.

Cypermethrin (pyrethroid insekticid) er tidligere undersøgt for hormonforstyrrende effekter i en række *in vitro* studier. Metabolitter af permethrin og *cypermethrin* er vist at have østrogen-lignende aktivitet i gærceller, som udtrykker humane ER (McCarthy et al., 2006). Der findes kontroversielle data for *cypermethrin* undersøgt i mammale cellekultur modeller. *Cypermethrin* er i ét studie vist at inducere MCF-7 cellevækst og mRNA ekspressionen af det østrogen-responsive gen pS2 i MCF-7 celler (Chen et al., 2002). I kontrast hertil fandt et lignende studie ingen effekter af pesticidet ved brug af tilsvarende analyser (Kim et al., 2004). Ligeledes udviste *cypermethrin* ingen effekter på ER funktion i CV-1 celler i et ER rapportergen assay (Du et al., 2010). Antiandrogene effekter af *cypermethrin* er vist *in vitro* i de mammale cellelinjer CV-1 og MDA-kb2 (Xu et al., 2008; Du et al., 2010). Der findes modstridende data for effekter af pesticidet på aromatase aktiviteten i humane celler. *Cypermethrin* er tidligere vist at kunne inducere aromatase aktiviteten i JEG-3 celler (Laville et al., 2006), hvorimod et andet studie med KGN celler har vist en hæmmende effekt af pesticidet på aromatase aktiviteten (Morinaga et al., 2004).

Lavdosis blandinger af *cypermethrin* og organofosfat pesticidet methyl parathion er vist at kunne påvirke hormonniveauer (specielt østradiol) i rotter (Liu et al., 2006). Negative effekter af *cypermethrin* på reproduktionsmarkører (nedsat spermkvalitet) er vist hos hankaniner (Yousef et al., 2003). Ligeledes er der observeret hæmmende effekter på rotte spermmobilitet *in vitro* (Song et al., 2008). *Cypermethrin* er desuden sat i relation til ændringer i reproduktionsadfærd i ørreder (Jaensson et al., 2007). Andre studier i rotter og kaniner har dog hverken fundet effekter på fertilitet eller drægtighed eller vedvarende effekter på afkommet som følge af eksponering til pesticidet (EU Assessment Report).

Reproduktionsstudier i rotter har ikke fundet effekter af pyrethroid insekticidet *tau fluvalinat* på hverken parring, fertilitet eller drægtighedsperiode. Dog er der i rotter og kaniner rapporteret om udviklingsmæssige effekter som følge af eksponering til *tau fluvalinat* og fluvalinat (bl.a. forsinket knogledannelse og nedsat overlevelsessevne af fosteret) ved maternelt toksiske doser. Da disse udviklingsmæssige effekter anses for at være sekundære til den maternelle toksicitet, er *tau fluvalinat* ikke klassificeret som værende toksisk for udviklingen af embryo/foster (EU Assessment Report).

Der eksisterer metoder til måling af pyrethroid metabolitter i urin (Barr and Needham, 2002). Metabolitten 3-PBA (3-phenoxy-benzoesyre) er en fælles markør for eksponering til pyrethroider (Barr and Needham, 2002).

På baggrund af de mange eksisterende kontroversielle *in vitro* data, som findes for *cypermethrin*, er det relevant at screene for hormonforstyrrende effekter af dette insekticid. Til vores kendskab findes der ingen specifikke data for det hormonforstyrrende potentiale af *tau fluvalinat*, og derfor bør pesticidet undersøges i det respektive batteri af *in vitro* tests for at belyse eventuelle hormonforstyrrende virkningsmekanismer af stoffet.

1.4.1.8 Organofosfat insekticider

Organofosfater virker ved at angribe insekters nervesystem, idet de hæmmer enzymet acetylkolinesterase, som er ansvarligt for nedbrydningen af nervesignalstoffet acetylkolin.

Malathion (organofosfat insekticid) har i flere undersøgelser i dyr vist en række reproduktionstoksikologiske effekter. I Wistar rotter har stoffet vist sig at hæmme spermobiliteten ved 48-dages eksponering (100 mg/kg/dag) (Akbarsha et al., 2000). I hanmus er der ligeledes rapporteret om forstyrrelser af visse reproduktionsparametre som følge af én enkelt dosis *malathion* (henholdsvis 250 mg/kg og 240 mg/kg) (Contreras and Bustos-Obregon, 1999; Bustos-Obregon and Gonzalez-Hormazabal, 2003). *Malathion* er desuden undersøgt i et 2-generations reproduktionsstudie i rotter, som rapporterede om nedsat kropsvægt som følge af eksponering til pesticidet, men ingen effekter på fertiliteten blev observeret (EU Assessment Report). På baggrund af to prænatale toksicitetsstudier i rotter og kaniner er *malathion* blevet klassificeret som værende ikke-toksisk for udviklingen af embryo/foster (EU Assessment Report).

Et *in vitro* studie har vist, at *malathion* hæmmer bindingen af TH til transthyretin (transportmolekyle) og thyroideahormon receptoren (TR) (Ishihara et al., 2003). Pesticidet er tidligere blevet undersøgt i et MCF-7 celle proliferations assay (E-screen) og i et ER kompetitiv-bindings assay, som ikke fandt østrogen-lignende effekter af stoffet (Chen et al., 2002).

Organofosfater bliver metaboliseret til dialkylfosfater eller oxoner, som er mere polære end moderstofferne. Metabolitterne udskilles med urinen enten i fri form eller bundet til sukker eller sulfater. Seks dialkylfosfat metabolitter af organofosfater er jævnlige målt i urinprøver. Disse metabolitter er ikke specifikke for organofosfat pesticiderne, men kan også dannes ud fra industrikemikalier og lægemidler. For *malathion* kan måles tre specifikke metabolitter: malathion dicarboxylsyre samt α - og β -isomerer af malathion monocarboxylsyre (Barr and Needham, 2002).

Det har siden 2008 været forbudt at anvende *malathion* i Danmark på grund af manglende optagelse af aktivstoffet på EU's positivliste. Insekticidet er dog alligevel medtaget i dette studie pga. den omfattende danske import af frugt og grønt fra lande uden for EU, som stadig anvender *malathion*. Foruden de ovennævnte *in vitro* studier af insekticidet på ER og TH funktion, findes der til vores kendskab ingen specifikke data for det hormonforstyrrende potentiale af *malathion in vitro*. Derfor er det relevant at screene stoffet i det respektive batteri af *in vitro* analyser.

2. Metoder

2.1 *In vitro* cellekultur analyser

Visse miljøfarlige stoffer kan interagere med receptorer, som påvirker hormonfunktioner i celler. Til disse receptorer hører ER, AR, AhR og TR. Når hormonforstyrrende stoffer binder til disse receptorer, kan de enten have en aktiverende (agonistisk) eller hæmmende (antagonistisk) effekt. Ligeledes har visse miljøkontaminanter vist sig at kunne ændre biotilgængeligheden af de naturlige hormoner - eksempelvis ved at påvirke aktiviteten af enzymer, som er ansvarlige for syntesen og/eller metabolismen af kønshormoner eller ved påvirkning af plasma transportprocesser - og dermed forstyrre de normale hormonniveauer i kroppen. Visse kemikalier har desuden vist sig at kunne påvirke forskellige modulatorer af vigtige signalveje og dermed udvise hormonforstyrrende effekter.

Første trin, i undersøgelsen af det hormonforstyrrende potentiale af de udvalgte pesticider, omfattede en række *in vitro* screeninger af de enkelte stoffer i seks allerede etablerede mammale cellekultur systemer. På baggrund af de opnåede *in vitro* data, blev der på basis af stoffernes aktivitet/potens sammensat pesticidblandinger, som ligeledes blev analyseret i de seks *in vitro* assays.

Alle *in vitro* effektmålinger beskrevet herunder blev foretaget i henhold til internationale standardforskrifter.

2.1.1 Effekter på ER-, AR- og AhR funktion

Effekter på ER-, AR- og AhR funktion blev analyseret ved anvendelse af såkaldte receptor-luciferase-rapportergen analyser, som er specialdesignede til at detektere såvel en hæmning som en aktivering af de relevante receptorer. Metoden bygger på princippet om, at ændringer i receptoraktivitet kan detekteres indirekte via en proportional ændring i udsendelsen af en specifik lysintensitet, som udsendes fra luciferase rapportergen produktet (Bonefeld-Jorgensen et al., 2007).

2.1.1.1 Effekter på ER funktion

Effekter på ER funktionen blev testet i den stabilt transfekterede humane brystcancer cellelinje MVLN, der udtrykker endogene ER og en østrogen-responselement vektor (Demirpence et al., 1993). Analysen blev udført som tidligere beskrevet (Bonefeld-Jorgensen et al., 2005) med få modifikationer. MVLN celler blev spaltet ud i hvide 96-huls microtiter plader (Perkin Elmer) med en celledensitet på ca. 4×10^4 celler per brønd. Efter 24 timers inkubation ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft blev fortyndingsrækker af pesticider tilsat, og efter yderligere 24 timers inkubation, blev cellerne lyseret. Herefter blev luciferase aktiviteten bestemt og relateret til den aktuelle proteinkoncentration i brøndene.

De enkelte pesticider, samt en 5-komponent pesticidblanding (Mix5), blev testet alene og i tilstedeværelse af det højpotente, naturlige østrogen 17β-østradiol (E2) i en koncentration på 25 pM (E2-EC₅₀, svarende til den koncentration, som inducerer det halve maksimale E2 respons) for at detektere henholdsvis agonistiske og antagonistiske effekter. Parallelt med hver udført analyse, blev

cellerne eksponeret til en fortyndingsrække af E2 (3.1-300 pM), hvilket fungerede som en positiv dosis-respons kontrol.

Pesticiderne blev testet alene i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, og i co-eksponerings forsøgene i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} - 1×10^{-5} M. Fem-komponent blandingen (Mix5) blev testet alene og i tilstedeværelse af E2 i koncentrationsintervallet 5×10^{-12} - 2.5×10^{-4} M.

2.1.1.2 Effekter på AR funktion

Effekter på AR funktionen blev testet i kinesisk hamster ovarieceller (CHO-K1), der blev co-transfekteret med et humant AR ekspressions plasmid (pSVARO) og et luciferase rapporter plasmid (MMTV-LUC). Analysen blev udført som tidligere beskrevet (Kruger et al., 2008). CHO-K1 cellerne blev spaltet ud i hvide 96-huls microtiter plader (Perkin Elmer) med en celledensitet på ca. 8000 celler per brønd. Efter 24 timer inkubation ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft blev cellerne co-transfekteret med 150 ng af plasmiderne pSVARO og MMTV-LUC i forholdet 1:100 ved brug af transfektionsreagenset FuGene (Roche). Efter fem timers inkubation blev cellerne induceret med en fortyndingsrække af de valgte pesticider/pesticidblandinger, og efter yderligere 20 timers inkubation blev cellerne lyseret. Herefter blev luciferase aktiviteten bestemt og relateret til den aktuelle proteinkoncentration i brøndene.

De enkelte pesticider samt en 3-komponent (Mix3) og en 5-komponent (Mix5) pesticidblanding blev testet alene og i tilstedeværelse af enten den syntetiske AR ligand methyltrienolone (R1881) eller det naturlige androgen dihydrotestosterone (DHT) i en koncentration på 25 pM (R1881-EC50/DHT-EC50, svarende til den R1881/DHT koncentration, som inducerer det halve maksimale respons) for at detektere henholdsvis agonistiske og antagonistiske effekter.

Parallelt med hver udført analyse, blev cellerne eksponeret til en fortyndingsrække af enten R1881 (1-250 pM) eller DHT (5-1000 pM), hvilket fungerede som en positiv dosis-respons kontrol. Ligeledes blev cellerne eksponeret for en fortyndingsrække af det AR-hæmmende stof hydroxyflutamide (HF) (0,5-5000 nM), hvilket fungerede som en inhibitor kontrol.

I begyndelsen af dette projekt blev R1881 anvendt til alle co-eksponeringsforsøg, men grundet et amerikansk forbud mod at eksportere dette kemikalie, blev R1881 erstattet med DHT i løbet af studiet. På Institut for Folkesundhed (Aarhus Universitet) er der blevet udført en række tests, som har bekræftet, at udskiftningen af R1881 med DHT er rimelig (data ikke vist). Dog er det blevet fundet nødvendigt at ændre det testede koncentrationsinterval af den positive kontrol i forbindelse med udskiftningen af R1881 til DHT, som angivet ovenfor.

De enkelte pesticider blev testet i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} - 1×10^{-5} M, 3-komponent (Mix3) og 5-komponent (Mix5) blandingen blev testet i koncentrationsintervaller på henholdsvis 3×10^{-12} - $1,5 \times 10^{-4}$ M og 5×10^{-12} - $2,5 \times 10^{-4}$ M.

2.1.1.3 Effekter på AhR funktion

Effekter på AhR funktionen blev testet i den stabilt transfekterede muse hepatoma cellelinje Hepa1.12cR, der indeholder AhR-luciferase rapportergen (Long et al., 2003; Long et al., 2006). Analysen blev udført som tidligere beskrevet (Long et al., 2006). Hepa1.12cR cellerne blev udspaltet i hvide 96-huls microtiter plader (Perkin Elmer) med en celledensitet på ca. 3×10^5 celler per brønd, og efter 24 timers inkubation ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft blev cellerne induceret med en fortyndingsrække af pesticiderne. Efter fire timers inkubation blev cellerne lyseret, og luciferase aktiviteten blev bestemt og relateret til den aktuelle proteinkoncentration i brøndene.

De enkelte pesticider, samt en 5-komponent pesticidblanding (Mix5), blev testet alene og i tilstedeværelse af det højpotente dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) i en koncentration på 60 pM (TCDD-EC₅₀, svarende til den koncentration, som inducerer det halve maksimale TCDD respons) for at detektere henholdsvis agonistiske og antagonistiske effekter. Parallelt med hver udført analyse, blev cellerne eksponeret til en fortyndingsrække af TCDD (0,002-5 nM), hvilket fungerede som en positiv dosis-respons kontrol.

De enkelte pesticider blev testet i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} - 1×10^{-4} M, og 5-komponent blandingen (Mix5) blev testet i koncentrationsintervallet 5×10^{-12} - $2,5 \times 10^{-4}$ M.

2.1.2 Effekter på TH funktion

For at undersøge eventuelle aktiverende eller hæmmende effekter af pesticiderne på TR, blev anvendt et såkaldt T-screen assay (Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2005). Metoden er baseret på den TH-afhængige vækst af rottehypofyse celler (GH₃), som udtrykker intracellulære TR og udskiller væksthormon i tilstedeværelse af TH. Væksthormon genet har et thyroidea-responselement i promoter regionen. Cellerne er almindeligt anvendt som standard hypofyse cellemodel for THs virkemåde og kan derfor anvendes til at undersøge, om pesticiderne har potentiale til at interferere med TH systemet på et cellulært niveau, idet en eventuel cellevækst indikerer tilstedeværelsen af et stof, som har TH-lignende egenskaber. Således anses T-screen for at være en indirekte måling af effekter på TR.

Analysen blev udført som tidligere beskrevet (Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2005). GH₃ cellerne blev uspaltet i 96-huls microtiter plader (Nunc) med en celletæthed på ca. 3000 celler per brønd, og efter 24 timers inkubation ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft blev cellerne induceret med en fortyndingsrække af pesticiderne i én uge. Herefter blev cellerne fikseret med trichloreddikesyre (TCA), og det intracellulære protein blev farvet med sulforhodamin B (SRB). Den bundne farve blev genopløst og målt i en microtiter plade aflæser (EL8000, BioTek) for at bestemme antal celledelinger i brøndene i forhold til brønde med celler, som kun blev behandlet med en solvent kontrol.

De enkelte pesticider, Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) samt en speciel pesticidblanding uden bitertanol (Mix4: terbuthylazin, propiconazol, cypermethrin og malathion) blev testet alene og i tilstedeværelse af thyroideahormonet triiodothyronine (T₃) i en koncentration på 0,5 nM (T₃-EC₅₀, svarende til den koncentration, som inducerer det halve maksimale T₃ respons) for at detektere henholdsvis stimulerende og hæmmende effekter på GH₃ cellevæksten. Parallelt med hver udført analyse, blev cellerne eksponeret til en fortyndingsrække af T₃ (1×10^{-11} - 1×10^{-8} M), hvilket fungerede som en positiv dosis-respons kontrol.

Alle pesticider blev testet som enkeltstoffer i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} - 5×10^{-5} M, og Mix5 og Mix4 blev testet i koncentrationsintervaller på henholdsvis 5×10^{-12} - $2,5 \times 10^{-4}$ M og 4×10^{-12} - 2×10^{-4} M.

2.1.3 Effekter på aromatase aktivitet

Effekter på aromatase aktiviteten blev bestemt i en human placenta cancer cellelinje (JEG-3) (Drenth et al., 1998; Bonfeld-Jorgensen et al., 2007). Den anvendte radiometriske metode bygger på en indirekte kvantificering af aromatase aktiviteten, idet der måles på mængden af radioaktivt mærket vand, som frigøres i forbindelse med aromatiseringen af et tilsat radioaktivt-mærket androgent substrat.

Analysen blev udført som tidligere beskrevet (Bonfeld-Jorgensen et al., 2007) med få modifikationer. Cellerne blev spaltet ud i 24-huls plader (Nunc) med en celledensitet på ca. 4×10^4 celler per brønd. Efter 48 timers inkubation ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft blev cellerne induceret med fortyndingsrækker af pesticider. Efter yderligere 18 timers inkubation blev der tilsat

det ^3H radioaktivt-mærkede stof 4-androsten-3,17-dione. Den aromatase-afhængige aromatisering af substratet blev afsluttet efter to timer ved at placere 24-huls pladerne på is. Fra hver brønd blev udtaget medie, som blev ekstraheret med henholdsvis chloroform og en kul/dextran opløsning. Slutteligt blev aromatase aktiviteten bestemt ved tilsætning af Hionic Fluor (Perkin Elmer) efterfulgt af måling i en væske scintillations tæller. Den målte aromatase aktivitet blev fratrukket baggrundsniveauet og relateret til det aktuelle celle proteinindhold.

Parallelt med hver udført analyse, blev cellerne eksponeret til en fortyndingsrække (1×10^{-10} – 1×10^{-5} M) af det aromatase hæmmende stof 4-androsten-4-ol-3,17-dione (4-AOD), hvilket fungerede som en inhibitor kontrol.

Alle pesticider blev testet i koncentrationsintervallet 1×10^{-10} – 1×10^{-4} M. 3-komponent (Mix3) og 5-komponent (Mix5) pesticidblandingen blev testet i koncentrationsintervaller på henholdsvis 3×10^{-8} – $1,5 \times 10^{-4}$ M og 5×10^{-8} – $2,5 \times 10^{-4}$ M.

2.1.4 Effekter på kønshormonsyntese

Effekter på kønshormonsyntesen blev undersøgt i humane H295R binyrebark cancerceller (ATCC, CRL-2128) i et såkaldt H295R assay. Den anvendte cellelinje udtrykker alle nøglezymer i steroidsyntesen, hvilket gør den meget anvendelig som et screeningsværktøj, der kan detektere effekter af fremmedstoffer på kønshormonsyntesen. H295R cellerne har de samme karakteristika som fosterbinyreceller, og effekter på steroidsyntesen kan derfor aflæses direkte i ændret produktion af steroidhormoner (Gazdar et al., 1990; Hollert and Giesy, 2007).

Effekterne af pesticiderne på produktionen af østradiol, progesteron og testosteron blev testet som tidligere beskrevet (Hecker et al., 2011). Cellerne blev udsået med en celletæthed på ca. 3×10^5 celler per brønd i 24-huls dyrkningsplader (Costar 3524, Corning, NY, USA) i DMEM/F12 medium (Gibco, Paisley, Storbritannien) suppleret med 2,0 % Nu-serum (BD Sciences Danmark) og 1 % ITS blanding indeholdende 6,25 µg/ml insulin, 6,25 mg/ml transferrin og 6,25 ng/ml selen, 1,25 mg/ml BSA og 5,35 µg/ml linoic syre (BD Sciences Danmark) og inkuberet i 24 timer ved 37 °C i en atmosfære af 5 % CO₂/luft.

Pesticiderne blev tilsat cellerne i seks koncentrationer (1,6–100 µM) i triplikat. Kontrolbrønde indeholdt den samme mængde af dimethylsulfoxid (DMSO) som eksponerede celler. Efter 48 timers inkubering blev mediet fjernet og opbevaret ved -80 °C til analyse af hormoner. Steroidhormonerne blev oprenset fra mediet og niveauerne af østradiol, progesteron og testosteron i cellediet blev målt ved anvendelse af kommercielle hormon kits fra Wallac DELFIA (Perkin Elmer Danmark, Hvidovre, Danmark). Hormonniveauer blev normaliseret til kontroller. I hvert forsøg blev inkluderet to positive kontroller - forskolin og prochloraz - der henholdsvis øger og reducerer dannelsen af testosteron og østradiol. To koncentrationer af hvert stof blev undersøgt for effekt på testosteron og østradiol dannelse.

2.1.5 Cytotoksicitet

For analyser på ER-, AR- og AhR funktion samt for T-screen og aromatase aktivitets analyser, blev cytotoksicitet af pesticiderne på de anvendte cellekulturer testet med et cytotoksicitets kit (LDH) fra Roche (Mannheim, Tyskland) som tidligere beskrevet (Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2005). Cytotoksicitet af pesticiderne på H295R celler blev analyseret ved hjælp af et MTT ((3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay som beskrevet (Hecker et al., 2011).

2.1.6 Evaluering af blandingseffekter: koncentrations addition (CA) modellen

De to equi-molære pesticidblandinger, Mix3 og Mix5, blev evalueret for eventuelle blandingseffekter *in vitro* ved anvendelse af koncentrations addition (CA) modellen. Princippet bag CA bygger på antagelsen om, at ikke-interagerende kemikalier, med samme virkningsmåde, blot varierer i potens og derfor kan anses som værende fortyndinger af hinanden. Altså forventes hver komponent i blandingen at bidrage til den overordnede kombinerede effekt i proportion til dets koncentration (Payne et al., 2000). Dermed er det med CA modellen muligt at prædiktere den koncentration af blandingen, som forårsager en given effekt – under forudsætning af, at forholdet mellem de enkelte komponenter i blandingen, samt den koncentration af hver komponent, som forårsager samme givne effekt, er kendt (Cedergreen et al., 2008). I princippet er modellen også anvendelig i tilfælde, hvor ikke alle komponenter i en blanding forårsager en effekt. Dog forudsætter princippet om CA, at effekterne af de aktive komponenter skal være ensrettede – dvs. enten aktiverende eller hæmmende.

Som tidligere beskrevet (Birkhoj et al., 2004; Kruger et al., 2008) blev koncentrationer af blandingerne svarende til udvalgte effektive niveauer prædikeret under antagelse af additivitet:

$$EC_{mix} = 1/\sum(p_i/EC_i)$$

hvor EC_{mix} er den koncentration af blandingen, som forårsager effekten E, p_i svarer til ratioen af stoffet i i blandingen, og EC_i er koncentrationen af stoffet i alene, som forårsager den samme effekt E (bestemmes ud fra koncentration-respons kurverne for de enkelte pesticider). De prædikterede koncentrationer af blandingerne ved givne effektive niveauer blev sammenlignet med de aktuelle observerede effekter af blandingerne for at evaluere for mulige blandingseffekter.

Ligeledes blev den kombinerede effekt af pesticiderne i blandingen evalueret ved beregning af isobolkoefficienter (Kortenkamp and Altenburger, 1998) ved givne effektive niveauer:

$$\sum(c_i/EC_i)$$

Hvor c_i er koncentrationen af stoffet i i blandingen, som producerer den samme effekt E. Isobolkoefficienter lig 1 indikerer en additiv blandingseffekt. Værdier <1 indikerer blandingseffekter mere end additive, og værdier >1 indikerer antagonistiske blandingseffekter.

2.2 QSAR analyser

Alle 13 pesticider og metabolitten ETU blev evalueret i QSAR modeller for teratogen risiko, ER α binding og ER agonisme, som tidligere beskrevet (Jensen et al., 2008), samt for AR antagonisme (Vinggaard et al., 2008). Ligeledes blev de fem pesticider, der indgik i pesticidblandingerne, udvalgt til eksponering af rotter, testet i en model for pregnan X receptor (PXR) agonisme, som beskrevet (Dybdahl et al., 2012). PXR er en kernereceptor, der som oftest, men ikke altid, er knyttet til induktion af CYP3A4, der metaboliserer visse kønshormoner og en lang række kemikalier.

2.3 Transport over human placenta

Det er i placenta perfusionsmodellen muligt at undersøge transporten af et stof over placenta ved forskellige koncentrationer henover tid. Den anvendte placenta perfusionsmodel, studerer placenta fra ukomplicerede graviditeter og fødsler fra fødegangen på Rigshospitalet, umiddelbart efter vaginal fødsel og ukomplicerede kejsersnit. En informeret samtykkeerklæring underskrives af moderen inden placenta modtages. Projektet er godkendt af videnskabsetisk komité og ingen

personidentificerbare oplysninger gemmes, hvorfor der er tale om anonyme donationer.

2.3.1 Perfusionssystemet

Placenta består af 20-40 mindre vaskulære enheder: cotyledoner. I cotyledonet adskilles det føtale og det maternelle kredsløb af få celler, hvor udvekslingen af ilt, carbondioxid, hormoner og metaboliske produkter foregår. I modelsystemet kannuleres arterie og vene på den føtale side af placenta, således at det føtale kredsløb i et isoleret cotyledon reetableres. Det maternelle kredsløb reetableres med slanger, som placeres i vævet, hvorefter begge kredsløb gennemstrømmes simultant med medie (Mathiesen et al., 2010; Myllynen et al., 2010).

Det anvendte medie bestod af DMEM-F12 uden pH indikatoren phenolrødt. I de placentrale perfusioner blev mediet tilsat heparin 25 IU/ml (Rigshospitalets apotek) og Human Serum Albumin (HSA) dialyseret i Krebs Ringer buffer, 30 g/l i det maternelle reservoir og 40 g/l i det føtale reservoir (20 % opløsning, produkt #109697, CSL Behring GmbH). Systemet blev konstant holdt ved 37 °C med en pH mellem 7,2 og 7,4 samt et glukoseniveau på over 5 mmol/L. Flowet i det føtale og det maternelle kredsløb blev kontrolleret med peristaltiske pumper på 3 mL/min og 9 mL/min og gasset med henholdsvis 95 % N₂/5 % CO₂ i det føtale kredsløb og 80 % O₂/20 % CO₂ i det maternelle kredsløb for at opretholde en iltgradient.

Der blev indledningsvist taget en før-prøve, og ved tiden T₀ blev teststoffet (cypermethrin, propiconazol, bitertanol eller en blanding af disse tre pesticider i forholdet 1:1:1 (Mix3)), med en koncentration af hvert stof på 0,5 µM eller 1 µM og kontrolstoffet antipyrin (i en koncentration på 100 µg/mL, Aldrich-Chemie, Steinheim, Germany) tilsat det maternelle kredsløb. Der blev hernæst taget prøver efter: 0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 330 og 360 minutters perfusion.

Kvantificering af stofkoncentrationer i alle udtagne prøver i tidsserierne er kritisk og projektet tillod ikke kemiske analyser af de mange prøver. Det var muligt for overkommelige midler at indkøbe cypermethrin og propiconazol med C-14 mærkning i den stabile ringstruktur, mens dette ikke kunne lade sig gøre for bitertanol. For radioaktivt-mærkede teststoffer (cypermethrin og propiconazol i soloperfusioner) blev ved hvert udtagningstidspunkt udtaget en 0,5 ml prøve, som blev centrifugeret i 5 minutter ved 4000 g. Herefter blev 200 µL af supernatanten overført til et rør med 2 mL Ecoscint (XR LS-372) scintillationsvæske (BN instruments A/S), og 200 µL supernatant blev ligeledes opbevaret ved -20 °C indtil antipyrin bestemmelse vha. HPLC. Transport af antipyrin fra maternel til føtal cirkulation blev anvendt som positiv kontrol, idet stoffet passerer placenta ved passiv transport.

For at bestemme stoffernes koncentration, og eventuel transport i de to kredsløb, blev der udtaget prøver fra både føtale og maternelle kredsløb ved forskellige tidspunkter under hele forsøget. Som kontrol for at vævet forblev intakt under hele forsøget, og at perfusionerne kunne betragtes som vellykkede, blev der målt lækage fra den føtale cirkulation, samt vævets optag af glukose og ilt.

2.3.2 BeWo cellemonolag systemet

2.3.2.1 Cytotoksicitet

Cytotoksicitetstest blev udført med et 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT) assay (Mosmann, 1983) for at sikre, at der ikke blev arbejdet med toksiske koncentrationer af pesticiderne i transportmodellerne. I denne kolorimetrisk analysemetode måles der på farveudviklingen i forbindelse med reduktionen af MTT til det tilsvarende formazan produkt (mørkelilla). MTT optages i cellerne og transporteres til mitokondrierne, hvor omdannelsen af stoffet finder sted. Det dannede formazan produkt kan ikke passere plasma membranen, og akkumuleres derfor i cellerne. Ved tilsætning af et organisk solvent frigøres det farvede produkt, hvilket kan måles spektrofotometrisk. Cellernes evne til at reducere MTT giver altså en indikation af

den mitrokondrielle integritet og aktivitet og kan derfor anses for værende et mål for celleviabiliteten (antallet af levende celler).

BeWo celler (klon b30) blev sået med en tæthed på ca. 1×10^4 celler/brønd i 96-brønns plader og inkuberet i 24 timer. De semikonfluente celler blev eksponeret for pesticiderne cypermethrin, propiconazol, bitertanol eller en blanding af de tre stoffer (Mix3) ved koncentrationerne 5×10^{-9} M til 1×10^{-5} M. Cellekulturmedium med 0,25 % dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Ayershire, UK) blev brugt som baggrund, og den positive kontrol bestod af 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Applichem, Darmstadt, Tyskland) i cellekulturmedium.

Efter 24 timer blev pesticidresterne fjernet, og cellerne blev vasket tre gange i PBS (phosphate buffered saline) og inkuberet med 100 μ l/brønd MTT ved koncentrationen 0,5 mg/ml i to timer. Derefter blev MTT fjernet, og 100 μ l/brønd DMSO blev tilsat for at opløse krystaller. Pladen blev rystet ved 900 rpm i et minut og absorbans blev målt ved 550 nm ved brug af en Multiscan FC plate reader (Thermo Fisher Scientific, Danmark).

2.3.2.2 Transport over BeWo monolag

In vitro studier med celler som model for placenta blev, ligesom de humane placentale perfusioner, brugt til at klarlægge transporten over placenta. De indledende *in vitro* forsøg var ligeledes med til at optimere perfusionernes forløb, hvormed det blev undgået at anvende unødvendigt mange placentae.

Til at studere transporten af de udvalgte pesticider over human placenta *in vitro*, blev anvendt trophoblastceller fra den humane BeWo cellelinje (Poulsen et al., 2009). Trophoblastceller udgør en del af den cellebarriere, som adskiller moderens og barnets kredsløb i placenta under graviditeten. Cellerne vokser i monolag og blev dyrket i cellekulturbrønde på permeable filtre. Ved at tilsætte teststoffet til det apikale kammer (svarende til den materielle side) var det muligt at studere den transport, som foregår over cellerne til det basale kammer (svarende til den føtale side). Resultater fra BeWo celle *in vitro* forsøgene blev anvendt som indledende forsøg for studier med placenta, for at estimere den celle-toksiske koncentration af det stof, der ønskedes undersøgt, til vurdering af tidsrammen for en eventuel transport, samt til afprøvning af analysemetode til sporing af teststof.

BeWo cellerne (klon b30) blev udsået med en celledæthed på 1×10^5 celler/cm² på Transwell® inserts (polyester (PE) filtre 3 μ m porestørrelse, 1,12 cm² areal, 0,5 ml apikal kammer, 1,5 ml basal kammer). Transportstudier blev udført efter tre dages cellevækst. Transepitel elektrisk modstand (TEER) i cellelaget i insert blev målt med EndOhm apparatur, og TEER værdier over 20 Ω ansås som indikator for et konfluent cellelag.

Ved tiden T_0 blev 0,5 ml 1 μ M pesticidopløsning i transportmedium (DMEM-F12 uden pH indikatoren phenolrødt) tilsat det apikale kammer. Det basale kammer indeholdt 1,5 ml transportmedium. Til tiderne: 0 min., 1 min., 30 min., 1 time, 2 timer, 4 timer, (6 timer), 8 timer og 24 timer blev 100 μ L prøver udtaget fra det basale kammer og 10 μ L prøver udtaget fra det apikale kammer. I det basale kammer blev prøvevolumen erstattet med 100 μ L nyt medie. Efter sidste prøve målte TEER igen, og celler og filtre blev vasket tre gange i iskold HBSS (Hank's buffered salt solution). Hvert filter blev klippet fri og analyseret tilsvarende prøverne. Ved radioaktivt-mærkede pesticider blev prøverne tilsat 2 mL scintillationsmedie og kvantificeret vha. en standardkurve. Data blev korrigeret for prøvetagning og genfyldning af volumen.

For at give den optimale vurdering af transporten af de forskellige stoffer over human placenta, blev resultaterne fra *in vitro* forsøg og perfusionerne sammenholdt.

2.4 *In vivo* rotte pesticid eksponeringer

Syv grupper af 12 tidssparrede Wistar rotter blev doseret dagligt fra dag 7 til 21 i drægtighedsperioden via sonde med forskellige pesticidblandinger. Gruppe 1 modtog kun vehikel. Gruppe 2, 3 og 4 modtog en 1:1:1 blanding (på vægtbasis) af bitertanol, propiconazol og cypermethrin (Mix3) med en totaldosis på henholdsvis 3, 9 og 30 mg/kg legemsvægt/dag. Gruppe 5, 6 & 7 fik en 1:1:1:1:1 blanding (på vægtbasis) af bitertanol, propiconazol, cypermethrin, malathion og terbuthylazin (Mix5) med en totaldosis på henholdsvis 5, 15 og 50 mg/kg legemsvægt/dag. Urin fra mødre blev opsamlet på gestationsdag 15 (GD15) over en periode på fire timer.

På gestationsdag 21 (GD21) blev mødre vejet og aflivet. Fostrene blev fjernet ved kejsersnit og fostervand opsamlet. Anogenitalafstanden (AGD) blev målt i alle fostre ved hjælp af et dissektionsmikroskop med en okulær retikel. Målingerne blev udført blændet med hensyn til eksponeringsgruppen af en faglært laborant med mange års erfaring i måling af AGD hos rottefostre og nyfødte unger. Blod fra fostre og mødre blev opsamlet til hormonanalyse. Føtale testikler blev udtaget til 1) måling af testiklens testosteronindhold, 2) inkubation i tre timer for at vurdere testosteronproduktion *ex vivo*, og 3) fiksering til histopatologisk undersøgelse. En testikel fra to hanfostre fra hvert kuld blev inkuberet i medium i tre timer ved 34 °C, og derefter nedfrosset ved -80 °C indtil måling af testosteron i inkubationsmediet som beskrevet (Borch et al., 2006). En testikel fra to hanfostre fra hvert kuld blev lynfrosset i flydende nitrogen før måling af testosteronindhold. En testikel fra hver af to hanfostre per kuld blev anbragt i Bouins fiksativ til histologi. Yderligere procedurer kan findes beskrevet (Borch et al., 2006).

2.5 **Analyse af pesticider og metabolitter i væske fra placenta perfusioner og BeWo celleforsøg samt i urin og fostervand fra rotter.**

Projektet har udviklet analysemetoder til bestemmelse af pesticider og udvalgte metabolitter i fostervand og urin fra rotter samt væske fra humane placenta-forsøg og BeWo celleforsøg. For cypermethrin er der udviklet en separat metode, da stoffet er meget upolært i forhold til alle de andre analyserede stoffer. En liste med de stoffer, der er analyseret i projektet og tilsvarende analysemetoder, fremgår af tabel 2.

Det var generelt ikke muligt at analysere for malathion og 1,2,4-triazol (metabolit af azolfungicider), da stofferne ikke kunne genfindes efter ekstraktion. Dog blev prøver fra human placenta perfusioner analyseret direkte uden oprensning, hvormed det var muligt, at detektere 1,2,4-triazol. Metabolitten er meget vandopløselig og bliver derfor ikke adsorberet på kolonnemateriale ved fast fase oprensning.

Cypermethrin blev ekstraheret med hexan ved væske-væske ekstraktion. Før ekstraktion blev ¹³C₆-permethrin tilsat prøverne. Genfindning af den isotop-mærkede standard blev anvendt til at korrigere for cypermethrin koncentrationen fundet i prøverne. Den organiske fase blev inddampet og analyseret med gas kromatografi-massespektrometri (GC-MS) ved brug af negativ kemisk ionisering (NCI). To specifikke ioner blev anvendt for identifikation af cypermethrin. Identifikation af stoffet blev baseret på overensstemmelse af det fundne ionforhold for de to ioner sammenlignet med ionforhold af en certificeret standard ($\pm 20\%$) samt den kromatografiske retentionstid (± 3 sek.). Stoffet blev kvantificeret i prøverne ved ekstern lineær regression.

Multimetoden for ekstraktion og analyse af de polære stoffer er baseret på metoden publiceret af Baker et al. (Baker et al., 2004). Før ekstraktion blev prøverne tilsat en blanding af isotop-mærkede standarder (propiconazol-D₅, ¹³C₆-PBA og desethylterbuthylazin-D₉). Genfindning af de isotop-mærkede standarder blev anvendt til at korrigere for pesticid- og metabolitkoncentrationerne fundet i prøverne. Urinprøver blev behandlet med enzymer (β -glucuronidase og sulfatase) før

ekstraktion for at hydrolysere de pesticider, der var konjugeret med glukose eller sulfat. Prøvevolumen var 100 µL for fostervand/placentaforsøg og 1 mL for urinprøver. Prøverne blev ekstraheret på fast fase ekstraktion og ekstrakterne blev analyseret med væske kromatografi-dobbelt massespektrometri (LC-MS-MS). Hvert stof blev identificeret på basis af to specifikke kombinationer af moder ion/datter ion samt ionforhold for de to ioner sammenlignet med ionforhold af en certificeret standard ($\pm 20\%$) samt den kromatografiske retentionstid (± 10 sek.). Stofferne blev kvantificeret i prøverne ved ekstern lineær regression.

Analyselaboratoriet (Institut for Miljøvidenskab, Aarhus Universitet) er akkrediteret til analyse af pesticider i vand (DANAK akkreditering No. 411). Analyse af pesticider og deres metabolitter blev udført under akkrediterings retningslinjer. Laboratorium blindprøver blev analyseret med hver batch prøver og ^{13}C - eller deuterium mærket standard blev tilsat prøverne for at kunne beregne genfindning af stofferne og dermed sikre analysekvalitet.

Tabel 2. Analyserede stoffer og tilsvarende analysemetoder

Stof	Type	Ekstraktion	Analyse
Cypermethrin	moderstof	væske-væske	GC-MS
3-PBA	metabolit af cypermethrin	fast fase	LC-MS-MS
Bitertanol	moderstof	fast fase	LC-MS-MS
Propiconazol	moderstof	fast fase	LC-MS-MS
Terbuthylazin	moderstof	fast fase	LC-MS-MS
Desethylterbuthylazin	metabolit af terbuthylazin	fast fase	LC-MS-MS
2-Hydroxyterbuthylazin	metabolit af terbuthylazin	fast fase	LC-MS-MS
Malathion dicarboxylsyre	metabolit af malathion	fast fase	LC-MS-MS

2.6 Statistisk analyse

2.6.1 *In vitro* cellekultur analyser

Hvert pesticid eller pesticidblanding blev testet i det relevante koncentrationsinterval i mindst tre uafhængige forsøg. I hvert forsøg blev pesticidkoncentrationerne testet i tripliket, og ligeledes blev tilsvarende solventkontroller og mediekontroller testet i tripliket for at sikre en standardisering af forsøgene. Hvis én af de tre værdier opnået ved tripliket afveg fra de to andre værdier med mere end 30 %, blev gennemsnittet af de to lignende værdier anvendt. Alle data blev relateret til de respektive solventkontroller, som blev fastsat til at give et respons på 100 %.

Statistisk analyse blev udført på middelværdier fra hvert uafhængigt forsøg. Kun resultater opnået ved ikke-toksiske koncentrationer blev inkluderet i den statistiske analyse. Kriteriet for statistisk signifikans blev sat til $p \leq 0,05$.

Statistisk analyse af normalfordelte data med varianshomogenitet blev foretaget vha. ANOVA efterfulgt af Dunnetts' test. Ved manglende normalfordeling og varianshomogenitet var post hoc testen Kruskal-Wallis' test (for at sammenligne forskelle mellem forskellige koncentrationer) og Jonckheere-Tepstra test (for at analysere for lineær trend mellem koncentration og respons). Hvis én eller begge af disse tests viste en signifikant forskel ($p \leq 0,05$), blev Mann-Whitney testen anvendt til at sammenligne hver koncentration med kontrollen.

Koncentration-respons-kurver samt beregning af EC₅₀ (den koncentration, som inducerer 50 % af det maksimale respons) og IC₅₀ (den koncentration, som medfører en 50 % hæmning af den maksimale hæmning) blev udført i SigmaPlot 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) ved at fitte data til den sigmoide Hill (4 parameter) ligning.

2.6.2 Ex vivo placenta overførsel

For at undersøge for statistisk forskel i overførsel af et pesticid solo og et pesticid i Mix3 blev anvendt ikke-parametrisk Kruskal-Wallis test for uafhængige variable. Analysen blev udført for placenta perfusionsforsøg og BeWo monolag transportforsøg. Kriteriet for statistisk signifikans blev sat til $p < 0,05$. Analyser blev udført i SAS Statistical Software version 9.2.

2.6.3 In vivo rotte pesticideksponeringer

Statistisk analyse af normalfordelte data med varianshomogenitet blev udført ved brug af analyse af varians (ANOVA) efterfulgt af Dunnetts' post hoc test. Når mere end én unge fra hvert kuld blev undersøgt, blev de statistiske analyser justeret med brug af kullet som uafhængig, random og nested faktor i ANOVA. Fødselsvægt blev analyseret med antallet af unger per kuld som kovariat. I tilfælde, hvor normalfordeling og varianshomogenitet ikke kunne opnås ved hjælp af datatransformation, blev en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis-test anvendt (postimplantationstab).

3. Resultater

3.1 *In vitro* cellekultur analyser

For at belyse mulige hormonforstyrrende mekanismer, blev de udvalgte pesticider analyseret i seks *in vitro* testsystemer for at evaluere for effekter på ER-, AR-, AhR- og TH funktion samt effekter på aromatase aktivitet og kønshormonsyntese.

3.1.1 Valg af pesticider til blandingsanalyser

På basis af første screeningsrunde af pesticiderne i de seks *in vitro* assays, blev der foretaget en vurdering af de aktive pesticiders effekt, potens og relevans for human eksponering. Af de 14 testede stoffer udviste seks af stofferne (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, prothioconazol, cypermethrin og malathion) en effekt på flere endpoints, hvilket indikerer et bredere hormonforstyrrende potentiale. Projektgruppen foreslog derfor, på basis af stoffernes *in vitro* potens og effekt, at der for følgende fem pesticider blev foretaget videre analyser i blanding: *terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion* (betegnet Mix5). Det blev fælles med følgegruppen vedtaget at kombinere pesticiderne i et equi-molært forhold, dvs. at stofferne blev blandet i koncentrationsforholdet 1:1:1:1:1. Ydermere foreslog projektgruppen, at en tre-komponent blanding (betegnet Mix3), bestående af *bitertanol, propiconazol og cypermethrin* (ligeledes i et equi-molært forhold), blev screenet for effekter på AR funktion samt for effekter på aromatase aktivitet og kønshormonsyntese, idet disse tre pesticider viste antiandrogene effekter på kønshormonsyntesen i den indledende screeningsrunde.

3.1.2 Effekter på ER funktion

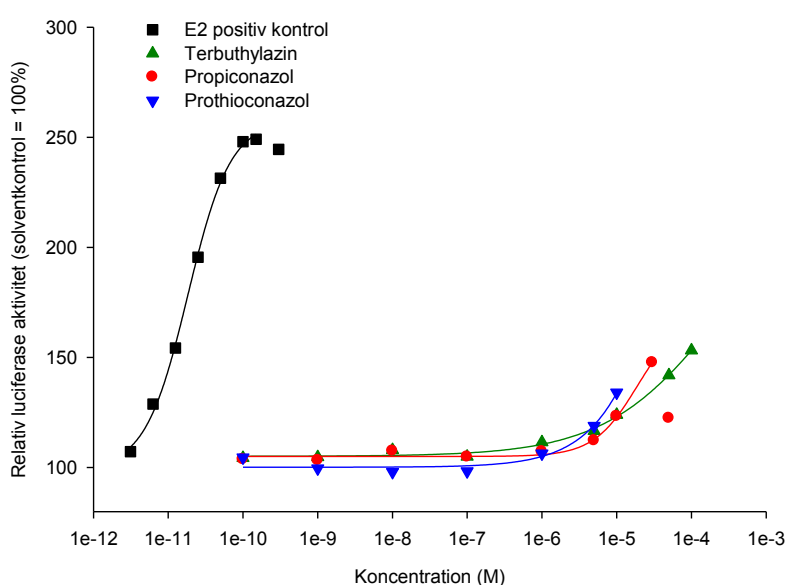
Fem af de 14 testede stoffer (terbuthylazin, propiconazol, prothioconazol, cypermethrin og malathion) udviste relativt svage, signifikante østrogen-lignende effekter (Tabel 3).

Tabel 3. Effekter på ER funktion af pesticider testet alene. Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), LOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et signifikant ($p \leq 0,05$) respons, MOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et maksimalt (ikke-toksisk) respons, EC50: den koncentration, som inducerer halvdelen af det maksimale respons, SC: solventkontrol, ib: ikke bestemt, -: ingen effekt observeret.

	LOEC (M)	MOEC (M)	% af SC ved MOEC	EC50 (M)	Cytotoksicitet (M)
E2	$6,3 \times 10^{-12}$	$1,0 \times 10^{-10}$	248	$1,8 \times 10^{-11}$	-
Solvent	-	-	100	-	-
Terbuthylazin	1×10^{-6}	1×10^{-4}	153	$1,8 \times 10^{-5}$	-
Propiconazol	5×10^{-6}	3×10^{-5}	148	$1,2 \times 10^{-5}$	$\geq 1 \times 10^{-4}$
Prothioconazol	5×10^{-6}	1×10^{-5}	134	$4,3 \times 10^{-6}$	$\geq 5 \times 10^{-5}$
Cypermethrin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	119	ib	$\geq 5 \times 10^{-5}$
Malathion	1×10^{-5}	1×10^{-5}	113	ib	$\geq 1 \times 10^{-4}$
Mix5	5×10^{-5}	5×10^{-5}	137	ib	$\geq 2,5 \times 10^{-4}$

Ved co-eksponering med 25 pM E2 (E2-Ec50) var terbuthylazin ligeledes i stand til svagt at forstærke effekten af det naturlige østrogen (E2) signifikant ved højeste koncentration testet (1×10^{-5} M) med en effekt på 114 % relativt til solventkontrollen (data ikke vist). Ingen af de testede pesticider viste sig at have hæmmende effekter på ER funktionen.

Figur 1 illustrerer de koncentrations-afhængige effekter af terbuthylazin, propiconazol og prothioconazol samt den positive kontrol (E2). Det var ikke muligt at konstruere tilsvarende kurver for cypermethrin og malathion, da cypermethrin ikke udviste en klar dosis-respons tendens, og da malathion kun viste effekt ved én af koncentrationerne testet. EC50 værdier for terbuthylazin, propiconazol og prothioconazol blev beregnet til at være henholdsvis $1,8 \times 10^{-5}$ M, $1,2 \times 10^{-5}$ M og $4,3 \times 10^{-6}$ M (Tabel 3). Dette placerer de tre pesticider i gruppen af meget svage østrogener. Som det fremgår af Tabel 3, er potensen af pesticiderne ca. en faktor 10^6 mindre end for 17β -østradiol (E2), og de østrogen-lignende effekter af pesticiderne må derfor siges at være relativt svage i forhold til effekten af dette naturlige østrogen.



Figur 1. Østrogen-lignende effekter af terbuthylazin, propiconazol, prothioconazol og den positive kontrol (E2).

Mix5 bestående af de fire ER aktive pesticider (terbuthylazin, propiconazol, cypermethrin og malathion) og ét pesticid, som ikke havde nogen effekt på ER funktion (bitertanol), viste sig ligeledes at have en østrogen-lignende effekt ved den højeste ikke-toksiske koncentration testet (5×10^{-5} M) (Mix5, Tabel 3). I tilstedeværelse af det naturlige østrogen (E2) havde blandingen ligeledes en meget svag ikke-signifikant opregulerende effekt ved højeste koncentration testet (data ikke vist), hvilket formodes at afspejle effekten af terbuthylazin i tilstedeværelse af E2.

Da der kun blev observeret østrogen-lignende effekter af pesticidblandingen ved den højeste ikke-toksiske koncentration testet, var det ikke muligt at beregne EC50 og undersøge for eventuelle blandingseffekter ved sammenligning af prædikterede og observerede effekter.

3.1.3 Effekter på AR funktion

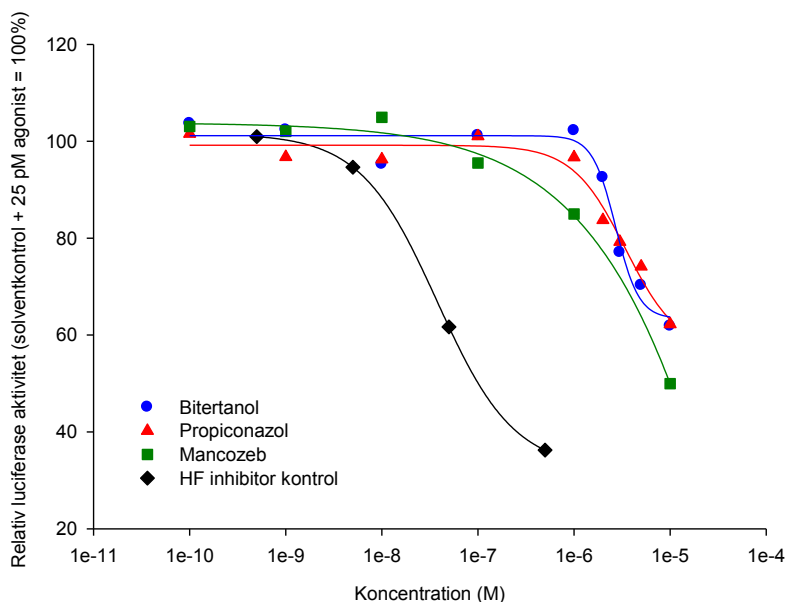
Ingen af de testede pesticider eller pesticidblandinger havde agonistiske effekter på AR (data ikke vist). Ved co-eksponering med en potent AR agonist (R1881 eller DHT) udviste pesticiderne mancozeb, bitertanol og propiconazol koncentrations-afhængige hæmmende effekter på det agonist-inducerede AR respons (Tabel 4 og Fig. 2). For mancozeb var denne effekt dog kun signifikant ved en relativ høj koncentration (1×10^{-5} M), og det kan derfor ikke udelukkes, at de

observerede effekter skyldes en begyndende cytotoxicitet af pesticidet. IC₅₀ værdier for pesticiderne mancozeb, bitertanol og propiconazol blev beregnet til at være henholdsvis $2,1 \times 10^{-6}$ M, $2,7 \times 10^{-6}$ M og $2,8 \times 10^{-6}$ M (Tabel 4), hvilket antyder, at potensen af de tre pesticider er nogenlunde ens. Dog er potensen af pesticiderne ca. en faktor 10^2 mindre end for inhibitor kontrollen (HF) (Tabel 4).

I co-eksponeringsforsøgene udviste Mix3 og Mix5 ligeledes hæmmende effekter på AR (Tabel 4 og Fig. 3 og 4). Begge pesticidblandinger indeholdt de to AR antagonist bitertanol og propiconazol. For begge blandinger blev der observeret en større procentvis maksimal hæmmende effekt end for de enkelte komponenter alene (Tabel 4).

Tabel 4. Effekter på AR funktion af pesticider testet i tilstedeværelse af 25 pM AR agonist (R1881 eller DHT). Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), LOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et signifikant ($p \leq 0,05$) respons, MOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et maksimalt (ikke-toksisk) respons, IC₅₀: den koncentration, som medfører halvdelen af det maksimale hæmmende respons, -: ingen effekt observeret. * Effekten af solventkontrollen (SC) + 25 pM AR agonist (R1881 eller DHT) blev sat til 100 %. ** Denne koncentration var borderline signifikant.

	LOEC (M)	MOEC (M)	% of SC + 25 pM agonist	IC ₅₀ (M)	Cytotoksicitet (M)
HF	5×10^{-8}	5×10^{-7}	36	$3,4 \times 10^{-8}$	-
Solvent			100*		-
Mancozeb	1×10^{-6} **	1×10^{-5}	50	$2,1 \times 10^{-6}$	-
Bitertanol	3×10^{-6}	1×10^{-5}	62	$2,7 \times 10^{-6}$	-
Propiconazol	2×10^{-6}	1×10^{-5}	62	$2,8 \times 10^{-6}$	-
Mix3	$1,5 \times 10^{-6}$	3×10^{-5}	36	$6,7 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-4}$
Mix5	$2,5 \times 10^{-6}$	5×10^{-5}	27	$7,0 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-4}$



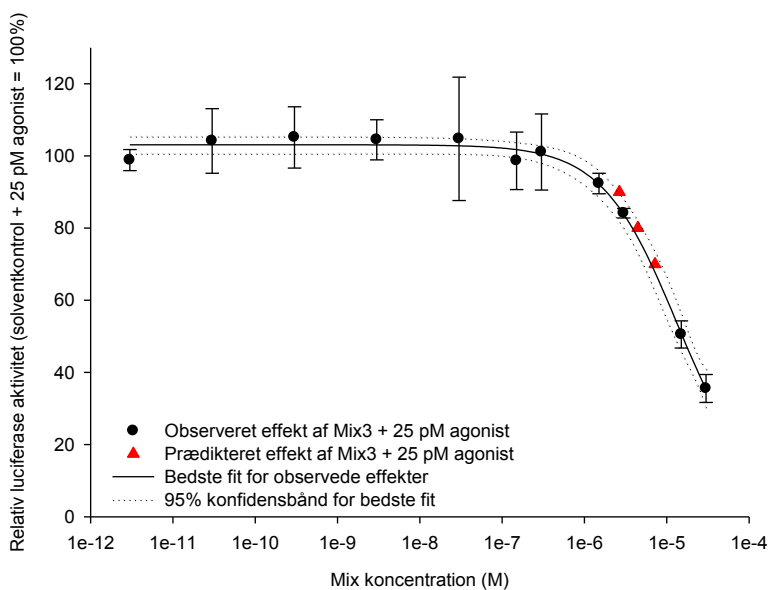
Figur 2. Hæmmende effekt på AR funktion af bitertanol, propiconazol, mancozeb og inhibitor kontrollen (HF). Pesticiderne og inhibitor kontrollen blev testet i tilstedeværelse af 25 pM AR agonist (R1881 eller DHT).

Ved hjælp af den såkaldte koncentrations addition (CA) model, blev blandingseffekter af pesticiderne evalueret, som tidligere beskrevet (Birkhoj et al., 2004; Kruger et al., 2008). Analysen

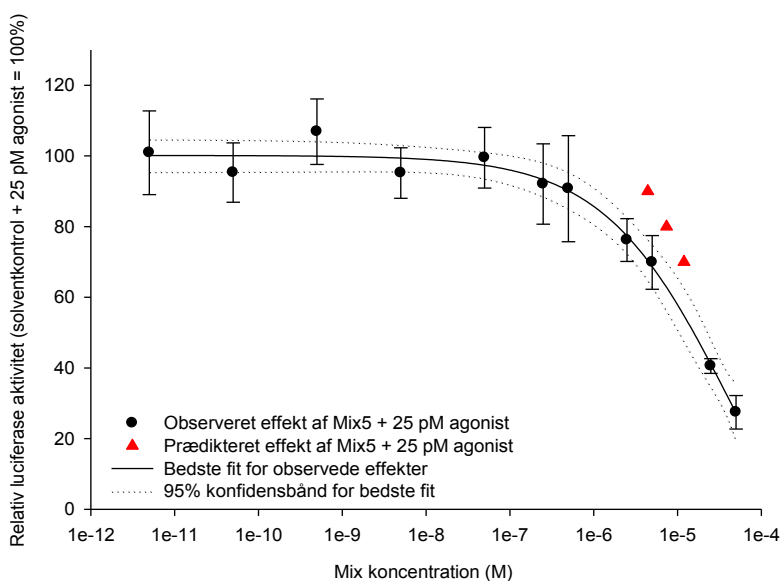
blev foretaget på baggrund af tre udvalgte effekt niveauer (70 %, 80 % og 90 % hæmning) og omfattede beregninger af isobolkoefficienter samt prædikerede effektkoncentrationer under antagelse af additivitet.

For Mix3 lå alle prædikerede effektkoncentrationer inden for 95 % konfidensintervallet (beregnet i SigmaPlot) for de observerede effekter (Fig. 3), hvilket tyder på, at kombinationen af bitertanol, propiconazol og cypermethrin har additiv effekt i forhold til effekterne observeret for de tre pesticider alene. Denne observation blev understøttet af de estimerede isobolkoefficienter med værdier omkring 1 (data ikke vist).

For Mix5 lå alle de prædikerede effektkoncentrationer uden for 95 % konfidensintervallet for observerede effekter, idet de prædikerede effektkoncentrationer viste sig at være større end de observerede effektkoncentrationer (Fig. 4). Dette tyder på, at de antagonistiske blandingseffekter var mere end additive i forhold til effekterne af de enkelte komponenter i blandingen. Denne observation blev understøttet af estimerede isobolkoefficienter <1 (data ikke vist).



Figur 3. Hæmmende effekter af Mix3 på AR funktion. Pesticidblandingen blev testet i tilstedeværelse af 25 pM DHT (agonist) svarende til DHT-EC₅₀.



Figur 4. Hæmmende effekter af Mix5 på AR funktion. Pesticidblandingen blev testet i tilstedeværelse af 25 pM DHT (agonist) svarende til DHT-EC₅₀.

3.1.4 Effekter på AhR funktion

Alle de analyserede stoffer, undtagen metabolitten ETU, viste sig at påvirke AhR funktionen (Tabel 5). Det skal dog påpeges, at seks af de 13 pesticider kun udviste aktivitet ved en relativ høj koncentration på 1×10^{-4} M, når stofferne blev testet alene.

Elleve af de 13 aktive stoffer havde en opregulerende effekt på AhR aktiviteten. Sammenlignet med den potente AhR ligand TCDD fremkaldte de relativt svage signifikante agonistiske effekter med AhR-REP værdier på mellem 2×10^{-7} og 2×10^{-4} (angiver potensen af pesticidet relativt til TCDD, for beregning se tabeltekst for Tabel 5). To af pesticiderne (bitertanol og prothioconazol) hæmmede AhR aktiviteten.

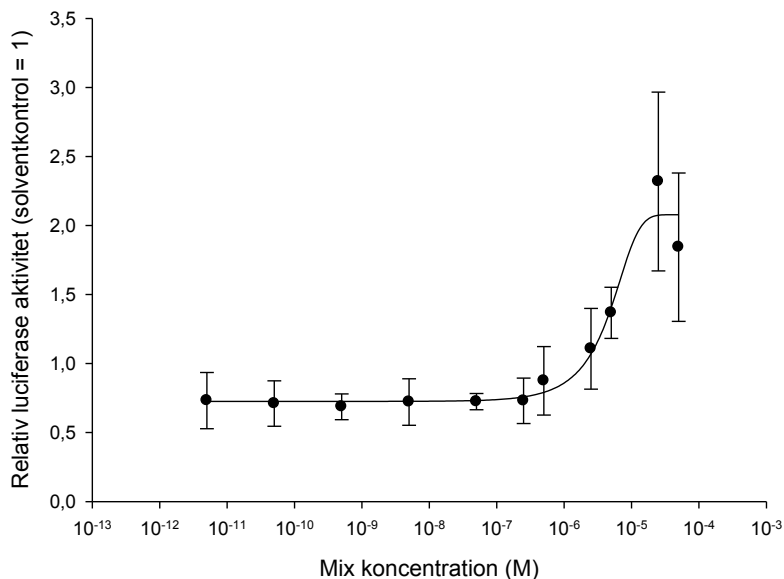
Ved co-eksponering med TCDD-EC₅₀ blev der observeret, at de seks AhR agonister (MCPA, terbuthylazin, iodosulfuron-methyl-natrium, mesosulfuron-methyl, chlormequat chlorid og tau fluvalinat) havde en potentiierende effekt på den TCDD-inducerede AhR aktivitet. Fire af pesticiderne (bitertanol, propiconazol, prothioconazol og cypermethrin) udviste en signifikant antagonistisk effekt på den TCDD-inducerede AhR aktivitet (Tabel 5).

Data for Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) viste en koncentrations-afhængig opregulerende tendens, der var forøget i sammenligning med enkeltkomponent pesticidanalyserne. Dog var denne effekt kun signifikant højere end solventkontrollen ved $2,5 \times 10^{-5}$ M (Tabel 5 og Fig. 5). Ved co-eksponering med TCDD-EC₅₀ udviste Mix5 ingen signifikante effekter på den TCDD-inducerede AhR aktivitet (Tabel 5).

Da komponenterne i blandingen havde modsatrettede effekter på AhR funktionen, var det ikke muligt at evaluere for eventuelle blandingseffekter ved sammenligning af prædikterede og observerede effekter.

Tabel 5. Effekter på AhR funktion. Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), LOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et signifikant ($p \leq 0,05$) respons, MOEC: den laveste testede koncentration, som inducerer et maksimalt (ikke-toksisk) respons, EC₅₀: den koncentration, som inducerer halvdelen af det maksimale respons, ib: ikke bestemt, -: ingen effekt observeret, AhR-REP angiver potens af pesticid relativt til TCDD beregnet ud fra formlen: $LOEC_{TCDD}/LOEC_{pesticid}$.

	Pesticider testet alene					Pesticider testet med 60 pM TCDD (TCDD-EC ₅₀)			
	LOEC (M)	MOEC (M)	% of SC, MOEC	EC ₅₀ (M)	AhR-REP	LOEC (M)	MOEC (M)	% of TCDD-EC ₅₀ , MOEC	Cytotoksicitet (M)
Solvent			100	-					
TCDD	2×10^{-12}	1×10^{-9}	7050	$1,9 \times 10^{-10}$	1,00	2×10^{-12}	1×10^{-9}	100	-
MCPA	1×10^{-4}	1×10^{-4}	244	ib	ib	1×10^{-4}	1×10^{-4}	124	-
Terbuthylazin	1×10^{-8}	1×10^{-4}	279	$1,4 \times 10^{-5}$	2×10^{-4}	1×10^{-9}	1×10^{-4}	128	-
Iodosulfuron-methyl-natrium	1×10^{-4}	1×10^{-4}	274	ib	ib	1×10^{-7}	1×10^{-4}	171	-
Mesosulfuron-methyl	1×10^{-4}	1×10^{-4}	170	ib	ib	1×10^{-4}	1×10^{-4}	116	-
Metsulfuron-methyl	1×10^{-4}	1×10^{-4}	227	ib	ib	-	-	-	-
Chlormequat chlorid	1×10^{-4}	1×10^{-4}	199	ib	ib	1×10^{-5}	1×10^{-5}	126	-
Bitertanol	1×10^{-5}	1×10^{-4}	53	ib	ib	1×10^{-4}	1×10^{-4}	5	-
Propiconazol	1×10^{-5}	1×10^{-4}	400	$1,1 \times 10^{-5}$	2×10^{-7}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	33	-
Prothioconazol	1×10^{-4}	1×10^{-4}	59	ib	b	1×10^{-4}	1×10^{-4}	50	-
Mancozeb	1×10^{-6}	1×10^{-5}	112	$2,8 \times 10^{-5}$	2×10^{-6}	-	-	-	$\geq 1 \times 10^{-4}$
Cypermethrin	1×10^{-7}	1×10^{-4}	136	$1,3 \times 10^{-8}$	2×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	88	-
Tau fluvalinat	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1357	$4,0 \times 10^{-5}$	2×10^{-7}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	178	-
Malathion	1×10^{-6}	1×10^{-6}	145	ib	ib	-	-	-	-
Mix5	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	232	ib	ib	-	-	-	$2,5 \times 10^{-4}$



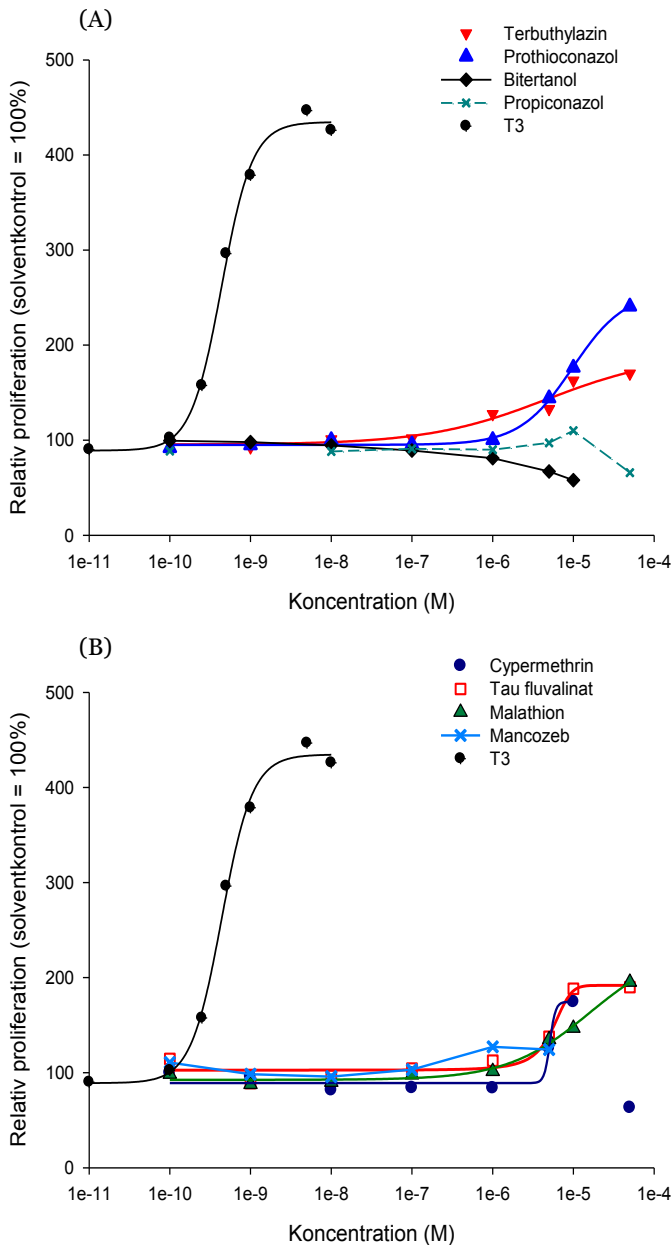
Figur 5. Effekter af Mix5 på AhR funktion.

3.1.5 Effekter på TH funktion

Otte ud af de 14 testede stoffer påvirkede den TH-afhængige GH3 celle proliferation (Tabel 6 og Fig. 6). Ved analyse af pesticiderne alene stimulerede terbuthylazin, prothioconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion cellevæksten, hvorimod bitertanol og propiconazol udviste hæmmende effekter. For cypermethrin blev observeret et fald i responset ved 5×10^{-5} M, hvilket formodes at skyldes en begyndende cytotoxicitet af dette pesticid i cellerne. Ingen af pesticiderne inducerede alene et respons højere end 38 % af det maksimale respons induceret af T3 (Tabel 6).

Tabel 6. Effekter af pesticiderne på TH-afhængig GH3 cellevækst. Mix4: terbuthylazin, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), LOEC: den laveste testede koncentration som inducerer et signifikant ($p \leq 0,05$) respons, MOEC: den lavest testede koncentration som inducerer et maksimalt (ikke-toksisk) respons, ib: ikke bestemt, -: ingen effekt observeret, RPE (relativ proliferativ effekt) er opgivet i forhold til den maksimale effekt af T3 ud fra formlen: $(\text{max effekt}_{\text{pesticid}} - \text{solventkontrol}) / (\text{max effekt}_{\text{T3}} - \text{solventkontrol}) \times 100$ %. * IC₅₀ værdi, da bitertanol udviste en hæmmende effekt.

	Pesticider testet alene					Pesticider testet med 0,5 nM T3 (T3-EC50)		
	LOEC (M)	MOEC (M)	RPE (%)	EC ₅₀ (M)	Cytotoksicitet (M)	LOEC (M)	MOEC (M)	% af T3-EC50
T3	1×10^{-10}	5×10^{-9}	100	$4,4 \times 10^{-10}$	-	-	-	-
Terbuthylazin	1×10^{-6}	5×10^{-5}	17	$4,5 \times 10^{-6}$	-	-	-	-
Bitertanol	1×10^{-6}	1×10^{-5}	12 (↓)	$2,6 \times 10^{-5}$ *	$\geq 5 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}	1×10^{-5}	73
Propiconazol	5×10^{-5}	5×10^{-5}	7 (↓)	ib	-	1×10^{-7}	1×10^{-5}	88
Prothioconazol	5×10^{-6}	5×10^{-5}	38	$9,7 \times 10^{-6}$	-	5×10^{-6}	5×10^{-5}	79
Mancozeb	1×10^{-6}	1×10^{-6}	7	ib	$\geq 1 \times 10^{-5}$	-	-	-
Cypermethrin	5×10^{-6}	1×10^{-5}	27	5×10^{-6}	-	$5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ (↑)	5×10^{-5} (↓)	116 ↑ 50 ↓
Tau fluvalinat	5×10^{-6}	5×10^{-5}	30	5×10^{-6}	-	5×10^{-5}	5×10^{-5}	76
Malathion	1×10^{-5}	5×10^{-5}	32	$1,5 \times 10^{-5}$	-	-	-	-
Mix5	5×10^{-8}	$2,5 \times 10^{-5}$	14	$3,3 \times 10^{-6}$	$\geq 2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-5}$	5×10^{-5}	50
Mix4	2×10^{-6}	4×10^{-5}	36	$3,4 \times 10^{-5}$	$\geq 2 \times 10^{-4}$	4×10^{-6}	2×10^{-5}	109

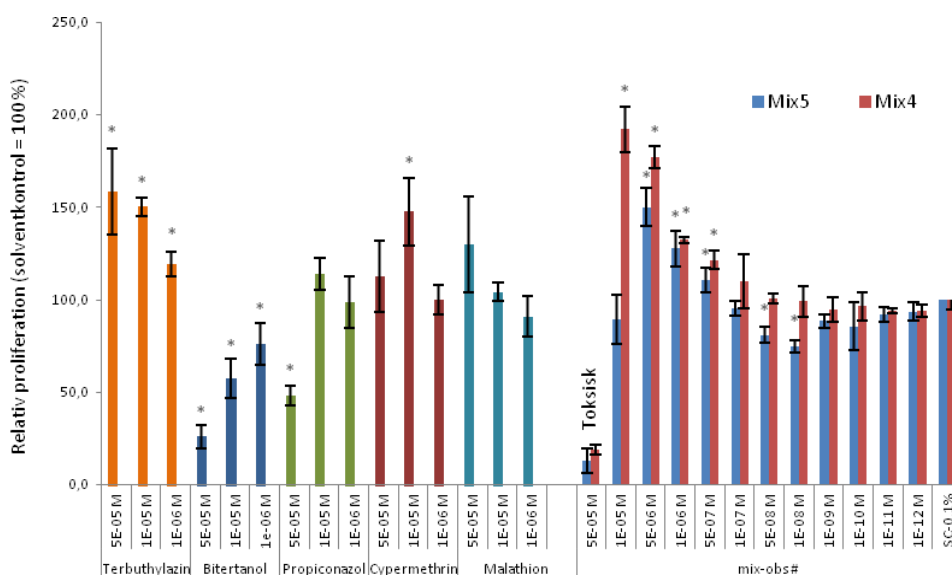


Figur 6. Effekter af pesticiderne og den positive kontrol (T3) på TH-afhængig GH3 cellevækst. Den relative proliferation angiver vækst af GH3 celler eksponeret for pesticidet relativt til væksten af celler eksponeret for solventkontrol (sat til 100 %). A) Relativ proliferation af terbutylazin, prothioconazol, bitertanol, propiconazol samt den positive kontrol (T3). B) Relativ proliferation af cypermethrin, tau fluvalinat, malathion, mancozeb samt den positive kontrol (T3).

Ved co-eksponerings forsøg blev pesticidernes evne til at forstærke eller hæmme effekten af T3 på cellerne undersøgt (Tabel 6). Bitertanol, propiconazol, prothioconazol og tau fluvalinat hæmmede den T3-inducerede GH3 cellevækst. Derimod stimulerede cypermethrin cellevæksten svagt ved lavere koncentrationer (5×10^{-6} - 1×10^{-5} M) og hæmmede væksten ved den højest testede koncentration (5×10^{-5} M).

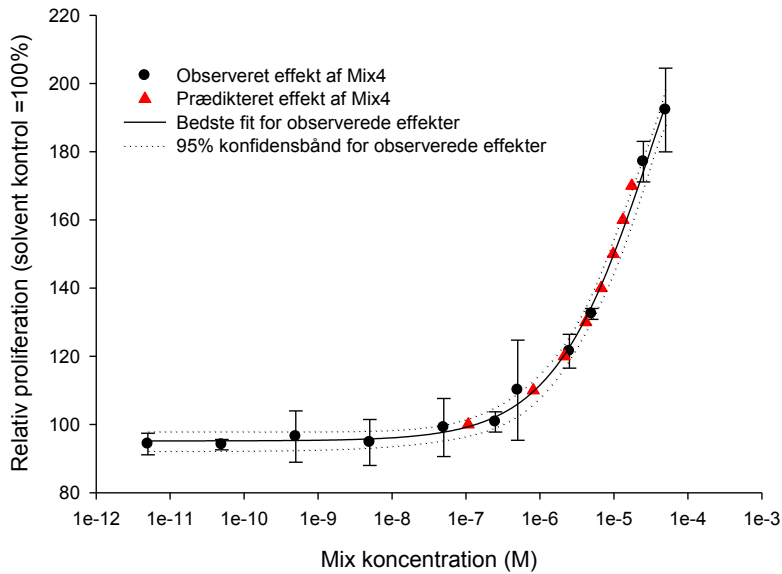
Den kombinerede effekt af Mix5 (terbutylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) blev ligeledes undersøgt for effekter på TH funktion i GH3 celler. Af de fem pesticider i blandingen havde bitertanol ved de første *in vitro* screeninger vist en hæmmende effekt på GH3 cellevæksten, mens de andre komponenter hver især havde udvist stimulerende effekter. Den samlede blandingseffekt af de fem pesticider på cellevæksten viste sig at være toksisk ved den højest testede koncentration ($2,5 \times 10^{-4}$ M) og ikke-signifikant ved 5×10^{-5} M (Fig. 7). Der opstod derfor en

mistanke om, at bitertanol ved de højeste koncentrationer i blandingen, havde en dominerende virkning på den samlede blandingseffekt, idet stoffet blev formodet at hæmme de andre pesticiders stimulerende virkning. Denne mistanke blev understøttet af observationen, at der ved lavere koncentrationer af Mix5 (5×10^{-5} - $2,5 \times 10^{-6}$ M), hvor bitertanols hæmmende effekt var mindre, blev observeret en øget GH3 cellevækst (Fig. 7). For at bekræfte hypotesen om, at bitertanol havde en hæmmende effekt på de øvrige komponenters effekter, testede vi yderligere en blanding uden bitertanol (Mix4: terbuthylazin, propiconazol, cypermethrin og malathion) (Fig. 7 og 8). Ved lavere koncentrationer viste der sig at være fin overensstemmelse mellem effekterne observeret for de to blandinger (Fig. 7). Derimod var effekten af Mix4 ved de højere koncentrationer (svarende til enkeltstof koncentrationer på 1×10^{-5} M- 5×10^{-6} M i blandingen, Fig. 7) større end for tilsvarende effekt-koncentrationer af Mix5, hvilket understøtter vores hypotese om, at bitertanol har haft en hæmmende effekt på de øvrige pesticider i blandingen.



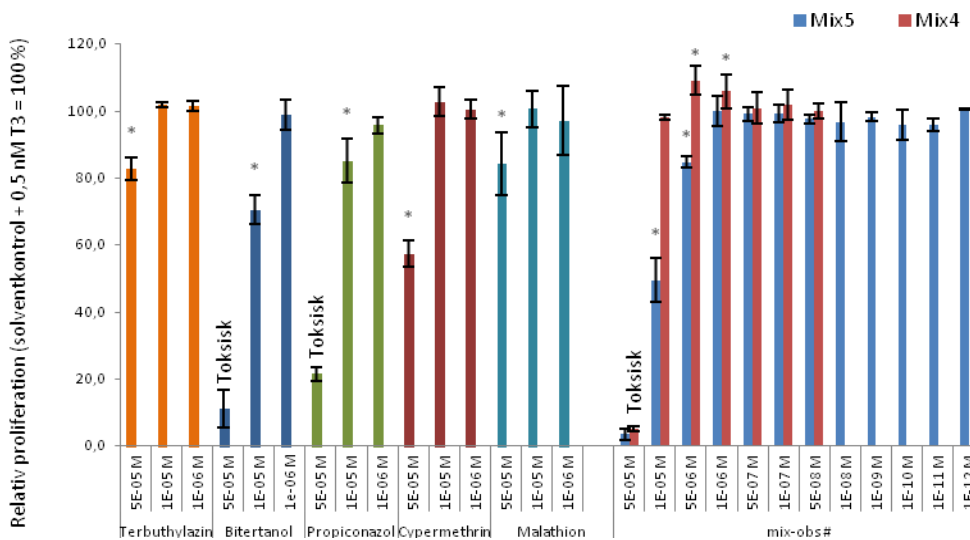
Figur 7. Effekt af pesticiderne og pesticidblandingerne på TH-afhængig GH3 cellevækst. Den relative proliferation angiver vækst af GH3 celler eksponeret for pesticidet relativt til væksten af celler eksponeret for solvent kontrol. # For de to blandinger er angivet koncentrationen af de enkelte komponenter i blandingen. * angiver et respons som er signifikant ($p \leq 0,05$) forskelligt fra respons opnået med solventkontrol.

Ved anvendelse af princippet om koncentrations-addition (CA), blev de prædikerede effekt-koncentrationer (under antagelse af additivitet) af Mix4 estimeret som tidligere beskrevet (Birkhoj et al., 2004; Kruger et al., 2008). Alle prædikerede effekt-koncentrationer lå inden for 95 % konfidensintervallet for de observerede effekter (Fig. 8), hvilket tyder på additive blandingseffekter. Dette blev understøttet af estimerede isobolkoefficienter med værdier omkring 1 (data ikke vist). Der blev ikke prædikerede effekt-koncentrationer for effekter over 170 %, da kun én komponent (malathion) i blandingen havde en effekt herover. For Mix5 blev der ikke evalueret for eventuelle blandingseffekter, da komponenterne i blandingen havde modsatrettede effekter, som tidligere beskrevet.



Figur 8. Effekt af Mix4 (uden bitertanol) på TH-afhængig GH3 cellevækst. Den relative proliferation angiver vækst af GH3 celler eksponeret for pesticidet relativt til væksten af celler eksponeret for solventkontrol.

I tilstedeværelse af naturligt thyroidea hormon (T₃), havde Mix5 en samlet hæmmende virkning på den T₃-inducerede GH3 cellevækst ved koncentrationer af blandingen svarende til enkeltstofkoncentrationer på 1×10^{-5} M og 5×10^{-6} M (Fig. 9). Effekten af Mix5 kan forklares ved den hæmmende effekt, som de to aktive pesticider i blandingen, bitertanol og propiconazol, hver især havde sammen med T₃. For Mix4 (uden bitertanol) sås en signifikant stimulerende effekt ved mixkoncentrationer på $2,5 \times 10^{-5}$ M og 5×10^{-6} M.



Figur 9. Effekter af pesticiderne og pesticidblandinger på T₃-induceret GH3 cellevækst. Den relative proliferation angiver vækst af GH3 celler eksponeret for pesticidet og 0,5 nM T₃ (T₃-EC₅₀) relativt til væksten af celler eksponeret for solvent kontrol + 0,5 nM T₃. # For de to blandinger er angivet koncentrationen af de enkelte komponenter i blandingen. * angiver et respons som er signifikant ($p \leq 0,05$) forskelligt fra respons opnået med solventkontrol + 0,5 nM T₃.

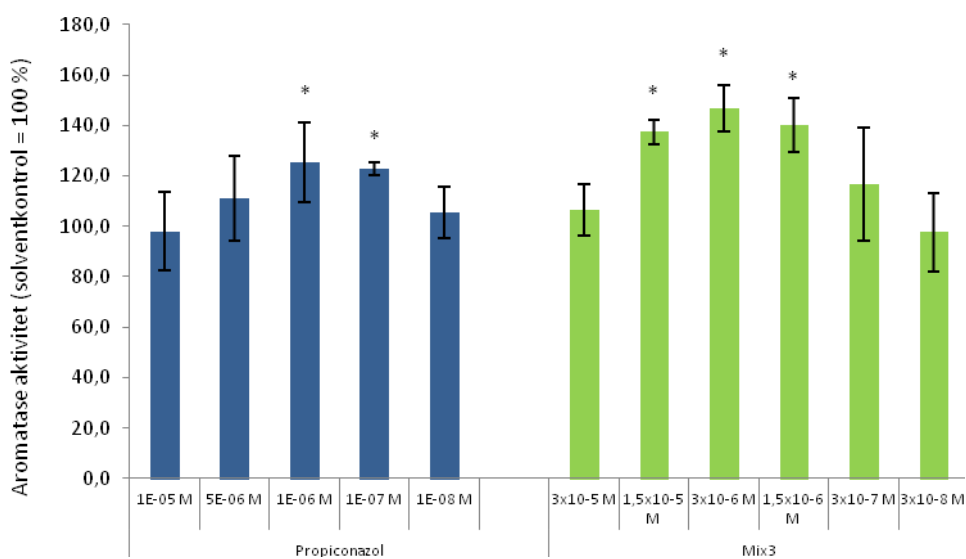
3.1.6 Effekter på aromatase aktivitet

Tre ud af de 14 testede stoffer udviste svage signifikante effekter på aromatase aktiviteten (Tabel 7). Terbuthylazin og prothioconazol opregulerede aromatase aktiviteten signifikant med maksimale effekter på henholdsvis 129 % og 120 % relativt til solventkontrollen. Propiconazol udviste en hæmmende effekt ved den højeste ikke-toksiske koncentration testet (5×10^{-5} M) og opregulerende effekter ved lavere koncentrationer (1×10^{-7} - 1×10^{-6} M) (Tabel 7 og Fig. 10).

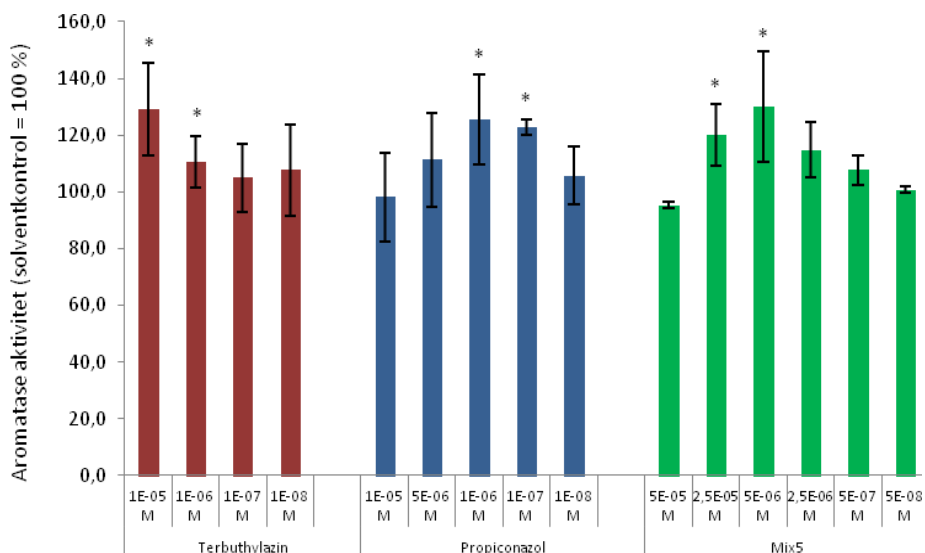
Tabel 7. Effekter af pesticiderne på aromatase aktivitet. Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), LOEC: den laveste testede koncentration som gav et signifikant ($p \leq 0,05$) respons, MOEC: den lavest testede koncentration som gav et maksimalt (ikke-toksisk) respons, -: ingen effekt observeret, ↑: opregulerende effekt, ↓: nedregulerende effekt.

	LOEC (M)	MOEC (M)	% af SC ved MOEC	Cytotoksicitet (M)
Terbuthylazin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	129	-
Propiconazol	1×10^{-7} - 1×10^{-6} (↑)	5×10^{-5} (↓)	(↑) 126 (1×10^{-6} M) (↓) 44 (5×10^{-5} M)	$\geq 1 \times 10^{-4}$
Prothioconazol	1×10^{-5}	1×10^{-5}	120	$\geq 1 \times 10^{-4}$
Mix3	$1,5 \times 10^{-6}$	3×10^{-6}	147	$\geq 1,5 \times 10^{-4}$
Mix5	5×10^{-6}	5×10^{-6}	130	$\geq 2,5 \times 10^{-4}$

Mix3 og Mix5 blev ligeledes undersøgt for effekter på aromatase aktiviteten. For Mix3, indeholdende den aktive komponent propiconazol samt de inaktive komponenter bitertanol og cypermethrin, blev der observeret en signifikant opregulerende effekt i intervallet $1,5 \times 10^{-6}$ - $1,5 \times 10^{-5}$ M med en MOEC på 3×10^{-6} M svarende til en effekt på 147 % i forhold til solventkontrollen (Tabel 7 og Fig. 10). Figur 10 illustrerer effekten af Mix3 og den aktive komponent propiconazol, og som det fremgår af figuren, fulgte effekten af Mix3 det samme mønster som for propiconazol. For Mix5, indeholdende de aktive komponenter propiconazol og terbuthylazin samt de inaktive komponenter bitertanol, cypermethrin og malathion, blev observeret en signifikant opregulerende effekt i intervallet 5×10^{-6} - $2,5 \times 10^{-5}$ M med en MOEC på 5×10^{-6} M svarende til en effekt på 130 % i forhold til solventkontrollen (Tabel 7 og Fig. 11). Figur 11 illustrerer effekten af Mix5 og de aktive komponenter terbuthylazin og propiconazol. Effekten af prothioconazol på aromatase aktiviteten er ikke illustreret, da pesticidet kun udviste en effekt ved én enkelt koncentration testet (1×10^{-5} M).



Figur 10. Effekter af Mix3 og den aktive komponent propiconazol på aromatase aktiviteten. * angiver et respons som er signifikant ($p \leq 0,05$) forskelligt fra respons opnået med solventkontrol.



Figur 11. Effekter af Mix5 og de aktive komponenter terbuthylazin og propiconazol på aromatase aktiviteten. * angiver et respons som er signifikant ($p \leq 0,05$) forskelligt fra respons opnået med solventkontrol.

3.1.7 Effekter på kønshormonsyntesen

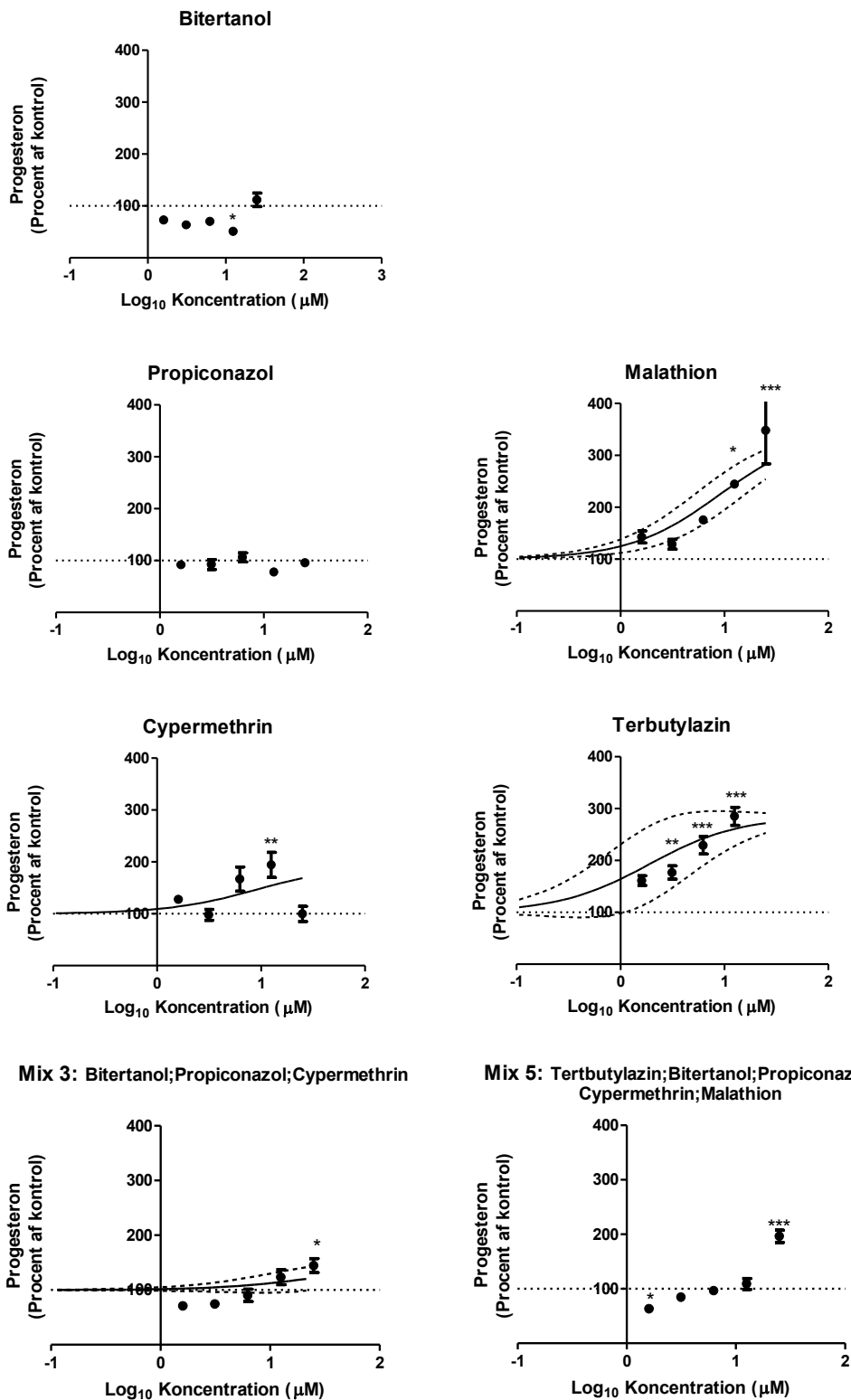
I de følgende tre figurer er vist effekter på kønshormonsyntesen *in vitro* - dvs. på syntesen af progesteron (Fig. 12), testosteron (Fig. 13) og østradiol (Fig. 14) i humane binyrebark cancerceller (H295R assay). Effekterne af Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin), Mix5 (bitertanol, propiconazol, cypermethrin, terbuthylazin og malathion) samt effekter af de enkelte komponenter af Mix5 er vist. Ved modellering af blandingseffekter i H295R assayet er det vores erfaring, at det er nødvendigt at indsamle data for alle enkeltstoffer og blandinger i ét og samme forsøg, for at få den bedste og mest korrekte prædiktation af blandingseffekterne, hvilket er gjort her.

Effekt på progesteron syntese. Cypermethrin, terbuthylazin og malathion forårsagede en forøget syntese af progesteron (Fig. 12). Ligeledes gav også Mix3 (bitertanol, cypermethrin og propiconazol) og Mix5 (bitertanol, cypermethrin, propiconazol, terbuthylazin og malathion) forøget progesterondannelse med den mest markante effekt set for Mix5. Dette skyldes formentlig, at kun cypermethrin var til stede i Mix3, mens både cypermethrin og terbuthylazin var til stede i Mix5.

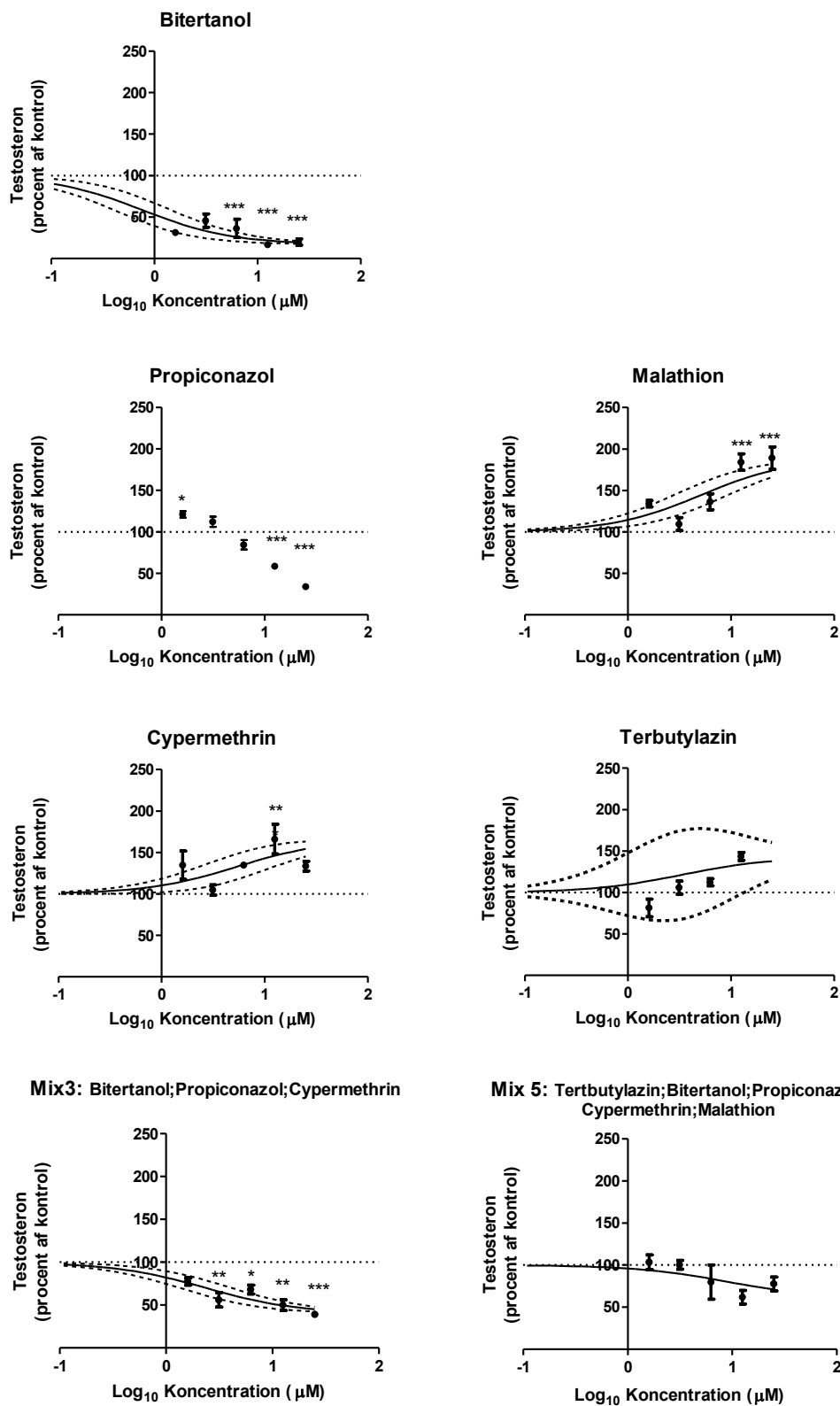
Effekt på testosteron syntese. De to azolfungicider, bitertanol og propiconazol, gav en signifikant hæmning af testosteronproduktionen (Fig. 13). Derimod gav cypermethrin og malathion en signifikant øget testosterondannelse. For terbuthylazin sås en tendens til en øget produktion af testosteron, der dog ikke var statistisk signifikant. Den integrerede effekt af Mix3 (bitertanol, cypermethrin og propiconazol) var en markant reduktion i testosteronproduktionen i overensstemmelse med at to ud af tre stoffer i blandingen havde denne effekt. Den integrerede effekt af Mix5 (bitertanol, cypermethrin, propiconazol, terbuthylazin og malathion) viste derimod ingen signifikante effekter på syntesen af testosteron. Dette er i overensstemmelse med, at Mix5 indeholdt to pesticider, der hæmmede testosteronproduktionen, og to pesticider, der inducerede testosteronproduktionen, og at disse effekter udlignede hinanden.

Effekt på østradiol syntese. Effekten af pesticiderne på syntesen af østradiol fulgte til en vis grad effekten på produktionen af testosteron, idet azolfungiciderne bitertanol og propiconazol gav en markant hæmning af østradiol, hvorimod cypermethrin, malathion og terbuthylazin forårsagede en signifikant stigning i produktionen af østradiol (Fig. 14). Den integrerede effekt af blandingerne viste en signifikant hæmning for Mix3 (bitertanol, cypermethrin og propiconazol) og en signifikant stigning for Mix5 (bitertanol, cypermethrin, propiconazol, terbuthylazin og malathion).

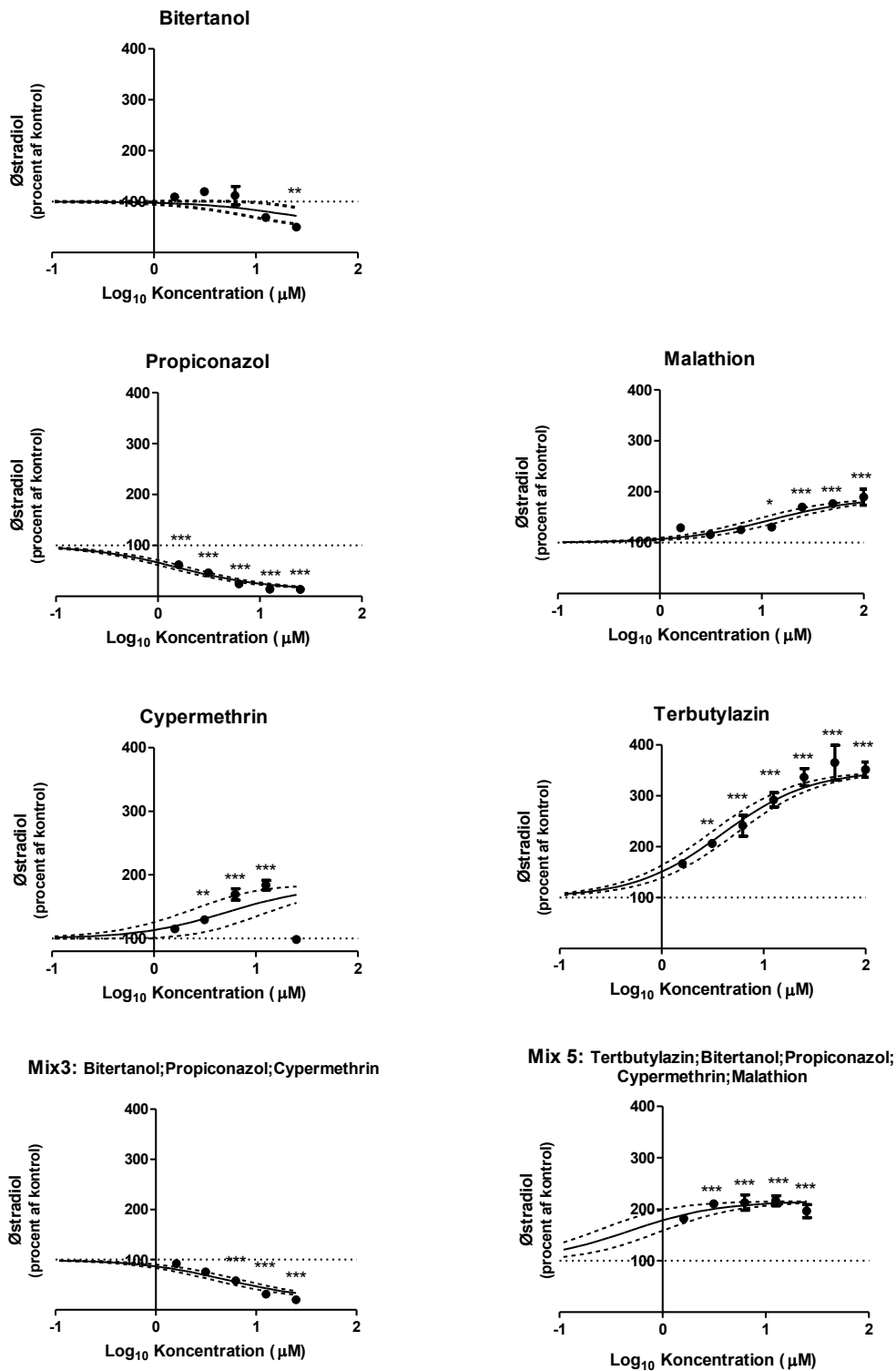
Alt i alt var den mest markante effekt af Mix3 en hæmning af syntese af testosteron og østradiol, mens den mest markante effekt af Mix5 var en stigning i østradiol syntesen men ingen effekt på testosteron niveauet. Dette indikerer, at Mix5 indeholder stoffer, der aktiverer aromatasen (CYP19). I Tabel 8 er givet en opsummering af effekter af pesticiderne og pesticidblandingerne på kønshormonsyntesen.



Figur 12. Syntese af progesteron i H295R celler. Figuren viser effekten af de fem individuelle pesticider; en 1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol og cypermethrin (Mix3) samt en 1:1:1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol, cypermethrin, terbutylazin og malathion (Mix5) på progesteron syntesen i H295R celler. Data er gennemsnit ± SEM fra et repræsentativt forsøg i triplikater af i alt tre uafhængige forsøg. De stiplede linjer svarer til 95 % konfidensintervaller. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.



Figur 13. Syntese af testosteron i H295R celler. Figuren viser effekten af de fem individuelle pesticider, en 1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol og cypermethrin (Mix3) samt en 1:1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol, cypermethrin, terbutylazin og malathion (Mix5) på testosteron syntesen i H295R celler. Data er gennemsnit ± SEM fra et repræsentativt forsøg i triplikater af i alt tre uafhængige forsøg. De stiplede linier svarer til 95 % konfidensintervaller. * p<0,05; ** p<0,01; *** p< 0,001.



Figur 14. Syntese af østradiol i H295R celler. Figuren viser effekten af de fem individuelle pesticider, en 1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol og cypermethrin (Mix3) samt en 1:1:1:1 blanding af bitertanol, propiconazol, cypermethrin, terbutylazin og malathion (Mix5) på østradiol syntesen i H295R celler. Data er gennemsnit \pm SEM fra et repræsentativt forsøg i triplikater af i alt tre uafhængige forsøg. De stiplede linier svarer til 95 % konfidensintervaller. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabel 8. Opsummering af effekter på kønshormonsyntesen i humane H295R celler. Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), -: ingen signifikant ($p \leq 0,05$) effekt observeret, ↓: hæmmende effekt, ↑: stimulerende effekt.

	Progesteron	Testosteron	Østradiol
Bitertanol	-	↓	↓
Cypermethrin	↑	↑	↑
Propiconazol	-	↓	↓
Terbuthylazin	↑	-	↑
Malathion	↑	↑	↑
Mix3	↑	↓	↓
Mix5	↑	-	↑

3.2 QSAR analyser

Alle 13 pesticider og metabolitten ETU blev evalueret i QSAR analyser for teratogen risiko, AR antagonisme, ER α binding og ER agonisme. Bitertanol og propiconazol slog ud som positive for AR antagonisme, hvilket var forventet, da disse stoffer indgår som aktive i træningssættet. Træningssættet er den gruppe af kemikalier, som dannede grundlag for udvikling af QSAR modellen. De øvrige pesticider faldt enten udenfor modellernes domæne eller var negative.

De fem pesticider, udvalgt til *in vivo* rotteforsøgene, blev ligeledes testet i en model for pregnan X receptor (PXR) agonisme i en nylig udviklet QSAR model (Dybdahl et al., 2012). Malathion og cypermethrin slog ud som positive (Tabel 9), dvs. at de blev forudsagt at være PXR agonister (sandsynlighed $>0,70$). Dette indikerer, at stofferne er i stand til at inducere CYP3A4, som er et leverenzym, der metaboliserer mange kemikalier og lægemidler. Terbuthylazin var klart negativ (sandsynlighed $<0,3$), mens bitertanol og propiconazol gav et tvetydigt svar.

Tabel 9. PXR agonisme *in silico*. De fem pesticider, udvalgt til rotteforsøg, blev undersøgt for PXR agonisme.

	PXR agonist sandsynlighed	Evaluering
Malathion	0,70	Positiv
Bitertanol	0,58	-
Terbuthylazin	0,13	Negativ
Propiconazol	0,60	-
Cypermethrin	1,0	Positiv

3.2.1 Opsummering af *in vitro* og *in silico* analyserne

En opssummering af det hormonforstyrrende potentiale *in vitro* og *in silico* af de 13 pesticider og én metabolit er vist i Tabel 10 og 11. Alle 13 pesticider udviste aktivitet i mindst én ud af de seks mammale cellekultur analysemodeller. Derimod viste mancozeb metabolitten (ETU) ingen effekter *in vitro*. Otte ud af de 13 pesticider - samt begge pesticidblandinger (Mix3 og Mix5) - viste en effekt i mere end én ud af de seks *in vitro* analyser, hvilket indikerer et bredere hormonforstyrrende potentiale.

Tabel 10. Opsummering af *in vitro* analyser af pesticider testet alene. Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), ↑: opregulerende effekt, ↓: nedregulerende effekt, -: ingen effekt observeret, ia: ikke analyseret. P: progesteron, Ø: østradiol, T: testosteron, * Denne kolonne angiver antal *in vitro* assays, hvor pesticidet har vist en signifikant effekt relativt til antal *in vitro* assays, hvori pesticidet er testet, ** Propiconazol hæmmede aromatase aktiviteten ved 5×10^{-5} M og inducerede aromatase aktiviteten ved 1×10^{-7} - 1×10^{-6} M, # Positiv for AR antagonisme.

	ER funktion	AR funktion	AhR funktion	TH funktion	Aromatase aktivitet	Kønshormon-syntese	QSAR	Effekt i x/y assays *
MCPA	-	-	↑	-	-	-	-	1/6
Terbuthylazin	↑	-	↑	↑	↑	P↑ og Ø↑	-	5/6
Iodosulfuron-methyl-natrium	-	-	↑	-	-	-	-	1/6
Mesosulfuron-methyl	-	-	↑	-	-	-	-	1/6
Metsulfuron-methyl	-	-	↑	-	-	-	-	1/6
Chlormequat chlorid	-	-	↑	-	-	-	-	1/6
Bitertanol	-	-	↓	↓	-	T↓ og Ø↓	AR #	3/6
Propiconazol	↑	-	↑	↓	↓ og ↑**	T↓ og Ø↓	AR #	5/6
Prothioconazol	↑	-	↓	↑	↑	-	-	4/6
Mancozeb	-	↓	↑	↑	-	-	-	3/6
ETU	-	-	-	-	-	-	-	0/6
Cypermethrin	↑	-	↑	↑	-	P↑ og T↑ og Ø↑	-	4/6
Tau fluvalinat	-	-	↑	↑	-	-	-	2/6
Malathion	↑	-	↑	↑	-	P↑ og T↑ og Ø↑	-	4/6
Mix3	ia	-	ia	ia	↑	P↑ og T↓ og Ø↓	ia	2/3
Mix5	↑	-	↑	↑	↑	P↑ og Ø↑	ia	5/6

Tabel 11. Opsummering af *in vitro* analyser af pesticider testet i tilstedeværelse af potent receptorligand. Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), ↑: opregulerende effekt, ↓: nedregulerende effekt, -: ingen effekt observeret, ia: ikke analyseret, * Denne kolonne angiver antal assays, hvor pesticidet har vist en signifikant effekt relativt til antal assays, hvori pesticidet er testet, **Cypermethrin havde en opregulerende effekt på T3-stimuleret GH3 cellevækst ved 5×10^{-6} - 1×10^{-5} M og en nedregulerende effekt ved 5×10^{-5} M.

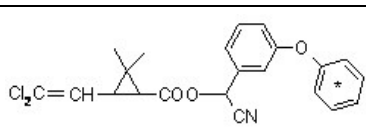
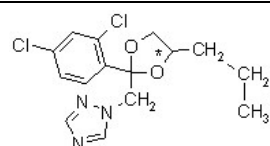
	ER funktion	AR funktion	AhR funktion	TH funktion	Effekt i x/y assays *
MCPA	-	-	↑	-	1/4
Terbuthylazin	↑	-	↑	-	2/4
Iodosulfuron-methyl-natrium	-	-	↑	-	1/4
Mesosulfuron-methyl	-	-	↑	-	1/4
Metsulfuron-methyl	-	-	-	-	0/4
Chlormequat chlorid	-	-	↑	-	1/4
Bitertanol	-	↓	↓	↓	3/4
Propiconazol	-	↓	↓	↓	3/4
Prothioconazol	-	-	↓	↓	2/4
Mancozeb	-	↓	-	-	1/4
ETU	-	-	-	-	0/4
Cypermethrin	-	-	↓	↓ og ↑**	2/4
Tau fluvalinat	-	-	↑	↓	2/4
Malathion	-	-	-	-	0/4
Mix3	ia	↓	ia	ia	1/1
Mix5	-	↓	-	↑	2/4

3.3 Transport over human placenta

3.3.1 Valg af pesticider til analyser af transport over human placenta

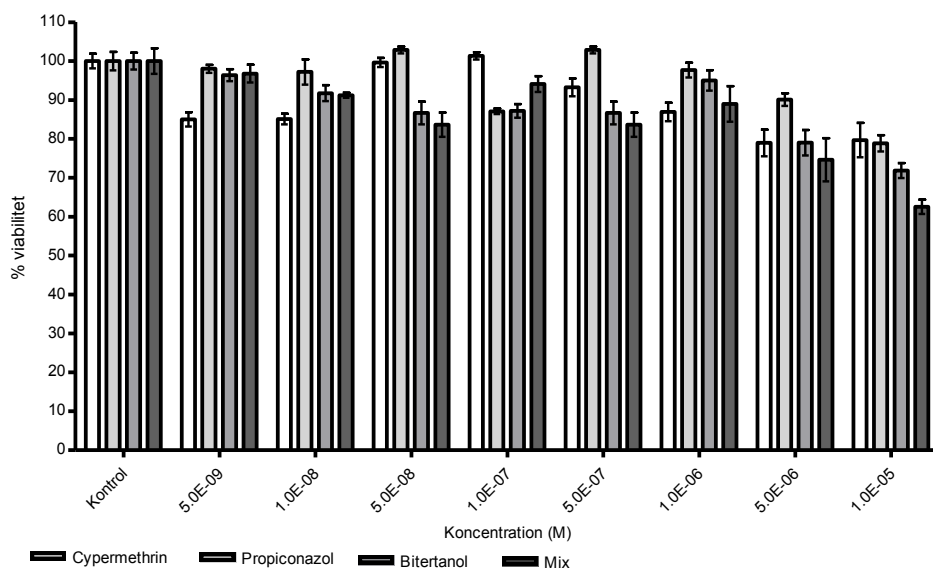
De tre pesticider, som på baggrund af data fra *in vitro* analyserne blev udvalgt til at indgå i Mix3 (cypermethrin, propiconazol og bitertanol i forholdet 1:1:1), blev studeret *ex vivo* i en placenta perfusionsmodel og *in vitro* i et BeWo celletransport assay. Cypermethrin og propiconazol blev i placenta transportforsøgene studeret som radioaktivt-mærkede enkeltstoffer (Tabel 12) for at kunne kvantificere disse ved scintillationstælling. I nedenstående er resultater fra soloforsøg og blandingsforsøg illustreret i de samme figurer for at kunne estimere eventuelle blandingseffekter.

Tabel 12. ¹⁴C-mærkede pesticider anvendt i analyser af transport over human placenta

Kemisk struktur	Kemisk forbindelse
	Cypermethrin (benzyl-7- ¹⁴ C)
	Propiconazol, [dioxolane-4- ¹⁴ C], CC323

3.3.1.1 Cytotoksicitets test

MTT assayet, anvendt i BeWo celle transportmodellen, viste ingen cytotoksisk effekt af cypermethrin, propiconazol, bitertanol eller blandingen af de tre pesticider (Mix3) i koncentrationer op til 1×10^{-5} M (efter kriteriet, at viabiliteten skal være sænket til 50 % for at stoffet kan siges at være cytotoksisk, se Fig. 15).



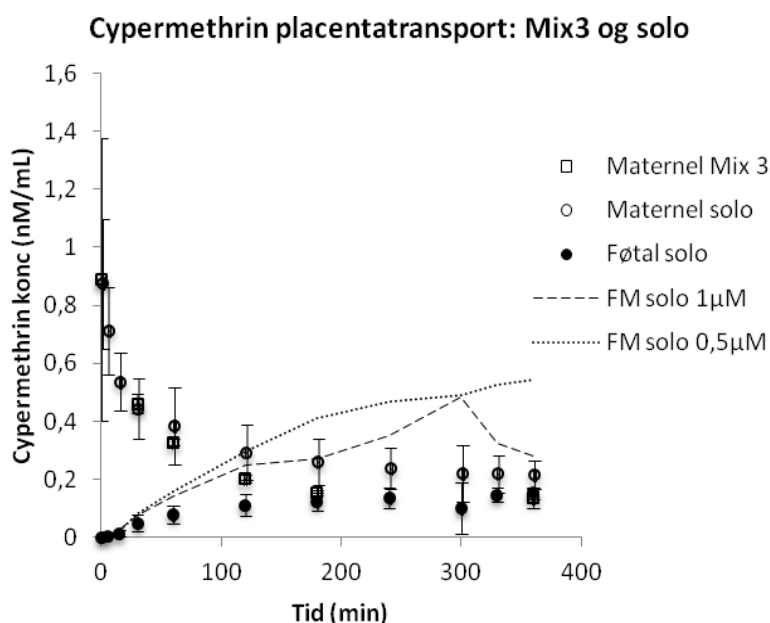
Figur 15. Cytotoksicitet af cypermethrin, propiconazol, bitertanol og Mix3 på BeWo celle monolag, testet ved MTT assay.

3.3.2 Cypermethrin

3.3.2.1 Human placenta perfusion

Bindingsforsøg med ^{14}C -mærket cypermethrin (benzyl-7- ^{14}C) viste, at cypermethrin binder en del til perfusionssystemet og forklarede derfor et recovery på kun 77 %.

Fire humane placenta perfusioner med $0,5 \mu\text{M}$ ^{14}C -cypermethrin og tre perfusioner med $1 \mu\text{M}$ ^{14}C -cypermethrin blev gennemført. Føtal-maternel (FM) ratioer, som angiver forholdet mellem stofkoncentrationen i det føtale system relativt til koncentrationen i det maternelle system, er illustreret i figur 16. Disse viste en koncentrationsuafhængig transplacental transport af ^{14}C -mærket cypermethrin over de seks timer lange perfusioner. Cypermethrin blev observeret i det føtale kredsløb efter 30 minutter, med en FM-ratio på ca. 0,5 efter seks timers perfusion. Stoffet passerer derfor ikke ved fri diffusion gennem den humane placenta. Dvs. transporten var langsommere end for passiv diffusion ($\text{FM}_{120} 0,35 \pm 0,16$). Da analyse af føtale prøver af Mix3 (cypermethrin, propiconazol og bitertanol) ikke var mulig, grundet koagulering af proteiner i prøverne under den analytiske ekstraktion, er data for disse ikke tilgængelige, og en eventuel effekt af blandingen kunne derfor ikke estimeres.

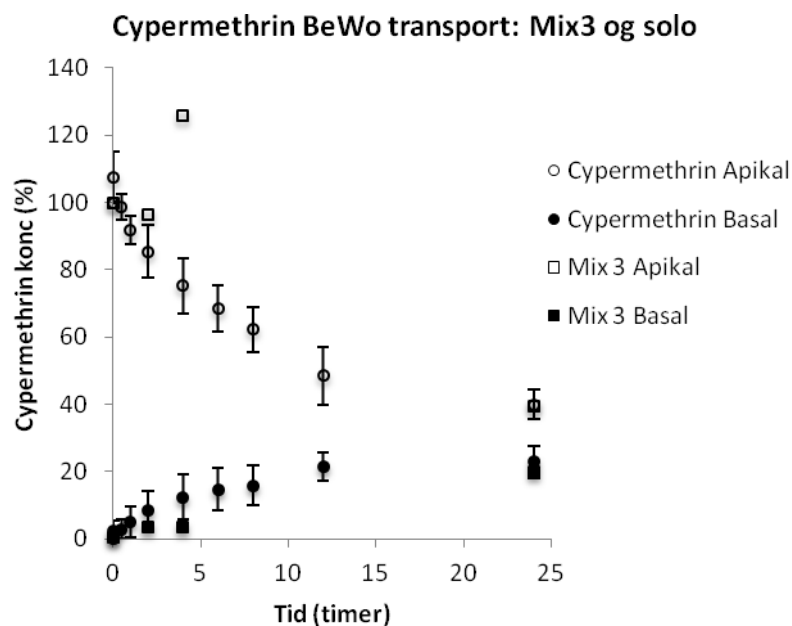


Figur 16. Placental transport af cypermethrin studeret solo i en koncentration på $1 \mu\text{M}$ ($n=3$) og $0,5 \mu\text{M}$ ($n=4$), og maternel koncentration af cypermethrin i Mix3 ($n=3$) i et seks timers perfusionsstudie. FM-ratioen angiver forholdet mellem den føtale koncentration og den maternelle koncentration.

3.3.2.2 BeWo celle transport

Indledningsvise bindingsforsøg med ikke-radioaktivt mærket cypermethrin viste, at stoffet binder stærkere til polycarbonat Transwell filtre end til polyesther (PE) Transwell filtre. Derfor blev der brugt PE filtre til BeWo celletransport studierne.

Der blev udført tre BeWo cellestudier (begge $n=6$) med ^{14}C -cypermethrin. Disse viste transport over BeWo celle monolag (Fig. 17). Efter 24 timer var transporten ens for cypermethrin testet solo og i blanding (Mix3). Der blev således ikke observeret nogen effekt af blandingen ved passage af cypermethrin over BeWo celle monolaget (basolateral/apikal (B/A ratio), ingen forskel i B/A ratio for samme stof testet solo og i blanding: $p>0,7$).



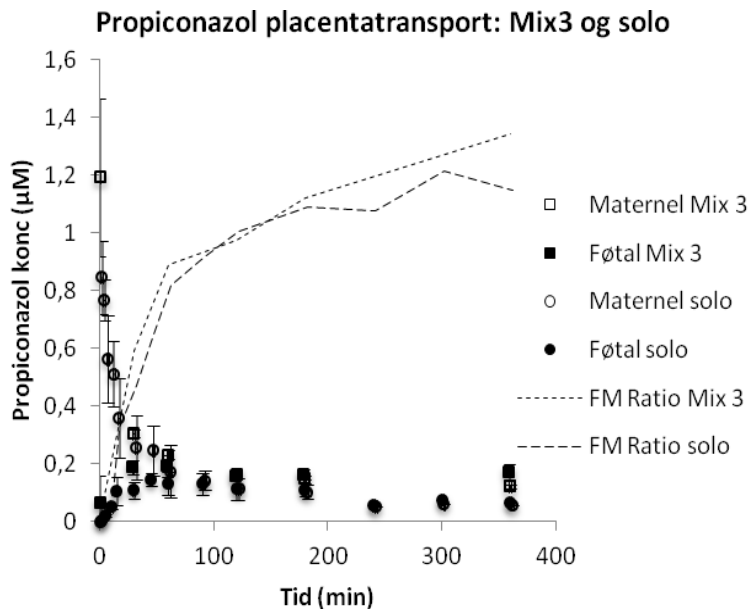
Figur 17. Transport af cypermethrin over BeWo celle monolag over 24 timer. Apikal svarer til maternel side og basal svarer til føtal side. Apikal side blev tilsat $1 \mu\text{M}$ af hvert stof. *Firkanter* illustrerer cypermethrin data fra transportforsøg med Mix3 (cypermethrin, propiconazol og bitertanol 1:1:1), hvor prøver fra tre brønde er poollet inden analyse (derfor ingen standardafvigelse). *Cirkler* illustrerer data fra transportforsøg i seks brønde med cypermethrin alene.

3.3.3 Propiconazol

3.3.3.1 Human placenta perfusion

Der blev indledningsvist udført en perfusion med umærket propiconazol, og koncentrationen i perfuratet blev bestemt. Denne perfusion blev brugt til at bestemme koncentrationen i perfusionsmedierne i forhold til transport og binding til placentavæv og metabolisme. Da der ikke blev fundet nogle metabolitter i denne perfusion, blev der indkøbt ^{14}C -mærket propiconazol hos Izotop (mærket i dioxolanringen, Tabel 12). Resten af perfusionerne blev lavet med denne ^{14}C -mærkede propiconazol. Fire perfusioner med $1 \mu\text{M}$ ^{14}C -mærket propiconazol blev gennemført (Fig. 18).

Transporten var meget hurtig og ligevægt sås efter ca. én times perfusion, hvilket svarer til raten for fri diffusion. Recovery efter seks timers perfusion var ca. 55 %, så næsten halvdelen af stoffet blev altså bundet i modellen i løbet af de seks timer. Denne binding var sandsynligvis også grunden til, at koncentrationen i både det maternelle og føtale kammer faldt løbende efter ligevægt var opstået i de to kredsløb. Der var ikke signifikant forskel på transporten af propiconazol i soloforsøg og i Mix3 blandingsforsøg (F/M ratio, $p > 0,06$).

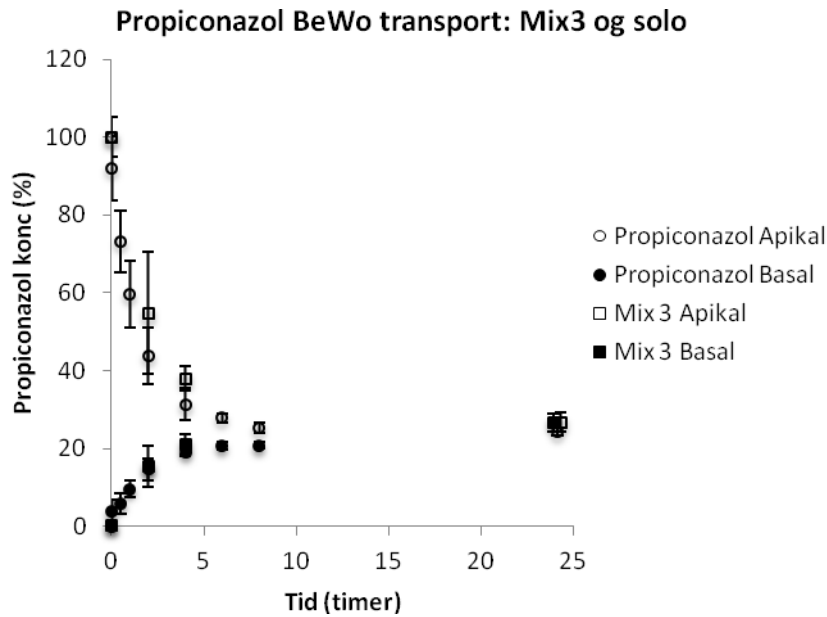


Figur 18. Placental transport af propiconazol studeret solo (n=4) og i Mix3 (n=3) i seks timer. FM-ratioen angiver forholdet mellem den føtale koncentration og den materielle koncentration. FM-ratioen var ens for de to studier og viste en transport svarende til fri diffusion. Grundet høj binding af propiconazol til systemet, sås et startfald i maternel koncentration i den første times perfusion.

3.3.3.2 BeWo celle transport

Der blev udført et forsøg med 1 µM ¹⁴C-propiconazol (n=6/blanke n=3) (Fig. 19). I BeWo celle transport studiet sås også en meget hurtig transport, som stemmer overens med placenta perfusionsdata, hvilket tyder på fri diffusion.

Recovery i BeWo cellestudierne var på ca. 87 %, men da modellen var mindre og stoffet ikke blev fundet vist transporteret rundt i systemet i slanger, stemmer dette fint overens med den lavere recovery i placenta perfusionerne. Der var ikke forskel i transport over BeWo celle monolag af propiconazol for pesticidet studeret i soloforsøgene og i Mix3 blandingsforsøgene (B/A ratio, $p > 0,4$).

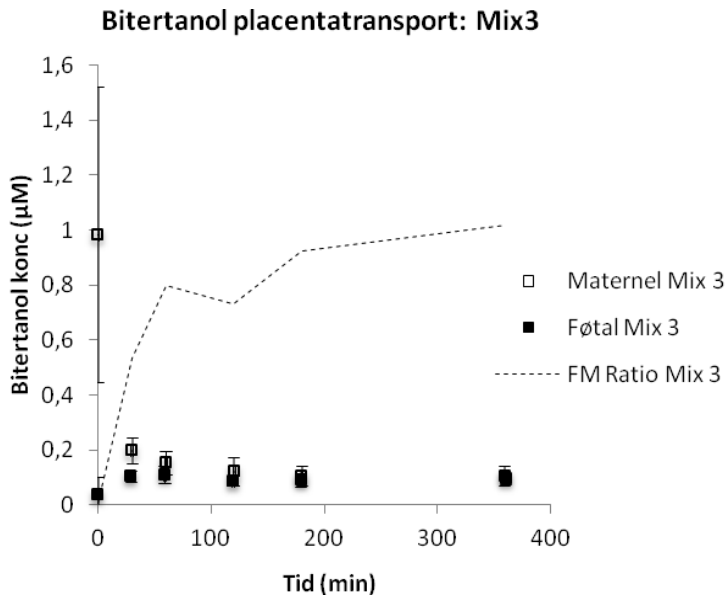


Figur 19. Transport af propiconazol over BeWo celle monolag over 24 timer. Apikal svarer til maternel side og basal svarer til føtal side. Apikal side blev tilsat 1 μ M af hvert stof. *Firkanter* illustrerer propiconazol data fra transportforsøg med Mix3 (cypermethrin, propiconazol og bitertanol 1:1:1), prøver fra tre brønde. *Cirkler* illustrerer data fra transportforsøg i seks brønde med propiconazol alene.

3.3.4 Bitertanol

3.3.4.1 Human placenta perfusion

Der blev udført to perfusioner med bitertanol, hvor stoffet ikke kunne genfindes i prøverne. Der kan være flere forklaringer herpå, fx for stor fortynding af det tilsatte grundet regnefejl. For bitertanol i blanding (Mix3) sås en placental transport meget lig propiconazols, hvilket tyder på fri diffusion over placenta (Fig. 20). Da transport af bitertanol udviste denne hurtige transport i blanding, anses det som sandsynligt, at der, ligesom for propiconazol, ikke var nogen blandingseffekter.

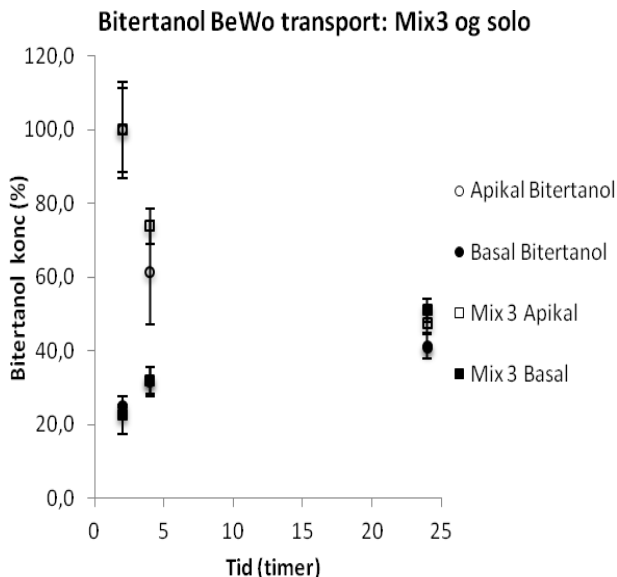


Figur 20. Placental transport af bitertanol i Mix3 (n=3) ved 6 timers perfusion. Transportraten var høj, hvilket tyder på fri diffusion. FM-ratioen angiver forholdet mellem den føtale koncentration og den materielle koncentration.

3.3.4.2 BeWo celle transport

Der blev udført et BeWo celle transportstudie (n=6) med bitertanol testet alene og et studie af bitertanol i blanding (Mix3) (Fig. 21). I BeWo celle transportstudierne sås en hurtig transport over celledaget, hvilket svarer til fri diffusion, som også antydet i placenta perfusionsstudiet.

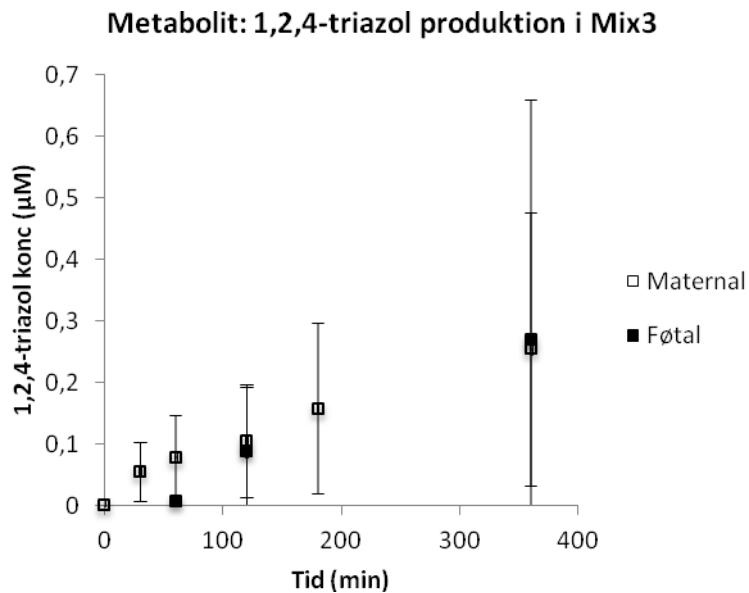
Der blev ikke observeret en forskel på transport af bitertanol i blanding og bitertanol alene i BeWo cellemonolag transport assayet (B/A ratio, $p > 0,3$), hvilket styrker hypotesen om, at bitertanol ikke forårsager nogen blandingseffekter ved transport over placenta.



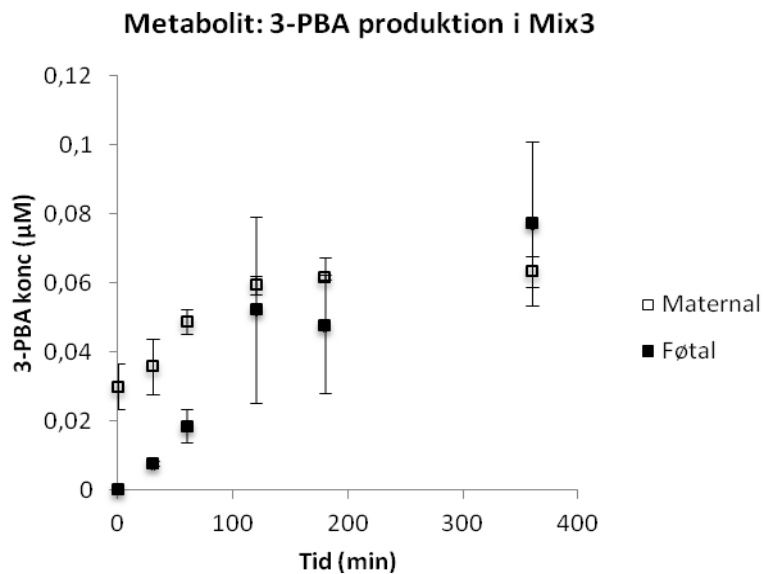
Figur 21. Transport af bitertanol over BeWo celle monolag over 24 timer. Apikal svarer til materiel side og basal svarer til føtal side. Apikal side blev tilsat 1 µM af hvert stof. *Firkanter* illustrerer bitertanol data fra transportforsøg med Mix3 (cypermethrin, propiconazol og bitertanol 1:1:1), prøver fra 3 brønde. *Cirkler* illustrerer data fra transportforsøg i seks brønde med bitertanol alene.

3.3.5 Human placenta perfusion: pesticid metabolitter i Mix3

Metabolitterne 1,2,4-triazol (nedbrydningsprodukt af propiconazol og bitertanol) og 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) blev fundet i prøverne fra placenta perfusionerne med Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin). Niveauet af disse metabolitter steg med tid i perfusionerne på både føtal og maternel side (Fig. 22 og 23).



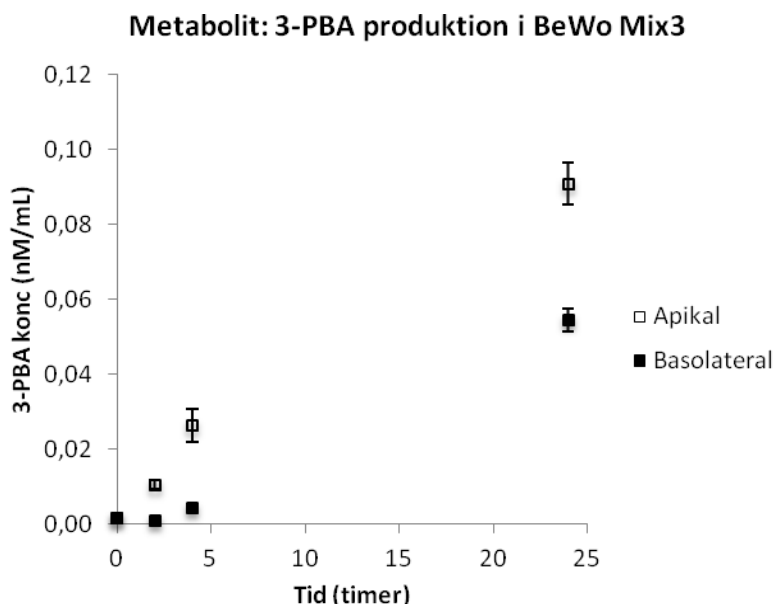
Figur 22. Indhold af 1,2,4-triazol (nedbrydningsprodukt af propiconazol og bitertanol) i prøver fra 6 timers placenta perfusion af Mix3, n=3 (1 µM af hhv. cypermethrin, propiconazol og bitertanol).



Figur 23. Indhold af 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) i prøver fra 6 timers placenta perfusion af Mix3, n=3 (1 µM af hhv. cypermethrin, propiconazol og bitertanol).

3.3.5.1 BeWo celle transport: pesticid metabolitter i Mix3

Metabolitten 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) blev fundet i prøverne fra BeWo cellemonolag transportforsøg med Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin). Niveaue af 3-PBA steg med tid på både apikal og basolateral side i 24 timers forsøg (Fig. 24) i samme størrelsesorden som ved seks timers placenta perfusion. Denne metabolit dannes af trophoblastcellelaget i placenta.



Figur 24. Indhold af 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) i prøver fra 24 timers BeWo celle monolag transportstudie af Mix3, n=3 (1 μ M af hhv. cypermethrin, propiconazol og bitertanol). Koncentrationen af 3-PBA steg på basolateral og apikal side igennem hele studiet.

3.3.6 Opsummering af analyser af transport af pesticider over human placenta

Den humane placenta perfusionsmodel viste overførsel af alle de tre undersøgte pesticider (bitertanol, propiconazol og cypermethrin) *ex vivo*: propiconazol og bitertanol ved fri diffusion med samme rate som kontrolstoffet antipyrin, og cypermethrin ved en lidt langsommere overførselsrate, som antyder aktiv transport. Ved perfusion af Mix3 sås ingen blandingseffekter.

I BeWo celled modellen blev ligeledes observeret en overførsel af de tre pesticider fra det materielle til det føtale kredsløb, med hurtig overførsel af propiconazol og bitertanol og lidt langsommere overførselsrate af cypermethrin. Som observeret for perfusionsmodellen, udviste Mix3 ingen blandingseffekter i BeWo *in vitro* forsøgene.

De to placenta transportmodeller viste en betydelig metabolisme af pesticiderne. Metabolitterne 1,2,4-triazol (nedbrydningsprodukt af propiconazol og bitertanol) og 3-PBA (nedbrydningsprodukt af cypermethrin) blev fundet med stigende koncentration over tid i prøverne fra placenta perfusionerne af pesticidblandingen. 3-PBA blev ligeledes fundet på basolateral og apikal side i BeWo transportforsøgene. Dette viser, at placenta delvist metaboliserer de tre undersøgte pesticider til stoffer, der kan have andre egenskaber end det originale stof. Både mødre og fostre udsættes for disse metabolitter.

3.4 *In vivo* rotte pesticideksponeringer

3.4.1 Valg af pesticiddoser og design af *in vivo* forsøg

Det var fra projektstart besluttet, at der skulle udføres et forsøg, hvor drægtige rotter blev doseret fra GD7 til GD21, hvorefter fostrene ville blive udtaget ved kejsersnit lige inden forventet fødsel. Rottemodellen har specielt fokus på androgene effekter. Fosterperioden er den optimale periode for at undersøge effekter på specielt kønshormonsyntese og effekter på mandlige kønshormoner.

For alle fem pesticider blev Draft Assessment Reports gennemgået. NOAELs (no observed adverse effect levels) og LOAELs (lowest observed adverse effect levels) fra specielt 2. og 3. generationsforsøg og ”developmental toxicity” forsøg i rotter, blev noteret. Der blev lagt vægt på at vælge doser af blandingerne, som ikke ville forårsage nogen maternal toksicitet.

På baggrund af analysen blev valgt følgende doser:

- Mix3: 3, 9, 30 mg/kg (1, 3 og 10 mg/kg af hvert enkeltstof)
- Mix5: 5, 15, 50 mg/kg (1, 3 og 10 mg/kg af hvert enkeltstof)

3.4.2 Drægtighedsparametre

Der var ingen effekter på mødrenes kropsvægt eller den justerede kropsvægt, som er legemsvægten af moderen minus vægten af uterus med fostre, moderkagen og væsker. Antallet af implantationer og levende fostre samt % postimplantationstab og % hanner per kuld var upåvirket af prænatal pesticideksponering (Tabel 13).

Tabel 13 Drægtighedsdata, føtal legemsvægt og AGD. Resultaterne er vist som middelværdi + spredning af kuldgennemsnittet.

GD21 kejsersnit	Kontrol	Mix3-3	Mix3-9	Mix3-30	Mix5-5	Mix5-15	Mix5-50
Antal unger	11	12	11	12	12	10	12
Legemsvægt, mødre	315.0+18.7	314.8+12.7	311.7+12.6	303.0+16.1	310.8+16.0	321.7+18.6	316+16.4
Justeret legemsvægt, mødre	243.7+13.2	246.5+14.1	246.4+12.8	245.6+11.7	247.5+10.2	249.9+18.2	251.3+9.6
Antal implantationer	12.8+1.2	13.3+1.2	12.3+1.3	11.6+2.1	12.5+1.9	13.0+0.9	13.1+1.4
Antal fostre	12.5+1.3	12.3+2.0	11.9+1.7	10.5+3	11.1+2.6	12.6+1.2	12.2+2.2
% postimplantationstab	2.1+3.6	8.6+10.6	2.5+6.2	11.0+14.8	10.6+20.3	3.1+4.1	6.8+14.1
% hanner	45.1+14.2	49.9+10.2	50.0+6.9	45.4+22.6	53.9+10.7	52.0+11.2	43.7+13.1
Legemsvægt, hanner	3,74+0.38	3,63+0.52	3,52+0.34	3,52+0.30	3,80+0.25	3,91+0.34	3,62+0.24
Legemsvægt, hunner	3,56+0.36	3,49+0.42	3,39+0.33	3,44+0.34	3,59+0.31	3,67+0.27	3,40+0.19
AGD, hanner (enhed)	21,40+0.79	20,76+1.39	21,17+0.78	21,56+0.63	21,35+0.96	21,47+0.82	21,02+1.25
AGD, hunner (enhed)	11,58+0.72	11,58+0.85	11,64+0.80	11,46+0.42	11,68+0.71	11,56+0.56	11,16+0.55

3.4.3 Anogenital afstand (AGD) og føtal legemsvægt

Den anogenitale afstand (AGD) i afkom af begge køn var upåvirket som følge af eksponeringen. AGD blev analyseret både med og uden kubikroden af kropsvægten som kovariat. Dette blev gjort for at tage hensyn til, at længden af AGD ved fødslen kan påvirkes af størrelsen af afkom, og at AGD er en endimensionel måling (modsat kropsvægten, som er en tredimensionel måling). Vægten af han- og hunfostre var omkring 4-5 % lavere i grupper doseret med de højeste doser af de to pesticidblandinger, dvs. 30 mg/kg Mix3 og 50 mg/kg Mix5, men ingen statistisk signifikant effekt blev set (Tabel 13).

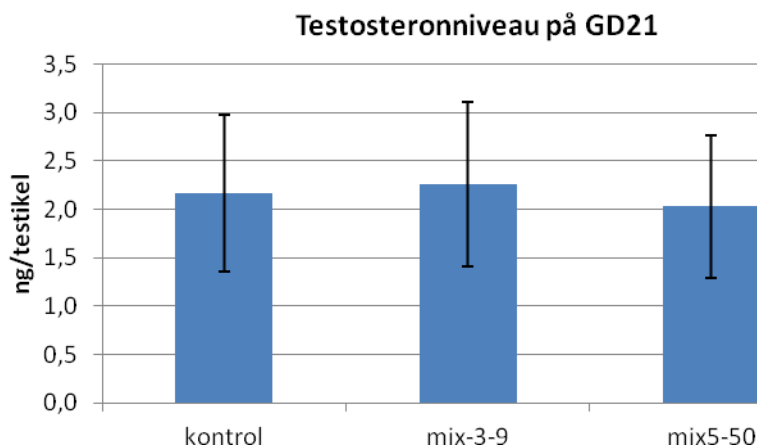
3.4.4 Hormonmålinger

3.4.4.1 Mødre

Niveauerne af progesteron, østradiol og T4 blev målt i mødrenes blod GD21. Der var ingen signifikante effekter på progesteron og østradiol, men en signifikant stigning i T4 niveauerne blev observeret hos mødrene i de to højeste dosisgrupper af Mix5 (15 mg/kg og 50 mg/kg) (data ikke vist).

3.4.4.2 Fostre

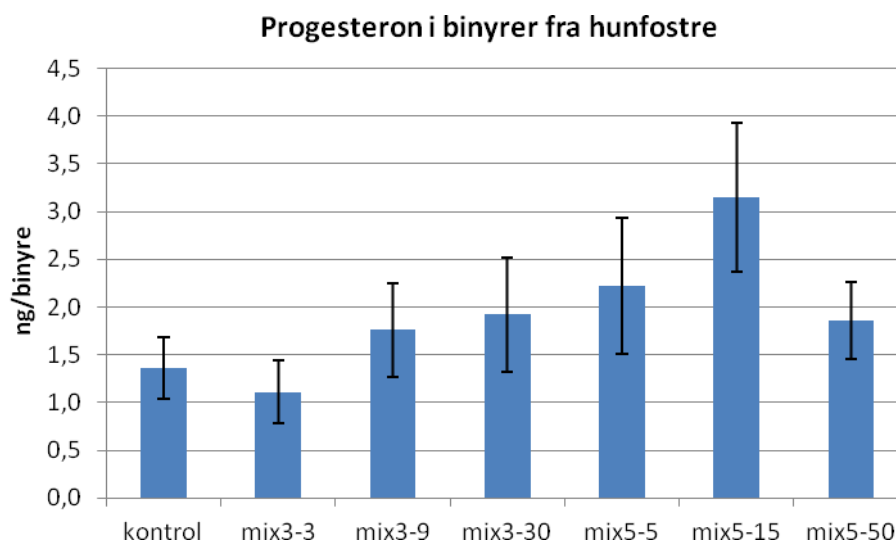
Testosteronniveauer i testikler blev målt på to hanfostre fra hvert kuld (GD21 i drægtighedsperioden) doserede med Mix3 (9 mg/kg) og Mix5 (50 mg/kg). Ingen effekter blev fundet (Fig. 25).



Figur 25. Testosteronniveau i testikler, middelværdi ± spredning (n=20).

Testikler (n=20) inkuberet *ex vivo* i tre timer gav den forventede produktion af testosteron i den positive kontrol – dvs. analysen levede op til vores kvalitetscheck - men der var igen ingen effekt af behandlingerne (data ikke vist).

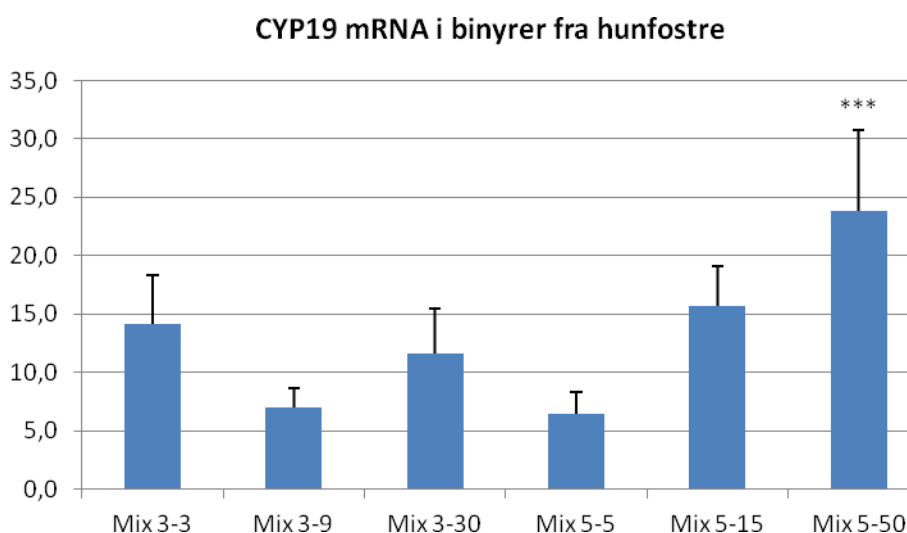
Østradiol blev målt i ovarier (n=10) fra hunner, og der var en tendens til øget niveau af østradiol med Mix3 og Mix5, men ingen signifikante effekter. Niveauerne lå generelt tæt på detektionsgrænsen for analysen. Progesteron i hunnernes binyrer (n=10-13) blev kvantificeret, og igen var der en tendens til stigning med Mix5, men ingen signifikans (Fig. 26). Cortikosteron og ACTH (adrenocortikotrop hormon) blev analyseret i hunnernes blod og ingen effekt blev fundet (data ikke vist).



Figur 26. Drægtige rotter blev eksponeret til Mix3 og Mix5 fra GD7 til GD21. Doserne var 3, 9 og 30 mg/kg/dag for Mix3 og 5, 15 og 50 mg/kg/dag for Mix5. Fostrene blev udtaget ved kejsersnit. Binyrerne fra hunnerne blev udtaget, steroider blev ekstraheret, og progesteron blev analyseret i vævet. Data er gennemsnit ± SEM for n=10-13.

3.4.5 Genekspression

Genekspression blev undersøgt i ovarier og binyrer fra hunnerne (n=10-12). For første gang nogensinde har vi analyseret genekspression i binyrerne, hvor der også produceres kønshormoner. Vi fandt en højsignifikant effekt på CYP19 (aromatasen) af Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) givet i en dosis på 50 mg/kg/dag (Fig. 27). Der var ingen effekter af nogen af pesticidblandingerne på mRNA af benzodiazepin receptoren (Brzp), CYP450sc, CYP17 eller Star, der alle er proteiner involveret i steroidsyntesen. I ovarierne blev ingen effekt fundet på ekspressionen af IGF-1, ER α , eller ComplC3 mRNA (data ikke vist). Generelt er østrogenproduktion i ovarier meget lav i rotte fostre.



Figur 27. Drægtige rotter blev eksponeret til Mix3 og Mix5 fra GD7 til GD21. Doserne var 3, 9 og 30 mg/kg/dag for Mix3 og 5, 15 og 50 mg/kg/dag for Mix5. Fostrene blev udtaget ved kejsersnit. Binyrer fra rottehunfostre blev udtaget på GD21, mRNA isoleret og QRT-PCR blev kørt for CYP19 (aromatasen). Data er gennemsnit ± SEM for n=10-12. Kontrollen sat til 1,0 og værdierne vist i figuren er givet relativt til kontrollen, *** p<0,001.

3.4.6 Histopatologi på testikler

Der blev ikke observeret dosisrelaterede ændringer i testikelhistopatologi. Testikler fra fostre blev evalueret af en patolog blændet med hensyn til dosisgrupper. Der blev vurderet tilstedeværelse af de følgende parametre, der vides at være påvirkelige af visse phthalater: Tilstedeværelse af multinukleære gonocytter, gruppering af gonocytter, øget antal af gonocytter, ændret morfologi af Leydig celler, gruppering af Leydig celler, Leydig celle hyperplasi og desorganisering af strukturen af sædstreng eller interstitialområdet. Kun ét dyr (doseret med 3 mg/kg/dag Mix3) havde en multinukleær gonocyt, og to andre dyr (doseret med henholdsvis 3 mg/kg/dag Mix3 og 50 mg/kg/dag Mix5) havde binukleære gonocytter. Flere dyr blev noteret som havende desorganisering af interstitialområdet. For testikler fra rottefostre eksponeret for visse phthalater er det set, at opdelingen mellem interstitialområde og sædstreng ikke er komplet (Fisher et al., 2003; Borch et al., 2005), men lettere tegn på desorganisering kan også være normalt forekommende og skyldes, at snittet strejfer en sædstreng eller et kar. Fundene af let desorganisering i dette studie antages ikke at være dosis-relaterede, da de blev observeret i alle dosisgrupper inklusive kontroller, og da der ikke var tegn på dosis-respons-sammenhæng (data ikke vist).

3.4.7 Pesticidanalyser i urin og fostervand fra rotter

3.4.7.1 Analysemetodernes følsomhed

Analysemetoderne, for bestemmelse af pesticider og metabolitter i humane placentafor søg samt i fostervand og urin fra rotter, er valideret, og de følgende parametre er undersøgt: linearitet, genfindning og detektionsgrænse.

Linearitet blev undersøgt i koncentrationsområdet 1-100 ng/mL. For alle stoffer var regressionskoefficienten (r^2) >0,99. I de tilfælde, hvor koncentrationen af et eller flere stoffer i prøverne oversteg den højeste standard, blev prøven fortyndet.

Genfindning af stofferne i rotte fostervand, human placenta- og BeWo celleforsøg blev undersøgt ved at tilsætte stofferne og en isotop-mærket standard til kaninserum. Genfindning af stofferne i rotte urinprøver blev undersøgt ved at tilsætte stofferne og isotop-mærket standard til rester af prøver fra kontrolrotter fra *in vivo* forsøget.

Genfindinger og detektionsgrænser for stofferne i kaninserum og rotteurin er opsummeret i henholdsvis Tabel 14 og 15. Cypermethrin blev ikke analyseret i rotte urinprøver, da stoffet forventedes at blive helt metaboliseret til 3-PBA.

Tabel 14. Genfindingsprocent af de analyserede stoffer i kaninserum og rotteurin - i.a.: ikke analyseret, RSD %: relativ standard afvigelse.

Stof	Genfindings % (±RSD %) i serum	Genfindings % (±RSD %) i urin
Cypermethrin	93,4 (±7,5)	i.a.
3-PBA	106,5 (±2,2)	114,6 (±9,3)
Bitertanol	96,5 (±9,1)	74,3 (±6,4)
Propiconazol	105,5 (±1,9)	152,6 (±1,7)
Terbuthylazin	103,2 (±4,1)	113,4 (±15,3)
Desethylterbuthylazin	79,9 (±6,2)	84,5 (±13,7)
2-Hydroxyterbuthylazin	91,7 (±6,3)	136,2 (±16,4)
Malathion dicarboxylsyre	19,9 (±10,7)	22,3 (±5,4)

Table 15. Detektionsgrænser af de analyserede stoffer i kaninserum og rotteurin- i.a.: ikke analyseret.

Stof	Detektionsgrænse i serum (ng/mL)	Detektionsgrænse i urin (ng/mL)
Cypermethrin	0,09	i.a.
3-PBA	0,60	0,05
Bitertanol	0,72	0,03
Propiconazol	0,62	0,03
Terbuthylazin	0,05	0,004
Desethylterbuthylazin	0,21	0,02
2-Hydroxyterbuthylazin	0,12	0,002
Malathion dicarboxylsyre	0,35	0,16

3.4.7.2 Pesticider og metabolitter i fostervand og urin fra rotter

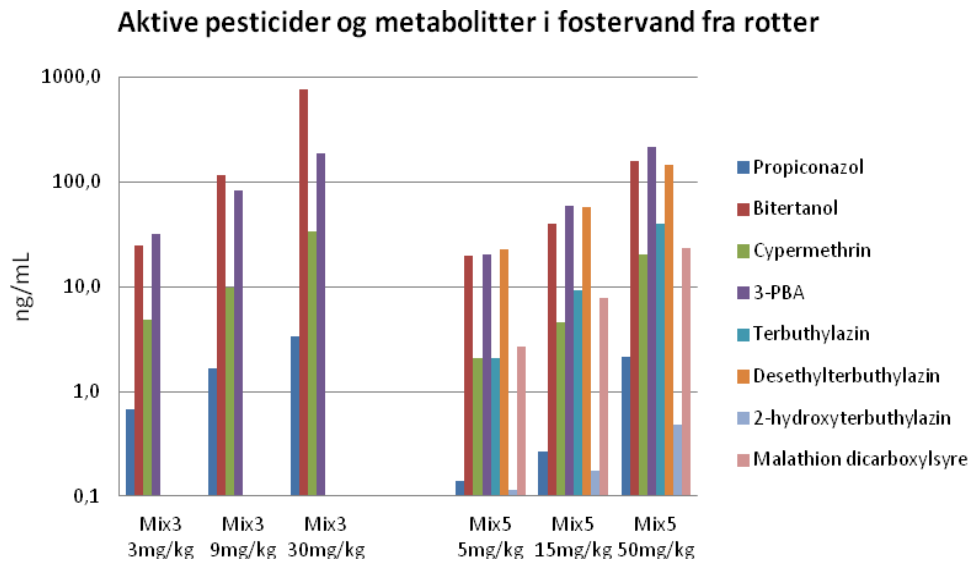
Fire (propiconazol, bitertanol, cypermethrin, terbuthylazin) af de fem pesticider fra Mix5, og i enkelte tilfælde deres metabolitter, blev kvantificerede i fostervand GD21 (Fig. 28). Tre (propiconazol, bitertanol, terbuthylazin) af de fem pesticider fra Mix5, og i enkelte tilfælde deres metabolitter, blev kvantificerede i mødrenes urin GD15 (Fig. 29). Der blev analyseret i alt 69 fostervandsprøver og 32 urinprøver. Alle analyserede stoffer blev detekteret i både fostervand og urin. Koncentrationer af alle stoffer, bortset fra desethylterbuthylazin, var relateret til pesticiddoseringen af rotter.

Koncentrationen af bitertanol var væsentligt højere i fostervand (19,9-749,1 ng/ml) end i urin (1,3-16,7 ng/ml), hvilket er i overensstemmelse med udskillelse af bitertanol igennem afføring (90 %) og meget lidt igennem urin. Imidlertid blev det andet azolfungicid, propiconazol, fundet i meget lave koncentrationer i både fostervand og urin.

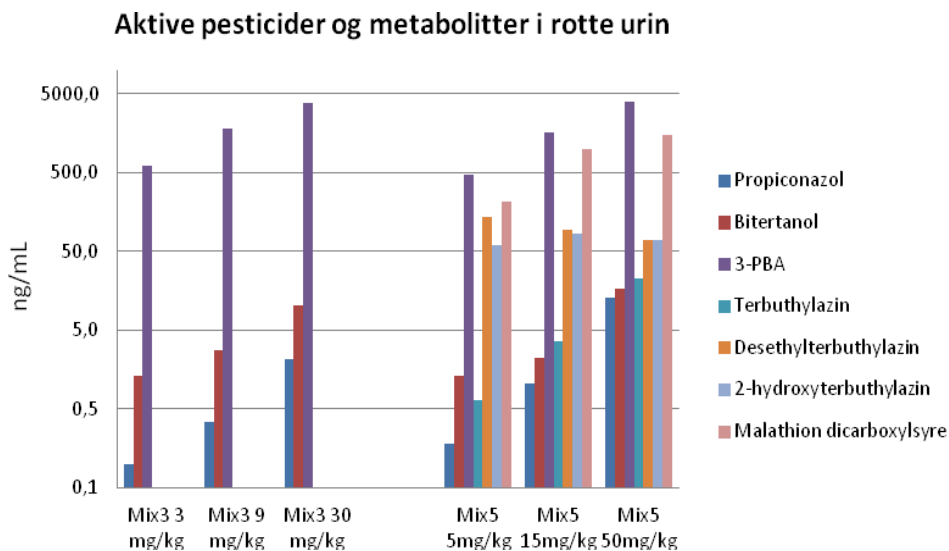
Cypermethrin og dets metabolit 3-PBA blev fundet i fostervand med et forholdsvis konstant forhold på mellem 0,08 og 0,18. Cypermethrin blev ikke analyseret i rotte urinprøver, da stoffet forventedes at blive helt metaboliseret til 3-PBA.

Terbuthylazin og desethylterbuthylazin havde tilsvarende koncentrationer i fostervand og urin, mens koncentrationen af metabolitten 2-hydroxyterbuthylazin var væsentligt højere i urin end i fostervand. Forsøgene viste at under 2 % af terbuthylazin blev udskilt med urin, mens der stadigvæk var 8-21 % af moderstoffet i fostervand. Samtidig var koncentrationen af metabolitten 2-hydroxyterbuthylazin væsentligt lavere i fostervand. Dette tyder på, at nedbrydningen af terbuthylazin er ufuldstændig, når stoffet overføres til fosteret.

Malathion dicarboxylsyre blev også fundet med højere koncentrationer i urin end i fostervand, hvilket tyder på, at det unedbrudte moderstof kan overføres til fosteret.



Figur 28. Gennemsnitskoncentrationer (n=5) af pesticider og metabolitter i fostervand GD21. Figurens y-akse er en log₁₀ skala.



Figur 29. Gennemsnitskoncentrationer (n=5) af pesticider og metabolitter i rotte urin GD15. Figurens y-akse er en log₁₀ skala.

3.4.8 Opsummering af *in vivo* rotte analyser

Vi fandt ingen antiandrogene effekter *in vivo* af Mix3 og Mix5. Der blev ikke fundet effekter på hverken AGD (hanner, hunner), testosteronniveauer eller histopatologi (hanner), hvilket taler for, at der reelt ikke er nogen antiandrogen effekt på fostre. Dette betyder, at det er sandsynligt, at der ingen AR blokering eller hæmning af testosteronsyntese finder sted i gonaderne hos hanfostrene ved disse doser.

I *in vitro* H295R celle assayet fandt vi en testosteronsænkende virkning af Mix3 men ikke af Mix5. I udformningen af *in vivo* undersøgelsen designede vi blandinger, i hvilke kemikalierne var til stede i lige store mængder (i mg/kg), hvilket betød, at den maksimale dosis af blandingen blev begrænset af den tilladelige maksimale dosis af det mest toksiske kemikalie. Det er muligt, at dosis i fosteret af Mix3 var for lav til at udrette nogen virkning på kønshormonsyntesen. Dette kan skyldes

problemstillinger i relation til *ADME* - dvs. interaktioner mellem kemikalierne i forhold til absorption, distribution, metabolisme eller udskillelse af organismen (ekskretion).

Pesticiderne og metabolitter blev fundet i fostervand og urin, generelt med stigende koncentrationer i takt med stigende dosering af rotterne. Pesticiderne i urinen dokumenterer såvel eksponeringen som evnen til at udskille stofferne. Desuden indikerer måling af stofferne i fostervand, at fosteret er eksponeret til såvel pesticiderne som deres metabolitter.

4. Diskussion

4.1 *In vitro* og *in silico* prædiktivitet

I dette studie blev der analyseret *in vitro* 13 pesticider og én metabolit som enkeltstoffer i seks allerede etablerede mammae cellekultursystemer. Disse screeninger havde til formål at belyse virkningsmekanismer og potens af pesticiderne. Blandt de *in vitro* aktive stoffer blev udvalgt komponenter til to forskellige pesticidblandinger (Mix3 og Mix5), som ligeledes blev analyseret i det respektive batteri af *in vitro* tests. Resultater fra *in vitro* forsøgene blev sammenholdt med undersøgelser af pesticiderne *in silico* i en række QSAR modeller til forudsigelse af effekter på ER, AR og PXR.

4.1.1 Effekter på ER funktion

Østrogen receptoren (ER) er udtrykt i stort set alle væv og er bl.a. involveret i udviklingen af hjernen, reproduktive funktioner og den seksuelle adfærd (Heldring et al., 2007).

Studiets væsentligste observationer af pesticideffekter på ER funktion:

De 14 testede stoffer blev undersøgt for effekter på ER funktion i humane MVLN celler i et receptor-rapportergen assay.

Vi fandt østrogen-lignende aktiviteter af fem pesticider (terbuthylazin, propiconazol, prothioconazol, malathion og cypermethrin), omend effekterne af disse må siges at være relativt svage i forhold til effekten af det naturlige 17 β -østradiol (E2), som cirkulerer i kroppen. Til vores kendskab rapporterer vi her for første gang om koncentrations-afhængige agonistiske effekter på ER af terbuthylazin og prothioconazol.

For Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) blev der kun observeret en østrogen-lignende effekt ved højeste koncentration testet, og det var derfor ikke muligt at prædiktere eventuelle blandingseffekter ved anvendelse af CA modellen.

Vi fandt svage koncentrations-afhængige østrogen-lignende effekter af azolfungicidet propiconazol i MVLN celler i koncentrationsområdet 5-30 μ M. Dette er i overensstemmelse med data fra et nyligt rapporteret dansk studie, hvori propiconazol blev analyseret i et MCF-7 celle proliferations assay, som viste en svag østrogen-lignende aktivitet af pesticidet ved 12,5-50 μ M (Kjaerstad et al., 2010b). I samme studie blev observeret antiøstrogene effekter af propiconazol, når pesticidet blev testet i tilstedeværelse af 10 pM E2, hvorimod vores analyse ikke viste nogen effekter på ER ved co-eksponering med 25 pM E2. Som tidligere rapporteret, kan der ikke altid forventes at være en total overensstemmelse mellem resultater opnået ved den mere specifikke ER-rapportergen analyse og MCF-7 celle proliferations assays (Andersen et al., 2002). Dette kan skyldes, at hormonelle aktiviteter observeret i ER-rapportergen analyser er specifikt receptor-medieret, hvorimod celle proliferation er et mere komplekst biologisk endpoint, og effekter, observeret i denne type analyser, kan skyldes interaktioner med flere andre cellulære mekanismer og signalveje.

Organofosfat insekticidet malathion er tidligere blevet undersøgt i et MCF-7 celle proliferations assay og i en ER kompetitiv-bindings analyse, som ikke viste nogen østrogen-lignende aktivitet af pesticidet (Chen et al., 2002).

I dette studie demonstrerede vi svage agonistiske effekter af malathion på ER, som antyder, at malathion alene ikke har et væsentligt østrogen-lignende potentiale.

Ligeledes observerede vi svage østrogen-lignende effekter af pyrethroid insekticidet cypermethrin. Der findes modstridende data for effekten af cypermethrin og dets metabolitter på ER funktion (Chen et al., 2002; Kim et al., 2004; McCarthy et al., 2006; Du et al., 2010). Vores resultater er i overensstemmelse med data rapporteret af Chen et al., som har vist, at cypermethrin inducerer MCF-7 cellevækst og det østrogen-responsive gen pS2 mRNA ekspression i MCF-7 celler (Chen et al., 2002). I kontrast hertil fandt Kim et al. ingen østrogen-lignende effekter af cypermethrin ved tilsvarende analyser (Kim et al., 2004). Ligeledes fandt Du et al. heller ingen effekter af cypermethrin på ER funktion i CV-1 celler i et ER rapportergen studie (Du et al., 2010). En række metabolitter af cypermethrin har dog tidligere vist at have østrogen-lignende aktivitet i gærceller, som udtrykker humane ER (McCarthy et al., 2006). Forskellige cellulære endpoints og cellekultur modeller kan være forklaringen på de divergerende resultater.

4.1.2 Effekter på AR funktion

Androgen receptoren (AR) er udtrykt i en lang række væv såsom prostata, binyrer, skeletmuskulatur, lever, centralnervesystemet (CNS), hjerte, knogler og fedtvæv (Gao et al., 2005; Davison and Bell, 2006). Receptoren er ansvarlig for den seksuelle udvikling af det mandlige foster og den seksuelle modning i puberteten (Dehm and Tindall, 2007). Det antages, at forstyrrelser af den normale AR funktion er involveret i den stigende forekomst af hypospadi, kryptorkisme og prostatakrcæft samt den faldende sædkvalitet, der er observeret i vestlige lande (Skakkebaek, 2003).

Studiets væsentligste observationer af pesticideffekter på AR funktion:

De 14 testede stoffer blev undersøgt for effekter på AR funktion i kinesisk hamster ovarieceller (CHO-K1) i et AR-rapportergen assay.

Tre pesticider (bitertanol, propiconazol og mancozeb) udviste antiandrogene effekter. For mancozeb var denne effekt dog kun signifikant ved en relativ høj koncentration på 1×10^{-5} M, og det kan derfor ikke udelukkes, at der er tale om en begyndende cytotoxicitet af pesticidet ved denne koncentration. Vores *in vitro* resultater understøttes af data fra QSAR analyserne, hvor de to azolfungicider bitertanol og propiconazol ligeledes slog ud som positive for AR antagonisme. Til vores kendskab rapporterer vi her for første gang om koncentrations-afhængige hæmmende effekter af azolfungicidet bitertanol på AR.

Vi observerede antiandrogene effekter for både Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin) og Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion), hvilket formodes at skyldes, at begge blandinger indeholdt de AR-hæmmende komponenter bitertanol og propiconazol. For begge pesticidblandinger blev der observeret en større procentvis maksimal hæmmende effekt end for de enkelte komponenter alene.

For Mix3 blev der prædikeret effektkoncentrationer svarende til additive blandingseffekter, dvs. at effekten af stofferne i blandingen agerede sammen, hvilket bevirkede en samlet forøget effekt. For Mix5 blev der prædikeret effektkoncentrationer svarende til en blandingseffekt, som var mere end additiv. Tidligere lignende studier har påvist additive blandingseffekter af pesticider med antiandrogen potentiale (Nellemann et al., 2003; Birkhoj et al., 2004). Data fra disse studier understøtter vores observation, at effekten af antiandrogene pesticider i blandinger kan agere sammen og hermed forårsage en samlet forøget effekt.

I et nyligt rapporteret studie udviste azolfungicidet propiconazol antiandrogen aktivitet i CHO celler og blev ligeledes observeret at hæmme produktionen af testosteron i H295R celler (Kjaerstad et al., 2010b). Disse resultater understøtter vores observationer, at propiconazol har et antiandrogen potentiale. Propiconazol er ligeledes tidligere blevet relateret til reproduktive effekter i Wistar hanrotter (øget anogenital afstand (AGD), øget testes vægt, øget serum testosteron) samt

leverhypertrofi (Goetz et al., 2007). Dog er der ikke blevet fundet nogen antiandrogene effekter af propiconazol ved brug af Hershberger test ved doser ≤ 150 mg/kg/dag (Taxvig et al., 2008).

Vi fandt en koncentrations-afhængig antiandrogen effekt af azolfungicidet bitertanol og dithiocarbamat fungicidet mancozeb. Et andet studie har vist, at bitertanol har en svag bindingsaffinitet for AR (Okubo et al., 2004). Ligeledes har mancozeb tidligere udvist antiandrogene effekter i muse NIH3T3 celler i et receptor-rapportergen assay (Viswanath et al., 2010). Data fra disse studier (Okubo et al., 2004; Viswanath et al., 2010) understøtter resultaterne fra vores data.

Tidligere *in vitro* studier har vist antiandrogene effekter af cypermethrin i CV-1 celler fra abe nyrer og i humane brystcarcinoma MDA-kb2 celler (Xu et al., 2008; Du et al., 2010), men vi fandt ingen effekter af pesticidet på AR funktion i hamster ovarieceller (CHO-K1). De divergerende resultater kan eventuelt skyldes forskelle i de anvendte cellekultur modeller.

4.1.3 Effekter på AhR funktion

Aryl hydrocarbon receptoren (AhR) er involveret i reguleringen af en række enzymer, som omsætter et antal stoffer (både endogene og eksogene) og hormoner i kroppen (Poland and Knutson, 1982; Safe, 1990; Schmidt and Bradfield, 1996). Ved binding af ligand til AhR induceres transkriptionen af gener fra CYP1 familien, og hermed øges aktiviteten af visse cytochrome P450 enzymer - fx ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), som er involveret i syntesen/metabolismen af steroidhormoner (Rifkind, 2006).

Studiets væsentligste observationer af pesticideffekter på AhR funktion:

De 14 testede pesticider blev undersøgt for effekter på AhR funktion i muse hepatoma cellelinjen Hepa1.12cR i et AhR-rapportergen assay. Alle de analyserede pesticider, undtagen metabolitten (ETU), viste sig at påvirke AhR funktionen. Det skal dog påpeges, at seks af pesticiderne (MCPA, iodosulfuron-methyl-natrium, mesosulfuron-methyl, metsulfuron-methyl, chlormequat chlorid og prothioconazol) kun udviste aktivitet ved den højeste forsøgskoncentration.

Elleve af pesticiderne (MCPA, terbuthylazin, iodosulfuron-methyl-natrium, mesosulfuron-methyl, metsulfuron-methyl, chlormequat chlorid, propiconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion) udviste en inducerende effekt på AhR aktiviteten, omend effekterne af disse stoffer var svage i forhold til effekten af den højpotente AhR ligand, TCDD. Ligeledes udviste de to azolfungicider bitertanol og prothioconazol hæmmende effekter på AhR aktiviteten.

Til vores kendskab er der ikke tidligere rapporteret om lignende effekter på AhR funktion *in vitro* af de 13 pesticider, bortset fra et enkelt studie af propiconazol, som er i overensstemmelse med vores observationer for dette azolfungicid.

Pesticidblandingen Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) udviste en svag agonistisk effekt på AhR. Det var ikke muligt at evaluere for eventuelle blandingseffekter vha. CA modellen, da en af komponenterne (bitertanol) hæmmede AhR aktiviteten, mens de øvrige komponenter havde en inducerede virkning på AhR.

Vi observerede en inducerende effekt af terbuthylazin på AhR aktiviteten og ligeledes var triazin herbicidet i stand til at øge den TCDD-inducerede AhR aktivitet. I modsætning hertil er det tidligere rapporteret, at terbuthylazin nedsætter enzymaktiviteten af EROD i regnbueørred (Tarja et al., 2003). Dette er i overensstemmelse med, at visse AhR agonister, som også fungerer som substrat for AhR-induceret CYP1A1 ekspression, kan resultere i kompetitiv hæmning af EROD aktivitet (Hahn et al., 1993). Desuden kan de forskellige arter (fisk vs. mus) og variationer i eksperimentel model (*in vivo* vs. *in vitro*) være årsag til de forskellige resultater.

Vi fandt, at azolfungicidiet propiconazol kan aktivere AhR og antagonisere den TCDD-inducerede AhR aktivitet ved samtidig eksponering til TCDD. Lignende resultater er tidligere blev rapporteret (Sergent et al., 2009). For de to øvrige azolfungicider, bitertanol og prothioconazol, blev der observeret en hæmmende effekt på AhR funktionen, hvilket formodes at kunne medføre en nedsat aktivitet af visse cytochrome P450 enzymer (fx EROD), som er involveret i syntesen/metabolismen af steroidhormoner. Bitertanol er tidligere blevet vist at hæmme EROD aktivitet i levermikrosomer fra fisk og pattedyr (Beijer et al., 2010). Dette understøtter vores data.

Mancozeb er mistænkt for at være kræftfremkaldende i pattedyr (Belpoggi et al., 2002) ved at inducere DNA beskadigelse i celler udsat *in vitro* ved oxidative mekanismer (Calviello et al., 2006; Domico et al., 2007). I dette studie observerede vi, at mancozeb udviste en agonistisk effekt på AhR, hvilket antyder muligheden for induktion af AhR-medieret genekspression af mancozeb. I betragtning af den rolle, som AhR spiller i oxidativ stress og udviklingen af kræft (Gasiewicz et al., 2008), bør det undersøges yderligere, om en eventuel kræftfremkaldende effekt af mancozeb medieres via AhR.

Cypermethrin er tidligere blevet rapporteret at inducere CYP1A1 i humane hepatocytter uden at interagere direkte med AhR (Delescluse et al., 1998). I dette studie blev cypermethrin vist at inducere AhR aktivitet i muse hepatoma celler. Således bør der undersøges yderligere, hvorvidt AhR induktionen spiller en rolle i induktionen af CYP1A1 i humane hepatocytter.

Vi fandt en agonistisk effekt af chlormequat chlorid på AhR ved den højeste testkoncentration (1×10^{-4} M) og en yderligere øget TCDD-induceret AhR aktivitet ligeledes ved en relativ høj koncentration (1×10^{-5} M). Dog blev der ikke observeret en åbenlys dosis-afhængig virkning af pesticidet. I vores tidligere undersøgelse i den humane hepatoma cellelinje TV101L udviste chlormequat chlorid en dosis-afhængig antagonistisk virkning på den TCDD-inducerede AhR aktivitet i koncentrationsområdet fra 1×10^{-6} - 5×10^{-5} M (Long et al., 2003). Disse observationsforskelle i de to studier kan være relateret til cellemodel artsforskelle (mennesker vs. mus).

4.1.4 Effekter på TH funktion

Thyroideahormoner (TH) spiller en vigtig rolle for bl.a. den prænatale og postnatale udvikling af centralnervesystemet (CNS) og for normal hjerneudvikling hos fostre (Boas et al., 2006). Hypothyroidisme hos mødre er vist at kunne resultere i mental retardering og problemer med motorikken hos deres afkom (Howdeshell, 2002). Selv moderate og forbigående fald i moderens T4-niveauer under graviditeten kan have en negativ indflydelse på barnets neurologiske udvikling.

Studiets væsentligste observationer af pesticideffekter på TH funktion:

De 14 testede stoffer blev undersøgt for effekter på TH funktion i GH3 celler i et T-screen assay. Otte af pesticiderne udviste en effekt: Terbutylazin, prothioconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion øgede signifikant GH3 cellevæksten, hvorimod bitertanol, prothioconazol, propiconazol, cypermethrin og tau fluvalinat, hæmmede den T3-inducerede GH3 cellevækst. For de tre sidstnævnte pesticider sås dog kun en hæmning ved de højeste koncentrationer testet. Til vores kendskab rapporterer vi her for første gang om sådanne *in vitro* effekter på TH funktion af pesticiderne terbutylazin, bitertanol, prothioconazol, mancozeb, tau fluvalinat og malathion.

Vores undersøgelse af pesticidblandingen Mix5 (terbutylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion), i forhold til en tilsvarende blanding uden bitertanol (Mix4) viste, at bitertanols hæmmende virkning ved de højeste koncentrationer af Mix5, havde en dominerende indvirkning på den samlede blandingseffekt, idet stoffet hæmmede de andre pesticiders stimulerende virkning. Ved fjernelse af bitertanol fra Mix5 (hermed svarende til Mix4) observerede vi en større effekt på GH3 cellevæksten (ved en koncentration svarende til 1×10^{-5} M af de enkelte

komponenter i blandingen), der oversteg effekten observeret for hvert af de enkelte pesticider ved denne koncentration. Således observerede vi additive blandingseffekter af Mix4, hvorimod det ikke var muligt at prædiktere for sådanne effekter for Mix5, da komponenterne i blandingen havde modsatrettede effekter. Vi har tidligere observeret for en blanding, at én komponent, med modsatrettet effekt relativt til de øvrige blandingskomponenter, kan sløre effekten af de øvrige komponenter (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009).

Der findes kun nogle ganske få rapporter om effekter af de testede pesticider på TH systemet.

I dette studie udviste azolfungiciderne bitertanol, propiconazol og prothioconazol antagonistiske effekter på TH funktion. Propiconazol er tidligere undersøgt i et studie, der også har benyttet T-screen assay til at vurdere en række azolers effekt på TH funktion (Andersen et al., 2007). Data fra dette studie understøtter vores data ved observation af en svag hæmning af GH3 cellevæksten for azolfungicidet. I vores studie havde prothioconazol en overbevisende stimulerende effekt på GH3 cellerne og ligeledes potentialet til at hæmme den T3-inducerede cellevækst. Dette kan relateres til et tidligere *in vivo* studie, som viste, at Wistar rotter eksponeret til prothioconazol (500 mg/kg/dag i 14 uger), havde et lidt lavere T4-niveau end kontrollerne (EU Assessment Reports).

For de to testede pyrethroid insekticider, tau fluvalinat og cypermethrin, observerede vi en stimulering af GH3 cellevæksten. Ligeledes hæmmede begge stoffer den T3-inducerede celleproliferation ved den højeste koncentration.

I et nyligt studie fandt man en antagonistisk effekt af cypermethrin (1×10^{-5} M) og flere andre pyrethroider i en TR-medieret rapportergen analyse med CV-1 celler (Du et al., 2010). For andre pyrethroider er der rapporteret om nedsat serumkoncentration af hormonerne T4 og T3 i mus eksponeret til fenvalerat (Maiti et al., 1995), samt om nedsat TH sekretion og hæmmet vækst af voksne rotter eksponeret til bifenthrin og lambda cyhalothrin (Akhtar et al., 1996).

I vores studie øgede herbicidet terbuthylazin og organofosfat insekticidet malathion GH3 cellevæksten, som antyder en TH-lignende effekt af pesticiderne. Terbuthylazin, hører til familien triaziner og ligner struktur-mæssigt atrazin, som er mere undersøgt. Der er fundet effekt af atrazin på skjoldbruskkirtlen (hyperplasi) hos hunrotter (0,2 LD50 for 6 og 12 dage) og et dosis-afhængigt fald i serumkoncentrationen af T3 (Kornilovskaya et al., 1996). I et andet studie så man en forøget serumkoncentration af T3 (men ikke af T4 og TSH) hos hanrotter eksponeret til atrazin (200 mg/kg) (Stoker et al., 2000).

Malathion er vist at have effekt på TH systemet ved at nedsætte T3 og T4 og øge TSH koncentrationen hos eksponerede rotter (60 µg/rotte/dag i 21 dage). Pesticidet hæmmede bindingen af T3 til transthyretin, men ikke til det ligand-bindende domæne af TRβ i et studie, hvor der blev brugt rekombinante japanske vagtler (Ishihara et al., 2003).

Således understøtter vores data, at terbuthylazin og malathion har TH-forstyrrende effekt

Vi fandt en meget svag omend signifikant stimulerende effekt af dithiocarbamat fungicidet mancozeb på TH-afhængig GH3 cellevækst, som kan relateres til pesticidets potentiale til at forstyrre TH funktion. Dette resultat understøttes af adskillige undersøgelser, som har rapporteret om toksiske effekter af mancozeb på funktionen af skjoldbruskkirtlen. Et nyligt rottestudie har bl.a. vist, at perinatal eksponering til mancozeb reducerer plasmaniveauet af hormonet T4 i mødre (Axelstad et al., 2011). Andre undersøgelser har vist lignende toksiske effekter af mancozeb på funktionen af skjoldbruskkirtlen – eksempelvis et fald i thyroidea-peroxidase aktivitet og iodoptag, øget produktion af thyroidea-stimulerende hormon (TSH), hyperplasi og hypotrofi af follikelceller i skjoldbruskkirtlen samt skjoldbruskkirtelkræft (Trivedi et al., 1993; Kackar et al., 1997b; Hurley, 1998; Cecconi et al., 2007; Axelstad et al., 2011).

Samlet viser vores *in vitro* data for hormonforstyrrende potentiale på TH funktion af otte af de undersøgte pesticider, at der bør etableres analysemodeller såvel *in vitro*, *ex vivo* som *in vivo* med

fokus på TH-forstyrrende mekanismer.

4.1.5 Effekter på aromatase aktivitet

Aromatase enzymet findes i mange forskellige væv inklusive æggestokkene, testiklerne, moderkagen, hjernen, huden, fedtvævet og knoglerne. Enzymet omdanner mandlige kønshormoner (androgener) til kvindelige kønshormoner (østrogener) og er derfor en vigtig faktor i bl.a. kønsudviklingen af fosteret (Jones et al., 2006).

Studiets væsentligste observationer af pesticideffekter på aromatase aktiviteten:

De 14 testede pesticider blev undersøgt for effekter på aromatase aktivitet i humane placentale JEG-3 celler.

Tre af pesticiderne (terbuthylazin, propiconazol og prothioconazol) udviste svage signifikante effekter.

Til vores kendskab rapporterer vi her for første gang om en svag stimulerende effekt af terbuthylazin og prothioconazol på aromatase aktiviteten.

For propiconazol fandt vi ligeledes en svag opregulerende effekt ved et lavere koncentrationsområde (1×10^{-7} - 1×10^{-6} M), samt en hæmmende effekt på aromatase aktiviteten ved den højeste koncentration (5×10^{-5} M) af stoffet.

De to pesticidblandinger Mix3 (bitertanol, propiconazol og cypermethrin) og Mix5 (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion) havde en svag opregulerende effekt på aromatase aktiviteten, hvilket formodes at skyldes de inducerende effekter af terbuthylazin og propiconazol.

Terbuthylazin hører til gruppen af triazin herbicider og ligner strukturmæssigt atrazin, som er mere undersøgt. Vi fandt en svag opregulerende effekt af terbuthylazin på aromatase aktivitet. Et tidligere *in vitro* studie har vist, at terbuthylazin hæmmer enzymet phosphodiesterase - dog i mindre grad end atrazin (Roberge et al., 2004). Dette enzym er ansvarligt for nedbrydningen af cAMP, som er involveret i dannelsen af aromatase mRNA. Det er tidligere vist, at atrazin inducerer aromatase enzymet i humane H295R celler samt forårsager en øget koncentrationen af cAMP, hvilket fører til en øget produktion af aromatase mRNA (Sanderson et al., 2000; Sanderson et al., 2002). Vores observationer kunne tyde på en lignende virkningsmekanisme for triazin herbicidet terbuthylazin.

Ligeledes observerede vi effekter af azolfungiciderne propiconazol og prothioconazol på aromatase aktiviteten i humane JEG-3 celler. En række studier har tidligere undersøgt effekten af propiconazol på aromatase aktiviteten. Vinggaard et al. fandt som i dette studie en nedregulerende effekt på aromatase af pesticidet i JEG-3 celler ved en koncentration på 5×10^{-5} M og en eksponerings tid på 18 timer (Vinggaard et al., 2000). Laville et al. fandt også en nedregulerende effekt af propiconazol i JEG-3 celler i koncentrationsintervallet 1×10^{-6} - 1×10^{-5} M blot efter 2 timers eksponering, hvorimod stoffet ikke udviste nogen effekt ved en eksponeringstid på 24 timer (Laville et al., 2006). Desuden har andre studier vist hæmmende effekter af propiconazol på aromatase aktiviteten i humane placentale microsomer (Vinggaard et al., 2000; Trosken et al., 2006), i humane H295R celler (Sanderson et al., 2002) og i ørred hjerne og ovarier (Hinfray et al., 2006).

Azolfungicidet bitertanol har tidligere udvist en hæmmende effekt på aromatase aktiviteten i humane placentale mikrosomer (Trosken et al., 2006), men vi fandt ingen effekter af dette pesticid i humane placentale JEG-3 celler. Cellemodel forskelle kan være forklaringen på forskelle i de observerede data.

Cypermethrin er tidligere vist at kunne inducere aromatase aktiviteten svagt i den humane placenta cancer cellelinje JEG-3 (Laville et al., 2006), hvorimod et andet studie, med den humane ovarie cancer cellelinje KGN, har vist en hæmmende effekt af pesticidet på aromatase aktiviteten (Morinaga et al., 2004). I vores studie fandt vi ingen effekt af cypermethrin på aromatase aktiviteten i JEG-3 celler.

4.1.6 Opsummering af effekter *in vitro* på ER-, AR-, AhR- og TH funktion samt aromatase aktivitet

Alle 13 undersøgte pesticider udviste aktivitet i mindst én ud af de fem ovennævnte *in vitro* cellekultur analyser, hvorimod mancozeb metabolitten (ETU) var inaktiv i alle assays.

Otte af pesticiderne (terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, prothioconazol, mancozeb, cypermethrin, tau fluvalinat og malathion) udviste en effekt på flere *in vitro* endpoints og vurderes derfor at besidde et bredere hormonforstyrrende potentiale *in vitro*. Dette fænomen er før set i lignende studier af pesticider (Andersen et al., 2002; Andersen et al., 2007; Kjaerstad et al., 2010b) og vækker bekymring om en forstærket biologisk effekt i kroppen, da det samlede respons formodes at være bestemt af samspillet mellem alle involverede signalveje.

Triazin herbicidet terbuthylazin udviste aktivitet i fire ud af de fem ovennævnte cellekultur analyser (ER, AR, AhR, T-screen, aromatase). Til vores kendskab, rapporterer vi her for første gang om koncentrations-afhængige agonistiske effekter af terbuthylazin på ER, samt om en inducerende effekt af pesticidet på aromatase aktiviteten. Overordnet set kunne dette tyde på en demaskuliniserende/feminiserende effekt af terbuthylazin, i stil med hvad der tidligere er blevet observeret *in vitro* og *in vivo* for atrazin (Friedmann, 2002; Hayes et al., 2010; Hayes et al., 2011). Ligeledes fandt vi, at terbuthylazin aktiverer AhR samt udviser forstyrrende effekter på TH funktion.

Azolfungicidet propiconazol udviste aktivitet på alle fem endpoints. Bl.a. observerede vi svage østrogen-lignende effekter samt blokerende effekter på AR, hvilket er i overensstemmelse med data fra et nyligt dansk *in vitro* studie, som ydermere rapporterede om en hæmmende effekt af propiconazol på produktionen af testosteron i H295R celler (Kjaerstad et al., 2010b). Ydermere fandt vi, ved lavere koncentrationer (1×10^{-7} - 1×10^{-6} M) af propiconazol, en svag opregulerende effekt på aktiviteten af aromatase enzymet. Overordnet set kunne disse *in vitro* data tyde på en demaskuliserende/feminiserende effekt af propiconazol ved lavere koncentrationer. Rottestudier har tidligere vist, at azolfungicider, såsom terbuconazol og prochloraz, kan feminisere hanunger (Vinggaard et al., 2005a; Taxvig et al., 2007). Ved den højeste koncentration af propiconazol (5×10^{-5} M) fandt vi en hæmmende effekt på aromatase aktiviteten, hvilket før er observeret i et studie med lignende forsøgsbetingelser (Vinggaard et al., 2000).

På samme måde viste studiets øvrige azolfungicider, bitertanol og prothioconazol, effekter på flere endpoints *in vitro*. Bl.a. fandt vi for begge disse pesticider en hæmmende effekt på AhR funktion. For prothioconazol var denne effekt dog kun signifikant ved en forholdsvis høj forsøgskoncentration, og det kan derfor ikke udelukkes, at den observerede nedregulering skyldtes en begyndende cytotoxicitet af pesticidet. Ligeledes viste vores *in vitro* undersøgelse en blokerende effekt på AR funktion af bitertanol med en potens som set for propiconazol. Vores observation af hæmmende effekter af propiconazol og bitertanol på AR i CHO-K1 celler er i overensstemmelse med resultater i vores QSAR analyser. Alt i alt understøtter vores *in vitro* resultater for de tre azolfungicider (propiconazol, prothioconazol og bitertanol) data fra tidligere undersøgelser *in vitro* og i dyr, som peger kraftigt i retning af, at gruppen af azolfungicider generelt besidder hormonforstyrrende egenskaber (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2002; Vinggaard et al., 2005a; Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007; Taxvig et al., 2008; Kjaerstad et al., 2010b).

Vores *in vitro* undersøgelse viser, at pesticiderne generelt er væsentligt mindre potente end de positive kontroller analyseret parallelt i *in vitro* analyserne. Dog demonstrerer studiet en række aktive pesticiders potentiale til at påvirke forskellige virkningsmekanismer, som er involveret i hormonforstyrrende effekter. Det skal selvfølgelig pointeres, at *in vitro* cellekultur modeller har deres begrænsninger i at detektere aktive stoffer for såvel dyr som mennesker.

Vores efterfølgende *in vivo* studier, af de aktive pesticider i designede blandinger, viste ingen alarmerende effekter i den androgene rottemodel. Dog har denne model sine begrænsninger, idet

den ikke giver oplysninger om effekter på fx pesticidernes endpoint i en østrogen rottemodel og dermed mere specifikke endpoints for hunner.

Den humane population er gennem livet eksponeret for blandinger af hormonforstyrrende stoffer, inklusive en række pesticider, og stofferne mistænkes for at kunne agere sammen og bevirke en samlet forøget effekt - en mistanke der bl.a. understøttes af tidligere studier *in vitro* og *in vivo*, som har påvist kombinationseffekter af pesticider (Nellemann et al., 2003; Birkhoj et al., 2004; Kjaerstad et al., 2010a; Hass et al., 2012; Jacobsen et al., 2012). I dette studie fandt vi *in vitro* kombinationseffekter af begge pesticidblandinger (Mix3 og Mix5) på AR funktion samt kombinationseffekter af en fire-komponents blanding (Mix4 – svarende til Mix5 uden bitertanol) på TH funktion. Disse resultater indikerer, at den biologiske effekt af enkelte, svage hormonforstyrrende pesticider ikke kan anses for at være uden betydning. Dog skal der tages i betragtning, at de anvendte koncentrationer er væsentlig højere sammenlignet med human eksponering.

4.1.7 Pesticideffekter på kønshormonsyntese i H295R celler, rotte *in vivo* forsøg og QSAR model analyse

Data fra H295R assayet viste en klar forskel på effekter af de to pesticidblandinger. Mix3 gav en hæmning af østradiol syntesen, mens Mix5 gav en induktion af østradiol syntesen. Dette er tegn på en klar CYP19 induktion med Mix5 men ikke med Mix3. Dette er i overensstemmelse med, at terbuthylazin, som er i Mix5 (men ikke i Mix3), i sig selv inducerer aromatasen (CYP19). Malathion, som også var i Mix5 (men ikke i Mix3), inducerer kønshormonsyntesen generelt og det har formodentlig været medvirkende til den øgede østradiol syntese med Mix5. Et enkelt studium har rapporteret, at cypermethrin kan inducere aromatasen (Laville et al., 2006).

I *in vivo* rotteforsøget så vi en form for såkaldt 'østrogen effekt' af Mix5, idet aromatasen var klart induceret på mRNA niveau af Mix5 men ikke af Mix3. Det indikerer, at østradiol produktionen i hunfostrene kan være forøget. Betydningen af dette fund er uklar, og vi ved ikke, om det er en 'adverse' effekt. Derudover så vi en tendens til stigning i progesteron *in vivo* i hunners binyrer med Mix5. Effekten på progesteron produktion *in vitro* var også klart mere markant for Mix5 end for Mix3.

I kontrast til H295R data blev aromatase (CYP19) aktivitet i JEG celler induceret af både Mix3 og Mix5, hvilket eventuelt kan forklares ved forskelle i de respektive cellekultur modeller.

Data fra H295R assayet på niveauet af testosteron viste en hæmning med Mix3, men ikke med Mix5. Denne testosteronhæmmende effekt af Mix3 kunne ikke genfindes *in vivo*, hvilket kan skyldes, at effekten ikke var tilstrækkelig markant til at slå igennem *in vivo* ved en dosis på 30 mg/kg/dag. I Mix3 var to azolfungicider (bitertanol og propiconazol), der begge hæmmede testosteron, til stede, men også cypermethrin, der i sig selv inducerer testosterondannelse og dermed har potentialet til at modvirke den testosteron-hæmmende effekt.

Alt i alt tyder disse data på en rimelig prædiktivitet af H295R assayet, da den østrogene effekt af Mix5 blev detekteret både *in vitro* og *in vivo*. Generelt tyder data på en generel induktion af kønshormonsyntesen af Mix5 ved 50 mg/kg/dag.

QSAR analysen viste, at cypermethrin og malathion begge var agonister for pregnan X receptoren (PXR) og dermed har potentialet til at inducere CYP3A4. Begge disse pesticider var i H295R assayet i stand til at inducere dannelse af alle tre kønshormoner og dermed opregulere kønshormonsyntesen. Disse data kunne tyde på en generel evne for cypermethrin og malathion til at inducere CYP'er.

4.2 Pesticider og metabolitter i fostervand og urin fra rotter

Fire af de fem pesticider fra Mix5, og i enkelte tilfælde deres metabolitter, blev kvantificerede i fostervand GD21 og i mødrener urin GD15. Alle analyserede stoffer blev detekteret i både fostervand og urin. Koncentrationer af alle stoffer, bortset fra desethylterbuthylazin, var relateret til pesticiddoseringen af rotter.

Koncentrationen af bitertanol var væsentligt højere i fostervand end i urin, hvilket er i overensstemmelse med udskillelse af bitertanol igennem afføring (90 %) og meget lidt igennem urin. Imidlertid blev det andet azolfungicid, propiconazol, fundet i meget lave koncentrationer i både fostervand og urin. Ifølge *in vivo* eksperimenter bliver propiconazol hurtigt adsorberet og metaboliseret; metabolitterne indgår i 44,5 % af den totale radioaktivitet (INCHEM, 1998). De lave koncentrationer af propiconazol målt i fostervand indikerer, at dette stof sandsynligvis ikke i samme grad bliver overført til den føtale cirkulation, ligesom det sker for bitertanol.

Cypermethrin og dets metabolit 3-PBA blev fundet i fostervand med et forholdsvis konstant forhold. Cypermethrin bliver hurtigt omdannet til polære metabolitter og adskilt fra kroppen via urinen (Crawford et al., 1981b). Dette er bekræftet af de høje 3-PBA koncentrationer fundet i urin i dette studie. På trods heraf, blev cypermethrin fundet i fostervand, hvilket er overraskende. Cypermethrin er meget lidt vandopløseligt og kan derfor bindes til fedtvæv, som fx observeret i rotteforsøg (Crawford et al., 1981a). En mulig forklaring på vores observation af cypermethrin i fostervand er, at stoffet kan overføres til fosteret igennem de samme processer, som sker for de lipofile pesticider (Foster et al., 2000; Luzardo et al., 2009).

Terbuthylazin og desethylterbuthylazin havde tilsvarende koncentrationer i fostervand og urin, mens koncentrationen af 2-hydroxyterbuthylazin var væsentligt højere i urin end i fostervand. Der findes ingen *in vivo* studier af metabolismen af terbuthylazin, men *in vitro* studier har vist, at nedbrydningen af terbuthylazin er sammenlignelig med atrazin og andre s-triazin pesticider (Lang et al., 1996). *In vivo* studier med rotter og biomonitoring af mennesker eksponeret til atrazin har vist, at mindre end 2 % af atrazin bliver udskilt med urin som moderstof (Catenacci et al., 1993; Fraites et al., 2011). I vores studie blev der ligeledes fundet, at under 2 % af terbuthylazin blev udskilt med urin, mens der stadigvæk var 8-21 % af moderstoffet i fostervand. Samtidig var koncentrationen af metabolitten 2-hydroxyterbuthylazin væsentligt lavere i fostervand. Dette tyder på, at nedbrydningen af terbuthylazin er ufuldstændig, når stoffet overføres til fosteret.

Malathion dicarboxylsyre blev også fundet med højere koncentrationer i urin end i fostervand, hvilket tyder på at det unedbrudte moderstof kan overføres til fosteret.

4.3 *Ex vivo* placenta overførsel

Der er en stadig stigende bekymring for, at eksponeringer til selv lave pesticidkoncentrationer i fosterperioden, under udvikling af reproduktionsorganer og nervesystem, kan medføre vedvarende skader på disse organsystemer.

Toksiske effekter ved blandingseksponering er komplicerede og kan ikke prædikeres ud fra viden om stoffernes virkningsmekanismer alene. Sekundære virkningsmekanismer, optagelseskinetik, transport, metabolisme samt udskillelse af stofferne skal også tages i betragtning (Cedergreen et al., 2008). Føtal eksponering foregår gennem placenta, som overfører forskellige stoffer med forskellig transportkinetik i henhold til stoffets fysisk-kemiske egenskaber. Studier af placentalt overførsel af pesticider har før været undersøgt i samme analyselaboratorium (Mose et al., 2008; Poulsen et al., 2009; Pedersen et al., 2010). Disse studier viste en begrænset placentalt overførsel af glyfosat og dioxinet TCDD samt en akkumulering af stofferne i det placentale væv.

I dette studie har vi undersøgt overførsel af tre pesticider (cypermethrin, propiconazol og bitertanol) som enkeltstoffer og i 1:1:1 blanding (Mix3) i en placentale perfusionsmodel og i en BeWo celle monolag model. Propiconazol og bitertanol viste en overførsel svarende til fri diffusion, mens cypermethrin viste en mere begrænset transport med binding til det placentale væv. Der sås ingen blandingseffekter af Mix3 i det placentale transportstudie. Årsagen til dette kunne være, at to af pesticiderne bliver overført ved fri diffusion og dermed ikke er afhængige af interaktion med receptorer og transportfaktorer.

Denne hurtige overførsel fra moder til foster er kritisk i forbindelse med føtal eksponering, hvor man her skal regne med en føtal eksponering i samme størrelsesorden som den materielle eksponering. Transplacentale overførsel af cypermethrin har før været undersøgt i en dyremodel, hvor det blev indikeret, at cypermethrin kan være genotoksisk ved en marginal stigning i antal DNA-skader i føtale blodceller og leverceller (Murkunde et al., 2012). Dog har en række andre studier ikke kunne påvise nogen genotoksisk effekt af cypermethrin (EU Assessment Report). I et andet studie, af maternal og føtal eksponering for udvalgte pesticider, blev pyrethroider inkl. cypermethrin fundet i meconium (første afføring fra et nyfødt barn) i 2,5 % af alle tilfælde (Ostrea et al., 2012). I samme studie viste pesticidet propoxur signifikante effekter på den neuronale udvikling hos 2-årige børn, som kun kunne forklares ved placentale eksponering. Dette indikerer, at prænatal eksponering udgør en risiko for efterfølgende skadelige effekter på udvikling af nervesystemet, da det er i fostertilstanden, at hjernens vækst og udvikling er på sit højeste og er mest sårbar.

5. Konklusioner

Flere af de undersøgte pesticider viste *in vitro* potentialet til at forstyrre en bred vifte af hormonforstyrrende mekanismer. Der blev fundet flest *in vitro* aktive pesticider blandt azolfungicider (*bitertanol*, *propiconazol*, *prothioconazol*), dernæst i gruppen af pyrethroid insekticider (*cypermethrin*, *tau fluvalinat*), hvorimod kun ét pesticid blev fundet aktivt i herbicid gruppen (*terbuthylazin*) og begrænsede og svage effekter blev observeret for dithiocarbamat fungicidet *mancozeb* og organofosfat insekticidet *malathion*. QSAR *in silico* analyser understøttede det *in vitro* antiandrogene potentiale af azolfungiciderne bitertanol og propiconazol. De to udvalgte blandinger bestående af *in vitro* aktive pesticider (Mix3: *bitertanol*, *propiconazol*, *cypermethrin*; Mix5: *terbuthylazin*, *bitertanol*, *propiconazol*, *cypermethrin*, *malathion*) viste additive effekter (blokerende) på AR funktion. Ligeledes viste en special sammensat fire-komponent pesticidblanding (Mix5 uden bitertanol: *terbuthylazin*, *propiconazol*, *cypermethrin*, *malathion*) additive effekter (stimulerende) på TH funktion.

Generelt blev *in vitro* effekterne observeret ved relativt høje pesticidkoncentrationer i forhold til de aktuelle humane eksponeringsniveauer. Ligeledes blev pesticiderne fundet at have en væsentligt svagere effekt sammenlignet med effekten af de naturlige hormoner, som blev analyseret parallelt. Dog viste vores studie, at effekten af pesticider kan virke sammen *in vitro* og forårsage en samlet forøget effekt. Derfor kan de relativt svage effekter, observeret for de enkelte pesticider i dette studie, ikke konkluderes for at være uden biologisk betydning.

Vores *ex vivo* human placenta transport analyser, af tre valgte pesticider viste, at de to azolfungicider, *propiconazol* og *bitertanol*, blev overført fra det materielle til det føtale rum via fri diffusion, hvorimod pyrethroid insekticidet *cypermethrin* viste en begrænset overførsel, der tyder på en aktiv transport af stoffet over human placenta. Der blev ikke set nogen effekter af de tre pesticider i blanding (Mix3) i placenta transportstudierne - sandsynligvis pga. forskellige overførselsmekanismer. Der blev endvidere observeret, at placenta væv metaboliserer de tre pesticider. En god overensstemmelse mellem de to anvendte modeller, *ex vivo* human placenta perfusion og *in vitro* BeWo cellekultur, blev observeret.

In vivo forsøg med eksponering af drægtige rotter til de to pesticidblandinger, Mix3 og Mix5, viste ingen antiandrogene effekter eller signifikant ændrede blodniveauer af de målte kønshormon i afkommet. Højeste dosis af Mix5 medførte en signifikant stigning af T4 blodniveaueret i mødre. Mix5 forårsagede ligeledes signifikant induktion af aromatase ekspression i binyrer hos hunfostre, hvilket stemmer fint overens med den stigning i østradiol, som blev set i H295R assayet. Tendens til stigning af østradiol i ovarier og progesteron i binyrer hos hunfostre blev ligeledes observeret. Disse data kunne indikere, at de anvendte pesticidblandinger primært har effekter på hunkønnet – dvs. at blandingerne har potentiale til at udøve hormonforstyrrende effekter i hunner. Betydningen af dette fund er dog uklar, og der kræves yderligere studier i en model med fokus på hormonforstyrrelser i hunner. Pesticiderne og deres metabolitter blev fundet i såvel fostervand som urin fra mødre med stigende koncentrationer i takt med stigende eksponeringer. Dette viser, at både moderen såvel som fosteret er eksponeret til disse kemikalier, samt dokumenterer, at moderen er i stand til at udskille stofferne. Studiet viste også, at niveauet af det enkelte pesticid i fostervandet faldt, når antallet af samtidigt tilstedeværende pesticider steg fra to til fire. Med andre ord hæmmede pesticiderne hinandens tilstedeværelse.

6. Perspektivering

Det overordnede formål med dette projekt var at udføre en første screening af det hormonforstyrrende potentiale samt at belyse eventuelle virkningsmekanismer af 13 pesticider og én metabolit. Resultaterne præsenteret i denne projektrapport bør fungere som et fundament for videre prioritering af mere dybdegående undersøgelser af pesticidernes mulige hormonforstyrrende effekter. Målet med studiet var *ikke* at gennemføre en human risikovurdering, og resultaterne fra denne undersøgelse kan derfor hverken frikende eller forbyde nogen af pesticiderne.

Sammenfattende bekræfter studiet, at *in vitro* og *in silico* analyserne er gode redskaber til en første screening af den hormonelle virkning af en række pesticider, og vores undersøgelser har givet en ide om, hvilke blandt de testede pesticider som måtte have problematiske endokrine effekter. Dog skal man være opmærksom på begge analysers begrænsning i henhold til den anvendte model. Analyserne *in vitro* er baserede på cellekulturer fra et bestemt væv (ofte fra forskellige arter) og adskiller sig fra de sædvanlige *in vivo* regulerende mekanismer. *In silico* modeller er baserede alene på stoffernes kemiske struktur og giver et fingerpeg om en eventuel toksicitet.

Der anbefales, at fremtidige forskningsprojekter bør inkludere nærmere undersøgelser af de i studiet observerede aktive pesticider og deres metabolitter på mere specifikke cellulære østrogene biomarkører i hunner (mødre og fostre). Ligeledes viser vores *in vitro* data hormonforstyrrende potentiale af otte af de undersøgte pesticider på TH funktion, samt *in vivo* en stigning i niveauet af T4 i blodet fra rottedmødre. Der foreslås, at der etableres analysemodeller såvel *in vitro*, *ex vivo* som *in vivo* med fokus på specifikke biomarkører for TH-forstyrrende mekanismer, så som niveau, cellulære mekanismer og funktion af thyroideahormoner.

Vores studie viste, at visse pesticider har potentialet til at blive overført via placenta til fosteret, samt at placenta danner pesticidmetabolitter, hvilket betyder at såvel mødre som fostre bliver eksponeret til de kemiske stoffer. For at få en vurdering af den reelle humane eksponering kunne der foreslås, at de opnåede data følges op af yderligere humane studier for måling af eventuelle pesticidkoncentrationer i moderens blod, og navlestrengsblod af mulige eksponerede individer. BeWo cellemodellen synes fra de opnåede data at være en god, hurtigere og derfor mere effektiv screeningsmodel til test af pesticiders potentiale til at blive overført fra moder til foster.

Generelt viser både vores *ex vivo* human placenta analyser og rotte studierne, at de undersøgte *in vitro* aktive pesticider og deres metabolitter overføres fra moder til foster. Fremtidige undersøgelser bør foretages for nærmere at evaluere, hvilke effekter disse metabolitter kan have på såvel moder som foster.

Referencer

- Akbarsha, M. A., Latha, P. N. and Murugaian, P., 2000. Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *J Reprod Fertil* **120**(2): 385-390.
- Akhtar, N., Kayani, S. A., Ahmad, M. M. and Shahab, M., 1996. Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *J Appl Toxicol* **16**(5): 397-400.
- Alavanja, M. C. and Bonner, M. R., 2012. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **15**(4): 238-263.
- Andersen, D. N., Cohr, K. H., Knudsen, L. E. and Nielsen, J. B. (2009). Transport af bekæmpelsesmidler over moderkagen, analogier til percutan transport og modellering. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 125. Miljøstyrelsen.
- Andersen, H. R., Bonefeld-Jorgensen, E. C., Nielsen, F., Jarfeldt, K., Jayatissa, M. N. and Vinggaard, A. M., 2006. Estrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide fenarimol. *Toxicol Lett* **163**(2): 142-152.
- Andersen, H. R., Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Metzdorff, S. and Vinggaard, A. M. (2007). Effects of azole fungicides on the function of sex and thyroid hormones. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 111. Miljøstyrelsen.
- Andersen, H. R., Schmidt, I. M., Grandjean, P., Jensen, T. K., Budtz-Jorgensen, E., Kjaerstad, M. B., Baelum, J., Nielsen, J. B., Skakkebaek, N. E. and Main, K. M., 2008. Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. *Environ Health Perspect* **116**(4): 566-572.
- Andersen, H. R., Vinggaard, A. M., Rasmussen, T. H., Gjermandsen, I. M. and Bonefeld-Jorgensen, E. C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **179**(1): 1-12.
- Ashby, J., Tinwell, H., Stevens, J., Pastoor, T. and Breckenridge, C. B., 2002. The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **35**(3): 468-473.
- Axelstad, M., Boberg, J., Nellemann, C., Kiersgaard, M., Jacobsen, P. R., Christiansen, S., Hougaard, K. S. and Hass, U., 2011. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci* **120**(2): 439-446.
- Baker, S. E., Olsson, A. O. and Barr, D. B., 2004. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* **46**(3): 281-288.
- Baligar, P. N. and Kaliwal, B. B., 2001. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind Health* **39**(3): 235-243.
- Baligar, P. N. and Kaliwal, B. B., 2004. Morphometric analysis of follicular growth and biochemical constituents in albino rats exposed to mancozeb. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **15**(3-4): 241-262.
- Barr, D. B. and Needham, L. L., 2002. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **778**(1-2): 5-29.
- Beijer, K., Abrahamson, A., Brunstrom, B. and Brandt, I., 2010. CYP1A inhibition in fish gill filaments: a novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquat Toxicol* **96**(2): 145-150.
- Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D. and Maltoni, C., 2002. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann N Y Acad Sci* **982**: 123-136.
- Bhatia, R., Shiau, R., Petreas, M., Weintraub, J. M., Farhang, L. and Eskenazi, B., 2005. Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environ Health Perspect* **113**(2): 220-224.

- Bigsby, R., Chapin, R. E., Daston, G. P., Davis, B. J., Gorski, J., Gray, L. E., Howdeshell, K. L., Zoeller, R. T. and vom Saal, F. S., 1999. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 4**: 613-618.
- Birkhoj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H. R., Dalgaard, M. and Vinggaard, A. M., 2004. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* **201**(1): 10-20.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U. and Main, K. M., 2012. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* **355**(2): 240-248.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebaek, N. E. and Main, K. M., 2006. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* **154**(5): 599-611.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Grunfeld, H. T. and Gjermansen, I. M., 2005. Effect of pesticides on estrogen receptor transactivation in vitro: a comparison of stable transfected MVLN and transient transfected MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* **244**(1-2): 20-30.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V. and Vinggaard, A. M., 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* **115 Suppl 1**: 69-76.
- Borch, J., Axelstad, M., Vinggaard, A. M. and Dalgaard, M., 2006. Diisobutyl phthalate has comparable anti-androgenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicol Lett* **163**(3): 183-190.
- Borch, J., Dalgaard, M. and Ladefoged, O., 2005. Early testicular effects in rats perinatally exposed to DEHP in combination with DEHA--apoptosis assessment and immunohistochemical studies. *Reprod Toxicol* **19**(4): 517-525.
- Bustos-Obregon, E. and Gonzalez-Hormazabal, P., 2003. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J Androl* **5**(2): 105-107.
- Calaf, G. M. and Roy, D., 2008. Cancer genes induced by malathion and parathion in the presence of estrogen in breast cells. *Int J Mol Med* **21**(2): 261-268.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F. I. and Palozza, P., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* **211**(2): 87-96.
- Carbone, P., Giordano, F., Nori, F., Mantovani, A., Taruscio, D., Lauria, L. and Figa-Talamanca, I., 2007. The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. *Int J Androl* **30**(1): 3-13.
- Catenacci, G., Barbieri, F., Bersani, M., Fereoli, A., Cottica, D. and Maroni, M., 1993. Biological monitoring of human exposure to atrazine. *Toxicol Lett* **69**(2): 217-222.
- Cavieres, M. F., Jaeger, J. and Porter, W., 2002. Developmental toxicity of a commercial herbicide mixture in mice: I. Effects on embryo implantation and litter size. *Environ Health Perspect* **110**(11): 1081-1085.
- Cecconi, S., Paro, R., Rossi, G. and Macchiarelli, G., 2007. The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. *Curr Pharm Des* **13**(29): 2989-3004.
- Cedergreen, N., Christensen, A. M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Streibig, J. C. and Sorensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ Toxicol Chem* **27**(7): 1621-1632.
- Chakeredza, S., Edrada, R. A., Ebel, R. and ter Meulen, U., 2006. The metabolite products of chlorocholine chloride (CCC) in eggs and meat of laying hens fed ¹⁵N-CCC containing diets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **90**(3-4): 165-172.
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H. and Wang, X., 2002. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A* **65**(19): 1419-1435.
- Contreras, H. R. and Bustos-Obregon, E., 1999. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J Exp Zool* **284**(3): 355-359.
- Correia Carreira, S., Cartwright, L., Mathiesen, L., Knudsen, L. E. and Saunders, M., 2011. Studying placental transfer of highly purified non-dioxin-like PCBs in two models of the placental barrier. *Placenta* **32**(3): 283-291.

- Crawford, M. J., Croucher, A. and Hutson, D. H., 1981a. Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J Agric Food Chem* **29**(1): 130-135.
- Crawford, M. J., Croucher, A. and Hutson, D. H., 1981b. The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science* **12**(4): 399-411.
- Davison, S. L. and Bell, R., 2006. Androgen physiology. *Semin Reprod Med* **24**(2): 71-77.
- Dehm, S. M. and Tindall, D. J., 2007. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol Endocrinol* **21**(12): 2855-2863.
- Delescluse, C., Ledirac, N., de Sousa, G., Pralavorio, M., Lesca, P. and Rahmani, R., 1998. Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1/2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor. *Toxicol Lett* **96-97**: 33-39.
- Demirpence, E., Duchesne, M. J., Badia, E., Gagne, D. and Pons, M., 1993. MVLN cells: a bioluminescent MCE-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**(3): 355-364.
- Denison, M. S. and Nagy, S. R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 309-334.
- Denison, M. S., Phelan, D., Winter, G. M. and Ziccardi, M. H., 1998. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* **152**(2): 406-414.
- Diana, S. G., Resetarits jr., W. J., Schaeffer, D. J., Beckmen, K. B. and Beasley, V. R., 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities AQUATIC COMMUNITIES. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(12): 2961-2967.
- Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Carver, L. A., Swanson, H. I. and Bradfield, C. A., 1993. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* **44**(5): 911-917.
- Domico, L. M., Cooper, K. R., Bernard, L. P. and Zeevalk, G. D., 2007. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology* **28**(6): 1079-1091.
- Drenth, H. J., Bouwman, C. A., Seinen, W. and Van den Berg, M., 1998. Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol Appl Pharmacol* **148**(1): 50-55.
- Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S. and Wang, X., 2010. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol Sci* **116**(1): 58-66.
- Dybdahl, M., Nikolov, N. G., Wedebye, E. B., Jonsdottir, S. O. and Niemela, J. R., 2012. QSAR model for human pregnane X receptor (PXR) binding: Screening of environmental chemicals and correlations with genotoxicity, endocrine disruption and teratogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **262**(3): 301-309.
- Fisher, J. S., Macpherson, S., Marchetti, N. and Sharpe, R. M., 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod* **18**(7): 1383-1394.
- Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Denslow, N. D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H. and Grau, E. G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol* **60**(1-2): 101-110.
- Foster, W., Chan, S., Platt, L. and Hughes, C., 2000. Detection of Endocrine-Disrupting Chemicals in Samples of Second Trimester Human Amniotic Fluid. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**(8): 2954-2957.
- Fraitas, M. J. P., Narotsky, M. G., Best, D. S., Stoker, T. E., Davis, L. K., Goldman, J. M., Hotchkiss, M. G., Klinefelter, G. R., Kamel, A., Qian, Y., Podhorniak, L. and Cooper, R. L., 2011. Gestational atrazine exposure: Effects on male reproductive development and metabolite distribution in the dam, fetus, and neonate. *Reproductive Toxicology* **32**(1): 52-63.
- Friedmann, A. S., 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod Toxicol* **16**(3): 275-279.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J. Y., Saulnier, D. and Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol* **84**(1): 92-102.
- Gao, W., Bohl, C. E. and Dalton, J. T., 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev* **105**(9): 3352-3370.

- Gasiewicz, T. A., Henry, E. C. and Collins, L. L., 2008. Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**(4): 279-321.
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V., 1990. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **50**(17): 5488-5496.
- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R. and Dunkelberg, H., 1997. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Arch Toxicol* **71**(3): 193-197.
- Ghisari, M. and Bonefeld-Jorgensen, E. C., 2005. Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **244**(1-2): 31-41.
- Ghisari, M. and Bonefeld-Jorgensen, E. C., 2009. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol Lett* **189**(1): 67-77.
- Giri, S., Prasad, S. B., Giri, A. and Sharma, G. D., 2002. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutat Res* **514**(1-2): 223-231.
- Goetz, A. K., Bao, W., Ren, H., Schmid, J. E., Tully, D. B., Wood, C., Rockett, J. C., Narotsky, M. G., Sun, G., Lambert, G. R., Thai, S. F., Wolf, D. C., Nesnow, S. and Dix, D. J., 2006. Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* **215**(3): 274-284.
- Goetz, A. K., Ren, H., Schmid, J. E., Blystone, C. R., Thillainadarajah, I., Best, D. S., Nichols, H. P., Strader, L. F., Wolf, D. C., Narotsky, M. G., Rockett, J. C. and Dix, D. J., 2007. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicol Sci* **95**(1): 227-239.
- Grunfeld, H. T. and Bonefeld-Jorgensen, E. C., 2004. Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicol Lett* **151**(3): 467-480.
- Gultom, D., Songsang, A. and Ter Meulen, U., 2001. The effect of chlorocholine chloride (CCC) inclusion in the diets of growing hens on growth rate, oestrogen levels and the onset of lay. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **85**(1-2): 1-8.
- Hahn, M. E., Lamb, T. M., Schultz, M. E., Smolowitz, R. M. and Stegeman, J. J., 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology* **26**(3-4): 185-208.
- Hass, U., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Vinggaard, A. M., Taxvig, C., Poulsen, M. E., Herrmann, S. S., Jensen, B. H., Petersen, A., Clemmensen, L. H. and Axelstad, M., 2012. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol* **34**(2): 261-274.
- Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., de Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V. S., Luque, E. H., McCoy, K. A., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C. A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L. E., Trudeau, V. L., Victor-Costa, A. B. and Willingham, E., 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **127**(1-2): 64-73.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T. and Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(10): 4612-4617.
- Healy, C. E., Heydens, W. F. and Naylor, M. W., 2004. Mammalian toxicology overview and human risk assessment for sulfosulfuron. *Regul Toxicol Pharmacol* **39**(3): 310-324.
- Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A. M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellesmann, C., Higley, E., Newsted, J., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Maletz, S., Giesy, J. and Timm, G., 2011. The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. *Environ Sci Pollut Res Int* **18**(3): 503-515.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M. and Gustafsson, J. A., 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* **87**(3): 905-931.
- Hinfray, N., Porcher, J. M. and Brion, F., 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **144**(3): 252-262.

- Hofmeister, M. V. and Bonfeld-Jorgensen, E. C., 2004. Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor alpha and beta mRNA levels analyzed by on-line RT-PCR. *Toxicol In Vitro* **18**(4): 427-433.
- Hollert, H. and Giesy, J., 2007. The OECD Validation Program of the H295R Steroidogenesis Assay for the Identification of In Vitro Inhibitors and Inducers of Testosterone and Estradiol Production. Phase 2: Inter-Laboratory Pre-Validation Studies (8 pp). *Environ Sci Pollut Res Int* **14 Suppl 1**: 23-30.
- Howdeshell, K. L., 2002. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 3**: 337-348.
- Hurley, P. M., 1998. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect* **106**(8): 437-445.
- INCHEM. (1998). Propiconazole (JMPPR Evaluations. Part II Toxicological). from www.inchem.org.
- Ishihara, A., Nishiyama, N., Sugiyama, S. and Yamauchi, K., 2003. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen Comp Endocrinol* **134**(1): 36-43.
- Jacobsen, P. R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., Mandrup, K. R., Berthelsen, L. O., Vinggaard, A. M. and Hass, U., 2012. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol* **34**(2): 237-250.
- Jaensson, A., Scott, A. P., Moore, A., Kylin, H. and Olsen, K. H., 2007. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquat Toxicol* **81**(1): 1-9.
- Jensen, G. E., Niemela, J. R., Wedebye, E. B. and Nikolov, N. G., 2008. QSAR models for reproductive toxicity and endocrine disruption in regulatory use--a preliminary investigation. *SAR QSAR Environ Res* **19**(7-8): 631-641.
- Jia, M. H., Larossa, R. A., Lee, J. M., Rafalski, A., Derose, E., Gonye, G. and Xue, Z., 2000. Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol Genomics* **3**(2): 83-92.
- Jiang, Y.-z., Wang, K., Fang, R. and Zheng, J., 2010. Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **58**(8): 679-685.
- Jones, M. E., Boon, W. C., Proietto, J. and Simpson, E. R., 2006. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol Metab* **17**(2): 55-64.
- Kackar, R., Srivastava, M. K. and Raizada, R. B., 1997a. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind Health* **35**(1): 104-111.
- Kackar, R., Srivastava, M. K. and Raizada, R. B., 1997b. Studies on rat thyroid after oral administration of mancozeb: morphological and biochemical evaluations. *J Appl Toxicol* **17**(6): 369-375.
- Kim, I. Y., Shin, J. H., Kim, H. S., Lee, S. J., Kang, I. H., Kim, T. S., Moon, H. J., Choi, K. S., Moon, A. and Han, S. Y., 2004. Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using in vitro combination assays. *J Reprod Dev* **50**(2): 245-255.
- Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Andersen, H. R. and Nellemann, C., 2010a. Mixture effects of endocrine disrupting compounds in vitro. *Int J Androl* **33**(2): 425-433.
- Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A. M. and Andersen, H. R., 2010b. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol* **30**(4): 573-582.
- Komarek, M., Cadkova, E., Chrastny, V., Bordas, F. and Bollinger, J. C., 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* **36**(1): 138-151.
- Kornilovskaya, I. N., Gorelaya, M. V., Usenko, V. S., Gerbilsky, L. V. and Berezin, V. A., 1996. Histological studies of atrazine toxicity on the thyroid gland in rats. *Biomed Environ Sci* **9**(1): 60-66.
- Kortenkamp, A. and Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *Sci Total Environ* **221**(1): 59-73.
- Kristensen, P., Irgens, L. M., Andersen, A., Bye, A. S. and Sundheim, L., 1997. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology* **8**(5): 537-544.
- Kruger, T., Long, M. and Bonfeld-Jorgensen, E. C., 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* **246**(2-3): 112-123.

- Ksheerasagar, R. L. and Kaliwal, B. B., 2003. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **15**(1): 9-17.
- Laier, P., Metzdorff, S. B., Borch, J., Hagen, M. L., Hass, U., Christiansen, S., Axelstad, M., Kledal, T., Dalgaard, M., McKinnell, C., Brokken, L. J. and Vinggaard, A. M., 2006. Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicol Appl Pharmacol* **213**(2): 160-171.
- Lang, D., Criegee, D., Grothusen, A., Saalfrank, R. W. and Böcker, R. H., 1996. In vitro metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in rats, pigs, and humans. *Drug Metabolism and Disposition* **24**(8): 859-865.
- Langhammer, M., Kuhla, S., Schneider, F., Renne, U., Spitschak, M. and Hagemeister, H., 1999. Zum Einfluss von Chlorcholinchlorid-behandeltem Weizen auf ausgewählte Parameter der Fruchtbarkeit weiblicher Mäuse. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **18**: 190-202.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J. M. and Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* **228**(1): 98-108.
- Lindh, C. H., Littorin, M., Amilon, A. and Jonsson, B. A., 2008. Analysis of phenoxyacetic acid herbicides as biomarkers in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(2): 143-150.
- Liu, P., Song, X., Yuan, W., Wen, W., Wu, X., Li, J. and Chen, X., 2006. Effects of cypermethrin and methyl parathion mixtures on hormone levels and immune functions in Wistar rats. *Arch Toxicol* **80**(7): 449-457.
- Long, M., Andersen, B. S., Lindh, C. H., Hagmar, L., Giwercman, A., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Spano, M., Toft, G., Pedersen, H. S., Zvezday, V., Bonde, J. P. and Bonfeld-Jorgensen, E. C., 2006. Dioxin-like activities in serum across European and Inuit populations. *Environ Health* **5**: 14.
- Long, M., Laier, P., Vinggaard, A. M., Andersen, H. R., Lynggaard, J. and Bonfeld-Jorgensen, E. C., 2003. Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology* **194**(1-2): 77-93.
- Lucas, A. D., Jones, A. D., Goodrow, M. H., Saiz, S. G., Blewett, C., Seiber, J. N. and Hammock, B. D., 1993. Determination of atrazine metabolites in human urine: development of a biomarker of exposure. *Chem Res Toxicol* **6**(1): 107-116.
- Luccio-Camelo, D. C. and Prins, G. S., 2011. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(1-2): 74-82.
- Luzardo, O. P., Mahtani, V., Troyano, J. M., Álvarez de la Rosa, M., Padilla-Pérez, A. I., Zumbado, M., Almeida, M., Burillo-Putze, G., Boada, C. and Boada, L. D., 2009. Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environmental Research* **109**(5): 607-613.
- Mahadevaswami, M. P., Jadaramkunti, U. C., Hiremath, M. B. and Kaliwal, B. B., 2000. Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. *Reprod Toxicol* **14**(2): 127-134.
- Maiti, P. K., Kar, A., Gupta, P. and Chaurasia, S. S., 1995. Loss of Membrane Integrity and Inhibition of Type-I Iodothyronine 5'-Monodeiodinase Activity by Fenvalerate in Female Mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **214**(3): 905-909.
- Mathiesen, L., Mose, T., Morck, T. J., Nielsen, J. K., Nielsen, L. K., Maroun, L. L., Dziegiel, M. H., Larsen, L. G. and Knudsen, L. E., 2010. Quality assessment of a placental perfusion protocol. *Reprod Toxicol* **30**(1): 138-146.
- McCarthy, A. R., Thomson, B. M., Shaw, I. C. and Abell, A. D., 2006. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J Environ Monit* **8**(1): 197-202.
- McCarthy, M. M., 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* **88**(1): 91-124.
- Mnif, W., Hassine, A. I., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O. and Roig, B., 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* **8**(6): 2265-2303.
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N. and Nawata, H., 2004. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* **145**(4): 1860-1869.

- Mose, T., Kjaerstad, M. B., Mathiesen, L., Nielsen, J. B., Edelfors, S. and Knudsen, L. E., 2008. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. *J Toxicol Environ Health A* **71**(15): 984-991.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mueller, S. O., 2004. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem* **378**(3): 582-587.
- Murkunde, Y. V., Sathya, T. N., Subashini, N. and Murthy, P. B., 2012. Transplacental genotoxicity evaluation of cypermethrin using alkaline comet assay. *Hum Exp Toxicol* **31**(2): 185-192.
- Myllynen, P., Mathiesen, L., Weimer, M., Annola, K., Immonen, E., Karttunen, V., Kummu, M., Morck, T. J., Nielsen, J. K., Knudsen, L. E. and Vahakangas, K., 2010. Preliminary interlaboratory comparison of the ex vivo dual human placental perfusion system. *Reprod Toxicol* **30**(1): 94-102.
- Nellemann, C., Dalgaard, M., Holst, B., Bonefeld-Jorgensen, E. C. and Vinggaard, A. M., 2005. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Mol Cell Endocrinol* **237**(1-2): 25-35.
- Nellemann, C., Dalgaard, M., Lam, H. R. and Vinggaard, A. M., 2003. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicol Sci* **71**(2): 251-262.
- Nguyen, J. V., Olsson, A. O., Bravo, R., Needham, L. L. and Barr, D. B., 2007. Quantification of atrazine, phenylurea, and sulfonylurea herbicide metabolites in urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **31**(4): 181-186.
- O'Brien, P. J., Irwin, W., Diaz, D., Howard-Cofield, E., Krejsa, C. M., Slaughter, M. R., Gao, B., Kaludercic, N., Angeline, A., Bernardi, P., Brain, P. and Hougham, C., 2006. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol* **80**(9): 580-604.
- O'Keefe, D. P., Gibson, K. J., Emptage, M. H., Lenstra, R., Romesser, J. A., Litle, P. J. and Omer, C. A., 1991. Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. *Biochemistry* **30**(2): 447-455.
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Soya, Y. and Kano, I., 2004. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. *Arch Environ Contam Toxicol* **46**(4): 445-453.
- Olson, L. J. and Hinsdill, R. D., 1984. Influence of feeding chlorocholine chloride and glyphosine on selected immune parameters in deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *Toxicology* **30**(2): 103-114.
- Orton, F., Lutz, I., Kloas, W. and Routledge, E. J., 2009. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environ Sci Technol* **43**(6): 2144-2150.
- Ostrea, E. M., Jr., Reyes, A., Villanueva-Uy, E., Pacifico, R., Benitez, B., Ramos, E., Bernardo, R. C., Bielawski, D. M., Delaney-Black, V., Chiodo, L., Janisse, J. J. and Ager, J. W., 2012. Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. *Neurotoxicology* **33**(4): 669-675.
- Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M. and Kortenkamp, A., 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ Health Perspect* **108**(10): 983-987.
- Pedersen, M., Halldorsson, T. I., Mathiesen, L., Mose, T., Brouwer, A., Hedegaard, M., Loft, S., Kleinjans, J. C., Besselink, H. and Knudsen, L. E., 2010. Dioxin-like exposures and effects on estrogenic and androgenic exposures and micronuclei frequency in mother-newborn pairs. *Environ Int* **36**(4): 344-351.
- Poland, A. and Knutson, J. C., 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **22**: 517-554.
- Porter, W. P., Hinsdill, R., Fairbrother, A., Olson, L. J., Jaeger, J., Yuill, T., Bisgaard, S., Hunter, W. G. and Nolan, K., 1984. Toxicant-disease-environment interactions associated with suppression of immune system, growth, and reproduction. *Science* **224**(4652): 1014-1017.
- Poulsen, M. S., Rytting, E., Mose, T. and Knudsen, L. E., 2009. Modeling placental transport: correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicol In Vitro* **23**(7): 1380-1386.

- Rademacher, W., 2000. GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 501-531.
- Rifkind, A. B., 2006. CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. *Drug Metab Rev* **38**(1-2): 291-335.
- Roberge, M., Hakk, H. and Larsen, G., 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol Lett* **154**(1-2): 61-68.
- Safe, S., 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* **21**(1): 51-88.
- Sakurai, A., Nakai, A. and DeGroot, L. J., 1989. Expression of Three Forms of Thyroid Hormone Receptor in Human Tissues. *Molecular Endocrinology* **3**(2): 392-399.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W. and van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**(1): 44-54.
- 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**(1): 121-127.
- Schmidt, J. V. and Bradfield, C. A., 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 55-89.
- Sergent, T., Dupont, I., Jassogne, C., Ribonnet, L., van der Heiden, E., Scippo, M. L., Muller, M., McAlister, D., Pussemier, L., Larondelle, Y. and Schneider, Y. J., 2009. CYP1A1 induction and CYP3A4 inhibition by the fungicide imazalil in the human intestinal Caco-2 cells-comparison with other conazole pesticides. *Toxicol Lett* **184**(3): 159-168.
- Skakkebaek, N. E., 2003. Testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res* **60 Suppl 3**: 49.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* **16**(5): 972-978.
- Song, L., Wang, Y. B., Sun, H., Yuan, C., Hong, X., Qu, J. H., Zhou, J. W. and Wang, X. R., 2008. Effects of fenvalerate and cypermethrin on rat sperm motility patterns in vitro as measured by computer-assisted sperm analysis. *J Toxicol Environ Health A* **71**(5): 325-332.
- Songsang, A., Chakeredza, S., Thinggaard, G., Vearasilp, T. and ter Meulen, U., 2002. Distribution of ¹⁵N-chlorocholine chloride in eggs of laying hens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **86**(5-6): 129-136.
- Sorensen, M. T. and Danielsen, V., 2006. Effects of the plant growth regulator, chlormequat, on mammalian fertility. *Int J Androl* **29**(1): 129-133.
- Sorensen, M. T., Poulsen, M. E., Leffers, H., Vajta, G. and Halekoh, U., 2009. No effect of the plant growth regulator, chlormequat, on boar fertility. *Animal* **3**(5): 697-702.
- Soto, A. M., Chung, K. L. and Sonnenschein, C., 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* **102**(4): 380-383.
- Sottani, C., Bettinelli, M., Lorena Fiorentino, M. and Minoia, C., 2003. Analytical method for the quantitative determination of urinary ethylenethiourea by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**(20): 2253-2259.
- Stoker, T. E., Laws, S. C., Guidici, D. L. and Cooper, R. L., 2000. The Effect of Atrazine on Puberty in Male Wistar Rats: An Evaluation in the Protocol for the Assessment of Pubertal Development and Thyroid Function. *Toxicological Sciences* **58**(1): 50-59.
- Sumbayev, V. V., Bonfeld-Jorgensen, E. C., Wind, T. and Andreasen, P. A., 2005. A novel pesticide-induced conformational state of the oestrogen receptor ligand-binding domain, detected by conformation-specific peptide binding. *FEBS Lett* **579**(2): 541-548.
- Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., Kruse, R. L., Calafat, A. M., Mao, C. S., Redmon, J. B., Ternand, C. L., Sullivan, S. and Teague, J. L., 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* **113**(8): 1056-1061.

- Tarja, N., Kirsti, E., Marja, L. and Kari, E., 2003. Thermal and metabolic factors affecting bioaccumulation of triazine herbicides by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol* **18**(4): 219-226.
- Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H. R. and Vinggaard, A. M., 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci* **100**(2): 464-473.
- Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Hass, U., Axelstad, M., Metzдорff, S. and Nellemann, C., 2008. Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int J Androl* **31**(2): 170-177.
- Torner, H., Blottner, S., Kuhla, S., Langhammer, M., Alm, H. and Tuchscherer, A., 1999. Influence of chlorocholinechloride-treated wheat on selected in vitro fertility parameters in male mice. *Reprod Toxicol* **13**(5): 399-404.
- Trivedi, N., Kakkar, R., Srivastava, M. K., Mithal, A. and Raizada, R. B., 1993. Effect of oral administration of fungicide-mancozeb on thyroid gland of rat. *Indian J Exp Biol* **31**(6): 564-566.
- Trosken, E. R., Fischer, K., Volkel, W. and Lutz, W. K., 2006. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* **219**(1-3): 33-40.
- Tully, D. B., Bao, W., Goetz, A. K., Blystone, C. R., Ren, H., Schmid, J. E., Strader, L. F., Wood, C. R., Best, D. S., Narotsky, M. G., Wolf, D. C., Rockett, J. C. and Dix, D. J., 2006. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* **215**(3): 260-273.
- Ujhazy, E., Sadlonova, I., Dubovicky, M., Mach, M., Muckova, M. and Flaskarova, E., 2006. Teratological study of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in rabbits. *J Appl Toxicol* **26**(4): 368-373.
- Vinggaard, A. M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M. E., Breinholt, V., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Dalgaard, M., Nellemann, C. and Hass, U., 2005a. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol Sci* **85**(2): 886-897.
- Vinggaard, A. M., Hnida, C., Breinholt, V. and Larsen, J. C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro* **14**(3): 227-234.
- Vinggaard, A. M., Jacobsen, H., Metzдорff, S. B., Andersen, H. R. and Nellemann, C., 2005b. Antiandrogenic effects in short-term in vivo studies of the fungicide fenarimol. *Toxicology* **207**(1): 21-34.
- Vinggaard, A. M., Nellemann, C., Dalgaard, M., Jorgensen, E. B. and Andersen, H. R., 2002. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol Sci* **69**(2): 344-353.
- Vinggaard, A. M., Niemela, J., Wedebye, E. B. and Jensen, G. E., 2008. Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure-activity relationship model for androgen receptor antagonism. *Chem Res Toxicol* **21**(4): 813-823.
- Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S. R., Divya, G. and Roy, P., 2010. Antiandrogenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J Steroid Biochem Mol Biol* **120**(1): 22-29.
- Weidner, I. S., Moller, H., Jensen, T. K. and Skakkebaek, N. E., 1998. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* **106**(12): 793-796.
- Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C. and Pflugmacher, S., 2001. Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* **49**(3): 199-205.
- Wohlfahrt-Veje, C., Main, K. M., Schmidt, I. M., Boas, M., Jensen, T. K., Grandjean, P., Skakkebaek, N. E. and Andersen, H. R., 2011. Lower birth weight and increased body fat at school age in children prenatally exposed to modern pesticides: a prospective study. *Environ Health* **10**: 79.
- Xu, L. C., Liu, L., Ren, X. M., Zhang, M. R., Cong, N., Xu, A. Q. and Shao, J. H., 2008. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro. *Toxicology* **243**(1-2): 59-65.
- Xu, X., Dailey, A. B., Talbott, E. O., Ilacqua, V. A., Kearney, G. and Asal, N. R., 2010. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in U.S. adults. *Environ Health Perspect* **118**(1): 60-66.

- Yousef, M. I., El-Demerdash, F. M. and Al-Salhen, K. S., 2003. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *J Environ Sci Health B* **38**(4): 463-478.
- Zarn, J. A., Bruschweiler, B. J. and Schlatter, J. R., 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect* **111**(3): 255-261.
- Zhu, J. L., Hjollund, N. H., Andersen, A.-M. N. and Olsen, J., 2006. Occupational Exposure to Pesticides and Pregnancy Outcomes in Gardeners and Farmers: A Study Within the Danish National Birth Cohort. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **48**(4): 347-352 310.1097/1001.jom.0000201566.0000242186.0000201565f.
- Zoeller, T. R., Dowling, A. L., Herzig, C. T., Iannacone, E. A., Gauger, K. J. and Bansal, R., 2002. Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 3**: 355-361.

Bilag 1: Oversigt over bekæmpelsesmidler der anvendes i Danmark vurderet i forbindelse med hormonforstyrrende effekter.

<i>Pesticid</i>	<i>Anvendelse/ afgrøde</i>	<i>Behandlet areal ha Landbrug</i>	<i>Forbrug i DK 2006 (kg)</i>	<i>Analysemetode i blod eller urin</i>	<i>Effekt</i>	<i>Sprøjetidspunkt</i>	<i>Pesticid Valgt til undersøgelse</i>
Herbicider							
Phenoxyryer					CANCER. Kromosom afvigelse <i>in vitro</i> Phenoxyacetic acids i urin fra arbejdere efter exp. 0.000 - 0.055 mmol/l.		
<i>Dichlorprop-P</i>	Kun i private græsplæner		1.090	Ja (moderstof)			
1. MCPA	Korn/frøgræs/græs/ærter	204.144	315-159	Ja (moderstof + metabolitter)	Cancer Hæmning af immunforsvar Endokrine forstyrrelser	forår	Valgt til undersøgelse CAS 94-74-6
<i>Mechlorprop (mecoprop)</i>	Kun i etablerede græsplæner		0	Ja (moderstof + metabolitter)			
Triaziner							
2. Terbutylazin	Majs	33.136	38.106	Ja (metabolitter)	Modulering af immunforsvar Endokrine forstyrrelser Genotoksicitet i mus/rotter	Sen. 90 d. f. høst	Valgt til studiet CAS 5915-41-3
Sulfonylurea*							
<i>Amidosulfuron</i>	Korn/græs	4.940	225	Ja (metabolitter)		forår	
<i>Flupyr-sulfuron-methyl</i>	korn	24.100	241	Ja (metabolitter)		Sen. 3 mdr. f. høst	
<i>Foramsulfuron</i>	Fodermajs/ juletræer	25.256	2.373	Ja (metabolitter)		Sen. 4 mdr. f. høst	
3. Iodosulfuron-methyl-natrium	Korn/fodermajs/juletræer	147.021	1.036	Ja (metabolitter)	-		Valgt til studiet CAS 144550-36-7
4. Mesosulfuron-methyl	korn	27.182	299	Ja (metabolitter)	-	Sen. 3 mdr. f. høst	Valgt til studiet CAS 208465-21-8
5. Metsulfuron-methyl	Korn	128.800	736	Ja (metabolitter)	-	forår	Valgt til studiet CAS 74223-64-6
<i>Rimsulfuron</i>	Kartofler	25.200	189	Ja (metabolitter)		Sen. 30 d. f. høst	
<i>Thifensulfuron methyl</i>	Korn/fodermajs/græs/helsæd	24.573	430	Ja (metabolitter)			

Pesticid	Anvendelse/ afgrøde	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Analysemetode i blod eller urin	Effekt	Sprøjtetidspunkt	Pesticid Valgt til undersøgelse
<i>Triasulfuron</i>	Korn/rajræs		0	Ja (metabolitter)			
<i>Tribenuron-methyl</i>	Korn/frøgræs	247.867	1.859	Ja (metabolitter)	Svagt østrogen		
<i>Triflusaluron-methyl</i>	Bederøer	12.156	547	Ja (metabolitter)		Sen. 3 mdr. f. høst	
Vækstregulering							
<i>1-naphthyleddikesyre</i>	Roddanner		33	Nej		Væksthuse	
6. Chlormequat chlorid	korn	125.340	141.382	Nej	Immun- og neuroforstyrrelser mulig hormonforstyrrende		Valgt til studiet for TH, AHR og H295R analyser CAS 7003-89-6
Fungicider				3,5-dichloroaniline som en biomarkør for vinclozolin og iprodione in human urin	Iprodione: potentiale til at forårsage celle proliferation og/eller inflammatoriske reaktioner (c-fos, NF-kB), proteotoksiske effekter (HSP70, GRP78), metabolisk forstyrrelse (CRE), og DNA skader (GADD45, GADD153).		
Imidazoler					Neuro/adfærdsmæssige deficits Genotoksisk/DNA skader i gær Fungicidet mancozeb: effekter på immunsystem i italienske vingårds arbejdere		
<i>Imazalil</i>	Korn/tomat/agurk/prydplanter		9.014	Nej		Bejdsning/ Væksthuse	
<i>Prochloraz</i>			0	Ja (metabolitter)		udgået	
Triazoler					Neurotoksisk/ændring i adfærd v rotter; Effekter på gener involveret i oxidativ metabolisme samt gener v. thyroid cancer relevant for human/rotte		
7. Bitertanol	Vinterbyg		16.066	Nej	-	Bejdsning	Valgt til studiet CAS 55179-31-2
<i>Difenoconazol</i>	Korn		1.725	Nej		Bejdsning	

Pesticid	Anvendelse/ afgrøde	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Analysemetode i blod eller urin	Effekt	Sprøjtetidspunkt	Pesticid Valgt til undersøgelse
<i>Epoxiconazol</i>	Korn/bederoer/sukkerroer	339.456	42.433	Nej		Sen. 5/4 uger f. høst	
<i>Metconazol</i>	Korn		0	Nej		Sen. 35 d. f. høst	
8. Propiconazol	Korn/frøgræs/bederoer	122.704	24.492	Nej	Aromatase hæmmer Endokrine forstyrrelser Ændringer i genekspression af P450 og steroidhormon-relaterede gener		Valgt til studiet CAS 60207-90-1
9. Prothioconazol	Korn	36.975	7.395	Nej	-		Valgt til studiet CAS178928-70-6
<i>Tebuconazol</i>	Korn, frøgræs, raps, roser og prydplanter	66.906	21.760	Nej			
Alkylebis (dithiocarbamat)							
10. Mancozeb	Kartofler/div. grønt/div. frugt/afsvampning af blomsterløg	212.168	352.977	Ja (Ethylenethiourea, ETU)	Cellulær stress Neurotoksicitet Forstyrrelse af østrogen cyklus i rotter		Valgt til studiet for in vitro analyser CAS 8018-01-7
Insekticider							
Pyrethroider					Hormonforstyrrende; antiandrogen		
<i>Alpha-cypermethrin</i>	Korsblomstrede/korn/græs/diverse grønt/diverse frugt/prydplanter	155.700	2.073	Ja (metabolitter)		Friland og væksthuse	
<i>Betacyfluthrin</i>	Sukkerroer/raps	?	496	Ja (metabolitter)		Bejdsning	
11. Cypermethrin	Div. afgrøder: landbrug/frugtavl/gartneri/skovbrug	499.614	7.878	Ja (metabolitter)	Kontroversielle data for østrogene effekter; Immune effekter i rotter; Effekter på reproduktionsmarkører i gnavere		Valgt til studiet CAS 97955-44-7
<i>Esfenvalerat(e)</i>	Nåletræer v. rodhals		73	Ja (metabolitter)			
<i>Lambda-cyhalothrin</i>	Korn/korsblomstrede frøafgrøder/diverse grønt og frugt/skovbrug/planteskoler	88.820	710	Ja (metabolitter)			
12. Tau fluvalinat	Hvede/raps/sennep/ærter	162.244	9.536	Ja (metabolitter)			Valgt til studiet

<i>Pesticid</i>	<i>Anvendelse/ afgrøde</i>	<i>Behandlet areal ha Landbrug</i>	<i>Forbrug i DK 2006 (kg)</i>	<i>Analysemetode i blod eller urin</i>	<i>Effekt</i>	<i>Sprøjtetidspunkt</i>	<i>Pesticid Valgt til undersøgelse</i>
							CAS 102851-06-9
<i>Tefluthrin</i>	Raps/bederoer	?	375	Ja (metabolitter)		Bejdsning	
Organofosfater					Akut toksicitet – respirationssystem – død; Effekt på human reproduktion mistænkt; Forstyrrelser på den mentale udvikling hos børn; Hoppin 2006: respirationstoksisk for brugere		
<i>Dimethoat(e)**</i>	prydplanter	117.907	37.372	Ja (metabolitter)		Væksthuse og friland	
13. Malathion	Diverse afgrøder landbrug/gartneri/frugtavl	1.185	16.186	Ja (metabolitter)	Neurotoksitet Endokrine forstyrrelser		Valgt til studiet CAS 121-75-5
<i>Phosalon(e)</i>	Kærnefrugt/prydplanter		0	Ja (metabolitter)	Effekter på lever phosphataser		

* Metabolitter af sulfonylurea (ikke specifikke for den enkelte stof, men for hele gruppen) kan måles i urin (Nguyen et al., 2007). **Dimethoat har tidligere været godkendt til en række spiselige afgrøder, men denne anvendelse er afmeldt.

De foreslåede pesticider til analyse i det ansøgte projekt er primært baseret på 1) anvendelse ude i miljøet (landmænd), 2) behandlet areal (ha) i landbrug, 3) forbrug i DK (kg) i 2006

Bilag 2: Oversigt over de valgte pesticider og deres effekter baseret på tidligere litteratur søgning, de nye EU Assessment Reports og ny PubMed søgning.

<i>Pesticid / Kemisk gruppe</i>	<i>Behandlet areal ha Landbrug</i>	<i>Forbrug i DK 2006 (kg)</i>	<i>Effekter fra Pubmed</i>	<i>Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports</i>	<i>A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)</i>
Herbicider					
Phenoxytsyre					
1. MCPA	204.144	315.159	<p>Cancer</p> <p>Hæmning af immunforsvar</p> <p>Endokrine forstyrrelser (Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Nye artikler: Ingen ER/AR forstyrrende effekt i ER / AR analyser i gær celler. Men pesticidet øgede testosteron koncentrationen i oocyte frø celler (Orton et al., 2009).</p>	<p><u>Acute toxicity:</u> moderate in rats, dermal in rabbits, ↑organ weight (liver and spleen)</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (In total 6 studies: rats, mice, dogs and rabbits, from 28 days to 3 months), ↑liver and kidney size, ↓ body weight gain at high doses, signs of anemia (rat, mice, dog).</p> <p><u>Genotoxicity in vitro/vivo:</u> No genotoxicity in bacterial or mammalian systems, no chromosome damaging effect <i>in vivo</i>. Only clastogenic¹ effect after S-9 mix activation at cytotoxic effects and weak sister chromatid exchange in Chinese hamster (bone marrow chromosome)</p> <p><u>Long term toxicity:</u> (in rats, mice and dog), Target organ was the kidney, sign and liver toxicity in rats.</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (one 2-generation study in rats), No fertility/reproductive effects (up to 450 ppm), ↓ body weight and body weight gain in adults/pups. No embryo toxic effects. In some studies maternal toxicity were seen.</p> <p><u>Developmental studies:</u> (4 studies in rats, 4 in rabbits, 1 in mouse), ↓ fetal weight of rats, maternal toxicity in Wistar rats (at 120 mg/kg bw): ↑kidney weight and ↓uterus/placental weight</p> <p><u>Neurotoxicity:</u> Impaired motor activity in high dose Wistar female/male rats, the delayed neurotoxicity was due to systematic toxicity and not selective neurotoxicity</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af MCPA's hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Ud over det ene <i>in vitro</i> forsøg (Orton et al. 2009) findes der til vores kendskab stadig ingen specifikke undersøgelser for MCPA's hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>, og derfor bør undersøges nærmere. Der er kun fremlagt et enkelt reproduktionsstudie i EU assessment reports.</p>
Triazinier					

¹ Damages to chromosomes, such as breaks, rearrangements and changes in number

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
2. Terbutylazin	33.136	38.106	<p>Modulering af immunforsvar</p> <p>Endokrine forstyrrelser</p> <p>Genotoksisk mus/rotter</p> <p>(Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Nye artikler:</p> <p>ER-E2 binding ikke forstyrret (Roberge et al., 2004)</p>	<p><u>Acute toxicity:</u> (rat/rabbit), low toxicity</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (In total 9 studies: rat, mouse, dog, rabbit) no clear target organs, ↓ body weight gain, at high doses: ↑ liver size, ↓ ovaries and ↓ thymus weight in high dose rats, anemia.</p> <p><u>Genotoxicity:</u> No mutagenicity <i>in vitro/in vivo</i>; Only sign of cytogenicity in one of the two mammalian cell mutagenicity assays in V79 Chinese hamster cells gave positive results (before metabolic activation, 600-800 µg / ml).</p> <p><u>Long term toxicity:</u> (3 studies in rats and 3 in mouse), ↓ weight gain, increased incidences of mammary gland carcinoma/adenocarcinoma in female rats (at top dose level of 750 ppm (equivalent to 41.5 mg/kg bw/d); and 120 ppm (equivalent to 7.6 mg/kg bw/d). An increased incidence of Leydig cell tumours at the top dose level within the laboratory's historical control range.</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (2 Multi-generation studies in rats): ↓ body weight gain and food consumption (Primary parental and offspring effects), ↓ pup viability, reproductive toxicity in CD rats: ↓ in the number of pregnant rats (300 ppm). Fertility unaffected in Wistar rats (200 ppm).</p> <p><u>Developmental studies:</u> (2 studies in rats, 3 in rabbits): Some maternal toxicity in rats and minor fetal toxicity (minor skeletal effects, septal defects). In rabbits: maternal toxicity but unaffected litter size.</p> <p><u>Neurotoxicity:</u> No evidence</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af terbutylazin's hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro, ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Der er ikke fundet specifikke data for undersøgelser af terbutylazin's hormonforstyrrende potentiale, udover et studie som viser at terbutylazin ikke forstyrre E2-ER bindingen <i>in vitro</i> (fluorescence polarisering). Stoffet bør undersøges nærmere, da der er observeret øget kræft i brystet og Leydig celler, og nedsat fertilitet hos rotter.</p> <p><u>Kommentar:</u> Da atrazin, som har næsten den samme struktur som terbutylazin, er rapporteret (ansøgnings tekst) at inducerer aromatase aktiviteten, kan den øgede brystkræft måske hænge sammen med en øget østrogen produktion i brystceller</p>
Sulfonylurea					
3. Iodosulfuron-methyl-natrium	147.021	1.036	<p>Ingen studier</p>	<p><u>Short term toxicity:</u> (three 90-day studies in rat, mouse, dog) ↓ body weight gains ↓ red blood cell parameters especially in females at 1000 ppm and at higher dose levels also in male rats, slight hepatocyte enlargement (1000 ppm and above). In mice: ↑ liver weight and hepatocyte enlargement, dose-dependent decrease of plasma cholesterol levels (at 700 ppm).</p> <p><u>Genotoxicity:</u> (five <i>in vitro/in vivo</i> studies) Not mutagenic</p> <p><u>Long term toxicity:</u> (two studies in rat and mouse), No oncogenic in rats/mouse</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (one 2-generation study in Wistar rats, 1996) No effect on fertility,</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticids hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro, ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Samme konklusion som før reevaluering. Dog skal der med i overvejslen medtages at der i et rotteforsøg ingen direkte relation fundet til fertilitet. Dog vil de foreslåede <i>in vitro/ex vivo/in vivo</i> analyser yderligere belyse stoffets hormon forstyrrende potentiale</p>

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
				<p>reproduction, estrus cycle, mating behaviour (up to 5000 ppm). At high doses ↓ bodyweight (parents) and ↑ mortality (offspring).</p> <p><u>Developmental toxicity</u>: retarded skeletal ossification in rat and rabbit offsprings.</p> <p><u>Delayed neurotoxicity</u>: NO</p>	
4. Mesosulfuron-methyl	27.182	299	Ingen studier	<p><u>Short term toxicity</u>: No toxicity (3 studies in dogs and 1 in rat), (dose up to 1000 mg/kg bw/day).</p> <p><u>No genotoxicity/oncogenicity</u></p> <p><u>Reproductive toxicity</u>: (one 2-generation study, 2000), No effects on reproductive performances (oestrous cycles, mating, pregnancy rates, gestation) in parental generation, No abnormal organs (liver, kidney, brain, ovaries, uterus). No effects on the off springs (NOAEL 16000 ppm). In parental and F1 generation: No effect on sperm motility/counts.</p> <p><u>Developmental toxicity</u>: (1 study in rats and 1 in rabbits) Doses up to 1000 ppm in pregnant animals, did not induce maternal or developmental toxicity.</p> <p><u>Delayed toxicity</u>: No clinical signs of neurotoxicity were detected during previous tests, so neurotoxicity testing was not done.</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticids hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Samme konklusion som før reevaluering. Dog skal der i overvejsen medtages at det eneste studie fremlagt i EU assessment rapporten viser minimale effekter på reproduktive organer eller fertiliteten. De foreslåede <i>in vitro</i> / <i>ex vivo</i> / <i>in vivo</i> analyser forventes yderligere at belyse stoffets basale hormon forstyrrende potentiale</p>
5. Metsulfuron-methyl	128.800	736	Ingen studier	<p><u>Acute toxicity</u>: no oral or dermal toxicity.</p> <p><u>Short term toxicity</u>: (4 oral studies in rat, dog, mouse and 1 dermal in rabbits), no specific effects and no target organs identified.</p> <p><u>Genotoxicity</u>: No effects except for clastogenic effects (Chromosome damages) before and after metabolic activation at ≥2.63 mM (induction of chromosome aberration in CHO-K1 cells, but in this study the negative controls gave also positive results= should be re-evaluated).</p> <p><u>Long term studies</u>: (1study in rat and 1 in mouse), No oncogenicity in rats and mice (exposures up to 5000 ppm, for 18 months).</p> <p><u>Reproductive toxicity</u>: A 2-generation study in rat (1985) showed ↓body weight in parents (organs of sterile parents were not examined in this study). No significant adverse effects on litters (NOAEL= 500 ppm)</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticids hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i></p> <p>B) Samme konklusion som før reevaluering. Dog skal der med i overvejsen medtages at studierne fremlagt ved EU assessment reports viser minimale effekter på reproduktive organer eller fertiliteten. Disse studier er dog af ældre dato (1980érne). Derfor vil de foreslåede <i>in vitro/ex vivo/in vivo</i> analyser yderligere belyse stoffets hormon forstyrrende potentiale</p>

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
				<p><u>Developmental toxicity:</u> (1 study in rat and 1 in rabbits), In rats no effects on fetal viability or fetal body weight, No teratogenicity¹ detected (up to 1000 mg/kg/bw).</p> <p>In rabbits: increased mortality (top dose at 700 mg/kg/day), anorexia, red stained urine, decreased motor activity, impaired reflexes.</p> <p><u>Delayed toxicity:</u> No clinical signs of neurotoxicity were detected during previous tests, so neurotoxicity testing was not done.</p>	
Vækstregulering					
Quaternary ammonium					
6. Chlormequat chlorid	125.340	141.382	<p>Immun- og neurale forstyrrelser</p> <p>mulig hormonforstyrrende</p> <p>(Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Ingen østrogen/ androgen/ aromatase effekt (Andersen et al., 2002)</p> <p>Stimulated the estrogen concentration in hens (Gultom et al., 2001)</p> <p>Effects on estrous cycle in pigs (Sorensen and Danielsen,</p>	<p><u>Acute toxicity:</u> classified as toxic if swallowed and harmful in contact with skin (rabbits).</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (7 studies in rats, 2 in mice, 4 dog, 1 dermal study in rabbits), Mice unaffected (1,5 g/kg bw/day). In rats and dogs high doses (1000 ppm) ↓ body weight gain, ↓ creatinine in the urine.-Effects on acetyl-cholinesterase receptor, no histological changes on brain- and all effects were reversible. Neurological effects were seen in dogs (salivation, unsteady /high stepping gait, apathy, due to effect on acetyl-cholinesterase receptors.</p> <p><u>Genotoxicity study:</u> a broad range of <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> studies showed no effects</p> <p><u>Long term toxicity:</u> (3 studies in rats and 3 in mice), the same effects as the short term: not oncogenic</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (Studies: 3 multigenerational studies in rats, 1 in mice). Two studies reported ↓ weight gain, ↓fertility (conceptions), ↓ mean pups pr litter, hypersensitivity in female rats, ↓ pup body weight gain, slight anemia in male rats.</p> <p>Female mice: No effects on measured reproductive parameters, LH receptor content in ovaries and blood progesterone reduced.</p> <p><u>Developmental toxicity:</u> (rats, rabbits, mice and hamsters) No effects in rats. In rabbits increased</p>	<p>A) I en tidligere undersøgelse (Andersen et al. 2002) viste Chlormequat-chlorid ingen effekter <i>in vitro</i> mhp estrogen, androgen og aromatase aktivitet, men en hæmning af dioxin aktiveret AhR funktion (Long et al. 2003). I det ansøgte projekt vil stoffet analyseres for mulige dioxin lignende effekter samt effekt på thyroidea hormon og steroidhormon syntese.</p> <p>B) Baseret på effekterne der er set på reproduktionen er det vigtigt at belyse mekanismen for disse effekter, og udover studiet udført af Andersen et al 2002, findes der ingen <i>in vitro</i> undersøgelser, der belyser mekanismen. Det er nødvendigt ligeledes at undersøge effekten på thyroid and steroid hormon syntesen.</p>

¹ The capability of producing fetal malformation

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
			2006)	mortality of the pups (NOAEL 20 mg/kg bw), in hamster's skeletal malformations and retarded ossification were observed. <u>Neurotoxicity:</u> No delayed neurotoxicity observed in hens.	
Fungicider					
Triazolier					
7. Bitertanol		16.066	Nye artikler: Svag aromatase inhibitor (Trosken et al., 2006)	Low acute toxicity <u>Short term toxicity:</u> (5 studies in rats, 2 in dogs, 1 in rabbits). In rats: ↑liver weights, ↓body weights in both sexes (100 mg/kg bw/day). Males: ↑mean liver and thyroid weights, Females: ↑thyroid and spleen weights (300 mg/kg), ↓ovarian weights. The female endocrine system more effected. Effects on liver parameters at high doses: enzyme induction, ↑ cholesterol, ↑ activities of serum transaminases and alkaline phosphatase. Other high dose effects: adrenal glands, female pituitary, ovaries (↓ in number of follicles), gastro-intestinal tract. In dogs: Liver effects and enzyme induction, ↑adrenalin, effects on skin. <u>Genotoxicity:</u> no effect observed <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> studies. <u>Long term toxicity:</u> (1 rat, 1 mice study), ↓ body weight gain, ↑adrenalin weights in rats and liver effects in mice. No evidence of carcinogenicity. <u>Reproductive toxicity:</u> (one 3-generation study in rats), The parental generation (F0): ↓ body weight (at top dose 500 ppm), ↓ pregnancy rate/number of pups (500 ppm). Maternal NOAEL= 20 ppm. In all the subsequent generations, no effect on pregnancy rate/no of pups were seen; ↓ mean pup weight (at 500 ppm), ↓ litter size at birth, and poor survivals (NOAEL 10 mg/kg). The following generation (F1): ↓ body weight gain of F1 parents at 100 ppm, ↓viability of pups and litter size (100ppm), pup NOAEL= 100 ppm. Females appear to be more sensitive than males and the adverse effect on body weight gain appears to become worse with each generation. <u>Developmental toxicity:</u> (3 studies in rats, 3 in rabbits), Malformations in the rat and the rabbit, bone alterations, In rabbits the NOAEL for teratogenicity was 30 mg/kg. <u>Delayed toxicity:</u> no testing was done.	A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticides hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i> . B) Pesticidet har været vist at have svagt hæmmende effekt på aromatase aktiviteten og da der også har været observationer på <i>in vivo</i> reproduktion, bør stoffet undersøges for andre basale hormonforstyrrende virkninger.
8. Propiconazol	122.704	24.492	Aromatase hæmmer Endokrine forstyrrelser	<u>Acute toxicity:</u> In rats, moderately toxic orally but not dermally. (dose dependent mortality, dyspnoea, ruffled fur). <u>Short term toxicity (rats, mice, dogs),</u> in rats: ↑liver weight, ↓Bodyweight and slight signs of anemia	A) Bortset fra hæmning af aromatase aktivitet i JEG-3 celler findes der til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticides hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i> som foreslået i det ansøgte

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
			<p>Ændringer i genekspression af P450 og steroidhormon-relaterede gener</p> <p>(Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Nye artikler: Ingen antiandrogene effekter <i>in vivo</i> (Taxvig et al., 2008).</p>	<p>(450 mg/kg bw/day) rats after 28 days, though liver effect not seen after 90 days. In mice also ↓ serum cholesterol (500 ppm)</p> <p><u>Genotoxicity:</u> Negative in all tests</p> <p><u>Long term studies:</u> ↓food intake in high dose rats, ↓ body weight gains, ↓ white blood cell, ↑liver weight in high dose rats, ↓adrenal weights, ↓kidney (females). In mice also: liver tumors, ↓ serum cholesterol (500 ppm),</p> <p><u>Reproduction toxicity:</u> (one 2-generation study in rats), No effects on following reproductive parameters (fertility, gestation, mating). Reproductive effects in F2 generation at highest dose (2500 ppm): reduction in numbers of delivered pups, viability of pups. F2-generation: both sexes had reduced brain weights, males had decreased weights of testes</p> <p><u>Developmental effects:</u> cleft palate, increased incidence of skeletal variations</p>	<p>projekt.</p> <p>B) På trods af et enkelt reproduktionsstudie i rotter anbefales stoffet at blive analyseret i de foreslåede først <i>in vitro</i>, og siden bedømmes for fortsat <i>ex vivo</i>, og <i>in vivo</i> undersøgelser.</p>
9. Prothioconazol	36.975	7.395	Ingen studier	<p><u>Acute toxicity:</u> not classified as toxic</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (6 studies, rats, mice, dog). ↓body weight, liver as target organ: ↑hepatic enzyme activity, ↑liver weights. In female rats ↓T4, ↑TSH, no change in thyroid (10000 ppm). No persistent effects. In rats and dogs kidney also targeted. In dogs the pesticides had more effect on female liver than male. Also in dogs there were changes of thyroid hormones.</p> <p><u>Genotoxicity:</u> clastogenic <i>in vitro</i>, CHL cells, before and after S9 activation – No mammalian cell mutation: considered mutagenic <i>in vitro</i>, but not <i>in vivo</i>.</p> <p><u>Long term studies:</u> (2 studies in rats, 1 in mice), ↓ Bodyweight gain (750 mg/kg bw/day), liver and kidney effects, T4 reduced in plasma at high doses in both sexes, also effects on TSH and T3, but not consistent.</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (one 2-generation study in rats), ↓ no. of oestrous cycles (750 mg/kg), ↑ time to insemination, ↓ implantation sites, ↑ duration of gestation. No effects on mating and fertility.</p> <p>Anogenital distance for F2 generation slightly longer (750 mg/kg bw/day) although still within the</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticides hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Samme konklusion som før reevalueringen. Baseret på det ene <i>in vivo</i> studie og de rapporterede effekterne der er set på reproduktionen er det vigtigt at undersøge disse effekter <i>in vitro</i> / <i>ex vivo</i>.</p>

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
				<p>normal range, lower sperm counts in F1 males (not treatment-related, because of lack of dose-response relationship). F1 females: oestrous cycles ↓ litter number,</p> <p>Note: Could be due to hormonal disruption, but all effects were accompanied by parental toxicity.</p> <p><u>Developmental studies</u> (3 studies in rats, 2 in rabbits): in the absence of parental toxicity, no malformation of offspring's.</p> <p>Neurotoxicity: no data</p>	
Alkylebis (dithiocarbamat)					
10. Mancozeb	212.168	352.977	<p>Cellulær stress</p> <p>Neurotoksicitet</p> <p>Forstyrrelse af østrogen cyklus i rotter</p> <p>(Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Nye artikler:</p> <p>Mancozeb thyroid peroxidase inhibitors (Cecconi et al., 2007)</p>	<p><u>Acute toxicity:</u> very low</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (14 studies in rats, mice, dogs, rabbits), after 3 months to rats: changes in Thyroid function (TH↓, TSH↑), ↑thyroid weight, pituitary, liver, testis NOAEL 7.4 mg/kg/bw/day. The metabolite ETU gives the same effects as mancozeb.</p> <p><u>Genotoxicity:</u> Induced chromosomal aberration in Chinese hamster ovary cells (CHO). Weak positive response in sister chromatid exchange tests before activation in cultured CHO. <i>In vivo</i> not mutagen.</p> <p><u>Long term effects: (2 rats, 1 mouse, 2 dog studies):</u> the same effects as for short term studies. thyroid tumor in rats</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (two 2-generation studies in rat), lower body weights of parental rats of both generations. Up to 1200 ppm, mancozeb produced no adverse effects on reproductive capability, fertility or on the health and survival of offspring. Treatment-related microscopic changes were observed in the thyroid, kidney, and pituitary in both generations (NOAEL= 30 ppm).</p> <p><u>Developmental toxicity:</u> (2 studies in rats, 2 in rabbits), some teratogenic effects (128 mg/kg bw): cleft palate, incomplete ossification etc.</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticids hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i> som foreslået i det ansøgte projekt.</p> <p>B) Samme konklusion som før reevalueringen på trods af at der ingen direkte effekt er set på reproduktion – men derimod "developmental" effekter.</p>

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
Insekticider					
Pyrethroider					
11. Cypermethrin	499.614	7.878	<p>Kontroversielle data for østrogenitet</p> <p>Immune effekter i rotter</p> <p>Effekter på reproduktionsmarkører i gnavere</p> <p>(Referencer angivet i ansøgningsteksten)</p>	<p><u>Short term toxicity:</u> (Studies: 3 rat, 3 dog, 1 rabbit) ↓Body weight, ↑liver (also enzyme activity induction) and kidney weight, neurotoxicity, Lowest reported NOAEL was for rats 5mg/kg bw/kg.</p> <p><u>Genotoxicity:</u> all <i>in vitro/in vivo</i> tests were negative.</p> <p><u>Long-term oral toxicity:</u> (2 studies in rats/mice) showed no carcinogenic effects</p> <p><u>Reproductive toxicity:</u> (2-generation rat study) parental body weight reduced (500 pm), No effect on fertility, gestation, viability, size</p> <p><u>Teratogenicity:</u> (2 studies in rat and rabbits) No effects on the offspring (120 mg/kg bw).</p> <p><u>Neurotoxicity:</u> No effects on hens</p>	<p>A) Da det er modstridende data for flere endokrine parametre for dette pesticid vil det hormonforstyrrende potentiale blive belyst i <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i>.</p> <p>B) Der anbefales samme konklusion som for reevalueringen. Dog skal der tages med i overvejelserne at der i det EU rapporterede reproduktions studie ikke vist nogen direkte effekter.</p>
12. Tau fluvalinat	162.244	9.536	<p>Ingen studier</p>	<p><u>Acute oral toxicity:</u> moderate</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (in rats, mice, dog), ↓ body weights, in females ↓ plasma cholinesterase activity (1000, 2500 ppm), ↑ brain cholinesterase activity, abnormal gait, salivation, pale eyes, skin irritation, ↑adrenal weight in rats (90 day-study).</p> <p><u>Genotoxicity testing:</u> Negative.</p> <p><u>Long term toxicity</u> and carcinogenicity (2 studies in rats and mice): like short term effects: mortality, skin lesions. No carcinogenic effects detected.</p> <p><u>Reproduction toxicity:</u> (two 2-generation studies in rats) toxicity of parental animals (from 100 ppm), increase in scabbing and fur loss (skorpedannelse og pels tab), ↓ weight of pups, ↓ survival of pup, no effects on mating, fertility and gestational length, Report conclusion: No fertility or other reproductive effects because the observed pups effects were during maternal toxicity.</p> <p><u>Developmental studies:</u> (2 studies in rats and rabbits), smaller fetus, delayed ossification at maternal toxic doses.</p>	<p>A) Der findes til vores kendskab ingen specifikke data for undersøgelser af dette pesticides hormonforstyrrende potentiale <i>in vitro</i>, <i>ex vivo</i> eller <i>in vivo</i> som foreslået i det ansøgte projekt.</p> <p>B) Det anbefales samme konklusion som for reevalueringen.</p>

Pesticid / Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Effekter fra Pubmed	Toksiske effekter ifølge de nye EU Assessment Reports	A) Evaluering ved projektansøgning/ B) Reevaluering (Aug-Sep 2009)
Organofosfater					
13. Malathion	1.185	16.186	<p>Neurtoksitet</p> <p>endokrine forstyrrelser</p> <p>(Referencer også angivet i ansøgningsteksten)</p> <p>Malathion-induced morphologic alterations found in the mouse testes (Contreras and Bustos-Obregon, 1999)</p> <p>Nye artikler:</p> <p>No estrogenic effect in E-screen, no binding to ER (Chen et al., 2002)</p> <p>Replication: genotoxic agent and may be regarded as a potential germ cell mutagen (Giri et al., 2002)</p>	<p><u>Acute toxicity:</u> Moderately toxic by the oral route in rat, but not acutely toxic via dermal route to rat and rabbit</p> <p><u>Short term toxicity:</u> (7 studies in rat, dog, rabbit), ↓ body weights, ↓ plasma/brain cholinesterase activity, ↑ liver and kidney weights.</p> <p><u>Genotoxicity:</u> Positive in <i>in vitro</i> mammalian cell gene mutation in human lymphocytes and induced chromosome aberration in cultured human lymphocytes, No <i>in vivo</i> genotoxicity observed.</p> <p><u>Long term toxicity:</u> (2 studies in rats, 1 in mice), the same effect as short term studies. inhibition of plasma/brain cholinesterase activity, induced the benign tumors in liver</p> <p><u>Reproduction toxicity (one 2-generation studies):</u> parental and F1 and F2 generation toxicity based on reduced body weights (7500 ppm for parents, 1700 ppm for pups): however, not classified as toxic for reproduction. No malformations.</p> <p><u>Neurotoxicity:</u> Did not induce delayed neurotoxicity in hens. In rats: reduced locomotor activity and increased nerve fibre degeneration, acetyl cholinesterase inhibition in female brain.</p>	<p>A) Genotoksicitet og carcinogenicitet af malathion er kontroversiel selv om stoffet er kendt som en potentiel endokrine disruptor.</p> <p>B) Da det hormonforstyrrende potentiale stadig er uklart for Malathion vil de ansøgte undersøgelser bidrage med en belysning af mulige mekanismer involveret i de rapporterede endokrine forstyrrelser.</p>

Bilag 3 Reevaluering af pesticid metabolitter.

	<i>Kemisk gruppe</i>	<i>Behandlet areal ha Landbrug</i>	<i>Forbrug i DK 2006 (kg)</i>	<i>Analysemetode i blod eller urin (reference)</i>	<i>Relevante stoffer/metabolitter ifølge litteratur (inkl. EU Assessment Reports)</i>
Herbicider					
1. MCPA	Phenoxytsyre	204.144	315.159	[1]	<ul style="list-style-type: none"> • MCPA • HMCPA (4-chloro-2-hydroxymethyl-phenoxyacetic acid) • Glycine-MCPA conjugate
2. Terbutylazin	Triazine	33.136	38.106	[2]	<ul style="list-style-type: none"> • Desethylterbutylazine-1'-carboxylic acid • Desethylterbutylazine (glucuronide conjugate) • 1'-hydroxyterbutylazine (glucuronide conjugate) • 2-chloro-4,6-diamino-1-3-5-triazine
3. Iodosulfuron-methyl-natrium	Sulfonylurea	147.021	1.036	[3]	<ul style="list-style-type: none"> • Iodosulfuron methyl • AE 0031838* • AE F145740* • AE F145741* • AE F075736* • AE F168532 (=CH₂OH-met)*
4. Mesosulfuron-methyl	Sulfonylurea	27.182	299	[3]	<ul style="list-style-type: none"> • Mesosulfuron methyl • Methyl-2-[3-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidin-2-yl)ureidosulfonyl]-4-methanesulfonamidomethyl-benzoate • 2-[3-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidin-2-yl)ureidosulfonyl]-4-methanesulfonamidomethyl-benzoic acid • Methyl-4-methanesulfonamidomethyl-2-sulfamoylbenzoate • 6-methanesulfonamidomethyl-1,2-benzisothiazol-3(2H)-on-1,1-dioxide • Methyl-2-[3-(4-hydroxy-6-methoxy-2-pyrimidin-2-yl)ureidosulfonyl]-4-methanesulfonamidomethylbenzoate • 2-[3-(4-hydroxy-6-methoxy-2-pyrimidin-2-yl)ureidosulfonyl]-4-methanesulfonamidomethyl benzoic acid
5. Metsulfuron-methyl	Sulfonylurea	128.800	736	[3]	<ul style="list-style-type: none"> • Metsulfuron methyl • Hydroxymethyl metsulfuron methyl (IN-F6520) • Acid sulfonamide (IN-D5119) • Saccharin (IN-00581) • Triazine amine (IN-A4098) • O-Desmethyl triazine amine (IN-B5528)
Vækstregulering					
6. Chlormequat chlorid	Quaternary ammonium	125.340	141.382	[4] [5]	<ul style="list-style-type: none"> • Chlormequat chloride • Choline chloride
Fungicider					
7. Bitertanol	Triazol		16.066	[6]	<ul style="list-style-type: none"> • p-Hydroxy-bitertanol • 1,2,4-triazole • Triazole alanine • Triazolylacetic acid (TAA)

	Kemisk gruppe	Behandlet areal ha Landbrug	Forbrug i DK 2006 (kg)	Analysemetode i blod eller urin (reference)	Relevante stoffer/metabolitter ifølge litteratur (inkl. EU Assessment Reports)
8. Propiconazol	Triazoler	122.704	24.492	[6]	<ul style="list-style-type: none"> • 1,2,4-triazole • Triazole alanine • Triazolylacetic acid (TAA)
9. Prothioconazol	Triazoler	36.975	7.395	Nej	<ul style="list-style-type: none"> • -S eller -O prothioconazole conjugat • Desthio- prothioconazole
10. Mancozeb	Alkylebis(dithiocarbamat)	212.168	352.977	[7]	<ul style="list-style-type: none"> • Ethylene thiourea (ETU)
Insekticider					
11. Cypermethrin	Pyrethroider	499.614	7.878	[8] [9]	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Phenoxybenzoic acid (PBA) • 3- (4-hydroxyphenoxy)benzoic acid O-sulfate ester • 3-(4-hydroxyphenoxy)benzoic acid
12. Tau fluvalinat	Pyrethroider	162.244	9.536	[8] [9]	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Phenoxybenzoic acid (PBA) • 3-(4'-hydroxyphenoxy) benzoic acid (4-OH-PBA) • 3-Phenoxybenzyl alcohol
13. Malathion	Organophosphater	1.185	16.186	[8]	<ul style="list-style-type: none"> • Malathion dicarboxylic acid (DCA) • Malathion monocarboxylic acid (MCA) • Dimethyl phosphate (DMP) • Dimethyl thiophosphate (DMTP) • Dimethyl dithiophosphate (DMDTP)

*kemisk struktur af iodofenuron methyl metabolitter fremgår af tabel A1.

Tabel A1

Forkortelse	Kemisk struktur	Kemisk navn
AE 0031838	Ikke angivet i rapport	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxy-methyl-1,3,5-triazine
AE F145740		4-iodo-2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl] benzoic acid
AE F145741		methyl 2-[3-(4-hydroxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl]-4-iodo-benzoate
AE Fo75736		methyl 2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureido-sulfonyl]benzoate
AE F168532 (=CH ₂ OH-met)		methyl 4-iodo-2-[3-(6-hydroxymethyl-4-methoxy-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfo-nyl]-benzoate

Referencer til Bilag 3:

- [1] Lind CH, Littorin M, Amilon Å, Jönsson BAG: Analysis of phenoxyacetic herbicides as biomarkers in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectr.* 2008, 22:143-150.
- [2] Pozzebon JM, Vilegas W, Jardim I: Determination of herbicides and a metabolite in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromat. A* 2003, 987: 375-380.
- [3] Nguyen JV, Olsson AO, Bravo R, Needham LL, Barr DB: Quantification of atrazine, phenylurea, and sulfonylurea herbicide metabolites in urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2007, 31:181-186.
- [4] Fuke C, Arao T, Morinaga Y, Takaesu H, Ameno K, Miyazaki T: Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high performance liquid chromatography. *Legal Medicine* 2002, 4: 156-163.
- [5] Ariffin MM, Anderson RA: LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromat. B* 2006, 842: 91-97.
- [6] Schermerhorn PG, Golden PE, Krynitsky AJ, Leimkuhler WM: Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Intern.* 2005, 88: 1491-1502.
- [7] Lindh CH, Littorin M, Johannesson G, Jonsson BA: Analysis of ethylenethiourea as a biomarker in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22:2573-2579.
- [8] Olsson AO, Baker SE, Nguyen JV, Romanoff LC, Udunka SO, Walker RD, Flemmen KL, Barr DB: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Anal. Chem.* 2004, 76:2543-2461.
- [9] Baker SE, Olsson AO, Barr DB: Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 46: 281-288.

Hormonforstyrrende effekter af anvendte pesticider fra forskellige pesticidgrupper

Projektet fokuserer på pesticider, som er relevante i forhold til human eksponering. Ved udvælgelse af stoffer blev der lagt vægt på anvendelse og forbrug i Danmark, behandlet areal, om der var tilgængelige analysemetoder for stoffet i blod/urin, samt om der fandtes tilgængelig viden om hormonforstyrrende effekter af pesticiderne.



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Strandgade 29
DK - 1401 København K
Tlf.: (+45) 72 54 40 00

www.mst.dk