

Hormonforstyrrende effekter af anvendte pesticider fra forskellige pesticidgrupper

Udarbejdet af: 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

Forfattere er opsat i henhold til institutionstilknytning

Resume

Forskningsprojektets overordnede formål var at undersøge en række almindeligt anvendte pesticider i Danmark for deres mulige evne til at forårsage hormonforstyrrende effekter. Målet med projektet var at udføre en første screening af pesticiderne, ved omfattende undersøgelser i en række testsystemer, 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.

Projektet omfattede en undersøgelse af de grundlæggende mekanismer og hormonforstyrrende effekter af 13 anvendte pesticider og en pesticid metabolit (nedbrydningsprodukt) i en række *in vitro* testsystemer. På basis af aktiviteten af de enkelte stoffer *in vitro*, undersøgte vi ligeledes to udvalgte blandinger af henholdsvis tre og fem pesticider i de selvsamme *in vitro* testsystemer og i en *in vivo* rottemodel. Ydermere blev de tre pesticider fra den ene pesticidblanding undersøgt som enkeltstoffer og i blanding i en *ex vivo* human placenta (moderkage) transport model.

Studierne viste, at flere af de undersøgte pesticider havde *in vitro* potentialet til at forstyrre en bred vifte af hormonforstyrrende mekanismer. Effekterne af pesticiderne var dog i langt de fleste tilfælde væsentlig svagere end effekten af de naturlige hormoner og nogle af de 'klassiske' kendte hormonforstyrrende kemikalier.

Studierne viste også, at tre *in vitro* aktive pesticider kan overføres fra moderen til fostret via placenta i et humant *ex vivo* system, samt at placentavæv omsætter pesticiderne til andre stoffer (metabolitter).

Der blev ikke fundet antiandrogene effekter af de to pesticidblandinger efter *in vivo* eksponering af drægtige rotter. Der blev derimod fundet svage tegn på østrogene effekter i hunfostre af blandingen med fem pesticider, hvilket formentlig er forårsaget af en ubalance mellem niveauet af kønshormonerne testosteron og østradiol.

Ligeledes viste rottestudierne på de to udvalgte pesticidblandinger, at de undersøgte *in vitro* aktive stoffer og deres metabolitter kan måles i fostervæske og i moderens urin. Koncentrationen af de enkelte pesticider i fostervæske var lavere, når de blev doseret sammen med fire andre pesticider,

end når de blev doseret sammen med bare to andre pesticider. Med andre ord hæmmede pesticiderne i dette studie hinandens tilstedeværelse, når antallet af komponenter i blandingen blev forøget fra tre til fem.

Sammenfattende bekræfter studiet, at *in vitro* analyser er gode redskaber til at screene pesticider for deres hormonforstyrrende egenskaber samt belyse de grundlæggende cellulære mekanismer. De mere i antal begrænsede *ex vivo* og *in vivo* analyser understøttede kun delvist de observerede hormonforstyrrende egenskaber *in vitro*.

Der anbefales, at fremtidige forskningsprojekter bør inkludere nærmere undersøgelser af de i studiet observerede aktive pesticider og deres metabolitter på cellulære østrogene biomarkører i hunner (mødre og fostre) samt mere specifikke biomarkører for effekter på niveau og funktion af thyroideahormoner (skjoldbruskkirtel hormoner).

BAGGRUND OG FORMÅL

Hormonforstyrrende effekter, som følge af eksponering til pesticider, er i søgelyset som muligt bidrag til hæmmet reproduktion (fx 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 har peget på, at en række nuværende anvendte bekæmpelsesmidler har hormonforstyrrende effekter. Blandt andet har adskillige pesticider vist sig at kunne interagere med receptorer, som påvirker hormonfunktioner i celler, og/eller ændre niveauet af de naturlige hormoner, eksempelvis ved at påvirke dannelsen eller omsætningen af hormoner i kroppen.

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 særligt sårbare grupper i forhold til pesticideksponering. For nyligt blev der i en dansk undersøgelse fundet en sammenhæng mellem kvinders eksponering til pesticider i gartnerier under graviditeten og medfødte misdannelser af kønsorganerne hos deres drengebørn.

Den humane population er gennem livet eksponeret for blandinger af hormonforstyrrende stoffer, inklusive en række pesticider. De hormonforstyrrende stoffer mistænkes for at kunne virke sammen og samlet give en forøget effekt - en mistanke der bl.a. støttes af tidligere studier, som har påvist kombinationseffekter af pesticider i cellemodeller og i rotter.

Det overordnede formål med dette projekt var at bestemme det hormonforstyrrende potentiale og undersøge mulige virkningsmekanismer af 13 forskellige bekæmpelsesmidler og én metabolit (se Tabel 1) fra pesticidgrupperne phenoxysyrer, triaziner, sulfonylurea stoffer, vækstregulatorer, azoler, dithiocarbamater, pyrethroider og organofosfater. Tolv af de undersøgte pesticider udgør bekæmpelsesmidler, som er almindeligt anvendt i Danmark i dag. Pesticiderne blev bl.a. udvalgt til undersøgelsen på baggrund af anvendelse og forbrug i Danmark samt behandlet areal i hektar. Målet var at skabe et solidt fundament for videre prioritering af dybdegående undersøgelser af pesticidernes mulige hormonforstyrrende effekter samt deres mulige kombinerede effekter i blandinger. Derimod var målet *ikke* at gennemføre en human risikovurdering af pesticiderne, og resultaterne fra denne undersøgelse kan derfor hverken frikende eller forbyde nogen af pesticiderne.

UNDERSØGELSEN

I projektet undersøgte vi udvalgte pesticider for hormonforstyrrende effekter i et panel af analyser, inkluderende seks forskellige cellemodeller, to humane placenta transport modeller samt en undersøgelse af pesticidblandinger på drægtige rotter og deres fostre.

Med analyser i mammale cellekulturer ønskede vi at screene for mulige hormonforstyrrende virkningsmekanismer af pesticiderne. Disse undersøgelser omfattede analyser af pesticiderne som enkeltstoffer såvel som i to blandinger udvalgt på basis af pesticidernes aktivitet og effekt *in vitro* (Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin; Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion).

Der blev undersøgt for effekter på funktion af østrogen receptor, androgen receptor, aryl hydrocarbon receptor og thyroideahormon. Ligeledes testede vi for effekter på kønshormonsyntese og på aktiviteten af enzymet aromatase, som er ansvarligt for omdannelsen af mandlige kønshormoner (androgener) til kvindelige kønshormoner (østrogener). Sideløbende med disse undersøgelser blev pesticidernes hormonforstyrrende potentiale forsøgt forudsagt på baggrund af stoffernes kemiske struktur vha. computer modellering.

Potentialet af tre udvalgte pesticider (bitertanol, propiconazol og cypermethrin) - samt en blanding af disse (Mix3) - til at passere den humane placenta blev ligeledes undersøgt. Som model for pesticideksponering af humane fostre blev anvendt et veletableret 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 cellemodel af transport af fremmedstoffer over et enkelt lag af humane placenta celler. Sideløbende analyserede vi koncentrationen af relevante pesticid nedbrydningsstoffer (metabolitter) i fostervæske, udtaget fra de to placenta testsystemer, for at få en nærmere indikation af eksponeringen af såvel mødre som fostre.

Vi undersøgte ligeledes for toksiske effekter af de to udvalgte pesticidblandinger Mix3 og Mix5 på syntesen af kønshormoner i drægtige rotter og deres fostre. Den anvendte rottemodel har specielt fokus på antiandrogene effekter - dvs. hormonforstyrrende effekter i hanfostre. Fostertilstanden er den optimale periode at undersøge for effekter på specielt mandlige kønshormoner. Hæmning af produktionen af det mandlige kønshormon (testosteron) 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 observeret som et problem i mennesker. Denne mekanisme er vigtig at belyse, fordi den kan være af relevans for den øgede forekomst af misdannede kønsorganer i drengebørn og den generelt ringe sædkvalitet.

Sideløbende undersøgte vi koncentrationen af pesticider og metabolitter i fostervand og urin fra rotterne. På denne måde kunne vi få en indikation af eksponeringen af såvel mødre som fostre til disse stoffer.

RESULTATER

Alle 13 pesticider udviste aktivitet i mindst én ud af de seks cellemodeller, hvorimod pesticid

metabolitten (ETU) var inaktiv i alle seks analyser (Tabel 1 og 2). Otte af pesticiderne viste effekt på flere af de undersøgte biomarkører, hvilket indikerer et bredere hormonforstyrrende potentiale af disse stoffer. Dog var virkningskraften af disse aktive pesticider svage i forhold til effekten af de naturlige hormoner i blodet og i forhold til mange af de 'klassiske' hormonforstyrrende kemikalier. De to pesticidblandinger (Mix3 og Mix5) udviste signifikante blandingseffekter på androgen receptor funktion - dvs. at komponenterne virkede sammen, hvilket forårsagede en samlet forøget effekt. Ligeledes fandt vi *in vitro* en samlet øget blandingseffekt af én fire-komponent pesticidblanding (Mix5 minus bitertanol: terbuthylazin, propiconazol, cypermethrin og malathion) på thyroideahormon funktion.

Begge humane placenta transportmodeller viste en overførsel af de tre undersøgte pesticider. De to undersøgte azolfungicider blev overført ved fri diffusion, mens pyrethroid insekticidet viste en mere begrænset transport med binding til placenta væv. Vi fandt ingen blandingseffekter af de tre pesticider (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 omsætning af pesticiderne, hvilket indikerer, at placenta delvist omsætter de tre undersøgte pesticider til stoffer, der kan have andre egenskaber end det originale stof. Både mødre og fostre udsættes for disse metabolitter.

Tabel 1. Opsummering af effekter af pesticider testet i cellekultur modeller og ved computer modellering.

Pesticider	Pesticidgrupper	Østrogen receptor	Androgen receptor	Aryl hydrocarbon receptor	Thyroidea-hormon funktion	Aromatase aktivitet	Kønshormon-syntese	QSAR
MCPA	Triazin herbicid			↑				
Terbuthylazin	Phenoxysyre herbicid	↑		↑	↑	↑	P↑ og Ø↑	
Iodosulfuron-methyl-natrium	Sulfonylurea herbicid			↑				
Mesosulfuron-methyl	Sulfonylurea herbicid			↑				
Metsulfuron-methyl	Sulfonylurea herbicid			↑				
Chlormequat chlorid	Vækstregulator			↑				
Bitertanol	Azolfungicid			↓	↓		T↓ og Ø↓	↓AR **
Propiconazol	Azolfungicid	↑		↑	↓	↓ og ↑*	T↓ og Ø↓	↓AR **
Prothioconazol	Azolfungicid	↑		↓	↑	↑		
Mancozeb	Dithiocarbamat fungicid		↓	↑	↑			
ETU	Metabolit af mancozeb							
Cypermethrin	Pyrethroid insekticid	↑		↑	↑		P↑ og T↑ og Ø↑	
Tau fluvalinat	Pyrethroid insekticid			↑	↑			
Malathion	Organofosfat insekticid	↑		↑	↑		P↑ og T↑ og Ø↑	
Mix3		ia		ia	ia	↑	P↑ og T↓ og Ø↓	ia
Mix5		↑		↑	↑	↑	P↑ og Ø↑	ia

MCPA: 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, ETU: ethylenthioiurea, Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbuthylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), **grøn**: opregulerende effekt, **rod**: nedregulerende effekt, **gul**: modsatrettede effekter (↑: opregulerende effekt, ↓: nedregulerende effekt), ia: ikke analyseret. P: progesteron, Ø: østradiol, T: testosteron, QSAR: quantitative structure-activity relationship (computer modellering). * Propiconazol hæmmede aromatase aktiviteten ved en høj koncentration af pesticidet og inducerede aromatase aktiviteten i et lavere koncentrationsområde, ** Positiv for AR antagonisme.

Table 2. Opsummering af effekter af pesticider testet i cellekultur modeller i tilstedeværelse af potent receptor ligand.

Pesticider	Pesticidgrupper	Østrogen receptor	Androgen receptor	Aryl hydrocarbon receptor	Thyroidea-hormon funktion
MCPA	Triazin herbicid			↑	
Terbutylazin	Phenoxysyre herbicid	↑		↑	
Iodosulfuron-methyl-natrium	Sulfonylurea herbicid			↑	
Mesosulfuron-methyl	Sulfonylurea herbicid			↑	
Metsulfuron-methyl	Sulfonylurea herbicid				
Chlormequat chlorid	Vækstregulator			↑	
Bitertanol	Azolfungicid		↓	↓	↓
Propiconazol	Azolfungicid		↓	↓	↓
Prothioconazol	Azolfungicid			↓	↓
Mancozeb	Dithiocarbamat fungicid		↓		
ETU	Metabolit af mancozeb				
Cypermethrin	Pyrethroid insekticid			↓	↓ og ↑*
Tau fluvalinat	Pyrethroid insekticid			↑	↓
Malathion	Organofosfat insekticid				
Mix3		ia	↓	ia	ia
Mix5			↓		↑

MCPA: 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, ETU: ethylenthiourea, Mix3: bitertanol, propiconazol og cypermethrin (1:1:1), Mix5: terbutylazin, bitertanol, propiconazol, cypermethrin og malathion (1:1:1:1:1), **grøn**: opregulerende effekt, **rød**: nedregulerende effekt, **gul**: modsatrettede effekter (↑: opregulerende effekt, ↓: nedregulerende effekt), ia: ikke analyseret, * Cypermethrin havde en nedregulerende effekt ved den højeste ikke-toksiske koncentration testet og opregulerende effekt i et lavere koncentrationsområde.

Rotteforsøgene viste ingen antiandrogene (feminiserende) effekter af de to pesticidblandinger (Mix3 og Mix5). Der blev hverken fundet effekter på parametre såsom anogenital afstand, testosteronniveauer eller histopatologiske forandringer i testiklerne. I rottemødrene blev der fundet et svagt, men signifikant nedsat blodniveau af østradiol samt en signifikant stigning i T4 efter dosering med den højeste dosis af Mix5. Vi fandt en tendens men ingen signifikante effekter på de målte hormonniveauer i rotteføstrene. Der blev observeret en markant stigning i gen ekspresion af aromatase i binyrerne fra hunføstre eksponeret til Mix5 som var i overensstemmelse med studiets *in vitro* data. Dette tyder på et potentiale til at udøve hormonforstyrrende effekter i hunner.

Pesticiderne og deres omsætningsstoffer (metabolitter) blev i alle tilfælde detekteret i fostervand og i urin fra rottemødrene. Generelt sås en lavere koncentration af de enkelte pesticider i Mix5 end i Mix3 blandingen til trods for, at de enkelte pesticider blev givet i samme dosis.

UNDERSØGELSENS HOVEDKONKLUSIONER

Vores mammale cellekultur *in vitro* analyser af pesticiderne tyder på, at visse bekæmpelsesmidler, anvendt i Danmark i dag, har potentialet til at påvirke en række hormonelle mekanismer såsom hormondannelse og signalmekanismer via hormonreceptorer (østrogen, androgen og thyroideahormon) samt via aryl hydrocarbon receptoren, som er involveret i såvel hormondannelse som omsætning af kemikalier. Effekterne af pesticiderne var dog væsentlig svagere end effekten af de naturlige hormoner og nogle af de 'klassiske' hormonforstyrrende kemikalier.

Man skal være opmærksom på, at brugen af cellekultur analyser har sin begrænsning, idet der ikke tages højde for alle de faktorer, som vil kunne påvirke den aktuelle virkningsmekanisme *in vivo* i fx menneskekroppen - eksempelvis samspillet med andre biologiske systemer end de undersøgte, regulerende feedback mekanismer og faktorer som optagelse, fordeling, metabolisme og udskillelse af stofferne.

På baggrund af vores cellekultur studier fandt vi flest *in vitro* aktive pesticider i gruppen af azolfungicider, dernæst i gruppen af pyrethroid insekticider, hvorimod kun ét pesticid blev fundet aktivt i herbicid gruppen (triazin herbicid). Begrænsede og svage effekter blev desuden observeret for dithiocarbamat fungicidet og organofosfat insekticidet.

Overordnet set tegner denne undersøgelse et billede af en række pesticider, der ikke umiddelbart synes at have alarmerende hormonforstyrrende effekter. Dog kan undersøgelsen ikke bruges til hverken at frikende eller forbyde nogen af pesticiderne, da human risikovurdering ikke var en del af formålet.

Derudover viste vores cellekultur analyser, at effekten af visse pesticider i blanding virker sammen, hvilket forårsager en forøget effekt i forhold til effekten af de enkelte stoffer alene. Dette resultat understøtter de konklusioner, der tidligere er blevet draget på dette område, samt det paradigmeskifte, som er under opsejling indenfor human risikovurdering, hvor vigtigheden af at tage højde for den kombinerede eksponering til kemikalier er åbenlys. Hermed forventes en minimering af risikoen for at underestimere humane sundhedsrisici forbundet med pesticideksponering.

Det konkluderes, at visse bekæmpelsesmidler har potentialet til at blive overført via moderkagen til fosteret, samt at moderkagen omsætter pesticiderne til andre stoffer (metabolitter). Dette indikerer, at såvel mødre som fostre kan blive eksponeret til disse stoffer. Før der kan konkluderes på eventuelle risici, bør de opnåede data følges op af yderligere humane studier med måling af biomarkører for eventuelle pesticidkoncentrationer i navlestrengsblod og i blod fra eksponerede mødre for at studere eventuelle effekter på den føtale udvikling.

Reproduktionsundersøgelsen i drægtige hunrotter viste, at de to pesticidblandinger (Mix3 og Mix5) ikke havde effekter på antiandrogene effektmål eller ændrede niveauet af kønshormoner i fostre. Den ene pesticidblanding (Mix5) viste tegn på østrogene og thyroid hormon effekter i rottemødre

samt østrogene effekter i hunfostrene, men yderligere studier er nødvendige for at afklare betydningen af dette fund.

Pesticiderne og deres omsætningsstoffer (metabolitter) blev fundet i såvel fostervand som urin fra rottemødre. Dette viser, at både mødre såvel som fostre kan være eksponeret til disse kemikalier, samt dokumenterer, at moderen er i stand til at udskille stofferne. Måling af kemikalier i fostervand er et godt mål for intern dosis i fostre, og fremtidige undersøgelser opfordres til at inkludere denne analyse. Vores studie viste, at pesticidkoncentrationen i fostervæsken faldt, når antallet af pesticider i blandingen steg, hvilket kunne tyde på at pesticiderne hæmmer hinandens tilstedeværelse.