

### Mischungstoxizität von Wirk- und Beistoffen in Pflanzenschutzmitteln

Elisabeth Zahn\*, Philip Marx-Stölting  
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Berlin  
(\*Absolventin des Masterstudiengangs Toxikologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin)

#### Hintergrund

Die Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln müssen vor der ersten Anwendung ein gesetzlich vorgeschriebenes Genehmigungsverfahren durchlaufen. Nur wenn kein Risiko für Mensch und Tier besteht, wird der Stoff in eine Positivliste der Europäischen Union (EU) aufgenommen und darf in Pflanzenschutzmitteln Verwendung finden. Dieses Genehmigungsverfahren beruht derzeit auf Einzelstoffbewertungen. In der Regel werden in der Landwirtschaft jedoch Kombinationen von Wirkstoffen eingesetzt. Desweiteren werden Pflanzenschutzmitteln sogenannte Beistoffe hinzugefügt, die beispielsweise als Netz-, Löse- oder Antioxidationsmittel dienen und die Eigenschaften der Produkte verbessern sollen.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Kombinationswirkungen verschiedener Stoffe zu einem höheren Risiko für die menschliche Gesundheit führen können<sup>1</sup>. Gegenwärtig besteht deshalb ein großes Interesse an der Entwicklung einheitlicher und zuverlässiger Methoden zur Untersuchung und Bewertung von Kombinationswirkungen.

#### Detektion kombinationstoxischer Wirkungen mittels Dual-Luciferase-Reporter-Genassays und Genexpressionsanalysen

Im Rahmen einer Masterarbeit<sup>2</sup> zum Abschluss des Studiums der Toxikologie wurden anhand der beiden Fungizidprodukte Priori Xtra<sup>®</sup> und Adexar<sup>®</sup> sowohl Kombinationseffekte verschiedener Wirkstoffe als auch von Wirk- und Beistoffen untersucht. Die ausgewählten Produkte enthalten neben den Beistoffen jeweils zwei Wirkstoffe, die hepatotoxische Eigenschaften aufweisen, allerdings mit unterschiedlichem Wirkmechanismus.

Priori Xtra<sup>®</sup> enthält Epoxiconazol und Fluxa-pyroxal, die Wirkung von Adexar<sup>®</sup> beruht auf den Inhaltsstoffen Cyproconazol und Azoxystrobin.

In zwei humanen Hepatomzelllinien (HepG2 und HepaRG) wurden (a) die einzelnen Wirkstoffe, (b) die Wirkstoffkombination und (c) das handelsübliche Pestizidprodukt mit den Beistoffen untersucht. Ausgehend von den Konzentrationen in den gebrauchsfertigen Produkten, wurden jeweils die gleichen Konzentrationen getestet.

Nach der Durchführung eines allgemeinen Zytotoxizitätstests wurden als hepatotoxische Endpunkte die Aktivität der nukleären Rezeptoren

AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) und PXR (*Pregnane X Receptor*) sowie Veränderungen in der Expression der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme *CYP3A4*, *CYP2B6* und *CYP1A1* untersucht. Mithilfe des *Neutral red uptake*-Assays konnte sowohl in HepG2- als auch in HepaRG-Zellen, eine erhöhte Toxizität der jeweiligen Wirkstoffkombinationen als auch der gebrauchsfertigen Formulierungen gegenüber den Einzelsubstanzen beobachtet werden, die um das 5- bis 50-fache höher lag. Der anschließend durchgeführte AhR-Reporter-Genassay in HepG2-Zellen zeigte für die Produkte Priori Xtra<sup>®</sup> und noch stärker ausgeprägt für Adexar<sup>®</sup>, eine signifikante dosisabhängige Induktion des Rezeptors, die in keiner der anderen Behandlungsgruppen zu beobachten war.

Für Adexar<sup>®</sup> ließ sich zusätzlich eine Genexpressionserhöhung für das AhR-regulierte Gen *CYP1A1* feststellen. Diese Ergebnisse scheinen auf Beistoffe zurückzuführen zu sein.

Der CAR-Transaktivierungsassay zeigte für das Fungizid Priori Xtra<sup>®</sup> eine dosisabhängige Inhibition der Rezeptoraktivität.

Für den PXR konnte für alle getesteten Substanzen und Kombinationen eine ausgeprägte Induktion detektiert werden. Für diesen Rezeptor ist bekannt, dass er unspezifisch ein weites Spektrum an hydrophoben Chemikalien bindet, darunter auch Antimykotika<sup>3</sup>.

#### Fazit

Die Kombination mehrerer Wirkstoffe und die Gegenwart von Beistoffen können die Wirkungen eines Stoffes modifizieren. Beistoffe könnten dabei zur Abschwächung oder Steigerung der *in vitro* beobachteten Veränderungen beitragen. Einige Effekte wurden sogar erst durch das Vorhandensein der Beistoffe hervorgerufen.

Zur Erhebung erster Hinweise auf Kombinationseffekte und zur Reduktion der Zahl von Versuchstieren ist die Entwicklung eines *in vitro* Screening Systems für die regulatorische Bewertung sinnvoll und notwendig. Diese Arbeit stellte einen wichtigen Baustein bei der Entwicklung eines solchen Systems dar.

1. Mesnage R et al. (2014) Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int* 2014;179691.

2. Zahn E, Untersuchung der Mischungstoxizität von Wirk- und Beistoffen in Pestizidprodukten in Zelllinien hepatischen Ursprungs. Masterarbeit, Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin, 2017

3. Kliewer S, Goodwin, B and Willson, TM (2002) The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocr Rev* 23(5):687–702.