

Vedecký článok

Diferenčné účinky glyfosátu a Roundupu na ľudské placentárne bunky a aromatázu

Sophie Richard, Safa Moslemi, Herbert Sipahutar, Nora Benachour a Gilles-Eric Seralini

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, USC-INCRA, Université de Caen, Caen, Francúzsko

Roundup je celosvetovo rozšírený herbicíd na báze glyfosátu, používaný pri pestovaní väčšiny geneticky modifikovaných rastlín, ktoré sú vyšľachtené práve tak, aby ho znášali. Jeho rezíduá môžu vstupovať do potravinového reťazca a jeho účinná zložka glyfosát býva prítomná v riekach ako kontaminant. Napriek tomu, že niektoré ženy, ktoré pracujú v poľnohospodárstve a prichádzajú do styku s glyfosátom majú problémy s otehotnením, vo všeobecnosti je mechanizmus jeho pôsobenia na cicavce spochybňovaný. V predkladanej štúdii dokazujeme, že glyfosát je toxický pre ľudské placentárne bunky JEG3 už po 18 hodinách, a to v nižších koncentráciách, aké sa vyskytujú pri poľnohospodárskom použití, pričom jeho toxický účinok vzrastá s koncentráciou a časom, resp. pri prítomnosti prísad prípravku Roundup. Prekvapivá je skutočnosť, že Roundup je vždy toxickjší ako je jeho aktívna zložka, glyfosát. Pôsobenie oboch sme testovali v nízkych, netoxických koncentráciách, pričom sme sledovali ich účinky na fungovanie aromatázy, enzýmu, ktorý je u cicavcov zodpovedný za syntézu estrogénu. Herbicíd na báze glyfosátu narúša fungovanie aromatázy a hladín mRNA a interaguje s miestom pôsobenia purifikovaného enzýmu. Účinkom glyfosátu, svojim pôsobením na mikrozómy alebo na bunkovú kultúru, pomáhajú ostatné zložky Roundupu. V závere tvrdíme, že u cicavcov možno pozorovať endokrinnodisrupčné a toxické účinky glyfosátu aj Roundupu. Prítomnosť pomocných látok v Roundupe zvyšuje biologickú dostupnosť glyfosátu pre bunkové štruktúry, resp. jeho bioakumuláciu. **Kľúčové slová:** prísady, aromatáza, endokrinná disrupcia, glyfosát, herbicíd, ľudské JEG3 bunky, placenta, reduktáza, Roundup, xenobiotiká. *Environ Health Perspect* 113:716-720 (2005).

Glyfosát je známy ako aktívna zložka širokospektrálneho herbicídu s názvom Roundup. Inhibuje cestu kyseliny šikimovej, ktorá je dôležitá pre syntézu rastlinných proteínov (Schonbrunn et al., 2001) a ukazuje sa taktiež, že moduluje rastlinný cytochróm P450 (Lamb et al., 1998). Všeobecne prevláda mienka, že glyfosát má skôr veľmi špecifickú účinnosť a pre životné prostredie je menej toxický než ostatné pesticídy. Na podklade tohto argumentu boli dokonca vyvinuté transgénne rastliny, ktoré ho tolerujú (Vollenhofer et al., 1999; Williams et al., 2000). Pravdou však je, že ľudia a cicavce nie sú imúnni voči expozícii zvyškom herbicídu z poľnohospodárskych aplikácií (Acquavella et al., 2004), ani voči rezíduám, ktoré vstupujú do potravinového reťazca (Takahashi et al. 2001). Glyfosát býva taktiež detegovaný ako kontaminant v riekach (Coxová, 1998). Okrem kyseliny glyfosátovej obsahuje Roundup aj prísady, ako je napr. surfaktant, polyetyxelovaný mastný amín (POEA) (Coxová, 1998). Tieto prísady sa podľa všeobecnej mienky považujú za riedidlá s regulačnými úlohami. Napriek tomu, že existujú prípady, keď ľudia z poľnohospodárstva prichádzajúci do styku s touto látkou majú problémy s otehotnením, mechanizmus pôsobenia glyfosátu na cicavce je vo všeobecnosti spochybňovaný (Savitz et al., 1997). Pritom je tiež zrejmé, že táto zlúčenina môže mať aj viacero narúšajúcich účinkov na enzýmy (Darwich et al., 2001; Williams et al., 2000). Nedávno bolo navyše dokázané, že narúša bunkový cyklus vo vajčkách ostnatokožcov (Marc et al., 2002) a dokonca aj posttranskripčnú expresiu steroidogénneho akútneho regulačného proteínu (StAR) v Leydigových bunkách v semenníkoch myší (Walsh et al., 2000).

V tejto štúdii sme testovali toxickosť glyfosátu a Roundupu pre humánne placentárne JEG3 bunky a hodnotili sme jej endokrinnodisrupčný potenciál, aký je napríklad typický pre toxicitu iných pesticídov (Nativelle-Serpentini et al., 2003), a to meraním účinkov netoxických hladín týchto látok na enzým zo skupiny cytochróm P450, tzv. aromatázu. Tento enzým zohráva u cicavcov kľúčovú úlohu pri syntéze pohlavných steroidných hormónov. Rodina cytochrómov P450 obsahuje množstvo proteínov, ktoré majú schopnosť metabolizovať xenobiotiká (cudzorodé látky – pozn. prekl.) (Nelson, 1998). Enzým aromatáza sa skladá z produktu génu *CYP19* (Bulun et al., 2003) a súvisiacej od nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP) závislej reduktázy a v organizme je zodpovedný za konverziu androgénov na estrogény. Považuje sa za limitujúci faktor v procese syntézy estrogénu, a teda aj súvisiacich fyziologických funkcií, vrátane mužskej a ženskej gametogenézy (Carreau, 2001), reprodukčnej schopnosti, pohlavnej diferenciácie a dokonca aj rastu kostí. Pri liečbe nádorov závislých od estrogénu podlieha farmakologickej kontrole (Seralini a Moslemi, 2001).

Niektoré účinky na reprodukciu pozorované *in vivo* by mohlo aspoň čiastočne vysvetľovať priame pôsobenie glyfosátu na aromatázu. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli otestovať glyfosát a Roundup priamo na aromatáze prítomnej v mikrozómoch ľudskej placenty a v konských semenníkoch, tkanivách, o ktorých je známe, že sú bohaté na jej obsah (Lemazurier et al., 2001). Okrem toho, aromatázu sme tiež purifikovali z konských semenníkov s cieľom zhodnotiť špecifickosť interakcie v mieste jej pôsobenia práve na tomto pre cicavce tak charakteristickom modeli (Auvray et al., 1998).

Výsledky

Životaschopnosť buniek. Roundup sa na poľnohospodárske účely odporúča aplikovať vo forme vodného roztoku s koncentráciou 1 až 2 % prípravku. Na otestovanie jeho účinku na humánne placentárne JEG3 bunky sme preto zvolili koncentrácie max. do 2 % v médiu s obsahom séra, pričom expozície sme kontrolovali po 18, 24 a 48 hodinách MTT testom za vyššie uvedených podmienok (uvedených v sekcii *Materiály a metódy*, ktorá tu nie je preložená – pozn. prekl.) a porovnávali sme ich s expozíciami glyfosátu. Pre účely porovnávania sme roztoky Roundupu a korešpondujúce množstvá glyfosátu upravili na rovnakú hodnotu pH. Toxicita sa s časom zvyšovala (pri koncentrácii 0,8 % medzi 24 a 48 hodinami až 8-násobne), pričom stredná smrteľná dávka (LD_{50}) bola pri Roundupe (0,7%-nom koncentrácii) približne 1,8-krát nižšia ako pri glyfosáte (obr. 1). Rozdiel bol badateľný dokonca aj po 1-hodinovej inkubácii v médiu bez obsahu séra (obr. 2A), v ktorom sa LD_{50} po 18 hodinách inkubácie dokonca stonásobila (obr. 2B). Umelé zakyslenie 2%-ného Roundupu aj glyfosátového roztoku ($pH\ 5,80 \pm 0,08$ oproti $pH\ 7,91 \pm 0,16$) znížilo životaschopnosť buniek po 18 hod. len o 23 %, preto samo osebe nemôže vysvetľovať 90%-né zníženie životaschopnosti buniek, aké bolo pri tejto koncentrácii pozorované. Keď sme do roztoku glyfosátu pridali Roundup v púhej 0,1%-nej koncentrácii, a obohatili tak jeho roztok o minimálne množstvá Roundupových prísad, životaschopnosť buniek sa významne znížila (obr. 2B).

Činnosť aromatázy v bunkovej kultúre. Činnosť aromatázy sme merali po inkubácii buniek v prítomnosti netoxických koncentrácií Roundupu, resp. glyfosátu rádioimunologickou skúškou (RIA) estrónu E_1 vytvoreného z 200 nM androstendiónu¹. Ako vidno na obr. 3A, po hodine inkubácie došlo k zlepšeniu syntézy estrogénu zhruba o 40 %, no iba s Roundupom. Po 18 hodinách inkubácie sme zaznamenali zreteľnú inhibíciu činnosti aromatázy *in vitro*, pričom stredná inhibičná koncentrácia (IC_{50})² bola 0,04 %, opäť len s Roundupom. Inhibícia je tu prinajmenšom čiastočne zrejme dôsledkom účinku na expresiu génu aromatázy, o čom svedčia znížené hladiny mRNA (obr. 3B). Glyfosát samotný bol za rovnakých podmienok neúčinný. Inhibičný účinok na činnosť aromatázy sa uňho dostavil až po pridaní hoci minimálneho množstva Roundupu, teda po obohatení roztoku glyfosátu o prísady Roundupu.

Činnosť aromatázy v mikrozómoch. Činnosť aromatázy v mikrozómoch sme hodnotili na základe uvoľňovania tritiovej vody z rádioaktívnym izotopom označeného substrátu (Dintinger et al., 1989; Thompson a Siiteri, 1974) v ľudských (obr. 5) a konských mikrozómoch. Inhibícia aromatázy Roundupom bola u oboch modelov cicavcov rovnaká. Stredná inhibičná koncentrácia (IC_{50}) bola za týchto podmienok 0,6 % s Roundupom a viac ako trojnásobná s glyfosátom. Kinetické parametre boli stanovené na základe inkubácie konských semenníkových mikrozómov s rôznymi koncentraciami rádiologicky označeného androstendiónu a Roundupu. Inhibičná konštanta K_i (0,6 %) vykazovala kompetitívnu inhibíciu (obr. 6A).

Enzymatická činnosť purifikovaných enzýmov. V ďalšom priebehu výskumu sme purifikovali účinné zložky enzýmu aromatázy z konských semenníkov, ktoré sú bohatšie na aromatázu než placenta. Inkubácia s herbicídmi demonštrovala priamu interakciu glyfosátu v mieste pôsobenia aromatázy. Spektrálne interakcie medzi Roundupom alebo glyfosátom a miestom pôsobenia purifikovaného cytochrómu P450 – aromatázy – sme získali zmeraním extinkcie preparátov pri vlnových dĺžkach od 375 do 475 nm. V pozorovanom spektre typu II (obr. 6B) bola badateľná interakcia medzi dusíkovým atómom molekuly a hemovým železom cytochrómu. Navyše sme sa podujali otestovať aj účinok herbicídu na všadeprítomnú zložku aromatázy, darcu elektrónu, reduktázu. Činnosť reduktázy, ktorá je závislá od NADP, indikovalo nameranie zvýšenej extinkcie preparátu, ktorá korešponduje s redukciou cytochrómu C. Priamy vplyv na reduktázu bol pozorovaný aj po purifikácii a inkubácii s Roundupom, no v menšej miere (IC_{50} 5 %) ako u cytochrómu P450 – aromatázy, ktorá je zodpovedná za väzbu steroidu a katalýzu syntézy (obr. 7).

Záver

Naše štúdie preukázali, že glyfosát funguje ako disruptor činnosti cytochrómu P450 cicavcov – aromatázy – už v 100-násobne nižších koncentráciách, aké sú odporúčané pre poľnohospodársku aplikáciu. V ľudských placentárnych bunkách je disruptívny účinok pozorovateľný už po 18 hodinách, pričom prípravok má schopnosť vplývať aj na expresiu génu aromatázy. Pri vyšších koncentráciách čiastočne narúša aj činnosť všadeprítomnej reduktázy. Účinky glyfosátu zásadnou mierou sprostredkujú a zosilňujú už v minimálnych koncentráciách, od 0,02 %, prísady Roundupu, o ktorých je známe, že podporujú prenikanie do buniek. Túto skutočnosť treba pri hodnotení pesticídov brať seriózne na zreteľ. Riedenie glyfosátu v preparátoch Roundupu môže znásobiť jeho endokrinnodisruptívny efekt. Roundup preto možno považovať za potenciálny endokrinný disruptor. Navyše pri vyšších dávkach, hoci stále nedosahujúcich koncentrácie klasických poľnohospodárskych roztokov, môže jeho toxickosť pre placentárne bunky vyvolávať isté reprodukčné problémy.

¹ Steroidný hormón fungujúci ako prekurzor syntézy estrogénov. (Pozn. prekladateľa.)

² IC_{50} je štandardná miera účinnosti, napr. lieku. Naznačuje, koľko daného lieku alebo látky je potrebné na inhibovanie nejakého biologického procesu (alebo komponentu procesu, ako napr. nejakého enzýmu, bunky, bunkového receptora, či mikroorganizmu) na polovicu. (Pozn. prekladateľa.)

Preklad uskutočnený / Translation executed on this29/10/2013.....

Ako prekladateľ anglického a slovenského jazyka, menovaný Ministerstvom spravodlivosti Slovenskej republiky, zapísaný v zozname znalcov, tlmočníkov a prekladateľov pod evidenčným číslom 971088, potvrdzujem, že preklad súhlasí s textom priloženej listiny.

As a sworn translator of English and Slovak languages, appointed by the Ministry of Justice of the Slovak Republic, registered with the List of Experts, Interpreters and Translators under reg. number 971088, I hereby confirm that this is a true translation of the attached document.

Prekladateľský úkon je zapísaný v prekladateľskom denníku pod poradovým číslom / Translator's Register No.:

.....170/2013.....

Mgr. Martin Krakovský, PhD.
prekladateľ / Sworn Translator

