

## PREKLAD Z ANGLICKÉHO JAZYKA

### Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells

Nora Benachour and Gilles-Eric Séralini\*

*University of Caen, Laboratory Estrogens and Reproduction, UPRES EA 2608, Institute of Biology, Caen 14032, France*

*Received June 16, 2008*

We have evaluated the toxicity of four glyphosate (G)-based herbicides in Roundup (R) formulations, from  $10^5$  times dilutions, on three different human cell types. This dilution level is far below agricultural recommendations and corresponds to low levels of residues in food or feed. The formulations have been compared to G alone and with its main metabolite AMPA or with one known adjuvant of R formulations, POEA. HUVEC primary neonate umbilical cord vein cells have been tested with 293 embryonic kidney and JEG3 placental cell lines. All R formulations cause total cell death within 24 h,...

---

### Prípravky s obsahom glyfosátu indukujú apoptózu a nekrózu v humánnych umbilikálnych, ebyronických a placentárnych bunkách

Nora Benachou a Gilles-Eric Séralini\*

*University of Caen, Laboratory Estrogens and Reproduction, UPRES EA 2608, Institute of Biology, Caen 14032,*

*Francúzsko*

*Prijaté 16. júna 2008*

Hodnotili sme toxicitu štyroch herbicídov obsiahnutých v prípravkoch Roundup s obsahom glyfosátu podľa vplyvu ich roztokov s koncentráciou  $10^{-5}$  na tri rôzne typy humánnych buniek. Použitá miera riedenia je d'aleko pod úrovňou poľnohospodárskych odporúčaní a korešponduje s nízkymi hladinami reziduí, aké sú prítomné v potravinách a v krmine. Prípravky Roundup boli porovnávané s ich samotnou účinnou zložkou, glyfosátom, d'alej s hlavným produktom jeho degradácie, kyselinou aminometylfosfónovou (AMPA) a s jednou známou prísadou Roundupu, polyetylhexovaným mastným aminom (POEA). Testovanými bunkami boli cievne endotelové bunky z ľudského popočníka (HUVEC) a línia buniek ľudských embryonálnych obličiek s označením 293 a placentárna bunková línia JEG 3. Všetky testované komerčné preparáty Roundup spôsobujú totálnu bunkovú smrť do 24 hod...

**Zadávateľ:**

**Prekladateľ:**

**Lesoochranárske zoskupenie VLK**

**Martin Krakovský, PhD.**

## Prípravky s obsahom glyfosátu indukujú apoptózu a nekrózu v humánnych umbilikálnych, ebyronických a placentárnych bunkách

Nora Benachou a Gilles-Eric Séralini\*

*University of Caen, Laboratory Estrogens and Reproduction, UPRES EA 2608, Institute of Biology, Caen 14032, Francúzsko*

*Prijaté 16. júna 2008*

Hodnotili sme toxicitu štyroch herbicídov obsiahnutých v prípravkoch Roundup s obsahom glyfosátu podľa vplyvu ich roztokov s koncentráciou  $10^{-5}$  na tri rôzne typy humánnych buniek. Použitá miera riedenia je ďaleko pod úrovňou poľnohospodárskych odporúčaní a korešponduje s nízkymi hladinami rezidui, aké sú prítomné v potravinách a v krmive. Prípravky Roundup boli porovnávané s ich samotnou účinnou zložkou, glyfosátom, ďalej s hlavným produkтом jeho degradácie, kyselinou aminometylfosfónovou (AMPA) a s jednou známou prísadou Roundupu, polyetyxelovaným mastným amínom (POEA). Testovanými bunkami boli cievne endotelové bunky z ľudského pupočníka (HUVEC) a línia buniek ľudských embryonálnych obličiek s označením 293 a placentárna bunková línia JEG 3. Všetky testované komerčné preparáty Roundup spôsobujú totálnu bunkovú smrť do 24 hod. prostredníctvom inhibície činnosti mitochondriálneho enzymatického komplexu, sukcinátdehydrogenázy, a nekrózu, poškodením membrány, o čom svedčí uvoľňovanie cytosolovej adenylátkinázy. Preparáty ďalej indukujú apoptózu<sup>1</sup>, a to aktiváciou činnosti enzýmov kaspáz 3/7. Je to potvrdené typickou fragmentáciou DNA, scvrknutím bunkového jadra (pyknózou) a jeho rozpadom (karyorexiou), detegovanými metódou DAPI. Glyfosát vyvoláva len apoptózu, pričom citlivosť buniek HUVEC na tento jeho vplyv je pri aplikovanej koncentrácií celkovo 100-násobne vyššia. Zhubné účinky testovaných prípravkov, mimochodom, proporčne neodzrkadľujú koncentrácie glyfosátu, ale závisia skôr od charakteru príasad. AMPA a POEA, samostatne aj v spojení, poškodzujú bunkové membrány rovnako ako Roundup, no pri odlišných koncentráciách. Ich zmesi sú vo všeobecnosti škodlivejšie než je samotný glyfosát. Na záver konštatujeme, že prísady Roundupu, ako napr. POEA, menia prieplustnosť ľudských buniek a toxicitu už vyvolanú glyfosátom ešte znásobujú indukovaním apoptózy a nekrózy. Pri určovaní reálneho prahu toxicity glyfosátu musí byť preto braná do úvahy aj prítomnosť príasad a degradačné produkty glyfosátu a taktiež rast toxickej účinnosti s časom, a prípadne bioakumulácia. Pri analyzovaní a hodnotení pôsobenia Roundupu in vivo sa na toto nesmie zabúdať. Táto práca jasne potvrdzuje, že prísady v preparátoch predávaných pod značkou Roundup nie sú, ako o nich tvrdí ich výrobca, inertné. Navyše, rozličné zmesi dostupné na trhu môžu spôsobať poškodenie a dokonca aj smrť buniek už svojimi koncentráciami v reziduánoch, aké sa podľa očakávaní nachádzajú v potravinách a krmivách vyrobených z poľnohospodárskych produkcií ošetrených Roundupom.

### Úvod

Štúdia sa sústredí na mechanizmus bunkovej smrti ľudských buniek, indukovaný štyrmi rôznymi preparátmi s obsahom glyfosátu so širokým poľnohospodárskym využitím. Vybrali sme preparáty Roundup Express (R7.2), Roundup Bioforce alebo Extra 360 (R360), Roundup Grand Travaux (R400) a Roundup Grand Travaux Plus (R450), ktoré sme aplikovali v subpoľnohospodárskych koncentráciách. Testovali sme ich na troch dôležitých enzymatických biomarkeroch. Najprv, na membránovej úrovni, po uvoľnení do média sme merali činnosť adenylát kinázy (AK) (31), pričom sme odhalili ruptúru cytoplazmatickej membrány. To korešponduje s nekrózou, resp. sekundárnu nekrózou na konci apoptózy (32). V druhom sledge, na úrovni mitochondriálneho dýchania, sme merali činnosť sukcinátdehydrogenázy (SDH) (33). Po tretie, testovali sme cytosolovú hladinu činnosti kaspázy 3 a 7 a in situ DNA fragmentáciu (metódou DAPI) s cieľom stanoviť, či je iniciovaná cesta apoptózy (34-36). Nekróza sa prejavuje napučaním cytoplazmatických organel (predovšetkým mitochondrií) a kde-tu kondenzáciou jadrového chromatínu, kým apoptózu sprevádza normálny vzťah organel v cytoplazme a nepoškodená plazmatická membrána, no zmrštenie cytoplazmy a jadra (pyknóza) a fragmentácia jadra (karyorexia); po rozdrobení jadra na menšie kompaktné zhluky sa bunka rozpadne na množstvo membránov spojených apoptotických teliesok (37, 32).

### Výsledky

Po prvý krát sme študovali mechanizmus bunkového pôsobenia rôznych zmesí Roundupu na ľudské bunky. Tie boli získané z placenty, z embryonálnej obličky a z pupočníka novorodenca. Prvým prekvapením bolo zistenie, že všetky štyri herbicídy pod značkou Roundup, ako aj glyfosát spôsobujú u všetkých testovaných typoch ľudských buniek bunkovú smrť, pričom majú porovnatelnú toxicitu, akurát pri odlišných koncentráciách. Napríklad 20 milióntín (ppm) R400, toho najtoxickejšieho, korešponduje približne 8 ppm (47  $\mu$ M) glyfosátu s príasadami (Obr. 1). Naproti tomu, 4–10 ppm samotného glyfosátu nemá toxicítu; toxicita samotného glyfosátu začína až okolo 1 %. Mechanizmus pôsobenia je pritom u všetkých druhov R konštantne rovnaký: dochádza k uvoľňovaniu AK, čo indikuje poškodenie bunkovej membrány a k inhibícii mitochondriálnej SDH (Obr. 1). Pri všetkých druhoch Roundupu sú línie buniek 293 a JEG3 1,5- až 2-násobne citlivejšie na poškodenie membrány (AK) než na mitochondriálne pôsobenie (SDH), resp. bunky HUVEC sú citlivé na oboje rovnako. Naproti tomu glyfosát indukuje len mitochondriálnu toxicitu, bez poškodenia bunkovej membrány. Celkom neočakávane sme zistili, že R400 je toxickejší ako iné prípravky obsahujúce viac glyfosátu, ako napr. R450, pričom R450 je ale škodlivejší ako R360, R7.2 a glyfosát, a tak teda

<sup>1</sup> Programovanú bunkovú smrť. (Pozn. prekladateľa.)

pozorujeme, že všetky prípravky sú vo vzťahu k obsahu účinnej látky, teda glyfosátu, škodlivé celkom neproporčne. Ilustrácia tohto zistenia sa nachádza na obr. 2.

Mitochondriálna inhibícia sukcinátdehydrogenázy (SDH) indikuje bunkovú asfyxiu (dusenie – pozn. prekl.). Z obr. 2 je zrejmé, že R7,2, R360 a glyfosát s prísadami pôsobia pri navodzovaní bunkovej smrti veľmi porovnatelne, kým Roundup 400 a R450 majú nepriamo úmerné účinky. Nejde pritom o artefakt, keďže línie embryonálnych aj placentárnych buniek sa v tomto ohľade správajú pozoruhodne podobne, a na všetky zmesi Roundupu a na glyfosát analogicky reagujú aj primárne pupočníkové bunky (HUVEC) (Obr. 2). Mortalita vo všetkých prípadoch nie je lineárne spojená s glyfosátom. Bolo teda nutné preskúmať hypotézu, že v zložení produktu pôsobia iné toxické látky.

V súlade s tým sme ako k prvemu pristúpili k samostatnému preskúmaniu hlavného metabolitu glyfosátu, teda produktu jeho degradácie, kyseliny AMPA, a surfaktantu POEA, o ktorom výrobca proklamuje, že je hlavnou prísadou produktu (ktorého presné zloženie je výrobným tajomstvom), a to v porovnaní s glyfosátom a R360 čoby kontrolnými lágkami a v podobných podmienkach, aké sú uvedené na obrázku 1, a pri veľmi nízkych subpoľnohospodárskych koncentráciách ( $10^{-6}$ , ak je produkt použitý v čistej forme, ako tvrdia niektorí farmári a  $10^{-4}$ , ak je zriadený podľa odporúčaní, teda na 1 %).

Podľa tvrdenia výrobcu, glyfosát je aktívnu zložkou, ktorá je podľa jeho vlastných vyhlásení netoxická pre ľudské bunky, no v spojení s inertnými zložkami je toxická pre rastlinné bunky. Naša štúdia po prvýkrát dokazuje, že všetky produkty s obsahom AMPA a POEA, hoci v závislosti od ich koncentrácií, vyvolávajú v ľudských bunkách pôsobenie na SDH a AK, a tak mortalitu (Obr. 3). Prekvapivo, údajne inertná prísada POEA je tým najsilnejším činiteľom. Už od koncentrácie 1 milióntiny (ppm) začína meniť SDH v bunkách HUVEC a AK v líniach buniek 293 a JEG3. Prípravok Roundup je potom jedovatejší než glyfosát alebo AMPA. Metabolit AMPA samotný ničí bunkovú membránu vo všetkých testovaných typoch buniek (spôsobuje uvoľňovanie AK). Glyfosát takýto efekt nemá, hoci zase, v porovnaní s AMPA pôsobí na SDH 3 až 8-násobne viac inhibične, akurát s malými odchýlkami v intenzite u jednotlivých testovaných typov buniek. V každom prípade, keďže však poškodenie bunkovej membrány je vo všeobecnosti citlivejšia záležitosť, metabolit AMPA je napokon pre ľudské bunky toxickejší než glyfosát. Nuž a POEA je najtoxickejšia; ak by bola jedinou prísadou Roundupu 360, jej maximálna koncentrácia by, podľa buniek, bola 1–24 %. POEA by sa takto dala povaľať za hlavnú zložku z hľadiska spôsobovania smrti ľudských buniek a za škodlivejšiu zložku než je glyfosát. Keďže je však Roundup viskóznejší než 1 % POEA plus glyfosátu, je zrejmé, že sa v ňom nachádzajú iné zlúčeniny.

Z tohto dôvodu sa javilo ako nevyhnutné preštudovať kombinované účinky na integritu bunkovej membrány (detegovaním uvoľňovania AK). Zlúčeniny sme testovali v pároch v maximálnych koncentráciách, pri ktorých ešte samostatne neovplyvňujú SDH (Obr. 4). Cieľom bolo zhodnotiť úlohu každej z nich, keďže vieme, že R ich po metabolizácii v organizme obsahuje všetky. Oproti predchádzajúcim výsledkom bunky reagovali inak. Jednotlivé kombinácie pôsobili disruptívne na embryonálne a pupočníkové bunky, kým membrány placentárnych nádorových buniek sa prejavili ako rezistentnejšie, avšak zdôrazňujeme: len voči týmto kombinaciám. Z testovania je teda celkom zrejmé, že zatiaľ čo samostatne majú glyfosát, POEA aj AMPA v nízkych koncentráciách na embryonálne bunky nízke toxické účinky, akákoľvek kombinácia ich dvojic pri tej istej finálnej koncentrácií je už výrazne škodlivá (Obr. 4).

Takto sme teda objasnili, že Roundupom a glyfosátom indukovaná bunková smrť môže byť, prinajmenšom čiastočne, zapríčinená apoptózou sprostredkovanej indukovaním kaspáz 3/7 (Obr. 5). Kaspázy sú aktivované po 6 hod. a maximálnu hladinu dosahujú vo všetkých prípadoch v čase 12 hod., pričom primárne pupočníkové bunky sú v tejto fáze 60–160 krát citlivejšie než línie 293 a JEG3 buniek. Navyše, glyfosát a R360 presne v tých istých koncentráciách, od 50 ppm, zvyšujú u pupočníkových (HUVEC) buniek indukciu kaspáz. Pri tejto koncentrácií glyfosát, zdá sa, na to, aby indukoval smrť, vôbec nepotrebuje prísady. Samostatne je na tejto ceste dokonca o 30 % potentnejší než Roundup. Prekvapujúci je fakt, že pôsobil mimoriadne rýchlo na apoptózu ľudských buniek už pri 500–1000-násobne nižších koncentráciách, než aké sú používané v poľnohospodárstve. Táto apoptotická cesta pôsobenia na kaspázy bola v pupočníkových bunkách navyše glyfosátom aktivovaná už pri 200-násobne nižšej koncentrácií, než aká je potrebná na jeho pôsobenie na SDH, a Roundupom pri 60-násobne nižších koncentráciách, a to za štvornásobne kratší čas (6–24 hod.). Po 24 hod. pôsobenia, kaspázy klesli na bazálnu úroveň, zatiaľ čo reakcie SDH a AK boli signifikantné. Tieto pozorovania korešpondujú s postupným ubúdaním aktivity kaspáz 3/7 v apoptotických bunkách, v ktorých už v tom čase prebieha sekundárna nekróza *in vitro* (44).

Pozorované výsledky potvrdzuje morfológia buniek po pôsobení Roundupu (napríklad R400, Obr. 6B,D,E) v porovnaní s neexponovanými bunkami z kontrolnej skupiny (Obr. 6A,C,F). V skutočnosti už veľmi nízka, 0,005 % koncentrácia Roundupu spôsobuje také závažné účinky ako je bunková smrť, strata adhézia, scvrkávanie a fragmentácia apoptotických teliesok. Potvrdzuju to aj zistenia prezentované na obr. 7, kde metódou DAPI fluorescenčne označená DNA naznačuje stav buniek po pôsobení 0,5 % koncentrátu R360 počas 24 hodín. Typická fluorescence apoptotických buniek, vyznačujúca sa kondenzáciou DNA, je badateľnejšia u buniek pod vplyvom herbicídov než u buniek z kontrolnej skupiny (A, D, G) a badateľnejšia u buniek pod vplyvom R (C, F, I) než pod vplyvom samotného glyfosátu (B, E, H), pokiaľ ide o bunky línie 293 a JEG3. Primárne (HUVEC) bunky vykazujú podobnú senzitivitu na glyfosát aj na R, rovnako ako tomu je pri aktivácii kaspáz (Obr. 5).

## Záver

V závere konštatujeme, že jednotlivé zmesi Roundupu, jeho tzv. „preparáty“, menia bunkovú prieplustnosť, toxicitu a cesty xenobiotík: vo všetkých pozorovaných prípadoch Roundup indukuje bunkovú smrť vo väčšej miere než AMPA alebo glyfosát, pričom glyfosát vyvoláva apoptózu bez poškodenia membrány (u buniek HUVEC už od koncentrácie 50 milióntin /ppm/). Naproti tomu, glyfosát spolu s prísadami v rôznych preparátoch Roundupu narúša bunkové a mitochondriálne membrány a podnecuje nekrózu. Je teda zrejmé, že pri určovaní „prahovej“ hladiny pôsobenia herbicídu treba bráť do úvahy dĺžku expozície, prítomnosť prísad, predovšetkým POEA, produkty metabolizmu, bioakumuláciu a časové omeškanie účinkov. Všetky vyššie uvedené účinky boli preukázané na koncentráciách, ktoré sú ďaleko pod úrovňami poľnohospodárskych herbicídnych roztokov

(od  $10^4$  ppm). Jasne to potvrdzuje, že prísady v jednotlivých prípravkoch Roundup nie sú vôbec inertné. Navyše, rozličné zmesi dostupné na trhu môžu spôsobovať poškodenie a dokonca aj smrť buniek už svojimi koncentráciami v rezíduách, aké sa podľa očakávaní nachádzajú v potravinách a krmivách vyrobených z poľnohospodárskych produkcií ošetrených Roundupom.

*Toto je čiastočne zredukovaná verzia originálnej štúdie. Časti Materiály a metódy a Podákovanie sme nechali po dohode so zadávateľom nepreložené. Pre Literatúru pozri predlohu. (Poznámka prekladateľa.)*

Preklad uskutočnený / Translation executed on this ..... 29/10/2013.....

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 súhlasi 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.:

..... 171/2013.....

Mgr. Martin Krakovský, PhD.  
prekladatel / Sworn Translator



