

Søren Skogstad Nielsen

Oversættelse af <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/tx800218n?cookieSet=1>

Af Søren Skogstad Nielsen

Med god hjælp af: google translate, wikipedia, dogpile, Wiktionary

Obs: en hel del fagudtryk er forklaret i fodnoter, men jeg har ikke altid fået fodnoten placeret der hvor udtrykket forekommer første gang.

Ikke alle råoversættelser er efterbehandlede, det står nævnt ved hvert afsnit.

Titel:

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

Glyphosat blandinger inducere Apoptosis og nekrose i Human tæ, Embryonale og placenta Celler

Publikationen fundet på nettet hos: ACS Publications

Som beskriver sig selv som følgende:

Publikations Divisionen af American Chemical Society giver det verdensomspændende videnskabelige samfund en omfattende samling af de mest citerede peer-reviewed tidsskrifter i den kemiske og beslægtede videnskaber. Ud over 34 forsknings-tidsskrifter, publiceres også det ugentlige newsmagazine for den kemiske virksomhed, 'Chemical & Engineering News. Med ACS Journal Arkiv, giver ACS søgbare adgang til over 130 år af original forskning i kemi, herunder mere end 750.000 artikler, der går tilbage til den konstituerende udgave af Journal of American Chemical Society i 1879.

Peer-reviewede tidsskrifter fra ACS offentliggør banebrydende artikler på tværs af et bredt spektrum af videnskabelige discipliner-landbrugsmæssige videnskab, bioteknologi, analytisk kemi, anvendt kemi, biokemi og molekylær biologi, kemiske biologi, kemisk ingeniørvidenskab, datalogi, crystallography, energi og brændsler, levnedsmiddelvidenskab, miljø-videnskab, uorganiske & nuklear kemi, materiallære, medicinsk kemi, organisk kemi, farmakologi, fysisk kemi, anlæg videnskaber, polymer videnskab, og toksikologi. Bredden og rækkevidden af ACS Tidsskrifter er enestående.

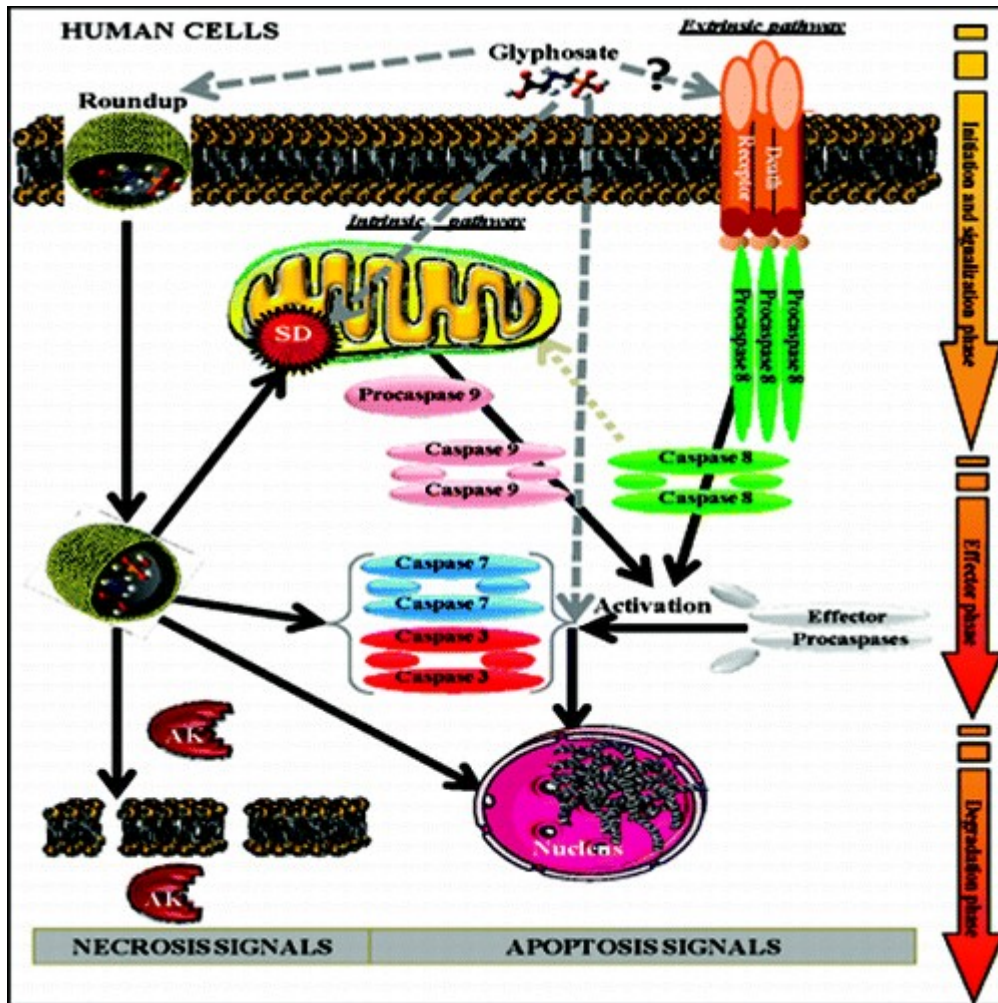
Abstract:

Vi har evalueret toksiciteten af fire glyphosat (G)-baserede herbicider i Roundup (R) formuleringer¹, i 10⁵ gange fortyndinger, på tre forskellige menneskelige celletyper. Dette fortyndings niveau ligger langt under landbrugs-anbefalinger og svarer til de lave restniveauer man finder i fødevarer eller foder. Formuleringer er blevet sammenlignet med G alene og med sine vigtigste metabolit AMPA eller med en kendt adjuvans R formuleringer². Typer af adjuvanter omfatter: , POEA³.

1 Blandinger af forskellige stoffer efter en forskrift, f.eks. en recept

2 Adjuvanter er farmakologiske og immunologiske agenter der ændrer virkningen af andre stoffer (fx lægemidler, vacciner), mens der kun er få om nogen direkte virkninger, af sig selv

3 Polyethoxylated talg amin er et overfladeaktivt stof, der øger aktiviteten af herbicider. Det forbedrer opløseligheder mange fælles herbicider i organiske opløsningsmidler [1], øge deres udbredelse på voksmajsstivelse overflader af planter. Det kan også interferere med funktionen af haletudse gæller [2] [citation behov]. Det overfladeaktive stof er



HUVEC⁴ primære neonate navlestrengen vene celler er blevet testet med 293 embryonale nyre-og JEG3 placentamembran cellelinjer. Alle R formuleringer forårsagede komplet celledød inden for 24 timer, gennem en hæmning af mitokondrie succinat dehydrogenase aktivitet, og nekrose ved frigivelsen af cytosolic adenylate kinase med membran skader. De er inducerer også apoptosis⁵ via aktivering af enzymatisk caspases 3 / 7 aktivitet. Dette bekræftes af karakteristisk DNA fragmentering, kerne krympning (pyknosis), og kerne opsplitting (karyorrhexis), som er påvist ved DAPI i apoptotic runde celler. G provokerer kun apoptosis og HUVEC er 100 gange mere følsom samlet på dette niveau. De skadelige virkninger er ikke proportional med G koncentrationer men afhænger snarere af karakteren af adjuvans. AMPA og POEA anvendt separat og synergistisk, skader celle membraner som R, men med andre koncentrationer. Blandinger heraf er generelt endnu mere skadeligt sammen med G. Det kan konkluderes, at R adjuvanter som POEA ændrer menneskecelle permeabilitet og amplificere toksicitet induceret allerede ved G via apoptosis og nekrose. Den egentlige grænse for G toksicitet skal tage hensyn til tilstedeværelsen af adjuvanter

ikke reguleret af miljølovgivningen, fordi det ikke anses for en aktiv ingrediens i herbicid.

- 4 Human tæt vene endoteliale celler (HUVEC) er isoleret fra normal human tæt vene. De er kuldepræservede ved efter dyrkning og kan opformeres mindst 16 gange. HUVEC er følsomme over for cytokinproduktion stimulation i samt cellesuspension adhæsions molekyler. Disse celler er almindeligt anvendt til fysiologiske og farmakologiske undersøgelser, såsom makromolekyle transport¹, blod coagulation², og fibrinolyse³.
- 5 (biologi, cytologi) En proces med programmeret celledød, hvorved celler undergår en ordnet sekvens af hændelser, der fører til død af cellen. Den kan opstå under væksten og udviklingen af den organisme, som en del af den normale celle ældning, eller som en reaktion til en skade på cellen. *Celler kan gennemgå apoptosis hvis de har lidt ikke reparerbare skader.*

men også G metabolisme og tidsforstærkende virkninger eller bioakkumulation. Dette bør drøftes ved analysering af in vivo giftige aktioner af R.

Herværende arbejde bekræfter klart, at adjuvanter i Roundup formuleringer ikke er inerte⁶. Samt at markedsførte forbindelser med R tilgængelige på markedet kan medføre celle skader og endda døden i koncentrationer, som kan forventes, især i fødevarer og foder fremstillet af R formulering-behandlede afgrøder.

Introduktion

Mennesker udsættes dagligt for et stort antal xenobiotiske⁷ stoffer og deres metabolitter, der er til stede som forurenende stoffer (1). De fungerer som blandinger med kompenserende, multiplicative eller synergistiske virkninger, som vi har vist (2) med andre (3, 4). De vigtigste glyphosat (G) formuleringer, kommercialiserede som Roundup (R) fra Monsanto Company, som blandinger af G og forskellige adjuvanter med forskellige koncentrationer. Vi har undersøgt disse produkter, som er de vigtigste nonselective herbicider verdensplan (5). Deres anvendelse og tilstedeværelse i fødekæden (6) er stigende, da mere end 75% af genetisk modificerede spiselige planter er designet til at tåle høje niveauer af disse forbindelser (7). G og dets vigtigste metabolit aminomethylphosphonic syre (AMPA) blev klassificeret blandt de første forurenende stoffer i floder (8). Adjuvanter er mindre målt i miljøet, idet de normalt betragtes som inerte og er beskyttet som et "forretningshemmeligheder" i fremstillingsindustrien (9). Men blandt dem, synes den fremherskende at være den polyethoxylated tallowamine eller POEA (10, 11), som selv har nogen toksicitet (12), som forårsager okulær brandsår, rødmen, hævelser og blærer, kortsigtede kvalme og diarré. I kombination med G, bliver blandingen mere aktive (13). Disse produkter, som vaske-og rengøringsmidler, kan tillad G's indtrængen gennem plasmatic membraner, potentialization af sin indsats, en øget stabilitet, og bioakkumulering (14, 15).

Dosis-og tid-afhængig cytotoxicitet af R Bioforce (360 g / L i G, R360) på menneskers placentamembranen og embryonale celler (15) kunne redegøre for i det mindste delvis nogle reproduktive problemer (16). Blandt de to linjer, 293 embryonale celler har vist sig at være meget egnet til at anslå den hormonale aktivitet for xenobiotiske (17), og JEG3 celler betragtes også som en nyttig model for behandlingen placentamembranen toksicitet (18). Disse linjer kan være lige så eller endda mindre følsomme over for xenobiotiske end primære kulturer (19). I den foreliggende undersøgelse, vi har også prøvet den mekanisme, hvorved R blandinger påvirker menneskers primærelementer af tæt vene lednings endoteliale celler (HUVEC) til sammenligning.

Den endotelial foring af blodkar udgør en permeabel barriere mellem blod og det underliggende væv. Denne endothelium spiller også en vigtig rolle i forskellige fysiologiske processer, såsom metabolismen af vasoactive stoffer og vedligeholdelse af antitrombotiske faktorer. (20). Den endoteliale celler eksponeres direkte til kemikalier, der cirkulerer i blodet i navlestrengen og passerer gennem placenta (21). Det er velkendt, at HUVEC celler kan være et mål for skadelige virkninger af xenobiotiske aktiveret i reaktive metabolitter (22, 23). Andre somatiske celletyper har været brugt til at studere pesticid toksicitet og apoptosis såsom hela (24) og Jurkat (25), men ingen var før behandlet af glyphosat.

I humane celler, har vi vist, at G blandet med adjuvanter i R360 var cytotoxisk gennem ændring af succinat dehydrogenase SD (14, 15). Med isoleret rotte lever mitokondrier, er det godtgjort, at R undertrykker mitokondrie kompleks II (SD) og III (26). I havlevende dyr påvirkes æg, R forværrer

6 Et inaktivt stof, er i denne sammenhæng, et stof der ikke har en giftig virkning på de arter, det pesticidie det indgår i er beregnet til at bekæmpe.

7 Udtrykket xenobiotiske er meget ofte anvendeti forbindelse med forurenende stoffer, såsom dioxiner og polychlorbiphenyler og deres virkning på biota, fordi xenobiotiske forstås som stoffer udenfor det biologisk system, dvs kunstige stoffer, som ikke findes i naturen, før de blev syntiserede af mennesker.

cellecyclus checkpoints, og G med sin adjuvanter inhiberer udrugning samt enzym transskription synergistisk (27, 28). For nylig blev det vist at der aktiveres DNA-skader i CDK1/cyclin B i den første celle cyklus med udvikling (29, 30) af celledød ved apoptosis i tilfælde af svigt af DNA-reparation.

Dette arbejde fokuserer på celledød mekanisme i menneskelige celler induceret af fire forskellige G formuleringer med et stort antal landbrugs-applikationer. Vi har valgt Roundup Express (R7.2), Roundup Bioforce eller Extra 360 (R360), Roundup Grand Travaux (R400), og Roundup Grand Travaux Plus (R450) på subagricultural fortyndinger. Vi testede dem på tre vigtige enzymatiske biomarkører. Først på membranen plan har vi målt adenylate kinase (AK) aktivitet efter sin løsladelse på mellemlang (31), afslørede cytoplasmatiske membran brud, givende en nekrose og / eller en sekundær nekrose i slutningen af apoptosis (32). I mitokondrie respiration området har vi målt succinat dehydrogenase (SD) aktivitet (33). For det tredje har vi testet cytosol niveau med caspase 3 og 7 aktiviteter til at bestemme apoptosis pathway (34-36) og in situ DNA fragmentering (DAPI). Nekrose er konstateret ved cytoplasmatiske hævelse, ruptur af plasma membran, hævelse af cytoplasmatiske organeller (især mitokondrier), og nogle kondensationer af nukleare chromatin, mens apoptosis er manifesteret ved cytoplasmatiske og nukleare kondensation (pyknosis), nuklear opsplitning (karyorrhexis), normal morfologiske udseende cytoplasmatiske organeller, og en intakt plasma membran; Følgende nukleare fragmentering, cellen disaggregates i en række membran-bundet apoptotic organer (37, 32). Celledød er nu kendt for at være forårsaget af en række forskellige mekanismer. Den kan inddeles i fire forskellige typer, baseret på morfologiske karakteristika: apoptosis (type 1), autophagy (type 2), nekrose (oncosis, type 3), og mitotisk katastrofe (37).

De tre menneskelige celletyper har tilladt os at skabe indsigt i ikke blot følsomheden af disse modeller, men også de generelle menneskecelle veje for G-baserede pesticider aktioner fra 1 ppm (0,0001%); disse blev produceret af G selv, dets vigtigste metabolit AMPA, og de vigtigste adjuvans POEA, enkeltvis eller i kombination.

Kemiske stoffer 'Råoversættelse'

N-Phosphonomethyl glycin (glyphosat, G, PM 169,07) og dets vigtigste metabolit AMPA (PM 111,04) blev købt fra Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Frankrig). Herbicidet Roundup formuleringer (Monsanto, Antwerpen, Belgien) var tilgængelige på markedet: Roundup Express 7.2 g / L i G, homologation 2010321 (R7.2); Bioforce eller Extra 360 på 360 g / L i G, homologation 9800036 (R360) ; Grands Travaux 400 g / L i G, homologation 8800425 (R400) og Grands Travaux plus 450 g / L i G, homologation 2020448 (R450). En 2% opløsning af Roundup (1 eller 2% er anbefalet af virkningen for landbrugs brug) og en tilsvarende løsning af glyphosat til Roundup Bioforce blev forberedt i serum-free medium og justeres til pH 5,8 med 2% Roundup Bioforce løsning. Den største adjuvans af Roundup, polyethoxylated tallowamine (POEA på 785 g / L), var en gave fra Pr. Robert Bell (UMR 7150 CNRS / UPMC, Station Biologique de Roscoff, Frankrig). Successive fortyndinger blev opnået med serum-free medium. 4', 6'-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid (DAPI) nukleinsyre pletdiameter pulver blev indhentet fra Lonza (Saint Beauzire, Frankrig). 3 - (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) og alle andre forbindelser, ellers præciseret, blev indhentet fra Sigma-Aldrich. MTT blev udarbejdet som et 5 mg / ml stamopløsning i fosfatbufferet saltvand, filtreres gennem et 0,22 µm filter før brug og fortyndes til 1 mg / ml i et serum-free medium.

Celle kulturer: 'Råoversættelse'

Human primærelementer

Det menneskelige primærelementer bruges i dette arbejde var HUVEC (C2519A), som Lonza. Celler (passage 5 eller 6) er blevet dyrket i henhold til den leverandør, i særlige endotelial vækstmediet EGM-2 SingleQuots (CC-4176) indeholder hEGF, hydrocortison, GA-1000 (Gentamicin, amphotericin B), FBS (føtale bovint serum), VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, ascorbinsyre og heparin. Halvtreds tusinde celler pr godt blev dyrket ved 37 ° C (5% CO₂, 95% luft) over en 24 timers periode til 80% sammenstrømningen med 48 og plader og blev skyllet med serum-fri EGM-2.

Menneskecelle Lines

Det menneskelige embryonale nyre 293 cellelinje (ECACC 85120602) og de menneskelige choriocarcinoma afledte placentamembranen JEG3 cellelinje (ECACC 92120308) blev fremlagt af CERDIC (Sophia-Antipolis, Frankrig). Cellerne blev dyrket i phenolrødt Eagle's modificerede mindst vigtigt medium (EMEM; Abcys, Paris, Frankrig) indeholdende 2 mM glutamin, 1% uvæsentlige aminosyre, 100 U / ml antibiotika (en blanding af penicillin, streptomycin og fungizone; Lonza), 10 mg / ml væske kanamycin (Dominique Dutscher, Brumath, Frankrig), og 10% FBS (PAA, LES MUREAUX, Frankrig). Den JEG3 cellelinje blev suppleret med 1 mM natrium pyruvat. Halvtreds tusinde celler pr godt blev dyrket ved 37 ° C (5% CO₂, 95% luft) over en 48 h til 80% sammenstrømningen med 48 og plader og blev skyllet med serum-fri EMEM.

Celle behandling 'Råoversættelse'

Celler blev eksponeret for 24 timer i serum-free medium til forskellige fortyndinger af de forskellige behandlinger, herunder de fire Roundup formuleringer (R7.2, R360, R400 og R450), G, AMPA eller POEA (14 koncentrationer fra 10 ppm til 2 %) og, navnlig for POEA, blev testet ved meget lave koncentrationer af 1 og 5 ppm; for AMPA testede vi desuden 4, 6, 8, og 10%. I en anden sag, celler blev inkuberet med G, AMPA, og POEA blandinger af par ved det endelige nontoxic fortynding på SD på 0,5% på den menneskelige cellerlinjer (293 eller JEG3) og 0,05% på den menneskelige primærelementer (HUVEC) i sammenligning til R360.

For yderligere oplysninger i hver enkelt celle type, tre kombinationer blev undersøgt. For de to cellerlinjer, første blanding var kombinationen af G (0,4999%) med POEA (0,0001%), det andet var kombinationen af G (0,4%) med AMPA (0,1%), og den tredje var AMPA (0,4999 %) plus POEA (0,0001%). For det primære HUVEC celler, første blanding var G (0,04999%) med POEA (0,0001%), det andet var G (0,04%) med AMPA (0,01%), og den tredje var AMPA (0,04999%) plus POEA (0,0001 %).

Kriterier for celle død 'Råoversættelse'

Mitokondrie Aktivitetsbaseret Måling

Denne foranstaltning var baseret på en spaltning af MTT til en blå-farvet produkt (FORMAZAN) af mitokondrie-enzymet succinat dehydrogenase (38, 39, 33); det blev anvendt til at vurdere menneskecelle levedygtighed. Efter celle behandlinger, de supernatanter blev inddrevet for ToxiLight bioassay, og vedhængende celler blev skyllet med serum-free medium og inkuberes med 200 µL MTT pr godt efter hver behandling. De 48 og pladerne blev inkuberet i 3 timer ved 37 ° C og 200 µL af 0,04 N saltsyre indeholder isopropanol løsning blev føjet til hver brønd. Pladerne blev derefter kraftigt rystet til solubilize den blå FORMAZAN krystaller dannes. Lysabsorptionen blev målt ved 570 nm ved hjælp af en luminometer Mithras LB 940 (Berthold, THOIRY, Frankrig).

Cell Membrane Skader Assay

Den bioluminescent ToxiLight bioassay (Lonza) var en ikke-destruktiv celletoksicitet meget

følsomme assay beregnet til måling af toksicitet i pattedyrceller og cellelinjer i kultur. Det kvantitativt målt frigivelse af cytosolic AK fra membraner af beskadigede celler (40, 31). AK er en robust protein til stede i alle eukaryote celler, der er frigivet i dyrkningsmediet når celler dør, beskrives som en vigtig nekrose markør. Enzymet aktivt phosphoryleres ADP, og den deraf følgende ATP blev derefter måles ved hjælp af bioluminescent Firefly luciferase reaktion med ToxiLight reagens. Efter 24 timer i de forskellige behandlinger, 50 µL af celle supernatanter blev deponeret i 96 og sorte plader. Så, 50 µL af AK afsløring reagens (AKDR) blev tilføjet ved godt. Pladerne blev henført under omrystning i 15 min sikkert fra lyset, og derefter, luminescence blev målt ved hjælp af luminometer Mithras LB 940 (Berthold) ved 565 nm. Serum-free medium blev den negative kontrol, og en positiv kontrol blev det aktive reagens AKDR blandet med celler behandlet i serum-free medium til at bestemme basal aktivitet.

Apoptotic Celledød Målinger

Den Caspase-Glo 3 / 7 assay (Promega, Paris, Frankrig) var en luminescent kit designet til automatisk high-throughput screening af caspases aktivitet eller apoptosis. Det kan måle caspase 3 og 7 aktiviteter i rensede enzympræparater eller kulturer af vedhængende eller suspension celler (41, 42, 36). Analysen forudsat en pro-luminescent caspase 3 / 7 substrat, som indeholder de tetrapeptide sekvens DEVD aktive gruppe. Dette substrat blev spaltet til at løslade amino-luciferin, et substrat af luciferase der bruges til fremstilling af lys. Den Caspase-Glo 3 / 7 reagens blev optimeret til caspase aktivitet, luciferase aktivitet og cellelysis. Tilsætning af det indre Caspase-Glo 3 / 7 reagens i et "add-mix-foranstaltning" format, resulterede i cellelysis efterfulgt af caspase spaltning af substratet og generering af en "glød type" luminescent signal. Den Caspase-Glo 3 / 7 bioassay blev gennemført i 96 og hvide plader.

Efter cellekulturer og deres behandlinger med 50 µL af forskellige fortyndinger, et lige saa stort volumen af fædningsreagens blev føjet til hver brønd. Pladerne var så nervøs for 15 min sikker mod lys, til regulering af lys signal før måling luminescence. Også den negative kontrol var serum-free medium, og den positive kontrol var aktive reagens blandes med celler behandlet i serum-free medium til at bestemme basal aktivitet af caspases 3 / 7. Luminescence blev målt ved hjælp af luminometer Mithras LB 940 (Berthold) ved 565 nm.

Celle Mikroskopi 'Råoversættelse'

Ved udgangen af de 24 h celle behandling, serum-free medium blev fjernet, og celler blev fastsat i absolut ethanol-chloroform-eddikesyre (6:3:1, v / v / v) i 1 dag ved -20 ° C. Hver brønd blev vasket med PBS (pH 7,4) og inkuberes med 1 µg / mL DAPI løsning (43). Farvning af DNA med DAPI blev undersøgt med et mikroskop ved hjælp af et fluorescerende mode (model Leica LMD 6000, Rueil Malmaison, Frankrig). Mærket DNA af levedygtige celler blev spredt over hele kernen, og lyse kondensation af chromatin afslørede apoptotic celler (forstørrelse, 400 ×). Ved udgangen af cellen behandling, microphotographs (forstørrelse, 100 ×; blå filter) af celler uden farve blev også indhentet med Leica Microscopy Systems (model Leica DC 100, Tyskland).

Statistisk analyse

Forsøgene blev gentaget mindst tre gange under forskellige uger om tre uafhængige kulturer hver gang. Alle data blev præsenteret som et middel ± standardfejl (SV). Statistiske forskelle blev fastlagt ved en Student's t-test med anvendelse af en høj grad af 0,01 (**).

Resultater (billeder er udeladt) 'Råoversættelse'

Vi har undersøgt for første gang den mekanisme af cellulære indsats af forskellige R om humane celler, fra placenta, embryonale nyre, og neonate. Den første overraskende resultater viser, at de fire R herbicider og G forårsage celleopbyggede død for alle typer af humane celler, med sammenlignelige toksicitet for hver én, men med forskellige koncentrationer. For eksempel, 20 ppm

for R400 ved 24 timer, er det mest giftige, svarer omtrent til 47 μM G (8 ppm) adjuvanter (figur 1). Men 4-10 ppm G alene er nontoxic; sin giftighed begynder omkring 1%. Den mekanisme er konstant for alle R: Der er en frigivelse af AK, vejledende af celle membran skader, og en hæmning af mitokondrie SD (Figur 1). For alle R, membranen skade (AK) er 1,5-2 gange mere følsom end mitokondrie-aktivitet (SD) for 293 og JEG3 eller lige så følsomme for HUVEC. Derimod G inducerer mitokondrie toksicitet uden celle membran skader. Uventet, R400 er mere giftige end en anden formulering indeholdende mere G, såsom R450; sidstnævnte igen er mere skadelige end R360, R7.2, og G i sidste, men alle af dem er til skade nonproportionally til G koncentration, at de indeholder. Dette er illustreret i figur 2.

De mitokondrie SD hæmning foranstaltninger celle kvælning. Det fremgår klart af figur 2, at 7,2 eller 360 g / LG adjuvanter i R formuleringer har tæt sammenlignelige aktioner for celledød, mens 400 eller 450 g / L giver omvendt proportional virkning i et andet interval. Dette er ikke en Artifact siden embryonale og placenta cellelinjer opfører bemærkelsesværdigt ligeledes i denne forbindelse, og det primære navlestrengen celler har følsomhed for alle R og G blot svarer til disse cellelinjer (figur 2). Dødeligheden i alle tilfælde er ikke lineært knyttet til G. den hypotese, at andre stoffer er impliceret det skal derfor undersøges i formuleringen af produktet.

Derfor er de store G metabolit AMPA, og det overfladeaktive stof POEA de vigtigste hævdede adjuvanter af fabrikanten (den nøjagtige sammensætning er en hemmelighed af formulering), er blevet testet separat i en første tilgang, i forhold til G og R360 som kontrol, og under lignende betingelser som i figur 1, fra et meget lavt subagricultural fortyndinger (10-6, hvis de anvendes rent som hævdet af nogle landmænd og 10-4 hvis fortyndet som anbefalet på 1%).

G er anført af fabrikanten er beregnet til den aktive ingrediens, og det hævdes at være ikke giftige for humane celler, men giftige for vegetabiliske, når de blandes med inerte komponenter. Vores undersøgelse viser for første gang, at alle produkter, herunder AMPA og POEA provokere SD og AK effekter i humane celler, og dermed dødeligheden (figur 3), men med forskellige koncentrationer. Forbavsende, den formodede inerte produkt POEA er den mest potente en. Fra 1 ppm, det begynder at ændre SD i HUVEC og AK i 293 og JEG3. Blandingen R er derefter mere giftige end G eller AMPA. Metabolitten AMPA selv ødelægger cellens membran (AK release), uanset celletype. Dette er ikke observeret med G, som imidlertid er 3-8 gange mere hæmmende på SD end AMPA med visse forskelle mellem celler. Men fordi cellens membran skader generelt er mere følsomme, metabolitten AMPA er endeligt mere giftige end G på menneskelige celler. POEA er det mest giftige; hvis det var det eneste adjuvant af R360, dens maksimale koncentration ville være omkring 1-24 % ifølge celler. Således POEA kunne anses for det aktive stof på menneskers celledød og mere ødelæggende end G. Som R er mere tyktflydende end 1 % POEA plus G er det indlysende, at andre forbindelser er i blandingen.

Således var det nødvendigt at undersøge de samlede virkninger på celle membran integritet (af AK release). Vi har testet de forbindelser ved parvis på maksimalt niveau, hvor alene de ikke indflydelse SD (Figur 4). Dette var at vurdere de respektive rolle hver en, vel vidende, at R indeholder alle testede forbindelser, når metaboliseres. I modsætning til tidligere resultater, celler reagerer anderledes. Blandingerne var mere forstyrrende på embryonale og tæt celler, mens placentamembranen carcinoma celler syntes at være mere membran-resistente, men at blandinger kun. Det er meget klart, at hvis G, POEA eller AMPA er et lille giftig virkning på embryonale celler alene på et lavt niveau, at kombinationen af to af dem på samme slutkoncentration er betydeligt skadelige (figur 4).

Vi har således belyst, at R-og G-induceret celledød kan skyldes, i det mindste delvis, at apoptosis

via caspases 3 / 7 induktion (fig. 5). Den caspases er aktiveret fra 6 timer med et maksimum på 12 timer i alle tilfælde, men tæt primærelementer er 60-160 gange mere følsom end linjer (293 og JEG3, respectively) på dette niveau. Desuden G og R360 øge nøjagtigt på samme koncentration caspases fra 50 ppm (HUVEC). Adjuvans synes ikke at være nødvendigt at gøre G som en død inducer på dette niveau. Selv G alene er 30% mere potent på denne udskillelsesvej end R. Overraskende, G handlet meget hurtigt ved koncentrationer 500-1000 gange lavere end landbrugs brug på menneskecelle apoptosis. Denne apoptotic pathway også var aktiveret på niveauer 200 gange lavere for G på caspases end sin indsats på SD for tæt celler, og for F på et niveau 60 gange lavere, i en fire gange kortere periode (6-24 h). Efter 24 timer af behandlingen, de caspases returneres til basal plan, når SD og AK reagere kraftigt. Disse data er i overensstemmelse med en gradvis tab af caspases 3 / 7 aktivitet i apoptotic celler, der undergår sekundære nekrose in vitro (44).

Vores resultater er bekræftet af morfologi af celler efter behandling med R (f.eks R400, figur 6B, D, E) i forhold til den normale celletyper (A, C, F). Faktisk er de meget svage F koncentration på 0,005% forårsager en meget vigtig celledød, manglende friktion, svindende, og fragmentering i apoptotic organer. Dette bekræftes i figur 7 med DNA fluorescerende mærkning med DAPI med f.eks R360 på 0,5% over 24 h. Den karakteristiske fluorescens af apoptotic celler manifesterer DNA kondensation er mere synlige med herbicidet end i kontrol (A, D, G) og mere efter R behandling (C, F, I) end med G alene (B, E, H), for cellelinjer. Det primære celler er ligeså følsomme til G end til F, som for caspases aktivering i figur 5.

Diskussion

Vi har tidligere påvist (14), at G-baserede formuleringer var i stand til at påvirke menneskers placentamembrane cellers levedygtighed på subagricultural doser (0,1% i 18 timer) og seksuel steroid biosyntesen ved lavere nontoxic doser (0,01%) og at dette skyldtes i hvert fald i delvist G, men dens effekt blev stærkt forstærket af adjuvanser, de såkaldte inerte indholdsstoffer i R formuleringer, holdes fortrolige af selskaber (9). Men spørgsmål om en bestemt cellelinjes følsomhed eller et tidsafhængighed af påvirkningen, eller om effekten var reversibel forblev åbne. Benachour et al. (15) viste, at i embryonale celler såvel som i normal human placenta og equin testis, var der en lignende G-afhængige hormonsystemforstyrrelse gennem aromatasehæmmende virkning på nontoxic niveauer. De embryonale celler var endda endnu mere følsomme: Det blev opdaget, at cellens mitokondrie-aktivitet blev påvirket på tids-og dosisafhængig måde af G formulering R360. Denne celletoksicitet blev forstærket omkring 14 gange ved påvirkning mellem 24 og 72 timer (15), hvilket tyder på enten en bioakkumulering eller en tid-akkumulerende eller forsinkende virkning og tyder på en kumulativ virkning, af hormonforstyrrende stoffer i meget lave doser omkring G acceptable daglige indtagelse (ADI: 0,3 mg / kg / j), afhængigt af arten af adjuvans.

For at forstå in vivo effekter gennem fortolkningen af celle konsekvenserne beskrevet ovenfor, er det nødvendigt at have viden om fortyndingsluften og af de processer, der fører til en fjernelse af produktet i kroppen. Dette skal tages i betragtning med hensyn til det bioaccumulative potentiale og tidsmæssigt forsinkede virkninger. Derfor har vi målt den caspases⁸ aktiviteter på forskellige tidspunkter og G eller R-koncentrationer, når det tidligere er vist at deres virkninger forstærkes med tiden inden for 3 dage, på SD i embryonale og placenta celler (15). Desuden skal metabolismen af et herbicid overvejes, og testene i denne undersøgelse af de ovennævnte produkter repræsenterertilgang dette spørgsmål.

8 Caspases eller cystein-aspartsyre proteaser, er en familie af cystein proteaser, som spiller afgørende roller i apoptosis (programmeret celledød), nekrose og inflammation ..

Alle celletyper, herunder primære kulturer, reagerer på samme måde på membranen og mitokondrie-plan, hvilket begrundes den hypotese, at disse cellelinjer leverer fremragende modeller til at studere menneskecelle toksicitet, for eksempel i placenta celler (18). Vi viser for første gang, at embryonale og 'venetætheds' celler også har sammenlignelig følsomhed. De mest reaktive niveau synes at være på celle membrans niveau for de forskellige formuleringer, men ikke for G. De formodede "inert ingredienser" spiller naturligvis en anderledes rolle, som celle membran disruptorer, uafhængigt til G, som vi tidligere har foreslået (14), og det blev foreslået at de havde virkning i fisk, padder, og mikroorganismer (27, 45) samt i planter (46). Vi har nu vist at dette også gælder i humane celler.

Det andet niveau er mitokondrie membranen og enzymatisk påvirkning af denne, SD, lokaliseret i det indre membran i kompleks II i den respiratoriske kæde (47). Den er påvirket på en sammenlignelig måde, ikke i forhold til G, men i forhold til arten og mængden af adjuvans, som vi tidligere har nævnt (15). Det betyder, at toksiciteten af G klart varierer med formuleringerne, det er derfor nu imperativt at disse skal bruges i in vivo-test for at undersøge toksicitet (45); det betyder også, at ADI⁹-værdien af G skal tage hensyn til dens formulering, da 7.2 eller 360 g / L for G kan have tilsvarende virkninger, hvilket er betydeligt anderledes end 400 g / L. Det ville endda være mere korrekt at bruge netop en ADI for F i stedet for G. Dette er også afhængigt af påvirkningens varighed. Disse forhold er der ikke taget højde for endnu for regulerende lovgivning.

Nødvendigheden af at studere kombinerede virkninger fremgår også af vores resultater. Faktisk er kroppen altid udsat for blandinger og ikke for enkelte forbindelser. Vi har tidligere vist, at blandinger kan forstærke toksiciteten af andre miljøgifte (2). For embryonale eller neonatal celler, har POEA, den meget anvendte adjuvans, den højeste toksicitet, enten pga. dens egen virkning eller forstærket 2-5 gange i kombination med G eller AMPA. Det er allerede blevet vist, at POEA er stærkt giftig for havlevende dyr, idet det påvirker RNA syntesen. (28). Det er også kendt, at i vandmiljøet har POEA har effekt end F og G på bakterier, mikroalger, protozoer, og krebsdyr (12). Hertil kommer, at de kendte metabolismer af G i jord eller planter, formodes at afgifte AMPA (11), men her, kan vi påvise, at AMPA er mere giftige end G i humane celler, især på celle membran. AMPA er også mere stabil i jord (48), i planter, og i fødevarer eller foder rester (49), og mere til stede i spildevand (2-35 ppm) end G [0.1-3 ppm (50)]. Det er ikke giftigt alene ved disse koncentrationer i vores eksperimenter, men det forstærker G eller POEA toksicitet i kombination. Den synergetiske toksicitet af alle disse forbindelser er nu mere indlysende.

Den inducerede modstandsdygtighed af placenta kræftceller (51) kan forklare en konkret forskel for JEG3 celler på disse niveauer. Placentamembrans celler kan danne en effektiv barriere for disse blandinger før deres død, fordi deres membraner er mere modstandsdygtige, og dette kunne skyldes, at der er karcinomer afledt af celler, der har erhvervet en evne til at udskille xenobiotiske. Stoffer

Den caspases 3 / 7 styrede apoptosis blev i virkeligheden først aktiveret indenfor 6 timer, og derefter faldt de med celle dødeligheden. Dette bekræfter den timing der er observeret for andre sammensatte forbindelser (36). Initieringen af Caspase for G alene er observeret ved doser, der ikke provokerer celle eller mitokondrie membran skadeg, hvilket indikerer en klar G-apoptotic virkning og altid på subagricultural doser. Blandes med adjuvanser, f.eks. G i F formuleringer nåede den anden ende punkter. Dette tyder på, at adjuvanser også kunne spille en rolle i den samlede celledød via nekrose karakteriseret ved organelle ændringer med mitokondrie og cellemembraner hævelse og membranbrud (52). De mest følsomme er tæt HUVEC celler, for hvilke apoptosis er blevet beskrevet (53-55), men meget sjældent fremkaldt af et pesticid, men for eksempel ved påvirkning af

⁹ Acceptabel daglig indtagelse

diallyl trisulfide (56). Overraskende nok er dette fænomen blev observeret for G og R på lignende og lave koncentrationer, som hvis en celle membrans død receptor var blevet aktiveret (57, 32), uden G nødvendigvis var trængt ind. Ændringen af en afhængigheds receptor er en anden G påvirkningsvej, som kunne blive undersøgt (58). Den apoptotic celles udseende var mikroskopisk bekræftet. Så vores næste skridt kunne være at undersøge necrotic / apoptotic forholdet inden for et kortere tidsinterval

Konklusion

Konklusionen er, at blandinger kaldet "formuleringer" kan ændre cellernes permeabilitet, toksicitet og virke xenobiotiske: I alle tilfælde, celledød provokeres i højere grad med R end med AMPA eller G. Sidstnævnte provokerer apoptosis (fra 50 ppm i HUVEC celler) uden membran skader. Er G derinod blandet med adjuvaner i R formuleringer forstyrres celle og mitokondrie-membraner og fremmer nekrose af cellen. Det er også klart, at de "tærskel" niveauer der fastlægges for brug af herbicider bør tage hensyn til varigheden af eksponeringen, samt tilstedeværelsen af adjuvaner, især POEA, samt metabolisme, bioakkumulering og udstrækningen af forsinkede virkninger. Alle ovennævnte effekter er påvist at indtræffe under det anbefalede herbicid landbrugs fortyndinger (fra 104 ppm). Studiet er en klar bekræftelse af at adjuvaner i Roundup formuleringer ikke er inerte. Desuden at blandinger tilgængelige på markedet kan medføre celle skader og endda døden ved de rest niveauer, som kan forventes, især i fødevarer og foder fremstillet af afgrøder behandlede med R formuleringer.