

Mgr Krzysztof Kaszkowiak

Ocena zagrożeń zdrowotnych związanych z glifosatem
na podstawie jego zawartości
w wodzie pitnej i w modelu eksperymentalnym *in vitro*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki o zdrowiu

Promotor: dr hab. Jakub Żurawski



Kolegium Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Promotorowi

Panu dr hab. Jakubowi Żurawskiemu

bardzo dziękuję za życzliwość i opiekę naukową w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Całemu zespołowi Zakładu Immunobiologii dziękuję za okazaną pomoc i wsparcie.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	5
1. Wstęp	8
1.1. Zastosowania glifosatu jako herbicydu	8
1.2. Glifosat i preparaty handlowe na jego bazie	9
1.3. Potencjalne drogi ekspozycji ludzi na glifosat	11
1.4. Narażenie związane z żywnością	12
1.5. Wpływ glifosatu na organizm człowieka	14
1.6. Kontrowersje dotyczące wpływu ekspozycji ludzi na glifosat	15
2. Cel pracy	17
3. Materiał i metody	18
3.1. Materiały	18
3.2. Metody	19
3.2.1. Oznaczanie stężenia glifosatu w roztworach wodnych	19
3.2.1.1. Oznaczanie stężenia glifosatu w wodzie metodą ELISA	19
3.2.1.2. Oznaczanie stężenia glifosatu w roztworach wodnych techniką HPLC	20
3.2.2. Ocena żywotności leukocytów krwi obwodowej	22
3.2.3. Badanie „wybuchu oddechowego” neutrofilów	23
3.2.4. Ocena zdolności neutrofilów do fagocytozy	25
3.2.5. Oznaczanie stężenia glutationu w lizatach komórkowych	26
3.2.6. Statystyczne opracowanie danych	28
3.2.6.1. Analiza statystyczna wyników oznaczania stężenia glifosatu w wodzie	28
3.2.6.2. Analiza statystyczna wpływu glifosatu na komórki <i>in vitro</i>	28
4. Wyniki	29
4.1. Stężenia glifosatu w wodzie wodociągowej	29
4.2. Ocena potencjalnie toksycznego działania glifosatu na leukocyty krwi obwodowej	29
4.3. Badanie wybuchu oddechowego w granulocytach	32
4.3.1. Wpływ glifosatu na wybuch oddechowy w komórkach stymulowanych PMA	33

4.3.2. Wpływ glifosatu na wybuch oddechowy komórek stymulowanych fMLP i E.coli	35
4.4. Wpływ glifosatu na aktywność fagocytarną granulocytów	37
4.5. Wpływ inkubacji krwi obwodowej z glifosatem na wewnątrzkomórkowe stężenia glutationu	39
4.5.1. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia glutationu zredukowanego (GSH)	39
4.5.2. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej stymulowanych PMA z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia GSH	40
4.5.3. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia glutationu utlenionego (GSSG)	41
4.5.4. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej stymulowanych PMA z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia GSSG	42
5. Dyskusja	43
5.1. Stężenia glifosatu w próbkach wody wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski	43
5.2. Wybór układu doświadczalnego	44
5.3. Toksyczność glifosatu dla komórek ludzkich	45
5.4. Produkcja wolnych rodników przez spoczynkowe neutrofile krwi obwodowej inkubowane z glifosatem	47
5.5. Wpływ glifosatu na wytwarzanie wolnych rodników przez neutrofile stymulowane PMA bądź fMLP i E. coli	49
5.6. Wpływ glifosatu na aktywność fagocytarną neutrofilów	54
5.7. Wpływ glifosatu na wewnątrzkomórkowe stężenia glutationu	54
5.8. Potencjalne drogi działania glifosatu na komórki ludzkie	57
6. Wnioski	61
7. Streszczenie	62
8. Abstract	64
9. Piśmiennictwo	66
10. Aktywność naukowa autora	84

Wykaz stosowanych skrótów

ADI - dopuszczalne dzienne spożycie, dopuszczalne dzienne pobranie, dopuszczalna dzienna dawka (ang. acceptable daily intake)

AKT - kinaza białkowa serynowo-treoninowa, kinaza białkowa B (ang. serine/threonine-specific protein kinase akt, protein kinase B)

CI - przedział ufności (ang. confidence interval)

DG - diacyloglicerol (ang. diacylglycerol)

DHR123 – dihydrorodamina 123 (ang. Dihydrorhodamine 123)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

ECHA - Europejska Agencja Chemikaliów (ang. The European Chemicals Agency)

EFSA - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. The European Food Safety Authority)

E. coli - komórki bakterii Escherichia coli

ELISA - test immunoenzymatyczny, test immunoenzymosorpcyjny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

ERK - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal-regulated kinase)

FAM - karboksyfluoresceina (ang. carboxyfluorescein)

FITC - izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)

Fl - fluorescencja

FLICA - znakowane fluorescencyjnie inhibitory kaspaz (ang. Fluorochrome Inhibitor of Caspases)

fMLP - N-formylometionino-leucylo-fenylalanina (ang. N-formyl-met-leu-phe)

FMK - fluorometyloketon (ang. fluoro-methylketone)

FMOC-Cl - chloromrówczan 9-fluorenylometylu (ang. 9-Fluorenylmethyl chloroformate)

FSC - w cytometrii rozproszenie światła „w przód” pod kątem 0° do 10° (ang. Forward Scatter)

GDP - difosforan guanozyny (ang. guanosine diphosphate)

GMO - organizm modyfikowany genetycznie (ang. genetically modified organism)

GSH - zredukowany glutation (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicyna)

GSSG - disulfid glutationu (glutation utleniony)

GTP - trifosforan guanozyny (ang. guanosine triphosphate)

HPLC - wysokociśnieniowa (wysokosprawna) chromatografia cieczowa – (ang. high pressure (performance) liquid chromatography)

IARC - Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer)

IP₃ - trifosforan inozytolu (ang. inositol trisphosphate)

LPS - lipopolisacharyd bakteryjny (ang. lipopolysaccharide)

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinase)

MEK - kinaza aktywowana mitogenem regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase)

MEKK - kinaza kinazy aktywanej mitogenem (ang. MEK mitogen-activated protein kinase kinase)

MPO - mieloperoksydaza (ang. myeloperoxidase)

MTT - test oceniający żywotność komórek na podstawie redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyлотetrazoliowy MTT) do nierozpuszczalnego formazanu

NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma zredukowana (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)

p38 MAPK - kinaza białkowa p38 aktywowana mitogenem (ang. mitogen-activated p38 protein kinase)

PBMC - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. periperal blood mononuclear cells)

PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. phosphate buffered saline)

PI - jodek propidionowy (ang. propidium iodide)

PI3K - kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)

PIP₂ - 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)

PKA - kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)

PKC - kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)

PLA₂ - fosfolipaza A2 (ang. phospholipase A2)

PLC - fosfolipaza C (ang. phospholipase C)

PLD - fosfolipaza D (ang. phospholipase D)

PM_{2,5} - pył zawieszony o średnicy nie większej niż 2,5µm (ang. atmospheric particulate matter with a diameter of 2.5µm or less)

PMA - 12-mirystylo-13-octan forbolu (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate)

PTK - białkowa kinaza tyrozynowa (ang. protein tyrosine kinase)

Raf - białko RAF, kinaza serynowo-treoninowa (ang. RAF protein, serine-threonine specific kinase)

Ras - białko RAS

RFT - reaktywne formy tlenu

SD - odchylenie standardowe (ang. standard deviation)

SSC - w cytometrii rozproszenie światła “w bok” pod kątem 90° (ang. side scatter)

UE - Unia Europejska

UK-FSA - Brytyjska Agencja Standardów Żywności (ang. United Kingdom Food Standards Agency)

W analizowanych w niniejszej pracy publikacjach stężenia glifosatu wyrażane były w różnych jednostkach, co zachowano w przypadku cytowania. W przypadku glifosatu:

$$1\text{ppb} = 1\mu\text{g/L} = 5,9\text{nM}$$

1. Wstęp

1.1. Zastosowania glifosatu jako herbicydu

Glifosat, zmieszany z tzw. „składnikami obojętnymi” stanowi podstawę popularnych środków chwastobójczych takich jak „Roundup®” i „RangerPro®”. Są one stosowane do nieselektywnego zwalczania chwastów liściastych i traw w rolnictwie, ogrodnictwie, sadownictwie, leśnictwie czy uprawach winorośli. Znajdują również zastosowanie w uprawach nierolniczych, w tym do zwalczania chwastów w siedliskach wodnych oraz na terenach nieuprawnych (Perez-Jones i Mallory-Smith, 2010; Antier i wsp., 2020; Rolando i wsp., 2017). Herbicydy zawierające glifosat należą do najczęściej używanych na świecie, co w dużej mierze jest związane ze wzrostem w ostatnich latach areału upraw roślin genetycznie modyfikowanych (GMO), odpornych na toksyczne działanie tego związku (Duke, 2018; Benbrook, 2016; Richmond, 2018). W 2014 roku w USA zużyto około 1,0 kg glifosatu na hektar upraw (Benbrook, 2016).

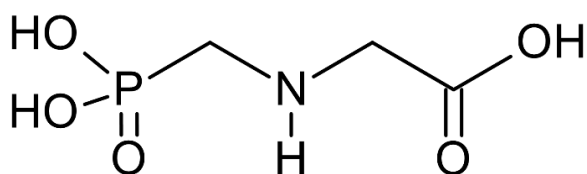
W Polsce, podobnie jak w innych częściach świata, zużycie glifosatu wzrasta, co można ocenić na podstawie wypowiedzi dyrektora departamentu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na posiedzeniu Komisji Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa w dn. 11 kwietnia 2018 r. Zgodnie z szacunkami sprzedaż glifosatu wzrosła z 4,4 milionów kg w 2015 r. do 5,4 milionów kg w 2016 roku (KANCELARIA SEJMU, 2018). Całkowita ilość sprzedanego glifosatu w 2017 r. w UE wyniosła ok. 50 tysięcy ton, z czego najwyższa była we Francji (19% całkowitej ilościowej sprzedaży), Polsce (13%), Niemczech (9%), Włoszech (7%) oraz Hiszpanii (7%) (Antier, 2020). Z 31 herbicydów zarejestrowanych w latach 1999-2019 do użytku w leśnictwie w Polsce, 18 preparatów opartych było na glifosacie (Karmiłowicz, 2019).

Trwałość glifosatu w glebie jest bardzo różna, a okres półtrwania waha się od 1 do 200 dni, w zależności m.in. od temperatury, wilgotności i rodzaju gleby, składu mikrobiologicznego i pH środowiska, zawartości fosforanów, tlenków/wodorotlenków glinu i żelaza w glebie (Bento i wsp., 2016; Borggaard i wsp., 2008). Związek ten może być roznoszony z pyłem na duże odległości, zwłaszcza z cząsteczkami o średnicy nie większej niż 10 μm (Bento i wsp., 2016). Może być wypłukiwany do wód powierzchniowych, lecz prawdopodobnie jest sorbowany i degradowany w głębszych warstwach gleby przed dotarciem do wód gruntowych (Borggaard i wsp., 2008). Chociaż transport glifosatu ze środowiska lądowego do wodnego wydaje się bardzo ograniczony,

dane dotyczące tego zjawiska są rozbieżne. Wyniki z ponad 2000 próbek pobranych z miejsc rozmieszczonych na terenie całych Stanów Zjednoczonych wskazują, że glifosat jest bardziej mobilny i występuje w środowisku w szerszym zakresie niż wcześniej sądzono. Glifosat (w stężeniach pomiędzy 0,1 a 0,02 mikrograma na litr) był wykrywany w próbkach wody deszczowej (86%), także w próbkach pobranych z rowów melioracyjnych i kanalizacji (71%) oraz gleby (63%); rzadziej zaś z wód gruntowych (3%) i dużych rzek (18%) (Battaglin i wsp., 2014). Herbicyd ten znajdowano w próbkach wody z różnych środowisk na całym świecie (Masiol i wsp., 2018; Annett, 2014). Jego występowanie związane jest przede wszystkim z dużymi obszarami upraw rolnych (Van Stempvoort i wsp., 2016; Montiel-León i wsp., 2019; Lupi i wsp., 2019), niemniej zastosowania pozarolnicze mogą w znacznym stopniu przyczyniać się do ogólnego skażenia wód powierzchniowych (Poiger i wsp., 2017; Ramwell i wsp., 2014; Kolpin i wsp., 2006).

1.2. Glifosat i preparaty handlowe na jego bazie

Glifosat zaliczany jest do herbicydów fosfonianowych, a pod względem chemicznym jest N-fosfonometyloglicyną. Jest to pochodna kwasu fosfonowego, w której jeden z atomów wodoru grupy metylowej bezpośrednio połączonej z fosforem został zastąpiony przez glicynę (Różański i wsp., 1998).



Ryc. 1. Wzór strukturalny glifosatu (N-fosfonometyloglicyna)

Glifosat (m.cz. 169.073g/mol) jest rozpuszczalny w wodzie (12g/L w 25°C i 60g/L w 100°C) (Modesto i Martinez, 2009). Jest praktycznie nierozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych z wyjątkiem kwasu trifluorooctowego. Dlatego też wnioskuje się, że nie rozpuszcza się w tłuszczach, wobec czego nie powinien ulegać bioakumulacji w tkankach zwierzęcych (Pieniążek i wsp., 2003). Komercyjne preparaty glifosatu zawierają zwykle ten związek w postaci soli, co zapewnia wyższą rozpuszczalność, przy jednoczesnym zachowaniu właściwości chwastobójczych związku

macierzystego (Pérez i wsp., 2011). Często stosowana sól izopropyloamoniowa glifosatu jest dobrze rozpuszczalna w wodzie i jest najczęściej stosowana w komercyjnych produktach użytkowych (np. Roundup®) (Pérez i wsp., 2011). Formy glifosatu w postaci soli obejmują także sól monoamonową, sól diamoniową, sól potasową, sól sodową i sól trimetylosulfoniową (trimesium). Spośród nich formy soli izopropyloaminy i soli monoamonowej są powszechnie stosowane w preparatach herbicydowych (Miller i wsp., 2012). Stężenie glifosatu jest zwykle wyrażane w mg substancji czynnej na litr lub mg równoważnika kwasu na litr (Pérez i wsp., 2011). Ekwiwalent kwasowy to teoretyczna procentowa wydajność kwasu macierzystego ze składnika aktywnego pestycydu, który został sformułowany jako pochodna (zwykle estry, sole lub aminy) (Nordby i Hager, 2011). Glifosat (N-fosfonometyloglicyna) i herbicydy na bazie tego związku są najszerszej stosowanymi na świecie organofosfonianowymi, powschodowymi, układowymi, nieselektywnymi herbicydami o szerokim spektrum zwalczania chwastów jednorocznych i wieloletnich (Pérez i wsp., 2011; Mink i wsp., 2012). Najpopularniejszym herbicydem na bazie glifosatu jest Roundup®. Inne nazwy handlowe herbicydów na bazie glifosatu i ich producentów przedstawia poniższa tabela. (Tu i wsp., 2001; Zhou i wsp., 2004).

Tab. 1. Preparaty na bazie glifosatu dostępne na rynku herbicydów

Producent	Nazwa handlowa
Monsanto	Roundup Ultra®, Roundup Pro®, Accord®, Honcho®, Pondmaster®, Protocol®, Rascal®, Expedite®, Ranger®, Bronco®, Campain®, Landmaster®, Fallow Master®, Aquamaster®
Dow Agrosiences	Glyphomax®, Glypro® i Rodeo®
Du Pont	Herbicyd glifosatowy
Cenex / Land O'Lakes	Silhouette®
Nufarm Ltd.	Rattler®
Platte	MirageR®
Riverside / Terra	JuryR®
Zeneca	Touchdown®

1.3. Potencjalne drogi ekspozycji ludzi na glifosat

Narażenie ludzi na kontakt z glifosatem można podzielić na zawodowe, które dotyczy przede wszystkim pracowników stosujących ten herbicyd do ochrony upraw na dużych obszarach (Pierce i wsp., 2020) i środowiskowe, zwłaszcza związane ze skażeniami wody i żywności (Faniband i wsp., 2021).

Wiarygodnym biomarkerem ekspozycji ludzi na glifosat jest jego występowanie w moczu. Biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji oceniany jest na 3 do 10 godzin (Faniband i wsp., 2021; Connolly i wsp., 2019; Zoller i wsp., 2020), co może wynikać z osobniczych różnic w metabolizmie. Taki stosunkowo krótki czas eliminacji jest przydatny zarówno do monitorowania skutków ostrych zatruc tym preparatem (Roberts i wsp., 2010; Zoller i wsp., 2020), jak i oceny wielkości skażenia zarówno w środowisku pracy jak i zamieszkania. W przeprowadzonych badaniach stężenia glifosatu w moczu rolników i ogrodników wahały się w dość niewielkich granicach od 1,35 µg/L do 3,2 µg/L, a wartości maksymalne wahały się od około 10 µg/L do 233 µg/L (Connolly i wsp., 2020). U osób mających zawodowo kontakt z tym herbicydem stężenie glifosatu w moczu korelowało z ekspozycją na ten preparat (Zhang i wsp., 2020a; Pierce i wsp., 2020).

Problemem bardzo istotnym jest to, na ile użycie środków ochrony roślin stanowi zagrożenie dla ludzi nie mających kontaktu zawodowego z takimi preparatami. W ostatniej dekadzie ukazało się wiele prac, dotyczących tego zagadnienia. W badaniach przeprowadzonych w czerwcu 2017 roku w Irlandii oceniano stężenia glifosatu w próbkach moczu od 50 dorosłych. Z badania wykluczono osoby z określonymi nawykami żywieniowymi (wegetarianie/weganie) oraz osoby, których zawód wiązał się z używaniem pestycydów. Spośród analizowanych próbek 20% zawierało wykrywalne poziomy glifosatu (0,80-1,35 µg/L) (Connolly i wsp., 2017). W szwedzkiej populacji młodych dorosłych, mediana i maksymalne stężenie glifosatu w moczu wynosiły odpowiednio 0,03 i 3,39 µg/L (Faniband i wsp., 2021). Mediana stężenia glifosatu w moczu Portugalczyków wynosiła 0,13 µg/L (Nova i wsp., 2020). Źródła skażenia populacji ludzkich nie można określić jednoznacznie. Na niektórych obszarach Meksyku zaobserwowano zbieżność pomiędzy stężeniami glifosatu w wodzie gruntowej (co może odzwierciedlać jego stosowanie w ochronie upraw), a stężeniami tego związku w moczu rolników produkujących żywność na własne potrzeby (Rendon-von Osten i wsp., 2017). W badaniach moczu osób w wieku 20 do 29 lat mieszkających w północno-wschodnich Niemczech odsetek próbek zawierających glifosat na granicy oznaczalności (0,1 µg/L) lub powyżej tego progu zmieniał się, osiągając blisko 60% w latach 2012-2013 i zmniejszając

się do 40% w roku 2015, co mogło mieć związek ze zmianami w wielkości zużycia tego preparatu w rolnictwie (Conrad i wsp., 2017). Próba oszacowania narażenia dzieci i młodzieży na obszarach wiejskich w północno-wschodniej Słowenii nie wykazała istotnego wpływu sezonowego stosowania glifosatu. Część uzyskanych wyników można tłumaczyć bardziej intensywnym stosowaniem herbicydów wiosną, ale nie pozwalało to na rozróżnienie pomiędzy narażeniem wynikającym z diety lub stosowania preparatów w środowisku zamieszkania (Stajanko i wsp., 2020). Badania przeprowadzone w Danii wykazały podobne stężenia glifosatu w moczu osób żyjących na terenach rolniczych i zamieszkujących poza nimi (Knudsen i wsp., 2017). Co ciekawe, w badaniach przeprowadzonych wiosną i latem 2001 r. w Iowa (USA) zaobserwowano, że członkowie rodzin rolniczych mieli ogólnie wyższy poziom pestycydów w moczu niż członkowie rodzin „nierolniczych”, ale poziom glifosatu nie różnił się statystycznie (Curwin i wsp., 2007). Glifosat został wykryty w 95% próbek moczu dzieci portugalskich ($1,77 \pm 0,86 \mu\text{g/L}$, maksymalnie $4,35 \mu\text{g/L}$), przy czym stężenia były wyższe u dzieci w wieku 7-9 lat, mieszkających w pobliżu terenów rolniczych ($<1 \text{ km}$) i spożywających przetwory domowe w gospodarstwach, gdzie stosowano herbicydy (Ferreira i wsp., 2021).

1.4. Narażenie związane z żywnością

Glifosat jest szybko eliminowany z organizmu, a więc jego stężenie w moczu pozwala na ocenę rzeczywistej długotrwałej ekspozycji w środowisku życia osób, które nie są narażone na kontakt z tym herbicydem z przyczyn zawodowych. Określenie źródeł skażenia glifosatem w gospodarstwach domowych może być trudne, lecz najważniejszymi wydają się być woda pitna i sposób odżywiania.

Publikacje dotyczące zawartości glifosatu w wodzie pitnej są nieliczne, większość prac dotyczy wód gruntowych i powierzchniowych. W wodzie wodociągowej w Wielkopolsce stężenie tego herbicydu nie przekraczało $0,33 \mu\text{g/L}$ (Kaszkowiak i wsp., 2020), przy dopuszczalnej wartości obowiązującej w UE $0,1 \text{ mg/L}$ (Li i Jennings, 2017). Woda nie jest więc prawdopodobnie nośnikiem glifosatu zawartego w normalnej diecie.

Większe ilości glifosatu zawiera żywność pochodzenia roślinnego. W badaniach europejskich stwierdzono następujące stężenia tego związku (średnio w mg/kg): mandarynki $0,022$; jabłka $0,023$; winogrona deserowe $0,021$; kalafiory $0,054$; fasola szparagowa $0,013$; nasiona soczewicy $0,267$; ziarna zbóż: owies $0,382$; ryż $0,050$; żyto $0,195$; pszenica $0,081$ (Stephenson i Harris, 2016). Obecność glifosatu, chociaż na

stosunkowo niskim poziomie wykryto w badaniach produktów spożywczych dostępnych na rynku szwajcarskim. Dotyczyło to przede wszystkim zbóż i nasion roślin strączkowych oraz uzyskiwanych z nich makaronów (Zoller i wsp., 2018). Pozostałości glifosatu wykryto w 42% próbek świeżych owoców i warzyw, produktów zbożowych mielonych, produktów strączkowych oraz gotowych produktów spożywczych zebranych od kwietnia 2015 r. do marca 2017 r. na kanadyjskim rynku detalicznym (Kolakowski i wsp., 2020). W 2016 r. UK-FSA (UK Food Standards Agency - Brytyjska Agencja Standardów Żywności) przebadła próbki pieczywa i przetworów zbożowych. Ponad 30% z nich zawierało glifosat, przy czym zanieczyszczenie to występowało we wszystkich płatkach śniadaniowych wyprodukowanych z owsa (Benbrook i Davis, 2020). Pośród produktów spożywczych z kukurydzy lub soi z lokalnych supermarketów Afryki Południowej 66,7% zawierało glifosat, jednak na poziomie poniżej najwyższego dopuszczalnego poziomu pozostałości ksenobiotyku (Viljoen i wsp., 2021).

Herbicyd ten był także wykrywany w winogronach przeznaczonych do produkcji wina (Stephenson i Harris, 2016) oraz w winach, sokach owocowych (Kolakowski i wsp., 2020) i miodzie (Kolakowski i wsp., 2020; Berg i wsp., 2018; John i Liu, 2018), próbkach herbaty czy kawy (John i Liu, 2018). W produktach pochodzenia zwierzęcego zawartość glifosatu jest niska. Badania wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania glifosatu u szczurów wykazały, że około jedna trzecia z podanej dawki jest wchłaniana i metabolizowana, podczas gdy reszta jest wydalana z kałem głównie w postaci niezmienionej. Większość wchłoniętej dawki zostaje wydalona z moczem, a mniej niż 1% jest zatrzymywany w organizmie (Brewster i wsp., 1991). W badaniach organów krów poddanych ubojowi stwierdzono podobne stężenia glifosatu (ok. 20ng/g) w jelitach, wątrobie, mięśniach, śledzionie i nerkach. (Krüger i wsp., 2014)

Można więc przyjąć, że produkty pochodzenia roślinnego stanowią ten składnik diety, który jest najbardziej podatny na zanieczyszczenia glifosatem. Badania przeprowadzone w Słowenii wykazały większe narażenie na ten herbicyd osób z większym spożyciem orzechów i ryżu pełnoziarnistego (Stajnko i wsp., 2020). W badaniach niemieckich zaobserwowano istotną korelację pomiędzy spożyciem nasion roślin strączkowych, a wydalaniem glifosatu z moczem (Soukup i wsp., 2020). Stosowana dieta może być głównym źródłem narażenia na skażenie glifosatem, gdyż przejście ze standardowej diety na „ekologiczną” (z ograniczonym i kontrolowanym użyciem środków ochrony roślin) powodowało szybką redukcję poziomu tego pestycydu w moczu badanych osób (Fagan i wsp., 2020).

1.5. Wpływ glifosatu na organizm człowieka

Potencjalne szkodliwe działania powszechnie stosowanych środków ochrony roślin w uprawach rolniczych i związana z tym możliwość dostawania się ich do organizmów zwierzęcych, spowodowały duże zainteresowanie możliwością skażenia glifosatem zarówno zwierząt jak i ludzi (Peillex i Pelletier, 2020). Było to przedmiotem licznych badań nie tylko środowiskowych, ale także laboratoryjnych, w tym *in vitro*. Glifosat w warunkach *in vitro* indukuje apoptozę ludzkich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (Kwiatkowska i wsp., 2020; De Almeida i wsp., 2018), choć w niektórych badaniach dużą śmiertelność komórek obserwowano tylko przy wysokich dawkach (Kwiatkowska i wsp., 2016). W preparatach dostępnych komercyjnie toksyczność mogą zwiększać dodatki wzmacniające działanie podstawowego czynnika aktywnego (Nagy i wsp., 2019; Woźniak i wsp., 2018; Mesnage i wsp., 2021a). Za istotne zagrożenie przy stosowaniu herbicydów uznano możliwość ich oddziaływania z materiałem genetycznym organizmów, przypadkowo narażonych na taką ekspozycję. Genotoksyczne działanie glifosatu na ludzkie limfocyty zaobserwowano w badaniach *in vivo* (po ekspozycji środowiskowej) (Paz-y-Miño i wsp., 2007; Bolognesi i wsp., 2009) i *in vitro* w warunkach laboratoryjnych (Alvarez-Moya i wsp., 2014; Santovito i wsp., 2018; Woźniak i wsp., 2018). Herbicyd ten może także wpływać na ekspresję informacji genetycznej, na drodze zmian metylacji DNA (Mesnage i wsp., 2021a; Rossetti i wsp., 2021; Woźniak i wsp., 2021), które mogą być przekazywane kolejnym pokoleniom na drodze epigenetycznej (Kubsad i wsp., 2019; Ben Maamar i wsp., 2020). Zmienione wzory metylacji zaobserwowano także w przypadku promotorów genów supresorowych nowotworów P21 i TP53 (Woźniak i wsp., 2020; Kwiatkowska i wsp., 2017), co może tłumaczyć kancerogenne działanie glifosatu (Mesnage i wsp., 2021b). W przeglądach systematycznych wskazano na jego silną rakotwórczą aktywność dla myszy i szczurów laboratoryjnych (Portier, 2020). Opinie badaczy dotyczące możliwego rakotwórczego glifosatu dla ludzi są bardzo rozbieżne. W niektórych pracach powiązano ekspozycję na preparaty zawierające tę substancję z występowaniem chłoniaków nieziarniczych (Zhang i wsp., 2019; Pahwa i wsp., 2019; Weisenburger, 2021), czy ostrej białaczki szpikowej (Andreotti i wsp., 2018), choć istnieją publikacje zaprzeczające takiemu kancerogennemu działaniu (Williams i wsp., 2016a).

W niektórych publikacjach sugeruje się, że glifosat może być związkiem endokrynnie czynnym (endocrine disruptor). Dodanie preparatu RoundUpVR do ludzkich linii komórek łożyska hamowało produkcję estrogeny, co było związane ze

zmianą aktywności aromatazy (Benachour i wsp., 2007). Środowiskowe narażenie na glifosat było związane z podwyższonym ryzykiem późnych (w 12-19 tygodniu) poronień samoistnych niezależnie od tego, kiedy nastąpiła ekspozycja (Zhang i wsp., 2020b). Wyższy (w stosunku do kontroli) poziom tego herbicydu w próbkach moczu pobranych od kobiet ciężarnych był związany ze zwiększonym prawdopodobieństwem przedwczesnego porodu (Silver i wsp., 2021; Arbuckle i wsp., 2001; Parvez i wsp., 2018). Niekiedy zwiększone narażenie na glifosat jest wiązane z rozprzestrzenianiem chorób tarczycy (Romano i wsp., 2021; Leemans i wsp., 2019). Należy jednak zauważyć, że pomimo podejmowanych badań interakcje glifosat-układ hormonalny ciągle pozostają w sferze przypuszczeń (Levine i wsp., 2020; de Araújo-Ramos i wsp., 2021).

Problemem, który budzi coraz większe zainteresowanie jest wpływ ksenobiotyku, jakim jest glifosat na mikrobiom jelitowy człowieka. Istnieją nieliczne badania nad zmianami mikrobiomu po ekspozycji zwierząt laboratoryjnych na ten związek. Zaobserwowano zmniejszenie względnej liczebności bakterii z rodzaju *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Lactobacillus* (ocenianych jako pożyteczne, także u ludzi), ale zwiększenie liczebności kilku szczepów potencjalnie patogennych (Tang i wsp., 2020; Mesnage i wsp., 2021; Aitbali i wsp., 2018). Obserwowana dysbioza jelitowa mogła powodować większą częstość występowania zaburzeń emocjonalnych, neurologicznych i neurodegeneracyjnych u badanych zwierząt (Aitbali i wsp., 2018, Rueda-Ruzafa i wsp., 2019). U ludzi, ostrożne oszacowania wskazują, że ponad połowa gatunków w rdzeniu ludzkiego mikrobiomu jelitowego jest wrażliwa na glifosat (Leino i wsp., 2021). Ponieważ obecnie przyjmuje się, że zależności organizm ludzki - mikrobiom jelitowy są bardzo ściśle (holobiom) i mają wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka, to działanie różnych pochłoniętych herbicydów może być bardzo istotne dla zdrowia ludzi.

1.6. Kontrowersje dotyczące wpływu ekspozycji ludzi na glifosat

Interpretacja badań (także z uwagi na różną metodykę) nad szkodliwością glifosatu dla ludzi budzi wiele kontrowersji. Najgłośniejsze z nich dotyczą sprzeczności w ocenie jego potencjalnego działania rakotwórczego. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) uznała w 2015 roku, że związek ten jest prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (IARC, 2017). Z kolei Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) i Europejska Agencja Chemikaliów (ECHA) (ECHA, 2021) przyjęły, że brak dowodów na kancerogenne działanie glifosatu. Można założyć, że główną przyczyną rozbieżności w ocenie były istotności wyników przeprowadzonych eksperymentów, jak i różnice w

wielkościach użytych w nich dawek. Kontrowersje te były przedmiotem analiz w różnych publikacjach (Berry, 2020; Tarazona i wsp., 2017; Connolly i wsp., 2020). Część ekspertów uważa, że glifosat nie jest toksyczny lub, że jego toksyczność jest bardzo niska zależnie od skali ekspozycji, jaka została zastosowana i mogłaby stanowić zagrożenie jedynie przy kontakcie z dużymi dawkami (Berry, 2020; Williams i wsp., 2016a). W UE dopuszczalne dzienne pobranie (ADI- acceptable daily intake) dla ludzi zostało ustalone na poziomie 0,5mg/kg masy ciała na dzień (EFSA, 2017). Takie toksykologiczne wartości referencyjne są około czterech rzędów wielkości mniejsze niż uznane przez IARC jako indukujące nowotwory i uszkodzenia genotoksyczne (Tarazona i wsp., 2017). Istnieją jednak obserwacje, że glifosat może wywierać szkodliwy wpływ na zwierzęta w dawkach znacznie mniejszych, niż przyjmowane jako toksyczne (Mesnage i wsp., 2015; Chłopecka i wsp., 2014).

2. Cel pracy

Na podstawie dostępnych danych literaturowych można przyjąć, że przyswajanie glifosatu (składnika środków ochrony roślin) zawartego w składnikach codziennej diety zwykle nie przekracza dopuszczalnego dziennego pobrania (zgodnie z wytycznymi UE). Opisano jednak, że niskie stężenia tego związku wpływają w warunkach *in vitro* na funkcje ludzkich komórek różnego pochodzenia. Badanie zauważalnego działania takich małych dawek na organizm człowieka wymagałoby przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań epidemiologicznych, trudnych do interpretacji.

Celem niniejszej pracy było oszacowanie wielkości skażenia glifosatem wody wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski i próba oceny, jak stężenia tego związku porównywalne z wykrytymi w wodzie, mogą wpływać na wybrane reakcje komórek krwi obwodowej *in vitro*. Dlatego też w niniejszej rozprawie zastosowano model z użyciem ludzkich leukocytów krwi obwodowej, gdyż taki układ wydaje się dobrze odzwierciedlać możliwe oddziaływanie niskich dawek glifosatu na zdrowie człowieka w naturalnym środowisku życia.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę występowania glifosatu w wodzie wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski.
2. Ocenę wpływu niskich stężeń glifosatu na produkcję reaktywnych pochodnych tlenowych przez ludzkie granulocyty krwi obwodowej, co świadczyłoby o wpływie tego związku na metabolizm wewnątrzkomórkowy.
3. Ocenę potencjalnego wpływu niskich stężeń glifosatu na poziom glutationu, głównego czynnika zapewniającego równowagę redoks w komórkach.

3. Material i metody

Badania eksperymentalne wykonano w Zakładzie Immunobiologii Wydziału Medycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.1. Materiały

Próbki wody pitnej pobranej losowo z wydzielonych obiektów Stacji Uzdatniania Wody na terenie Wielkopolski (z wyjątkiem regionu poznańskiego) w okresie październik-grudzień 2017 r. uzyskiwano z Pracowni Badania Gleb i Wód Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej.

Wodę (200mL) pobierano do butelek z ciemnobrązowego szkła, konserwowano tiosiarczanem sodu do stężenia końcowego ok. 0,002% i do czasu wykonania oznaczeń glifosatu przechowywano w temperaturze 4°C.

Do doświadczeń przeprowadzanych na próbkach krwi przygotowano wyjściowy roztwór glifosatu (CAS# 1071-83-6) (98,9% w/w, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa, Polska) o stężeniu 1mg/ml w wodzie apirogennej. Roztwór ten sączono przez filtr strzykawkowy PES 0,22µm (Merck Millipore), rozporcjowywano do sterylnych probówek do głębokiego mrożenia (1,8ml) i do momentu użycia przechowywano w zamrażarce (-18°C).

W badaniach używano krwi od zdrowych dawców zakupionej w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu, wobec czego zgoda komisji Bioetycznej nie była wymagana. Krew w objętości 7,5ml była pobierana do probówek z heparyną litową (Sarstedt, Germany) i dostarczana do laboratorium w możliwie najkrótszym czasie (maksymalnie 1 godz.).

3.2. Metody

3.2.1. Oznaczanie stężenia glifosatu w roztworach wodnych

3.2.1.1. Oznaczanie stężenia glifosatu w wodzie metodą ELISA

Do oznaczeń stężeń glifosatu w wodzie pitnej użyto zestawu Glyphosate ELISA Plate Kit PN5000086 firmy Abraxis Inc., PA, USA. Granica wykrywalności glifosatu wynosiła 0,05ppb ($\mu\text{g/l}$)

Zasada metody.

Oznaczanie stężenie glifosatu w tym teście oparte jest na konkurencji glifosatu w badanej próbce z glifosatem wyznakowanym enzymatycznie o miejsce wiązania na króliczych przeciwciałach.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta:

1. Standardy, kontrole i próbki derywatyzowano dodając do probówek 250 μL wzorca, kontroli lub próbki badanej, 1ml buforu testowego, 100 μL rozcieńczonego odczynnika derywatyzacyjnego, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
2. Do mikrodółków dodawano 50 μL derywatyzowanych roztworów i 50 μL roztworu przeciwciała, mieszano i inkubowano mikropłytki przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym dodawano 50 μL roztworu koniugatu enzymu, następnie inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej.
3. Zawartość dołków dekantowano, a mikropłytki płukano trzykrotnie roztworem buforu płuczącego przy użyciu płuczki automatycznej.
4. Po osuszeniu do poszczególnych dołków dodawano 150 μL roztworu substratu (barwnika), po wymieszaniu inkubowano płytki z próbkami przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności, a następnie dodawano 100 μL roztworu przerywającego reakcję.
5. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450nm za pomocą czytnika ELISA (EPOCH, BioTek) w ciągu 15 minut od dodania roztworu przerywającego reakcję.
6. Stężenia glifosatu w próbkach wyznaczano na podstawie krzywych wzorcowych wykreślanych w każdej serii badań. Wszystkie oznaczenia wykonywano podwójnie.

3.2.1.2. Oznaczanie stężenia glifosatu w roztworach wodnych techniką HPLC

Wzorcowe roztwory glifosatu (CAS# 1071-83-6) (98,9% w/w, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa, Polska) w stężeniach od 100 pmol/L do 50mmol/L przygotowano metodą kolejnych rozcieńczeń w wodzie bidestylowanej. Jako środki derywatyzujące zastosowano chloromrówczan 9-fluorenylometylu (FMOC-Cl) (CAS# 28920-43-6, 98%, w/w, Sigma-Aldrich) i chloromrówczan 1-(hydroksymetylo)pirenu. Jako rozpuszczalników użyto acetonitrylu o czystości HPLC (CAS# 75-05-8 HPLC gradient grade, J.T. Baker), wody bidestylowanej (CAS# 7732-18-5) i odczynników o czystości analitycznej (czda): dichlorometanu (CAS# 75-09-2, POCh, Polska), chloroformu (CAS# 67-66-3, POCh, Polska), eteru dietylowego (CAS# 60-29-7 Lachema, Czechy), diwodorofosforanu potasu (CAS# 7778-77-0, POCh, Polska), kwasu ortofosforowego 85% (CAS# 7664-38-2, POCh, Polska), wodorotlenku potasu (CAS# 1310-58-3, POCh, Polska).

Kalibracja przepływu w pompach HPLC Gilson 305, 306 i 307 została przeprowadzona metodą grawimetryczną przy użyciu wagi analitycznej RadWag. W metodzie tej w ustabilizowanym przepływie masa rozpuszczalnika dostarczonego w zadanym interwale czasu jest porównywana z iloczynem szybkości przepływu, zadanego interwału czasu i gęstości rozpuszczalnika. Ponadto przy ustalonym stałym przepływie cieczy metodą różnicową mierzone jest napięcie (nanowoltomierz prądu stałego Unipan 252) oraz natężenie podawane na silnik pompy. Kryterium, iż pompa może być wykorzystana i może spełniać swoją funkcję to odchylenia przepływu poniżej poziomu 0,002 mL/min przy zadanym przepływie 1,000mL/min oraz stałość napięcia i natężenia.

Pomiar stałości ciśnienia przy zadanym przepływie rozpuszczalnika wykonano czujnikiem piezoelektrycznym ze stosunkiem sygnał-szum 120dB, częstotliwość 100kHz. Odchylenia poniżej 0,5bar przy ciśnieniu 200bar uznano za kryterium, iż pompa z modulem ciśnieniowym lub moduł ciśnieniowy nie wymagają dalszej kalibracji.

Dilutor (wstrzykiwacz) Gilson 401 skalibrowano podobnie jak pompy metodą grawimetryczną. Mierzono, czy zadana objętość (przeliczona na masę) oraz szybkość przepływu pokrywa się z ilorazem objętości i czasu przepływu.

Sprawdzenie poprawności działania detektora UV-Vis Dionex AD20 oprócz wewnętrznego testu (uruchamianego z poziomu serwisowego) polegało na sprawdzeniu stałości odczytu absorbancji przy stałym przepływie cieczy, przy czym za dopuszczalny uznano dryft podany przez producenta – tj. poniżej 100μAU/godz. lub 100μAU/°C (po wcześniejszym ponad półgodzinnym „włączeniu” lampy). Podobnie szum uznano za

prawidłowy jeżeli wynosił poniżej $10\mu\text{AU}$ dla długości fali 254nm , w dwusekundowym czasie narastania (przy przepływie wody). Pomiaru stosunku sygnał-szum wykonano także przy czułości -20dB (nanowoltomierze prądu przemiennego Unipan 232B i 233).

Poprawność działania w zakresie UV oraz rejestrowane wartości absorbancji oraz relację wartości absorbancji od stężenia wykonano przy pomocy roztworów wzorcowych kofeiny.

Derywatyzacja

Do 4ml standardowego roztworu glifosatu (100pmol/L do $33\mu\text{mol/L}$) lub analizowanej próbki wody wodociągowej dodawano 2ml buforu boranowego, a następnie 4 ml świeżo przygotowanego roztworu odczynnika derywatyzującego FMOC-Cl (lub chloromrówczanu 1-(hydroksymetylo)pirenu) w acetonitrylu (o stężeniu 50mmol/L). Całość mieszano przez pół godziny w temperaturze $45\text{-}50^\circ\text{C}$ i następnie ochłodzono do $5\text{-}8^\circ\text{C}$. Nadmiar środka derywatyzującego usuwano poprzez trzykrotne przemycie po 5ml dichlorometanu (ewentualnie chloroformu lub eteru dietylowego), po czym przesączono przez teflonowy filtr strzykawkowy ($0,22\mu\text{m}$).

Zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy z autosamplerem (możliwość nastrzykiwań objętości od 10 do $50\mu\text{L}$) Gilson 231-402, odgazowywaczem (degasserem), dwoma pompami: sterującą Gilson 307 (z modułem manometrycznym) oraz Gilson 306 podłączonej do mieszacza Dynamix Mixer Gilson 811C. Rozdział przeprowadzono na kolumnie MetaChem Polaris NH_2 ($2\times 150\text{mm}$, 3 mikrometry , z prekolumną C_{18}) w temperaturze 25°C . Zastosowano detektor UV-Vis AD20 firmy Dionex. Pompy podłączone były do systemu zbierania danych - HP ChemStation 7.0 z modułem interfejsu HP 35900 (A/D).

Przepływ eluentu zadano na stałym poziomie $0,45$ lub $0,50\text{mL/min}$. Fazę ruchomą stanowił acetonitryl i $0,05\text{mol/L}$ roztwór KH_2PO_4 ($1:1\text{ v/v}$), doprowadzony do pH $5,0$ kwasem ortofosforowym lub wodorotlenkiem potasu) przesączonym wcześniej przez filtr teflonowy $0,22\mu\text{m}$.

Wszystkie badane próbki wody analizowano co najmniej trzykrotnie.

3.2.2. Ocena żywotności leukocytów krwi obwodowej

Do badania żywotności granulocytów zastosowano zestaw FLIVO® In vivo Poly Caspase Assay (ICT) firmy ImmunoChemistry Technologies, LLC.

Zasada metody.

Procedura opiera się na ocenie odsetka komórek apoptotycznych, wybarwionych znakowanymi fluorescencyjnie inhibitorami kaspaz (FLICA - Fluorochrome Inhibitor of Caspases) i odsetka komórek nekrotycznych, wybarwionych jodkiem propidionowym (PI - Propidium Iodide). Cząsteczki FLICA przenikają przez błonę komórkową do wnętrza komórki i wiążą się kowalencyjnie z centrum aktywnym kaspaz (proteaz cysteinowych) kluczowych enzymów w procesie apoptozy. Aktywowane kaspazy rozszczepiają łańcuch białkowy, rozpoznając sekwencję 3 lub 4 aminokwasów, która musi zawierać resztę kwasu asparaginowego (D) w pozycji P1. Każda sonda FLICA zawiera odpowiednią sekwencję, która jest celem różnych kaspaz. Ta sekwencja jest umieszczona pomiędzy karboksyfluoresceiną (FAM), barwnikiem wykazującym zieloną fluorescencję przy fali wzbudzenia 488-492nm i fluorometyloketonem (FMK). Kaspazy rozszczepiają FLICA, tworząc nieodwracalne wiązanie kowalencyjne z FMK. Niezwiązany odczynnik zostaje usunięty z komórki podczas płukania. Komórki apoptotyczne, które wiążą FLICA wykazują większą intensywność fluorescencji niż komórki nieuszkodzone.

Komórki nekrotyczne od żywych odróżniano na podstawie barwienia jodkiem propidionowym (PI), który wiąże się stechiometrycznie z dwuniciowymi kwasami nukleinowymi. Jodek wnika do komórek dopiero przy zaburzeniu integralności błony komórkowej, a stosowany w niskich stężeniach pozwala na zidentyfikowanie martwych komórek.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta:

1. Do próbek zawierających 20µL krwi dodawano 20µL PBS i 5µL roztworu glifosatu lub soli fizjologicznej (kontrola) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
2. Do próbek dodawano 1µL roztworu FLICA i zawiesinę delikatnie wstrząsano.
3. Komórki inkubowano bez dostępu światła w temperaturze 37°C przez 1 godzinę, następnie dodawano 200µL buforu płuczącego (1 X Apoptosis Wash Buffer) i delikatnie mieszano.

4. Próbkę odwirowywano przy przyspieszeniu 200 x g przez 7 minut w temperaturze pokojowej, supernatant odrzucano, a komórki zawieszano w 100µL buforu płuczącego.

5. Próbkę odwirowywano przy przyspieszeniu 200 x g przez 7 minut w temp. pokojowej, a komórki zawieszano w 400µL buforu płuczącego i inkubowano w 4°C przez 10 min.

6. Do zawiesiny dodawano 2µL PI, mieszano i umieszczano próbki na lodzie na 20 min.

7. Następnie dodawano 400µL płynu lizującego i inkubowano przez 20 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej.

8. Próbkę odwirowywano przy przyspieszeniu 200 x g przez 7 minut w temperaturze pokojowej, supernatant odrzucano, a komórki zawieszano w 1000µL buforu płuczącego.

9. Fluorescencję komórek mierzono w cytometrze Sysmex Partec-CyFlow®Space przy długości fali wzbudzenia 488nm. Pomiaru fluorescencji PI dokonywano w zakresie widma światła czerwonego poniżej 630nm, natomiast FAM w zakresie widma światła zielonego 515-545nm, stosując logarytmiczne wzmocnienie sygnału.

3.2.3. Badanie „wybuchu oddechowego” neutrofilów

Do badania produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w granulocytach użyto zestawu PHAGOBURST™ firmy Glycotope Biotechnology GmbH.

Zasada metody.

Zetknięcie się obcej cząstki z zewnętrzną błoną neutrofila zapoczątkowuje fazę pochłaniania (endocytozy). W momencie oddzielania się błony, mającej utworzyć pęcherzyk fagocytarny, od powierzchni komórki, następuje zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), co jest określane jako "wybuch oddechowy" (oxidative burst). W procesie tym główną rolę odgrywa aktywacja oksydazy NADPH, a powstający anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ jest prekursorem innych reaktywnych pochodnych tlenu. Poziom RFT w komórce można ocenić, używając odpowiednich fluorochromów, jak np. dihydrorodamina 123 (DHR123), która po utlenieniu do rodaminy 123 uzyskuje właściwości fluorescencyjne.

Szlak sygnałowy warunkujący aktywację oksydazy NADPH obejmuje zmiany szeregu cząsteczek i aktywację kinazy białkowej C (PKC), enzymu oddziałującego z kompleksem oksydazy NADPH. W warunkach *in vitro* PKC może zostać bezpośrednio zaktywowana przez estry forbolu (PMA-phorbol 12-myristate 13-acetate), co z kolei

aktywuje dostępne cząsteczki NADPH i w rezultacie pozwala na oszacowanie zdolności fagocytu do produkcji RFT.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta:

1. Do próbek zawierających 20 μ L krwi dodawano 20 μ L PBS i 5 μ L roztworu glifosatu lub soli fizjologicznej (kontrola) i inkubowano przez 1 godz. w temp. pokojowej.
2. Do wychłodzonych próbek (inkubowanych przez 10 min. w 4°C) dodawano 8 μ L wychłodzonej zawiesiny bakterii E. coli lub 8 μ L PMA i dokładnie mieszano.
3. Próby inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37,0°C, po czym dodawano 8 μ L roztworu DHR123, dokładnie mieszano i inkubowano przez kolejne 15 min. w 37,0°C.
4. Do badanych próbek krwi pełnej dodawano 400 μ L roztworu lizującego, mieszano i inkubowano przez 20 min. w temperaturze pokojowej.
5. Komórki odwirowywano przez 5 min. przy 250 x g, w temperaturze pokojowej i przemywano 1ml roztworu płuczącego, po czym procedurę powtarzano.
6. Supernatant odrzucano, a do próbek dodawano 40 μ L roztworu barwiącego DNA (zawartego w zestawie) i inkubowano bez dostępu światła przez 10 min. w łaźni lodowej.
7. Fluorescencję komórek mierzono w cytometrze Sysmex Partec -CyFlow®Space przy długości fali wzbudzenia 488nm. Pomiaru fluorescencji DNA dokonywano w zakresie widma światła czerwonego poniżej 630nm, natomiast DHR123 w zakresie widma światła zielonego 515-545nm, stosując logarytmiczne wzmocnienie sygnału.
8. Granulocyty bramkowano wykorzystując fluorescencję wybarwionego DNA, a następnie oceniano wielkość produkcji RFT w tak wybarwionych komórkach.

3.2.4. Ocena zdolności neutrofilów do fagocytozy

Do badania pochłaniania bakterii przez granulocyty użyto zestawu PHAGOTEST™ firmy Glycotope Biotechnology GmbH.

Zasada metody.

Zdolność określonych komórek krwi do pochłaniania patogenów (fagocytozy) jest istotnym elementem odporności immunologicznej ssaków. U człowieka do takich komórek należą granulocyty, które charakteryzują się dużą zdolnością fagocytozy i stanowią pierwszą linię obrony w każdym przypadku wniknięcia drobnoustrojów do organizmu. Neutrofile fagocytują i zabijają przede wszystkim szybko namnażające się i inwazyjne bakterie. Komórka fagocytująca, łączy się w sposób nieswoisty z patogenem, prawdopodobnie na zasadzie interakcji powierzchniowych grup cukrowcowych (wiązanie lektynopodobne). Proces ten, zwany przyleganiem, zachodzi łatwiej po opłaszczeniu antygeny przez tzw. opsoniny, do których należą immunoglobuliny, niektóre składowe dopełniacza, a także inne substancje. Aktywność fagocytarna granulocytów jest jednym z istotnych wykładników odporności wrodzonej.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta:

1. Do próbek zawierających 20µL krwi dodawano 20µL PBS i 5µL roztworu glikofosatu lub soli fizjologicznej (kontrola) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
2. Do wychłodzonych próbek dodawano 4µL wychłodzonej zawiesiny opsonizowanych bakterii *E. coli* znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i dokładnie mieszano.
3. Próby inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37,0°C.
4. Po inkubacji wszystkie próby umieszczano na lodzie w celu zatrzymania fagocytozy i dodawano 20µL wychłodzonego roztworu tłumiącego fluorescencję bakterii *E.coli* przyłączonych do zewnętrznej błony komórki.
5. Komórki odwirowywano przez 5 min. przy 250 x g, w temp. pokojowej i przemywano 1ml roztworu płuczącego, po czym procedurę powtarzano.
6. Do próbek z krwinkami dodawano 400µL roztworu lizującego, mieszano i inkubowano przez 20 min. w temperaturze pokojowej.
7. Komórki jądrzaste odwirowywano przez 5 minut przy 250 x g w temperaturze pokojowej i przemywano 1ml roztworu płuczącego.

8. Supernatant odrzucano, komórki zawieszano w 400µL roztworu płuczącego i dodawano 40 µL roztworu barwiącego DNA , po czym inkubowano bez dostępu światła przez 10 minut w łaźni lodowej.

9. Fluorescencję komórek mierzono w cytometrze Sysmex Partec CyFlow®Space przy długości fali wzbudzenia 488nm. Pomiaru fluorescencji DNA dokonywano w zakresie widma światła czerwonego poniżej 630nm, natomiast FITC w zakresie widma światła zielonego 515-545nm, stosując logarytmiczne wzmocnienie sygnału.

10. Granulocyty bramkowano wykorzystując fluorescencję wybarwionego DNA, a następnie oceniano wielkość fagocytozy w tak wybarwionych komórkach.

11. Odczytane w ten sposób dane obejmowały procentową ilość komórek, które wykazały fagocytozę oraz średnią intensywność fluorescencji, odpowiadającą liczbie bakterii pochłoniętych przez jedną komórkę.

3.2.5. Oznaczanie stężenia glutationu w lizatach komórkowych

Do oznaczeń użyto zestawu Glutathione Colorimetric Detection Kit EIAGSHC firmy Invitrogen™. Czułość testu producent określił na 0,634 µM glutationu.

Zasada metody.

Glutation (γ-glutamilo-cysteinylo-glicyna) jest jednym z najważniejszych przeciwutleniaczy w przyrodzie. Występuje w formie tiolowej (zredukowanej - GSH) i dwusiarczkowej (utlenionej – GSSG). GSSG powstaje z dwóch cząsteczek GSH połączonych wiązaniem dwusiarczkowym w wyniku m.in. reakcji enzymatycznych eliminujących nadtlarki. W komórce eukariotycznej główną rolę fizjologiczną odgrywa GSH, uczestniczący w obronie organizmu przed tzw. stresem oksydacyjnym; postać utleniona stanowi mniej niż 1% całkowitej puli glutationu. GSSG jest redukowany do GSH przez reduktazę glutationu zależną od NADPH. Układ redoks GSH / GSSG zapewnia właściwe środowisko w komórce.

Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta:

1. Do próbek zawierających 20 μ L krwi dodawano 20 μ L PBS i 5 μ L roztworu glifosatu lub soli fizjologicznej (kontrola) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

2. Próbkę krwi odwirowywano, usuwano nasącz, płukano zimnym PBS i zawieszano w 5% wychłodzonym roztworze kwasu 5-sulfo-salicylowego, wytrząsano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 4°C.

3. Probówki z lizatem komórkowym odwirowywano przy 14000 obr/min przez 10 minut w 4°C (wirówka Eppendorf 5804 R), a supernatant służył do oznaczania stężeń GSH.

4. W przypadku oznaczania GSSG do 250 μ L supernatantu dodawano 5 μ L roztworu 2-winylopirydyny (aby zablokować wolny GSH lub inne tiole) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

5. Badane supernatanty rozcieńczano w proporcji 1:4 buforem dostarczonym przez producenta.

6. W podobny sposób przygotowywano roztwory wzorcowe GSH lub GSSG.

7. Do mikrodołków dodawano 50 μ L wzorca lub badanych supernatantów, a następnie 25 μ L odczynnika do oznaczeń kolorymetrycznych, znajdującego się w zestawie.

8. Do każdego dołka dodawano 25 μ L mieszaniny reakcyjnej zawierającej reduktazę glutationową i NADPH, mieszano i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej.

9. Oznaczeń dokonywano z użyciem czytnika Epoch firmy Biotek przy długości fali 405nm.

10. Stężenia GSH i GSSG wyznaczano z odpowiednich krzywych wzorcowych.

3.2.6. Statystyczne opracowanie danych

3.2.6.1. Analiza statystyczna wyników oznaczania stężenia glifosatu w wodzie

Rozkład danych oceniono przy użyciu testu Kołmogorowa-Smirnowa. Istotność różnic pomiędzy wynikami badań wykonanych metodami HPLC i ELISA oceniano za pomocą sparowanego testu Studenta. Korelację między wynikami badań HPLC i ELISA oceniano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona. Dane analizowano za pomocą oprogramowania Medcalc® (Belgia).

3.2.6.2. Analiza statystyczna wpływu glifosatu na komórki *in vitro*

Analizę statystyczną wykonano w programie MedCalc® Statistical Software version 19.5.3 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

We wszystkich zastosowanych testach statystycznych poziom $p < 0,05$ przyjęto jako potwierdzający istotność statystyczną.

Dla zmiennych w poszczególnych seriach badań wyliczono wartości średnie, odchylenia standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną.

Następnie sprawdzano zgodność rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym. W obu seriach badań nie wszystkie zmienne spełniły warunek normalności, dlatego zastosowano test nieparametryczny dla zmiennych powiązanych – test Friedmana.

Gdy obliczone prawdopodobieństwo było mniejsze od wybranego poziomu istotności, to można stwierdzić, że co najmniej dwie zmienne znacznie się od siebie różnią. W dalszym kroku wykonywany był test post-hoc (test post-hoc Conover), który wskazuje pomiędzy którymi zmiennymi zachodzi istotnie statystyczna różnica (gdy $p < 0,05$).

Dla zmiennych wyliczono wartości średnie, odchylenia standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną. Następnie sprawdzano zgodność rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym. W przypadku, gdy nie wszystkie zmienne spełniły warunek normalności, zastosowano test nieparametryczny Friedmana.

Obliczenia statystyczne były wykonywane w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4. Wyniki

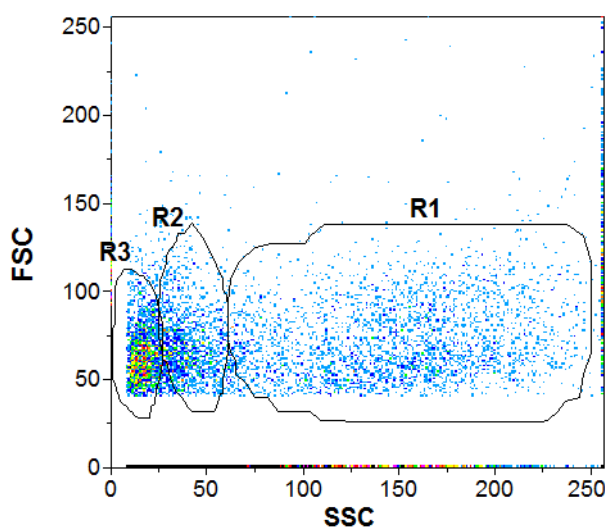
4.1. Stężenia glifosatu w wodzie wodociągowej

Stężenia glifosatu oznaczono w 66 próbkach wody wodociągowej metodami: HPLC i ELISA. Korelacja pomiędzy danymi uzyskanymi obiema metodami była wysoka ($r=0,97$), co potwierdziła analiza regresji. Metodą HPLC wykrywano w badanych próbkach glifosat w zakresie stężeń $0,07 - 0,31 \mu\text{g/L}$ (95% CI przedział ufności dla średniej: $0,12 - 0,18 \mu\text{g/L}$), natomiast w testach ELISA oznaczano jego wartości od granicy wykrywalności ($0,1 \mu\text{g/L}$) do $0,332 \mu\text{g/L}$ (95% CI dla średniej: $0,12 - 0,18 \mu\text{g/L}$). Wykryte stężenia były stosunkowo niskie: $0,15 \pm 0,06 \mu\text{g/L}$ przy użyciu HPLC i $0,15 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ w testach ELISA. Glifosat w roztworach wodnych jest stabilny. Zamrażanie i rozmrażanie, gotowanie i autoklawowanie próbek nie wpływało na poziom glifosatu w badanych roztworach. Związek ten nie był również usuwany z roztworu w procesie sączenia przy użyciu komercyjnych filtrów do wody stosowanych w gospodarstwach domowych.

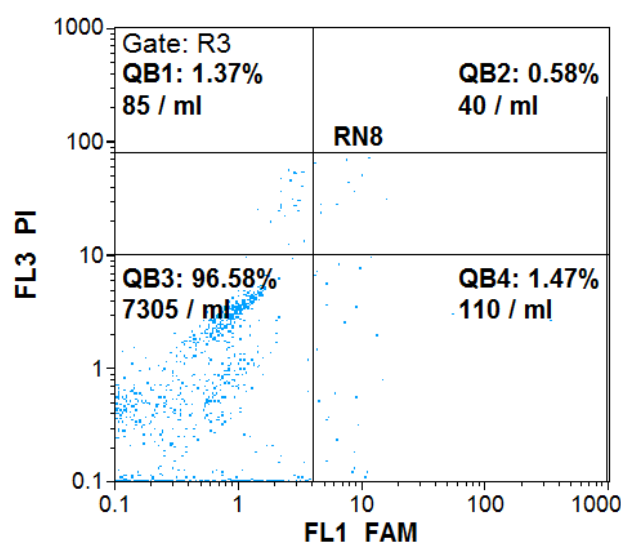
4.2. Ocena potencjalnie toksycznego działania glifosatu na leukocyty krwi obwodowej

Do oceny toksyczności glifosatu zastosowano metodę cytometrii przepływowej z użyciem sondy FLICA i jodku propidionowego.

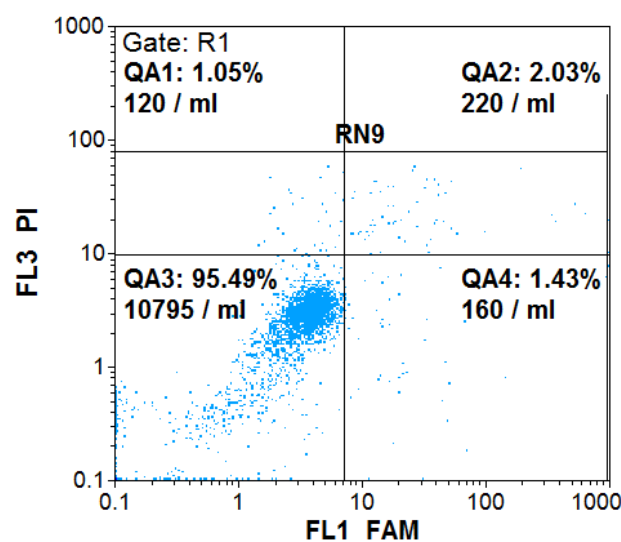
Komórki apoptotyczne wykazywały fluorescencję w zielonym zakresie widma, martwe w zakresie czerwonym.



Ryc. 2. Przykładowy cytogram - wyodrębniono bramkami populacje limfocytów (R3), monocytów (R2) i granulocytów (R1) w obrazie cytometrycznym.



Ryc. 3. Obraz z cytometru przepływowego Sysmex Partec-CyFlow®Space przedstawiający rozdział badanych granulocytów na:
 QB3. Komórki żywe - FAM(-)PI(-); QB4. Komórki umierające - FAM(+)PI(-);
 QB2. Komórki apoptotyczne - FAM(+)PI(+); QB1. Komórki nekrotyczne - FAM(-)PI(+)



Ryc. 4. Obraz z cytometru przepływowego Sysmex Partec -CyFlow®Space przedstawiający rozdział badanych limfocytów na:
 QA3. Komórki żywe - FAM(-)PI(-); QA4. Komórki umierające - FAM(+)PI(-),
 QA2. Komórki apoptotyczne - FAM(+)PI(+),
 QA1. Komórki nekrotyczne - FAM(-)PI(+)

Analiza statystyczna przedstawionych wyników wykazała, że jednogodzinna inkubacja próbek komórek krwi z badanymi stężeniami glifosatu nie wpływa na żywotność granulocytów i limfocytów (Tabela 2 i 3). Testy MTT wykazały brak toksycznego wpływu glifosatu w stężeniu 10 µg/mL w trzydniowych hodowlach *in vitro* limfocytów niestymulowanych lub stymulowanych mitogenem. (inf. dr Jacek Sikora).

Tab. 2. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w populacji granulocytów.

OGÓŁEM (N=7) stężenia [µg/mL]	Granulocyty			p
	średnia±SD	mediana	min-max	
kontrola 0	95,85±2,03	95,88	93,04-98,50	0,2729
0,01	96,50±1,75	96,88	93,28-98,60	
0,1	96,68±0,86	97,13	95,31-97,46	
1	94,43±2,07	93,76	92,47-97,17	
10	95,55±3,14	96,84	89,29-98,09	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p > 0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami stężeń).

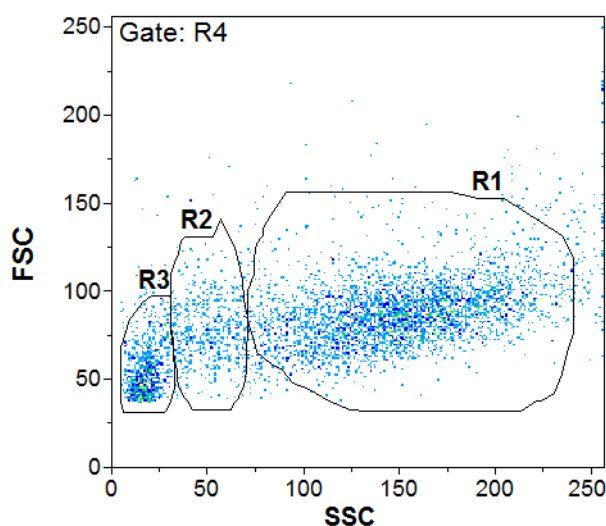
Tab. 3. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w populacji limfocytów.

OGÓŁEM (N=7) stężenia [µg/mL]	Limfocyty			p
	średnia±SD	mediana	min-max	
kontrola 0	96,15±2,20	95,58	92,92-99,22	0,7252
0,01	96,51±1,95	97,27	93,36-98,51	
0,1	96,49±2,00	96,72	92,41-98,59	
1	96,22±2,56	96,41	92,59-99,49	
10	95,33±1,22	95,37	93,98-96,86	

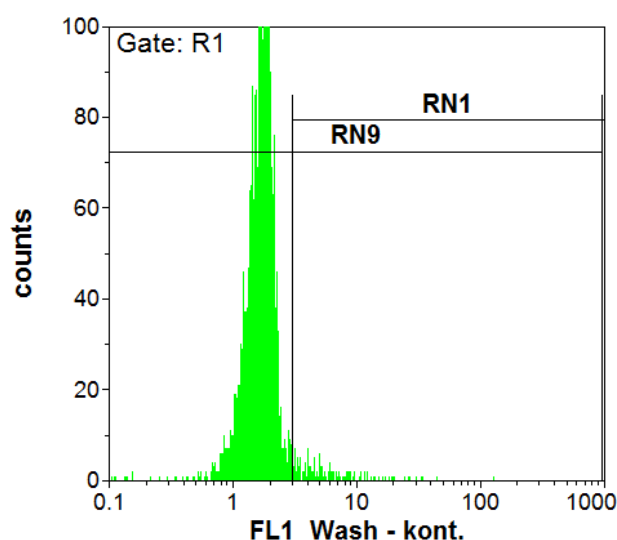
Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p > 0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami stężeń).

4.3. Badanie wybuchu oddechowego w granulocytach

Do oceny produkcji wolnych rodników w granulocytach zastosowano metodę cytometrii przepływowej z użyciem dihydrorodaminy 123 (DHR123) i roztworu barwiącego DNA (zawartego w zestawie producenta). Wielkość produkcji reaktywnych pochodnych tlenu (RFT) oceniono na podstawie intensywności fluorescencji w zielonym zakresie widma, natomiast żywe komórki wykazujące fluorescencję identyfikowano na podstawie barwienia w zakresie czerwonym.



Ryc. 5. Przykładowy cytogram - populacje limfocytów (R3), monocytów (R2) i granulocytów (R1) w obrazie cytometrycznym. W dalszej analizie używano wyodrębnione bramką populacje granulocytów (R1) krwi obwodowej.



Ryc. 6. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji DHR123 (średni kanał) w granulocytach spoczynkowych.

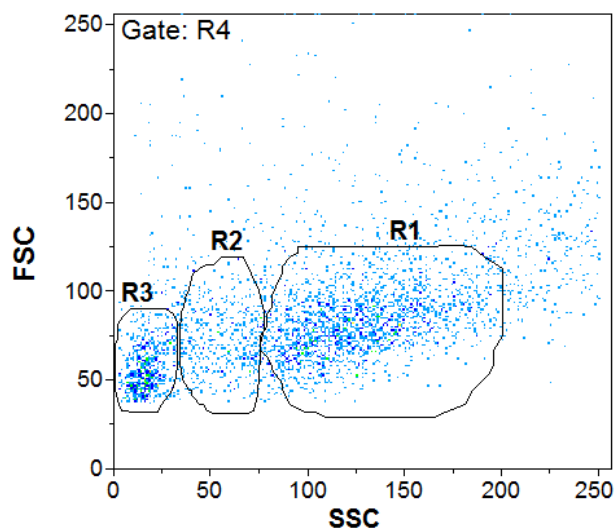
Jednogodzinna inkubacja krwi pełnej z roztworami glifosatu o różnych stężeniach nie powodowała zwiększenia metabolizmu tlenowego w granulocytach. (Tab. 4)

Tab. 4. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w populacji granulocytów niestymulowanych.

OGÓŁEM (N=32) stężenia glifosatu [μg/mL]	Wartość średniego kanału fluorescencji DHR123			p
	średnia±SD	mediana	min-max	
0	1,39±0,40	1,37	0,76-2,40	0,4124
0,01	1,46±0,38	1,43	0,62-2,26	
0,1	1,44±0,51	1,31	0,67-2,55	
1	1,39±0,47	1,29	0,75-3,16	

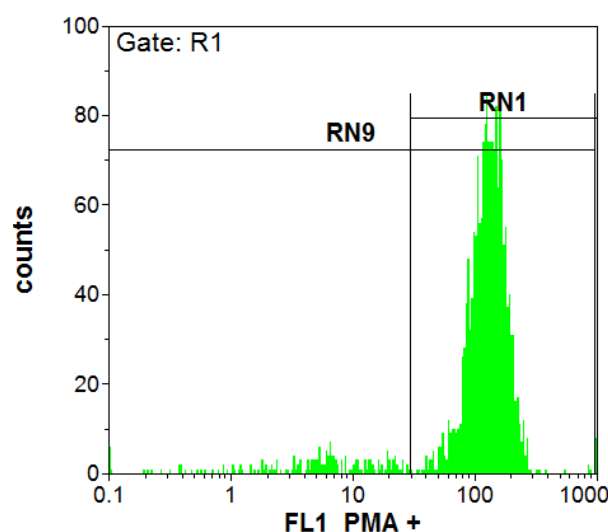
Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana (gdzie $p > 0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice między porównywanymi grupami stężeń).

4.3.1. Wpływ glifosatu na wybuch oddechowy w komórkach stymulowanych PMA



Ryc. 7. Cytogram przedstawiający - populacje limfocytów (R3), monocytów (R2) i granulocytów (R1) w próbkach krwi po dodaniu PMA.

W analizie używano wyodrębnione bramką populacje granulocytów (R1) krwi obwodowej.



Ryc. 8. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji DHR123 (średni kanał) w granulocytach stymulowanych PMA.

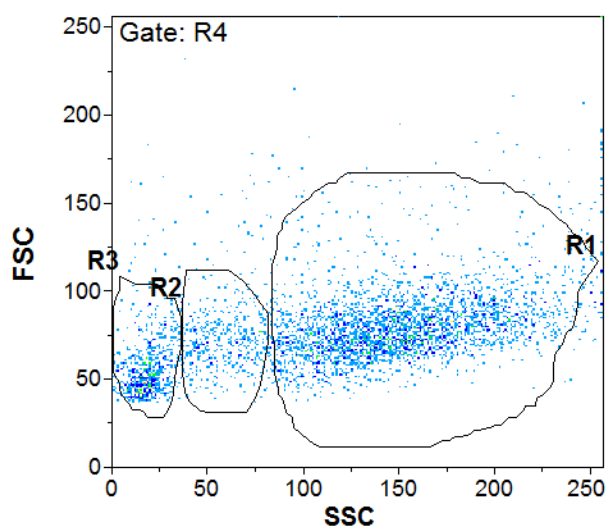
Jednogodzinna inkubacja krwi pełnej z roztworami glifosatu o różnych stężeniach nie powodowała zmian w metabolizmie tlenowym granulocytów stymulowanych PMA.

Tab. 5. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w populacji granulocytów stymulowanych PMA.

OGÓŁEM (N =16) stężenia [$\mu\text{g/mL}$]	Wartość wybuchu oddechowego po stymulacji PMA			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
kontrola 0	49,77 $\pm$ 13,79	49,90	23,70-67,20	0,1409
0,01	60,99 $\pm$ 11,38	60,70	45,20-81,80	
0,1	60,20 $\pm$ 12,90	61,90	34,00-81,80	
0,5	61,16 $\pm$ 10,68	60,95	42,80-83,30	
1	62,42 $\pm$ 8,64	60,95	49,70-84,90	
5	61,19 $\pm$ 10,77	60,65	41,30-90,40	

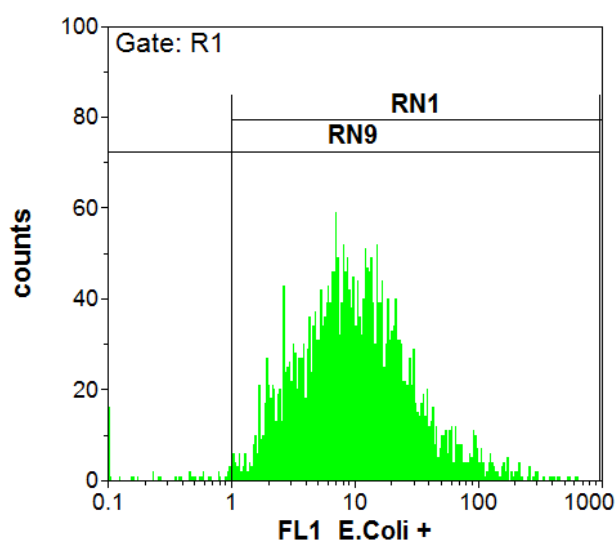
Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana (gdy $p > 0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice między porównywanymi grupami stężeń).

4.3.2. Wpływ glifosatu na wybuch oddechowy komórek stymulowanych fMLP i E.coli



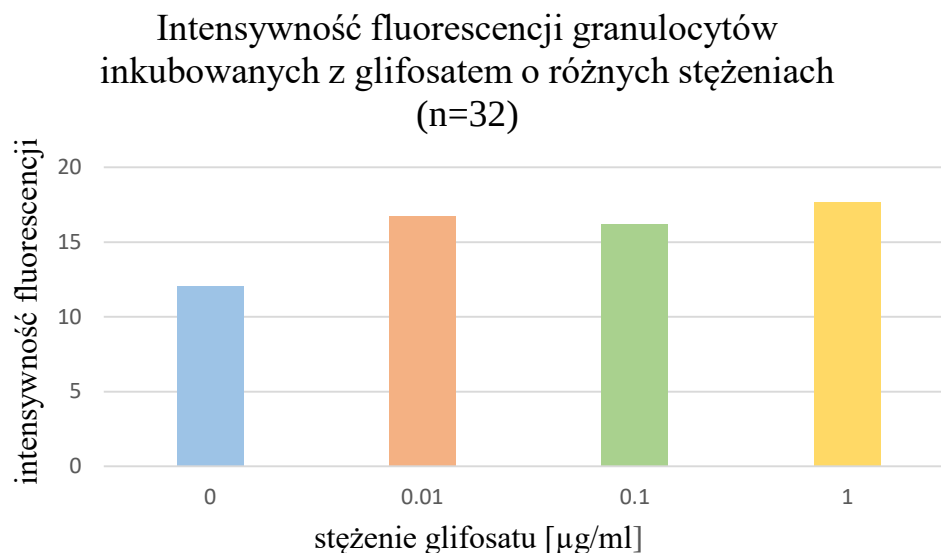
Ryc. 9. Cytogram przedstawiający - populacje limfocytów (R3), monocytów (R2) i granulocytów (R1) w próbkach krwi stymulowanych fMLP i E.coli.

W analizie używano wyodrębnione bramką populacje granulocytów (R1) krwi obwodowej.



Ryc. 10. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji DHR123 (średni kanał) w granulocytach stymulowanych fMLP i E.coli.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano stymulujący wpływ różnych stężeń glifosatu na produkcję RFT w granulocytach stymulowanych fMLP i E.coli (od 20% przy 10µg/ml do 60% przy 0,5µg/ml) Wszystkie badane stężenia zwiększały produkcję wolnych rodników lecz nie zaobserwowano liniowej zależności od dawki (Ryc. 11, Tab. 6, Tab. 7).



Ryc. 11. Wpływ jednogodzinnej inkubacji próbek krwi obwodowej z różnymi stężeniami glifosatu na „wybuch oddechowy” granulocytów indukowany fMLP i E.coli.

Tab. 6. Procentowe zmiany wartości średniego kanału fluorescencji DHR123 w granulocytach stymulowanych fMLP i E.coli w obecności glifosatu.

Stężenia glifosatu [µg/ml]	0	0,01	0,1	0,5	1	5	10
Wartość średniego kanału fluorescencji	12,0	16,7	16,2	19,7	17,7	18,7	14,8
Procent zmian	100,00	137,09	134,85	163,83	146,96	155,67	123,34

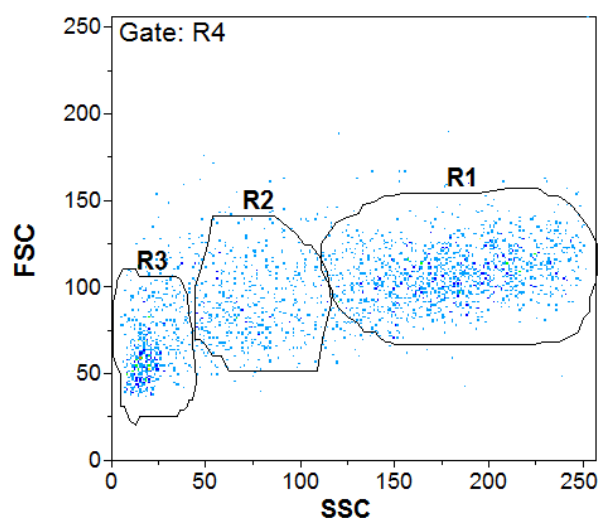
Tab. 7. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w granulocytach stymulowanych fMLP i E.coli.

OGÓŁEM (N=32) stężenie glifosatu [$\mu\text{g/mL}$]	intensywność fluorescencji			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
0	12,06 $\pm$ 7,63	10,60	2,20-36,2	0,0000
0,01	16,74 $\pm$ 9,97	14,60	5,20-48,9	
0,1	16,21 $\pm$ 8,70	14,45	4,50-35,00	
1	17,67 $\pm$ 8,32	17,65	2,60-35,30	

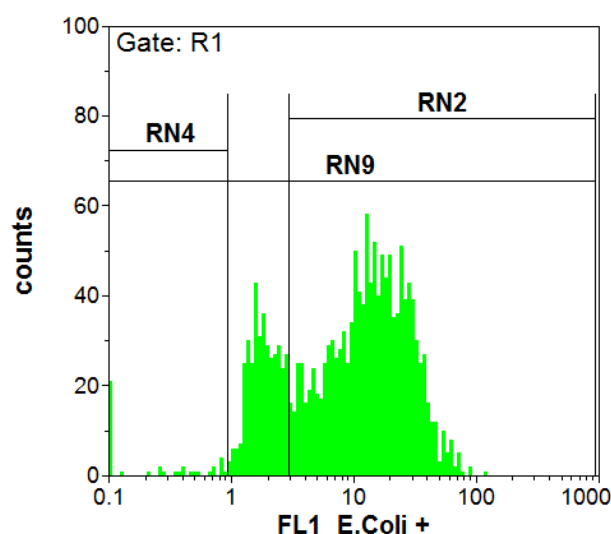
Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana (gdy $p < 0,05$ oznacza statystycznie istotne różnice między porównywanymi grupami stężeń). Wyniki testu post hoc dla testu Friedmana oznaczają, że na pewno stężenie 0 (kontrola) różni się istotnie od pozostałych, a stężenie 0,1 $\mu\text{g/mL}$ prawdopodobnie różni się od 1 $\mu\text{g/mL}$.

4.4. Wpływ glifosatu na aktywność fagocytarną granulocytów

Do oceny aktywności fagocytarnej granulocytów zastosowano metodę cytometrii przepływowej z użyciem zawiesiny opsonizowanych bakterii E. coli znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i roztworu barwiącego DNA (zawartego w zestawie producenta)



Ryc. 12. Cytogram przedstawiający - populacje limfocytów (R3), monocytów (R2) i granulocytów (R1) w próbkach krwi z dodatkiem barwionych komórek E.coli. W analizie używano wyodrębnione bramką populacje granulocytów (R1) krwi obwodowej.



Ryc. 13. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji (średni kanał) w granulocytach, które pochłonęły E.coli.

Jednogodzinna inkubacja pełnej krwi z różnymi stężeniami glifosatu nie zwiększała aktywności fagocytarnej granulocytów. Liczba komórek fagocytujących także nie ulegała zmianie (Tab.8).

Tab. 8. Wpływ różnych stężeń glifosatu na średni kanał fluorescencji w granulocytach fagocytujących bakterie E.coli.

OGÓŁEM (N=10) stężenia glifosatu [µg/mL]	FAGOTEST E.coli			p
	średnia±SD	mediana	min-max	
0	18,91±4,44	19,34	12,66-28,93	0,0687
0,01	16,36±4,05	16,64	9,11-22,77	
0,1	16,89±4,94	16,67	10,44-26,24	
1	18,30±5,38	18,02	10,63-29,97	
10	17,07±4,44	17,19	11,16-23,99	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana (gdy $p < 0,05$ oznacza statystycznie istotne różnice między porównywanymi grupami stężeń).

4.5. Wpływ inkubacji krwi obwodowej z glifosatem na wewnątrzkomórkowe stężenia glutationu

4.5.1. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia glutationu zredukowanego (GSH)

W testach kolorymetrycznych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w stężeniach zredukowanego glutationu w komórkach po jednogodzinnej inkubacji z wybranymi stężeniami glifosatu (Tab. 9, Tab.10).

Tab. 9. Stężenia glutationu (μM) w badanych próbkach krwi

Glifosat [$\mu\text{g/ml}$]	0	0,5	5
Próbka 1 glutation [μM]	0,83	0,77	0,69
Próbka 2 glutation [μM]	4,15	4,35	4,5
Próbka 3 glutation [μM]	4,14	3,53	4,87
Próbka 4 glutation [μM]	4,65	4,01	4,38
Próbka 5 glutation [μM]	4,51	3,96	4,4
Próbka 6 glutation [μM]	5,3	3,89	3,99

Tab. 10. Zmiany stężenia glutationu (μM) w badanych próbkach krwi niestymulowanej

OGÓŁEM (N=6) stężenia glifosatu [$\mu\text{g/ml}$]	GSH - glutation			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
kontrola 0	3,93 $\pm$ 1,58	4,33	0,83-5,30	0,1146
0,5	3,41 $\pm$ 1,32	3,92	0,77-4,35	
5	3,80 $\pm$ 1,55	4,39	0,69-4,87	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p < 0,05$ ozn. statystycznie różnice między porównywanymi grupami stężeń).

4.5.2. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej stymulowanych PMA z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia GSH

W testach kolorymetrycznych stwierdzono różnicę istotną statystycznie w stężeniach zredukowanego glutationu (GSH) w komórkach po jednogodzinnej inkubacji (Tab.11, Tab.12)

Tab. 11. Stężenia glutationu (μM) w badanych próbkach krwi stymulowanej PMA

Glifosat [$\mu\text{g/ml}$]	0	0,5	5
Próbka 1 glutation [μM]	0,7	0,68	0,69
Próbka 2 glutation [μM]	4,41	3,24	3,76
Próbka 3 glutation [μM]	4,2	3,94	4,04
Próbka 4 glutation [μM]	4,52	4,14	4,22
Próbka 5 glutation [μM]	4,16	3,34	3,32
Próbka 6 glutation [μM]	3,83	3,26	3,54

Tab. 12. Zmiany stężenia glutationu (μM) w badanych próbkach krwi stymulowanej PMA

OGÓŁEM (N=6) stężenia glifosatu [$\mu\text{g/ml}$]	Glifosat z PMA			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
kontrola 0	3,64 $\pm$ 1,46	4,18	0,70-4,52	0,0057
0,5	3,10 $\pm$ 1,24	3,30	0,68-4,14	
5	3,26 $\pm$ 1,30	3,65	0,69-4,22	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p < 0,05$ oznacza statystycznie różnice między porównywanymi grupami stężeń). Następnie wykonano test post-hoc Dunna, który wskazuje na statystycznie istotne różnice ($p < 0,01$) między stężeniem 0 (kontrola) a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ oraz stężeniem 0 a 5 $\mu\text{g/ml}$.

4.5.3. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia glutationu utlenionego (GSSG)

W testach kolorymetrycznych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w stężeniach utlenionego glutationu (GSSG) w komórkach po jednogodzinnej inkubacji próbek (Tab.13, Tab.14).

Tab. 13. Stężenia utlenionego glutationu (μM) w badanych próbkach krwi niestymulowanej w różnych stężeniach glifosatu

Glifosat [$\mu\text{g/ml}$]	0	0,5	5
Próbka 1 glutation [μM]	3,97	3,5	3,26
Próbka 2 glutation [μM]	1,08	0,73	0,86
Próbka 3 glutation [μM]	0,78	0,78	0,86
Próbka 4 glutation [μM]	0,97	0,73	0,72
Próbka 5 glutation [μM]	0,31	0,75	0,7

Tab. 14. Zmiany stężenia utlenionego glutationu (μM) w badanych próbkach krwi niestymulowanej

OGÓŁEM (N=5) stężenia glifosatu [$\mu\text{g/ml}$]	GSSG - glutation utleniony			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
kontrola 0	1,42 $\pm$ 1,45	0,97	0,31-3,97	0,6918
0,5	1,29 $\pm$ 1,23	0,75	0,73-3,50	
5	1,28 $\pm$ 1,11	0,86	0,70-3,26	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p>0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice między porównywanymi grupami stężeń).

4.5.4. Wpływ inkubacji próbek krwi obwodowej stymulowanych PMA z wybranymi stężeniami glifosatu na stężenia GSSG

W testach kolorymetrycznych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w stężeniach utlenionego glutationu (GSSG) w komórkach po jednogodzinnej inkubacji próbek (Tab.15, Tab. 16).

Tab. 15. Stężenia utlenionego glutationu (μM) w badanych próbkach krwi stymulowanych PMA w różnych stężeniach glifosatu

Glifosat [$\mu\text{g/ml}$]	0	0,5	5
Próbka 1 glutation [μM]	3,31	3,35	3,36
Próbka 2 glutation [μM]	3,34	2,71	2,64
Próbka 3 glutation [μM]	1,03	0,77	0,81
Próbka 4 glutation [μM]	0,79	0,67	0,81
Próbka 5 glutation [μM]	0,66	0,62	0,67
Próbka 6 glutation [μM]	0,69	0,56	0,6

Tab. 16. Zmiany stężenia glutationu utlenionego (μM) w badanych próbkach krwi stymulowanej PMA

OGÓŁEM (N=6) stężenia glifosatu [$\mu\text{g/ml}$]	GSSG - glutation utleniony			p
	średnia $\pm$ SD	mediana	min-max	
kontrola 0	1,64 $\pm$ 1,32	0,91	0,66-3,34	0,1353
0,5	1,45 $\pm$ 1,25	0,72	0,56-3,35	
5	1,48 $\pm$ 1,20	0,81	0,60-3,36	

Parametry statystyczne oraz wynik testu Friedmana ($p>0,05$ oznacza statystycznie nieistotne różnice między porównywanymi grupami stężeń).

5. Dyskusja

5.1. Stężenia glifosatu w próbkach wody wodociągowej z ujęć na terenie

Wielkopolski

Glifosat został wykryty w wielu próbkach wód zebranych na całym świecie (Masiol i wsp., 2018; Annett i wsp., 2014). Jego występowanie wydaje się być związane z uprawami rolnymi (Van Stempvoort i wsp., 2016; Montiel-León i wsp., 2019), jednak zastosowania pozarolnicze mogą w znacznym stopniu przyczyniać się do obecności glifosatu w wodach powierzchniowych (Poiger i wsp., 2017; Ramwell i wsp., 2014). Ze względu na polarną strukturę glifosatu, niską lotność i małą masę cząsteczkową, pomiar glifosatu w wodzie pitnej (gdzie występuje on w niskich stężeniach) jest trudny (Ibáñez i wsp., 2006). Te cechy cząsteczki oraz brak grup chromoforowych są podstawową przyczyną stosowania derywatyzacji (Martins-Júnior i wsp., 2009), która jest konieczna do uzyskania wysokiej czułości oznaczeń (Arkan i wsp., 2015). W niniejszej pracy wykorzystano dwie techniki analityczne, obie obejmujące derywatyzację mierzonego związku, ale oparte na różnych zasadach: ELISA i HPLC. Wyniki uzyskane w obu metodach są zgodne, co potwierdza dotychczasowe obserwacje (Rubio i wsp., 2003; Lee i wsp., 2002). Stężenia glifosatu w przebadanych próbkach wody wodociągowej były stosunkowo niskie, co najmniej tysiąc razy niższe niż ADI i nie przekraczały $0,33\mu\text{g/L}$ (Kaszkowiak i wsp., 2020).

Woda wodociągowa w gospodarstwach domowych jest wykorzystywana do różnych celów. Powinna więc być również brana pod uwagę jako możliwe źródło skażenia ludzi różnymi patogenami i substancjami chemicznymi. W warunkach domowych woda wodociągowa przed spożyciem może być filtrowana, przegotowywana lub zamrożona. W przeprowadzonych do celów standaryzacji pomiarach, stężenie glifosatu w roztworach wzorcowych nie ulegało zmianom w wyniku zamrażania i rozmrażania, gotowania i autoklawowania próbek, co jest zgodne z obserwacjami podwyższonego poziomu glifosatu w moczu osób, które przypuszczalnie parzyły herbatę ze skażonych liści (Stephenson i Harris, 2016). Ponieważ związek ten nie był usuwany również za pomocą domowych systemów filtracji wody, zatem tak przygotowane płyny mogą zawierać śladowe ilości glifosatu.

5.2. Wybór układu doświadczalnego

Badania nad wpływem glifosatu na organizmy zwierzęce są prowadzone w różnych układach eksperymentalnych. Używane w nich są zarówno zwierzęta, jak i linie komórkowe różnego pochodzenia, także ludzkie. Pewną część doświadczeń przeprowadzono na organizmach modelowych, takich jak nicienie *Caenorhabditis elegans* (Kronberg i wsp., 2018; Burchfield i wsp., 2019), wywilżna karłowata *Drosophila melanogaster* (muszka owocowa) (de Aguiar i wsp., 2016) czy danio pręgowany *Danio rerio* (Faria i wsp., 2021), a także na morskich bezkręgowcach (Matozzo i wsp., 2020), rybach słono- i słodkowodnych (Uren Webster i wsp., 2015; Kreutz i wsp., 2011; Richard i wsp., 2014) czy żółwiach słodkowodnych (Héritier i wsp., 2017). Doświadczenia na zwierzętach wodnych, podobnie jak na komórkach linii ciągłych dostarczają cennych danych, gdyż prowadzone są one w warunkach stałej środowiskowej ekspozycji na ten związek. Ocena potencjalnej szkodliwości glifosatu dla ludzi opiera się jednak na badaniach z wykorzystaniem standardowych zwierząt laboratoryjnych: myszy i szczurów (np. Portier, 2020; Ford i wsp., 2017; Kubsad i wsp., 2019; Williams i wsp., 2016b). Badania takie, podobnie jak badania na liniach komórkowych, dotyczyły jednak populacji homogennych genetycznie, podczas gdy osobnicza reakcja na działanie glifosatu w populacji ludzkiej może być zmienna. W nielicznych przypadkach używano prawidłowych ludzkich komórek, przy czym najczęściej były to izolowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (Kwiatkowska i wsp., 2017; Kwiatkowska i wsp., 2020; Nagy i wsp., 2019; Woźniak i wsp., 2021; Martínez i wsp., 2007). Ludzka krew pełna była rzadko wykorzystywana w takich badaniach (De Almeida i wsp., 2018; Nagy i wsp., 2021; Santovito i wsp., 2018), chociaż przyjmuje się, że taki model lepiej odzwierciedla interakcje *in vivo*, gdzie większa różnorodność komórek odpornościowych może wpływać na wielkość i szybkość odpowiedzi na badaną substancję (Duramad i wsp., 2006). W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu glifosatu na ludzkie leukocyty w próbkach pełnej krwi obwodowej pobranych od różnych osób, gdyż taki układ wydaje się lepiej odzwierciedlać możliwe oddziaływanie tego preparatu na ludzi w naturalnym środowisku życia.

Działanie glifosatu na komórki ludzkie badano analizując wpływ różnych stężeń tego związku przy różnych czasach inkubacji. W doświadczeniach na ludzkich komórkach krwi obwodowej zakres badanych stężeń w używanych podłożach wynosił od 0.0125mg/L do ok. 1,7mg/L, a czas inkubacji od 4 do 96 godzin (Martínez i wsp., 2007; Kwiatkowska i wsp., 2017; Kwiatkowska i wsp., 2020; Nagy i wsp., 2019;

Kwiatkowska i wsp., 2016; Woźniak i wsp., 2018; Santovito i wsp., 2018). Komórki ludzkich linii ustalonych różnego pochodzenia jak Caco-2, HepG2, HEK293, JEG3, A549, SH-SY5Y czy TR146 inkubowano w mediach hodowlanych o stężeniach tego preparatu od 200mg/L do 10g/L w czasie od 20 min. do 24 godzin (Gildea i wsp., 2017; Mesnage i wsp., 2013; Koller i wsp., 2012; Hao i wsp., 2019).

Zgodnie z Dyrektywą Rady 98/83/WE w Unii Europejskiej maksymalne stężenie jakiegokolwiek pestycydu w wodzie pitnej nie powinno przekraczać 0.1µg/L (Council Directive, 1998), natomiast dopuszczalne dzienne spożycie (ADI) dla ludzi zostało ustalone na poziomie 0,5mg/kg masy ciała (EFSA, 2016). W niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ glifosatu w relatywnie niskich stężeniach od 0.01mg/L = 0,06µM do 10mg/L = 59µM, zbliżonych do dopuszczonych w normach Unii Europejskiej. Biorąc pod uwagę biologiczny czas półtrwania glifosatu w organizmie ludzkim, szacowany na 3 do 10 godzin (Faniband i wsp., 2021; Connolly i wsp., 2019; Zoller i wsp., 2020), zdecydowano się na krótką, jednogodziną inkubację z tym związkiem. Było to istotne z tego względu, że przeciętny czas życia granulocytów, będących głównym obiektem badań w niniejszej pracy, w krwiobiegu jest szacowany na 5 do 8 godzin, a po izolacji dochodzi szybko do ich apoptozy (Bekkering i Torensma, 2013; Blanter i wsp., 2021), choć istnieją obserwacje, że granulocyty *in vivo* żyją we krwi znacznie dłużej (Bekkering i Torensma, 2013).

5.3. Toksyczność glifosatu dla komórek ludzkich

Potencjalna toksyczność glifosatu dla komórek różnego pochodzenia była oceniana w wielu badaniach (Mesnage i wsp., 2015; Mesnage i wsp., 2013; De Almeida i wsp., 2018). W niniejszej pracy poddano analizie wpływ glifosatu w stężeniach od 0,01µg/ml (~0,06µM) do 10µg/ml (59µM) na żywotność leukocytów krwi obwodowej. W tym celu zastosowano standardową metodę cytometrii przepływowej, z użyciem sondy FLICA do oceny apoptozy i jodku propidionowego do pomiaru odsetka komórek martwych (Faria i wsp., 2021). Godzinna inkubacja próbek krwi z badanymi roztworami glifosatu nie powodowała statystycznie istotnych zmian odsetka leukocytów apoptotycznych czy nekrotycznych w badanym materiale (Tab. 2, Tab.3, Ryc 2, Ryc. 3, Ryc. 4). Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy nie stwierdzali toksycznego działania niskich dawek glifosatu na komórki ludzkie. W przypadkach inkubacji izolowanych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) przez 4 godziny w temp. 37°C takiego efektu nie zaobserwowano przy stężeniach do 1mM i 5mM, stosując odpowiednio

techniki mikroskopii fluorescencyjnej (Nagy i wsp., 2019) i cytometrii przepływowej (Kwiatkowska i wsp., 2016), chociaż możliwość słabego toksycznego działania tego związku stwierdzono przy stężeniach 0,5mM i wyższych, stosując także metodę cytometrii przepływowej (Kwiatkowska i wsp., 2020). Różnice te mogły być spowodowane użyciem w tych badaniach różnych sond fluorescencyjnych do znakowania martwych komórek – kalceiny (Calcein AM) (Nagy i wsp., 2019; Kwiatkowska i wsp., 2016) lub żółcieni oksazolowej (YO-PRO-1) (Kwiatkowska i wsp., 2020). Barwienia błękitem trypanu, który umożliwia identyfikację martwych komórek, nie wykazały toksycznego działania glifosatu na PBMC, w warunkach inkubacji przez 24 godz. w roztworach o stężeniach do 100µg/ml (Martínez i wsp., 2007) lub 1mM (Woźniak i wsp., 2018), natomiast w cytometrii przepływowej przy stężeniach do 5mM (Kwiatkowska i wsp., 2016). W kontrolnych eksperymentach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy sprawdzono także wpływ dłuższej, 72 godzinnej inkubacji z glifosatem na komórki krwi obwodowej. W tym celu założono hodowle izolowanych komórek jednojądrzastych, niestymulowanych lub stymulowanych fitohemaglutyniną w podłożu zawierającym 10µg/ml glifosatu. Oznaczenie żywotności komórek testem MTT nie wykazało różnic pomiędzy hodowlami z dodatkiem tego związku, a kontrolami bez glifosatu. Inni autorzy, stosując taki sam test w przypadku komórek pełnej krwi (nierozdzielanych) inkubowanych z glifosatem przez 18 godzin zaobserwowali natomiast minimalny wpływ tego związku przy stężeniach 0,1µg/ml i 0,7µg/ml, ale znaczące zmniejszenie żywotności komórek przy stężeniach 10µg/ml i 50µg/ml i zupełny brak toksycznego działania przy stężeniu 500µg/ml w porównaniu z kontrolą (De Almeida i wsp., 2018).

Pewnym wyjaśnieniem rozbieżności, oprócz różnic w układach doświadczalnych, może być sama procedura użycia standardowego testu MTT, opartego na redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu. Mierzy on bowiem cytotoksyczność na podstawie oceny aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej, która może reagować bezpośrednio z glifosatem (Ugarte, 2014). Przedstawione dane literaturowe i otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, że przy użytych w doświadczeniach parametrach: czasie inkubacji i stężeniu badanego związku nie powinno dochodzić do apoptozy ani nekrozy w badanych jądrzastych komórkach krwi.

5.4. Produkcja wolnych rodników przez spoczynkowe neutrofile krwi obwodowej inkubowane z glifosatem

Jednym z wykładników, używanych w badaniach nad wpływem glifosatu na równowagę oksydoredukcyjną w organizmach zwierząt, była produkcja reaktywnych pochodnych tlenowych [RFT]. Wyniki badań w tym zakresie przeprowadzone na szczurach nie są jednoznaczne, m.in. ze względu na różnorodność stosowanych metod analitycznych. Doustne podanie glifosatu w dawkach dziennych od 0,5 do 10mg/kg masy ciała przez okres 28 dni nie powodowało zmiany stężeń RFT w osoczu krwi zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną (Milić i wsp., 2018), z kolei przy stosowaniu dawek dziennych 50 i 500mg/kg podawanych przez 5 tygodni zaobserwowano wzrost stężenia nadtlenu wodoru (H₂O₂) w surowicy i homogenatach komórek wątroby (Tang i wsp., 2017). Aplikowanie zwierzętom tego herbicydu w dawce 50mg/kg drogą dootrzewną zwiększało o 50% zawartość nadtlenu w hepatocytach (Soudani i wsp., 2019). W świetle tych danych można przyjąć, że glifosat może indukować produkcję RFT w tkankach zwierzęcych.

W doświadczeniach przeprowadzanych na ludzkich liniach komórkowych i izolowanych komórkach krwi uzyskano także rozbieżne wyniki. Inkubacja komórek linii neuroblastoma SH-SY5Y w medium z dodatkiem 5mM glifosatu powodowała ok. 25% wzrost poziomu RFT po 48 godzinach (Martínez i wsp., 2020). W 24 godzinnych hodowlach ludzkiej linii komórek naskórka HaCaT obecność w podłożu tego herbicydu w stężeniach do 0,1mM stymulowała produkcję RFT prawie dwukrotnie (George i Shukla, 2013). Odsetek tych komórek wykazujących obecność H₂O₂ wzrastał z 10% do ok. 80% po 6 i 18 godz. inkubacji z 15, 20, 30 i 45mM roztworami glifosatu (Heu i wsp., 2012).

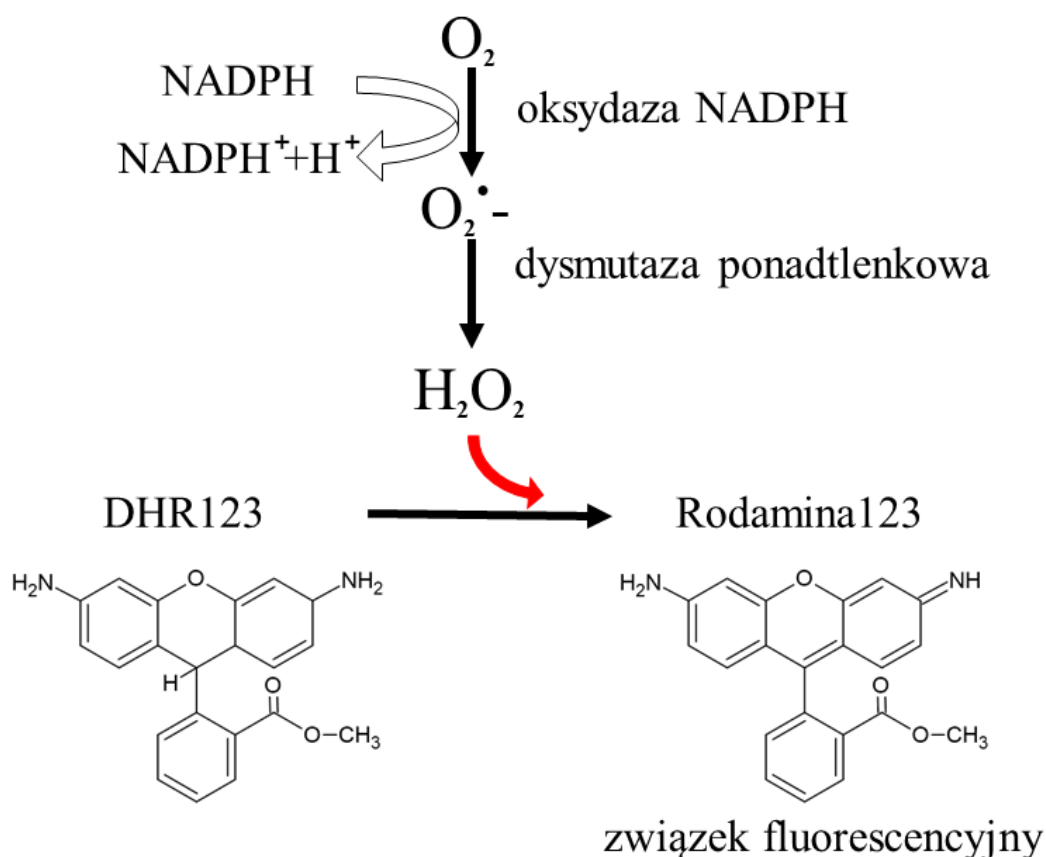
Inkubacja próbek krwi przez 1 godzinę z glifosatem w stężeniach 0.01µg/ml, 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml czyli od ~0,06µM do 59µM nie zwiększała, oznaczanych przy pomocy barwnika fluorescencyjnego dihydrorodaminy 123 (DHR123), produkcji reaktywnych pochodnych tlenowych (RFT) w granulocytach (Ryc. 5, Ryc. 6, Tab. 4). Jest to zgodne z badaniami innych autorów, którzy obserwowali wzrost zawartości RFT w komórkach jednojądrzastych po 4 lub po 24 godzinach inkubacji z glifosatem w stężeniu powyżej 0,25mM (Kwiatkowska i wsp., 2020; Woźniak i wsp., 2018). Ze względu na różnice w wynikach, uzyskane w tych samych doświadczeniach przy zastosowaniu fluorochromów różniących się powinowactwem do RFT (DCFH - diocetandichlorodihydrofluoresceiny i HPF - 3-(p-hydroksyfenylo)- fluoresceina), można

wnioskować, że zwiększeniu ulega wytwarzanie nadtlenku wodoru (H_2O_2) i rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$). W przypadku ludzkich erytrocytów jednogodzinna inkubacja z glifosatem w stężeniach powyżej 0,25mM powodowała wzrost produkcji RFT, co wykrywano przy użyciu DHR123 (Kwiatkowska i wsp., 2014).

Wyniki badań na ludzkich liniach komórkowych dawały podobne wyniki. Krótkotrwała inkubacja (0.5 godz.) komórek ludzkiej linii naskórka HaCaT z 30mM roztworem glifosatu nie powodowała zmian w wewnątrzkomórkowych stężeniach RFT (Heu i wsp., 2012). Wzrostu stężenia RFT nie zaobserwowano w przypadku linii ludzkich komórek wątrobiaka HepG2 po 4 godzinach inkubacji z tym herbicydem w stężeniach od 0,5µg/mL do 3,5µg/mL (Kašuba i wsp., 2017).

5.5. Wpływ glifosatu na wytwarzanie wolnych rodników przez neutrofile stymulowane PMA bądź fMLP i E. coli

W badaniach postanowiono sprawdzić wpływ niskich stężeń glifosatu na wytwarzanie RFT w granulocytach stymulowanych fMLP lub PMA. fMLF wiąże się ze specyficznym receptorem formylopeptydowym i stymuluje kaskady sygnałowe w komórce, a PMA przenika błony plazmatyczne i bezpośrednio aktywuje kinazy białkowe C (PKC), analogicznie do diacylglicerolu. Obydwa te związki indukują w neutrofilach produkcję anionorodnika nadadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$ (Kobayashi i wsp., 2005), który ulega dysmutacji do nadttlenku wodoru - H_2O_2 (Rutkowski i wsp., 2007). Do wykrywania zmian w poziomie tego nadttlenku używano wykazującą duże powinowactwo do niego, dihydrorodaminę 123 (Price i Kessel, 2010; Walrand i wsp., 2003).



Ryc. 14. Schemat oznaczania H_2O_2 przy użyciu dihydrorodaminy 123.

Zwiększone wytwarzanie RFT przez neutrofile pod wpływem czynników zewnętrznych jest jednym z kluczowych mechanizmów, zapewniających obronę organizmu przed szybko namnażającymi się i inwazyjnymi bakteriami, jak *Strepto-* i *Staphylococcus* sp. Neutrofile wykazują szczególną aktywność w ognisku zakażenia, gdzie rozpoznają czynnik indukujący proces zapalny. Docierają one do miejsca zapalnego na zasadzie chemotaksji, wędrując z łożyska naczyniowego przez warstwę śródbłonną w stronę wzrastającego stężenia czynnika chemotaktycznego. Z takich czynników, powstających w procesie zapalnym, duże znaczenie mają peptydy, uwalniane w toku aktywacji dopełniacza i układu krzepnięcia oraz chemokiny produkowane przez liczne komórki ustroju. Niektóre związki, wytwarzane przez drobnoustroje, jak np. peptydy zawierające reszty N-formylo-metioninowe także powodują ukierunkowaną wędrówkę fagocytów (Bekkering i Torensma, 2013).

W wyniku zetknięcia się obcej cząstki z błoną komórkową fagocyta następuje uruchomienie elementów kurczliwych protoplazmy, co zapoczątkowuje fazę pochłaniania (endocytozę). Fagocyt tworzy wypustki (pseudopodia), które otaczają cząstkę, prowadząc stopniowo do jej całkowitego pochłonięcia. Po zamknięciu wakuoli fagocytarnej następuje aktywacja oksydazy NADPH. Uruchomiony zostaje wtedy proces, nazywany tzw. "wybuchem oddechowym" - "eksplozją tlenową" - (oxidative burst), w wyniku którego powstaje duża ilość anionów nadtlennokowych $O_2^{\cdot-}$ i nadtlenu wodoru (H_2O_2), uwalnianych do fagosomów. Z fagosomem łączą się ziarnistości azurofilne neutrofilów, uwalniające mieloperoksydazę (MPO), a to w obecności jonów chloru prowadzi do powstania chloraminy (poprzez podchloryny), działającej zabójczo na bakterie i wirusy. Związki te, poza bezpośrednim udziałem w niszczeniu drobnoustrojów (tzw. zabijanie zależne od tlenu), kontrolują procesy proteolityczne w fagosomach, zabezpieczając potencjał redoks wewnętrznego środowiska w tych organellach.

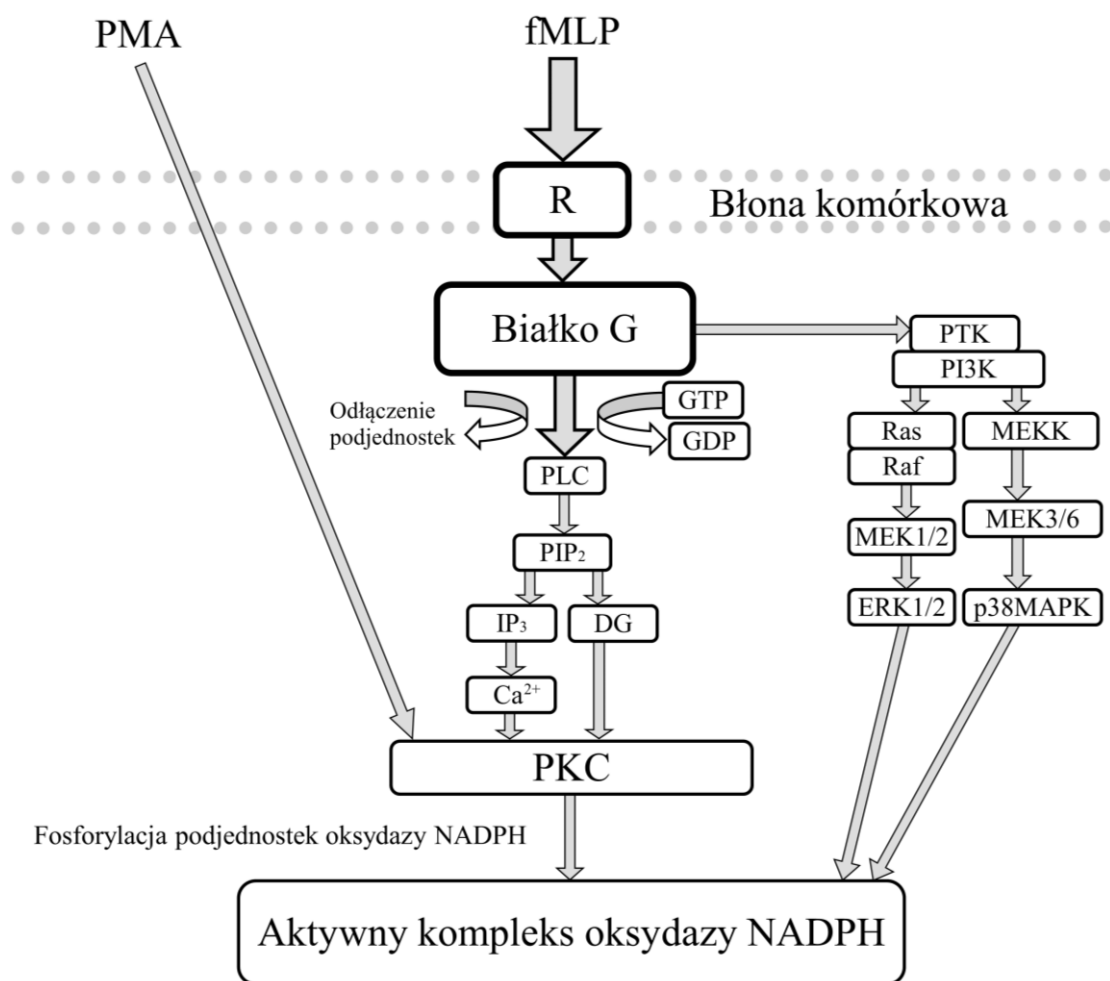
Reaktywne formy tlenu (RFT) są pierwotnie generowane przez zaktywowany kompleks oksydazy NADPH - oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase, Nox2). W jego skład wchodzi błonowy flavocytochrom b558 (zbudowany z dwóch podjednostek gp-91phox i p-22phox) do którego dołączają składowe magazynowane w cytozolu: p47phox, p67phox, p40phox (phox-phagocyte oxydase). W reakcjach udział biorą także dwa niskocząsteczkowe kofaktory - Rac-2 występujący w cytozolu i Rap-1A występujący w formie rozpuszczalnej i błonowej. Zaktywowany kompleks katalizuje

redukcję tlenu, w wyniku czego powstaje anionorodnik nadadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$, który w reakcji dysproporcjonowania (dysmutacji) przechodzi w nadtlenek wodoru (Rutkowski i wsp., 2007).

Jednym z kluczowych procesów w aktywacji oksydazy NADPH jest fosforylacja jej podjednostek przez odpowiednie kinazy. Wiązanie bakteryjnego oligopeptydu N-formylometionino-leucylo-feniloalaniny (fMLF, fMLP, N-formylo-met-leu-phe) ze swoistym receptorem indukuje transdukcję sygnału przez błonę plazmatyczną za pośrednictwem rodziny małych heterotrimerycznych białek G, które są aktywowane poprzez wymianę związanego difosforanu guanozyny (GDP) na trifosforan guanozyny (GTP). Białka G aktywują szereg enzymów: fosfolipazę C (PLC), fosfolipazę A₂ (PLA₂), fosfolipazę D (PLD) i białkowe kinazy tyrozynowe, co uruchamia kaskady sygnalizacyjne we wnętrzu komórki.

Fosfolipaza C rozszczepia 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₂) na diacyloglicerol (DG) i trifosforan inozytolu (IP₃). DG aktywuje kinazy białkowe z rodziny PKC, natomiast IP₃ stymuluje uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych, co także wywiera wpływ na aktywność oksydazy NADPH.

Aktywacja PLD prowadzi do produkcji kwasu fosfatydowego (PA) z fosfatydylocholiny, który może aktywować kinazy białkowe, m.in. PKC. Zaktywowana PLA₂ hydrolizuje glicerolofosfolipidy uwalniając wolne kwasy tłuszczowe (KT), w tym kwas arachidonowy (KA), który może uczestniczyć w aktywacji PKC lub bezpośrednio aktywować oksydazę NADPH. Stymulacja neutrofilów przez fMLF wpływa na działanie innych kinaz białkowych, takich jak PKA, AKT i kinaz MAP (MAPK). (Sarniak i wsp., 2016; Belambri i wsp., 2018; Thomas, 2017)



Ryc. 15. Schemat szlaków aktywacji oksydazy NADPH w komórce (wg Sarniak i wsp., 2016; Belambri i wsp., 2018, zmodyfikowane)

DG - diacyloglicerol; ERK - kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym

IP₃ - trifosforan inozytolu

MAPK - kinaza białkowa aktywowana mitogenem

PI3K - kinaza fosfatydylo-3-inozytolu

PIP₂ - 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu

PKC - kinaza białkowa C

PLC - fosfolipaza C

PTK- białkowa kinaza tyrozynowa

R – receptor błonowy

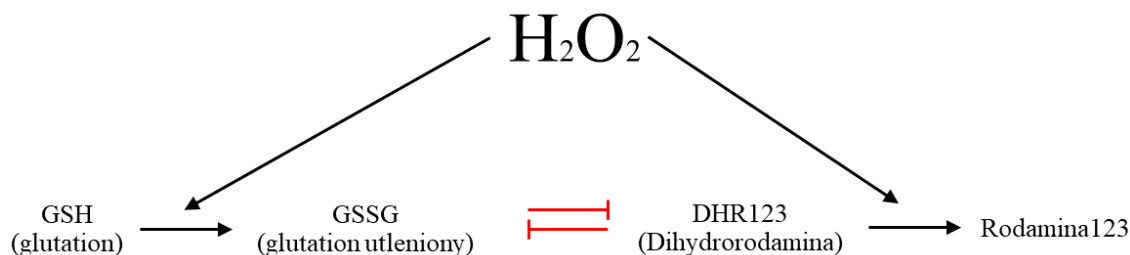
Raf - białko RAF, kinaza serynowo-treoninowa

Ras – białko RAS

W niniejszej pracy do oceny wielkości produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) przez granulocyty stymulowane fMLF lub PMA zastosowano metodę cytometrii przepływowej z użyciem dihydrorodaminy 123 (DHR123). W odróżnieniu od konwencjonalnych technik ilościowych, mierzących średnią wartość produkcji RFT przez całe populacje komórek, w cytometrii przepływowej mierzona jest zawartość RFT w pojedynczych komórkach, co pozwala na określenie funkcjonalnych zmian w obrębie określonych subpopulacji. DHR123 swobodnie przenika przez błonę komórkową, a po utlenieniu do rodaminy 123, emituje wyraźny sygnał fluorescencyjny. Barwnik ten reaguje z $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 jedynie w obecności enzymatycznego katalizatora (peroksydazy) (Wardman, 2007). Rodamina 123 ma charakter lipofilowy, wiąże się z błonami komórkowymi i mitochondrialnymi, więc źródło sygnału fluorescencyjnego pozostaje wewnątrz komórki. Ponieważ anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru wykazują długi okres półtrwania i stosunkowo niską reaktywność, ten sposób oznaczania stężenia RFT w granulocytach jest na tyle wiarygodny, że stosuje się go w rutynowej diagnostyce immunologicznej (Elbim i Lizard, 2009).

W przeprowadzonych doświadczeniach obecność glifosatu w badanych stężeniach nie wpływała na wielkość wybuchu oddechowego w granulocytach stymulowanych PMA, natomiast zwiększała wytwarzanie RFT w granulocytach stymulowanych fMLP. (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Ryc. 7, Ryc. 8, Ryc. 9, Ryc. 10, Ryc. 11). Nie wydaje się, aby taki wzrost był związany z zakłóceniami szlaków wewnątrzkomórkowych prowadzących do aktywacji kinazy PKC. Glifosat nie wpływa bowiem na wytwarzanie RFT w granulocytach pobudzonych przez PMA, który aktywuje PKC podobnie jak diacylglicerol, natomiast szlak prowadzący przez trifosforan inozytolu wiąże się z uwalnianiem wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Sygnały Ca^{2+} kontrolują wiele szlaków, a podwyższenie poziomu $[Ca^{2+}]$ wywiera wpływ na aktywność oksydazy NADPH (Bréchar d i wsp., 2013). Jednak chelatujące właściwości glifosatu (Mertens i wsp., 2018) mogą zapobiegać wzrostowi stężenia dostępnych jonów wapnia, co w efekcie powinno zahamować ten szlak sygnałowy. Różną podatność na zakłócenia szlaków sygnałowych stymulowanych przez PMA lub fMLP w granulocytach zaobserwowano także u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek. Nie obserwowano różnicy w wybuchu oksydacyjnym stymulowanym przez bezpośrednią aktywację kinazy białkowej C za pomocą PMA, ale wybuch indukowany *Staphylococcus aureus* i fMLP był znacząco zwiększony (Ward i McLeish, 1995).

Niemniej, w przeprowadzonych własnych doświadczeniach podjęto próbę wykluczenia innych mechanizmów, które mogłyby powodować zwiększenie fluorescencji DHR123 w granulocytach stymulowanych fMLP i *E. coli*. Wzięto pod uwagę możliwość zwiększenia aktywności fagocytarnej komórek pod wpływem glifosatu (co mogłoby skutkować zwiększonym wytwarzaniem RFT) bądź zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, będącego silnym antyoksydantem (co zwiększałoby dostępność RFT dla DHR123).



Ryc. 16. Schemat przemian H_2O_2 wewnątrz badanych komórek w wykonywanych doświadczeniach.

5.6. Wpływ glifosatu na aktywność fagocytarną neutrofilów

W testach cytometrycznych oceniających wielkość fagocytozy *E. coli* przez granulocyty stwierdzono obniżenie ilości fagocytowanych komórek bakteryjnych, zwłaszcza przy stężeniu glifosatu $0,01\mu\text{g/ml}$ (Tab. 8, Ryc. 12, Ryc. 13). Publikacje dotyczące wpływu tego związku na aktywność fagocytarną u kręgowców są nieliczne, w większości dotyczą układu immunologicznego ryb (Sopińska i wsp., 2000; Peillex i wsp., 2020). Wyniki tych badań wskazują, że narażenie na ten związek może prowadzić do zmniejszonej fagocytozy, podobnie do zaobserwowanych w przeprowadzonych eksperymentach (Tab. 8). Pozwala to na przypuszczenie, że zmiany związane z wpływem glifosatu na fagocytozę nie wpływają istotnie na wytwarzanie RFT przez granulocyty.

5.7. Wpływ glifosatu na wewnątrzkomórkowe stężenia glutationu

Przedstawione w wynikach zwiększenie fluorescencji DHR123 w granulocytach stymulowanych fMLP i *E. coli* mogło też być spowodowane zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, będącego silnym antyoksydantem (co zwiększałoby dostępność RFT dla DHR123).

Niekorzystny wpływ glifosatu na stan zdrowia zwierząt jest bardzo często wiązany z indukcją stresu oksydacyjnego. Co więcej, w przypadkach przewlekłej ekspozycji stres taki nie musi być związany z uszkodzeniami genetycznym czy zaburzeniami wszystkich naturalnych mechanizmów antyoksydacyjnych. Zmiany stanu równowagi pomiędzy stężeniem antyoksydantów i wolnych rodników w organizmie mogą występować zarówno na poziomie komórki, jak i całego organizmu. Pojawienie się stresu oddechowego po kontakcie z glifosatem obserwowano w organizmach wielu gatunków zwierząt laboratoryjnych, należących do różnych grup systematycznych.

Poddanie nicienia *Caenorhabditis elegans* zarówno przewlekłej (24 godz.) (Bailey i wsp., 2018) jak i krótkiej (30 min) (Burchfield i wsp., 2019) ekspozycji na zawierający glifosat herbicyd prowadzi do uszkodzenia mitochondriów i produkcji nadtlenu wodoru. Zwiększenie produkcji RFT i aktywację odpowiedzi na stres oksydacyjny także zaobserwowano u tych nicieni w ciągu 16 godzin po kontakcie z glifosatem (Kronberg i wsp., 2018). Z kolei u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* glifosat pobierany z pokarmem wpływał na zwiększenie ekspresji genów związanych z mechanizmami obrony antyoksydacyjnej już po 24 godzinach (de Aguiar i wsp., 2016).

Zwiększenie akumulacji reaktywnych form tlenu pod wpływem glifosatu stwierdzono u myszy (Yahfoufi i wsp., 2020) i szczurów (Yahfoufi i wsp., 2020; Soudani i wsp., 2019), a wykładniki stresu oksydacyjnego obserwowano u szczurów, zarówno po podaniu tego związku doustnie (Milić i wsp., 2018; Cattani i wsp., 2017) jak i dootrzewnowo (El-Shenawy i wsp., 2009).

Jednym z najważniejszych związków hydrofilowych, chroniących komórki przed toksycznym działaniem RFT jest glutation (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicyna, GSH), niezbędny w wielu procesach związanych z utrzymaniem i regulacją stanu redoks w organizmie. GSH na drodze bezpośrednich reakcji ze związkami elektrofilowymi, np. wolnymi rodnikami przechodzi w formę utlenioną, disulfid glutationu (GSSG) (Aquilano i wsp., 2014).

W wielu publikacjach opisano zmiany stężenia GSH u zwierząt narażonych na działanie glifosatu. U szczurów, którym dootrzewnowo podawano subletalne dawki glifosatu (135mg/kg m.c.) przez 2 tygodnie co 2 dni, doszło do 30% redukcji wątrobowych stężeń glutationu (El-Shenawy i wsp., 2009). Podobne zmiany u szczurów wywoływała niższa dawka (50mg/kg m.c.), aplikowana w identyczny sposób (Soudani i wsp., 2019). Taka sama dawka podawana szczurom doustnie przez dłuższy czas (5 tygodni) silnie zmniejszała poziom glutationu w nerkach (Tang i wsp., 2017). Użycie w

badaniach na tych zwierzętach preparatu Roundup w doustnej dawce dziennej 270 mg/kg m.c. przez okres 1 miesiąca powodowała obniżenie stężenia GSH w wątrobie i nerkach o ok. 20% (Djaber i wsp., 2020). Preparaty roślinobójcze zawierające glifosat podawane szczurom w karmie codziennie przez 8 tygodni w ilości 375mg/kg m.c znacząco obniżały poziom GSH we krwi pełnej, mózgu, sercu, wątrobie i nerkach (Turkmen i wsp., 2019). Z kolei u szczurów, którym podawano w wodzie glifosat (Larsen i wsp., 2012) lub handlowo dostępny herbicyd na bazie tego związku (Larsen i wsp., 2014) w stężeniach 0,7mg/L i 7mg/L przez 90 dni, zaobserwowano zwiększony poziom zredukowanego glutationu (GSH) i zwiększoną aktywność peroksydazy glutationowej (GPx), co może być interpretowane jako mechanizm ochronny przed możliwym szkodliwym działaniem tego herbicydu na organizmy zwierzęce.

O możliwym wpływie glifosatu na równowagę redox u ludzi można wnioskować na podstawie wyników badań na liniach komórkowych ludzkiego pochodzenia. Niestety, obserwacje takie są nieliczne i dotyczą różnych rodzajów komórek. W pochodzących z nabłonka gruczołu krokowego komórkach WPM-Y.1 (Abdel-Halim i Osman, 2020) i linii keratynocytów człowieka HaCaT (Gehin i wsp., 2006) ekspozycja odpowiednio na roztwór 0,025mM lub 10mM glifosatu powodowała istotny spadek zawartości glutationu. Zmian takich nie obserwowano w przypadkach 4 i 24 godzinnej inkubacji komórek ludzkiego wątrobiaka HepG2 w medium o stężeniu tego herbicydu do 1mg/L (Hultberg, 2007) lub 3,5mg/L (Kašuba i wsp., 2017), a nawet, w pewnych przypadkach, zaobserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia GSH (Chaufan i wsp., 2014).

Zmiany stężeń wewnątrzkomórkowych form glutationu mogą powodować śmierć komórek na różnych drogach (Franco i Cidlowski, 2009; De Nicola i Ghibelli, 2014; Sun i wsp., 2018), więc w pilotowych doświadczeniach postanowiono sprawdzić wpływ dodania roztworów glifosatu o wybranych stężeniach na zawartość glutationu w próbkach krwi obwodowej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian poziomu glutationu (GSH) jak też utlenionego glutationu (GSSG) w spoczynkowych komórkach krwi po jednogodzinnej inkubacji z roztworami glifosatu o stężeniu 0,05µg/mL i 0,5µg/mL. Niemniej, w obu przypadkach średnie poziomy obu form glutationu były nieznacznie niższe niż w kontroli (Tab. 9, Tab. 10, Tab. 13, Tab. 14). W próbkach krwi, które stymulowano PMA zaobserwowano, podobne jak w komórkach niestymulowanych, zmiany w poziomach GSH i GSSG. Użycie w tym przypadku glifosatu w stężeniu 0,5µg/mL powodowało istotnie statystycznie obniżenie stężenia GSH (Tab. 11, Tab. 12,

Tab. 15, Tab. 16). Uzyskane wyniki są zgodne z większością publikacji dotyczących tego zagadnienia.

Niska istotność statystyczna prawdopodobnie odzwierciedla małą liczbę wykonanych doświadczeń, które zostały przerwane z przyczyn technicznych. Niemniej, ponieważ zarówno w próbkach stymulowanych PMA (aktywującego PKC i wybuch oddechowy), jak i w próbkach niestymulowanych zmniejszeniu uległy stężenia obu form glutationu – zredukowanej i utlenionej, należy sądzić, że za to zjawisko nie odpowiada neutralizacja nadtlenu wodoru. W takich bowiem przypadkach spadkowi stężenia GSH powinien towarzyszyć wzrost stężenia GSSH, które jednak także uległo obniżeniu. Wydaje się, że taki wpływ glifosatu jest związany z zakłóceniem innych procesów metabolicznych w komórce, jak np. torów przemiany cysteiny, prekursora syntezy glutationu (Hultberg, 2007). Niemniej, można przyjąć, że zaobserwowana w pracy zwiększona fluorescencja rodaminy 123 w granulocytach stymulowanych fMLP i *E. coli* nie jest związana ze zmianami metabolizmu glutationu w tych komórkach.

5.8. Potencjalne drogi działania glifosatu na komórki ludzkie

Szkodliwość glifosatu dla organizmów zwierzęcych była przedmiotem badań na osobnikach różnych grup systematycznych. W przypadku zwierząt lądowych i ludzi należy brać pod uwagę rozmaite drogi wnikania tego związku: per os (Torretta i wsp., 2018), oddechową (de F Sousa i wsp., 2019; Pierce i wsp., 2020) i transepidermalną (Pierce i wsp., 2020). W przypadku populacji nie narażonych na kontakt z glifosatem z przyczyn zawodowych za najbardziej prawdopodobne można uznać wchłanianie tego związku drogą pokarmową.

Ocena stopnia wchłaniania glifosatu zawartego w pokarmie jest trudna. W badaniach na szczurach oszacowano, że mniej niż 1% z podanej dawki jest zatrzymywana w organizmie, a większość z wchłoniętej dawki zostaje wydalona z moczem (Brewster i wsp., 1991). Jest to zgodne z wynikami obserwacji u ludzi, wskazującymi na biologiczny okres półtrwania tego związku na 3 do 10 godzin (Faniband i wsp., 2021; Zoller i wsp., 2020). Można więc przyjąć, że nawet w przypadkach jednorazowej ekspozycji na wysokie stężenia glifosatu jego poziom w organizmie szybko ulegnie znaczącemu zmniejszeniu. Narażenie na ciągły kontakt z tym herbicydem w żywności czy wodzie, może jednak skutkować utrzymywaniem się stałego, choć bardzo niskiego poziomu glifosatu w organizmie.

Możliwość szkodliwego wpływu niskich dawek (niższych niż dopuszczalne dla ludzi) była przedmiotem badań na zwierzętach laboratoryjnych. U szczurów, którym przez dłuższy czas podawano 45ng/L glifosatu (0,1ppb preparatu Roundup) w wodzie pitnej lub 0,09 do 4,87mg/kg wagi ciała/dzień zaobserwowano uszkodzenia wątroby (Mesnage i wsp., 2015). Badania te, podobnie jak badania na liniach komórkowych, obarczone są pewną wadą. Komórki zarówno zwierząt laboratoryjnych jak i linii ustalonych mają wyselekcjonowane w czasie hodowli genomy, które mogą wykazywać różnice w reaktywności na ksenobiotyki. Bardziej odpowiadające warunkom naturalnym wydają się być modele *ex vivo*, wykorzystujące pobrane narządy lub ich fragmenty. W takich układach można dokładniej określić wpływ krótkiego działania glifosatu na wybrane tkanki, niż w przypadku całych organizmów zwierzęcych, gdzie występują mechanizmy homeostazy ogólnoustrojowej. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach na pełnej krwi stwierdzono wyraźny wpływ tego herbicydu na granulocyty krwi obwodowej stymulowane fMLP i *E. coli*. Przykładem znaczenia badań *ex vivo* może być model wykorzystujący izolowane wycinki przewodu pokarmowego szczura. Inkubacja takich wycinków w roztworach glifosatu o stężeniach 0,014; 0,34 i 1,7g/l (pH 7,35) wyraźnie zaburzała aktywność mięśniówki w przypadku wszystkich zastosowanych stężeń substancji badanej (Chłopecka i wsp., 2014). Tego typu zmian, mogących zaburzać perystaltykę, a więc i dostępność treści pokarmowych nie dostrzeżono w badaniach na zwierzętach.

Drogi wnikania glifosatu do komórek zwierzęcych nie zostały jeszcze opisane. W przypadku bakterii laseczki siennej *Bacillus subtilis* główną drogą wnikania glifosatu jest symporter glutaminianu/asparaginianu (Wicke i wsp., 2019). W pewnej mierze jest to zgodne z obserwacjami, że inkubacja hodowli linii HeLa bądź Hep G2 z tym herbicydem w stężeniach 100µg/L i wyższymi zakłóca transport cysteiny do komórek, gdyż w komórkach zwierzęcych istnieje system transportu przez błonowy cystyna/glutaminian i asparaginian (system XAG) (Hultberg, 2007). Zaobserwowano w niniejszej pracy podobne zmiany wybuchu oddechowego granulocytów inkubowanych z różnymi stężeniami glifosatu (w zakresie od 0,06µM do 59µM), co pozwala sądzić, że związek ten może przechodzić przez błony komórkowe na drodze transportu aktywnego. W komórkach roślinnych przy niskich stężeniach zewnętrznych tego związku (3–250µM) zaobserwowano działanie aktywnego systemu pobierania, który przy wyższych stężeniach był zamaskowany przez dyfuzję bierną (Hetherington i wsp., 1998). W doświadczeniach *in vitro* na ludzkich komórkach linii nabłonka jelitowego, Caco-2, z

użyciem glifosatu znakowanego radioaktywnym izotopem węgla C14, oszacowano ilość miejsc wiążących na 4×10^{11} /komórkę. Związek ten w stężeniach powyżej 10mg/ml (59mM) powodował bardzo duże zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, mierzony transmembranowym oporem elektrycznym (Vasiluk i wsp., 2005).

Wpływ glifosatu na metabolizm komórki roślinnej jest dobrze opisany i znane są jego punkty uchwytu. Słabo udokumentowane sugestie, że związek ten, polarna pochodna glicyny (N-fosfonometyloglicyna) może wbudowywać się w białka w miejsce glicyny (Samsel i Seneff, 2016) zostały wykluczone w badaniach eksperymentalnych (Antoniou i wsp., 2019). Zaobserwowano natomiast, że *in vivo* w organizmach zwierzęcych (u myszy) glifosat może być metabolizowany do reaktywnego metabolitu, glioksylanu, który hamuje aktywność białek uczestniczących w metabolizmie kwasów tłuszczowych. Należą do nich tiolaza uczestnicząca w peroksysomalnym utlenianiu kwasów tłuszczowych (peroxisomal 3- ketoacyl-CoA thiolase, Acaa1b), mikrosomalna dehydrogenaza aldehydowa (Aldh9a1) konwertująca γ -aminobutyraldehyd do kwasu γ -aminomasłowego i cytozolowe białko wiążące kwasy tłuszczowe Fabp1 (Ford i wsp., 2017).

Na ile wpływ glifosatu na procesy wewnątrzkomórkowe wiąże się ze zmianami w produkcji RFT obecnie trudno wyjaśnić. Podobnie trudno ocenić znaczenie tego zjawiska dla zdrowia człowieka. Nadmierne wytwarzanie RFT jest uważane za główny czynnik odpowiedzialny za patogenezę wielu chorób, między innymi: nowotworów, chorób serca i układu krążenia, chorób niedokrwiennych, cukrzycy, zwłóknienia płuc, reumatoidalnego zapalenia stawów, bezdechu nocnego, chorób neurodegeneracyjnych (Alzheimer, Parkinsona), ale także za procesy starzenia się organizmu (Sarniak i wsp., 2016). Badane w niniejszej pracy niskie stężenia glifosatu nie były cytotoksyczne, ani nie stymulowały produkcji RFT w komórkach spoczynkowych, natomiast zwiększały wytwarzanie RFT w trakcie procesu fagocytozy. Zjawisko takie można ocenić jako korzystne w przypadku infekcji bakteryjnych. Zagrożenie stanowi jednak ekspozycja organizmu na nanocząstki, zwłaszcza kontakt z układem oddechowym człowieka. Nieodłącznym elementem zanieczyszczenia powietrza są pyły zawieszone (PM), które są mieszaniną różnych cząstek w powietrzu. Zaobserwowano, że wnikające z wdychanym powietrzem ultradrobne cząstki węgla szybko przechodzą do krążenia systemowego ludzi (Nemmar i wsp., 2002). Fagocytoza nanocząstek, zwłaszcza o określonych kształtach, przez neutrofile powoduje wzrost produkcji anionorodnika nadadtlenkowego (Hitzfeld i wsp., 1997; Tamura i wsp., 2002; Safari i wsp., 2020). Może to być istotne w niektórych

stanach chorobowych, gdyż w obecności nanocząstek neutrofile chorych na astmę wykazywały zwiększoną skłonność do generowania reaktywnych form tlenu po stymulacji cząstkami PM_{2,5}, niż neutrofile osób zdrowych (Sierra-Vargas i wsp., 2009). Zwiększenie w takich przypadkach wytwarzania RFT może spowodować nasilenie uszkodzeń w tkance. Dodatkowo, należy wziąć pod uwagę możliwość nieswoistego wiązania do nanocząstek silnego czynnika prozapalnego, lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS). U myszy ekspozycja na glifosat stymuluje odpowiedź zapalną płuc wywołaną przez LPS (Pandher i wsp., 2021). Można więc przyjąć, że choć niskie dawki glifosatu nie są szkodliwe dla ludzi, synergistyczne działanie tego związku z innymi skażeniami środowiskowymi, zarówno organicznymi i nieorganicznymi, może stanowić ważny element mechanizmów patogenetycznych, co musi być uwzględniane przy ocenie zagrożenia zdrowia populacji ludzkiej.

6. Wnioski.

1. Użyte metody oznaczania glifosatu w wodzie (wysokociśnieniowa (wysokosprawna) chromatografia cieczowa i test immunoenzymosorpcyjny) charakteryzuje duża czułość, a pomiędzy wynikami występuje wysoka korelacja.
2. Stężenie glifosatu w wodzie wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski ($0,33\mu\text{g/L}$) nie przekracza norm dopuszczalnych w Unii Europejskiej.
3. Inkubacja próbek krwi przez 1 godzinę z glifosatem w stężeniach $0,01\mu\text{g/ml}$, $0,1\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$ czyli od $\sim 0,06\mu\text{M}$ do $59\mu\text{M}$ powoduje istotny statystycznie wzrost produkcji reaktywnych pochodnych tlenowych w granulocytach stymulowanych N -formylometionino-leucylo-fenyloalaniną i bakteriami *Escherichia coli*.
4. Wzrost ten nie jest związany z toksycznym działaniem glifosatu na ludzkie komórki wielojądrzaste, ani ze zwiększoną aktywnością fagocytarną granulocytów.
5. Glifosat w użytych stężeniach nie indukuje wybuchu oddechowego w granulocytach.
6. Obecność glifosatu w próbkach krwi stymulowanych 12-mirystylo-13-octanem forbolu nie wpływa także na wielkość produkcji reaktywnych form tlenu w badanych komórkach.
7. Niewielkie obniżenie poziomu glutationu zredukowanego i utlenionego w komórkach krwi po inkubacji z glifosatem o stężeniu $0,05\mu\text{g/L}$ lub $0,5\mu\text{g/L}$ pozwala sądzić, że wzmocnienie wybuchu oddechowego nie jest spowodowane zmianami stężenia tego związku.
8. Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że glifosat wpływa na drogi sygnałowe prowadzące do aktywacji oksydazy NADPH niezależne od aktywacji kinazy białkowej C.

7. Streszczenie

Glifosat stanowi bazę licznych środków chwastobójczych. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) uznała glifosat za prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi. W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych stwierdzono silną hepato- i nefrotoksyczność dużych dawek tego związku. Większość badań nad ekspozycją ludzi na glifosat dotyczyła grup narażonych na kontakt z tym pestycydem w związku z wykonywanym zawodem. Badania dotyczące wpływu niskich stężeń glifosatu na populacje nierolnicze powinny uwzględniać wielkości dawek, które mogą się kumulować, a dostających się do organizmu przede wszystkim na drodze pokarmowej. W Unii Europejskiej maksymalne stężenie jakiegokolwiek pestycydu w wodzie pitnej nie powinno przekraczać $0,1\mu\text{g/L}$, natomiast dopuszczalne dzienne spożycie (ADI - *acceptable daily intake*) dla ludzi zostało ustalone na poziomie $0,5\text{mg/kg}$ masy ciała.

Celem niniejszej pracy było oszacowanie wielkości skażenia glifosatem wody wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski i próba oceny, jak stężenia tego związku porównywalne z wykrytymi w wodzie, mogą wpływać na wybrane reakcje komórek krwi obwodowej *in vitro*.

Do oznaczeń stężeń glifosatu w wodzie zastosowano metody HPLC (technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej) i ELISA (test immunoenzymosorpcyjny). Wpływ glifosatu na żywotność komórek, produkcję reaktywnych pochodnych tlenowych i wielkość fagocytozy analizowano przy użyciu standardowych testów cytometrycznych, a do określenia stężenia zredukowanego i utlenionego glutationu komercyjnego zestawu ELISA.

Stężenia glifosatu w badanych próbkach wody pitnej były niskie, co najmniej tysiąc razy niższe niż ADI i nie przekraczały $0,33\mu\text{g/L}$. Te stwierdzone zakresy stężeń były powodem, że w niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ glifosatu w relatywnie niskich stężeniach od $0,01\text{ mg/L}$, $0,1\text{mg/L}$, 1mg/L , 10mg/L czyli od $\sim 0,06\mu\text{M}$ do $59\mu\text{M}$, zbliżonych do dopuszczonych w normach Unii Europejskiej, na komórki krwi obwodowej. Biorąc pod uwagę biologiczny czas półtrwania tego związku w organizmie człowieka, szacowany na 3 do 10 godzin zdecydowano się na krótką, jednogodziną inkubację próbek krwi z glifosatem. W próbkach krwi, inkubowanych z podanymi wyżej stężeniami glifosatu w przyjętych warunkach doświadczalnych zaobserwowano istotny statystycznie wzrost produkcji reaktywnych pochodnych tlenowych (RFT) w granulocytach stymulowanych N -formylometionino-leucylo-feniloalaniną (fMLP) i komórkami bakterii *Escherichia coli*. Wzrost ten nie był związany z toksycznym

działaniem glifosatu, ani ze zwiększoną aktywnością fagocytarną granulocytów. Związek ten w użytych stężeniach nie indukował wybuchu oddechowego w granulocytach ani nie wpływał na wielkość produkcji RFT w próbkach krwi stymulowanych PMA (12-mirystylo-13-octan forbolu). Niewielkie obniżenie poziomu tak glutationu zredukowanego, jak i utlenionego w komórkach krwi po inkubacji w roztworze glifosatu o stężeniu 0,05µg/mL lub 0,5µg/mL pozwala sądzić, że wzmocnienie wybuchu oddechowego nie jest spowodowane zmianami stężenia tego związku.

Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że glifosat wpływa na drogi sygnałowe prowadzące do aktywacji oksydazy NADPH, niezależne od aktywacji kinazy białkowej C. Można więc uznać, że choć niskie dawki glifosatu nie są szkodliwe dla ludzi, synergistyczne działanie tego związku z innymi skażeniami środowiskowymi może stanowić ważny element mechanizmów patogenetycznych.

8. Abstract

Glyphosate is the base of numerous herbicides. The International Agency for Research on Cancer (IARC) identified glyphosate as possibly carcinogenic to humans. Strong hepato- and nephrotoxicity of high doses of this reagent was reported in laboratory animal studies. Most of the studies concerning human exposure to glyphosate have thus far included peoples exposed occupationally to the pesticide. Studies on the effects of low concentrations of glyphosate on non-agricultural populations should take into account the magnitude of doses that may accumulate in the body, which are primarily absorbed through the oral route. In European Union countries, the maximum concentration of any pesticide in drinking water should not exceed $0.1\mu\text{g/L}$, while the acceptable daily intake (ADI) for humans is set at 0.5mg/kg body weight.

The aim of the study was to estimate the glyphosate levels in tap water samples collected from different Water Treatment Plants in Greater Poland region, as well as assess how this reagent – at doses comparable to those detected in tap water – may influence selected reactions of human peripheral blood cells *in vitro*.

HPLC (high-performance liquid chromatography) and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) methods were used to determine glyphosate concentrations in water. The effects of glyphosate on cell viability, production of reactive oxygen species (ROS), and rates of phagocytosis were analyzed using standard cytometric assays. Furthermore, a commercial ELISA kit was used to determine reduced and oxidized glutathione concentrations.

Glyphosate concentrations in the tested drinking water samples were low – at least one thousand times lower than ADI – and did not exceed $0.33\mu\text{g/L}$. Such concentration ranges were the reason for this study to investigate the effects of glyphosate on peripheral blood cells at relatively low concentrations of the reagent, i.e. from 0.01mg/L , 0.1mg/L , 1mg/L , 10mg/L (from $\sim 0.06\mu\text{M}$ to $59\mu\text{M}$), which are close to norms acceptable within the European Union. As the biological half-life of this compound in the human body is estimated to be 3 to 10 hours, we decided to incubate blood samples with glyphosate for a short period of one hour. Blood samples incubated with the given concentrations of glyphosate under the specified conditions exemplified a statistically significant increase of ROS production in granulocytes stimulated with N -formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLP) and *Escherichia coli* cells. This increase was not associated with toxic effects of glyphosate or with increased phagocytic activity of granulocytes. The reagent, when applied at specified concentrations, did not induce a respiratory burst in

granulocytes or affect the amount of ROS production in blood samples stimulated with 12-myristate phorbol 13-acetate (PMA). A slight decrease in the level of both reduced and oxidized glutathione in blood cells after incubation in glyphosate solution of 0.05 µg/mL or 0.5 µg/mL allows room for assumption that the enhancement of respiratory burst is not caused by changes in the concentration of this antioxidant tripeptide. On the basis of the results obtained, it may be suggested that glyphosate affects signaling pathways leading to NADPH oxidase activation, independent of protein kinase C activation. Thus, it can be concluded that although low doses of glyphosate are not harmful to humans, synergistic effects of this compound with other environmental pollutants may be an important part of pathogenic mechanisms.

9. Piśmiennictwo

1. Abdel-Halim KY, Osman SR. Cytotoxicity and Oxidative Stress Responses of Imidacloprid and Glyphosate in Human Prostate Epithelial WPM-Y.1 Cell Line. *J Toxicol*. 2020; 4364650. doi: 10.1155/2020/4364650.
2. Aitbali Y, Ba-M'hamed S, Elhidar N, Nafis A, Soraa N, Bennis M. Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. *Neurotoxicol Teratol*. 2018; 67: 44-49. doi: 10.1016/j.ntt.2018.04.002.
3. Alvarez-Moya C, Silva MR, Ramírez CV, Gallardo DG, Sánchez RL, Aguirre AC, Velasco AF. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genet Mol Biol*. 2014; 37(1): 105-10. doi: 10.1590/s1415-47572014000100016.
4. Andreotti G, Koutros S, Hofmann JN i wsp. Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst*. 2018; 110(5): 509-516. doi: 10.1093/jnci/djx233.
5. Annett R, Habibi HR, Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol*. 2014; 34(5): 458–479. doi:10.1002/jat.2997.
6. Antier C, Kudsk P, Reboud X, Ulber L, Baret PV, Messéan A. Glyphosate Use in the European Agricultural Sector and a Framework for Its Further Monitoring. *Sustainability*. 2020; 12 (14): 5682. <https://doi.org/10.3390/su121456>.
7. Antoniou MN, Nicolas A, Mesnage R, Biserni M, Rao FV, Martin CV. Glyphosate does not substitute for glycine in proteins of actively dividing mammalian cells. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):494. doi: 10.1186/s13104-019-4534-3.
8. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*. 2014; 5: 196. doi: 10.3389/fphar.2014.00196.
9. Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect*. 2001; 109 (8): 851-7. doi: 10.1289/ehp.01109851.
10. Arkan T., Molnár-Perl I. The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography. *Microchemical Journal*. 121, 99, 2015.

11. Bailey DC, Todt CE, Burchfield SL, Pressley AS, Denney RD, Snapp IB, Negga R, Traynor WL, Fitsanakis VA. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018; 57: 46-52.
doi: 10.1016/j.etap.2017.11.005.
12. Battaglin WA, Meyer MT, Kuivila KM, Dietze JE,. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)* 2014; 50(2): 275-290. doi:10.1111/jawr.12159.
13. Bekkering S, Torensma R. Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol* 2013; 2(2): 44-58. doi: 10.5315/wjh.v2.i2.44.
14. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*. 2018; 48 Suppl 2:e12951. doi: 10.1111/eci.12951.
15. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Séralini GE. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007; 53 (1): 126-33. doi: 10.1007/s00244-006-0154-8.
16. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 2016; 28, 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
17. Benbrook CM, Davis DR. The dietary risk index system: a tool to track pesticide dietary risks. *Environ Health* 2020; 19, 103. doi: 0.1186/s12940-020-00657-z.
18. Ben Maamar M, Beck D, Nilsson EE, Kubsad D, Skinner MK. Epigenome-wide association study for glyphosate induced transgenerational sperm DNA methylation and histone retention epigenetic biomarkers for disease. *Epigenetics*. 2020: 1-18.
doi: 10.1080/15592294.2020.1853319.
19. Bento CPM., Yang X, Gort G i wsp. Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Sci. Total Environ* 2016. 572, 301-311.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.215.
20. Berg CJ, King HP, Delenstarr G, Kumar R, Rubio F, Glaze T. Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLoS ONE* 2018; 13(7): e0198876.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198876>.

21. Berry C. Glyphosate and cancer: the importance of the whole picture. *Pest Manag Sci.* 2020; 76 (9): 2874-2877. doi: 10.1002/ps.5834.
22. Blanter M, Gouwy M, Struyf S. Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors. *J Inflamm Res.* 2021; 14: 141-162. doi: 10.2147/JIR.S284941.
23. Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A.* 2009; 72(15-16): 986-997. doi:10.1080/15287390902929741.
24. Borggaard, OK, Gimsing AL. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag. Sci.* 2008; 64(4): 441-56. doi: 10.1002/ps.1512.
25. Bréchar S, Plançon S, Tschirhart EJ. New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca(2+) signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(6): 661-76. doi: 10.1089/ars.2012.4773.
26. Brewster DW, Warren J, Hopkins WE. Metabolism of glyphosate in Sprague–Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol.* 1991 17(1): 43-51. doi: 10.1016/0272-0590(91)90237-x.
27. Burchfield SL, Bailey DC, Todt CE, Denney RD, Negga R, Fitsanakis VA. Acute exposure to a glyphosate-containing herbicide formulation inhibits Complex II and increases hydrogen peroxide in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019; 66: 36-42. doi: 10.1016/j.etap.2018.12.019.
28. Cattani D, Cesconetto PA, Tavares MK, i wsp. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology.* 2017; 15; 387: 67-80. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.001.
29. Chaufan G, Coalova I, Ríos de Molina M del C. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int J Toxicol.* 2014; 33(1): 29-38. doi: 10.1177/1091581813517906.
30. Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses - in vitro study. *Pestic Biochem Physiol.* 2014; 113:25-30. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.06.005.

31. Connolly A, Coggins MA, Koch HM. Human Biomonitoring of Glyphosate Exposures: State-of-the-Art and Future Research Challenges. *Toxics*. 2020; 8(3): 60. doi:10.3390/toxics8030060.
32. Connolly A, Jones K, Basinas I, i wsp. Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. *Int J Hyg Environ Health*. 2019; 222(2): 205-210. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.09.004.
33. Connolly A, Leahy M, Jones K, Kenny L, Coggins MA. Glyphosate in Irish adults: a pilot study in 2017. *Environ. Res.*, 2018; 165: 235-236. doi: 10.1016/j.envres.2018.04.025.
34. Conrad A, Schröter-Kermani C, Hoppe HW, Rüther M, Pieper S, Kolossa-Gehring M. Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health*. 2017; 220(1): 8-16. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.09.016.
35. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH L 330/32.
36. Curwin BD, Hein, MJ, Sanderson WT i wsp. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Ann. Occup. Hyg.* 2007; 51, 53–65 doi: 10.1093/annhyg/mel062.
37. de Aguiar LM, Figueira FH, Gottschalk MS, da Rosa CE. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016; 185-186: 94-101. doi: 10.1016/j.cbpc.2016.03.006.
38. De Almeida LKS, Pletschke BI, Frost CL. Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. *3 Biotech*. 2018; 8(10): 438. doi: 10.1007/s13205-018-1464-z.
39. de Araújo -Ramos AT, Passoni MT, Romano MA, Romano RM and Martino-Andrade AJ. Controversies on Endocrine and Reproductive Effects of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides: A Mini-Review. *Front. Endocrinol*. 2021; 12: 627210. doi: 10.3389/fendo.2021.627210.
40. de F Sousa MG, da Silva AC, Dos Santos Araújo R, Rigotto RM. Evaluation of the atmospheric contamination level for the use of herbicide glyphosate in the northeast region of Brazil. *Environ Monit Assess*. 2019; 191(10): 604. doi: 10.1007/s10661-019-7764-x.

41. De Nicola M, Ghibelli L. Glutathione depletion in survival and apoptotic pathways. *Front Pharmacol*. 2014; 5:267. doi: 10.3389/fphar.2014.00267.
42. Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, i wsp. Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochim Pol*. 2020; 67(1): 53-64. doi: 10.18388/abp.2020_2898.
43. Duke SO. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag Sci*. 2018; 74(5): 1027-1034. doi: 10.1002/ps.4652.
44. Duramad P, Tager IB, Leikauf J, Eskenazi B, Holland NT. Expression of Th1/Th2 cytokines in human blood after in vitro treatment with chlorpyrifos, and its metabolites, in combination with endotoxin LPS and allergen Der p1. *J Appl Toxicol*. 2006; 26(5): 458-65. doi: 10.1002/jat.1162.
45. ECHA. Glyphosate Not Classified as a Carcinogen by ECHA-All News-ECHA. Available online: <https://echa.europa.eu/-/glyphosate-not-classified-as-a-carcinogen-by-echa> (data dostepu 06.2021)
46. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate *EFSA Journal* 2015; 13(11): 4302
47. EFSA (European Food Safety Authority). Reasoned opinion on the modification of the existing maximum residue levels for glyphosate in borage and corn gromwell seeds. *EFSA Journal* 2016; 14(4): 4468, 20 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4468.
48. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*. 2009; 75(6): 475-81. doi: 10.1002/cyto.a.20726.
49. El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28(3): 379-85. doi: 10.1016/j.etap.2009.06.001.
50. Fagan J, Bohlen L, Patton S, Klein K. Organic diet intervention significantly reduces urinary glyphosate levels in U.S. children and adults. *Environ Res*. 2020; 189: 109898. doi: 10.1016/j.envres.2020.109898.
51. Faniband H, Norén E, Littorin M, Lindh CH, Human experimental exposure to glyphosate and biomonitoring of young Swedish adults. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2021, 231, 113657. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113657.

52. Faria M, Bedrossiantz J, Ramírez JRR, i wsp. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. *Environ Int.* 2021; 146: 106253. doi: 10.1016/j.envint.2020.106253.
53. Ferreira C, Duarte SC, Costa E i wsp. Urine biomonitoring of glyphosate in children: Exposure and risk assessment. *Environ Res.* 2021; 198: 111294. doi: 10.1016/j.envres.2021.111294.
54. Ford B, Bateman LA, Gutierrez-Palominos L, Park R, Nomura DK. Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. *Cell Chem Biol.* 2017; 24(2): 133-140. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.12.013.
55. Franco, R., Cidlowski, J. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 2009; 16, 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>.
56. Gehin A, Guyon C, Nicod L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2006; 22(1): 27-34. doi: 10.1016/j.etap.2005.11.003.
57. George J, Shukla Y. Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. *ISRN Dermatol.* 2013; 825180. doi: 10.1155/2013/825180.
58. Gildea JJ, Roberts DA, Bush Z. Protective Effects of Lignite Extract Supplement on Intestinal Barrier Function in Glyphosate-Mediated Tight Junction Injury. *J Clin Nutr Diet.* 2017, 3:1. doi: 10.4172/2472-1921.100035.
59. Hao Y, Zhang Y, Ni H i wsp. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. *J Environ Sci Health B.* 2019; 54(9): 737-744. doi: 10.1080/03601234.2019.1633215.
60. Hitzfeld B, Friedrichs KH, Ring J, Behrendt H. Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear granulocytes. *Toxicology.* 1997; 120(3): 185-95. doi: 10.1016/s0300-483x(97)03664-0.
61. Héritier L, Duval D, Galinier R, Meistertzheim AL, Verneau O. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environ Toxicol Chem.* 2017; 36(12): 3343-3350. doi: 10.1002/etc.3916.
62. Hetherington P, Marshall G, Kirkwood R, Warner J. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. *J Exp Botany.* 1998; 49(320): 527-533 doi: 10.1093/jxb/49.320.527.

63. Heu C, Elie-Caille C, Mougey V, Launay S, Nicod L. A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012; 34(2): 144-153.
doi: 10.1016/j.etap.2012.02.010.
64. Hultberg M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007; 24(1): 19-22. doi: 10.1016/j.etap.2007.01.002.
65. Ibáñez M, Pozo OJ, Sancho JV, López FJ, Hernández F. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1134(1-2): 51-5.
doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.093.
66. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017. PMID: 31829533.
67. John J, Liu H. Glyphosate monitoring in water, foods, and urine reveals an association between urinary glyphosate and tea drinking: A pilot study. *Int J Env Health Eng.* 2018; 7: 2. doi: 10.4103/ijehe.ijehe_5_17.
68. KANCELARIA SEJMU, Biuro Komisji Sejmowych, Pełny zapis przebiegu posiedzenia Komisji Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa (nr 126) 11 kwietnia 2018r. <http://www.sejm.gov.pl/sejm8.nsf/biuletyn.xsp?sknrn=OSZ-126> (access: 26.04.2021).
69. Karmiłowicz E. The use of herbicides to regulate weeds in forest nurseries and crops in Poland. *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*, 2019; 61 (3); 222–229.
doi: 10.2478/ffp-2019-0021.
70. Kaszkowiak K, Kubacki T, Olejniczak J, Bondarenko I. The Concentration of Glyphosate in the Tap Water in Greater Poland Region. *EJBR* 2020; 11; 57-64.
doi: 10.5281/zenodo.4310255.
71. Kašuba V, Milić M, Rozgaj R i wsp. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017; 24(23): 19267-19281. doi: 10.1007/s11356-017-9438-y.
72. Knudsen LE, Hansen PW, Mizrak S i wsp. Biomonitoring of Danish school children and mothers including biomarkers of PBDE and glyphosate. *Rev Environ Health.* 2017; 32(3): 279-290. doi: 10.1515/reveh-2016-0067.
73. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005; 53(6); 505-17. PMID: 16407783.

74. Kolakowski BM, Miller L, Murray A, Leclair A, Bietlot H, van de Riet JM. Analysis of Glyphosate Residues in Foods from the Canadian Retail Markets between 2015 and 2017. *J Agric Food Chem.* 2020; 68(18): 5201-5211. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07819.
75. Koller VJ, Fürhacker M, Nersesyan A, Mišák M, Eisenbauer M, Knasmueller S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol.* 2012; 86(5): 805-13. doi: 10.1007/s00204-012-0804-8.
76. Kolpin DW, Thurman EM, Lee EA, Meyer MT, Furlong ET, Glassmeyer ST. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Sci Total Environ.* 2006; 354 (2-3): 191-7. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.01.028.
77. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S i wsp. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol.* 2011; 30(1): 51-7. doi: 10.1016/j.fsi.2010.09.012.
78. Kronberg MF, Clavijo A, Moya A i wsp. Glyphosate-based herbicides modulate oxidative stress response in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2018; 214: 1-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.08.002.
79. Krüger M, Schledorn P, Schrödl W, Hoppe HW, Lutz W, Shehata AA. Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. *J Environ Anal Toxicol.* 2014; 4: 210. doi: 10.4172/2161-0525.1000210.
80. Kubsad D, Nilsson EE, King SE, Sadler-Rigglesman I, Beck D, Skinner MK. Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 6372. doi: 10.1038/s41598-019-42860-0.
81. Kwiatkowska M, Huras B, Bukowska B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pestic Biochem Physiol.* 2014; 109: 34-43. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.01.003.
82. Kwiatkowska M, Jarosiewicz P, Michałowicz J, Koter-Michalak M, Huras B, Bukowska B. The Impact of Glyphosate, Its Metabolites and Impurities on Viability, ATP Level and Morphological changes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS One.* 2016; 11(6): e0156946. doi:10.1371/journal.pone.0156946

83. Kwiatkowska M, Reszka E, Woźniak K, Jabłońska E, Michałowicz J, Bukowska B. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol.* 2017; 105:93-98. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.051.
84. Kwiatkowska M, Michałowicz J, Jarosiewicz P i wsp. Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol.* 2020; 135: 110888. doi: 10.1016/j.fct.2019.110888.
85. Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Virkel G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012; 34(3): 811-8. doi: 10.1016/j.etap.2012.09.005.
86. Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Maté ML, Lanusse C, Virkel GL. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. *Int J Toxicol.* 2014; 33(4): 307-318. doi: 10.1177/1091581814540481.
87. Lee EA, Zimmerman LR, Bhullar BS, Thurman EM. Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. *Anal. Chem.* 2002; 74(19): 4937-43. doi: 10.1021/ac020208y.
88. Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini JB. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 743. doi:10.3389/fendo.2019.00743.
89. Leino L, Tall T, Helander M i wsp. Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *J Hazard Mater.* 2021; 408: 124556. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124556.
90. Lupi L, Bedmar F, Puricelli M i wsp. Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, 2019; 225: 906-914. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.090.
91. Levine SL, Webb EG, Saltmiras DA. Review and analysis of the potential for glyphosate to interact with the estrogen, androgen and thyroid pathways. *Pest Manag Sci* 2020; 76: 2886–906. doi: 10.1002/ps.5983.
92. Li Z, Jennings A. Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14(7): 826. doi: 10.3390/ijerph14070826.

93. Martínez A, Reyes I, Reyes N. Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells *Biomedica* 2007; 4; 594-604. PMID: 18320126.
94. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B i wsp. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int.* 2020; 135: 105414. doi: 10.1016/j.envint.2019.105414.
95. Martins-Júnior HA, Lebre DT, Wang AY, Pires MA, Bustillos OV. An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23(7); 1029. doi: 10.1002/rcm.3960.
96. Masiol M, Gianni B, Prete M. Herbicides in river water across the northeastern Italy: occurrence and spatial patterns of glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(24): 24368–24378. doi:10.1007/s11356-018-2511-3.
97. Mesnage R, Bernay B, Séralini GE. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology.* 2013; 313(2-3): 122-8. doi: 10.1016/j.tox.2012.09.006.
98. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits', *Food Chem. Toxicol* 2015, 84; 133-53. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.012.
99. Mesnage R, Ibragim M, Mandrioli D i wsp. In-depth comparative toxicogenomics of glyphosate and Roundup herbicides: histopathology, transcriptome and epigenome signatures, and DNA damage. *bioRxiv - Pharmacology and Toxicology* 2021a. doi: 10.1101/2021.04.12.439463.
100. Mesnage R, Teixeira M, Mandrioli D i wsp. Use of Shotgun Metagenomics and Metabolomics to Evaluate the Impact of Glyphosate or Roundup MON 52276 on the Gut Microbiota and Serum Metabolome of Sprague-Dawley Rats. *Environ Health Perspect.* 2021b; 129(1): 17005. doi: 10.1289/EHP6990.
101. Matozzo V, Fabrello J, Marin MG. The Effects of Glyphosate and Its Commercial Formulations to Marine Invertebrates: A Review. *J. Mar. Sci. Eng.* 2020, 8, 399. doi.org/10.3390/jmse8060399.

102. Mertens M, Höss S, Neumann G, Afzal J, Reichenbecher W. Glyphosate, a chelating agent-relevant for ecological risk assessment?. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018; 25(6): 5298-5317. doi:10.1007/s11356-017-1080-1.
103. Milić M, Žunec S, Micek V i wsp. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2018; 69(2): 154-168. doi: 10.2478/aiht-2018-69-3114.
104. Miller A, Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D.. Glyphosate Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. 2010 <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphotech.html>.
105. Mink PJ, Mandel JS, Scurman BK, Lundin JJ. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012; 63(3): 440-52. doi: 10.1016/j.yrtph.2012.05.012.
106. Modesto AK, Martinez BCR. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 2010; 78: 294–299, doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
107. Montiel-León JM, Munoz G, Vo Duy S i wsp. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ Pollut*. 2019; 250: 29-39. doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.125.
108. Nagy K, Tessema RA, Budnik LT, Ádám B. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Environ Res*. 2019; 179(Pt B): 108851. doi: 10.1016/j.envres.2019.108851.
109. Nagy K, Argaw Tessema R, Szász I, Smeirat T, Al Rajo A, Ádám B. Micronucleus Formation Induced by Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides in Human Peripheral White Blood Cells. *Front Public Health*. 2021; 9: 639143. doi: 10.3389/fpubh.2021.639143.
110. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B i wsp. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002; 105(4): 411-4. doi: 10.1161/hc0402.104118.
111. Nordby DE, Hager AG. Herbicide formulations and calculations: active in-gradient or acid equivalent, a Weed Fact sheet. Integrated Pest Management Handbook, University of Illinois, USA. 2011. <http://ipm.illinois.edu/weeds/aeai.pdf>.

112. Nova P, Calheiros CSC, Silva M. Glyphosate in Portuguese Adults - A Pilot Study. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2020; 80: 103462. doi: 10.1016/j.etap.2020.103462.
113. Pahwa M, Beane Freeman LE i wsp. Glyphosate use and associations with non-Hodgkin lymphoma major histological sub-types: findings from the North American Pooled Project. *Scand J Work Environ Health*. 2019; 45(6): 600-609. doi: 10.5271/sjweh.3830.
114. Pandher U, Kirychuk S, Schneberger D i wsp. Pulmonary inflammatory response from co-exposure to LPS and glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021; 86: 103651. doi: 10.1016/j.etap.2021.103651.
115. Parvez S, Gerona RR, Proctor C i wsp. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environ Health*. 2018; 17(1): 23. doi: 10.1186/s12940-018-0367-0.
116. Paz-y-Miño C, Sánchez ME, Arévalo M i wsp. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet Mol Biol*. 2007; 30: 456-460. doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026.
117. Peillex C, Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J Immunotoxicol*. 2020; 17(1): 163-174. doi: 10.1080/1547691X.2020.1804492.
118. Pérez GL, Vera MS, Miranda L. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems.; In: Andreas Kortekamp (Ed.), *Herbicides and Environment*. InTech Publications, Rijeka, Croatia. 2011; doi: 10.5772/12877.
119. Perez-Jones A, Mallory-Smith C. Biochemical mechanisms and molecular basis of evolved glyphosate resistance in weed species. In: V. K. Nandula, *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*, John Wiley & Sons 2010 pp. 119-140. doi.org/10.1002/9780470634394.ch6.
120. Pierce JS, Roberts B, Kougias DG i wsp. Pilot study evaluating inhalation and dermal glyphosate exposure resulting from simulated heavy residential consumer application of Roundup®. *Inhal Toxicol*. 2020; 32(8): 354-367. doi: 10.1080/08958378.2020.1814457.
121. Poiger T, Buerge IJ, Bächli A, Müller MD, Balmer ME. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017; 24(2): 1588–1596. doi:10.1007/s11356-016-7835-2.

122. Portier CJ. A comprehensive analysis of the animal carcinogenicity data for glyphosate from chronic exposure rodent carcinogenicity studies. *Environ Health*. 2020; 19(1):18. doi:10.1186/s12940-020-00574-1.
123. Price M, Kessel D. On the use of fluorescence probes for detecting reactive oxygen and nitrogen species associated with photodynamic therapy. *J Biomed Opt*. 2010; 15(5): 051605. doi: 10.1117/1.3484258.
124. Ramwell CT, Kah M, Johnson PD. Contribution of household herbicide usage to glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in surface water drains. *Pest Manag Sci*. 2014; 70(12): 1823–1830. doi:10.1002/ps.3724.
125. Rendon-von Osten J, Dzul-Caamal R. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14(6): 595. doi: 10.3390/ijerph14060595.
126. Richard S, Prévot-D'Alvise N, Bunet R i wsp. Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 β and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2014; 92(3): 294-9. doi: 10.1007/s00128-013-1180-7.
127. Richmond, M.E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J Environ Stud Sci*. 2018; 8, 416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>.
128. Roberts DM, Buckley NA, Mohamed F i wsp. A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2010; 48(2): 129-36. doi: 10.3109/15563650903476491
129. Romano RM, Oliveira JM, Oliveira VM i wsp. Could Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides Be Associated With Increased Thyroid Diseases Worldwide? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 627167. doi: 10.3389/fendo.2021.627167.
130. Rolando CA, Baillie BR, Thompson DG, Little KM. The Risks Associated with Glyphosate-Based Herbicide Use in Planted Forests. *Forests*. 2017; 8(6): 208. doi.org/10.3390/f8060208.
131. Rossetti MF, Canesini G, Lorenz V, Milesi MM, Varayoud J, Ramos JG. Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. *Front. Endocrinol*. 2021; 12: 671991. doi: 10.3389/fendo.2021.671991.

132. Róžański L. Przemiany glifosatu; w: Kozłowska D, Jakubczak, E, Mielcarek M. [red.]. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. Agra-Enviro Lab., Poznań 1998, ss. 311–313.
133. Rubio F, Veldhuis LJ., Clegg BS, Fleeker JR, Hall JC. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(3): 691-6. doi: 10.1021/jf020761g.
134. Rueda-Ruzafa L, Cruz F, Roman P, Cardona D. Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *Neurotoxicology.* 2019; 75:1-8. doi: 10.1016/j.neuro.2019.08.006.
135. Rutkowski R, Pancewicz S, Rutkowski K, Rutkowska J. Znaczenie reaktywnych form tlenu i azotu w patomechanizmie procesu zapalnego. *Pol. Merk. Lek.,* 2007, XXIII, 134, 131-136
136. Safari H, Kelley WJ, Saito E i wsp. Neutrophils preferentially phagocytose elongated particles-An opportunity for selective targeting in acute inflammatory diseases. *Sci Adv.* 2020; 10; 6(24): eaba1474. doi: 10.1126/sciadv.aba1474.
137. Samsel A, Seneff S. Glyphosate pathways to modern diseases V: amino acid analogue of glycine in diverse proteins. *J Biol Phys Chem.* 2016; 16: 9–46. doi: 10.4024/03SA16A.jbpc.16.01
138. Santovito A, Ruberto S, Gendusa C, Cervella P. In vitro evaluation of genomic damage induced by glyphosate on human lymphocytes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(34): 34693-34700. doi: 10.1007/s11356-018-3417-9.
139. Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S. Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016, 70, 1150–1164 e-ISSN 1732-2693
140. Sierra-Vargas MP, Guzman-Grenfell AM, Blanco-Jimenez S i wsp. Airborne particulate matter PM2.5 from Mexico City affects the generation of reactive oxygen species by blood neutrophils from asthmatics: an in vitro approach. *J Occup Med Toxicol.* 2009; 4: 17. doi: 10.1186/1745-6673-4-17.
141. Silver MK, Fernandez J, Tang J i wsp. Prenatal Exposure to Glyphosate and Its Environmental Degradate, Aminomethylphosphonic Acid (AMPA), and Preterm Birth: A Nested Case-Control Study in the PROTECT Cohort (Puerto Rico). *Environ Health Perspect.* 2021; 129(5): 57011. doi: 10.1289/EHP7295.

142. Sopińska A., Grochoła A., Niezgoda J.. Wpływ wód zanieczyszczonych herbicydem Roun-dap na organizm ryb. *Med. Weter.* 2000; 56(9): 593–5
143. Soudani N, Chaâbane M, Ghorbel I, Elwej A, Boudawara T, Zeghal N. Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *Gen Physiol Biophys.* 2019; 38(2): 123-134. doi: 10.4149/gpb_2018043.
144. Soukup ST, Merz B, Bub A i wsp. Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany. *Arch Toxicol.* 2020; 94(5): 1575-1584. doi: 10.1007/s00204-020-02704-7.
145. Stajnko A, Snoj Tratnik J, Kosjek T i wsp. Seasonal glyphosate and AMPA levels in urine of children and adolescents living in rural regions of Northeastern Slovenia. *Environ Int.* 2020; 143: 105985. doi: 10.1016/j.envint.2020.105985.
146. Stephenson CL, Harris CA. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. *Food Chem Toxicol.* 2016; 95: 28-41. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.026.
147. Sun, Y., Zheng, Y., Wang, C., Liu, Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis* 2018; 9; 753. doi.org/10.1038/s41419-018-0794-4.
148. Tamura K, Takashi N, Kumazawa R, Watari F, Totsuka Y. Effects of particle size on cell function and morphology in titanium and nickel. *Mater. Trans.*, 2002, 43: 3052-3057.
149. Tang J, Hu P, Li Y, Win-Shwe TT, Li C. Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. *Front Physiol.* 2017; 8: 1083. doi: 10.3389/fphys.2017.01083.
150. Tang Q, Tang J, Ren X, Li C. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ Pollut.* 2020; 261: 114129. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114129.
151. Tarazona JV, Court-Marques D, Tiramani M i wsp. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol.* 2017; 91(8): 2723-2743. doi: 10.1007/s00204-017-1962-5.

152. Thomas DC. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett.* 2017; 192: 88-96. doi: 10.1016/j.imlet.2017.08.016.
153. Torretta V, Katsoyiannis IA, Viotti P, Rada EC. Critical Review of the Effects of Glyphosate Exposure to the Environment and Humans through the Food Supply Chain. *Sustainability.* 2018; 10(4): 950. doi.org/10.3390/su10040950.
154. Tu, M., Hurd, C., Randall, J.M. *Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas*, The Nature Conservancy. 2001; <http://tncweeds.ucdavis.edu>.
155. Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(11): 11427-11437. doi: 10.1007/s11356-019-04585-5.
156. Tsui MT, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere.* 2003; 52(7): 1189-97. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00306-0.
157. Ugarte, R. Interaction between glyphosate and mitochondrial succinate dehydrogenase. *Comput. Theor. Chem.* 2014; 1043, 54–63. doi: 10.1016/j.comptc.2014.05.018.
158. Uren Webster TM, Santos EM. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics.* 2015; 16(1): 32. doi: 10.1186/s12864-015-1254-5.
159. Van Stempvoort DR, Spoelstra J, Senger ND, Brown SJ, Post R, Struger J. Glyphosate residues in rural groundwater, Nottawasaga River Watershed, Ontario, Canada. *Pest Manag Sci.* 2016; 72(10): 1862-72. doi: 10.1002/ps.4218.
160. Vasiluk L, Pinto LJ, Moore MM. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. *Environ Toxicol Chem.* 2005; 24(1): 153-60. doi: 10.1897/04-088r.1.
161. Viljoen CD, Koortzen BJ, Sreenivasan Tantuan S. Determining the presence of glyphosate and glyphosate-tolerant events in maize and soybean food products in South Africa. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 2021; 14(2): 91-97. doi: 10.1080/19393210.2021.1872713.

162. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*. 2003; 331(1-2): 103-10. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00086-x.
163. Ward RA, McLeish KR. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 5(9): 1697-702. doi: 10.1681/ASN.V591697.
164. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 43: 995-1022. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026.
165. Weisenburger DD. A Review and Update with Perspective of Evidence that the Herbicide Glyphosate (Roundup) is a Cause of Non-Hodgkin Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021; 21(9): 621-630. doi: 10.1016/j.clml.2021.04.009.
166. Wicke D, Schulz LM, Lentes S i wsp. Identification of the first glyphosate transporter by genomic adaptation. *Environ Microbiol*. 2019; 21(4): 1287-1305. doi: 10.1111/1462-2920.14534.
167. Williams GM, Aardema M, Acquavella J i wsp. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. *Crit Rev Toxicol*. 2016a; 46(sup1): 3-20. doi: 10.1080/10408444.2016.1214677.
168. Williams GM, Berry C, Burns M, de Camargo JLV, Greim H. Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. *Crit Rev Toxicol*. 2016b; 46(sup1): 44-55. doi: 10.1080/10408444.2016.1214679.
169. Woźniak E, Sicińska P, Michałowicz J i wsp. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesement. *Food Chem Toxicol*. 2018; 120: 510-522. doi: 10.1016/j.fct.2018.07.035.
170. Woźniak E, Reszka E, Jabłońska E, Balcerczyk A, Broncel M, Bukowska B. Glyphosate affects methylation in the promoter regions of selected tumor suppressors as well as expression of major cell cycle and apoptosis drivers in PBMCs (in vitro study). *Toxicol In Vitro*. 2020; 63:104736. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104736.
171. Woźniak E, Reszka E, Jabłońska E, Michałowicz J, Huras B, Bukowska B. Glyphosate and AMPA Induce Alterations in Expression of Genes Involved in Chromatin

Architecture in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (In Vitro). *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6): 2966. doi: 10.3390/ijms22062966.

172. Yahfoufi ZA, Bai D, Khan SN i wsp. Glyphosate Induces Metaphase II Oocyte Deterioration and Embryo Damage by Zinc Depletion and Overproduction of Reactive Oxygen Species. *Toxicology.* 2020; 439: 152466. doi: 10.1016/j.tox.2020.152466.

173. Zhang L, Rana I, Shaffer RM, Taioli E, Sheppard L. Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutat Res.* 2019; 781: 186-206. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.02.001.

174. Zhang F, Xu Y, Liu X i wsp. Concentration Distribution and Analysis of Urinary Glyphosate and Its Metabolites in Occupationally Exposed Workers in Eastern China. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(8): 2943. doi: 10.3390/ijerph17082943.

175. Zhang C, Schilirò T, Gea M i wsp. Molecular Basis for Endocrine Disruption by Pesticides Targeting Aromatase and Estrogen Receptor. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(16): 5664. doi: 10.3390/ijerph17165664.

176. Zhou DM, Wang YJ, Cang L, Hao XZ, Luo XS. Adsorption and cosorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics. *Chemosphere.* 2004; 57(10): 1237-44. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.043.

177. Zoller O, Rhyn P, Rupp H, Zarn JA, Geiser C. Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 2018; 11(2): 83-91. doi: 10.1080/19393210.2017.1419509.

178. Zoller O, Rhyn P, Zarn JA, Dudler V. Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2020; 228: 113526. doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113526.

10. Aktywność naukowa autora

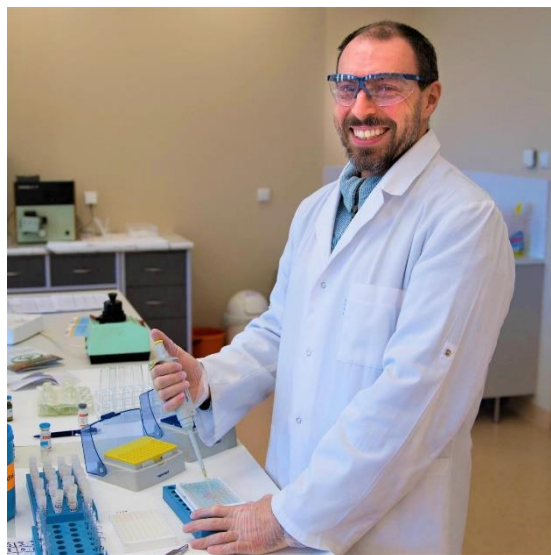
Mgr Krzysztof Kaszkowiak

Starszy wykładowca

Zakład Immunobiologii

Wydział Medyczny

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu



Spis publikacji:

1. Kaszkowiak Krzysztof, Kubacki Tomasz, Olejniczak Jacek, Bondarenko Igor. The Concentration of Glyphosate in the Tap Water in Greater Poland Region. Eur. J. Biol. Res. 2020; nr 11, s. 57-64.
2. Wiktorowicz Krzysztof, Kaszkowiak Krzysztof, Samborski Włodzimierz. Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Cz. 3. Rola antygenów MHC w chorobach reumatycznych. Forum Reumatol. 2019 : T. 5, nr 1, s. 33-42.
3. Żurawski Jakub, Kaszkowiak Krzysztof, Talarska Patrycja, Łazowski Stanisław, Grochowalski Marcin, Karoń Jacek. Concentration of CD10 protein in serum and tissue specimen in patients with adenocarcinoma tubulare large intestine - a pilot study. Pol. J. Pathol. 2019 : Vol. 70, s. 72-73.
4. Pawlaczyk Mariola, Rokowska-Waluch Anita, Kaszkowiak Krzysztof, Kubacki Tomasz, Roszak Magdalena, Wiktorowicz Krzysztof. Ocena jakości życia i roli stresu u chorych na trądzik. Prz. Derm. 2019 : T. 106, supl. 1, s. 44-45.
5. Wiktorowicz Krzysztof, Kaszkowiak Krzysztof, Kaszkowiak Mirosława. Szczepienia profilaktyczne - troska o dobro wspólne czy objaw totalitaryzmu państwowego? W: Między historią, bioetyką i medycyną. Księga Jubileuszowa z okazji 70-lecia urodzin Profesora Michała Musielaka. Pod red.: Krzysztofa Prętkiego, Adama Czabańskiego, Ewy Baum, Katarzyny B. Głodowskiej. Poznań : Wydaw. Nauk. Uniw. Med. im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2019 s. 507-542 .

6. Wiktorowicz Krzysztof, Kaszkowiak Krzysztof. Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Cz. 2. Funkcja antygenów zgodności tkankowej. Forum Reumatol. 2018: T. 4, nr 2, s. 87-94.
7. Wiktorowicz Krzysztof, Kaszkowiak Krzysztof. Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Cz.1. Kodowanie i budowa. Forum Reumatol. 2018 : T. 4, nr 1, s. 37-44.
8. Butkiewicz Anna, Kaszkowiak Krzysztof. Wpływ inteligencji emocjonalnej na jakość opieki oraz satysfakcję z wykonywania zawodu pielęgniarki. Pielęg. Pol. 2010 : nr 2 (36), s. 81-85.
9. Kaszkowiak Krzysztof, Kaszkowiak Mirosława, Wiktorowicz Krzysztof. Biologiczne podstawy doboru partnera u ludzi. Pol. Prz. Nauk Zdr. 2009 : nr 2 (19), s. 211-218.
10. Butkiewicz Anna, Kaszkowiak Krzysztof. Zjawisko subkultur młodzieżowych w Japonii. Pol. Prz. Nauk Zdr. 2009 : nr 2 (19), s. 157-163.