

Streszczenie

Stale rosnące zużycie pestycydów na świecie to bardzo ważny problem, dotyczący każdego z nas, ponieważ na każdy hektar kuli ziemskiej przypada aż 0,5 kg glifosatu. W aktualnym rejestrze środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w Polsce, znajduje się aż 109 preparatów herbicydowych opartych o glifosat. Jednym z nich jest Roundup 360 PLUS, który zawiera glifosat w postaci soli potasowej oraz surfaktanty objęte tajemnicą producenta. Głównym produktem rozpadu glifosatu w roślinach, glebie i wodzie jest AMPA.

Glifosat początkowo był uznawany za substancję bezpieczną dla ludzi. Natomiast w 2015 roku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem – Agenda WHO – sklasyfikowała glifosat, jako związek prawdopodobnie kancerogeny dla ludzi (kategoria 2A). Pomimo udowodnionej (zdaniem IARC) rakotwórczości wobec zwierząt, związek ten uzyskał zgodę Komisji Europejskiej do stosowania w Unii do końca 2022 roku.

Dotychczas nie określono mechanizmu genotoksycznego glifosatu, jego działania preparatu Roundup 360 PLUS i głównego metabolitu – AMPA, a także nie dokonano oceny ich wpływu na ludzki epigenom w zakresie stężeń odpowiadających potencjalnemu narażeniu środowiskowemu czy zawodowemu. Dlatego też biorąc pod uwagę fakt ciągłego wzrostu wykorzystania glifosatu w preparatach herbicydowych stosowanych w rolnictwie, niezbędne wydają się być dalsze badania, które dostarczą istotnych informacji w tym zakresie i być może przyczynią się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia potencjalnych uszkodzeń DNA i rozwoju transformacji nowotworowej.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu glifosatu, jego preparatu herbicydowego - Roundup 360 PLUS i metabolitu AMPA na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka, a także porównanie genotoksyczności i wpływu tych ksenobiotyków na wybrane parametry epigenomu. PBMCs inkubowano przez 24 godziny z badanymi ksenobiotykami w różnym zakresie stężeń odpowiadających narażeniu środowiskowemu i zawodowemu. Analizie poddano jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz dwuniciowe pęknięcia DNA, wykorzystując odpowiednio alkaliczną i neutralną wersję testu kometowego. Oceniono poziom oksydacyjnych uszkodzeń puryn i pirymidyn przy użyciu ludzkiej glikozylazy 8-oksoguaniny DNA i endonukleazy III. Dokonano analizy kinetyki naprawy powstałych uszkodzeń DNA przy użyciu alkalicznej wersji testu kometowego. Zweryfikowano zdolność tworzenia adduktów badanych związków i preparatu z DNA za pomocą testu relaksacji plazmidowego DNA (pUC19). Sprawdzone

możliwość generowania reaktywnych formy tlenu, w tym rodnika hydroksylowego za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych dioctanu 6-karboksy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH₂DA) oraz 3'-(p hydroksyfenylo)fluoresceiny (HPF). Analizie poddano globalną metylację DNA poprzez kolorymetryczny pomiar 5-metylocytozyny w DNA oraz metylację regionów promotorowych genów supresorowych (*P16*, *P21*, *TP53*) i protoonkogenów (*BCL2*, *CCND1*) za pomocą metylospecyficznej reakcji PCR. Oceniono również profil ekspresji tych genów, a także genów związanych z procesami epigenetycznymi: genów zaangażowanych w proces metylacji DNA (*DNMT1*, *DNMT3A*), demetylacji DNA (*TET2*, *TET3*) oraz genów zaangażowanych w modyfikację białek histonowych (*EHMT1*, *EHMT2*, *HDAC3*, *HDAC5*) za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Część pracy dotycząca oceny uszkodzeń DNA została wykonana we współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Woźniak, kierownikiem Katedry Genetyki Molekularnej UŁ. Doświadczenia z zakresu epigenetyki zostały wykonywane w ramach stażu w Instytucie Medycyny Pracy im. Prof. Nofera w Łodzi i współpracy z dr hab. Edytą Reszką, prof. nadzw. IMP, kierownikiem Zakładu Genetyki Molekularnej i Epigenetyki IMP.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane związki i preparat pestycydowy indukują powstawanie zarówno jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA, jak i uszkodzeń oksydacyjnych w postaci utleniania puryn i pirymidyn. Zarówno glifosat, AMPA jak i Roundup 360 PLUS nie są zdolne do tworzenia adduktów z DNA, podczas gdy zwiększają one generowanie reaktywnych form tlenu, w tym rodnika hydroksylowego w PBMCs. Roundup 360 PLUS w porównaniu do glifosatu i AMPA wykazuje najbardziej genotoksyczne działanie (już w stężeniu 5 μM powoduje szereg uszkodzeń DNA). Działanie preparatu herbicydowego w przeciwieństwie do glifosatu i AMPA uniemożliwia pełną naprawę powstałych uszkodzeń DNA. Obserwowane zmiany nie wiązały się z bezpośrednią interakcją badanych ksenobiotyków z DNA (nie zaobserwowano powstawania adduktów), ale najprawdopodobniej wystąpiły jako pośrednie działanie tych substancji na DNA poprzez indukcję RFT.

Uzyskane wyniki wskazują na istotne statystycznie obniżenie globalnej metylacji DNA w wyniku ekspozycji PBMCs na badane ksenobiotyki. Roundup 360 PLUS, glifosat i AMPA zmieniają metylację regionów promotorowych genów supresorowych *P21* i *TP53* oraz w przypadku Roundup'u 360 PLUS również protoonkogenu *BCL2*. Badane związki i preparat herbicydowy zmieniają profil ekspresji genów zaangażowanych w kluczowe procesy epigenetyczne (*CCND1*, *DNMT1*, *TET2*, *HDAC3*; *P16* i *TP53* – w przypadku

glifosatu i Roundup'u 360 PLUS oraz *P21* i *BCL2* w przypadku samego glifosatu), czego następstwem jest zaburzenie wyżej wymienionych mechanizmów molekularnych. Zmiany w epigenomie mogą skutkować modyfikacją struktury chromatyny i zaburzeniem cyklu komórkowego, w efekcie prowadząc do rozwoju transformacji nowotworowej.

Ewelina Woźniak

25.08.2018r.

Abstract

The constantly increasing use of pesticides in the world is a very important problem for each of us, because for every hectare of the globe there is 0.5 kg of glyphosate. In the current register of plant protection products authorized for marketing authorization of the Minister of Agriculture and Rural Development of Poland, there are as many as 109 herbicide preparations containing glyphosate as an active substance. One of them is the Roundup 360 PLUS, which contains glyphosate potassium salt and surfactants covered by the manufacturer's secret. The main product of glyphosate decay in plants, soil and water is AMPA. Previously, glyphosate was considered a substance safe for humans. However, in 2015, the International Agency for Research on Cancer – WHO - classified glyphosate as probably carcinogenic to humans (category 2A). In spite of proven to have carcinogenic activity in animals, this compound was approved by European Commission for the use by the end of 2022.

The mechanism of genotoxicity of glyphosate its herbicide preparation – Roundup 360 PLUS and its metabolite – AMPA has not been determined until now. No impact assessment has been made on human epigenom in the range of concentrations corresponding to potential environmental or occupational exposure. Therefore, considering the continuous increase in the use of glyphosate in herbicide preparations used in agriculture, Further research seems to be necessary to provide relevant information in this area and may contribute to reducing the risk of potential DNA damage and cancer development.

The aim of the study was to determine the effect of glyphosate, its herbicidal formulation - Roundup 360 PLUS and the metabolite AMPA on human peripheral blood mononuclear cells and to compare the genotoxicity and impact of these xenobiotics on selected epigenomic parameters. The cells were incubated with investigated xenobiotics in various concentration ranges corresponding to environmental and occupational exposures. The analysis included SSBs and DSBs of DNA using alkaline and neutral version of the comet assay, respectively. Detection of oxidative DNA damage of purines and pyrimidines was conducted using human 8-oxoguanine DNA glycosylase and endonuclease III. An analysis of the kinetics of DNA repair of the resulting DNA damage was performed using alkaline version of the comet assay. The ability to DNA adducts formation by the tested compounds and preparation with DNA was verified by the plasmid relaxation assay (pUC19). The possibility of generating reactive oxygen species, including the hydroxyl radical was measured by flow cytometry with the using of the fluorescence of the probe

– 6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂DA) and 3'-(p-hydroxyphenyl)-fluorescein (HPF). The analysis included global DNA methylation by colorimetric measurement of 5-methylcytosine in DNA and methylation at promoter regions of tumor suppressor (*P16*, *P21*, *TP53*) and protooncogenes genes (*BCL2*, *CCND1*) by methylation specific PCR. The expression profile of these genes was also evaluated, as well as genes related to epigenetic processes: genes involved in the DNA methylation process (*DNMT1*, *DNMT3A*), DNA demethylation (*TET2*, *TET3*) and genes involved in the modification of histone proteins (*EHMT1*, *EHMT2*, *HDAC3*, *HDAC5*) by real-time PCR.

Part of the work on the assessment of DNA damage was made due to the collaboration with Prof. Katarzyna Woźniak from Department of Molecular Genetics, University of Lodz. Experience in the field of epigenetics was carried out as part of an internship at the Nofer Institute of Occupational Medicine and due to the collaboration with Assoc. Prof. Edyta Reszka from Department of Molecular Genetics and Epigenetics of IMP.

Obtained results indicate that the tested compounds and pesticidal preparation induced SSBs and DSBs of DNA and caused purines and pyrimidines oxidation. Both glyphosate, AMPA and Roundup 360 PLUS are not capable of creating adducts with DNA, while they lead to increase in ROS (including [•]OH) level in the incubated cells. Roundup 360 PLUS has the most genotoxic effect compared to glyphosate and AMPA (already at a concentration of 5 μM it causes a number of DNA damages). Observed changes were not associated with direct interaction of xenobiotics studied with DNA (none adducts formation has been observed) but the most probably they occurred as indirect effect of these substances on DNA through ROS induction.

Obtained results indicate a significant reduction of the level of global DNA methylation as a result of PBMCs exposure to tested xenobiotics. Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA change the methylation within the promoters of *P21* and *TP53* suppressor genes, and for Roundup 360 PLUS also *BCL2* protooncogene. The compounds and herbicide formulation change the expression profile of genes involved in key epigenetic processes (*CCND1*, *DNMT1*, *TET2*, *HDAC3*; *P16* and *TP53* – for glyphosate and Roundup 360 PLUS, and *P21* and *BCL2* - for glyphosate itself), resulting in the disorder of the above mentioned molecular mechanisms. Changes in the epigenome may result in chromatin modification and cell cycle disrupt, which may result in tumor proliferation.

Ewelina Woźniak
25.08.2018r.