

Marta Kwiatkowska

Paweł Jarosiewicz

Bożena Bukowska

GLIFOSAT I JEGO PREPARATY – TOKSYCZNOŚĆ, NARAŻENIE ZAWODOWE I ŚRODOWISKOWE

GLYPHOSATE AND ITS FORMULATIONS – TOXICITY,
OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE

Uniwersytet Łódzki / University of Lodz, Łódź, Poland

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska / Faculty of Biology and Environmental Protection,
Department of Environmental Pollution Biophysics

STRESZCZENIE

Glifosat (*N*-fosfonometyloglicyna) to składnik preparatów herbicydowych, stosowanych do ochrony upraw rolniczych i ogrodnictw. W artykule analizie poddano dane (głównie z publikacji z lat 2010–2013) dotyczące działania glifosatu i zawierających go preparatów w ostatnim dziesięcioleciu. Omówiono także narażenie zawodowe na ten związek. Początkowe doniesienia o rzekomej biodegradowalności glifosatu w środowisku okazały się błędne. Stwierdzono, że zostaje on w glebie i z wodami podziemnymi może docierać do ludzi. Według najnowszych publikacji glifosat u ludzi wykrywany jest w niskich stężeniach we krwi. Badania wskazują też na związek między stosowaniem glifosatu a zachorowalnością ludzi na raka. Publikacje przytoczone w niniejszym artykule, które wskazują na możliwość indukcji zmian nowotworowych przez ten herbicyd, spowodowały kontrowersje i zaniepokojenie w świecie naukowym. Opisuując w niniejszej pracy niekorzystne działanie glifosatu i jego preparatów, skupiono się także na publikacjach dotyczących jego roli w zaburzeniach hormonalnych poprzez hamowanie ekspresji białka StAR (steroidogenic acute regulatory protein) oraz inhibicję aromatazy. Przedstawiono informacje wskazujące na to, że preparaty zawierające glifosat mogą zachowywać się jak typowe modulatory hormonalne. Opisano proces tworzenia reaktywnych form tlenu (RFT) pod wpływem działania glifosatu oraz zmiany w systemie redox komórki. Omówiono jego wpływ na nekrozę i apoptozę komórek. Ponadto scharakteryzowano jego wpływ na aktywność acetylocholinoesterazy, wykazując, że glifosat jako herbicyd fosfonianowy nie hamuje bezpośrednio aktywności tego enzymu. Zauważono, że liczne prace zgodnie wskazują na wyższą toksyczność preparatów zawierających glifosat od toksyczności samej substancji czynnej. Omówione zagadnienia jednoznacznie sugerują konieczność prowadzenia dalszych prac oceniających toksyczność glifosatu i jego preparatów oraz powodowanych przez nie zagrożeń dla ludzi. Med. Pr. 2013;64(5):717–729

Słowa kluczowe: glifosat, roundup, acetylocholinoesteraza, nowotwory, zaburzenia hormonalne

ABSTRACT

Glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)glycine) is an active ingredient of the most widely used herbicide formulations in protecting agricultural and horticultural crops. Numerous results (mostly published in the years 2010–2013) concerning the action of glyphosate and its formulations in the recent decade were analyzed. Initial reports about alleged biodegradability of glyphosate in the environment turned out to be wrong. It has been shown that glyphosate remains in the soil and can reach people by spreading along with groundwater. Recent publications have shown that glyphosate is detected at low concentrations in the human blood. Publications cited in this article, which indicate a possible induction of neoplastic changes by glyphosate formulation, have raised great concern and controversy in the scientific world. Presenting adverse effects of glyphosate and its formulations we focused on the role of glyphosate formulations in hormonal disorders by impeding the expression of steroidogenic acute regulatory protein and the inhibition of aromatase activity. The impact of glyphosate on oxygen reactive species formation, changes in redox system and the effect on necrosis and apoptosis in various types of cells was shown. We also revealed that glyphosate as a phosphonate herbicide does not inhibit directly the activity of acetylcholinesterase. Based on numerous studies it was noted that commercial formulations of glyphosate exhibit higher toxicity than that of the active substance itself. The discussed problems clearly show the need to evaluate the toxicity of glyphosate and its formulations and related potential threat to humans. Med Pr 2013;64(5):717–729

Key words: glyphosate, roundup, acetylcholinesterase, cancers, hormonal disturbances

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Marta Kwiatkowska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Polska, e-mail: m.n.kwiatkowska@wp.pl
Nadesłano: 23 sierpnia 2013, zatwierdzono: 30 października 2013

WSTĘP

Rozwój technologiczny minionego wieku przyczynił się do gwałtownego wzrostu liczby ludności na całym świecie. Szacuje się, że w ciągu najbliższych 40 lat będzie żyło 9 mld ludzi (1). Stwarza to wiele wyzwań, z którymi będziemy musieli się zmierzyć. Jednym z nich jest problem głodu dotyczący większości państw trzeciego świata. Dobrym rozwiązaniem wydaje się zwiększenie wydajności upraw, dlatego w celu ochrony roślin stosuje się selektywne lub nieselektywne herbicydy. Jednym z działających nieselektywnie jest glifosat (*N*-fosfonometyloglicyna), który ma szerokie spektrum biologicznej aktywności. Wykazuje dużą skuteczność, a mechanizm jego działania obejmuje hamowanie jednego z podstawowych szlaków metabolicznych roślin.

Glifosat jest stosowany od ponad 35 lat, jednak dopiero z rozwojem technik inżynierii genetycznej i opracowaniem roślin genetycznie modyfikowanych zyskał na popularności. Obecnie jest herbicydem najczęściej stosowanym na świecie. Jego użycie gwałtownie wzrosło w ostatnich latach – np. w Niemczech od roku 1999 do 2010 aż o 100% (2).

Glifosat – dzięki zastosowaniu w roślinach modyfikacji uodporniającej je na działanie tego herbicydu – może być stosowany w uprawach GMO. Niszczy bowiem niepożądane chwasty, a jednocześnie nie hamuje wzrostu uprawianej rośliny. Wykorzystuje się go w tym celu głównie w Stanach Zjednoczonych, Argentynie i Brazylii, jednak uprawy roślin modyfikowanych genetycznie (genetically modified organisms – GMO) na całym świecie rosną w szybkim tempie. Najważniejsze rośliny genetycznie modyfikowane z odpornością na działanie glifosatu to soja, bawełna i kukurydza (2–4).

Oporność roślin genetycznie modyfikowanych na działanie glifosatu umożliwia stosowanie go na szeroką skalę jako idealnego herbicydu. Również brak szlaku szikimowego, a tym samym duża jego selektywność sprawia, że pestycyd ten jest bardzo chętnie stosowany.

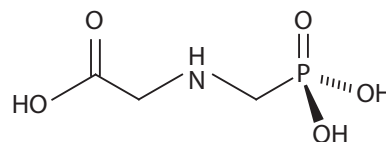
Ze względu na jego szybkie i skuteczne działanie rolnicy uważają go za bardzo dobry herbicyd. Zainteresowanie glifosatem wzrasta, a dzięki dużemu popytowi na rynku pojawiły się już dziesiątki preparatów zawierających glifosat jako składnik aktywny. Zdecydowanie najpopularniejszym z nich jest Roundup firmy Monsanto. Niestety często substancje dodawane do preparatów w celu poprawienia efektywności działania glifosatu powodują, że staje się on bardziej toksyczny dla środowiska.

Rozwój molekularnych metod badawczych i wzrost potencjalnego narażenia na glifosat coraz większej części społeczeństwa powoduje, że wiele ośrodków naukowych wnikliwie bada zarówno substancję aktywną, jak i produkcyjne zanieczyszczenia oraz metabolity glifosatu. Najważniejsze jest jednak badanie łącznego działania surfaktantów i substancji czynnej, ponieważ jest to forma, na którą środowisko naturalne jest narażone najczęściej. Szerokie wykorzystanie tych związków sprawia, że ich duża część trafia do środowiska w sposób niekontrolowany.

W przeszłości wielokrotnie miały miejsce pomyłki związane z wprowadzaniem i powszechnym stosowaniem „bezpiecznych” pestycydów (np. dichlorodifenylo-trichloroetanu, parakwatu, kwasu 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego itd.) oraz ich późniejsze wycofanie ze względu na wykazaną dużą toksyczność (5).

BUDOWA CHEMICZNA

Glifosat zalicza się do herbicydów fosfonianowych. Jest pochodną kwasu fosfonowego połączonego z glicyną (ryc. 1).



Ryc. 1. Wzór chemiczny glifosatu
Fig. 1. Chemical structure of glyphosate

W celu zwiększenia skuteczności działania glifosatu stosuje się różne modyfikacje jego cząsteczki. Występuje on w postaci kwasu, soli amonowej, sodowej, potasowej, soli izopropylowej oraz jako sól trimetylosiarczanu. Postać soli izopropylowej glifosatu jest najbardziej popularna w preparatach pestycydowych.

Dzięki hydrofilności, czyli powinowactwu do cząsteczek wody, glifosat jest świetnie rozpuszczalny w wodzie. Jego rozpuszczalność wynosi 10–15,7 g/l w temperaturze 25°C (6). Glifosat jest również praktycznie nierozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych, dzięki czemu zdaniem Pieniążek i wsp. (7) nie powinien rozpuszczać się w tłuszczach, czyli ulegać bioakumulacji w tkankach zwierzęcych.

W przeciwieństwie do ww. autorów Sandrini i wsp. (8) sugerują, że niektóre organizmy (kręgowce i bezkręgowce) mogą wykazywać zdolność akumulacji glifosatu. Z kolei Watts (9) zwraca uwagę, że glifosat i jeden z jego metabolitów – kwas (aminometylo)-

fosfonowy (aminomethylphosphonic acid – AMPA) – są umiarkowanie trwałe w środowisku i wykrywalne w wodzie deszczowej. Ponadto wykazują zdolność akumulacji w wodzie powierzchniowej i glebie poprzez powinowactwo do fazy mineralnej gleby.

MECHANIZM DZIAŁANIA

Glifosat stosowany jest do niszczenia zbędnej roślinności na polach uprawnych, w ogrodach i zbiornikach wodnych oraz na torach kolejowych. Pestycyd ten jest herbicydem nieselektywnym, działającym na jedno- i wieloletnie trawy oraz rośliny szerokoliste. Czyni to z niego świetny preparat do odchwaszczania dużych powierzchni porośniętych przez różne gatunki roślin niepożądanych (10).

Glifosat wnika do roślin poprzez ich zielone części (liście, zielone pędy i niezdrewniałą korę), a następnie zostaje rozprowadzony wraz z wodą i asymilatami do innych organów rośliny. Rozprowadzanie glifosatu po roślinie określono jako samoregulujące, ponieważ herbicyd ten ogranicza działanie tkanki asymilującej dwutlenek węgla w liściach zielonych i w wyniku tego hamuje proces fotosyntezy. Redukcja fotosyntezy ogranicza transport zarówno asymilatów, jak i glifosatu, którego stężenie w liściu wzrasta. Zjawisko to zostało zaobserwowane w trzcinie cukrowej (11).

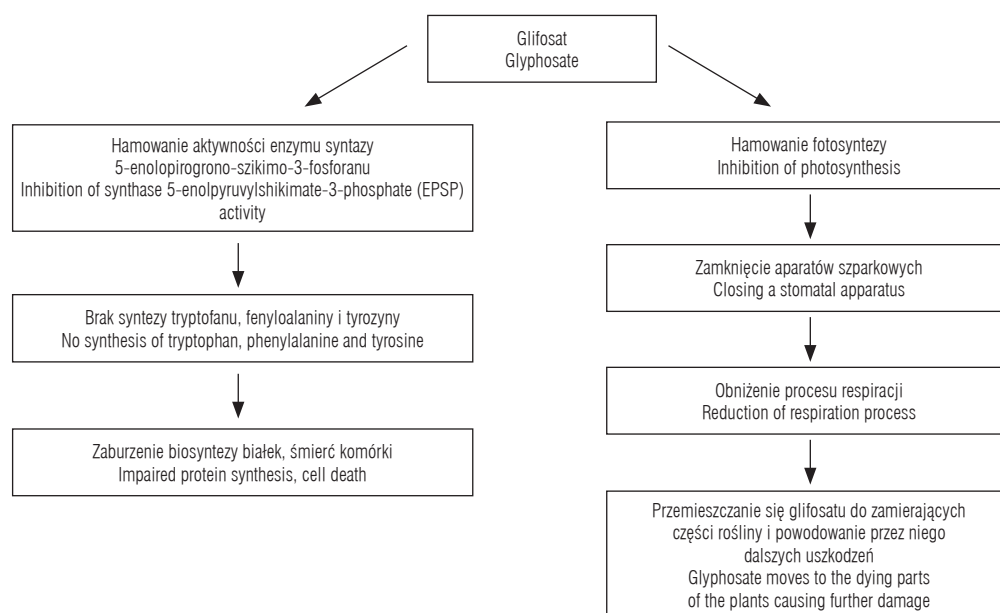
Głównym mechanizmem działania glifosatu jest hamowanie aktywności syntazy 5-enolpirogro-

szikimo-3-fosforanu (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate – EPSP), który jest kluczowym enzymem szlaku szikimowego występującego we wszystkich mikroorganizmach, grzybach i roślinach. Enzym ten nie występuje u zwierząt, dlatego glifosat ze względu na główny mechanizm działania uznawany jest za nietoksyczny dla zwierząt (ryc. 2) (4).

Inną metodą działania glifosatu jest desykacja, czyli wysuszenie roślin, spowodowane zaburzeniami cyklu fotosyntezy. Proces ten rozpoczyna się od zamknięcia aparatów szparkowych rośliny w następstwie ograniczenia procesu respiracji. Nie jest to jednak metoda wykorzystywana tylko do zwalczania chwastów. Z wykorzystaniem glifosatu dosusza się zbiory zboża i rzepaku. W ten sposób wyrównuje się również szybkość dojrzewania i zapobiega wtórnemu zachwaszczeniu (ryc. 2) (12).

PREPARATY ZAWIERAJĄCE GLIFOSAT

Obecnie na rynku występuje bardzo duża liczba środków zawierających ten związek. Są to herbicydy stosowane do niszczenia roślin niepożądanych, takich jak chwastnica jednostronna, gwiazdnica pospolita, mak polny, miotła zbożowa, owies głuchy i wiele innych. Do preparatów zawierających glifosat zalicza się m.in: Avans Premium 360 SL, Dominator 360 SL, Roundup 360 SL, Roundup Max 680 SG, Roundup Strong 540 SL (10).



Ryc. 2. Mechanizm działania glifosatu (11,13,14)

Fig. 2. The mechanism of glyphosate action (11,13,14)

Adiuwanty i kondycjonery wody

Preparaty stosowane do zwalczania roślinności niepożądaną zawierają oprócz substancji czynnej glifosatu również wiele substancji polepszających działanie herbicydu – tzw. adiuwanty. Do takich związków zaliczają się środki powierzchniowo czynne – surfaktanty. Doskonałym surfaktantem jest polioksyetylenoamina (polyoxyethylene amine – POEA), która ułatwia adsorpcję i zwiększa efektywność wnikania preparatu do tkanek roślinnych. Niestety dodatkowe substancje często okazują się bardziej toksyczne niż sam glifosat (4).

Często adiuwanty, które dobrze spełniają swoją rolę przy wchłanianiu przez kutikulę substancji aktywnej do rośliny, nie niwelują niekorzystnego oddziaływania na glifosat soli mineralnych zawartych w wodzie. W roztworach przygotowanych do oprysku glifosat występuje w formie anionu i ma silne powinowactwo do związków mineralnych, a zwłaszcza kationów magnezu i wapnia oraz innych metali występujących w wodzie. Obecność tych jonów powoduje powstawanie nierozpuszczalnych soli, które nie wnikają do zielonych części roślin (3). Powoduje to zatrzymanie preparatu na powierzchni liścia i znaczne zmniejszenie jego wydajności. W konsekwencji oznacza to stosowanie większych ilości herbicydu.

Funkcję tworzenia nieaktywnych soli i kompleksów z kationami zawartymi w wodzie, oraz wynikającej z niej ochrony anionu glifosatu, spełniają kondycjonery wody. Najpopularniejszym związkiem mającym te właściwości jest siarczan amonu – stosowany również jako nawóz, może wychwytywać z roztworu jony wapnia, magnezu, sodu i innych metali (z wyjątkiem żelaza). Oprócz tego ma właściwości ułatwiające wnikanie glifosatu do rośliny, poprzez kation amonowy, który wzmacnia działanie pompy protonowej i dzięki temu zwiększa intensywność wnikania herbicydu do komórki (3).

METABOLIZM GLIFOSATU

Kolejną zaletą związku jest słaba wchłanialność herbicydu w przewodzie pokarmowym i jego szybkie wydalanie z ustroju. Wchłanianie glifosatu po podaniu dostępnym wynosi około 30–36%. Dawka ta jest wydalana z moczem w ciągu 6 dni na poziomie 97,5% (15).

Największą trwałością w cząsteczce glifosatu cechuje się wiązanie między fosforem a atomem węgla. W roślinach poddanych działaniu herbicydu nie stwierdzono obecności produktów świadczących o degradacji tego wiązania (5). Głównym produktem rozpadu glifosatu w roślinach, ziemi i wodzie jest AMPA, który powstaje w wyniku hydrolizy herbicydu. Kwas (aminomety-

lo)fosfonowy ma dłuższy czas półtrwania od glifosatu oraz różni się od niego mechanizmem działania, który niestety wciąż nie jest dobrze poznany. Wiadomo natomiast, że nie cechuje się toksycznością większą niż glifosat (16,17).

TOKSYCZNOŚĆ GLIFOSATU

Glifosat wykazuje niską toksyczność dla szczurów – dawka śmiertelna (lethal dose – LD₅₀) dla tych zwierząt wynosi 4873 mg/kg m.c. Niska retencja w tkankach szczurów wynika z tego, że glifosat jest związkiem rozpuszczalnym w wodzie (18). Nie jest również związkiem lotnym i w związku z tym zagrożenie zatruciem glifosatem przez drogi oddechowe jest niewielkie (19).

Wraz ze zwiększeniem upraw roślin modyfikowanych genetycznie w zakresie odporności na glifosat wzrasta narażenie na ten herbicyd. Wprowadzając na rynek Unii Europejskiej soję Roundup Ready (soja RR), 200-krotnie zwiększono europejską normę pozostałości glifosatu w ziarnie (z 0,1 mg/kg do 20 mg/kg) (20). Jak podaje Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO), soja RR zawiera nawet do 17 mg glifosatu na 1 kg ziarna (21).

Jak pokazuje analiza kanadyjskich badaczy Arisa i Leblanca (22), glifosat był wykrywany we krwi ludzi nienarażonych bezpośrednio na podwyższone dawki tego pestycydu w stężeniu 73,6±28,2 ng/ml krwi.

W przypadku zatruc glifosatem jego zawartość we krwi pacjentów waha się średnio od 61 mg/l (0,6–150 mg/l) w zatruciach łagodnych do 4146 mg/l (690–7480 mg/l) w przypadku zatruc prowadzących do śmierci (19 osób na 601 pacjentów) (23). Po zatruciu glifosatem drogą pokarmową można zaobserwować nasilone objawy kliniczne (niewydolność oddechową i zaburzenia rytmu serca). Zatrucia kończące się śmiercią związane są z ilością spożytego herbicydu (więcej niż 190 ml) i jego poziomem we krwi wyższym niż 734 mg/l (24).

Narażenie zawodowe

Grupą zawodową najbardziej narażoną na toksyczne działania środków herbicydowych są rolnicy. Wykorzystując je w swoich gospodarstwach, mają z nimi bezpośredni kontakt podczas wykonywania rutynowych prac, tj. przygotowywania roztworów użytkowych preparatów handlowych, przeprowadzania oprysków, czyszczenia i naprawy aparatury, ale również na skutek wypadków i pomyłek.

Pomiary zanieczyszczenia powietrza podczas wykonywania typowych prac z zastosowaniem pestycydów są konieczne, żeby stężenia substancji toksycznych w tych warunkach nie przekraczały wartości najwyższych dopuszczalnych stężeń (NDS), uznanych za bezpieczne dla człowieka. Dla glifosatu NDS wynosi 10 mg/m^3 (25).

Części ciała szczególnie narażone na działanie pestycydów to ręce, uda, podudzia, przedramiona, oczy, twarz, tułów i stopy. W zależności od rodzaju wykonywanej pracy i formy preparatu związki herbicydowe mogą przenikać do organizmu przez skórę, układ oddechowy i rzadziej – przez układ pokarmowy (np. poprzez przypadkowe połknięcie preparatu) (26).

Każdego roku na świecie odnotowuje się około 3 mln zatruc pestycydami, z czego 220 tys. śmiertelnych (27). W Polsce w 2000 r. (28) odnotowano 107 przypadków zatruc pestycydami. Liczba ta była mniejsza od odnotowanej w roku 1998 (118 przypadków) (28) i 1999 (121 przypadków) (28). Przeważały zatrucia w wyniku doustnego przyjęcia trucizny (80 przypadków). Zgony w 2000 r. wystąpiły tylko u osób, które spożyły preparat w celach samobójczych (7 osób) (28). Liczba zatruc uległa zwiększeniu w 2001 r., w którym zanotowano 220 przypadków (29).

Pokazuje to, że konieczna jest ocena ryzyka u osób wykonujących zabiegi z wykorzystaniem środków ochrony roślin. Wynika ona z Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009/EC (30), którego przepisy regulują całość zagadnień związanych z bezpieczeństwem stosowania pestycydów w rolnictwie, włączając w to kryteria oceny dokumentacji toksykologicznej dla chemicznych i biologicznych środków ochrony roślin.

Ocena ryzyka u osób, które mają kontakt z preparatami herbicydowymi, jest jednym z najważniejszych etapów w procesie oceny toksykologicznej (31). Szerokie rozpowszechnienie preparatów zawierających glifosat sprawia, że monitorowanie ich szkodliwości i stopnia ekspozycji ma ogromne znaczenie w szacowaniu ryzyka zdrowotnego i przewidywaniu odległych skutków zdrowotnych.

Mimo dużej ilości stosowanego glifosatu i wiążące się z tym bezpośredniego narażenia pracowników wykonujących zabiegi z wykorzystaniem zawierających glifosat środków ochrony roślin, poważne zatrucia zdarzają się stosunkowo rzadko. Ma to związek z niskim wchłanianiem glifosatu przez skórę, układ oddechowy i inne drogi narażenia. Glifosat uznawany jest za związek umiarkowanie toksyczny (32).

Również badania monitoringowe, prowadzone wśród rolników pracujących przy spryskiwaniu terenu glifosa-

tem, nie wykazały niepokojących poziomów herbicydu w moczu. Wartości wahały się od niewykrywalnych (33) przez 3 ppb (34) do 1,5–2,5 $\mu\text{g/ml}$ (35). Poważne zatrucia zdarzają się w wyniku przypadkowego lub celowego połknięcia glifosatu. Zatrucia ostre glifosatem występują rzadko – wiąże się to z wysoką wartością LD_{50} (dla szczurów – 4873 mg/kg m.c.) i niskim wchłanianiem glifosatu po podaniu doustnym (30–36%).

Narażenie środowiskowe

Największe uprawy zbóż odpornych na glifosat prowadzone są w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Brazylii i Argentynie. Szczególnie w Argentynie zauważono bardzo duży wpływ upraw o tej charakterystyce na środowisko naturalne. Badania przeprowadzone w okolicach Buenos Aires wykazały, że glifosat jest obecny w dużych ilościach w wodzie (0,1–0,7 mg/l) i glebie (0,5–5 mg/kg) (36).

Obecność glifosatu stwierdzono także w domach farmerów i wydalonym moczu u osób mieszkających w pobliżu upraw rolnych, w których wykorzystuje się ten herbicyd (37). Również żywność może zawierać glifosat – w stężeniach od ledwie wykrywalnych do 20 mg/kg w jęczmieniu i soi (37). Z kolei w ziarnach zbóż stężenie glifosatu waha się od 0,1 do 9,5 mg/kg (37). Roundup może dostawać się do organizmu drogą powietrzną podczas oprysków (38,39).

Narażenie ludzi na glifosat pociąga za sobą konieczność zwiększenia kontroli i wykonywania wnikliwych badań nad glifosatem i zawierającymi go preparatami do zwalczania niepożądanego roślności.

Garry i wsp. (40) stwierdzili, że w wyniku narażenia środowiskowego na glifosat i jego preparaty mogą wystąpić problemy z prawidłowym rozwojem płodu u kobiet. Badania przeprowadzono na terenie stanu Minnesota – jednego z najbardziej rolniczych obszarów w Stanach Zjednoczonych. Badaniem objęto 695 rodzin i 1532 dzieci w latach 1997–1998. Badania dotyczyły nie tylko herbicydów, ale również fungicydów i insektycydów. Stwierdzono, że u rodzin farmerów stosujących wszystkie rodzaje pestycydów procent dzieci z wadami wrodzonymi wynosił 15,4, a u rodzin farmerów stosujących tylko herbicydy – 6,8.

Kolejnym ważnym zagadnieniem w badaniu Garry'ego i wsp. (40) było porównanie stanu zdrowia i ilości wad wrodzonych dzieci poczętych w okresie jesiennym i wiosennym, ponieważ największe opryski stosuje się podczas wiosny. Procent dzieci z wadami wrodzonymi, których poczęcie nastąpiło podczas jesieni, wyniósł 3,7, a podczas wiosny – 7,6 (40).

Toksyczny wpływ na komórki

W badaniach Heu i wsp. (41) wykorzystano ludzkie keratynocyty linii HaCaT. Glifosat w stężeniach 5–70 mM inkubowano z komórkami. Inkubację przeprowadzano w czasie 0,5–18 godzin. Wartości stężenia, w których został zahamowany wzrost połowy komórek (half maximal inhibitory concentration – IC_{50}), zmieniały się wraz z czasem inkubacji. Dla czasu 0,5–1 godziny stężenie IC_{50} wynosiło 53 mM, dla 2–4 godzin – ok. 43 mM, a dla 6–18 godzin – 30 mM.

Dwoma głównymi mechanizmami prowadzącymi do apoptozy komórek pod wpływem glifosatu było powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) oraz zmiana potencjału błonowego mitochondriów (41). Autorzy analizy wykazali małą toksyczność glifosatu. Stężenie rzędu 53 mM przy narażeniu 0,5–1-godzinnym jest mało prawdopodobne do osiągnięcia w organizmie człowieka.

Z kolei badania prowadzone na komórkach wątroby szczura przy stężeniach 1–10 mM nie wykazały zmian w śmiertelności tych komórek (42). Inkubacje prowadzono przez 4–24 godzin. Zaobserwowano natomiast spadek potencjału błony mitochondrialnej i zmniejszenie jej przepuszczalności. Także Clair i wsp. (38) wykazali, że potencjał błony mitochondrialnej komórek jąder szczura maleje wraz ze wzrostem stężenia glifosatu w zakresie stężeń 0,01–1%. Stwierdzono wyciek z matrix mitochondrium cytochromu c. Taka zmiana jest charakterystyczna dla indukcji apoptozy szlakiem wewnętrznym (mitochondrialnym).

Porównanie toksyczności czystego glifosatu z jego preparatem pestycydowym

Jak już wspomniano, preparaty pestycydowe takie jak Roundup charakteryzują się 17–32 razy większą toksycznością od glifosatu. Główną przyczyną tego zjawiska są związki powierzchniowo czynne, które zmieniają właściwości herbicydu (7).

Bukowska i wsp. (12) przeprowadzili badania w celu porównania toksyczności działania czystego, aktywnego związku z jego handlowym preparatem – Roundup 360 SL (prod. Monsanto, Belgia). Stwierdzono, że większe uszkodzenia erytrocytów człowieka w postaci większej hemolizy i peroksydacji lipidów występują po inkubacji tych komórek z preparatem herbicydowym Roundup 360 SL (12). Zaobserwowano również silniejsze utlenianie hemoglobiny i większy spadek aktywności acetylocholinoesterazy (acetylcholinesterase – AChE) w porównaniu z substancją czynną, czyli glifosatem (43).

Nie zawsze też wyższe stężenie glifosatu w preparacie oznacza większą toksyczność. W badaniach przeprowadzonych przez Gasnier i wsp. (44) wykazano, że preparat zawierający glifosat w stężeniu 400 g/l jest bardziej toksyczny od preparatu o stężeniu 450 g/l. W badaniach wykorzystano linię ludzkich komórek wątroby HepG2. Analizie poddano 4 preparaty marki Roundup (prod. Monsanto, Belgia), które zawierają różne stężenia glifosatu: Roundup Express® (7,2 mg/l), Bioforce® (360 mg/l), Grands Travaux® (400 mg/l) i Grands Travaux Plus® (450 mg/l).

Pierwsze objawy toksyczności odpowiadające 10% zmian powodowanych przez czysty glifosat uznano za wartość odnośnikową, równą 1 (100%). Zmiany powodowane przez różne dawki Roundupu obliczano w stosunku do zmian wywoływanych przez czysty glifosat. Stwierdzono, że powszechnie stosowane na rynku preparaty Roundup cechują się wyższą toksycznością niż czysty glifosat. Również LC_{50} było znacznie niższe w przypadku preparatów pestycydowych niż samego glifosatu.

Indukcja stresu oksydacyjnego

Pestycydy mogą wywoływać stres oksydacyjny poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu, które mogą powstać w wyniku zaburzenia transportu elektronów w błonie mitochondrialnej, inaktywację enzymów antyoksydacyjnych lub poprzez peroksydację lipidów budujących błonę komórkową. Równowaga między czynnikami antyoksydacyjnymi a reaktywnymi formami tlenu jest bardzo ważna dla zachowania homeostazy w komórkach. W wyniku zaburzeń równowagi dochodzi do zmian w DNA i ostatecznie do śmierci komórki (45).

Peroksydacja lipidów może wywołać nieodwracalne zmiany w budowie błon wewnątrzkomórkowych i błony plazmatycznej. Dla przykładu uszkodzenie błony krwinek czerwonych może prowadzić do ich wcześniejszego usuwania z krwioobiegu. Pieniążek i wsp. (43) oznaczyli wpływ glifosatu na erytrocyty człowieka. W badaniach wykazali, że związek ten dopiero przy bardzo wysokich stężeniach – rzędu 1000–1500 ppm – i 5-godzinnej inkubacji powoduje niewielką peroksydację lipidów, utlenianie hemoglobiny oraz podwyższa aktywność katalazy. Z kolei po 24 godzinach inkubacji indukuje tylko 3,12% hemolizy krwinek czerwonych przy najwyższym stężeniu.

Beuret i wsp. (46) wykazali, że glifosat wzmaga w wątrobie szczurów peroksydację lipidów i powstawanie RFT, takich jak tlen singletowy, rodnik hydroksylowy oraz rodnik wodoronadtlenkowy. Zasugerowali, że 1-procentowy glifosat podawany codziennie w wodzie pitnej samicom szczurów w 21. dniu ciąży i pośred-

nio ich płodom powoduje powstawanie wolnych rodników na skutek zmniejszenia aktywności peroksydazy glutationowej w tych komórkach.

Niskie dawki tego herbicydu (36 ppm) podawane szczurom przez 30 min powodują stres oksydacyjny, który aktywuje wiele szlaków prowadzących przed okresem dojrzewania do śmierci komórek Sertoliego, czyli podporowych komórek kanalika nasiennego wspomagających i kontrolujących proces spermatogenezy (47).

Zmiany w aktywności AChE

Glifosat zalicza się do związków fosfonianowych (w których występuje wiązanie między fosforem a węglem), wykazujących odmienne właściwości od związków fosforoorganicznych. Nie można go uznać za bloker kompetycyjny acetylocholinoesterazy, tak jak to jest w przypadku insektycydów fosforoorganicznych.

W badaniach przeprowadzonych przez Kwiatkowską i wsp. (48) oceniano wpływ glifosatu jego podstawowych metabolitów i produkcyjnych zanieczyszczeń na aktywność acetylocholinoesterazy obecnej w błonach erytrocytów człowieka. Badania wykazały, że fosfoniany, takie jak glifosat i jego metabolity, oraz produkcyjne zanieczyszczenia nie powodują dużych zmian w aktywności AChE w porównaniu ze związkami fosforoorganicznymi indukującymi taką inhibicję. Insektycyd fosforoorganiczny – chlorfenwinfos – wykazuje po godzinnej inkubacji z erytrocytami człowieka inhibicję kompetycyjną błonowej AChE już przy stężeniu 0,05 μM , a bromfenwinfos przy stężeniu 0,1 μM (49). Są to więc

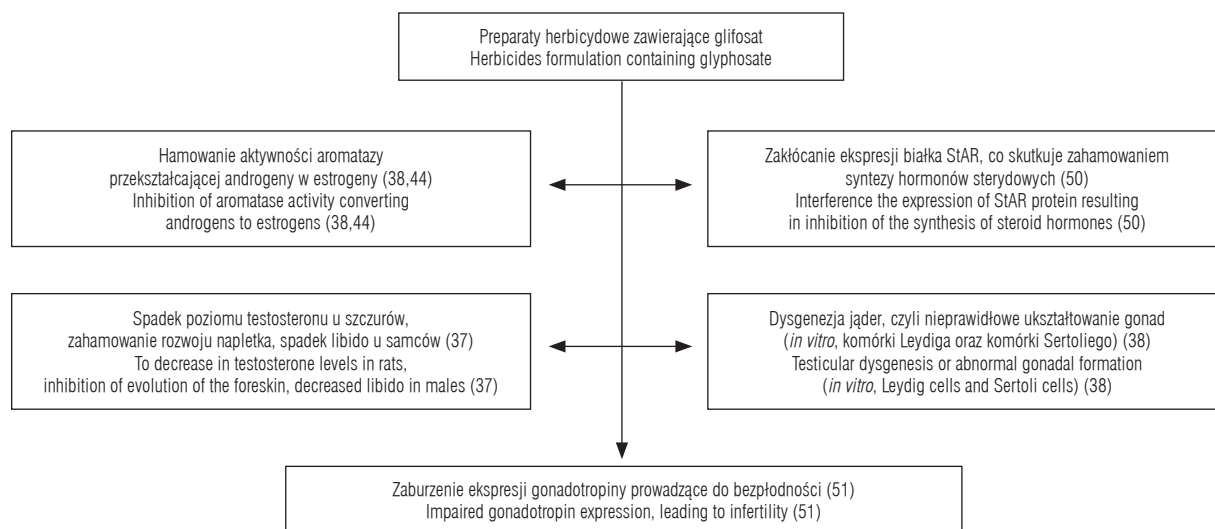
stężenia nieporównywalnie mniejsze niż te, przy których następuje spadek aktywności AChE indukowany przez glifosat (500 μM).

Z kolei Sandrini i wsp. (7) wykazali, że 50-procentowa inhibicja aktywności acetylocholinoesterazy w przypadku małża *Perna perna* następowała przy stężeniu glifosatu w wodzie rzędu 0,75–1 mM. W przypadku ryb *Danio rerio* i *Jenynsia multidentata* zahamowanie było mniejsze i następowało przy wyższych stężeniach glifosatu, odpowiednio: 3,75–7,5 mM i 7,5–15 mM. Należy jednak podkreślić, że są to stężenia 1000-krotnie wyższe od tych, które zanotowano w wodach powierzchniowych w okolicach Buenos Aires (ok. 4,14 μM).

Glifosat jako modulator hormonalny

Najnowsze wyniki badań wskazują, że preparaty zawierające glifosat mogą zachowywać się jak typowe modulatory hormonalne (endocrine disrupting compounds – EDCs), czyli mogą znacząco wpływać na układ wydzielania wewnętrznego. Głównym zagrożeniem wynikającym z obecności EDCs w środowisku jest opóźnianie dojrzewania zwierząt i zmiana stężeń hormonów płciowych w ich organizmach (ryc. 3).

Ekspozycja samców szczurów na glifosat może powodować zakłócenie procesu spermatogenezy i prowadzić do bezpłodności (47). Niskie dawki Roundupu (36 ppm) powodują stres oksydacyjny w komórkach Sertoliego u szczurów, który aktywuje wiele szlaków prowadzących do śmierci tych komórek przed okresem dojrzewania.



Ryc. 3. Preparaty herbicydowe zawierające glifosat jako modulator hormonalny
Fig. 3. Herbicides formulation containing glyphosate as a hormonal modulator

Jedną z przyczyn powstawania zaburzeń w układzie hormonalnym jest zjawisko hamowania aktywności aromatazy (38). Jest to enzym odpowiedzialny za konwersję androgenów w estrogeny i za wytwarzanie się drugorzędowych cech płciowych u osobników żeńskich.

Inną drogą zaburzenia syntezy hormonów steroidowych jest zakłócanie ekspresji białka StAR (steroidogenic acute regulatory protein), odpowiedzialnego za regulację syntezy hormonów steroidowych (50). Zaburzenia w aktywności aromatazy oraz zakłócenia związane ze stężeniem androgenów i estrogenów mogą prowadzić do licznych powikłań. Najpoważniejszymi z nich są zaburzenia podziałów komórek płciowych, metabolizmu kości i wątroby, a nawet wystąpienie raka piersi lub raka prostaty (44).

Kolejną przyczyną nieprawidłowości związanych z produkcją androgenów jest toksyczny wpływ na komórki znajdujące się w jądrach. Obecnie coraz większym problemem u organizmów zwierzęcych jest dysgenезja jąder, czyli nieprawidłowe ukształtowanie gonad. W pracy Clair i wsp. (38) badano komórki Leydiga, czyli komórki śródmiąższowe odpowiedzialne za produkcję androgenów, oraz komórki Sertoliego. W badaniach wykorzystywano stężenia 1–10 000 ppm preparatu Roundup Bioforce®, w którym stężenie glifosatu wynosi 360 g/l.

Testy przeprowadzono na jądrach pozyskanych od dojrzałych szczurów rasy Sprague-Dawley. Już przy stężeniu 1 ppm Roundupu i glifosatu zaobserwowano spadek poziomu testosteronu o 35%. Największe różnice w odpowiedzi na wymienione herbicydy odnotowano w przypadku komórek Leydiga. Glifosat nie wpływał znacząco na komórki we wszystkich wariantach hodowli, natomiast Roundup powodował znaczące zmiany w budowie błony komórkowej i nekrozę komórek od stężenia 1000 ppm po 24 godzinach hodowli. Zaburzenia hormonalne w komórkach jąder mogą prowadzić do spadku produkcji spermy i zmniejszenia liczby aktywnych plemników (38). Należy jednak podkreślić, że zmiany były indukowane dopiero przy bardzo wysokich dawkach.

Z kolei badania przeprowadzone przez Romano i wsp. (37) na 68 szczurach rasy Wistar miały na celu określenie wpływu preparatu herbicydowego zawierającego glifosat na dojrzewanie szczurów, prawidłowy rozwój ich jąder i nadnerczy oraz stężenie hormonów steroidowych. Preparatem zawierającym glifosat był Roundup Transorb (prod. Monsanto, Brazylia), który ma w składzie 480 g/l glifosatu, 648 g/l soli izopropylu i 594 g/l innych substancji, w tym surfaktantów. Preparat herbicydowy rozpuszczony w wodzie podawano

szczurom w okresie dojrzewania, tj. od 23. do 53. dnia po porodzie. Wyznaczono grupę kontrolną, której nie podawano Roundupu, i grupy otrzymujące dawki w wysokości 5 mg/kg m.c., 50 mg/kg m.c. oraz 250 mg/kg m.c. W przypadku stężenia estrogenu i kortykosteronu nie zauważono istotnych zmian, natomiast zaobserwowano istotne zmiany w stężeniu testosteronu. Przy dawce 5 mg/kg m.c. nastąpił 30-procentowy spadek wytwarzania testosteronu w porównaniu z wynikami z grupy kontrolnej, przy 50 mg/kg m.c. – 45-procentowy, a przy 250 mg/kg m.c. – 50-procentowy. Brak istotnych zmian stężenia estrogenu może wynikać z tego, że powstaje on u samców nie tylko w jądrach i korze nadnerczy, ale również w innych częściach ciała, np. adipocytach tkanki tłuszczowej.

Dojrzałość szczurów badano na podstawie rozwinięcia napletka (37). Stwierdzono, że czas osiągnięcia dojrzałości przez szczury był zależny od stężenia środka herbicydowego w wodzie i wydłużał się wraz ze wzrostem dawki. W 52. dniu po porodzie zbadano masę jąder i nadnerczy wszystkich szczurów, a następnie z uwzględnieniem masy ich ciała wykonano przelicznik na 100 g m.c. Okazało się, że badane organy wewnętrzne uległy przerostowi u szczurów wystawionych na działanie Roundupu we wszystkich wymienionych stężeniach (37).

Gasnier i wsp. (44) wykazali, że glifosat nie wpływa niekorzystnie na estrogeny, ale zaburza działanie androgenów. W przypadku mechanizmu hamowania działania aromatazy ww. badacze dowiedli, że preparaty zawierające glifosat w różnych stężeniach działają jako inhibitory konwersji androgenów do estrogenów. Czysty glifosat nie przejawia podobnych właściwości. Wyniki badań Gasnier i wsp. (44) wskazują, że preparaty wykorzystujące glifosat są znacznie bardziej toksyczne od czystego związku. Z powyższej pracy wynika ponadto, że preparaty zawierające glifosat mogą być inhibitorami aromatazy i mogą obniżać poziom testosteronu. Inhibicja aromatazy może również prowadzić do obniżenia poziomu estradiolu, który jest ważnym czynnikiem ostatecznie określającym płeć i zachowania płciowe u dorosłego osobnika.

Zaburzenie funkcjonalności hormonów androgenicznych i estrogenicznych może oddziaływać na cechy płciowe osobników. Istnieje ryzyko wpływu Roundupu na dojrzałość płciową. W okresie okołoporodowym następuje silne płciowe różnicowanie mózgu. Proces ten u szczurów rozpoczyna się od 18. dnia ciąży, kiedy w jądrach zaczyna być produkowany testosteron, i trwa do 5. dnia po porodzie. Założeniem kolejnego badania, przeprowadzonego przez Romano i wsp. (51), było

wystawienie na działanie Roundupu samic szczyrch w okresie okołoporodowym i potencjalnie ich przyszłego potomstwa. Stwierdzono, że preparat powodował zaburzenie ekspresji gonadotropiny, która należy do hormonów glikoproteinowych występujących u kręgowców. Jej niedobór powoduje nieplodność.

W badaniach Romano i wsp. (51) wykorzystano 60-dniowe samce pochodzące od samicy narażonej na Roundup Transorb. Głównym założeniem było sprawdzenie preferencji seksualnych dorosłych osobników. Szczury przeznaczone do badania nie były poddawane innym testom. W porównaniu z grupą kontrolną szczury pochodzące z miotów narażonych na Roundup wykazywały większe zainteresowanie samicami. Jednocześnie stwierdzono u samców opóźnienie rozpoczęcia współżycia z samicami i zmniejszenie się liczby ejakulacji. Następował u nich spadek libido. Ponadto dojrzałość płciową samce osiągały w młodszym wieku, czego konsekwencją była niższa masa ciała (51).

W komentarzu de Sesso i Williams (52) do pracy Romano i wsp. (51) wykazano nieprawidłowości w przeprowadzonych badaniach – wyniki zostały oparte na niestandardowych protokołach badań. Test preferencji płciowych osobników dojrzałych powinien uwzględnić dodatkowe warunki, np. feromony wydzielane przez samce i samice. Nie można również wyciągać wniosków dotyczących glifosatu, badając preparat zawierający adiuwanty zwiększające jego toksyczność (44).

Czy glifosat może indukować nowotwory?

W 2002 r. Unia Europejska uznała, że glifosat nie jest genotoksyczny. Niestety w badaniach na całym świecie uzyskuje się wyniki sprzeczne z decyzją podjętą przez komisję Unii Europejskiej (53). Badane są jednak najczęściej preparaty herbicydowe zawierające oprócz glifosatu wiele substancji chemicznych zwiększających toksyczność, dlatego trudno jednoznacznie stwierdzić, czy glifosat jest genotoksyczny.

Na obszarze północnego Ekwadoru przeprowadzono badanie dotyczące uszkodzeń DNA u ludzi narażonych na działanie glifosatu oraz u osób niemających bezpośredniego kontaktu z tym herbicydem (54). Do grupy porównawczej wybrano 21 osób nienarażonych, a do grupy badanej – 24 osoby żyjące w rejonie największych upraw genetycznie modyfikowanych, odpornych na glifosat. Badani narażeni byli na działanie preparatu Roundup Ultra, który stanowi ponad 40% używanych herbicydów na granicy Ekwadoru z Kolumbią. Uszkodzenia badano za pomocą testu kometowego i pomiaru długości ogona DNA, świadczącej o uszkodzeniu

materiału genetycznego. Wykazano, że większy stopień uszkodzeń DNA występuje u osób narażonych na działanie preparatów herbicydowych. Długość ogona migrującego DNA u osób narażonych na glifosat wynosiła 35,5 μm , a u osób niemieszkających w pobliżu terenów uprawnych – 25,94 μm (54).

Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Manasa i wsp. (55) na komórkach wątroby człowieka, linii Hep-2, użyto glifosatu w czystej postaci. Oprócz próby kontrolnej, którą była czysta woda, użyto próby pozytywnej – mitomycyny (inhibitora replikacji DNA, używanego w chemioterapii). Mitomycyna w stężeniu 0,01 mM powoduje istotną statystycznie migrację DNA i powstawanie ogona o długości 117,1 jednostek arbitralnych (j.a). W stężeniu 3 mM glifosat powodował powstanie ogona o długości 183,6 j.a., a przy stężeniu 7,5 mM – o długości 223,4 j.a. Powyżej tego stężenia badanie nie było możliwe, ponieważ śmiertelność komórek była większa niż 80%.

Z kolei Cavas i Konen (56) zbadali uszkodzenie materiału genetycznego erytrocytów karasia złocistego. Ryba była hodowana w akwariach, w których rozpuszczono preparat Roundup zawierający glifosat o stężeniu 360 g/l. Rozcieńczenia dobrano tak, żeby uzyskać stężenia glifosatu: 5 ppm, 10 ppm i 15 ppm. Krew pobierano od ryb po 2, 4 i 6 dniach hodowli. Po 2 dniach jedynie przy stężeniu 5 ppm nie odnotowano zmian genotoksycznych. Wszystkie pozostałe próby dały podwyższony wynik uszkodzenia DNA.

Sivikova i wsp. (57) sugerują, że glifosat wykazuje działanie genotoksyczne. Autorzy inkubowali limfocyty krwi obwodowej bydła z glifosatem w stężeniach 56–1120 mmoli/l przez 24 godz., a następnie analizowali wymianę chromatyd siostrzanych (sister chromatyd exchange – SCE). Stwierdzono, że u każdego z dawców występuje istotnie statystycznie podwyższona indukcja SCE.

Ponad 90% nowotworów jest pochodzenia nabłonkowego, dlatego w pracy Koller i wsp. (58) badano komórki nabłonka wyizolowane z ust człowieka (linia TR146). Wykorzystano preparat Roundup Ultra Max, w którym wyjściowe stężenie glifosatu wynosi 450 g/l. W badaniach stwierdzono istotne zmiany w komórkach nabłonka już przy stężeniu 0,01 g/l Roundupu podczas 20-minutowej inkubacji. Praca potwierdza możliwą korelację między narażeniem na Roundup a występowaniem nowotworów (58).

Zdecydowanie najbardziej kontrowersyjna praca badawcza, której wyniki opublikowano w ostatnich latach, była autorstwa Seraliniego i wsp. (59). Dotyczyła

ona nie tylko wpływu Roundupu na organizmy żywe, ale również żywności genetycznie modyfikowanej.

W ww. badaniach wykorzystano gatunek genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy NK603 – bardzo popularnej na całym świecie. Badania przeprowadzono wśród 20 grup zawierających po 10 osobników szczurzych rasy Sprague-Dawley. Jest to rasa, u której występuje większa częstotliwość chorób nowotworowych niż w innych odmianach. Badania obejmowały 2 lata, a krew i moczu pobierano od szczurów 11 razy. Poza tym ponad 38 organów przeznaczonych do badań izolowano ze zwierząt po ich śmierci. Jako próbę kontrolną do badań wykorzystano szczury karmione kukurydzą niemodyfikowaną genetycznie.

Kukurydza NK603 była opryskiwana Roundupem WeatherMAX, w którym stężenie glifosatu wynosi 540 g/l. Szczury dostawały karmę zawierającą odpowiednie ilości transgenicznej kukurydzy oraz karmę z kukurydzą transgeniczną, przy której uprawach używano preparatu Roundup.

Pokarm dla grupy kontrolnej zawierał roślinę niemodyfikowaną genetycznie. Poza tym badane grupy szczurów otrzymywały Roundup GT Plus (450 g/l glifosatu), rozpuszczony w wodzie pitnej. Zastosowano 3 dawki. Pierwsza dawka glifosatu ($1,1 \times 10^{-8}\%$) została wyznaczona na podstawie zawartości glifosatu obecnego w wodzie w środowisku, druga (0,09%) odnosiła się do pozostałości glifosatu w paszach, a trzecia (0,5%) stanowiła połowę stężenia stosowanego w uprawach rolniczych.

Żywotność osobników ustalano na podstawie średniej długości życia osobników z grupy kontrolnej. Pierwszy przypadek zgonu dotyczył samca z grupy badanej, który musiał zostać uśpiony z powodu guza nerki większego niż 25% masy jego ciała. Nastąpiło to rok przed pierwszą śmiercią zwierzęcia z grupy kontrolnej. Pierwsza samica z grupy badanej padła z powodu gruczolakowłókniaka piersi 246 dni przed pierwszym zgonem zwierzęcia z grupy kontrolnej. Ten łagodny guz powstaje pod wpływem nadmiaru estrogenów w organizmie. Aż 93% wszystkich przypadków nowotworów u samic stanowił właśnie ten rodzaj guza (59).

Samice wykazywały znacznie większą wrażliwość na obecność Roundupu w wodzie niż samce i aż 5 razy częściej występowały u nich duże guzy. Po 24 miesiącach badań w grupie kontrolnej guzy miało 30% osobników, a w grupach badanych – 50–80%. Najwięcej przypadków zanotowano w grupie badanej, której podawano wodę pitną z Roundupem w najniższym stężeniu, przy czym u większości osobników stwierdzono więcej niż

jeden rodzaj nowotworu. Mogło to wynikać z wpływu surfaktantów, czyli substancji powierzchniowo czynnych, obecnych w preparacie.

Z omówionych doniesień wynika, że u samców nowotwory najczęściej atakowały wątrobę, nerki i skórę, a u samic – piersi i przysadkę mózgową. W przypadku badanych hormonów największym odstępstwem od normy był aż 2-krotny wzrost stężenia estradiolu u samic. Śmiertelność samic karmionych genetycznie modyfikowaną kukurydzą z Roundupem była 2–3 razy większa niż samic z grupy kontrolnej.

Praca Seraliniego i wsp. (59) zwróciła uwagę na problem zbyt krótkiego okresu badań toksykologicznych dotyczących wpływu roślin genetycznie modyfikowanych i środków herbicydowych na organizmy żywe. W większości prac ograniczono się do 90 dni badań, podczas gdy w pracy Seraliniego pierwsze guzy wykryto u samców po 4 miesiącach badań, a u samic po 7 miesiącach.

Od razu po opublikowaniu artykułu ww. autorów (59) pojawiły się liczne komentarze, w których zarzucano grupie naukowców prof. Seraliniego wiele nieprawidłowości. Najpoważniejszą z nich był dobór rasy szczurów do testów. Wykazano bowiem, że szczury rasy Sprague-Dawley cechują się wyższą podatnością na nowotwory, szczególnie kiedy nie przestrzega się zasad prawidłowej diety (60). Seralini i wsp. sprzeciwili się tej ocenie i podkreślili, że właśnie wyższa podatność szczurów rasy Sprague-Dawley sprawia, iż są one dobrym modelem do tego typu badań (61).

PODSUMOWANIE

Wzrost użycia związków herbicydowych niesie ze sobą konieczność prowadzenia szerszych badań na temat ich działania i wpływu na różne układy biologiczne. Glifosat jest stosunkowo bezpiecznym związkiem, jednak preparaty, w których skład wchodzi, często mają wyższą toksyczność. Stosowanie ich na szeroką skalę może więc powodować niepożądane skutki zdrowotne.

W pracach badawczych można spotkać się z brakiem wyraźnej granicy między analizą wyników dotyczących efektów powodowanych przez sam glifosat i środki mające go w składzie. Również badania prowadzone na małą skalę w układzie *in vitro* i *in vivo* mogą nie dawać prawdziwego obrazu zagrożenia. Z tego powodu ważne jest prowadzenie długoterminowych badań dotyczących wpływu glifosatu i zawierających go preparatów pestycydowych na organizmy zwierzęce, a szczególnie badań epidemiologicznych, które dotyczą oddziaływania ww. związków na organizm człowieka.

PIŚMIENNICTWO

1. Cohen J.E.: Human population grows up. *Sci. Am.* 2005;293(3):48–55, <http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican0905-48>
2. Steinmann H.H., Dickeduisberg M., Theuvsen L.: Uses and benefits of glyphosate in German arable farming. *Crop Prot.* 2012;42:164–169, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.015>
3. Woźnica Z., Waniorek W.: Znaczenie kondycjonerów wody dla skuteczności chwastobójczej glifosatu. *Post. Ochr. Roślin* 2008;48(1):329–335
4. Martini C.N., Gabrielli M., del Vila M.C.: A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 2012;26:1007–1013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.017>
5. Różański 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
6. Modesto A.K., Martinez B.C.R.: Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 2010;78:294–299, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>
7. Pieniążek D., Bukowska B., Duda W.: Glifosat – nietoksyczny pestycyd? *Med. Pr.* 2003;54(6):579–583
8. Sandrini J.Z., Rola C.R., Lopes F.M., Buffon F.H., Freitas M.M., Marinez C. i wsp.: Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: *In vitro* studies. *Aquatic Toxicol.* 2013;130–131:171–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>
9. Watts M.: Glyphosate: Addendum 2012. Pesticide Action Network Asia and the Pacific 2012. Adres: http://www.panap.net/sites/default/files/monograph_glyphosate-addendum-2012.pdf
10. Grygiel K., Sadowski J., Snopczyński T., Wysocki A.: Pozostałości herbicydów w płodach rolnych i glebie. *J. Ecol. Health* 2012;16(4):159–163
11. Yannicari M., Istilart C., Gimenez D.O., Castro A.M.: Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. *Environ. Exp. Bot.* 2012;82:14–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.006>
12. Wróbel S.: Reakcja roślin ziemniaka na glifosat zastosowany do desykcji naci. *Post. Ochr. Roślin* 2007;47(3):316–320
13. Bukowska B., Pieniążek D., Duda W.: Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with Roundup. *Curr. Top. Biophys.* 2002;26(2):245–249
14. Fushs M.A., Geiger D.R., Reynolds T.L., Bourque J.E.: Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medicus). *Pestic. Biochem. Physiol.* 2002;74(1):27–39, [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00118-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00118-9)
15. Franz J.E., Mao M.K., Sikorski J.A.: Glyphosate. A unique global herbicide. ACS Monograph 189. American Chemical Society, Washington D.C. 1997, s. 653
16. Manas F., Peralta L., Raviolo J., Garcia Ovando H., Weyers A., Ugnia L. i wsp.: Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009;72:834–837, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.019>
17. Ding W., Reddy K.N., Zablotowicz R.M., Bellalou N., Bruns A.H.: Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. *Chemosphere* 2011;83:593–598, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.008>
18. Centralny Instytut Ochrony Pracy (CIOP) – Państwowy Instytut Badawczy: Zbiór informacji na temat substancji chemicznych. Glifosat [1071-83-6] [cytowany 17 lipca 2013]. Adres: <http://www.ciop.waw.pl/28502.html?id=290>
19. Bradberry S.M., Proudfoot A.T., Vale J.A.: Glyphosate poisoning. *Toxicol. Rev.* 2004;23(3):159–167, <http://dx.doi.org/10.2165/00139709-200423030-00003>
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Pesticide residues in food – 1997. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO Core Assessment Group on pesticide residues. Lyons, France, 22 September – 1 October 1997. FAO Plant Production and Protection Paper 145. WHO, FAO, Rome 1998 [cytowany 17 lipca 2013]. Adres: <http://www.fao.org/docrep/w8141e/w8141e00.htm>
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Pesticide residues in food – 2005. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO Core Assessment Group on pesticide residues. Geneva, Switzerland, 20–29 September. FAO Plant Production and Protection Paper 183. WHO, FAO, Rome 2005 [cytowany 17 lipca 2013]. Adres: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/JMPR05report.pdf

22. Aris A., Leblanc S.: Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in eastern townships of Quebec, Canada. *Reprod. Toxicol.* 2011;31(4):528–533, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.02.004>
23. Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier J.M. Moesch C. Lachatre G.: Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 2013;226:20–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.010>
24. Roberts D.M., Buckley N.A., Mohamed F., Eddleston M., Goldstein D.A., Mehrsheikh A. i wsp.: A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. *Clin. Toxicol.* 2010;48(2):129–136, <http://dx.doi.org/10.3109/15563650903476491>
25. Brzeźnicki S., Bonczarowska M.: Glifosat – metoda oznaczania. *Podst. Met. Oceny Środ. Pr.* 2008;55(1):35–40
26. Krzemińska S., Szczecińska K., Makowski K., Pościk A.: Środki ochrony indywidualnej stosowane w rolnictwie. *Bezp. Pr.* 2001;7–8:34–38
27. Eddleston M., Karalliede L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbiter G. i wsp.: Pesticide poisoning in the developing world. A minimum pesticides list. *Lancet* 2002;360:1163–1167, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11204-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11204-9)
28. Przybylska A.: Zatrucia chemicznymi środkami ochrony roślin w 2000 r. *Przegl. Epidemiol.* 2002;56:311–317
29. Przybylska A.: Zatrucia chemicznymi środkami ochrony roślin w 2001 r. *Przegl. Epidemiol.* 2003;57:107–116
30. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r.
31. Ludwicki J.K., Bańkowski R., Wiadrowska B.: Ocena ryzyka narażenia na pestycydy operatorów zabiegów agrochemicznych. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* 2003;54:45–47
32. United States Environmental Protection Agency: Glyphosate Reregistration Eligibility Decision (RED). EPA-738-R-93-014. Agency, Washington D.C. 1993
33. Jauhiainen A., Rasanen K., Sarantila R., Nuutinen J., Kangas J.: Occupational exposure of forest workers to glyphosate during brush saw spraying work. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 2010;52(2):61–64, <http://dx.doi.org/10.1080/15298669191364334>
34. Acquavella J.F., Alexander B.H., Mandel J.S., Gustin C., Baker B., Chapman P. i wsp.: Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study. *Environ. Health Perspect.* 2004;12(3):321–326
35. Curwin B.D., Hein M.J., Sanderson W.T., Striley C., Heederick D., Kromhout H. i wsp.: Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Ann. Occup. Hyg.* 2007;51(1):53–65, <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/mel062>
36. Peruzzo P.J., Porta A.A., Ronco A.E.: Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 2008;156:61–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>
37. Romano R.M., Romano M.A., Bernardi M.M., Furtaido P.V., Oliveira C.A.: Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alerts testosterone levels and testicular morphology. *Arch. Toxicol.* 2010;84:309–317, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-009-0494-z>
38. Clair E., Mesange R., Travert C., Seralini G., Seralini E.: A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. In Vitro* 2012;26:269–279, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.009>
39. McQueen H., Callan A.C., Hinwood A.L.: Estimating maternal and prenatal exposure to glyphosate in the community setting. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2012;215:570–576, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.12.002>
40. Garry V.F., Harkins M.E., Erickson L.L., Long-Simpson L.K., Holland S.E., Burroughs B.L.: Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ. Health Perspect.* 2002;110(3):441–449, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.02110s3441>
41. 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;34:144–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.010>
42. Malatesta M., Perdoni F., Santin G., Battistelli S., Muller S., Biggiogera M.: Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. *Toxicol. In Vitro* 2008;22:1853–1860, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.09.006>
43. Pieniążek D., Bukowska B., Duda W.: Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2004;79:58–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.03.003>
44. Gasnier C., Dumont C., Benachour N., Clair E., Chagnon M.: Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 2009;262:184–191, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>

45. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008
46. Beuret C.J., Zirulnik F., Gimenez M.S.: Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod. Toxicol.* 2005;19:501–504, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.09.009>
47. Cavalli V.L., Cattani D., Heinz Rieg C.E., Pierozan P., Zanatta L., Parisotto E.B. i wsp.: Roundup disrupted male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;65C:335–346, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043>
48. Kwiatkowska M., Nowacka-Krukowska H., Bukowska B.: The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on human acetylcholinesterase activity. W: 9th EBSA European Biophysics Congress, 13–17 July 2013, Lisbon, Portugal – Abstracts. *Eur. Biophys. J.* 2013;42(1, Supl. 1):S1–S236, <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-013-0917-x>
49. Sosnowska B., Huras B., Krokosz A., Bukowska B.: The effect of bromfenwinphos, its impurities and chlorfenwinphos on acetylcholinesterase activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013;57:38–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.011>
50. Walsh L.P., McCormick C., Martin C., Stocco D.M.: Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:769–776, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.00108769>
51. Romano M.A., Romano R.M., Santos D.L., Wisniewski P., Campos A.D., Bargi de Souza P. i wsp.: Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 2012;86:663–673, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0788-9>
52. DeSesso J.M., Williams A.L.: Comment on „Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression” by Romano et al. 2012. *Arch. Toxicol.* 2012;86(11):1791–1793, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-012-0894-3>
53. Antoniou M., Habib M.E.M., Howard C.V., Jennings R.C., Leifert C., Nodari R.O. i wsp.: Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: Divergence of regulatory decisions from scientific evidence. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 2012;S4:006, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S4-006>
54. Paz-y-Miño C., Sánchez M.E., Arévalo M., Muñoz M.J., Witte T., De-la-Carrera G.O. i wsp.: Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet. Mol. Biol.* 2007;30:456–460, <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026>
55. Manas F., Perlata L., Raviolo J., Ovando H.G., Weyers A., Ugnia L. i wsp.: Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic test. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009;28:37–41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>
56. Cavas T., Konen S.: Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation. *Mutagenesis* 2007;22(4):263–268, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gem012>
57. Sivikova K, Dianovsky J.: Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *Int. J. Hyg. Environ.* 2006;209(1):15–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.07.005>
58. Koller V.J., Furhacker M., Nersesyan A., Misik M., Eisenbauer M., Knasmueller S.: Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 2012;86:805–813, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>
59. Seralini G., Clair E., Mesnage R., Gress S., Defarge N., Malatesta M. i wsp.: Long term toxicity of Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50:4221–4231, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>
60. De Souza L., Macedo Oda L.: Letter to the editor. *Food Chem. Toxicol.* 2013;53:440, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.057>
61. Seralini G., Mesange R., Defarge N., Gress S., Hennequin D., Clair E. i wsp.: Answer to critics: Why there is a long term toxicity due to a Roundup-tolerant genetically modified maize and to a Roundup herbicide. *Food Chem. Toxicol.* 2013;53:476–483, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.007>