

# ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

## ORIGINAL RESEARCH

УДК 612.017.1-02:546.47-31-022.513.2:661.162.2/.63]-092.9  
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2023.1.13444

Я. Ю. Гапоненко, М. М. Корда

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

### ПОТЕНЦІЮВАННЯ НЕГАТИВНОГО ЕФЕКТУ ГЕРБІЦИДУ ГЛІФОСАТУ НА ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ НАНОЧАСТИНКАМИ ОКСИДУ ЦИНКУ

Потенціювання негативного ефекту гербіциду гліфосату на цитокіновий профіль наночастинками оксиду цинку

Я. Ю. Гапоненко, М. М. Корда

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

**Резюме.** Наночастинки, внаслідок їх здатності проникати через біологічні бар'єри і полегшувати транспорт всередину клітин хімічних сполук, потенційно можуть посилювати токсичний ефект останніх.

**Мета дослідження** – оцінити вплив наночастинок оксиду цинку на здатність гліфосату змінювати цитокіновий профіль крові щурів.

**Матеріали і методи.** Досліди виконано на 40 щурах-самцях, яким вводили щоденно внутрішньошлунково суспензію наночастинок ZnO в дозі 100 мг/кг, розчин гліфосату в дозі 250 мг/кг або суспензію наночастинок ZnO у розчині гліфосату. На 15-й день експерименту в сироватці крові щурів визначали концентрацію цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10 методом імуноферментного аналізу.

**Результати.** Встановлено, що під впливом наночастинок ZnO досліджувані показники не зазнавали достовірних змін. У сироватці крові щурів, яким вводили гліфосат, встановлено достовірне збільшення концентрації прозапальних цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Найбільш суттєво цитокіновий профіль змінювався у сироватці крові тварин, які зазнавали поєднаного впливу наночастинок і гліфосату. В цьому випадку концентрація TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6 була достовірно вищою як порівняно з групою тварин, яким вводили тільки наночастинки, так і з тваринами, яким вводили сам гліфосат. Крім того, сумісне застосування наночастинок і гліфосату призводило до достовірного зниження рівнів IL-4 та IL-10 порівняно з усіма досліджуваними групами.

**Висновки.** Наночастинки оксиду цинку посилюють здатність хімічного токсиканта гліфосату підвищувати продукцію прозапальних цитокінів.

**Ключові слова:** наночастинки; оксид цинку; гліфосат; цитокіни.

Potential of the herbicide glyphosate negative effect on the cytokine profile by zinc oxide nanoparticles

Y. Y. Gaponenko, M. M. Korda

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

e-mail: korda@tdmu.edu.ua

**Summary.** Nanoparticles, due to their ability to penetrate biological barriers and facilitate the transport of chemical compounds into cells, can potentially increase their toxic effects.

**The aim of the study** – to evaluate the effect of zinc oxide nanoparticles on the ability of glyphosate to change the cytokine profile of the blood of rats.

**Materials and Methods.** Experiments were conducted on 40 male rats, which were administered intragastrically daily with a suspension of ZnO nanoparticles at a dose of 100 mg/kg, a glyphosate solution at a dose of 250 mg/kg, or a suspension of ZnO nanoparticles in a glyphosate solution. On the 15th day of the experiment, the concentration of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, and IL-10 in the blood serum of rats was measured by the enzyme immunoassay method.

**Results.** It was shown that ZnO nanoparticles did not result in the significant changes of the studied indices. A significant increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 was found in the blood serum of rats administered glyphosate. The cytokine profile changed most significantly in the blood serum of animals exposed to the combined effect of nanoparticles and glyphosate. In this case, the concentration of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 was significantly higher both compared to the group of animals that were injected with only nanoparticles, and with animals that were injected with glyphosate alone. In addition, the combined use of nanoparticles and glyphosate led to a significant decrease in the levels of IL-4 and IL-10 compared to all studied groups.

**Conclusions.** Zinc oxide nanoparticles enhance the ability of the chemical toxicant glyphosate to increase the production of pro-inflammatory cytokines.

**Key words:** nanoparticles; zinc oxide; glyphosate; cytokines.

©Я. Ю. Гапоненко, М. М. Корда, 2023

ISSN 2706-6282(print)  
ISSN 2706-6290(online)

Вісник медичних і біологічних досліджень  
Bulletin of Medical and Biological Research

1(15), 2023

### ВСТУП

Бурхливий розвиток нанотехнологій, з одного боку, є рушієм технічного прогресу, проте з іншого – може призвести до негативних ефектів на довкілля та здоров'я людей. Потенційна небезпека наноматеріалів зумовлена їх унікальними властивостями, зокрема: високим хімічним потенціалом, що призводить до їх специфічної каталітичної здатності; великою питомою поверхнею, що різко збільшує їх адсорбційну ємність і хімічну реакційну здатність; маленькими розмірами, що дозволяє їм зв'язуватися з макромолекулами, вмонтовуватися в мембрани, проникати в клітинні органели, змінювати функції біоструктур [1].

Наночастинки ZnO, як новий тип недорогих та малотоксичних наноматеріалів, враховуючи їх протипухлинний, антибактеріальний, антиоксидантний, протидіабетичний та протизапальний ефекти, а також потенціал щодо доставки ліків та біовізуалізації, викликають надзвичайне зацікавлення в плані їх застосування у різних біомедичних напрямках [2, 3]. Наночастинки ZnO розміром менше 100 нм вважаються відносно біосумісними, що робить можливим їх застосування та стимулює проведення відповідних біомедичних досліджень.

Пестициди є найважливішими хімічними забруднювачами річок, поверхневих вод і їжі. Фосфометил, похідне амінокислоти гліцину, – гліфосат є одним із неселективних гербіцидів у сільському господарстві, який найбільш часто використовують і який може безпосередньо забруднювати навколишнє середовище. Протягом останніх років застосування гербіцидів на основі гліфосату експоненціально зростає в усьому світі. Цей факт викликає велике занепокоєння щодо ризиків гліфосату для людей і тварин [4]. Механізми токсикологічної дії гліфосату все ще досліджують, хоча результати останніх досліджень показали, що вони пов'язані зі змінами метилювання ДНК, модифікацією гістонів і диференційною експресією некодуючих РНК у клітинах людини [5]. Є докази того, що гліфосат здатний індукувати апоптотичні ефекти, а також окиснювальний стрес [6]. Результати кількох досліджень показали, що несприятливий вплив гліфосату на людину включає ефекти, що порушують ендокринну систему, репродукцію та розвиток [7, 8]. У березні 2015 р. Всесвітня організація охорони здоров'я прийняла рішення віднести гліфосат до категорії 2А як імовірний канцероген для людини.

Висока адсорбційна здатність наночастинок і їх властивість проникати через біологічні бар'єри можуть полегшувати попадання всередину клітини різних хімічних сполук, тим самим підвищуючи їх системну концентрацію у тканинах і збільшуючи токсичність. Крім того, адсорбовані на поверхні наночастинок токсини можуть впливати на мембранні циторецептори, ініціюючи імунну реакцію. На сьо-

годні питання про біологічні ефекти наночастинок ZnO при їх надходженні в організм разом із традиційними токсикантами залишаються недослідженими. Все це зумовлює актуальність вивчення інтегрального токсикологічного ефекту наночастинок оксиду цинку і широко поширеного гербіциду гліфосату.

**Метою дослідження** було оцінити вплив наночастинок оксиду цинку на здатність гліфосату змінювати цитокіновий профіль крові щурів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В експериментах використовували безпородних щурів-самців масою 160 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Інтоксикацію в тварин моделювали шляхом щоденного внутрішньошлункового введення 0,5 мл суспензії наночастинок оксиду цинку в дозі 100 мг/кг маси тіла впродовж 14-ти діб [9] і гліфосату (в формі гербіциду раундапу) в дозі 250 мг/кг маси тіла. Токсиканти вводили сумісно та окремо. Як контроль використовували інтактних щурів, яким вводили питну воду.

Диспергування наночастинок у воді чи розчині гліфосату проводили за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-М750Т (20–25 кГц, 750 Вт) протягом 5 хв.

Усіх дослідних тварин поділили на такі групи: перша – інтактні (контрольні); друга – щури, яким вводили наночастинки оксиду цинку; третя – тварини, уражені гліфосатом; четверта – щури, яким сумісно вводили наночастинки оксиду цинку та гліфосат. Тварин виводили з експерименту на 15-ту добу під тіопентал-натрієвим наркозом (40 мг/кг маси тварини). Всі маніпуляції із дослідними тваринами проводили з дотриманням правил відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [10] та Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [11].

Визначення концентрації цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10 у сироватці крові щурів проводили методом імуноферментного аналізу з використанням наборів реагентів «Bioscience» виробництва «BenderMedSystemsGmbH», Австрія. Абсорбцію проб вимірювали на апараті «StatFax 303 Plus» відповідно до протоколу виробника. Концентрацію цитокінів виражали у пг/мл.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0 з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки ( $M$ ), її дисперсії і помилки середньої ( $m$ ). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами встановлювали за допомогою критерію Манна – Уїтні. Зміни вважали статистично достовірними при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Двотижневе введення щурам суспензії наночастинок оксиду цинку в дозі 100 мг/кг маси тіла не викликало достовірних змін цитокинового профілю сироватки крові (табл.). Разом з тим, внутрішньошлункове введення гліфосату в дозі 250 мг/кг маси тіла протягом 14 діб призводило до достовірних змін концентрацій TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10 у сироватці крові щурів. Зокрема, вміст TNF- $\alpha$  у крові тварин, яким вводили гербіцид, зростав у 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами. Таке підвищення даного цитокину може бути наслідком прозапального ефекту токсиканта та активації моноцит/макрофагальної системи. Вплив TNF- $\alpha$  на клітини реалізується через рецептори (gp 55, CD 120a, TNF $\alpha$ -RI, gp 75, CD 120b, TNF $\alpha$ -RII), що в результаті призводить до активації факторів транскрипції, які є регуляторами генів широкого спектра медіаторів, таких, як IL-1, IL-6, IL-8, простагландини, фактор активації тромбоцитів, тромбоцитарний фактор росту [12].

Рівень ще одного важливого прозапального цитокину IL-1 $\beta$  у крові тварин, яким вводили гліфосат, також достовірно підвищувався – у 4,8 раза, порівняно з контрольною групою тварин, а концентрація IL-6, який є одним із найважливіших медіаторів гострої фази запалення і секретується макрофагами, фібробластами, клітинами судинного ендотелію, Т-клітинами у відповідь на їх активацію фактором некрозу пухлин, патогензв'язаними молекулами чи токсинами підвищувалася в 3,3 раза. Дані щодо підвищення концентрації прозапальних цитокинів у сироватці крові щурів із гліфосатною інтоксикацією, які ми отримали, узгоджуються із даними інших авторів [13].

Вивчення концентрації протизапальних цитокинів сироватки крові при внутрішньошлунковому введенні гліфосату показало тенденцію до зниження їх продукції, проте при статистичному аналізі зміни виявилися недостовірними.

З'являється все більше доказів того, що гліфосат здатний викликати оксидативний стрес, який призводить до окиснювального ушкодження мембран

клітин і макромолекул та змін в антиоксидантному статусі [14, 15]. Оксидативний стрес активує специфічні шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналу з подальшим вивільненням цитокинів і розвитком запалення. Можливо, саме це і стало причиною підвищення концентрації прозапальних цитокинів у щурів, яким вводили гліфосат. Варто зазначити, що активовані клітини запалення, наприклад нейтрофільні гранулоцити, у свою чергу, починають посилено генерувати активні форми кисню, що призводить до утворення так званого хибного кола.

Найбільш суттєво цитокиновий профіль змінювався у сироватці крові тварин, яким вводили наночастинок оксиду цинку сумісно з гербіцидом. У цьому випадку концентрація TNF- $\alpha$  зростає у 5,8 раза ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  – в 8,2 раза ( $p < 0,05$ ), IL-6 – у 5,9 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами. Варто зазначити, що при поєднаному застосуванні наночастинок і гербіциду рівні усіх прозапальних цитокинів були достовірно вищими, порівняно з такими як у тварин, яким вводили тільки наночастинок, так і в тварин, яким вводили сам гліфосат.

При сумісному введенні щурам наночастинок і гліфосату, на відміну від їх окремого застосування, спостерігалось достовірне зниження концентрації IL-4 та IL-10 порівняно з усіма досліджуваними групами тварин. Відомо, що IL-4 відіграє важливу роль у хронічному запаленні. Його присутність у тканинах сприяє альтернативній активації макрофагів у клітини M2, що супроводжується секрецією IL-10. У свою чергу, IL-10 інгібує індукцію секреції запальних цитокинів – TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 та IFN- $\gamma$ , опосередковану ліпополісахаридом чи хімічними токсинами через активацію Toll-подібних рецепторів у клітинах.

Найімовірніше, що результати посилення наночастинок оксиду цинку змін цитокинового профілю сироватки крові щурів, викликаних гліфосатом, які ми отримали, є наслідком їх здатності проникати через біологічні мембрани в клітини і тим самим транспортувати адсорбований на їх поверхні токсикант та посилювати його біодоступність. Крім того, можлива сумісна прозапальна дія гліфосату і наночастинок оксиду цинку. Можливо також, що

**Таблиця.** Показники вмісту цитокинів у сироватці крові щурів, які піддавалися впливу наночастинок оксиду цинку і гербіциду гліфосату ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

| Показник              | Група тварин     |                  |                   |                        |
|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------------|
|                       | контроль         | наночастинок ZnO | гліфосат          | ZnO + гліфосат         |
| TNF- $\alpha$ , пг/мл | 10,18 $\pm$ 2,56 | 14,80 $\pm$ 2,75 | 35,60 $\pm$ 3,84* | 59,05 $\pm$ 5,60**\$   |
| IL-1 $\beta$ , пг/мл  | 14,20 $\pm$ 2,85 | 20,15 $\pm$ 3,70 | 68,20 $\pm$ 7,40* | 116,10 $\pm$ 12,90**\$ |
| IL-4, пг/мл           | 25,50 $\pm$ 3,60 | 20,12 $\pm$ 3,60 | 17,15 $\pm$ 2,58  | 9,20 $\pm$ 1,01**\$    |
| IL-6, пг/мл           | 9,80 $\pm$ 1,90  | 15,70 $\pm$ 2,30 | 32,30 $\pm$ 3,70* | 57,80 $\pm$ 6,70**\$   |
| IL-10, пг/мл          | 28,16 $\pm$ 3,50 | 25,15 $\pm$ 3,25 | 20,10 $\pm$ 2,80  | 10,60 $\pm$ 1,90**\$   |

Примітки: 1) \* – зміни достовірні порівняно з показниками контрольних тварин ( $p < 0,05$ );

2) # – зміни достовірні, порівняно з показниками тварин, яким вводили наночастинок ZnO ( $p < 0,05$ );

3) \$ – зміни достовірні, порівняно з показниками тварин, яким вводили гліфосат ( $p < 0,05$ ).

наночастинки, взаємодіючи з мембранами ендоплазматичного ретикулу, здатні певним чином змінювати метаболізм гліфосату, що призводить до посилення його токсичних властивостей.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Najahi-Missaoui W. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? / W. Najahi-Missaoui, R. D. Arnold, B. S. Cummings // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 22 (1). – P. 385.
2. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications / J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, D. G. Wingett // *Expert Opinion on Drug Delivery.* – 2010. – Vol. 7 (9). – P. 1063–1077.
3. Xiong H.M. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery / H. M. Xiong // *Advanced Materials.* – 2013. – Vol. 25 (37). – P. 5329–5335.
4. Glyphosate and its toxicology: A scientometric review / N. de Castilhos Ghisi, N. R. Zuanazzi, T. M. C. Fabrin, E. C. Oliveira // *Sci. Total Environ.* – 2020. – Vol. 733. – Article ID 139359.
5. Epigenetic changes associated with exposure to glyphosate-based herbicides in mammals / M. F. Rossetti, G. Canesini, V. Lorenz [et al.] // *Front Endocrinol.* – 2021. – Vol. 12. – Article ID 671991.
6. Abdel-Halim K. Y. Cytotoxicity and oxidative stress responses of imidacloprid and glyphosate in human prostate epithelial WPM-Y.1 cell line / K. Y. Abdel-Halim, S. R. Osman // *J. Toxicol.* – 2020. – Vol. 2020. – Article ID 4364650.
7. Controversies on endocrine and reproductive effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides: A mini-review / A. T. de Araújo-Ramos, M. T. Passoni, M. A. Romano [et al.] // *Front Endocrinol.* – 2021. – Vol. 12. – Article ID 627210.
8. Glyphosate herbicide as endocrine disruptor and probable human carcinogen: Current knowledge and future direction / V. Lorenz, M. F. Rossetti, E. Dallegre [et al.] // *Front. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 12. – Article ID 772911.

#### REFERENCES

1. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci.* 2020;22(1): 385.
2. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2010;7(9): 1063-77.
3. Xiong HM. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced Materials.* 2013;25(37): 5329-35.
4. Nédia de Castilhos Ghisi, Natana Raquel Zuanazzi, Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, Elton Celton Oliveira. Glyphosate and its toxicology: A scientometric review. *Sci Total Environ.* 2020;733: 139359.

#### ВИСНОВКИ

Наночастинки оксиду цинку посилюють здатність хімічного токсиканта гліфосату підвищувати продукцію прозапальних цитокінів.

9. Oral exposure to zinc oxide nanoparticles induced oxidative damage, inflammation and genotoxicity in rat's lung / N. Howaida, H. Atti, M. Shalaby, M. Arafah // *Life Science Journal.* – 2013. – Vol. 10 (1). – P. 1969–1979.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – No. 123. – 52 p.
11. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
12. Kalliolias G. D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G. D. Kalliolias, L. B. Ivashkiv // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 12 (1). – P. 49–62.
13. Peillex C. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity / C. Peillex, M. Pelletier // *J Immunotoxicol.* – 2020. – Vol. 17 (1). – P. 163–174.
14. Oxidative stress and metabolism: A mechanistic insight for glyphosate toxicology / X. Wang, Q. Lu, J. Guo [et al.] // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2022. – Vol. 62. – P. 617–639.
15. Glyphosate-induced oxidative stress in Arabidopsis thaliana affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation / L. de Freitas-Silva, M. Rodríguez-Ruiz, H. Houmani [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2017. – Vol. 218. – P. 196–205.

5. 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.
6. 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;2020: 4364650.
7. de Araújo-Ramos AT, Passoni MT, Romano MA, Romano RM, Martino-Andrade AJ. Controversies on endocrine and reproductive effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides: A mini-review. *Front Endocrinol.* 2021;12: 627210.

8. Lorenz V, Rossetti MF, Dallegrave E, Milesi MM, Varayoud J. Glyphosate herbicide as endocrine disruptor and probable human carcinogen: Current Knowledge and future direction. *Front Endocrinol.* 2021;12: 772911.

9. Howaida N., Atti H., Shalaby M., Arafah M. Oral exposure to zinc oxide nanoparticles induced oxidative damage, inflammation and genotoxicity in rat's lung. *Life Science Journal* 2013;10(1): 1969-79.

10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg; 1986.

11. Kozhemiakin Yu.M, Khromov OS, Filonenko MA, Saifetdinova HA. Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them. [Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними] Київ: Avitsenna; 2002. Ukrainian.

12. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1): 49-62.

13. Peillex C, Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J Immunotoxicol.* 2020;17(1): 163-74.

14. Wang X, Lu Q, Guo J, Ares I, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, Anadón A, Martínez MA. Oxidative stress and metabolism: A mechanistic insight for glyphosate toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2022;62: 617-39.

15. de Freitas-Silva L, Rodríguez-Ruiz M, Houmani H, da Silva LC, Palma JM, Corpas FJ. Glyphosate-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. *J Plant Physiol.* 2017;218: 196-205.