

Received: 28.05.2020
Accepted: 13.01.2021
Published: 07.04.2021

Wpływ pyretroidów: permetryny, deltametryny, alfa-cypermetyryny na stres oksydacyjny

The influence of pyrethroids: permethrin, deltamethrin and alpha-cypermethrin on oxidative damage

Agnieszka Chrustek, Iga Hołyńska-Iwan, Dorota Olszewska-Słonina

Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie:

Pyretroidy, syntetyczne pochodne naturalnych pyretryn pochodzących z *Chrysanthemum cinerariaefolium*, powszechnie stosowane do ochrony roślin, w leśnictwie, przemyśle rolniczym, farmaceutycznym, a także w medycynie oraz weterynarii. Do organizmu mogą się dostać poprzez wdychanie, spożycie oraz kontakt ze skórą. Przyjęto, że charakteryzują się niewielką toksycznością dla ludzi, są szybko metabolizowane i nie kumulują się w tkankach, a wydalone są z moczem. Mimo istniejących licznych obostrzeń, ich stosowanie niesie duże ryzyko, ponieważ związki te oraz ich metabolity mogą przedostawać się do środowiska naturalnego, zanieczyszczając wodę, glebę oraz żywność. Od wielu lat opisywane są skutki stosowania pyretroidów jako bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia zwierząt oraz ludzi. Na bieżąco publikowane są informacje o zatruciach tymi związkami u ludzi i zwierząt oraz o ofiarach śmiertelnych po ich zażyciu. Najbardziej narażone są dzieci, gdyż pyretroidy mogą występować w mleku matki. Związki te działają nefrotoksycznie, hepatotoksycznie, immunotoksycznie, neurotoksycznie oraz negatywnie na układ rozrodczy oraz na płód. Pyretroidy takie jak: permetryna, deltametryna, alfa-cypermetyryna są dopuszczane przez Światową Organizację Zdrowia do codziennego użytku, jednak liczne badania naukowe informują, że mogą wywołać stres oksydacyjny. Doprowadzają do uszkodzenia DNA, białek, lipidów oraz do indukcji apoptozy. Celem pracy było zebranie oraz usystematyzowanie dostępnej wiedzy dotyczącej wywoływania stresu oksydacyjnego przez wybrane pyretroidy.

Słowa kluczowe:

pyretroidy, stres oksydacyjny, peroksydacja lipidów, śmierć komórki

Summary:

Pyrethroids, synthetic derivatives of natural pyrethrins derived from *Chrysanthemum cinerariaefolium*, are commonly used for plant protection in the forestry, agricultural, pharmaceutical industry as well as in medicine and veterinary medicine. They can enter the body by inhalation, ingestion and skin contact. It was assumed that they are characterized by low toxicity to humans, are quickly metabolized and do not accumulate in tissues, and are excreted in the urine. Despite the existing restrictions, their use carries a great risk, because these compounds and their metabolites can get into the natural environment, contaminating water, soil and food. The consequences of using pyrethroids as a direct threat to animal and human health have been described for many years. They are published on an ongoing basis informing about poisoning with these compounds in humans and animals, and about fatalities after their taking. Children are most at risk because pyrethroids can be found in breast milk. These compounds have nephrotoxic, hepatotoxic, immunotoxic, neurotoxic effects and have a negative effect on the reproductive system and the fetus. Pyrethroids such as permethrin, deltamethrin, alpha-cypermethrin are approved by the World Health Organization for daily use; however, numerous scientific studies indicate that they can cause oxidative stress. They lead to DNA, protein, lipid damage and induction of apoptosis. The purpose of the work was to collect and systematize the available knowledge regarding the induction of oxidative stress by selected pyrethroids.

Keywords:

pyrethroids, oxidative stress, lipid peroxidation, cell death

GICID	01.3001.0014.8309
DOI:	10.5604/01.3001.0014.8309
Word count:	5 043
Tables:	1
Figures:	1
References:	56

Adres autorki: Agnieszka Chrustek, Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; e-mail: agnieszka.chrustek@gmail.com

WSTĘP

Zmiany oksydacyjne są naturalnym skutkiem metabolizmu komórkowego wynikającego z oddychania tlenowego i powstawania reaktywnych form tlenu i azotu (RONS, reactive oxygen and nitrogen species), RONS uwalniane w fizjologicznych przemianach pełnią rolę mediatorów i regulatorów, zapewniając komórkom prawidłowe funkcjonowanie, a ich wpływ zależy od stężenia i czasu działania. Krótkotrwały wzrost wytwarzania RONS jest dobrze tolerowany przez komórki i w takich sytuacjach uruchamiają się mechanizmy obronne. Długotrwały i nasilony stres oksydacyjny, wywołany czynnikami zewnętrznymi, zaburza homeostazę i indukuje uszkodzenia struktur komórkowych [2, 11, 52].

Do związków chemicznych wywołujących stres oksydacyjny zaliczyć można pyretroidy, syntetyczne pochodne naturalnych pyretryn pochodzące z *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Należą do czwartej grupy insektycydów i dzieli się je na dwie grupy w zależności od ich struktury, działania i wywoływania niepożądanych objawów (tab. 1) [8, 10, 20, 27, 30, 45].

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, World Health Organization) zaleca do stosowania trzy główne substancje chemiczne: permetrynę, deltametrynę oraz alfa-cypermetyrynę [48]. Pyretroidy powszechnie są stosowane do ochrony roślin, w przemyśle rolniczym, farmaceutycznym, a także w weterynarii oraz medycynie. Mimo istniejących licznych obostrzeń, ich stosowanie niesie duże ryzyko, ponieważ związki te oraz ich metabolity mogą się przedostawać do środowiska naturalnego, zanieczyszczając wodę, glebę oraz żywność. Od wielu lat opisywane są następstwa stosowania pyretroidów jako bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia zwierząt oraz ludzi. Związki te wykazują działanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, immunotoksyczne, neurotoksyczne oraz działają negatywnie na układ rozrodczy oraz na płód. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano także genotoksyczność. Toksyczność pyretroidów, oprócz wpływu na transport jonów, może być związana z indukcją stresu oksydacyjnego oraz nagromadzeniem wolnych rodników w komórce. Zmiany w strukturze DNA (kwas deoksyrybonukleinowy, deoxyribonucleic acid), RNA (kwas rybonukleinowy, ribonucleic acid), białek, lipidów i cukrów mogą zaburzać metabolizm komórkowy i zapoczątkować trudne do przewidzenia reakcje [6, 10, 27].

W artykule zebrano oraz usystematyzowano dostępną wiedzę dotyczącą wywoływania stresu oksydacyjnego przez wybrane pyretroidy; permetrynę, deltametrynę oraz alfa-cypermetyrynę.

USZKODZENIE LIPIDÓW I BIAŁEK

Wiele organizmów wykształciło unikalne systemy, które chronią przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species). Jednym ze sposobów walki są enzymy antyoksydacyjne, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa (EC 1.15.1.1; SOD), katalaza (EC 1.11.1.6; CAT), reduktaza glutationowa (EC 1.6.4.2; GR), peroksydaza glutationowa (EC 1.11.1.9; GPx), a także glutation (GSH), które bezpośrednio wychwytyują rodniki ponadtlenkowe oraz nadtlenek wodoru, przekształcając je w mniej reaktywne formy, chroniąc komórki przed peroksydacją lipidów [11, 20, 52].

Peroksydacja lipidów to proces utlenienia przede wszystkim wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów. W wyniku tego procesu dochodzi do uszkodzenia i depolaryzacji błony cytoplazmatycznej, błon mitochondrialnych, jądra komórkowego oraz błon pęcherzyków i błon rozdzielających kompartmenty komórkowe. Obecne w nadmiarze, powstałe w toku reakcji faz peroksydacji wolne rodniki stają się bardzo reaktywne i reagując z innymi wolnymi rodnikami, tworzą nierodnikowe produkty utleniania lipidów. Peroksydacja lipidów może być mierzona np. przez zmiany w poziomie aldehydu malonowego (MDA), kwasu tiobarbiturowego (TBA) oraz DPPH (1,3-bis (difenylfosfino) propan) [20, 56].

Permetryna może indukować stres oksydacyjny przez wytwarzanie ROS i być toksyczna *in vitro* oraz *in vivo* [8, 15, 16, 17, 44, 45]. Pyretroid ten zmniejsza wytwarzanie O_2 i H_2O_2 w monocytach szczurów, natomiast wzrost O_2 i aktywności mieloperoksydazy (EC 1.11.1.1; MPO) w PMNs (leukocyty z jądrem segmentowanym) [16].

Po podaniu permetryny i/lub deltametryny szczurom rasy Wistar wykazano wzrost aktywności SOD i zmniejszenie aktywności GPx, stężenia GSH oraz wzrost stężenia GST (EC 2.5.1.18; transferazy glutationowej) oraz aktywności CAT niezależnie od płci. Opisywano zmniejszenie stężenia GSH w osoczu, wzrost TNF- α oraz zmniejszenie IL-1 β , IL-2, IL-13 u starszych szczurów [15, 17].

Tabela 1. Podział pyretroidów ze względu na ich typ wraz z charakterystyką [10, 47, 49, 50]

	Związki	Budowa	Działanie	Metabolity	Dawka owadobójcza * (g/m ²)	Dawka toksyczna	Objawy niepożądane	Zastosowanie
Typ I	Permetryna	mieszanina 1:3 izomerów <i>cis</i> i <i>trans</i> 3-phenoxyphenyl)-methyl] 3-(2,2-dichloroethenyl) cyclopropane-1-carboxylate	Zaburzenie działania napięciowo-zależnych kanałów sodowych – VSSC, Nav1.6, Nav1.3, Nav1.8, opóźnienie aktywacji i doprowadzenie do przedwczesnego otwarcia kanału	3-PBA <i>cis</i> -DBCA	0,025–0,1	LD50 dla szczurów 430–4000 mg/kg masy ciała LD50 dla myszy 540–2690 mg/kg masy ciała LD dla królików >2000 mg/kg masy ciała	Drżenie całego ciała, ataksja, nadwrażliwość, agresywne zachowanie, nudności, wymioty, ból gardła, ból brzucha, ból głowy, problemy z oddychaniem, podrażnienie błon śluzowych przewodu pokarmowego	Zwalczanie komarów, pcheł, ochrona upraw paszowych
Typ II	Deltametryna	[(S)-Cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl] (1R,3R)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	Zaburzenie działania napięciowo-zależnych kanałów sodowych – VSSC, Nav1.6, Nav1.3, Nav1.8	<i>cis</i> -DCCA <i>trans</i> -DCCA 3-PBA	0,01–0,25	LD50 dla szczurów 30–5000 mg/kg masy ciała LD50 dla królików od 700–2940 mg/kg masy ciała	Ślinienie, niezdolność ruchowa, zespół CS ból głowy, ból brzucha, wymioty, mdłości, łzawienie, osłabienie, ataksje, drgawki, reakcje alergiczne, obrzęk twarzy, wstrząs anafilaktyczny	Zwalczanie mszyc, mączlika, wszy, much tse-tse oraz wobec wektorów malarii <i>Aedes aegyptii</i> oraz <i>Gambiae anopheless</i>
Typ II	Alfa-cypermetryna	mieszanina racemiczna: [(S)-alpha-cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl] (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate oraz [(R)-alpha-cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl](1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	Zaburzenie transportu jonów sodowych przez błonę komórkową, powoduje ciągłe otwarcie kanału, co skutkuje ciągłą depolaryzacją błony oraz blokowaniem generowania potencjałów czynnościowych	F-PBA CPA	0,02	LD50 dla myszy i szczurów wynosi 80 mg/kg masy ciała	Mdłości, wymioty, biegunka, ślinienie, łzawienie, płasawicę, bezwład, drżenie oraz drgawki klonalne	Zwalczanie motyli i chrząszczy oraz w uprawach roślin

* dla much domowych

F-PBA – kwas fenoksybenzoesowy, 3-PBA – kwas 3-fenoksybenzoesowy, CPA – kwas cyklopropanokarboksylowy, *cis*-DCCA – *cis*-3-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropan kwasu karboksylowego, *trans*-DCCA – *trans*-3-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropan kwasu karboksylowego, *cis*-DBCA – 4-hydroksy,3-fenolobenzoesowy kwas 3-(2,2-dibromoetenyl)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylowy; CS – ANG. chloroathesios-salivation

Badania wykazały, iż metabolity permetryny również mogą wywoływać stres oksydacyjny. Komórki serca izolowane od szczurów rasy Wistar traktowano 3-PBA (kwas 3-fenoksybenzoesowy), 3-PBAIc (alkohol 3-fenoksybenzylowy) oraz PBAId (aldehid 3-fenoksybenzylowy). Metabolity te spowodowały wzrost utleniania białek

i lipidów. 3-PBAIc wywołał najmocniejszą peroksydację lipidów, natomiast 3-PBA najsilniejsze uszkodzenie białek [44]. U organizmów wodnych wykazano zwiększone wytwarzanie ROS i GSH w różnych narządach karpia zwyczajnego *Cyprinus carpio* L. oraz zaobserwowano peroksydację lipidów po zastosowaniu deltametryny [5].

Zbadano wpływ antracenu i permetryny na małże morskie *Venerupis decussata*, oceniano aktywność CAT, SOD oraz GST [40].

Aktywność enzymów wzrosła w gruczole trawiennym po traktowaniu permetryną i w skrzelach po podaniu antracenu. Łączna aktywność związków chemicznych była znacznie większa, niż analizowana oddzielnie [5]. Działanie cypermetryny oceniono wykorzystując układ pokarmowy i skrzela ślimaka jabłoni *Pomacea canaliculata*. W gruczole trawiennym obserwowano wzrost aktywności SOD, CAT, stężenia GST po działaniu pyretroidu [4]. Podobne wyniki zaobserwowali Zhang i wsp., u danio przegowanego (*Danio rerio*) traktowanego beta-cypermetryną [55].

Ozok [37] zbadał wpływ cypermetryny na ryby z rodziny karpowatych *Alburnus tarichi* [37]. Zaobserwował obniżenie aktywności SOD, CAT, GPx oraz wzrost poziomu MDA w tkankach skrzeli, wątroby, nerkach oraz mózgu [37].

W literaturze naukowej niewiele opisano badań pod kątem działania pyretroidów na stres oksydacyjny *in vitro* na liniach komórkowych [38, 42]. Oceniano cytotoksyczność, genotoksyczność oraz stres oksydacyjny wywołany przez cypermetrynę na liniach komórkowych ryb. Cytotoksyczność oceniano za pomocą testów MTT (tetrazolium salt reduction test) oraz barwienia NR (czerwień obojętna), AB (Almar Blue) i wykazano 50% zahamowanie proliferacji komórek. Procent uszkodzeń DNA oceniano za pomocą testu kometkowego. Zaobserwowano znaczące uszkodzenie DNA oraz wzrost poziomu LPO, obniżenie ilości GSH oraz aktywności SOD i CAT w analizowanym układzie. Badania potwierdziły, iż pyretroidy wywołują stres oksydacyjny u organizmów wodnych oraz ich liniach komórkowych [42].

Dostępne są wyniki badań dotyczących wpływu pyretroidów na powstawanie stresu oksydacyjnego oraz jego skutki [16, 17, 21, 39]. Oceniono wpływ cypermetryny na szczury w dawce 60 mg/kg/dzień przez 15 dni. Analizowano markery stresu oksydacyjnego: GSH, GPx, MDA, przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne. Zaobserwowano obniżenie aktywności GSH i GPx z jednoczesnym wzrostem poziomu MDA. Cypermetryna znacznie redukowała aktywność całkowitej kwaśnej fosfatazy (EC 3.1.3.2, AcP), obniżała poziom GSH i aktywność GPx oraz powodowała znaczną akumulację MDA. W badaniu udowodniono, że MDA nasila peroksydację lipidów w układzie rozrodczym szczurów. Obniżenie aktywności AcP odzwierciedla upośledzoną steroidogenezę w jądrach szczurów i może to być skorelowane ze zmniejszonym wydzielaniem gonadotropin. Cypermetryna indukowała również uszkodzenia struktury jąder, najądrzy, pęcherzyków nasiennych i zmniejszenie ilości spermy u samców myszy, przez indukcję stresu oksydacyjnego [21].

Hocine i wsp. [23] zasugerowali, że anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru są głównymi inicjatorami powstawania wolnych rodników podczas stosowania cypermetryny.

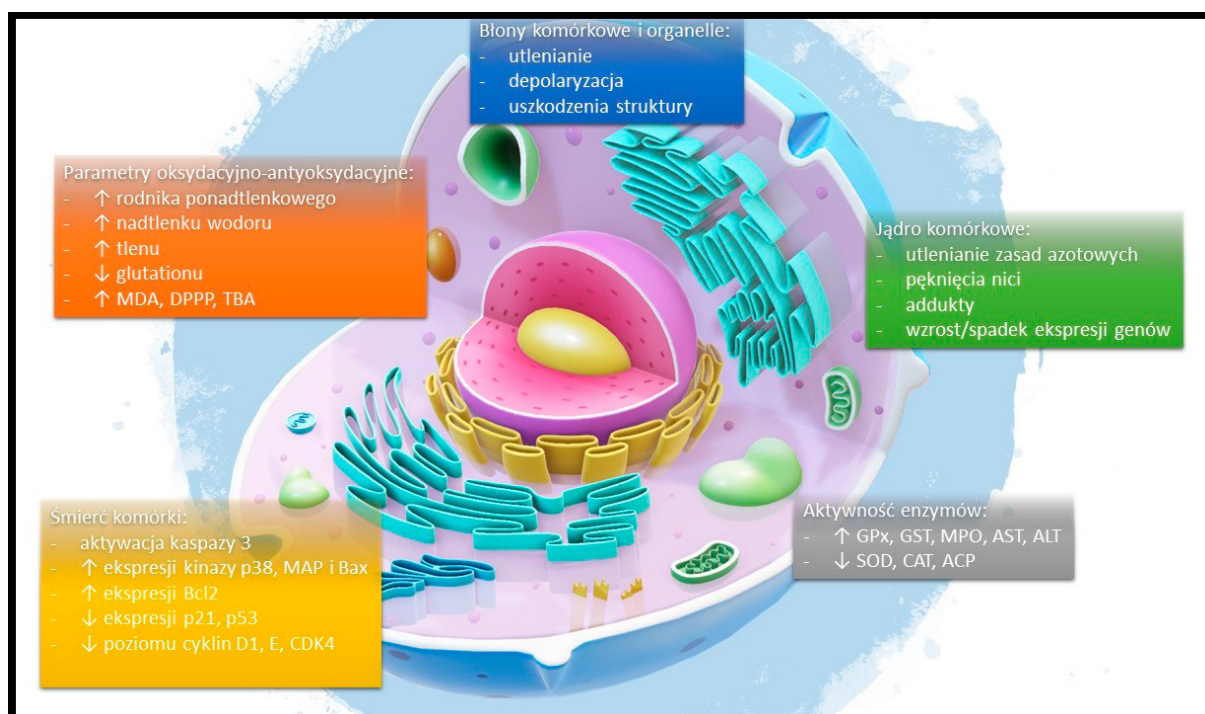
Uznano to za prawdopodobny mechanizm prowadzący do uszkodzenia DNA. Zatem wzrost peroksydacji lipidów oraz zmniejszenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych może odgrywać istotną rolę w genotoksyczności cypermetryny. Cypermetryna spowodowała nasilenie stresu oksydacyjnego w tkance mózgowej szczurów, czego wykładnikiem był podwyższony poziom TBARS (substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym) [23].

Cypermetryna może działać na dwa sposoby: może wywołać stres oksydacyjny, ale także jako związek hydrofobowy może się gromadzić w błonie komórkowej i zakłócać procesy związane z zachowaniem struktury błony, układem białek transportowych i w ten sposób wpływać na pełnione przez błonę role. Mniejsza aktywność enzymatyczna GPx może ułatwiać zwiększoną peroksydację lipidów. Stres oksydacyjny badano na komórkach linii SH-SY5Y w odpowiedzi na alfa-cypermetrynę. Przeprowadzono test MTT oraz zmierzono aktywność dehydrogenazy mleczanowej (EC 1.1.1.27, LDH). Stężenie 0,01–30 µM alfa-cypermetryny nie miało wpływu na żywotność komórek (brak zmian w MTT i aktywność LDH). Pyretroid w sposób zależny od dawki indukował wzrost MDA i poziom tlenu azotu [39]. U szczurów ciężarnych karmionych alfa-cypermetryną w dawce 0,02 mg/kg masy ciała/dobę oraz u noworodków zaobserwowano wzrost MDA, stężenia białka karbonylowego oraz spadek aktywności CAT, SOD i stężenia GSH [23]. Wyniki wskazały na znaczącą rolę stresu oksydacyjnego i ROS w toksyczności cypermetryny, zarówno *in vitro*, jak *in vivo*.

Akumulacja deltametryny w tkankach zwiększała wytwarzanie ROS prowadząc do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia tkanek. Jest związkiem bardzo lipofilnym, zdolnym do przenikania przez błony biologiczne i naturalne bariery, takie jak bariera krew-mózg. Zaobserwowano upośledzenie pamięci, podwyższenie aktywności SOD i aminotransferazy alaninowej (EC 2.6.1.2, ALT) oraz obniżenie GPx, a ponadto opisywano nacieki limfocytarne w wątrobie myszy poddanym działaniu deltametryny [34].

Badano poziom MDA i białkowych grup karbonylowych (PCO) w celu odzwierciedlenia stopnia peroksydacji lipidów i utleniania białek u szczurów traktowanych deltametryną. Związek ten indukował większy wzrost stężenia MDA niż PCO, co wskazuje, że lipidy są szczególnie wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne, a ponadto hamował aktywność enzymów antyoksydacyjnych SOD, CAT [51]. U szczurów traktowanych deltametryną doustnie i dootrzewnowo odnotowano zwiększenie aktywności aminotransferazy asparaginianowej (EC 2.6.1.1, AST), ALT, stężenia MDA w surowicy i zmniejszenie aktywności SOD oraz CAT [1].

Opisano także wpływ deltametryny na natężenie stresu oksydacyjnego u nietoperzy *Artibeus lituratus*. Zwierzęta karmione były owocem papai traktowanej pyretroidem w dawkach 0,02 oraz 0,04 mg/kg. Wykazano wzrost aktywności ALT, AST, GST, SOD, CAT, a także składników nieenzymatycznych, takich jak: całkowitej zawartości



Ryc. 1. Pyretroidy wywołują stres oksydacyjny uszkadzając DNA, białka oraz lipidy

lipidów, GSH, NO, H_2O_2 oraz glikemii, natomiast zawartość glikogenu w wątrobie zmniejszyła się. W mięśniu piersiowym wykazano podwyższenie aktywności SOD, CAT oraz składników nieenzymatycznych, takich jak: MDA i NO. Niskie dawki deltametryny powodowały toksyczne uszkodzenie wątroby i mięśni, indukowały zmiany w metabolizmie węglowodanów przez utratę masy ciała, wzrost poziomu glukozy w surowicy krwi oraz zmniejszone stężenie glikogenu w wątrobie [36].

Badań oceniających stres oksydacyjny zachodzący w organizmie ludzkim, który został wywołany pyretroidami jest niewiele. W jednym z nich oceniono wyniki analiz 200 pracowników narażonych na alfa-cypermetyrynę, podzielonych na grupy ze względu na stopień ekspozycji. Analizowano parametry morfologiczne (liczbę leukocytów, płytek krwi), immunologiczne (CD3, CD4, CD8), enzymatyczne (aktywność SOD, CAT, GPx, stężenie GSH) oraz mutacje genu *TP53*. Zaobserwowano mniejszą aktywność SOD, CAT, GPx i stężenie GSH oraz zmiany w egzonie 5a i 6 genu *TP53*. Badania potwierdziły wystąpienie stresu oksydacyjnego oraz mutacji genu *TP53* podczas narażenia organizmu ludzkiego na ten pyretroid [14].

W innych badaniach zaobserwowano wzrost poziomu utlenienia PCO po podaniu cypermetyryny [4]. Deltametryna natomiast indukowała wzrost ilości ROS *in vivo* i *in vitro*, któremu towarzyszyła aktywacja p66shc (członek rodziny białek adaptorowych ShcA - homologicznych homologów kolagenu Src). W komórkach linii SH-SY5Y, traktowanych 50 μM deltametryną przez 24 h, zaobserwowano zwiększoną subkomórkową translokację p66shc z cytoplazmy do frakcji mitochondrialnych [13]. Opisano

również wzrost stężenia białka karbonylowego w wątrobie szczurów traktowanych deltametryną [51] oraz u szczurów ciężarnych karmionych alfa-cypermetyryną [23].

USZKODZENIE DNA I ŚMIERĆ KOMÓRKOWA

Podczas stresu oksydacyjnego może dojść do uszkodzeń pojedynczych zasad azotowych, pęknięć nici DNA oraz tworzenia adduktów. Głównym rodnikiem odpowiedzialnym za wymienione zmiany jest rodnik hydroksylowy. Najbardziej podatne na reakcje z rodnikiem są zasady azotowe – tymidyna oraz guanina [7, 41, 46].

Wskazuje się, że stres oksydacyjny może wywołać śmierć komórki. Reaktywne formy tlenu, poprzez kaspazy i aktywację szlaków wewnętrznych i zewnętrznych, najczęściej doprowadzają do apoptozy, rzadziej do martwicy oraz autofagii [7, 22, 38, 41].

U organizmów wodnych, niskie i wysokie dawki deltametryny mogą powodować hiperplazję (przerost) komórek blaszkowatych i nacieki komórek zapalnych w blaszkach, przekrwienie i ogniskową martwicę hepatocytów, a także nekrotyczne zmiany w neuronach [5]. Długotrwałe narażenie na deltametrynę karpia zwyczajnego *Cyprinus carpio L* może doprowadzić do stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA i apoptozy. Zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji mRNA kaspazy-3 po wprowadzeniu deltametryny do mózgu, co dowodzi, że ekspozycja na deltametrynę może wyzwać zależną od kaspazy-3 ścieżkę apoptozy w neuronach mózgowych. Uszkodzenia DNA w mózgu spowodowane były też

wyższym stężeniem 8-OHdG (8-hydroksy-2-deoksyguanozyna) wywołującej stres oksydacyjny [5].

Niewielkie dawki alfa-cypermetryny (0,0036 µg/ml) niszczyły DNA, powodowały apoptozę i cytotoksyczność wobec ludzkich limfocytów i komórek linii HepG2. W badanych stężeniach biomarkery stresu oksydacyjnego (TBARS), TAC (całkowity status antyoksydacyjny) oraz aktywność GPx nie zostały znacząco zmienione. Wskazuje to, że uszkodzenia DNA były spowodowane bezpośrednimi interakcjami między badanymi związkami i/lub ich metabolitami, które destabilizowały strukturę DNA [53]. Zaobserwowano zmniejszenie żywotności komórek i indukcję apoptozy w komórkach linii RAW 264.7 [25].

Udowodniono, że cypermetryna wywołuje apoptozę w komórkach linii SH-SY5Y [38], astrocytach szczurów [32], a także u zarodka *Danio rerio* [28].

Romero i wsp. [39] badali stres oksydacyjny generowany w odpowiedzi na alfa-cypermetrynę w komórkach linii SH-SY5Y. Wykryto zmiany poziomów mRNA w 39 genach, w 3 obniżenie, a w 36 wzrost ekspresji genów. Wykryto zmianę ekspresji genów apoptozy, autofagii i martwicy oraz indukcję stresu oksydacyjnego, który prowadzi do uszkodzenia DNA [39].

Zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu i uszkodzenia DNA mogą zależeć od dawki cypermetryny. Według Huanh i wsp. pyretroid może doprowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego. Zaobserwowano zmniejszoną ekspresję p21, p53 oraz obniżenie poziomu cyklin D1, E, CDK4 [25].

Dikic i wsp. [12] wykazali właściwości uszkodzające cypermetryny w stosunku do DNA hepatocytów szczurów za pomocą testu kometkowego. Udowodniono genotoksyczność cypermetryny w komórkach krwi płodu (limfocyty) i wątroby szczurów rasy Wistar z użyciem testu kometkowego alkalicznego [33].

Ogaly i wsp. [35] stwierdzili zwiększoną ekspresję TP53 w mózgu szczurów po 30 dniach podawania deltametryny. Deltametryna indukowała apoptozę w splenocytach mysich w zależności od stężenia. Zaobserwowano powstawanie ROS, aktywację kaspazy-3, wzrost ekspresji kinazy p38 MAP i Bax w sposób zależny od stężenia oraz zmniejszenie ekspresji Bcl2 i GSH. Pyretroid indukował apoptozę przez interakcję z receptorami CD45, CD28 prowadząc do stresu oksydacyjnego i aktywacji szlaków zależnych od kaspaz mitochondrialnych [35].

Zaobserwowano wzrost ekspresji genu NF-κB p65 oraz Nrf2 w mózdzku szczurów rasy Wistar poddanych działaniu permetryny. Zmniejszenie ekspresji genu *Nurr1* w ciele prądkowym, natomiast wzrost w hipokampie i mózdzku. Wzrost białka *Nurr1* w ciałku prądkowym i białka NF-κB p65 w mózdzku, a spadek w hipokampie [8].

ZAPOBIEGANIE STRESOWI OKSYDACYJNEMU – DZIAŁANIE OCHRONNE

Wielu naukowców udowodniło, że pyretroidy wywołują stres oksydacyjny uszkodzając w ten sposób DNA, białka oraz lipidy, co zobrazowano na ryc. 1 [16, 17, 38, 42, 53]. Dlatego na znaczeniu zyskują badania dotyczące skutków ochronnych związków o udowodnionym działaniu antyoksydacyjnym, które mogą zapobiegać negatywnym działaniom pyretroidów.

Wykazano działanie ochronne etanolowego ekstraktu z owoców drzew oliwnych (OFE) i jego pochodnej – oleuropeiny (OLE) przeciwko toksyczności wątrobowo-nerkowej wywołanej przez deltametrynę, u szczurów rasy Wistar. Po podaniu deltametryny zaobserwowano wzrost poziomu LPO mierzonej wzrostem ilości MDA, zmniejszenie całkowitej zdolności przeciwutleniającej (ABTs), obniżenie aktywności SOD, CAT, wzrost poziomu ekspresji genów prozapalnych *cox-2* i proapoptotycznych *bcl-2* i *p53*. U szczurów, które otrzymały OLE i OFE zaobserwowano poprawę aktywności SOD, CAT, a także zmniejszenie ilości MDA [31].

Zhang i wsp. [54] wykazali ochronny wpływ melatoniny w stosunku do szkodliwego działania deltametryny na kraby. Pyretroid ten zwiększał poziom MDA, GSH oraz zmniejszał aktywność SOD. Ekspozycja na deltametrynę indukowała uszkodzenie wątroby i trzustki, czego oznaką był wzrost aktywności ALT, AST, AcP, ALP. Wymienione zmiany neutralizowała melatonina [54].

Ochronny wpływ na mózg narażony na toksyczne działanie cypermetryny wykazywał także olej sezamowy. Pyretroid zwiększał stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), obniżał stężenie glutationu, powodował spadek aktywności SOD, CAT, acetylocholinesterazy (EC 3.1.1.7; AChE) i oksydazy monoaminowej (EC 1.4.3.4; MAO), obniżał stężenia białka całkowitego, albuminy, a powodował wzrost stężenia triglicerydów i cholesterolu w osoczu krwi, a także redukcję masy ciała. Po zastosowaniu oleju sezamowego widoczna była znaczna poprawa wyników oraz stabilizacja masy ciała [26].

Kwas alfa-liponowy (ALA) wykazuje także ochronny wpływ pyretroidy. ALA łagodził niekorzystne zmiany oporności osmotycznej erytrocytów i peroksydację lipidów w organizmach szczurów rasy Wistar poddanych działaniu deltametryny [43].

Silne działanie antyoksydacyjne wywierały *N*-acetylocysteina [3] i kurkumina [24], podawane samcom szczurów traktowanych alfa-cypermetryną. Zastosowanie kurkuminy łącznie z pyretroidem zapobiegało stresowi oksydacyjnemu u badanych zwierząt. Nie zaobserwowano zmian w stężeniach dialdehydu malonowego, mocznika, kwasu askorbinowego oraz markerów uszkodzenia wątroby (AST, ALT), a także aktywności CAT i SOD [24]. Według Arafa i wsp. [3] alfa-cypermetryna powodowała wzrost aktywności LDH, stężenia MDA oraz zmniejszenie aktywności CAT,

SOD, obniżenie stężenia GSH i indukcję syntezy tlenu azotu w płucach szczurów. Zaobserwowano ponadto zmiany histopatologiczne objawiające się przekrwieniami oraz zmianami martwiczymi w tkance płuc. Zastosowanie *N*-acetylocysteiny złagodziło skutki niekorzystnego wpływu pyretroidu [3].

Spirulina platensis, mikroalga o aktywności przeciwutleniającej i przeciwzapalnej, chroniła samce myszy przed hepatotoksycznością, nefrotoksycznością oraz neurotoksycznością wywołaną deltametryną [1].

Ogaly i wsp. [35] badali działanie wodnego ekstraktu z liści zielonej herbaty przeciw neurotoksyczności i uszkodzeniom oksydacyjnym wywołanemu przez deltametrynę u samców szczurów. Związek ten powodował znaczny wzrost stężenia MDA, tlenu azotu, fragmentacji DNA, poziomu ekspresji genów apoptotycznych *Tp53*, *Cox2* oraz redukcję całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, natomiast zastosowanie ekstraktu z liści zielonej herbaty hamowało toksyczne działanie pyretroidu [35].

Doniesiono, że witaminy E i C łagodzą skutki toksyczne wywołanych u ptaków i ssaków przez deltametrynę [34]. Alfa-tokoferol zastosowany łącznie z deltametryną u broilerów (kurczaki) zmniejszał ubytek masy ciała, a także uszkodzenie wątroby (wzrost aktywności ALT i AST) u badanych zwierząt [9]. Witamina E hamowała neurotoksyczność indukowaną przez deltametrynę [18].

Gasmi i wsp. [19] wykazali działanie ochronne przed neurotoksycznością podczas stosowania kwercetyny

u szczurów rasy Wistar narażonych na deltametrynę. W badaniach zaobserwowano normalizację aktywności enzymów GSH, SOD, CAT, obrazu histopatologicznego (ograniczenie martwicy tkanki mózgowej) oraz zachowań behawioralnych: poprawę pamięci, polepszenie sprawności ruchowej, zmniejszenie lęku [19].

Związki przeciwutleniające, zwłaszcza pochodzenia roślinnego, w przyszłości mogą mieć istotne znaczenie u osób i zwierząt, które są narażone na działanie nie tylko pyretroidów, ale i innych pestycydów.

PODSUMOWANIE

Nie istnieją bezpieczne środki owadobójcze. Nawet te, które zostały wskazane jako potencjalnie nieszkodliwe, mogą wywoływać długotrwałe skutki zdrowotne, wpływać na ekspresję genów, a tym samym zmieniać odporność organizmu na stres środowiskowy oraz mechanizmy adaptacji. Ze względu na kumulację pyretroidów w środowisku, szczególnie wodnym, na uwagę zasługują wszystkie badania wyjaśniające mechanizmy reakcji zachodzących podczas kontaktu z pyretroidem.

Pyretroidy, modyfikując działanie enzymów uczestniczących w zmiataniu wolnych rodników, mogą wywoływać długotrwałe zmiany w tkankach, których skutkiem może być uszkodzenie narządów wewnętrznych, zmiany w odporności komórkowej i zmiany zachowania. Przedstawiono usystematyzowane dane dotyczące poszczególnych procesów, które mogą wystąpić po kontakcie z wymienionymi pyretroidami oraz możliwe rozwiązania prewencyjne.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdel-Daim M., El-Bialy B.E., Abdel Rahman H.G., Radi A.M., Hefny H.A., Hassan A.M.: Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: Biochemical and histopathological studies. *Biomed. Pharmacother.*, 2016; 77: 79-85
- [2] Adams L., Franco M.C., Estevez A.G.: Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp. Biol. Med.*, 2015; 240: 711-717
- [3] Arafa M.H., Mohamed D.A., Atteia H.H.: Ameliorative effect of *N*-acetyl cysteine on alpha-cypermethrin-induced pulmonary toxicity in male rats. *Environ Toxicol.*, 2015; 30: 26-43
- [4] Arrighetti F., Ambrosio E., Astiz M., Capitulo A.R., Lavarías S.: Differential response between histological and biochemical biomarkers in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gasteropoda: Amullariidae) exposed to cypermethrin. *Aquat Toxicol.*, 2018; 194: 140-151
- [5] Arslan H., Altun S., Özdemir S.: Acute toxication of deltamethrin results in activation of iNOS, 8-OHdG and up-regulation of caspase 3, iNOS gene expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat Toxicol.*, 2017; 187: 90-99
- [6] Bordoni L., Nasuti C., Mirto M., Caradonna F., Gabbianelli R.: Intergenerational effect of early life exposure to Permethrin: Changes in global DNA methylation and in *Nurr1* gene expression. *Toxics*, 2015; 3: 451-461
- [7] Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L.: Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, 2003; 531: 5-23
- [8] Carloni M., Nasuti C., Fedeli D., Montani M., Amici A., Vadhana M.S., Gabbianelli R.: The impact of early life permethrin exposure on development of neurodegeneration in adulthood. *Exp. Gerontol.*, 2012; 47: 60-66
- [9] Chandra N., Jain N.K., Sondhia S., Srivastava A.B.: Deltamethrin induced toxicity and ameliorative effect of alpha-tocopherol in broilers. *Bull Environ Contam. Toxicol.*, 2013; 90: 673-678
- [10] Chrustek A., Hołyńska-Iwan I., Dziembowska I., Bogusiewicz J., Wróblewski M., Cwynar A., Olszewska-Słonina D.: Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. *Medicina*, 2018; 54: 61
- [11] Dasuri K., Zhang L., Keller J.N.: Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013; 62: 170-185
- [12] Đikić D., Mojsović-Cuić A., Cupor I., Benković V., Horvat-Knezević A., Lisčić D., Orsolić N.: Carbendazim combined with imazalil or cypermethrin potentiate DNA damage in hepatocytes of mice. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2012; 31: 492-505
- [13] Ding R., Cao Z., Wang Y., Gao X., Luo H., Zhang C., Ma S., Ma X., Jin H., Lu C.: The implication of p66shc in oxidative stress induced by deltamethrin. *Chem. Biol. Interact.*, 2017; 278: 162-169

- [14] El Okda E.S., Abdel-Hamid M.A., Hamdy A.M: Immunological and genotoxic effects of occupational exposure to α -cypermethrin pesticide. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2017; 30: 603-615
- [15] Fedeli D., Montani M., Carloni M., Nasuti C., Amici A., Gabbianelli R., Vadhana M.S.: Leukocyte Nurr1 as peripheral biomarker of early-life environmental exposure to permethrin insecticide. *Biomarkers*, 2012; 17: 604-609
- [16] Gabbianelli R., Falcioni M.L., Nasuti C., Cantalamessa F., Imada I., Inoue M.: Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chem. Biol. Interact.*, 2009; 182: 245-252
- [17] Gabbianelli R., Palan M., Flis D.J., Fedeli D., Nasuti C., Skarydova L., Ziolkowski W.: Imbalance in redox system of rat liver following permethrin treatment in adolescence and neonatal age. *Xenobiotica*, 2013; 43: 1103-1110
- [18] Galal M.K., Khalaf A.A., Ogaly H.A., Ibrahim M.A.: Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complement Altern Med.*, 2014; 14: 458
- [19] Gasmi S., Rouabhi R., Kebieche M., Boussekine S., Salmi A., Toualbia N., Taib C., Bouteraa Z., Chenikher H., Henine S., Djabri B.: Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017; 24: 16440-16457
- [20] Grosicka-Maciąg E.: Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 357-366
- [21] Hashema H.E., Abd El-Haleema M.R., Abass M.A.: Epithelial and stromal alterations in prostate after cypermethrin administration in adult albino rats (histological and biochemical study). *Tissue Cell*, 2015; 47: 366-372
- [22] Higuchi Y.: Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 1527-1535
- [23] Hocine L., Merzouk H., Merzouk S.A., Ghorzi H., Youbi M., Narce M.: The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2016; 134: 49-54
- [24] Hongsibsong S., Stuetza W., Susa N., Prapamontol T., Grune T., Frank J.: Dietary exposure to continuous small doses of α -cypermethrin in the presence or absence of dietary curcumin does not induce oxidative stress in male Wistar rats. *Toxicol. Rep.*, 2014; 1: 1106-1114
- [25] Huang F., Liu Q., Xie S., Xu J., Huang B., Wu Y., Xia D.: Cypermethrin induces macrophages death through cell cycle arrest and oxidative stress-mediated JNK/ERK signaling regulated apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016; 17: 885
- [26] Hussien H.M., Abdoub H.M., Mokhtar I.Y.: Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: The protective effect of sesame oil. *Brain Res. Bull.*, 2013; 92: 76-83
- [27] Jia Z.Z., Zhang J.W., Zhou D., Xu D.Q., Feng X.Z.: Deltamethrin exposure induces oxidative stress and affects meiotic maturation in mouse oocyte. *Chemosphere*, 2019; 223: 704-713
- [28] Jin Y., Zheng S., Fu Z.: Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, 2011; 30: 1049-1054
- [29] Kumar A., Sasmal D., Bhaskar A., Mukhopadhyay K., Thakur A., Sharma N.: Deltamethrin-induced oxidative stress and mitochondrial caspase-dependent signaling pathways in murine splenocytes. *Environ Toxicol.*, 2016; 31: 808-819
- [30] Lidova J., Stara A., Kouba A., Velisek J.: The effects of cypermethrin on oxidative stress and antioxidant biomarkers in marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2016; 37: 53-59
- [31] Maalej A., Mahmoudi A., Bouallagui Z., Fki I., Marrekchi R., Sayadi S.: Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.*, 2017; 106: 455-465
- [32] Maurya S.K., Rai A., Rai N.K., Deshpande S., Jain R., Mudiam M.K., Prabhakar Y.S., Bandyopadhyay S.: Cypermethrin induces astrocyte apoptosis by the disruption of the autocrine/paracrine mode of epidermal growth factor receptor signaling. *Toxicol. Sci.*, 2012; 125: 473-487
- [33] Murkunde Y.V., Sathya T.N., Subashini N., Murthy P.B.: Transplacental genotoxicity evaluation of cypermethrin using alkaline comet assay. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2012; 31: 185-192
- [34] Nieradko-Iwanicka B., Borzęcki A.: Subacute poisoning of mice with deltamethrin produces memory impairment, reduced locomotor activity, liver damage and changes in blood morphology in the mechanism of oxidative stress. *Pharmacol. Rep.*, 2015; 67: 535-541
- [35] Ogaly H.A., Khalaf A.A., Ibrahim M.A., Galal M.K., Abd-Elsalam R.M.: Influence of green tea extract on oxidative damage and apoptosis induced by deltamethrin in rat brain. *Neurotoxicol Teratol.*, 2015; 50: 23-31
- [36] Oliveira J.M., Losano N.F., Condessa S.S., de Freitas R.M., Cardoso S.A., Freitas M.B., de Oliveira L.L.: Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2018; 148: 684-692
- [37] Özok N.: Effects of cypermethrin on antioxidant enzymes and lipid peroxidation of Lake Van fish (*Alburnus tarichi*). *Drug Chem. Toxicol.*, 2020; 43: 51-56
- [38] Raszewski G., Lemieszek M.K., Łukawski K., Juszcak M., Rzeski W.: Chlorpyrifos and cypermethrin induce apoptosis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2015; 116: 158-167
- [39] Romero A., Ramos E., Ares I., Castellano V., Martínez M., Martínez-Larrañaga M.R., Anadón A., Martínez M.A.: Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol.*, 2017; 91: 2151-2164
- [40] Sellami B., Khazri A., Mezni A., Louati H., Dellali M., Aissa P., Mahmoudi E., Beyrem H., Sheehan D.: Effect of permethrin, anthracene and mixture exposure on shell components, enzymatic activities and proteins status in the Mediterranean clam *Venerupis decussate*. *Aquatic Toxicol.*, 2015; 158: 22-32
- [41] Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: The types of cell death. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 420-428
- [42] Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K.S., Farook M.A., Vimal S., Sahul Hameed A.S.: In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2014; 113: 15-24
- [43] Uchendu C., Ambali S.F., Ayo J.O., Esievo K.A., Umosen A.J.: Erythrocyte osmotic fragility and lipid peroxidation following chronic co-exposure of rats to chlorpyrifos and deltamethrin, and the beneficial effect of alpha-lipoic acid. *Toxicol. Rep.*, 2014; 1: 373-378
- [44] Vadhana D., Carloni M., Fedeli D., Nasuti C., Gabbianelli R.: Perturbation of rat heart plasma membrane fluidity due to metabolites of permethrin insecticide. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2011; 11: 226-234

- [45] Vadhana M.S., Carloni M., Nasuti C., Fedeli D., Gabbianelli R.: Early life permethrin insecticide treatment leads to heart damage in adult rats. *Exp. Gerontol.*, 2011; 46: 731-738
- [46] Weidinger A., Kozlov A.V.: Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Bio-molecules*, 2015; 5: 472-484
- [47] World Health Organization (WHO): WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Deltamethrin Long-Lasting (Coated onto Filaments) Insecticidal Net. (S)- α -Cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane Carboxylate. World Health Organization, Geneva 2017
- [48] World Health Organization (WHO): Pesticide Evaluation Scheme, Vector Ecology and Management; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016
- [49] World Health Organization (WHO): WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Permethrin (25:75 Cis:Trans Isomer Ratio) 3-Phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane Carboxylate. World Health Organization, Geneva 2015
- [50] World Health Organization (WHO): WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Alpha-Cypermethrin Long-Lasting (Incorporated into Filaments) Insecticidal Net. A Racemic Mixture of: (S)- α -Cyano-3-phenoxybenzyl-(1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate and (R)- α -Cyano-3-phenoxybenzyl-(1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate. World Health Organization, Geneva 2014
- [51] Xu M., Wang P., Sun Y.J., Wang H.P., Liang Y.J., Zhu L., Wu Y.J.: Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and deltamethrin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2015; 124: 60-65
- [52] Zabłocka A., Janusz M.: The two faces of reactive oxygen species. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118-124
- [53] Želježić D., Mladinić M., Žunec S., Vrdoljak A.L., Kašuba V., Tariba B., Živković T., Marjanović A.M., Pavičić I., Milić M., Rozgaj R., Kopjar N.: Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food Chem. Toxicol.*, 2016; 96: 90-106
- [54] Zhang C., Zhang Q., Pang Y., Song X., Zhou N., Wang J., He L., Lv J., Song Y., Cheng Y., Yang X.: The protective effects of melatonin on oxidative damage and the immune system of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to deltamethrin. *Sci. Total Environ.*, 2019; 653: 1426-1434
- [55] Zhang J., Liu L., Ren L., Feng W, Lv P., Wu W., Yan Y.: The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *J. Hazard Mater.*, 2017; 334: 121-131
- [56] Zhou F., Sun W., Zhao M.: Controlled formation of emulsion gels stabilized by salted myofibrillar protein under malondialdehyde(MDA)-induced oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.*, 2015; 63: 3766-3777

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.