

Received: 2010.12.21
Accepted: 2011.05.18
Published: 2011.06.17

Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów

Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides

Emilia Grosicka-Maciąg

Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Pestycydy są powszechnie stosowane do ochrony roślin, produktów roślinnych, a także są wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu. Zaliczane są do związków szkodliwych. Mimo istniejących rygorystycznych kontroli ich stosowania istnieje duże ryzyko, że pestycydy oraz ich pochodne mogą przedostawać się do środowiska naturalnego zanieczyszczając wodę, glebę i żywność, stanowiąc tym samym zagrożenie dla zdrowia człowieka. Prowadzone badania w wielu ośrodkach naukowych koncentrują się na wyjaśnieniu mechanizmów działania pestycydów. Toksyczność pestycydów może być związana m.in. z indukcją stresu oksydacyjnego i nagromadzeniem się wolnych rodników w komórce. Długotrwały, bądź nasilony stres oksydacyjny jest szkodliwy dla komórki, ponieważ wywołuje zaburzenia jej metabolizmu. Prowadzić to może do powstania trwałych zmian w strukturze białek, lipidów i DNA. W wyniku utlenienia wiele białek może utracić lub zwiększyć swoją aktywność, a także tworzyć agregaty mogące hamować systemy odpowiedzialne za ich degradację, co sprzyja nagromadzeniu się zmienionych białek w komórkach. Wzrost utleniania lipidów komórkowych wywołuje uszkodzenia i depolaryzację błon cytoplazmatycznych. W wyniku działania wolnych rodników tlenowych na cząsteczkę DNA dochodzi do powstania licznych uszkodzeń oksydacyjnych (uszkodzeń pojedynczych zasad azotowych, pęknięć nici DNA, tworzenia adduktów). Stres oksydacyjny wymieniany jest jako jedna z przyczyn chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimer, Parkinsona) i nowotworowych, a także bezpłodności.

Słowa kluczowe:

pestycydy • stres oksydacyjny • utlenienie białek i DNA • peroksydacja lipidów • choroby neurodegeneracyjne • nowotworowe • bezpłodność

Summary

Pesticides are used to protect plants and numerous plant products. They are also utilized in several industrial branches. These compounds are highly toxic to living organisms. In spite of close supervision in the use of pesticides there is a serious risk that these agents are able to spread into the environment and contaminate water, soil, food, and feedstuffs. Recently, more and more studies have been focused on understanding the toxic mechanisms of pesticide actions. The data indicate that the toxic action of pesticides may include the induction of oxidative stress and accumulation of free radicals in the cell. Long-lasting or acute oxidative stress disturbs cell metabolism and is able to produce permanent changes in the structure of proteins, lipids, and DNA. The proteins that are oxidized may lose or enhance their activity. Moreover, the proteins oxidized are able to form aggregates that inhibit the systems responsible for protein degradation and lead to alterations of proteins in the cell. Once oxidized, lipids have the capacity to damage and depolarize cytoplasmic membranes. Free oxygen radicals are harmful to DNA including damage

to single nitric bases, DNA strand breaks and adduct production. Many studies indicate that oxidative stress may accelerate development of numerous diseases including cancer and neurodegenerative ones such as Alzheimer's and Parkinson's disease and may also be responsible for infertility.

Key words: pesticides • oxidative stress • protein oxidation • lipid peroxidation • DNA oxidation • neurodegenerative diseases • cancer • infertility

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=948816>

Word count: 3664

Tables: –

Figures: 6

References: 77

Adres autorki: dr Emilia Grosicka-Maciąg, Katedra i Zakład Biochemii, I WL, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: grosicka@amwaw.edu.pl

Wykaz skrótów: **ADI** – akceptowane dzienne pobranie (acceptable daily intake); **ARfD** – ostra dawka referencyjna (acute reference dose); **c-fos, c-jun, c-myc** – protoonkogeny; **DOPA** – 3,4-dihydroksyfenyloalanina; **GSH** – zredukowany glutation; **GSSG** – utleniony glutation; **4-HNE** – *trans*-4-hydroksynonenal; **MDA** – dialdehyd malonowy; **NDP** – najwyższy dopuszczalny poziom; **PC** – białkowe grupy karbonylowe (protein carbonyl groups); **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's disease); **PSTI** – Predicted Short Term Intake; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **TBARS** – związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (thiobarbituric reactive substances).

WSTĘP

Pestycydy są związkami powszechnie stosowanymi na całym świecie w rolnictwie i w wielu gałęziach przemysłu. W krajach Unii Europejskiej, tylko do ochrony roślin, zużywa się ponad 140 000 ton pestycydów rocznie. Z danych statystycznych UE wynika, że w latach 1993–2003 roczne zużycie pestycydów nie zmniejszyło się [15]. Pestycydy powinny charakteryzować się wysoką toksycznością w stosunku do szkodników, natomiast niską w stosunku do pozostałych organizmów, głównie człowieka oraz organizmów zamieszkujących środowisko wodne. Powinny być odporne na trwałe, podatne na biodegradację tak, aby po spełnieniu swojej funkcji nie były szkodliwe dla środowiska oraz nie dochodziło do ich kumulacji. W Polsce pestycydy podzielono na 5 klas toksyczności, a o zakwalifikowaniu do poszczególnej grupy decyduje wartość LD_{50} . Jest to dawka śmiertelna wyrażona w ilości miligramów substancji toksycznej na kilogram masy ciała, która po jednorazowym podaniu powoduje śmierć 50% badanej populacji zwierząt. Dane te dotyczą badań prowadzonych na zwierzętach i związane są z wyznaczeniem toksyczności ostrej.

Jest wiele kryteriów, według których dzielimy pestycydy, np. w zależności od zwalczanego organizmu pestycydy dzieli się na: zoocydy (środki do zwalczania szkodników zwierzęcych), bakteriocydy (środki do zwalczania bakterii), herbicydy (środki do zwalczania chwastów) oraz fungicydy (środki grzybobójcze). Często stosuje się podział pestycydów ze względu na budowę chemiczną, tj. pestycydy nieorganiczne (insektydy arsenowe i insektydy fluorkowe) oraz pestycydy organiczne (chloroorganiczne, fosforoorganiczne, karbaminiany, pochodne kwasu fenoksyoctowego oraz pochodne triazynowe).

Ze względu na coraz powszechniejsze stosowanie pestycydów, także przy przechowywaniu żywności, jesteśmy stale narażeni na ich pozostałości w produktach spożywczych, a także w wodzie pitnej. Tylko niewielka część stosowanych w krajach Unii Europejskiej pestycydów jest objęta programem monitorowania, podczas gdy prawie 50% owoców, warzyw i zbóż dostępnych na rynku jest zanieczyszczonych pozostałościami pestycydów, a ponad 25% badanej żywności zawiera pozostałości przynajmniej dwóch pestycydów. Również żywność przetworzona, w tym także jedzenie przeznaczone dla niemowląt, jest zanieczyszczona pozostałościami pestycydów [15,51].

Według FAO/WHO, pozostałość pestycydów w żywności definiuje się jako sumę związków chemicznych obecnych w produkcie spożywczym w wyniku stosowania pestycydów (substancja macierzysta oraz produkty jej przemiany lub rozkładu). Celem ochrony zdrowia ludności opracowano tzw. Najwyższe Dopuszczalne Poziomy Pozostałości Pestycydów w poszczególnych surowcach i produktach spożywczych (tzw. NDP). Wartości te wyrażane są w mg/kg produktu. Od 1 września 2008 r. we wszystkich krajach Unii Europejskiej obowiązują ujednolicone przepisy w zakresie dopuszczalnego poziomu pozostałości pestycydów w żywności. Przepisy te mają chronić konsumentów i ułatwić wymianę handlową między krajami, zapewniając jednocześnie najwyższy poziom bezpieczeństwa żywności. Akty prawne dotyczące NDP dla pestycydów są dostępne na stronie internetowej: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection&ch=1ie.

W krajach Unii Europejskiej, w tym również w Polsce, w przypadku przekroczeń NDP w badanych próbkach z obrotu dokonuje się oceny ryzyka wynikającego z narażenia

krótkoterminowego obliczając tzw. wartość przewidywanego krótkoterminowego pobrania z żywnością na podstawie wyniku badania próbki – PSTI (predicted short term intake from sampling result) i porównując ją z tzw. ostrą dawką referencyjną (ARfD), bądź w przypadku jej braku z akceptowanym dziennym pobraniem (ADI). Ocenę tę przeprowadza się dla tzw. populacji generalnej (w praktyce jest to grupa osób dorosłych) oraz tzw. populacji krytycznej, najbardziej wrażliwej na skutki narażenia na pozostałości pestycydów, tzn. dzieci w wieku 1,5–6 lat i kobiet w ciąży [64]. Zgodnie z definicją WHO, ADI to jest ilość substancji [mg/kg m.c × dzień⁻¹], która może być bezpiecznie pobrana przez człowieka z żywnością i wodą pitną przez całe życie bez ryzyka dla zdrowia [71]. ARfD jest to ilość substancji w żywności lub wodzie pitnej wyrażona w mg/kg m.c., która nie może być pobrana w czasie nie dłuższym niż 24 godziny bez ryzyka dla zdrowia konsumenta, oszacowana na podstawie wszystkich faktów znanych w czasie dokonywania oceny [65,72]. Zarówno wartość ADI, jak i ARfD są ustalone niezależnie, zarówno na poziomie FAO/WHO, jak również na etapie rejestracji substancji czynnych w UE. Zgodnie z zaleceniami UE wartość ARfD powinna być wyznaczona dla każdego pestycydu.

W Polsce badania przeprowadzone przez Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin w Rzeszowie [60] wykazały obecność pozostałości pestycydów w wielu dostępnych na rynku owocach i warzywach. Na terenie południowo-wschodniej Polski pobrano próbki świeżych oraz mrożonych owoców i warzyw przeznaczonych na eksport i na rynek krajowy, w tym także do produkcji odżywek dla dzieci (607 próbek). Pozostałości aktywnych środków ochrony roślin wykryto w 173 próbkach (28%), przy czym w 23 próbkach (4%) przekroczyły one poziom NDP (najwyższy dopuszczalny poziom pozostałości substancji aktywnych środków ochrony roślin) obowiązujący w Polsce. W 8 próbkach stwierdzono pozostałości substancji aktywnych pochodzących ze środków ochrony roślin niezalecanych, bądź też objętych czasowym zakazem [57,58].

W latach 1988–1994 w USA przeprowadzono badania, których celem była przybliżona ocena liczebności populacji narażonej na pestycydy i ich pozostałości. Badania te wykazały, że w moczu większości przebadanych osób obecne są wykrywalne stężenia fosforanu metylu, fosforanu etylu i innych metabolitów pestycydów [15,46]. Takich badań nie przeprowadzono dotychczas w krajach Europy, dlatego też nie można dokładnie określić liczebności populacji osób narażonych na pozostałości pestycydów w tych rejonach.

Badania prowadzone w laboratoriach koncentrują się na wyjaśnieniu mechanizmów działania pestycydów. Toksyczność pestycydów może być związana m.in. z indukcją stresu oksydacyjnego i nagromadzeniem się wolnych rodników w komórce. Długotrwały, bądź nasilony stres oksydacyjny jest szkodliwy dla komórki, ponieważ wywołuje zaburzenia jej metabolizmu.

Zaburzenia metabolizmu komórkowego mogą prowadzić do trwałych zmian w strukturze DNA, RNA, białek, lipidów i cukrów, czego konsekwencją jest najczęściej utrata ich biologicznych funkcji i w dalszej kolejności rozwój procesów chorobowych. Stres oksydacyjny jest uważany za główną przyczynę wielu chorób, takich jak: miażdżyca,

cukrzyca, katarakta, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona), autoimmunologiczne, a także choroby nowotworowej. Jest on także jednym z istotniejszych czynników odpowiedzialnych za proces starzenia, a ponadto może być przyczyną bezpłodności [1,27,68].

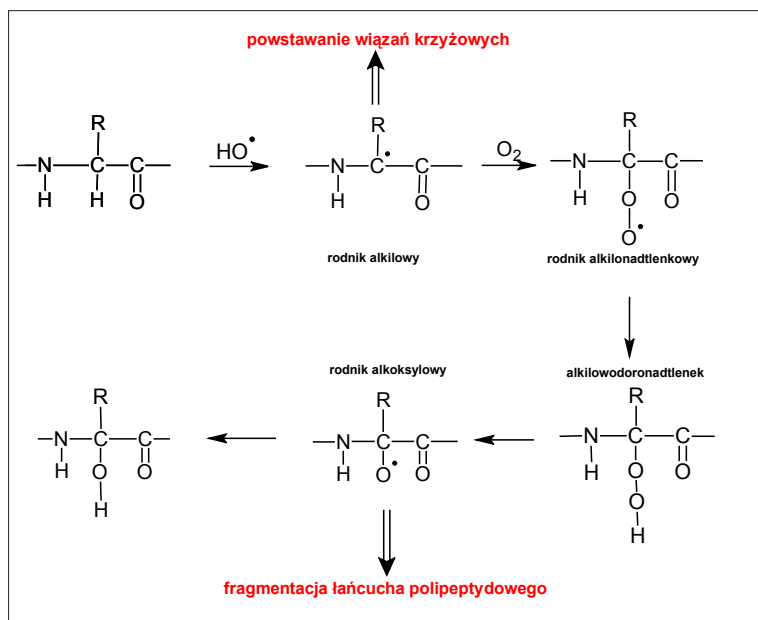
UTLENIANIE BIAŁEK

W wyniku utlenienia reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym może dojść do jego rozerwania, utworzenia wiązań krzyżowych w obrębie tego samego lub kilku łańcuchów polipeptydowych, a także modyfikacji reszt aminokwasowych [56,63]. W wyniku tego procesu wiele białek może stracić lub zwiększyć swoją aktywność biologiczną. Utlenione białka łatwo tworzą agregaty, które z kolei mogą hamować układy enzymatyczne odpowiedzialne za ich degradację. Wymienione procesy sprzyjają nagromadzeniu się zmienionych białek w komórkach [34,56].

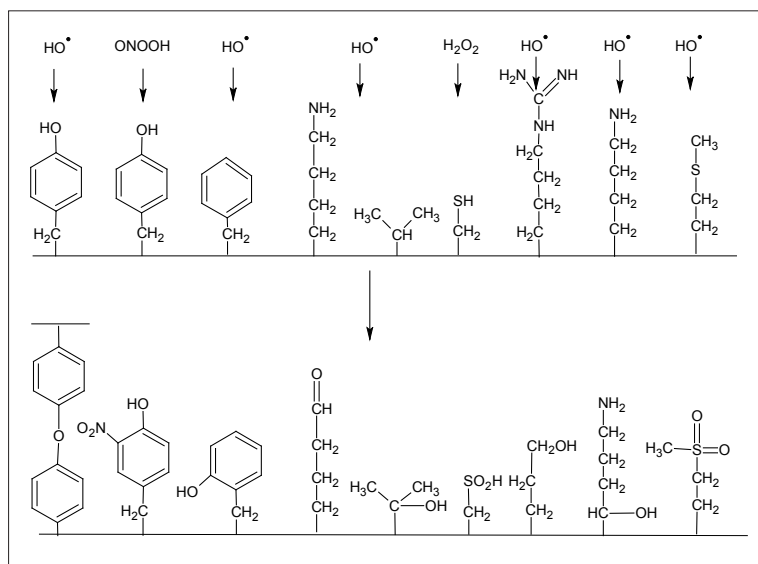
Za oksydacyjne modyfikacje białek odpowiedzialne są przede wszystkim, nadtlenek wodoru (H₂O₂), rodnik hydroksylowy (·OH) oraz anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻). Reakcje utlenienia reszt aminokwasowych przedstawiono na ryc. 1. Rodnik hydroksylowy zapoczątkowuje utlenianie łańcucha polipeptydowego odrywając atom wodoru przy węglu α aminokwasu. W wyniku tej reakcji powstaje rodnik alkilowy, który reaguje gwałtownie z tlenem tworząc rodnik alkilonadtlenkowy, a następnie alkilowodoronadtlenek. Z powstałego alkilowodoronadtlenku utworzony zostaje rodnik alkoksylowy, który może się przekształcić w hydroksylovaną przy węglu α resztę aminokwasową lub może doprowadzić do fragmentacji łańcucha polipeptydowego [13,56]. Wytworzone w przebiegu powyższych reakcji rodniki: alkilowy, alkilonadtlenkowy i alkoksylowy mogą reagować z innymi resztami aminokwasowymi tego samego lub innego łańcucha polipeptydowego, powodując w ten sposób powstawanie kolejnych rodników. Przy niedoborze tlenu, rodniki alkilowe mogą reagować ze sobą, prowadząc do powstania wiązań krzyżowych między łańcuchami polipeptydowymi [34,56,63].

Wszystkie reszty aminokwasowe obecne w białkach są podatne na utlenianie, jednak największą wrażliwość na działanie reaktywnych form tlenu (RFT) wykazują: cysteina, metionina, tyrozyna i tryptofan. Modyfikacje aminokwasów przez reaktywne formy tlenu przedstawiono na ryc. 2. Reszty cysteinowe są utleniane do reszt disiarczkowych, a metioninowe do sulfotlenku metioniny. Te modyfikacje aminokwasów w białkach *in vivo* są jedynymi, które mogą zostać naprawione przez swoiste reduktazy [13]. Utlenienie reszt tyrozynowych prowadzi do powstania 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) lub do utworzenia wiązań krzyżowych między dwiema cząsteczkami tego aminokwasu z utworzeniem 2,5-dityrozyny [13]. W wyniku utlenienia tryptofanu powstaje formylkinurenina i kinurenina, natomiast reszty histydyny zostają utlenione do 2-oksohistydyny, kwasu asparaginowego i asparaginy [13,56].

Inną grupą aminokwasów o podwyższonej podatności na utlenianie przez RFT są aminokwasy z wolną grupą aminową, amidową i hydroksylową (lizyna, arginina, tyrozyna). W wyniku ich utlenienia powstają pochodne karbonylowe. Dotyczy to również proliny, której pierścień ulega rozerwaniu w czasie utlenienia [13]. Powstałe pochodne



Ryc. 1. Utlenianie łańcucha polipeptydowego przy węglu α



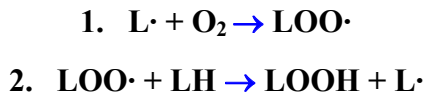
Ryc. 2. Modyfikacje aminokwasów pod wpływem reaktywnych form tlenu (wg [29] zmodyfikowano)

karbonylowe aminokwasów mogą reagować z wolnymi grupami aminowymi reszt lizyny w tej samej lub innej cząsteczce białka. W wyniku tej reakcji utworzone zostaje wiązanie krzyżowe [13,56]. Pochodne karbonylowe mogą także powstawać w reakcjach reszt aminokwasowych z produktami peroksydacji lipidów i cukrami nieredukującymi [13,56,63].

Wiele aminokwasów jest utlenianych również przez nadtlenoazotyn (ONOO^-) [5]. Na działanie rodnika nadtlenoazotynowego szczególnie narażone są aminokwasy siarkowe: cysteina, metionina oraz aminokwasy aromatyczne: tyrozyna i tryptofan. Nadtlenoazotyn może również odpowiadać za podstawienie grupy nitrowej ($-\text{NO}_2$) w pierścieniu aromatycznym aminokwasów [41,56].

Przy wysokim stężeniu RFT, a jednocześnie obniżonej aktywności układów proteolitycznych, dochodzi w komórce do nagromadzenia utlenionych białek. Ich obecność wykryto w wielu tkankach. Wykazano, że stres oksydacyjny oraz

modyfikacje białek zachodzące pod wpływem RFT odgrywają rolę zarówno w procesie starzenia, jak i w patogenezie wielu chorób [56]. Znacznikiem mówiącym o poziomie oksydacyjnych uszkodzeń białek jest stężenie białkowych grup karbonylowych (PC) obecnych w pochodnych aminokwasów o charakterze aldehydów lub ketonów. Pochodne te powstają na skutek utlenienia reszt aminokwasowych zawierających wolną grupą aminową, amidową lub hydroksylową (lizyna, arginina, tyrozyna) oraz reszt tryptofanu oraz prolina. Grupy karbonylowe powstają również na skutek przzerwania łańcucha polipeptydowego, gdy w środowisku pojawi się rodnik alkoksylowy. Grupy karbonylowe białek, powstające w wyniku utleniania białek, są stosunkowo stabilne chemicznie, dzięki czemu możliwe jest ich jakościowe i ilościowe oznaczenie, co pozwala na ocenę stopnia uszkodzenia białek [20,56]. Z piśmiennictwa wiadomo, że toksyczność niektórych powszechnie stosowanych pestycydów z grupy ditiokarbaminianów: np. zinebu, tiuramu, a także disulfiram wiazana jest m.in. z ich niekorzystnym wpływem na strukturę białek, o czym świadczy



Ryc. 3. Reakcje fazy propagacji w procesie peroksydacji lipidów

obserwowany wzrost stężenia białkowych grup karbonylowych [6,32,33].

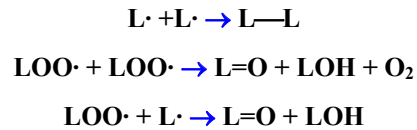
PEROKSYDACJA LIPIDÓW BŁONOWYCH

Peroksydacja lipidów jest procesem utleniania, przede wszystkim wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów, będących podstawowym składnikiem budulcowym błon biologicznych (głównie fosfatydyloetanolaminy i fosfatydylocholino) prowadzącym do powstania nadtlenujących związków. Proces ten ma charakter lawinowy oraz wolnorodnikowy. Reakcje peroksydacji nasilają się w komórkach narażonych na działanie stresu oksydacyjnego, np. w czasie infekcji, w stanach zapalnych, w procesach starzenia, chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworowych [3,7,10,53,66]. Mechanizmy cytotoksycznego działania niektórych pestycydów z grupy ditiokarbaminianów: np. manebu, zinebu lub tiuramu związane są z indukcją w komórkach procesów peroksydacji lipidów [6,33,35]. W wyniku tego procesu dochodzi do uszkodzenia i depolaryzacji błon cytoplazmatycznych oraz błon mitochondrialnych, co skutkuje wzmożonym wytwarzaniem wolnych rodników tlenowych w komórce [40,52].

Peroksydacja lipidów jest procesem składającym się z trzech faz: inicjacji, propagacji i terminacji. W fazie inicjacji atom wodoru zostaje oderwany od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (L) lub reszty takiego kwasu wchodzącego w skład fosfolipidu pod wpływem np. rodnika hydroksylowego $\cdot OH$, rodnika: nadtlenującego $\cdot LOO$, alkoksylowego $\cdot LO$ bądź alkilowego $\cdot L$ lub ksenobiotyków. Reakcje peroksydacji lipidów mogą też inicjować: O_3 , NO , NO_2 , SO_2 i kationorodniki – ferrylowy bądź nadferrylowy oraz kompleks $Fe^{2+}-O_2-Fe^{3+}$ [9]. W wyniku reakcji inicjacji z cząsteczką kwasu tłuszczowego powstaje wolny rodnik alkilowy $\cdot L$.

Reakcje fazy propagacji przedstawiono na ryc. 3. W reakcjach tych wolne rodniki alkilowe $L \cdot$ reagują z tlenem, tworząc wolne rodniki nadtlenujące $\cdot LOO$ (reakcja 1 na ryc. 3), które odrywają atomy wodoru od kolejnych, nieuszkodzonych cząsteczek nienasyconych kwasów tłuszczowych. W wyniku tej reakcji powstaje nadtlenek kwasu tłuszczowego $LOOH$ i kolejny rodnik alkilowy, który może utleniać kolejną cząsteczkę kwasu tłuszczowego (reakcja 2 na ryc. 3). Powyższe reakcje mogą się powtarzać wielokrotnie, co doprowadza do przekształcenia w nadtenki – kilku, kilkudziesięciu, a nawet kilkuset cząsteczek kwasów tłuszczowych.

Terminacja procesu peroksydacji lipidów polega na reakcji między wolnymi rodnikami (rekombinacji wolnych rodników) i prowadzi do powstania produktu, który nie jest wolnym rodnikiem (ryc. 4). Produktami etapu terminacji są dimery kwasów tłuszczowych (w błonach biologicznych dimery fosfolipidów) oraz okso- lub hydroksykwasy – a więc zmodyfikowane, uszkodzone cząsteczki lipidów [9].



Ryc. 4. Reakcje fazy terminacji w procesie peroksydacji lipidów

Dalsze przemiany produktów peroksydacji zachodzące m.in. za pośrednictwem β -eliminacji, prowadzą do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i powstania kilku- lub kilkunastowęglowych fragmentów (ryc. 5). Produktami końcowymi powyższych reakcji są m.in. dialdehyd malonowy (MDA) i *trans*-4-hydroksynonenal (4-HNE), które mogą uszkadzać cząsteczki kwasów nukleinowych i białek. W wyniku peroksydacji lipidów powstają również inne aldehydy i hydroksyaldehydy, w tym 4-hydroksyalkenal, 2-alkenal, hepta-2,4-dienal, 5-hydroksyoktanal i wiele innych, a także węglowodory, takie jak etan i pentan. Spośród wymienionych produktów peroksydacji lipidów, 4-HNE jest najbardziej toksyczny, natomiast MDA wykazuje mutagenność wobec licznych komórek bakteryjnych i komórek ssaków, a ponadto jest kancerogenny dla szczurów [68,75]. Podwyższone stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym TBARS (thiobarbituric reactive substances) odzwierciedla zwiększoną peroksydację lipidów i jest parametrem wykorzystywanym do badania peroksydacji lipidów.

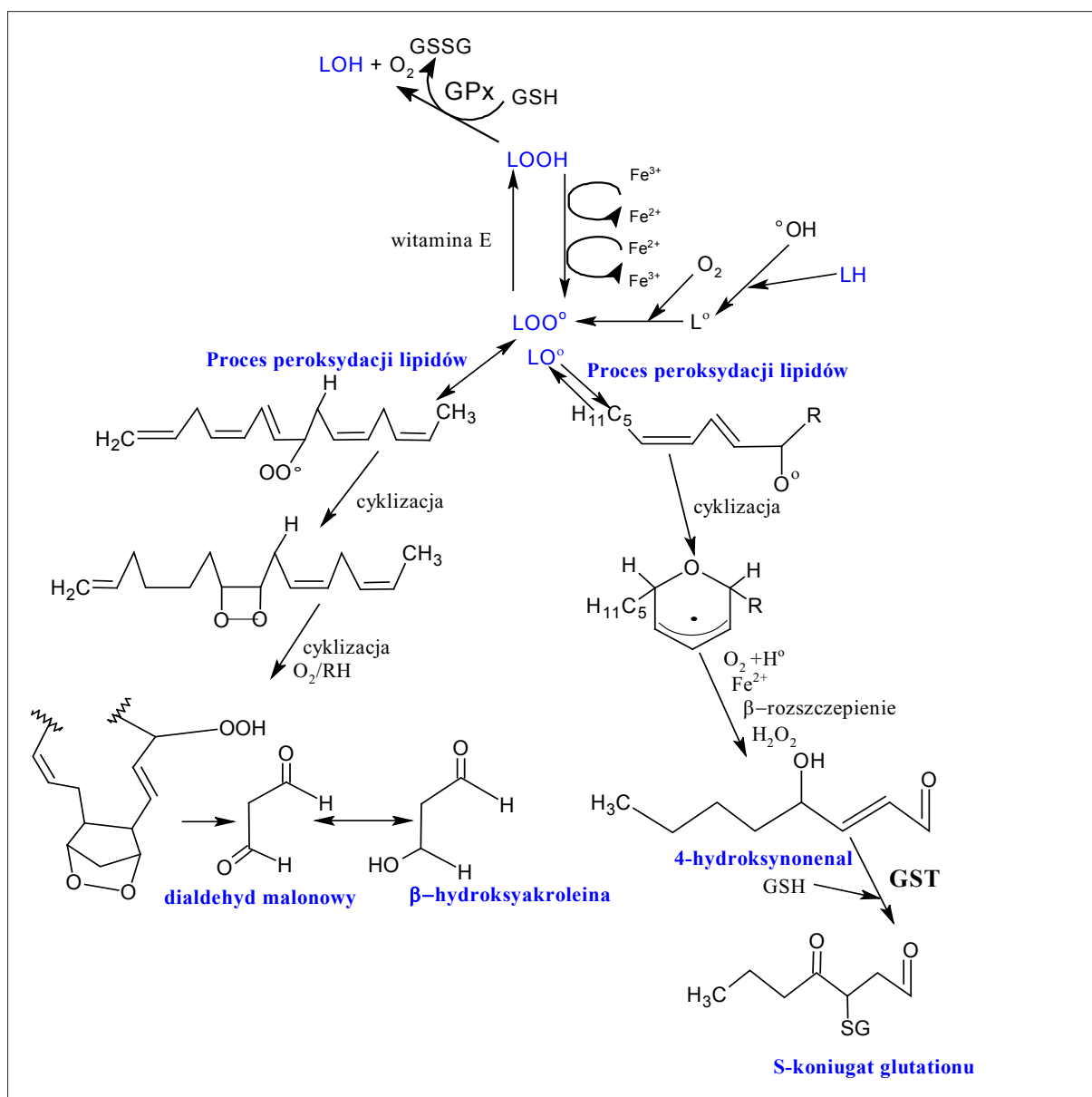
Produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych. Do fosfolipidów znajdujących się wewnątrz podwójnej warstwy lipidowej, wprowadzone zostają polarne grupy nadtlenujące, ketonowe, aldehydowe lub hydroksylowe. Powoduje to obniżenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błon komórkowych, a także zmianę organizacji podwójnej warstwy lipidowej, co prowadzi do zaburzenia asymetrii lipidowej błon [48]. W wyniku peroksydacji lipidów dochodzi również do zahamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących, np. $(Ca^{2+}-Mg^{2+})-ATP$ -azy. Ostatecznie reakcje peroksydacji mogą spowodować zaburzenia integralności błon komórkowych [3,9,36,42,48,76].

UTLENIANIE DNA I CUKRÓW

W wyniku działania RFT na cząsteczkę DNA dochodzi do powstania licznych uszkodzeń oksydacyjnych, m.in. uszkodzeń pojedynczych zasad azotowych, pęknięć nici DNA oraz tworzenia adduktów [17,73].

Nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy nie działają bezpośrednio na składniki kwasów nukleinowych. Za oksydacyjne uszkodzenia DNA odpowiedzialny jest przede wszystkim rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$). Reakcje rodnika hydroksylowego z kwasami nukleinowymi prowadzą do uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowych lub powstania pęknięć nici kwasów nukleinowych, a także do powstania wiązań poprzecznych DNA-białko.

Najbardziej podatne na reakcje z rodnikiem hydroksylowym są reszty tymidyny. W wyniku reakcji z $\cdot OH$ powstają wolne rodniki reszt tymidyny, które reagują z tlenem i tworzą odpowiednie nadtenki (ryc. 6). W wyniku tych reakcji powstają trzy izomery nadtlenu tymidyny, mające grupę nadtlenującą w pozycji 5 lub 6 pierścienia pirymidynowego



Ryc. 5. Proces peroksydacji lipidów

lub związaną z węglem grupy metylowej, są to: *cis*-6-hydroksy-5-hydroperoksy-5,6-dihydrotymidyna, *cis*-5-hydroksy-6-hydroperoksy-5,6-dihydrotymidyna oraz 5-hydroperoksymetylo-2'-deoksyurydyna [9].

Kolejną zasadą azotową, która bardzo łatwo ulega utlenieniu jest guanina. Produktem reakcji rodnika hydroksylowego z cząsteczką guaniny jest 8-hydroksyguanina (8-OH-G), która jest najczęściej spotykanym mutagennym uszkodzeniem cząsteczki DNA [45]. Wynikiem powyższej zmiany jest indukcja mutacji typu transwersji, w której para zasad guanina-cytozyna (G-C) przechodzi w parę tymina-adenina (T-A): G-C→T-A [38].

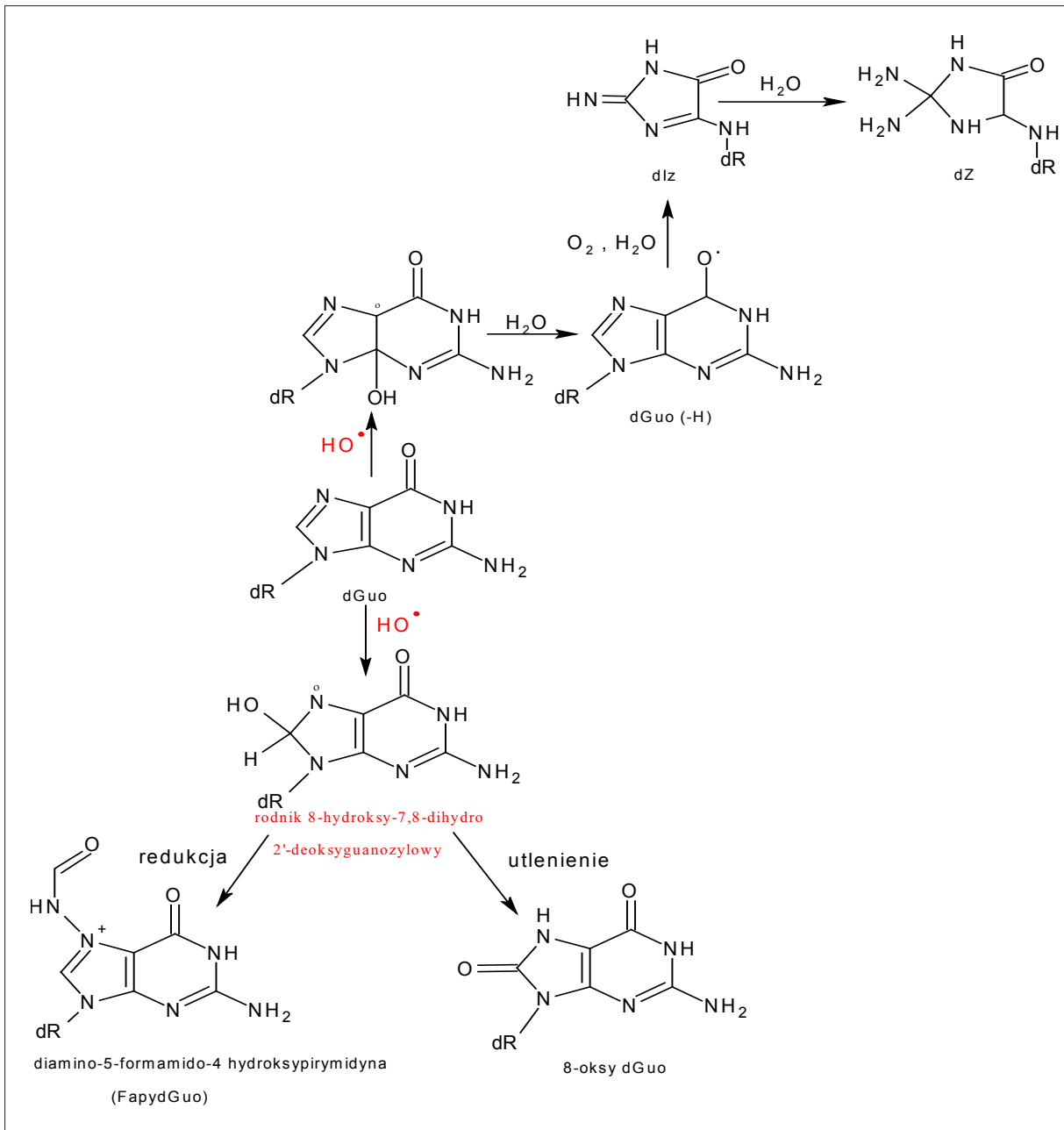
Powstawanie innych oksydacyjnie zmienionych zasad, m.in. form dipiryimidynowych, adduktów adeniny i guaniny doprowadza do transwersji G-C→C-G. Utlenienie wiązań podwójnych w pozycji 5 i 6 pierścienia metylocytozyny prowadzi do powstania glikolu tyminy,

związku odpowiedzialnego za powstanie mutacji typu tranzycji, gdzie cytozyna przechodzi w tyminę: C→T. 5-Hydroksyuracyl, powstający w wyniku utlenienia grupy metylowej tyminy w DNA, wpływa na oddziaływanie DNA z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi, co może zmieniać ekspresję genów. Rodnik hydroksylowy może również reagować z deoksyrybozą w DNA, w wyniku czego powstają pojedyncze i podwójne pęknięcia w niciach DNA [19].

STRES OKSYDACYJNY JAKO PRZYCZYNA WIELU CHOROÓB

Choroby neurodegeneracyjne

Wiele ze stosowanych obecnie pestycydów uszkadza układ nerwowy. Wyjątkowo niekorzystnie mogą one wpływać na mózg człowieka w czasie jego rozwoju, zwłaszcza w okresie życia płodowego. Mózg w tej fazie jest znacznie bardziej wrażliwy w porównaniu z mózgiem osoby dorosłej.

Ryc. 6. Reakcja rodnika hydroksylowego ($\cdot OH$) z guaniną (wg [17] zmodyfikowano)

Objawy charakterystyczne dla choroby Parkinsona zaobserwowano u ludzi stale narażonych na działanie m.in. pestycydów z grupy ditiokarbaminianów [24,37]. Dotyczy to przede wszystkim rolników mających stały kontakt z manebem (etylenobisditiokarbaminian). Maneb w swojej cząsteczce zawiera atom manganu. Dane literaturowe wskazują na związek manebu z rozwojem choroby Parkinsona (PD) [49]. PD jest drugą co do częstości występowania chorobą neurodegeneracyjną, dotykającą 1–3% populacji ludzi. Objawy choroby wywołane są zanikiem neuronów istoty czarnej, jednak przyczyny i mechanizmy neurodegeneracji są wciąż niewyjaśnione. W licznych opracowaniach dotyczących patogenezy PD zwraca się uwagę na istotną rolę stresu oksydacyjnego. Maneb jest związkiem rozprzęgającym łańcuch oddechowy w mitochondriach [23]. Jak wspomniano, zaburzenia funkcji mitochondriów

są związane z generowaniem wolnych rodników i w konsekwencji prowadzą do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej komórki.

Neurony dopaminergiczne są w sposób szczególnie narażone na stres oksydacyjny, ponieważ zachodzi w nich synteza i metabolizm dopaminy. W trakcie tych procesów powstaje duża ilość wolnych rodników [8,23,39]. Wyniki badań *post mortem* mózgow osób chorych na PD wykazywały zmiany w parametrach stresu oksydacyjnego [30]. Poziom grup karbonylowych (PC) – wskaźnika oksydacji białek, był dwukrotnie większy u chorych na PD niż w neuronach istoty czarnej osób zdrowych [30]. Poziomy wybranych produktów peroksydacji lipidów [74] i utlenienia nukleotydów [77] były odpowiednio 8- i 16-krotnie wyższe u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną.

Dodatkowo w mózgach osób chorych na PD stwierdzono podwyższone stężenie żelaza i jednocześnie obniżone zredukowanego glutationu (GSH) [22,39,31,34,62].

Zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w komórce są również jedną z przyczyn choroby Alzheimera. Choroba ta objawia się przede wszystkim u osób powyżej 70 roku życia [14,44]. Za rozwój choroby odpowiedzialne jest współdziałanie wielu różnych czynników, m.in. genetycznych, bodźców neurotoksycznych, wpływ reaktywnych form tlenu, występowanie odczynów zapalnych, a także obecność glinu. Ponieważ choroba Alzheimera występuje u osób w podeszłym wieku, zwrócono uwagę na powiązanie efektów działania stresu oksydacyjnego w komórce z procesem starzenia. W osoczu osób chorujących na Alzheimera stwierdzono podwyższone stężenie związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), odzwierciedlających zwiększoną peroksydację fosfolipidów osocza. Ponadto w erytrocytach stwierdzono wzrost stężenia utlenionej formy glutationu (GSSG), wzrost peroksydacji białek [61], co wskazywało na obecność stresu oksydacyjnego w komórkach obwodowych [69]. W mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera zaobserwowano wzrost peroksydacji białek [61] i zmiany w mitochondrialnym DNA [50].

CHOROBA NOWOTWOROWA

Mimo że dla wielu z powszechnie stosowanych pestycydów nie udowodniono właściwości cancerogennych, to wiadomo, że niektóre z nich są odpowiedzialne za rozwój pewnych typów nowotworów.

Zaobserwowano, że wśród osób zawodowo narażonych na wysokie stężenia pestycydów (rolnicy, ogrodnicy, osoby pracujące przy produkcji pestycydów) znacznie częściej pojawiają się niektóre typy nowotworów, takie jak nowotwory krwi, rak żołądka, warg, płuca i prostaty, a także nowotwory złośliwe skóry np. czerniak [18].

Trwałe zmiany w genomie komórek powstałe m.in. na skutek działania stresu oksydacyjnego to pierwszy etap charakterystyczny dla procesu mutagenyzy, cancerogenezy i starzenia się komórek. Pojawienie się mutacji w DNA to krytyczny etap w procesie cancerogenezy. W różnego rodzaju guzach nowotworowych zaobserwowano wzrost liczby oksydacyjnych uszkodzeń w DNA.

W komórkach nowotworowych zidentyfikowano ponad 100 produktów powstałych w wyniku utlenienia DNA [12,40,55]. Jednym z najlepiej poznanych typów oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest 8-hydroksyguanina, która uważana jest za marker w procesie cancerogenezy (stosunkowo łatwo powstaje i jest silnie mutagenna). W wyniku uszkodzeń DNA może dojść do indukcji lub zatrzymania procesu transkrypcji, powstania błędów podczas procesu replikacji, a także niestabilności genomu. Każdy z tych procesów ma istotny związek z indukcją procesu cancerogenezy [47,67,68]. Powszechnie uważa się, że za proces cancerogenezy odpowiedzialne są uszkodzenia w DNA jądrowym. Ostatnio jednak coraz więcej uwagi poświęca się uszkodzeniom, które powstają w DNA mitochondrialnym. Zaobserwowano, że w wielu różnych typach ludzkich nowotworów obecne są mutacje w genach DNA mitochondrialnego, kodujących enzymatyczne kompleksy łańcucha oddechowego: I, III, IV i V [68].

Ze względu na właściwości chemiczne uważa się RFT za ważną klasę cancerogenów, odgrywających istotną rolę w procesie inicjacji, promocji i progresji nowotworów [68]. W inicjacji procesu cancerogenezy najważniejszą rolę odgrywa rodnik hydroksylowy $\cdot\text{OH}$, który jest odpowiedzialny za inaktywację genów supresorowych, aktywację onkogenów w wyniku powstania m.in. mutacji punktowych i aktywację niektórych chemicznych cancerogenów [24]. Na etapie promocji cancerogenezy, RFT mogą indukować proliferację lub apoptozę klonów komórek inicjujących. Pod wpływem RFT w komórkach dochodzi do znacznego zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} , które następnie mogą aktywować niektóre protoonkogeny: *c-fos*, *c-jun* i *c-myc*, a także kinazę białkową C i w ten sposób nasilać proliferację komórek oraz etap promocji nowotworów [25].

BEZPŁODNOŚĆ

Z badań ostatnich lat wynika, że częstość występowania niepłodności w krajach rozwiniętych w latach 1960–2001 zwiększyła się o 50–60%, czego jedną z przyczyn jest wzrost zanieczyszczenia środowiska [2,16,59,70]. Istotną rolę w skażeniu otaczającego nas środowiska odgrywają pestycydy i ich pozostałości, głównie z grupy związków fosforoorganicznych i karbaminianów. To właśnie te związki są stosowane w dużych, często nieregulowanych ilościach w nowoczesnym rolnictwie. Astis i wsp. [6] zaobserwowali, że u szczurów narażonych na działanie związków, takich jak: zineb (fungicyd), glifosat (herbicyd) i dimetoat (insektycyd) wzrastają markery stresu oksydacyjnego w osoczu, wątrobie i jądrach. Stwierdzili ponadto, że badane przez nich pestycydy wpływają na aktywność hormonów związanych z procesem rozmnażania. Niekorzystny wpływ pestycydów na badane parametry stresu oksydacyjnego u szczurów wzrastał, gdy zwierzęta były narażone na działanie więcej niż jednego pestycydu.

Ze względu na swoją specyficzną budowę i funkcję, plemniki są szczególnie wrażliwe na działanie RFT. Komórki plemników charakteryzują się niewielkim stężeniem zredukowanego glutationu i małą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Ponadto ich błony są bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, szczególnie podatne na działanie reaktywnych form tlenu. Jednocześnie ze względu na większą niż w innych komórkach liczbę mitochondriów, plemniki wytwarzają w procesach utleniania komórkowego większe ilości RFT, które muszą być sprawnie usuwane z komórki, mimo obniżonej aktywności enzymów antyoksydacyjnych i niskim poziomie GSH. Ponadto, plemniki mają mniej sprawne niż inne komórki mechanizmy naprawiające uszkodzenia powstałe w cząsteczce DNA [4,11].

W badaniach przeprowadzonych w ostatnich latach zaobserwowano u wielu mężczyzn znaczący wzrost nieprawidłowości związanych z funkcjonowaniem jąder. Stwierdzono podwyższony poziom RFT w ponad 40% próbek nasienia pobranych od bezpłodnych mężczyzn [6]. Wydaje się, że wzrost stężenia RFT prowadzić może do istotnych zaburzeń równowagi oksydoredukcyjnej w komórce plemnika, co może dalej skutkować uszkodzeniami jego struktur komórkowych i w konsekwencji prowadzić do zmian chorobowych [2,6,54]. Wynikiem tego mogą być zaburzenia w procesie spermatogenezy mogące prowadzić do przedwczesnej apoptozy komórek spermatozoa i tym samym wpłynąć na liczbę i jakość plemników [2,6,59,70].

Większość badań opisujących problemy z płodnością u ludzi dotyczy mężczyzn, którzy są stale narażeni na działanie pestycydów [21,43]. Natomiast wiedza na temat przyczyn bezpłodności kobiet jest niepełna. Jedną z przyczyn może być to, że mechanizm cyklu owulacyjnego u kobiet jest słabiej poznany niż proces spermatogenezy u mężczyzn [16].

Ekspozycja kobiet na pestycydy powoduje zaburzenia cyklu owulacyjnego na różnym jego etapie. Farr i wsp.[28] w swoich badaniach zaobserwowali, że kobiety stale narażone na działanie pestycydów miały różnego rodzaju zaburzenia cyklu w porównaniu do kobiet, które nigdy nie miały kontaktu z pestycydami. W innych badaniach zaobserwowano, że kobiety pracujące w rolnictwie oraz w przemyśle i mające kontakt z pestycydami mają znacznie częściej kłopoty z płodnością [16].

PODSUMOWANIE

Pestycydy należą do grupy związków chemicznych, które ze względu na swoje właściwości chemiczne muszą być stosowane według ściśle określonych norm i procedur.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia A., Nikfar S., Rezaie A.: Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10: RA141–RA147
- [2] Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A.: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.*, 2003; 79: 829–843
- [3] Agha A.M., Gad M.Z.: Lipid peroxidation and lysosomal integrity in different inflammatory models in rats: the effects of indomethacin and naftazone. *Pharmacol. Res.*, 1995; 32: 279–285
- [4] Aitken R.J.: Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995; 7: 659–668
- [5] Alvarez B., Radi R.: Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*, 2003; 25: 295–311
- [6] Astiz M., de Alaniz M.J., Marra C.A.: The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2009; 94: 93–99
- [7] Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K.: Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.*, 1999; 107: 33–47
- [8] Barlow B.K., Lee D.W., Cory-Slechta D.A., Opanashuk L.A.: Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology*, 2005; 26: 63–75
- [9] Bartosz G.: Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim. Pol.*, 1996; 43: 645–659
- [10] Bartsch H.: Keynote address: exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. *IARC Sci. Publ.*, 1999; 150: 1–16
- [11] Bauché F., Fouchard M.H., Jégou B.: Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.*, 1994; 349: 392–396
- [12] Behrend L., Henderson G., Zwacka R.M.: Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003; 31: 1441–1444
- [13] Berlett B.S., Stadtman E.R.: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 20313–20316
- [14] Birkner E., Zalejska-Fiolka J., Antoszewski Z.: Aktywność enzymów antyoksydacyjnych i rola witamin o charakterze antyoksydacyjnym w chorobie Alzheimera. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 264–269
- [15] Björling-Poulsen M., Andersen H.R., Grandjean P.: Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health*, 2008; 7: 50
- [16] Bretveld R.W., Thomas C.M., Scheepers P.T., Zielhuis G.A., Roeleveld N.: Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2006; 4: 30
- [17] Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L.: Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, 2003; 531: 5–23
- [18] Cancer Trends Report – 2009/2010 Update. Pesticides. National Cancer Institute U.S. National Institutes of Health. http://progressreport.cancer.gov/doc_detail.asp?pid=1&did=2009&chid=91&coid=913&mid=#pesticides (23.05.2011)
- [19] Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 2003; 17: 1195–1214
- [20] Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 329: 23–38
- [21] de Cock J., Westveer K., Heederik D., te Velde E., van Kooij R.: Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in the Netherlands. *Occup. Environ. Med.*, 1994; 51: 693–699
- [22] Dexter D.T., Wells F.R., Lees A.J., Agid F., Agid Y., Jenner P., Marsden C.D.: Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1989; 52: 1830–1836
- [23] Domico L.M., Zeevalk G.D., Bernard L.P., Cooper K.R.: Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*, 2006; 27: 816–825
- [24] Drechsel D.A., Patel M.: Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 44: 1873–1886
- [25] Dreher D., Junod A.F.: Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer*, 1996; 32A: 30–38
- [26] Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H.: Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1068–1077
- [27] Etemadi-Aleagha A., Akhgari M., Abdollahi M.: A brief review on oxidative stress and cardiac diseases. *Mid. East. Pharmac.*, 2002; 10: 8–9
- [28] Farr S.L., Cooper G.S., Cai J., Savitz D.A., Sandler D.P.: Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 2004; 160: 1194–1204
- [29] Favier A.: Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*. 2003; 108–115
- [30] Floor E., Wetzel M.G.: Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.*, 1998; 70: 268–275
- [31] Good P.F., Olanow C.W., Perl D.P.: Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.*, 1992; 593: 343–346

- [32] Grosicka E., Czczot H., Skrzycki M., Szumiło M., Podsiad M., Rahden-Staroń I.: Wpływ tiuramu i disulfiram na stan redox w komórkach fibroblastów płuca chomika chińskiego. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2006; 4: 383–390
- [33] Grosicka E., Sadurska B., Szumiło M., Grzela T., Łazarczyk P., Niederla-Bielińska J., Rahden-Staroń I.: Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *Int. Immunopharmacol.*, 2005; 5: 1945–1956
- [34] Grune T., Davies K.J.: The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol. Aspects Med.*, 2003; 24: 195–204
- [35] Gupta S.P., Patel S., Yadav S., Singh A.K., Singh S., Singh M.P.: Involvement of nitric oxide in maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: is there any link with lipid peroxidation? *Neurochem. Res.*, 2010; 35: 1206–1213
- [36] Halliwell B., Gutteridge J.M.: The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 18: 125–126
- [37] Hoogenraad T.U.: Dithiocarbamates and Parkinson's disease. *Lancet*, 1988; 1: 767
- [38] Hsu G.W., Ober M., Carell T., Beese L.S.: Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature*, 2004; 431: 217–221
- [39] Jankowski M.: Rola szlaku JNK w rodzinnych postaciach choroby Parkinsona. *Postepy Biochem.*, 2007; 53: 297–303
- [40] Kang D., Hamasaki N.: Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41: 1281–1288
- [41] Khan J., Brennan D.M., Bradley N., Gao B., Bruckdorfer R., Jacobs M.: 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem. J.*, 1998; 330: 795–801
- [42] Kourie J.I.: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: C1–C24
- [43] Larsen S.B., Giwercman A., Spano M., Bonde J.P.: A longitudinal study of semen quality in pesticide spraying Danish farmers. The ASCLEPIOS Study Group. *Reprod. Toxicol.*, 1998; 12: 581–589
- [44] Leszek J.: Immunopatologia choroby Alzheimer'a – kierunki terapeutyczne. *Farm. Psych. Neurol.*, 1995; 2–3: 21–30
- [45] Lindahl T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993; 362: 709–715
- [46] Mage D.T., Allen R.H., Gondy G., Smith W., Barr D.B., Needham L.L.: Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III) J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol., 2004; 14: 457–465
- [47] Marnett L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 361–370
- [48] McConnell E.J., Bittelmeyer A.M., Raess B.U.: Irreversible inhibition of plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase and Ca²⁺ transport by 4-OH-2,3-trans-nonenal. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999; 361: 252–256
- [49] Meco G., Bonifati V., Vanacore N., Fabrizio E.: Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand. J. Work Environ. Health*, 1994; 20: 301–305
- [50] Mecocci P., MacGarvey U., Beal M.F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1994; 36: 747–751
- [51] Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein, 2005. Commission staff working document http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticide_residues/report_2005_en.pdf (19.05.2011)
- [52] Nigam S., Schewe T.: Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1488: 167–181
- [53] Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N.: Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 668–676
- [54] O'Flaherty C., de Lamirande E., Gagnon C.: Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006; 40: 1045–1055
- [55] Pelicano H., Carney D., Huang P.: ROS stress in cancer cells and the therapeutic implications. *Drug Resist. Update*, 2004; 7: 97–110
- [56] Ponczek M.B., Wachowicz B.: Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postepy Biochem.*, 2005; 51: 140–145
- [57] Rozporządzenie (WE) nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 lutego 2005 r. zmieniającym dyrektywę Rady 91/414/EWG w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów w żywności i paszy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni.
- [58] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 maja 2007 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów, które mogą się znajdować w środkach spożywczych lub na ich powierzchni (Dz.U. 2007, nr 119, poz. 817) z późniejszymi zmianami.
- [59] Sikka S.C., Gurbuz N.: Reproductive toxicology of organophosphate and carbamate pesticides, in: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds, Section IV – Organ Toxicity*, 2006; 447–462
- [60] Słowik-Borowiec M., Machowska A., Rogozińska K., Rupar J., Szpyrka E.: Pozostałości środków ochrony roślin w owocach i warzywach z terenu południowo-wschodniej Polski. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin*, 2009; 49: 1931–1937
- [61] Smith M.A., Rudnicka-Nawrot M., Richey P.L., Praprotnik D., Mulvihill P., Miller C.A., Sayre L.M., Perry G.: Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 1995; 64: 2660–2666
- [62] Sofic E., Lange K.W., Jellinger K., Riederer P.: Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 1992; 142: 128–130
- [63] Stadtman E.R., Levine R.L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003; 25: 207–218
- [64] Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J.K.: Ocena ryzyka dla konsumenta przy przekroczeniach najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości pestycydów (NDP) w żywności. *Rocznik PZH*, 2007; 58: 377–388
- [65] Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J.K.: Ocena ryzyka związana z narażeniem na pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego na etapie środka ochrony roślin. *Rocznik PZH*, 2006; 57: 303–315
- [66] Uchida K.: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.*, 2003; 42: 318–343
- [67] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 44–84
- [68] Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 2006; 160: 1–40
- [69] Viña J., Lloret A., Orti R., Alonso D.: Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.*, 2004; 25: 117–123
- [70] Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas J.A.Jr., Falcone T., Agarwal A.: Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 2003; 80: 531–535
- [71] WHO: Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (revised). Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment programme (GEMS/Food) in collaboration with Codex Committee on Pesticide Residues Programme of Food Safety and Food Aid, WHO, Geneva 1977
- [72] WHO/FAO: Further guidance of derivation of the acute RFD. Pesticide residues in food – 2002. FAO Plant production and protection paper. 2002; 172: 4–8
- [73] Williams G.M., Jeffrey A.M.: Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2000; 32: 283–292
- [74] Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E.R., Mizuno Y.: Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2696–2701
- [75] Zarkovic N.: 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.*, 2003; 24: 281–291
- [76] Zdolsek J.M., Svensson I.: Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 1993; 64: 401–406
- [77] Zhang J., Perry G., Smith M.A., Robertson D., Olson S.J., Graham D.G., Montine T.J.: Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am. J. Pathol.*, 1999; 154: 1423–1429

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.