Original researches

Influence of the Insecticide λ -cyhalothrin on Oxidative Stress and Expression of Replicative Protein A in the Brain of Fish

V. S. Nedzvetsky^{1,2}, V. Y. Gasso¹, R. O. Novitskiy³, S. V. Yermolenko¹

¹Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

²Bingöl University, Bingöl, Turkey

³Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 08 October 2020

Revised: 16 October 2020

Accepted: 19 October 2020

Oles Honchar Dnipro National University,
Gagarina av., 72, Dnipro, 49000, Ukraine

Bingöl University, Selahaddin-i Eyyubi Mah.
Aydınlık Cad. No: 1, Bingöl, 12000, Turkey

Dnipro State Agrarian and Economic
University, Serhii Efremov Str., 25, Dnipro,
49000, Ukraine

Tel.: +38-097-302-56-83

E-mail: viktor.gasso@gmail.com

Cite this article: Nedzvetsky, V. S., Gasso, V. Y., Novitskiy, R. O., & Yermolenko, S. V. (2020). Influence of the insecticide λ -cyhalothrin on oxidative stress and expression of replicative protein A in the brain of fish. *Agrology*, 3(4), 214–218. doi: 10.32819/020025

Abstract. Anthropogenic pollution of natural waters by pesticides became a global problem with the beginning of their widespread use in the 1960s of the twentieth century. The most studied cells' response to the pesticides is an increase in the content of reactive oxygen species (ROS) and, as a consequence, the development of oxidative stress. The proliferative activity of cells is regulated by various factors and largely depends on the expression of proteins involved in the DNA replication. Among such proteins are replicative proteins A (RPA), which binds single-stranded DNA (ssDNA) of eukaryotes. Disruption of RPA-associated cellular activity initiates genomic imbalance, so the expression and content of RPA1 serves as a marker not only of the cell cycle stability, but also the relevant response to DNA damage caused by ecotoxins. The aim of our study is to determine the oxidative stress development and the RPA1 protein state as a response of rainbow trout's brain cells to the influence of sublethal concentrations of the lambda-cyhalothrin. A model experiment on the neurotoxicity of lambda-cyhalothrin was performed on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under experimental conditions in a laboratory. The obtained results indicate that sublethal concentrations of lambda-cyhalothrin in the water induce a significant increase in ROS generation in the rainbow trout's brain. It was found that the content of ROS in the fish brain in all experimental groups depends on both the lambda-cyhalothrin concentration and the duration of exposure to the pesticide. Oxidative stress under the influence of lambda-cyhalothrin increases the content of stress-regulating protein RPA1 in the fish brain, inhibits transcriptional activity and limits the DNA breaks repair, which, in turn, can lead to genomic instability and activation of apoptosis. This indicates a high sensitivity of the mechanism of DNA replication to the neurotoxic effect of synthetic pyrethroids. Thus, the detected increased expression of RPA1 protein may be an adequate biomarker of cellular response to the toxic effects of synthetic pyrethroids in the brain of fish. Further studies of the effect of pyrethroids on key proteins of the aquatic organisms' reaction to intoxication are of great importance for the determination of indicative biomarkers of pesticide pollution and its potential risk.

Keywords: pyrethroid pesticides; rainbow trout; reactive oxygen species; RPA1; biomarkers.

Вплив інсектициду λ -цигалотрин на окиснювальний стрес та експресію реплікативного білка А в мозку риб

В. С. Недзвєцький^{1,2}, В. Я. Гасо¹, Р. О. Новіцький³, С. В. Єрмоленко¹

¹Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, м. Дніпро, Україна

²Бінгьольський університет, м. Бінгьол, Туреччина

³Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна

Анотація. Антропогенне забруднення природних вод пестицидами стало загальносвітовою проблемою від початку їх широкого використання у 60-ті роки ХХ ст. Найбільш вивченою реакцією на присутність пестицидів у клітинах є підвищення вмісту реактивних сполук кисню (РСК) і, як наслідок, розвиток окиснювального стресу. Проліферативна активність клітин регулюється різними факторами і багато в чому залежить від експресії білків, що беруть участь в реплікації ДНК. До таких білків відносять реплікативний білок А (RPA), що зв'язує одноланцюгову ДНК (олДНК) еукаріотів. Порушення RPA-асоційованої клітинної активності ініціює геномний дисбаланс, тому експресія та вміст RPA1 слугують маркером не тільки стабільності клітинного циклу, але і відповідної реакції на пошкодження ДНК, викликані дією екотоксикантів. Метою нашого дослідження є визначення наявності окиснювального стресу та стану білка RPA1 як реакції клітин головного мозку райдужної форелі на вплив сублетальних концентрацій лямбда-цигалотрину. Модельний експеримент нейротоксичності лямбда-цигалотрину проведено в лабораторії на аквакультурі пструга райдужного (*Oncorhynchus mykiss*). Отримані результати вказують на те, що сублетальні концентрації лямбда-цигалотрину в середовищі існування райдужної форелі індукують достовірне підвищення генерації РСК. Встановлено, що вміст РСК у головному мозку риб усіх експериментальних груп залежить як від концентрації лямбда-цигалотрину в середовищі існування райдужної форелі, так і від тривалості впливу токсиканту. Унаслідок окиснювального стресу під впливом лямбда-цигалотрину відбувається підвищення вмісту стрес-регулювального білка RPA1 у головному

мозку риб, пригнічення транскрипційної активності та обмеження репарації розривів ДНК, що у свою чергу може призводити до геномної нестабільності і активації процесів апоптозу. Це свідчить про високу чутливість механізму реплікації ДНК до нейротоксичного ефекту синтетичних піретроїдів. Таким чином, виявлена підвищена експресія білка RPA1 може бути адекватним біомаркером клітинної адаптації до токсичної дії синтетичних піретроїдів у мозку риб. Подальші дослідження впливу піретроїдів на ключові білки клітинної відповіді на інтоксикацію в гідробіонтів мають велике значення для виявлення показових біомаркерів забруднення навколишнього середовища пестицидами та його потенційного ризику.

Ключові слова: піретроїдні пестициди; райдужна форель; реактивні сполуки кисню; RPA1; біомаркери.

Вступ

Починаючи з другої половини XX ст., використання різноманітних пестицидів у сільському та лісовому господарстві набуло глобального характеру. Антропогенне забруднення природних вод пестицидами стало загальносвітовою проблемою від початку їх широкого використання у 1960-ті роки. Ця група токсикантів представляє серйозну потенційну небезпеку для живих організмів водних екосистем. Уміст деяких пестицидів може перевищувати допустимі рівні як у донних відкладеннях, так і в поверхневих водах багатьох водойм світу (Li et al., 2019). Однією з таких груп пестицидів є синтетичні піретроїди.

Синтетичні піретроїди метаболізуються певними ферментами з утворенням широкого кола метаболітів, включаючи і такі, що здатні долати гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) і накопичуватися в тканинах мозку (Alak et al., 2019). У таких випадках біохімічні і молекулярні порушення можуть спричинити ушкодження клітин мозку, у тому числі і необоротні. Однак молекулярні механізми виживання клітин мозку під час впливу піретроїдів, а також діапазон клітинної відповіді на їх цитотоксичну дію залишаються практично незрозумілими.

Лямбда-цигалотрин – це синтетичний піретроїд, який широко використовується у світі. Він близький за структурою до природного інсектициду піретрину та має ефективні інсектицидні властивості. У риб ламбда-цигалотрин порушує роботу нервової системи, викликаючи руховий параліч, і підвищує рівень смертності. Наприклад, під впливом сублетальних концентрацій (0,86 мкг/л) ламбда-цигалотрину в нільської тиліпії (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) відбуваються зміни в руховій функції нейронів вже через 24 год після початку інтоксикації. У подальшому змінюються концентрації осморегуляторних електролітів (K, Ca, глюкоза тощо), з'являються гіперемія зябрових судин, інфільтрація еозинофілів, гіперплазія клітин слизового епітелію, а згодом і формування аневризми судин та некроз епітелію зябер (Fernandes et al., 2020).

Найбільш вивченою реакцією на присутність пестицидів у клітинах є підвищення вмісту реактивних сполук кисню (РСК) і, як наслідок, розвиток окиснювального стресу (Sharma & Jindal, 2020; Yang et al., 2020). Реакція антиоксидантних систем на вплив пестицидів запропоновано використовувати як біомаркери токсичного впливу (Sharma & Jindal, 2020). Однак модуляція активності антиоксидантних ферментів ушкоджуючими факторами має спільні риси, що не залежить від природи токсичної речовини (Pillet et al., 2019; Valavanidis, 2006). Незважаючи на те, що різні токсиканти можуть викликати схожу відповідь антиоксидантної системи, реєстрація показників окиснювального стресу, а також активності антиоксидантної системи є важливим доповненням до вивчення дії екотоксикантів на живі організми (Dos Santos, 2018). Ще одна особливість впливу деяких пестицидів обумовлена їх високою здатністю пригнічувати клітинну активність через інгібування гормональної та цитокінної регуляції (Özdemir et al., 2018). Деякі автори пов'язують прооксидантну дію пестицидів з генотоксичними ефектами, які виявляються в безхребетних і хребетних тварин (Yadav et al., 2021). Зокрема, показані генотоксичні ефекти синтетичних піретроїдів у тканинах гідробіонтів (Amaeze et al., 2020).

Відомо, що проліферативна активність клітин регулюється різними факторами і багато в чому залежить від експресії білків, що беруть участь в реплікації ДНК. До таких білків

відносять реплікативний білок А (RPA), який зв'язує одноланцюгову ДНК (олДНК) еукаріотів (Wold, 1997). Під час реплікації олДНК утворюється безперервно і є важливою проміжною сполукою в процесі рекомбінаційно-опосередкованого відновлення пошкодженої ДНК. RPA є основним еукаріотичним олДНК-зв'язувальним білком. RPA запобігає помилковим реакціям олДНК під час реплікації та підтримує її одноланцюговість, що і забезпечує можливість реплікації. RPA зв'язує також олДНК, щоб підтримувати такі ділянки в неспареному стані для репараційних процесів (Xuan & Wolf-Dietrich, 2008). У такий спосіб RPA захищає тимчасово утворену олДНК від нуклеотидної деградації. Крім добре вивчених функцій у реплікації та репарації ДНК, RPA бере участь у більш широкому колі діяльності ДНК, включаючи складання нуклеосом, регулювання експресії генів, підтримання теломер та інші численні процеси в метаболізмі нуклеїнових кислот (Dueva & Iliakis, 2020).

У ході ініціації транскрипції RPA врівноважує одноланцюгову область ДНК, тому його присутність необхідна як у початковій, так і в наступних фазах реплікації. Білок RPA є гетеромерним комплексом і складається з трьох субодиниць (RPA1, RPA2 та RPA3). ДНК-зв'язувальна активність опосередкована доменами RPA1-субодиниці (70-kDa), яка бере участь у процесах реплікації, репарації і рекомбінації ДНК (Zou & Elledge, 2003). Порушення RPA-асоційованої клітинної активності ініціює геномний дисбаланс, тому експресія та вміст RPA1 слугують маркерами не тільки стабільності клітинного циклу, але і відповідної реакції на пошкодження ДНК, викликані дією токсикантів (Choi et al., 2010).

Як інформативний та валідний тест-об'єкт для вивчення впливу різних екотоксикантів, у тому числі й пестицидів, наразі широко використовується пструг (форель) райдужний (*Oreochromis niloticus* Walbaum, 1792); (Ciardullo et al., 2008; Kenšová et al., 2012).

Мета нашого дослідження полягала у визначенні наявності окиснювального стресу та стану білка RPA1 як реакції клітин головного мозку райдужної форелі на вплив сублетальних концентрацій ламбда-цигалотрину.

Матеріал та методи

Модельний експеримент нейротоксичності ламбда-цигалотрину проведено в лабораторії на аквакультурі пструга (форелі) райдужного (37,43±2,73 г та 11,24±1,04 см), отриманого з рибної ферми Кебан (Keban baraj gölü, м. Елязиг, Туреччина) і акліматизованого у 600-літрових ємкостях протягом 15 діб. Температура води становила 14±3 °C, рівень розчиненого кисню 8,24±0,5 мг/л, рН 7,3±0,2. Рибу годували кормами промислового виробництва двічі на добу, при цьому добова норма кормів становила 2% від маси тварини.

Відповідно до правил визначення LC50, райдужну форель піддавали дії ламбда-цигалотрину в семи експериментальних групах з концентраціями 200, 500, 1500, 5000 та 10000 нг ламбда-цигалотрину на літр води. Експеримент тривав протягом 96 год. Зміни в життєздатності реєстрували 6 разів на добу. Встановлено, що 96-годинна LC50 ламбда-цигалотрину для молоді райдужної форелі віком 10–12 місяців становила 5420 нг/л. Сублетальні низькі концентрації ламбда-цигалотрину для експерименту визначали з розрахунку 5% і 10% від величини LC50, що дорівнює 271 нг/л і 542 нг/л, відповідно. Чотири кон-

трольні групи риб по 15 особин кожна піддавали впливу зазначених сублетальних концентрацій протягом 2-х та 28-ми діб. Дві контрольні групи риб, кожна з яких включала 15 особин, лямбда-цигалотрину не піддавали.

Відбір тканин мозку проводили відповідно до вимог Комісії з біоетики Бінгольського університету (м. Бінгюл, Туреччина) та Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара (м. Дніпро, Україна), що стосуються роботи з експериментальними тваринами. Проби головного мозку риб зберігали замороженими при температурі -80°C . Для отримання гомогенату мозок гомогенізували у співвідношенні тканина:буфер як 1:10. Склад буферного розчину: 10 mM Тріс-буфер (pH = 7,4); 0,1 mM NaCl; 1% TritonX-100; 0,2% SDS; 2,5 mM етилендіамінтетраоцтової кислоти; 6,5 мкМ апротиніну; 1,5 мкМ пепстатину А; 23 мкМ лейпептину; 1 мМ фенілметилсульфонілфторид; 1 мкМ ортованадату натрію; 5 мкМ інгібітора трипсину сої. Гомогенізацію та інші процедури проводили на льоду, щоб запобігти деградації білка, викликаній підвищенням активності протеаз. Після екстракції білка протягом 60 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$ проводили центрифугування при 60 000 об/хв (60 хв, $+4^{\circ}\text{C}$). Отримані супернатанти зберігали за температури -80°C .

Імуноблотинг проводили з використанням електрофорезу в поліакриламідному гелі (10% акриламід) (Hnasko & Hnasko, 2015). Уміст РСК визначали флуорометричним методом при забарвленні 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетатом (DCFH-DA). Кожен зразок був протестований в п'яти паралелях.

Після поділу білки перенесли на полівініліденофторидну (ПВДФ) мембрану, промивали фетальною бичачою сироваткою та інкубували в блокувальному буфері (3%-вий бичачий сироваточний альбумін) протягом 60 хв. Після блокування мембрани інкубували протягом 10 год ($+4^{\circ}\text{C}$) з відповідними первинними антитілами – анти-RPA1 (SantaCruz, sc-48425, розведення 1:1000) і анти- β -актину (Abcam, ab8226, розведення 1:3000). Після інкубації з первинними антитілами мембрану тричі промивали Тріс-буферним фізіологічним розчином, що містить 0,05% Твін 20 (TBS-T). Промиті мембрани інкубували з мишачими вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому (HRP) протягом 60 хв за кімнатної температури. Після триразового промивання мембран розчином TBS-T проводили візуалізацію результатів вестерн-блот методом хемілюмінесценції (Alegria-Schaffer et al., 2009). з використанням автоматичного рентгенівського апарата (Carestream Health Inc., США). Для сканування фотоплівок використовували систему візуалізації BIO-RAD. Результати оцінювали методом денситометрії з використанням програми IMAGE-J.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програми SPSS Statistics 20 з множинним порівнянням за тестом Дункана. Кількісні дані представляли у вигляді середнього значення зі стандартним середньоквадратичним відхиленням. Значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою t -критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотези на нормальність розподілу.

Результати

Утворення реактивних сполук кисню (РСК) та окиснювальний стрес є наслідком впливу різних за природою токсикантів, включаючи сучасні пестициди. З огляду на це, ми визначали рівень РСК у головному мозку риб усіх експериментальних і контрольних груп. Отримані дані рівнів РСК у головному мозку риб, які зазнавали впливу лямбда-цигалотрину, представляли у вигляді відносного вмісту порівняно з контрольними значеннями (рис. 1).

Для виявлення вмісту білка RPA1 у головному мозку райдужної форелі після впливу сублетальними концентраціями лямбда-цигалотрину протягом 4-х та 28-ми діб проведений імуноблотинг (рис. 2).

Дані вмісту білка RPA1, які представлені на рис. 3, були обчислені з урахуванням вмісту бета-актину (рис. 2). Виявлено,

що вміст білка RPA1 в мозку всіх експериментальних груп райдужної форелі під дією лямбда-цигалотрину істотно підвищувався (рис. 3). Підкреслимо, що лямбда-цигалотрин ініціював значне збільшення експресії RPA1 в групах риб, яких піддавали

Рис. 1. Відносний вміст реактивних сполук кисню (РСК) у мозку райдужної форелі під дією сублетальних (271 та 542 нг/л) концентрацій лямбда-цигалотрину протягом 4-х та 28-ми діб ($M \pm SD$); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Рис. 2. Результати імуноблотингу фракцій білків мозку райдужної форелі під дією сублетальних (271 та 542 нг/л) концентрацій лямбда-цигалотрину протягом 4-х та 28-ми діб (К – контроль)

Рис. 3. Відносний вміст білка RPA1 у мозку райдужної форелі під дією сублетальних (271 та 542 нг/л) концентрацій лямбда-цигалотрину протягом 4-х та 28-ми діб ($M \pm SD$); ** $P < 0,01$

менш тривалому впливу (4 доби), незалежно від концентрації лямбда-цигалотрину. Виявлено виражений дозозалежний характер змін вмісту RPA1 у риб експериментальних груп, експонованих реальними для забрудненого довкілля концентраціями лямбда-цигалотрину (5% LC50 та 10% LC50).

Отримані результати показали, що вплив меншої дози лямбда-цигалотрину (5% LC50) викликає більш суттєве збільшення вмісту білка RPA1 у головному мозку риб порівняно з експериментальною групою риб, експонованих дозою 10% LC50.

Обговорення

Дослідження Li et al. (2010) вказують, що за тривалого впливу пропіконазолу у пеструга райдужного підвищувалися показники окиснювального стресу. Виявлено, що низький рівень окиснювального стресу викликає адаптивні реакції антиоксидантної захисної системи, тоді як тривалий вплив пестициду може призвести до серйозних окиснювальних ушкоджень мозку риб (Li et al., 2010).

Життєздатність клітинних структур, за інтоксикації низькими дозами лямбда-цигалотрину, залежить від ефективності клітинної відповіді, яка може забезпечити виживання або запрограмовану загибель клітин. Клітини головного мозку є одними з найбільш чутливих до окиснювальних ушкоджень, оскільки для них характерні інтенсивне споживання кисню і низький рівень антиоксидантного захисту. Тому цілком зрозуміло, що вплив синтетичного піретроїду може індукувати підвищення клітинного рівня РСК і, як наслідок, порушення в клітинах мозку.

Отримані результати вказують на те, що сублетальні концентрації лямбда-цигалотрину в середовищі існування райдужної форелі індукують достовірне підвищення генерації РСК. Встановлено, що вміст РСК у головному мозку риб усіх експериментальних груп залежить як від концентрації лямбда-цигалотрину в середовищі існування райдужної форелі, так і від тривалості впливу токсиканту.

Білки RPA представлені консервативними протеїнами, які присутні практично в кожній еукаріотичній клітині (Ishibashi et al., 2001; Wold, 1997), а їх доменна структура подібна в усіх живих організмів (Iftode et al., 1999; Wold, 1997). Разом з іншими білками реплікації ДНК ці протеїни забезпечують нормальне функціонування мозку (Mason et al., 2014).

Унаслідок окиснювального стресу під впливом лямбда-цигалотрину відбувається підвищення вмісту стрес-регулювального білка RPA1 у головному мозку риб, пригнічення транскрипційної активності та обмеження репарації розривів ДНК, що у свою чергу може призводити до геномної нестабільності й активації процесів апоптозу. Це свідчить про високу чутливість механізму реплікації ДНК до нейротоксичного ефекту синтетичних піретроїдів.

Таким чином, виявлена підвищена експресія білка RPA1 може бути адекватним біомаркером клітинної адаптації до токсичної дії синтетичних піретроїдів у мозку риб.

Висновки

Вплив низьких сублетальних концентрацій лямбда-цигалотрину викликає генерацією реактивних сполук кисню в мозку риб та змінює експресію білка RPA1. Підвищення вмісту RPA1 у тканині мозку тварин є складовою клітинної відповіді на пошкодження ДНК. Збільшення експресії білків RPA може слугувати маркером порушень ДНК за хронічної інтоксикації пестицидами.

Подальші дослідження впливу піретроїдів на ключові білки клітинної відповіді на інтоксикацію в гідробіонтів полягатимуть у визначенні показових біомаркерів забруднення навколишнього середовища пестицидами та його потенційного ризику.

References

- Alak, G., Yeltekin, A. Ç., Özgeriş, F. B., Parlak, V., Uçar, A., Keleş, M. S., & Atamanalp, M. (2019). Therapeutic effect of N-acetyl cysteine as an antioxidant on rainbow trout's brain in cypermethrin toxicity. *Chemosphere*, 221, 30–36. doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.12.196](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.196)
- Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., & Vattam, K. (2009). Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in Enzymology*, 463, 573–599. doi: [10.1016/S0076-6879\(09\)63033-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63033-0)
- Amaeze, N. H., Komolafe, B. O., Salako, A. F., Akagha, K. K., Briggs, T.-M. D., Olatinwo, O. O., & Femi, M. A. (2020). Comparative assessment of the acute toxicity, haematological and genotoxic effects of ten commonly used pesticides on the African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell 1822. *Heliyon*, 24, 6(8), e04768. doi: [10.1016/j.heliyon.2020.e04768](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04768)
- Choi, J. H., Lindsey-Boltz, L. A., Kemp, M., Mason, A. C., Wold, M. S., & Sancar, A. (2010). Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13660–13665. doi: [10.1073/pnas.1007856107](https://doi.org/10.1073/pnas.1007856107)
- Ciardullo, S., Aureli, F., Coni, E., Guandalini, E., Iosi, F., Raggi, A., Rufo, G., & Cubadda, F. (2008). Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2442–2451. doi: [10.1021/jf703572t](https://doi.org/10.1021/jf703572t)
- Dos Santos, A. A., Ferrer, B., Gonçalves, F. M., Tsatsakis, A. M., Renieri, E. A., Skalny, A. V., Farina, M., Rocha, J. T., & Aschner, M. (2018). Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Cell Toxicity. *Toxics*, 6(3), 47–50. doi: [10.3390/toxics6030047](https://doi.org/10.3390/toxics6030047)
- Dueva, R., & Iliakis, G. (2020). Replication protein A: a multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer*, 2(3), zcaa022. doi: [10.1093/narcan/zcaa022](https://doi.org/10.1093/narcan/zcaa022)
- Fernandes, C. E., da Silveira, A. W., do Nascimento Silva, A. L., de Souza, A. I., Povh, J. A., Dos Santos Jaques, J. A., Dos Santos, E. D. A., Yonekawa, M. K. A., de Barros Penteadoall B., & Franco-Belussi, L. (2020). Osmoregulatory profiles and gill histological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to lambda-cyhalothrin. *Aquatic Toxicology*, 227, 105612. doi: [10.1016/j.aquatox.2020.105612](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105612)
- Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The Western Blot. *Methods in Molecular Biology*, 1318, 87–96. doi: [10.1007/978-1-4939-2742-5_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9)
- Huang, D.-Y., Chen, D., Wang, C., & Wei, G.-L. (2019). Temporal-spatial distribution of synthetic pyrethroids in overlying water and surface sediments in Guangzhou waterways: potential input mechanisms and ecological risk to aquatic systems. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(17), 17261–17276. doi: [10.1007/s11356-019-05013-4](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05013-4)
- Iftode, C., Daniely, Y., & Borowiec, J. A. (1999). Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 141–180. doi: [10.1080/10409239991209255](https://doi.org/10.1080/10409239991209255)
- Ishibashi, T., Kimura, S., Furukawa, T., Hatanaka, M., Hashimoto, J., & Sakaguchi, K. (2001). Two types of replication protein A 70 kDa subunit in rice, *Oryza sativa*: molecular cloning, characterization, and cellular & tissue distribution. *Gene*, 272(1–2), 335–343. doi: [10.1016/S0378-1119\(01\)00555-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00555-8)
- Kenšová, R., Kružiková, K., Havránek, J., Haruštiaková, D., & Svobodová, Z. (2012). Distribution of mercury in rainbow trout tissues at embryo-larval and juvenile stages. *Scientific World Journal*, 20, 652–666. doi: [10.1100/2012/652496](https://doi.org/10.1100/2012/652496)
- Li, W.-G., Kostich, M. S., Bencic, D. C., Batt, A. L., See, M. J., Flick, R. W., Gordon, D. A., Lazorchak, J. M., & Biales, A. D. (2019). Multigene biomarkers of pyrethroid exposure: exploratory experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(11), 2436–2446. doi: [10.1002/etc.4552](https://doi.org/10.1002/etc.4552)

- Li, Z. H., Zlabek, V., Grabic, R., Li, P., Machova, J., Velisek, J., & Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 297–303. doi: [10.1016/j.aquatox.2010.02.017](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.017)
- Mason, A. G., Tom, S., Simard, J. P., Libby, R. T., Bammler, T. K., Beyer, R. P., Morton, A. J., Pearson, C. E., & La Spada, A. R. (2014). Expression levels of DNA replication and repair genes predict regional somatic repeat instability in the brain but are not altered by polyglutamine disease protein expression or age. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1606–1618. doi: [10.1093/hmg/ddt551](https://doi.org/10.1093/hmg/ddt551)
- Özdemir, S., Altun, S., Özkara, M., Ghosi, A., Toraman, E., & Arslan, H. (2018). Cypermethrin, chlorpyrifos, deltamethrin, and imidacloprid exposure up-regulates the mRNA and protein levels of bdnf and c-fos in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 203, 318–326. doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.03.190](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.190)
- Pillet, M., Castaldo, G., De Weggheleire, S., Bervoets, L., Blust, R., & De Boeck, G. (2019). Limited oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*, L., 1758) exposed to a sublethal tertiary (Cu, Cd and Zn) metal mixture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 218, 70–80. doi: [10.1016/j.cbpc.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.01.003)
- Sharma, R., & Jindal, R. (2020). Assessment of cypermethrin induced hepatic toxicity in *Catla catla*: A multiple biomarker approach. *Environmental Research*, 184, 109359. doi: [10.1016/j.envres.2020.109359](https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109359)
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189. doi: [10.1016/j.ecoenv.2005.03.013](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013)
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 61–92. doi: [10.1146/annurev.biochem.66.1.61](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61)
- Xuan, L., & Wolf-Dietrich, H. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(99), 99–113. doi: [10.1038/cr.2008.1](https://doi.org/10.1038/cr.2008.1)
- Yadav, A., Tandon, A., Seth, B., Goyal, S., Singh, S. J., Tiwari, S. K., Agarwal, S., Nair, S., & Chaturvedi, R. K. (2021). Cypermethrin impairs hippocampal neurogenesis and cognitive functions by altering neural fate decisions in the rat brain. *Molecular Neurobiology*, 58(1), 263–280. doi: [10.1007/s12035-020-02108-9](https://doi.org/10.1007/s12035-020-02108-9)
- Yang, C., Lim, W., & Song, G. (2020). Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 234, 108758. doi: [10.1016/j.cbpc.2020.108758](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758)
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625), 1542–1548. doi: [10.1126/science.1083430](https://doi.org/10.1126/science.1083430)