



Állatorvostudományi Egyetem
Élettani és Biokémiai Tanszék
Biokémiai Osztály

**A kurkumin acetamipriddel szembeni védő
hatásainak vizsgálata mézelő méhekben**

Készítette: Huber Fanni Sára
Témavezetők: Dr. Mackei Máté
tanszéki állatorvos
Dr. Mátis Gábor
egyetemi docens

Budapest, 2022

Tartalom

Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	4
A nyugati mézelő méh (<i>Apis mellifera</i>) életciklusa	4
A nyugati mézelő méh ökológiai és gazdasági jelentősége	4
Kolónia-összeomlás kórkép (Colony Collapse Disorder)	5
Neonikotinoid rovarölő szerek általános jellemzése és hatásmechanizmusa.....	7
Neonikotinoid növényvédőszeres lehetséges mellékhatásai.....	8
Akut toxicitás	8
Krónikus toxicitás	8
Viselkedési változások	9
Acetamiprid	10
Szubletális hatásai méhekre	10
Hatásai más fajokra	11
Oxidatív stressz	12
Antioxidáns hatású szerek	14
Kurkumin	15
Célkitűzés	16
Anyag és módszer	17
Kezelés és mintavétel	17
Mérések	19
Az összfehérje-koncentráció meghatározása.....	19
Hidrogén-peroxid koncentrációjának mérése.....	19
Malondialdehid koncentrációjának mérése	19
Glutation koncentrációjának mérése	20
Statisztika	20
Eredmények.....	21
Hidrogén-peroxid koncentrációja.....	21
Malondialdehid koncentrációja	22
Glutation koncentrációja	22
Megbeszélés	25
Összefoglalás.....	32
Summary	33
Irodalomjegyzék:.....	34
Köszönetnyilvánítás	39

Rövidítésjegyzék

AC: acetamiprid
CCD: kolónia-összeomlás kórkép
COX: ciklooxygenáz enzim
DDT: diklór-difenil-triklóretán
GPx: glutation-peroxidáz
GR: glutation-reduktáz
GSH: redukált glutation
GSSG: oxidált glutation
GST: glutation-S-transzferáz
H₂O₂: hidrogén-peroxid
KAT: kataláz
KU: kurkumin
LD50: letális dózis 50
LOX: lipoxigenáz enzim
MDA: malondialdehid
NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid
Nrf2: nuclear factor erythroid-derived 2
ROS: reaktív oxigén gyökök
SOD: szuperoxid-dizmutáz

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A nyugati mézelő méh (Apis mellifera) életciklusa

A nyugati mézelő méh (*Apis mellifera*) gazdaságilag rendkívül jelentős, szemi-domesztikált rovarfaj. Elterjedési területe eredetileg Európa és Afrika volt, azonban a gyarmatosítások révén az 1600 - as évek elejétől Amerikában, Ausztráliában és Ázsiában is megtelepedett. A nyugati mézelő méh egyike az euszociális fajoknak, és mint olyan, kolóniákat alkot, melyben az egyedek szigorú munkamegosztás szerint élnek. A csoportok elnevezése a kolóniában betöltött szerepük alapján: méhanya, dolgozó és here. Az új méhanya élete a nászrepüléssel kezdődik, mely során akár 20 herével is párosodhat, melyet követően kezdi el petéinek lerakását. A pete 3 nap alatt kikel és lárvává alakul, mely állapotot álcának is nevezik. Az álca 5-6 nap alatt bábbá alakul, a későbbi funkciótól függően 7-14 nap alatt fejlődik ki a felnőtt méh. Ennek megfelelően a teljes fejlődési ciklus 16 (méhanya), 21 (dolgozó) vagy 24 napra (here) tehető [1]. A megtermékenyített petékből fejlődnek ki a hím ivarú méhek, azaz a herék. A herék egyetlen feladata 40-50 napig tartó életük során, hogy a méhanyát megtermékenyítsék. A méhanya által megtermékenyített petékből fejlődnek ki a nőstény ivarú egyedek, vagyis; a további anyák és a dolgozók. A dolgozó méhek életük első 3 hetét a kaptárban töltik, feladataik a lárvák etetése, a méz feldolgozása, a kaptár őrzése és a friss levegő biztosítása szellőztetéssel. 21 napos korukban kirepülnek a kaptárból, a környezetükben pollent, nektárt és vizet gyűjtenek, majd visszatérnek a kolóniához. A dolgozó méhek élettartama a nyári hónapokban 30-40 nap, a téli hónapokban 7-8 hónap. A méhanya petéket a tavaszi, nyári és kora őszi hónapokban tesz. A hidegebb, őszi-téli időszakban a kolónia aktív marad, azaz nem hibernál, a méhek felélik raktározott mézüket, és szoros csoportot alkotva, úgynevezett fűrtöt képezve biztosítják a megfelelő hőmérsékletet a kaptárban [1].

A nyugati mézelő méh ökológiai és gazdasági jelentősége

A nyugati mézelő méh világszerte a legnagyobb ökológiai jelentőséggel bíró beporzó rovarfaj, egyéb beporzó fajok, például a poszméhek, zengőlegyek, lepkék és hangyák mellett. A globális élelmezés nagyobb részét kitevő termesztett gabonafélék beporzása ugyan többnyire szél segítségével történik, a legtöbb gyümölcs és zöldségféle beporzásához azonban elengedhetetlen a pollinátor fajok tevékenysége. Kozmopolita lévén az Antarktisz és néhány óceáni sziget kivételével a Föld egész területén elterjedt faj, a virágzó növények 87,5%-ának beporzásáért felelős [2], és a világ 107 legnagyobb mennyiségben termesztett mezőgazdasági jelentőségű növényének 90%-át látogatja [3]. A mézelő méhek nem csak napjainkban töltenek

be kiemelkedően fontos szerepet, hanem végigkísérték az emberi civilizáció fejlődését is. Legkorábbi fennmaradt emlékeink a kőorból származnak; az ember méz utáni kutatásáról tanúskodnak, vagyis már akkoriban az élelmezés fontos részét képezték. Később az ókori Görögországban a születés és a halál örök körforgásának szimbólumaiként a filozófia fejlődésében is megjelentek. A mézelő méh gazdasági jelentősége a népesség expanziójával párhuzamosan évezredről évezredre növekedett [4]. Napjaink modern mezőgazdaságának elmúlt évszázadban tapasztalható hatalmas mértékű térhódítása miatt a méz termelése mellett a méhek beporzásban való nélkülözhetetlen szerepe is egyre nagyobb jelentőséget kapott. Napjainkban az Egyesült Államok területén a méhészek egyik legfontosabb bevételi forrásukként hivatás-szerűen vállalják a hatalmas növénykultúrák beporzását méh kolóniáik segítségével, melyhez akár több ezer kilométert is szállítaniuk kell az állatokat [5].

A méhek beporzó fajok közötti dominánssá válásának okai sokrétűek. Először is kozmopolita faj lévén a mézelő méhek elterjedtsége a világon a legszéleskörűbb minden pollinátor faj között, mely egyértelmű szelekciós előnyt jelent a faj számára. Ezen kívül táplálkozási szokásait tekintve a mézelő méh generalista fajnak mondható, amit tisztán tükröz, hogy a termesztett mezőgazdasági növények 90%-át látogatják takarmányszerzés céljából. Végül, de nem utolsósorban, a mézelő méhek más beporzó fajok fitnessét és viselkedését negatívan befolyásolhatják, a kompetíció révén pedig szelekciós nyomás helyeződik a többi fajra, melyet úgy tűnik, a mézelő méh tolerál jobban. Ez a fajta kompetíció megzavarhatja a pollinátor fajok és a növények közötti interakciókat, a megfigyelések szerint abban az esetben is, ha az adott területen a mézelő méh nincs jelen nagy sűrűségben [2]. Csakúgy, ahogyan a mézelő méhek száma (mind az ember által kezelt, mind a vadon élő kolóniák), az egyéb beporzó fajok száma is jelentősen csökkent az elmúlt évtizedekben, jellemzően az élőhelyek zsugorodása és degradációja, a növények monokultúrákban való termesztése, a növényvédőszer nagymértékű használata, patogének és paraziták jelenléte, a takarmány nem megfelelő tápanyagtartalma és a klímaváltozás negatív hatásai miatt.

Kolónia-összeomlás kórkép (Colony Collapse Disorder)

A mézelő méhek kolóniáit nagymértékben sújtó kolónia-összeomlás kórkép, vagy másnéven elnéptelenedési szindróma jelenségéről 2006-ban számoltak be először az Egyesült Államokban. A probléma jelentősége kifejezetten nagy, mivel a mezőgazdaságilag legjelentősebb pollinátor fajt érinti, mely a világ élelmezésének legalább harmadára van közvetlen hatással a beporzás révén. 2006 óta számos kutatás foglalkozott a témával, azonban nem sikerült azonosítani konkrét tényezőt, ami önmagában felelőssé tehető a szindróma

kialakulásáért. Sokkal inkább valószínű, hogy több tényező szinergista hatása állhat a folyamat háttérében. Ilyen faktorok többek között a paraziták, patogén baktériumokkal és vírusokkal való fertőzöttség, a vegyszerek és peszticidek alkalmazása, a nagy távolságokra történő vándoroltatás okozta fokozott stressz, a monokultúrák beporzásából fakadó rossz tápláltsági állapot, a hőmérsékleti fluktuáció, zsúfolt tartási körülmények, pollen- és nektár-hiány, kukoricából készült glükóz-fruktóz szirup etetésének kedvezőtlen hatásai, a légszennyezettség, az érzékeny méh mikrobiom megváltozása rossz takarmányozás következtében, illetve a limitált vagy szennyezett vízellátás. A hatalmas károkat okozó, nagy mortalitású ázsiai méhatka (*Varroa destructor*) fertőzöttségről először 1987-ben számoltak be [5]. E parazita átlagosan 17-20%-os éves veszteséget is előidézhethet, mely fertőzéssel szemben a kolónia-összeomlás kórkép akár évi 30%-os mortalitási arányokkal is jellemezhető, tehát az állományokban akár még ennél is nagyobb volumenű károkat okozhat [5]. A korábban tapasztalt, kolóniák nagy hányadát elpusztító atkafertőzéstől különbözik a kolónia-összeomlás kórkép abban, hogy a dolgozó méhek ez utóbbi esetében nem kaptárakban vagy azok közelében pusztulnak el, hanem valamilyen oknál fogva nem képesek visszatérni a méhcsaládhoz. Az általánosan jellemző tünetek a dolgozó méhek hirtelen eltűnése, az elpusztult méhek tetemeinek hiánya a kaptár közelében, kevés dolgozó vagy a méhek teljes hiánya a kaptárban, fejletlen méhek fokozott jelenléte, a pollen- és méz-raktárak kaptárban maradása. Külön kiemelendő, hogy bár számos kutatás világított rá a parazitáknak való kitettség és a kolónia-összeomlás kórkép közötti összefüggésekre, az érintett méhcsaládokban nem minden esetben van jelen *Varroa* atka vagy *Nosema ceranae* egysejtű parazitával való fertőzöttség. Európában először Svájcban detektálták a jelenséget 2009. októberben, azóta azonban a kórkép szinte már az összes európai országban leírásra került [6].

A neonikotinoid peszticidek hatásainak kutatása fontos a kolónia-összeomlás kórkép okainak megértésében, feltételezve, hogy szubletális dózisban is súlyos tüneteket okozhatnak. Ezek érinthetik a repülést, a navigációs készségek megváltozását, a szaglási memória torzulását, a regenerációs képesség csökkenését, a takarmányfelvételt, illetve a koordinációt [5]. Több fajban is leírták, hogy a neonikotinoidokkal szembeni fokozott kitettség nagyfokú oxidatív terhelést is jelenthet a szervezet számára, méhek esetében azonban a témában további kutatások szükségesek a kérdés tisztázására. Az 1990-es években Franciaországban szigorú szabályozásokat vezettek be, 2008-ban Németországban betiltották használatukat, majd 2013-ban 2 éves moratóriumot vezettek be, azonban a növényvédelem rendkívül fontos vegyületei, így betiltásuk további problémákat vetne fel [7]. Elképzelhető a táplálékláncban felfelé gyűrűző hatásuk is, mely révén az egész ökoszisztémára egyelőre ismeretlen hatással lehetnek, így a

„One Health” szemlélet értelmében is fontos problémát jelenthet. Összességében tehát számtalan tényező befolyásolhatja a kolónia-összeomlás kórkép megjelenését, jelen dolgozatban a neonikotinoid növényvédőszer, azon belül is az acetamiprid központi idegrendszer redox homeosztázisára gyakorolt hatásainak vizsgálatával foglalkozom részletesebben, azonban fontos megjegyezni, hogy a neonikotinoid inszekticidek nem tehetők egyedüli felelőssé a kolónia-összeomlás kórkép kialakulásáért.

Neonikotinoid rovarölő szerek általános jellemzése és hatásmechanizmusa

A mezőgazdaság rohamos növekedésével párhuzamosan a kártevők elleni védekezés fontossága is felerősödött. Tekintve, hogy a rovarölő szerek receptorális úton hatnak a célállat fajokra, kifejezetten fontos a megfelelő szelektivitás megvalósulása. Ellenkező esetben további fajokra is toxikus hatással lehetnek, mely sokszor csak késedelmesen, több évtizednyi használat után bizonyosodik be. A DDT (diklór-difenil-triklóretán) világszerte elterjedt rovarölő szer használata körüli botrány talán a legékezebb példája ennek a sajnálatos jelenségnek. A DDT-t már a második világháború idején használták a tetvek irtására, és az azt követő évtizedekben is fontos szerepe volt a mezőgazdaságnak. Kiderült azonban, hogy ez a környezetben rendkívül stabil organoklorid típusú vegyület, melynek maradványai még napjainkban is kimutathatók az élő szervezetekben, antiandrogén és erőteljes karcinogén hatású [8]. Súlyos mellékhatásait felismerve az 1970-es években a világ számos országában betiltották, azonban használata még ma is mindennapos a malária terjedésének visszaszorítására Dél-Amerikában [9]. Részen ennek hatására az 1980-as években számos kutatás foglalkozott új, a DDT-hez hasonlóan hatékony, azonban biztonságosabb rovarölő szer kifejlesztésével, majd 1986-ban megalkották a neonikotinoid vegyületcsalád első képviselőjét, az imidaklopridot. A vegyület felfedezése kapcsán az alapvető elképzelés egy nikotinhoz hasonló szer létrehozása volt, amely bár kiváló rovarölő hatással bír, azonban a legfrissebb kutatások alapján, nem elég szelektív. A neonikotinoidok a rovarok központi idegrendszerében található nikotinos acetilkolin receptorokon hatnak, mely hatásmechanizmus meglehetősen szelektív a rovarokra, csak sokszoros túladagolás esetén fejtenek ki akut toxikus hatást az emlős szervezetekre [10]. A vegyületcsalád újabb generációjához tartozó acetamipridet 2002-ben fedezték fel, a mezőgazdaságban kifejezetten hangyák, szúnyogok, pókok, darazsak és legyek kártevése ellen. Kitűnő hatékonyságú vegyület, kedvezőbb toxicitási profilja miatt nagyobb biztonsággal alkalmazható a korábban kifejlesztett vegyületekhez képest [1], azonban szubletális hatásai negatívan befolyásolhatják a méhcsaládokat. Használatuk hamar elterjedt, mivel nagyon hatékony vegyületek, vízzeloldékonyak és a környezetben hónapokig stabilak maradhatnak. A

neonikotinoidok egyik leggyakoribb alkalmazási módja a magok csávázása vetés előtt, mely során a rovarölő szerrel bevont mag növekedése folyamán a vegyületet beépíti a szövetéibe, amely azonban utána pollenben, nektárban és a guttációs folyadékban is megjelenhet fokozott kockázatot jelentve ezzel a beporzó rovarfajokra. Ezen kívül szintén alkalmazhatók számos növénykultúrán permetezőszerként is, mely formában történő nem megfelelő kijuttatása szintén jelentős káros hatással szolgálhat a méhekre és más rovarfajokra.

Neonikotinoid növényvédőszeres lehetséges mellékhatásai

Akut toxicitás

A neonikotinoid növényvédőszeresek a korábban elterjedten alkalmazott peszticidekhez (például organofoszfátok) képest sokkal biztonságosabb vegyületek, direkt mérgezések nagyon ritka esetekben fordulnak elő [11]. A növényvédőszeres toxicitását az LD50 értékük alapján jellemzik, mérések alapján imidakloprid esetében 18 µg/méh, acetamiprid esetében pedig 7 µg/méh dózis szükséges a méhek 50%-ának 24 órán belüli elhullásához [12]. A molekulák jellegét tekintve a ciano-szubsztituált neonikotinoidok kevésbé toxikusak nitro-szubsztituált társaiknál. A mérések alapján a neonikotinoidok vízzoldékonyságuk révén orálisan alkalmazva toxikusabbak, mint kontakt úton, mivel penetrációjuk akadályozott a kutikulán keresztül. A hatás az alkalmazás módján túl a méhek életkorától, alfajától és a méhcsaládtól is függ [13].

Krónikus toxicitás

A neonikotinoid inszekticidek méhekre kifejtett krónikus hatásait komplikáltabb vizsgálni laboratóriumi körülmények között, mint az akut toxicitást, és a kutatási eredmények sokszor ellentmondásosak. A dolgozó méhek az összegyűjtött neonikotinoidokkal szennyezett pollent és nektárt beviszik a kaptárba, mellyel végső soron minden méh táplálkozik. A fejlődő méhek immunrendszere még alapesetben sem védi meg őket hatékonyan a paraziták fertőzésektől, mely problémát a feltételezhetően immunszuppresszív neonikotinoidok tovább fokozzák. Az álcák továbbá méregtelenítő mechanizmusaik lassabb működése miatt nagyobb mértékben ki vannak téve a peszticidek szubletális hatásainak is, ez a két tényező pedig szinergista hatást fejt ki fejlődő méhekre nézve [14]. A neonikotinoidok lárvális fejlődésre kifejtett hatásait vizsgáló kutatások megállapították, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva az imidaklopriddal kezelt álcák fejlődéséhez szükséges idő hosszabb volt, mely negatívan befolyásolhatja a méhek későbbi életképességét [15]. Hosszútávú hatások vizsgálata során tanulmányozták továbbá a növényvédőszeres vedlésre, élettartamra, immunrendszerre,

termékenységre, ivararányra, mozgásra, tájékozódásra, táplálkozási szokásokra, peterakási viselkedésre és tanulási mechanizmusokra kifejtett káros hatásait is [16].

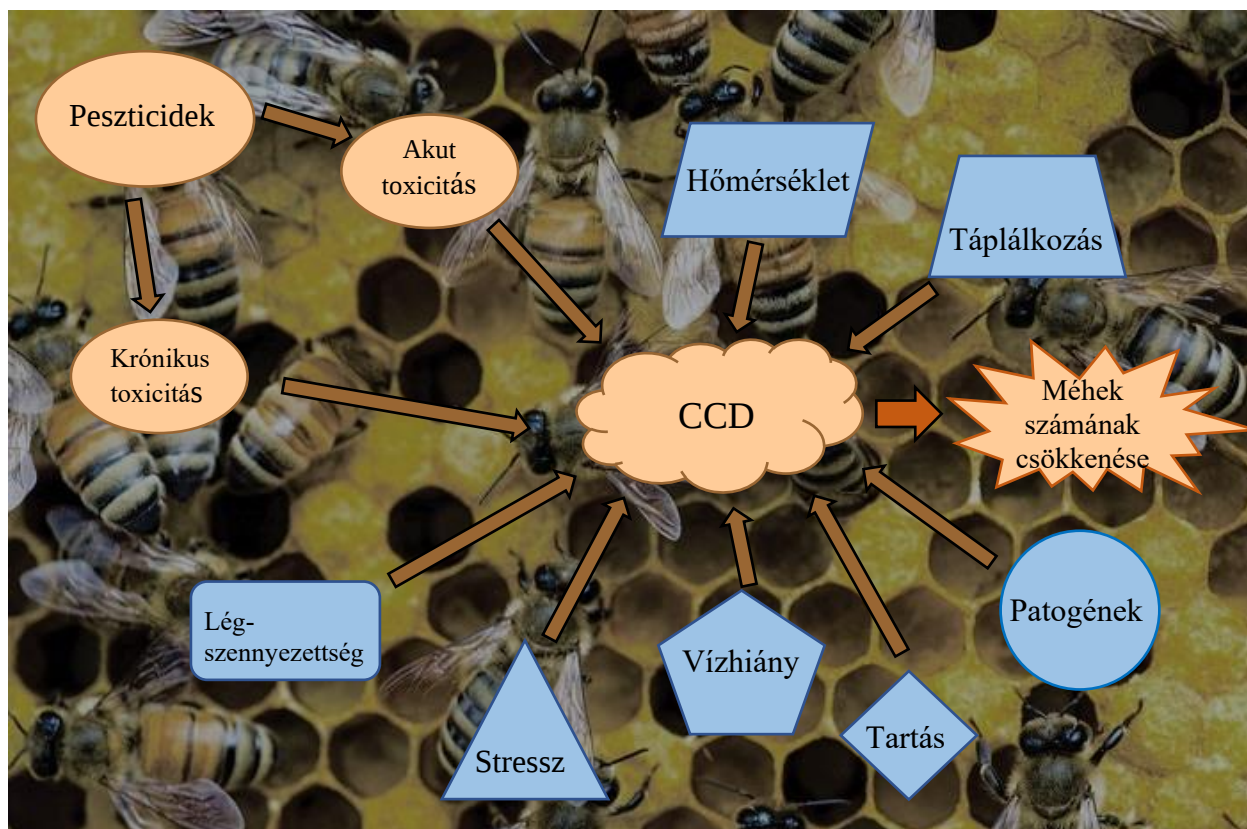
Viselkedési változások

A méhek összetett táplálkozási szokásai miatt a peszticidek viselkedésre és tanulásra kifejtett krónikus hatásait bonyolult vizsgálni terepi körülmények között, illetve sok kérdést vet fel a laboratóriumi vizsgálatok eredményeit a természetben lezajló folyamatokhoz hasonlítani. A viselkedésre kifejtett hatások gyakran nem közvetlenül okozzák a méhek pusztulását, azonban idővel a káros hatások összeadódnak és ez a szinergizmus a méhcsaládok érzékenyebbé válását okozza különböző tényezőkkel szemben, így is hozzájárulva a kolónia-összeomlás kialakulásához [17].

A neonikotinoid inszekticidek neurotoxikus vegyületek, ezáltal a központi idegrendszerre hatva befolyásolhatják a méhek viselkedését és mozgását. Magas dózisú neonikotinoid kitettségnél megfigyeltek különböző tüneteket kísérleti körülmények között (földre hullás, remegés, inkoordinált mozgás, hiperaktivitás), melyek azonban nem jellemzőek természetes körülmények között, alacsony dózisú neonikotinoid kitettség esetében [18].

A tanulási képességek megváltozása a neonikotinoid inszekticidek fontos hatása, mivel a méhek tanulás által találják meg a megfelelő táplálékforrást és képesek oda visszatérni. A szájszerv nyújtási reflex (*proboscis extension reflex*) során a lábtövön, csápon és szájszerven található ízlelőreceptorok stimulációja révén a méh kinyújtja szívószájszervét és megkezdi a nektár felvételét. A táplálkozással párhuzamosan memorizálja a virág illatát, mely révén a következő alkalommal képes lesz visszatérni a táplálékforráshoz. A tanulási folyamat során neonikotinoid expozíciónak kitett méhek reflexműködése, illetve szaglási memóriája zavart szenvedhet, melynek mértéke nagyban függ a vegyületek koncentrációjától és a behatás időpontjától [19]. A neonikotinoid vegyületek repellens hatása előnyös lehet a méhekre kifejtett káros hatások szempontjából, azonban a méhek mérsékelt táplálkozási aktivitása a mezőgazdasági területeken egyértelműen csökkentené az ökológiai értéküket [20].

A méhek kiváló orientációs képessége összetett mechanizmus, meghatározó elemei a tanulás, a vizuális és szaglási memória, a kommunikáció és a navigáció belső órájuk és tereptárgyak alapján. Amennyiben a tanulási folyamat során neonikotinoid expozíció éri őket, potenciálisan károsodhat az információk integrációja, a méhek eltévedhetnek, mely folyamat háttérben részben a fokozott oxidatív stresszhatás következményei is állhatnak és e jelenség lehet a méhcsaládok eltűnésének egyik oka [21](*l. ábra*).

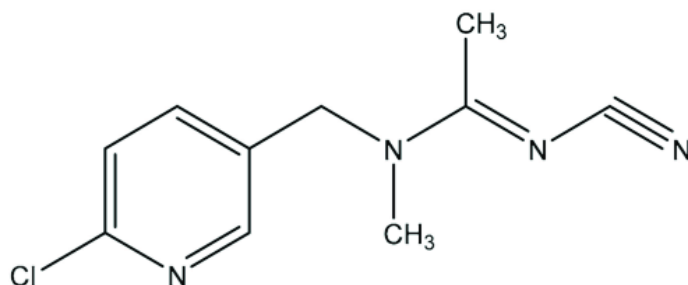


1. ábra: A kolónia-összeomlás kórkép kialakulása és a méhek számának drasztikus csökkenése több tényezős folyamat, melynek okai sokrétűek, többek között szerepe lehet benne a növényvédő szerek toxikus hatásainak, azon belül is a neonikotinoid inszekticideknek, a hőmérsékleti fluktuációnak, a monokultúrákon való táplálkozásból fakadó tápanyag hiánynak, különböző patogén vírusoknak és baktérium-fajoknak, a vízhiánynak, a zsúfoltságból és szállításból adódó stressznek, illetve a légszennyezettségnek. Sárgával jelöltem az általunk tanulmányozott peszticid, vagyis az acetamiprid, illetve kékkel az egyéb környezeti tényezők szerepét a méhek számának csökkenésében. (Forrás: saját ábra).

Acetamiprid

Szubletális hatásai méhekre

Az acetamiprid (2. ábra) méhekbe jutva 30 percen belül több, mint 50%-ban metabolizálódik [22], mely metabolitok toxicitása alacsonyabb az eredeti vegyületnél, azonban nem elhanyagolható [23].



2. ábra: Az acetamiprid kémiai szerkezete. Forrás: researchgate.net

Az acetamiprid élettartamra kifejtett kedvezőtlen hatása 1 µg/méh dózisonál magasabb koncentrációnál jelentkezik, efelett szignifikánsan rövidíti a méhek életét.

A többi neonikotinoid vegyülethez hasonlóan az acetamiprid szaglási memóriára kifejtett ártalmas hatása révén károsítja a szájszerv nyújtási reflexet, mely által zavarja a méhek táplálékkeresési viselkedését, illetve a hazatérési képességük is sérülhet. Ezzel kapcsolatban kimutattak eltéréseket bizonyos tanulással és memóriával kapcsolatos gének expressziójában magas dózisú acetamipridnek való kitettség esetében [24].

Egy másik kutatásban a méheket 0,1 µg (LD₅₀/100) illetve 1 µg (LD₅₀/10) dózisú acetamipriddel kezeltek a szubletális hatások vizsgálata céljából. Az eredmények alapján az acetamiprid stimulálta a lokomotoros aktivitást topikálisan alkalmazva 0,1-0,5 µg/méh dózisban, melynél magasabb dózisonál érdekes módon nem figyeltek meg szignifikáns változást. A szájszerv nyújtási reflexet a kezelés csökkentette 1 µg/méh dózis alatt. A hosszú távú memóriát már 0,1 µg/méh dózisú acetamiprid kitettség is rontotta, a rövid távú memóriára azonban nem volt jelentős hatással. Közepes dózisú alkalmazás módosította a tanulási teljesítményt és a lokomotoros aktivitást, míg magasabb dózisonak nem volt jelentős hatása [25]. Az acetamiprid befolyásolhatja a méhek első táplálékkereső repülésének időpontját is. Minél korábban kezdenek el a méhek kirepülni táplálékkeresés céljából, annál rövidebb lesz az élettartamuk, az acetamiprid ezáltal csökkenti a dolgozó méhek élettartamát [26].

Mivel a kaptárban fejlődő egyedek a dolgozó méhek által összegyűjtött nektárral táplálkoznak, ezért az acetamiprid hatással van a méhek lárvális fejlődésére, mely a méhcsalád jövőjének szempontjából legalább ugyanakkora jelentőségű, mint a dolgozó méhek elhullása. Az acetamiprid már 5 mg/l etetőanyag koncentráció felett káros hatással van az álcák túlélési esélyeire, károsítja növekedésüket és metabolizmusukat, mely hatással van későbbi életképességükre [27]. Fontos kiemelni továbbá, hogy több kutatás is felvetette az acetamiprid hatására fellépő oxidatív stressz kiemelt jelentőségét a fent említett tünetek kialakulása szempontjából, a kérdés tisztázására azonban a jövőben elengedhetetlen további vizsgálatok elvégzése [28, 29].

Hatásai más fajokra

Ökológiai és humán egészségügyi szempontból fontos a kutatások kiterjesztése a neonikotinoid peszticidek emlős szervezetekre kifejtett hatásaira, annak ellenére, hogy ezek a vegyületek szelektíven hatnak a rovarok központi idegrendszerében található nikotinos acetilkolin receptorokra. A neonikotinoidok a környezetben felhalmozódnak, szervezeten

kívüli felezési idejük több hónap vagy akár év is lehet. Az emlős szervezetek számára a legjelentősebb neonikotinoid forrás a táplálék lehet, de szintén kimutathatók az ivóvízben is. Humán magzatokra kifejtett teratogén hatásukat vizsgálva a kutatások összefüggést találtak a az anencephalia [30], az autizmus [31], a Fallott tetralógia [32] és a neonikotinoid inszekticidek terhesség alatt történő expozíciója között.

A neonikotinoidok reprodukciós toxicitását főképp patkányokon vizsgálták különböző kutatásokban. Nőstény egyedekben patomorfológiás follikuláris elváltozásokat, illetve csökkent petefészek tömeget tapasztaltak [33]. Hím egyedekben a mellékhere súlyának és a vérplazma tesztoszteron koncentrációjának csökkenését, illetve előnytelen spermium működést írtak le egyes vizsgálatokban [34]. A kutatások alapján a fejlődő patkányok fogékonyabbak voltak a kezelésből fakadó káros hatásokra, mint a felnőttek.

Magas dózisú neonikotinoidok alkalmazását követően hepatotoxicitás jelent meg patkányoknál, melyet a hepatocyták degenerációja, a centrális véna tágulata és a megemelkedett májenzimek szintje jelzett [35].

A neonikotinoid peszticidek neurotoxinok lévén neurotoxikus hatásúak lehetnek. A kísérlet során fiatal patkányok kognitív funkciójának sérülését állapították meg [36], felnőtt egyedekben pedig a magas dózisú kitettség csökkentette a fájdalomküszöböt és a mozgásszervi aktivitást [37].

Leginkább magas dózisban gén és kromoszóma mutációt okozó genotoxikus hatásukat nyulakban [38], patkányokban [39], egerekben [40], szarvasmarhában [41] és emberben is kimutatták [42].

A neonikotinoid inszekticidek hatással lehetnek pajzsmirigy-túlműködés, inzulinrezisztencia, zsír akkumuláció, immunszuppresszió, oxidatív stressz és vese toxicitás kialakulására, azonban kevés erre irányuló kutatási anyag érhető el ezek igazolására [43].

Sertések reprodukciójára gyakorolt hatásukat vizsgálva a kutatási eredmények alapján a neonikotinoidok szaporodási problémákat okozhatnak az általuk indukált endokrin zavar vagy oxidatív stressz által, mely rontja az egyedek termékenységét, illetve az emésztőszervi megbetegedések előfordulását is növelhetik, mely növekedésben való elmaradást okoz. Az ember és sertés reprodukciós működésének hasonlósága miatt további kutatások szükségesek a pontos mechanizmusok feltárására [44].

Oxidatív stressz

Oxidatív stresszről abban az esetben beszélhetünk, mikor a prooxidáns és antioxidáns tulajdonságú anyagok közötti egyensúly felborul a prooxidáns hatású anyagok javára. Ez a

folyamat redox jelátvitel zavarhoz és molekuláris károsodáshoz vezethet [45]. Elsőként az osztrák-magyar származású tudós, Selye János vetette fel a stressz fogalmát mellékvesét tanulmányozó kutatásai során, 1976-ban írt cikkében így fogalmazott: „A stressz a szervezet nonspecifikus válasza különböző behatásokra” [46]. Az oxidatív stressz fogalma először az 1950-es években merült fel egyes vegyipari folyamatok káros hatásainak vizsgálata során [47], 1985 óta pedig már a napjainkban is használt definíciója a sejtek és szervek oxidatív károsodásának jellemzésére [48].

A redox homeosztázis fenntartása elengedhetetlen minden élő szervezet számára. A szervezetben zajló metabolikus folyamatok során különböző reaktív molekulák keletkeznek, melyek közül a reaktív oxigén fajták (reactive oxygen species, ROS) kiemelt jelentőséggel bírnak. Néhány ROS szabadgyök tulajdonságú, tehát tartalmaz párosítatlan elektront, ilyen például a szuperoxid-anion ($O_2^{\bullet-}$), a hidroxil ($OH^{\bullet}$) és a peroxil ($CO-O^{\bullet}$) gyök. Néhány ROS viszont nem tartalmaz szabad párosítatlan elektront, tehát nem szabadgyök természetű molekula, de mégis forrásai lehetnek egyéb reaktív vegyületeknek. Ide tartozik például a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és az ózon (O_3), melyek kémiaiilag stabilabb vegyületek. A ROS-ok mellett fontos szerepet töltenek be a reaktív nitrogén fajták (RNS), illetve a klór és bróm fajták is [49]. A prooxidáns anyagok túlsúlya létrejöhet különböző környezeti hatásokra is, jelen dolgozatban a peszticidek negatív hatását vizsgáljuk a méhek redox háztartására.

A prooxidáns hatású anyagok elleni védekezési mechanizmusok 3 kategóriába sorolhatók: megelőzés, feltartóztatás és javítás, melyek közül a legkedvezőbb megoldás a szabadgyök képződés megelőzése, melyet számos enzim tart kontroll alatt, működésüket a következő bekezdésben fejtem ki.

Amennyiben a reaktív anyagok már kialakultak, enzimatis rendszerek igyekeznek fenntartani a fiziológiás szintjüket, megakadályozva az oxidatív stressz kialakulását. A SOD (szuperoxid-dizmutáz) minden sejt életében kifejezetten fontos antioxidáns hatású enzim. Működése során két szuperoxid-anion átalakulását katalizálja hidrogén-peroxiddá és molekuláris oxigénné, csökkentve ezzel a vegyület toxicitását [50]. Metalloenzim lévén a SOD működéséhez fém kofaktorra van szükség, különböző izoenzimjei eltérő kofaktorokat igényelnek, mint például vasat, cinket és mangánt [51].

A glutation-peroxidáz (GPx) főként a mitokondriumokban megtalálható intracelluláris enzim, mely a hidrogén-peroxidok detoxifikálását végzi, redukált glutation (GSH) felhasználásával vízzé bontja őket, illetve oxidált glutation (GSSG) keletkezik a reakció folyamán [52]. Emellett pedig a lipid-peroxidokat alkoholokra bontja, védve a sejteket a lipidperoxidáció által okozott oxidatív stressztől [53]. Csökkent működésekor megfigyelhető negatív hatások, úgy, mint a

membránlipidek és sejtfehérjék károsodása, bizonyítja kiemelt szerepét az oxidatív stressz elleni védekezésben [54].

Minden biomolekula közül a lipidek vannak leginkább kitéve az oxidatív stressz káros hatásainak. Lipidperoxidáció hatására főként aldehidek keletkeznek, melyek katalitikus tulajdonságuk révén tovább súlyosbítják az oxidatív károsodást [55]. A többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának tanulmányozására a malondialdehid (MDA) az elsődleges vegyület, melyet az 1960-as évektől kezdődően használnak a lipidperoxidáció mértékének jelzésére. A lipidperoxidáció során keletkező metabolitok nagyon reaktívak és toxikusak, így interakcióba léphetnek nukleinsavakkal és fehérjékkel, sokszor irreverzibilis károsodást okozva a sejtekben [56].

Antioxidáns hatású szerek

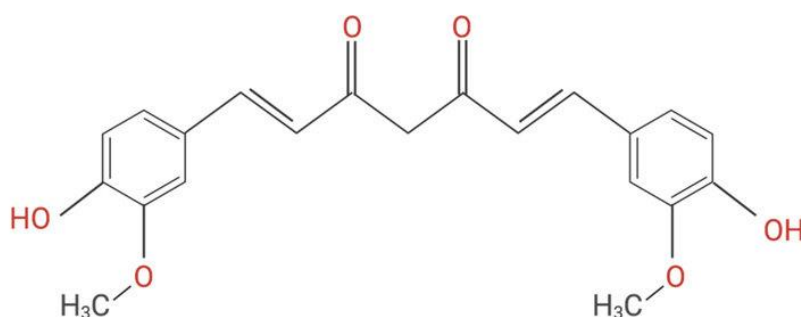
A neonikotinoidok, nem célállatfajokban kifejtett káros hatásait részben oxidatív stressz kiváltásán keresztül érik el, mely mechanizmus alapja a ROS termelés indukálása, mely oknál fogva bekövetkezhet a DNS károsítása, a fehérjék oxidációja, illetve a lipidperoxidáció, valamint a mitokondriális Ca^{2+} homeosztázisa [57]. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció fontos a mitokondrium membrán permeabilitásának fenntartásában, ezt az egyensúlyt a neonikotinoid inszekticidek képesek megváltoztatni a Ca^{2+} sejtbeli koncentrációjának emelésével [58]. Emellett megemelkedik a ROS szintje is a sejtekben, melynek fő forrása a mitokondrium [59]. E folyamatok egyes jelátviteli utak rendellenes működéséhez és energiaháztartási zavarokhoz vezethetnek, ráadásul a ROS mitokondrium-károsító hatása révén a folyamat gyakran öngerjesztővé válik [60]. A neonikotinoidok képesek a mitokondrium morfológiai és ezáltal funkcionális változását is előidézni, például azok rendellenes megduzzadását, kitágulását vagy deformációját okozva [61]. Ezek a nemkívánatos strukturális módosulások neurodegeneratív és metabolikus betegségekhez vezethetnek [62]. Többek között részben vagy egészben e negatív folyamatokra vezették vissza a neonikotinoidok hepatotoxikus [63] és neurotoxikus [64] hatásait is. A mitokondriális DNS károsodása és az ATP termelés zavara miatti sejtszintű energiahány továbbá hatással lehet a méhek telelésére is, mely a nagymértékű méhcsalád veszteségek egyik oka lehet [65].

Az neonikotinoidok által okozott oxidatív stressz kivédésére antioxidáns hatású anyagokat alkalmazhatunk preventív és terápiás célból egyaránt. A reaktív oxigén- és nitrogéngyökök felhalmozódása az antioxidáns rendszer elégtelen működése vagy extrém mértékű szabad gyök termelés esetében jöhet létre [66]. A folyamat a fent kifejtett módon a DNS, a fehérjék és a lipidek károsítása révén végül sejtszintű apoptózist vagy nekrozist okoz [10]. Ennek

elkerülésére mind a méhek, mind az emlős szervezetek védelmére protektív anyagokat alkalmazhatunk. Ilyenek lehetnek egyes vitaminok (pl. E- és C-vitamin), az N-acetil-cisztein, bizonyos esszenciális olajok, polifenolok és egyéb aromás láncú vegyületek (pl. timokinon, rezveratrol, kvercetin vagy kurkumin)[67].

Kurkumin

A kurkumin antioxidáns hatású vegyület egy lipofil polifenol, melyet a *Curcuma longa* rizómájából vonnak ki (3. ábra).



3. ábra: A kurkumin kémiai szerkezete. Forrás: researchgate.net

Gyulladáscsökkentő hatását a ciklooxygenáz (COX)-2 és lipoxigenáz (LOX) enzimek működésének, illetve gyulladást elősegítő citokinek termelődésének gátlásával fejt ki [67]. Citoprotektív hatása lipidperoxidáció gátláson alapul, gyengíti a gyulladásos reakciókat akut vagy krónikus gyulladásos betegségek esetén. Eddigi eredmények alapján sikeresen alkalmazható számos betegség esetén, mely példákat a dolgozat későbbi fejezetében fejtek ki. Alacsony dózisban anti-genotoxikus, azonban túlzottan magas dózisban alkalmazva akár genotoxikus hatásai is lehetnek [68]. A kurkumin képes volt megvédeni a patkányokat az acetamiprid-indukálta kisagyi toxicitástól, a megnövekedett acetilkolin-észteráz és butirilkolin-észteráz aktivitástól, a sejtek életképességének csökkenésétől, oxidatív stressztől és fokozott intracelluláris Ca^{2+} szinttől [69].

Összességében az antioxidáns hatású protektív anyagok alkalmazása számos jótékony hatással bír a neonikotinoidok káros szubletális hatásaival szemben. Az antioxidáns anyagok méhek szervezetére kifejtett hatásaival kevés kutatás foglalkozik, azonban az emlős szervezetekben kifejtett pozitív hatásaik alapján kiváló szerekeknek ígérkeznek a neonikotinoid inszekticidek elleni védekezésben is.

Célkitűzés

Napjaink egyre nagyobb mértékben növekvő népességének táplálékkal való ellátásában a méheknek kulcsfontosságú szerepük van világszerte. A méhek kihalásával vagy számuk drasztikus csökkenésével a mezőgazdaság egyik legértékesebb pollinátor fajtát veszítené el, melynek ökológiai és gazdasági következményei egyaránt beláthatatlanok.

A mezőgazdaságban széleskörben alkalmazott növényvédőszer a nem célállatfajokra, így pedig a házi méhekre is potenciálisan mérgező hatással lehetnek. Bár az utóbbi évszázadban végbemenő tudományos és technológiai fejlődés hatására egyre biztonságosabb peszticidek kerültek a világpiacra, és egyes környezetvédelmi szempontok is fokozott figyelmet kapnak azok alkalmazása kapcsán, az egyes készítmények molekuláris szintű hatásainak tanulmányozása napjainkban is rendkívül fontos feladat, mivel kedvezőtlen hatásaik révén negatívan befolyásolhatják a nem célállatfajok életsiklusát és fejlődését, nemkívánatos ökológiai változásokat előidézve. Másrészt a hatalmas mértékű mezőgazdasági termelés miatt a növényvédőszer alkalmazása elengedhetetlen, mellőzésük egyéb opció híján jelenleg nem kivitelezhető.

A növényvédőszer, például neonikotinoidok méhek metabolizmusára kifejtett hatásainak vizsgálata, valamint a kolónia-összeomlás kórkép kialakulásában játszott esetleges szerepének tisztázása egyre inkább sürgető kérdéssé válik, ugyanis a méhek számának drasztikus csökkenése végeláthatatlan következményekkel járhat mind a fenntartható és biztonságos élelmiszertermelés, mind az ökoszisztéma stabilitása szempontjából. Fontos továbbá megjegyezni, hogy e jelenségnek valószínűleg számos oka van, így a neonikotinoidok nem tehetők egyedül felelőssé, azonban számos egyéb tényezőhöz társulva, szinergista faktorként részt vehetnek a kórkép kialakulásában. A neonikotinoidok újabb generációjába tartozó acetamiprid a többi hatóanyaghoz képest kedvezőbb toxicitási profillal bír, így biztonságosan alkalmazható szer, azonban a méhekre kifejtett szubletális hatásainak vizsgálata mindenképpen szükséges az említett kérdések tisztázása szempontjából.

Jelen kutatás keretében az acetamiprid központi idegrendszer redox háztartására kifejtett hatásait kívántuk vizsgálni mézelő méhekben, hiszen a szakirodalom szerint a szubletális dózisban alkalmazott neonikotinoidoknak esetlegesen idegrendszeri hatásai lehetnek, befolyásolva az agydúc redox homeosztázisát és következetesen megváltoztatva többek között a méhek hazatérési és táplálkozási viselkedését.

A fokozott oxidatív stressz ellensúlyozásra lehetséges a jövőben különböző antioxidáns hatású anyagok alkalmazása, melyek közül a kurkumin protektív hatásait kívántuk vizsgálni.

Anyag és módszer

Kezelés és mintavétel

A kísérlet első fázisát, vagyis a méhek begyűjtését, kezelését és a mintavételt egy Veszprém megyei családi méhészetben, Ugodon végeztük. Munkánk során a felnőtt dolgozók begyűjtése és elhelyezése Williams és mtsai, 2013-ban leírt [70] módszerei alapján valósult meg. A kísérletben a kiinduláskori megegyező általános állapot és az egyedek homogenitásának biztosítása érdekében egy egészséges méhcsaládot használtunk fel. A méhcsalád a kísérletet 3 hónappal megelőzően, szigorúan ellenőrzött, nem volt kitéve semmilyen vegyszer hatásának vagy gyógyszeres kezelésnek. A dolgozó méhek begyűjtése fiasítás nélküli, mézes keretéről történt a kora reggeli órákban.

Az állatokat véletlenszerűen csoportokba osztottuk, melyek csoportonként nagyjából 50 egyedet tartalmaztak. A felhasznált ketrecek mérete 30 cm x 20 cm volt, és a kezelés 25 ± 2 °C-on, 50-65% relatív páratartalom mellett valósult meg. A méhek *ad libitum* fértek hozzá az ivóvízhez és a takarmányhoz (50%-os szacharóz oldat). A kísérlet első 36 órájában rövid akkomodációs időszak beiktatására került sor, mely során a méhek nem kaptak semmilyen kezelést. Ezután az acetamiprid és a kurkumin megfelelő koncentrációit adtuk hozzá az etetőoldathoz, melyet minden 8 órában frissre cseréltünk (4. ábra). A kezelés 48 órán át tartott, mely időtartam alatt a kezelőanyagok koncentrációi a következők voltak a különböző csoportokban.

1. táblázat: A méhek különböző csoportjainak kezelési terve

Csoport	Kezelésre koncentráció
Kontroll	⊙
Acetamiprid	35,5 mg/L cukorszirup
Kurkumin alacsony	11 mg/L cukorszirup
Kurkumin magas	110 mg/L cukorszirup
Acetamiprid + kurkumin alacsony	35,5 mg acetamiprid + 11 mg kurkumin/L cukorszirup
Acetamiprid + kurkumin magas	35,5 mg acetamiprid + 110 mg kurkumin/L cukorszirup

A kezelés pontos menetét és az acetamiprid, kurkumin koncentrációját korábbi kutatási eredmények alapján határoztuk meg [71]. Az alkalmazott acetamiprid kezelés Decourtye és mtsai, 2005 cikkében [72] leírtak alapján egy akut, szubletális dózissal feleltethető meg (LD50/10/méh/nap *per os*)

A kezelés után az egyedeket tartalmazó ketreceket szárazjégre helyeztük és a laborba szállítottuk, ahol a méhek tárolása a mintafeldolgozásig -80°C -on valósult meg.



4. ábra: A méhek fejének leválasztása a sztereomikroszkópos boncolást megelőzően (forrás: saját kép)

Óvatos kiolvasztást követően, a méhek fejét eltávolítottuk (4. ábra) és azok további boncolása jégen, sztereomikroszkóp alatt történt (5. ábra). A kipreparált agy minták tartalmazták a protocerebrumot, az antenna lebenyeket, az optikus lebenyeket és a nyelőcső alatti gangliont is, így tehát a méhek idegrendszerének jelentős részét.



5. ábra: A méhfej boncolás menete (forrás: saját kép)

A mintákat Potter-Elejem szövet homogenizátorral homogenizáltuk T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) oldatban Pierce proteáz inhibitor oldattal kiegészítve (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ezután 5000 g-n centrifugáltuk a mintákat 10 percig, majd a kapott felülúszókat aliquot-okba osztva -80°C-on tároltuk a további mérések elvégzéséig.

Mérések

Az összfehérje-koncentráció meghatározása

A minták feldolgozását az összfehérje koncentrációjának meghatározásával kezdtük meg, melyet Pierce BCA Protein Assay Kit felhasználásával végeztünk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A -80 °C-on tárolt mintákat a fagyasztóból kivéve egyből jégre helyeztük (1 aliquot/minta), majd elkészítettük a standard sort. A mintákat hígítottuk és a standardekkel (bovine serum albumin, BSA) együtt bemértük a microplate-re (25 µl/standard vagy hígított minta). Ezután előkészítettük a reagenseket, 20 ml „A” reagenst és 400 µl „B” reagenst (50:1 arány), majd minden lyukba 200 µl reagenst mértünk be. 30 perc 37°C-on történő inkubációt követően 562 nm hullámhosszon leolvastuk microplate olvasó segítségével. A fehérjemérésre a későbbi standardizálás céljából volt szükség annak érdekében, hogy elkerüljük a mintafeldolgozás során esetlegesen bekövetkező, metodikai hibákból eredő pontatlanságokat.

Hidrogén-peroxid koncentrációjának mérése

A hidrogén-peroxid (H₂O₂) koncentrációt Amplex Red módszerrel határoztuk meg Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit felhasználásával (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). A mérés során az Amplex Red reagens szubsztrátja tormaperoxidáz jelenlétében 1:1 sztöchiometriai arányban reakcióba lép a hidrogén-peroxiddal. A reakció során fluoreszcens rezorufin keletkezik, és O₂ szabadul fel. A hidrogén-peroxid mennyiségét a keletkező rezorufin mennyisége alapján kaptuk. A gyártó által ajánlott protokoll szerint, 96 lyukú lemezen 50 µl Amplex Red oldathoz 50 µl szövethomogenizátumot adtunk, a kapott fluoreszcencia értékeket pedig 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően Victor X2 2030 microplate olvasóval detektáltuk (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA; λ_{ex} = 560nm; λ_{ex} = 590nm).

Malondialdehid koncentrációjának mérése

A lipidperoxidációs folyamatok nyomonkövetése céljából a malondialdehid (MDA) koncentrációját vizsgáltuk specifikus kolorimetriás teszttel (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A mérés során a gyártó protokollja szerint jártunk el, vagyis 300 µl tiobarbitur savat (TBA) pipettáztunk össze 100 µl agyszövet homogenizátummal, majd a kapott oldatokat

95°C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Jégen történő lehűtést követően az abszorbancia értékeket 532 nm-en Multiskan GO 3.2 olvasóval detektáltuk.

Glutation koncentrációjának mérése

A GSH és a GSSG koncentrációt szintén kolorimetriás módszerrel határoztuk meg (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A standardet és a mintákat 96 lyukú lemezre pipettáztuk, mindegyikből 40 µl-t, melyet 120 µl pufferoldattal, valamint a GSSG meghatározása során 4 µl maszkoló reagenssel egészítettünk ki. A lemezt 37°C-on 60 percig inkubáltuk. Ezután 20 µl szubsztrát oldatot adtunk mindegyikhez, melyet követően 20 µl koenzim oldattal és szintén 20 µl enzim oldattal egészítettük ki a mintákat (ld. 6. ábra). Az abszorbancia értékeket 412 nm-en mértük 10 perces, 37°C-on történő inkubáció után, Multiskan GO 3.2 olvasó segítségével.

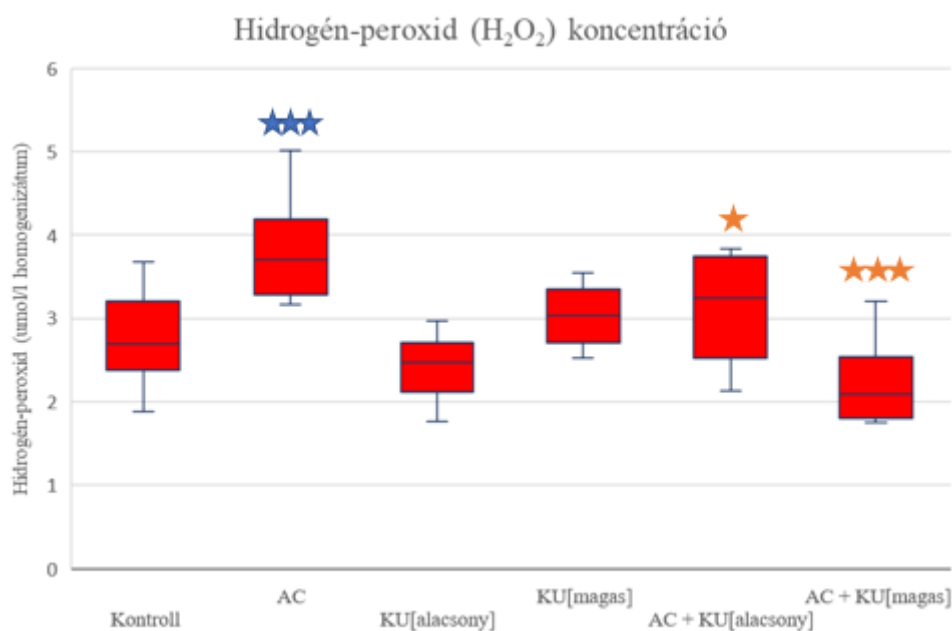
Statisztika

Az adatok feldolgozása és elemzése a GraphPad Prism 9 szoftver segítségével történt (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A variancia homogenitását és a normál eloszlást Levene-próbával és Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A különböző csoportok közötti eltéréseket egyszempontos varianciaanalízissel és Dunnett-féle post-hoc teszt segítségével mértük fel. A csoportok közötti eltéréseket szignifikánsnak ítéltük abban az esetben, ha $p < 0,05$. Minden értéket a fehérjemérés során kapott eredmények alapján standardizáltunk annak érdekében, hogy elkerüljük a boncolás és homogenizálás során bekövetkező esetleges metodikai okokból eredő pontatlanságokat. A standardizálás során kiszámítottuk a homogenizátumok átlagos fehérjekoncentrációját és az egyes minták további paramétereit az ettől való százalékos eltérés függvényében, utólagosan korrigáltuk.

Eredmények

Hidrogén-peroxid koncentrációja

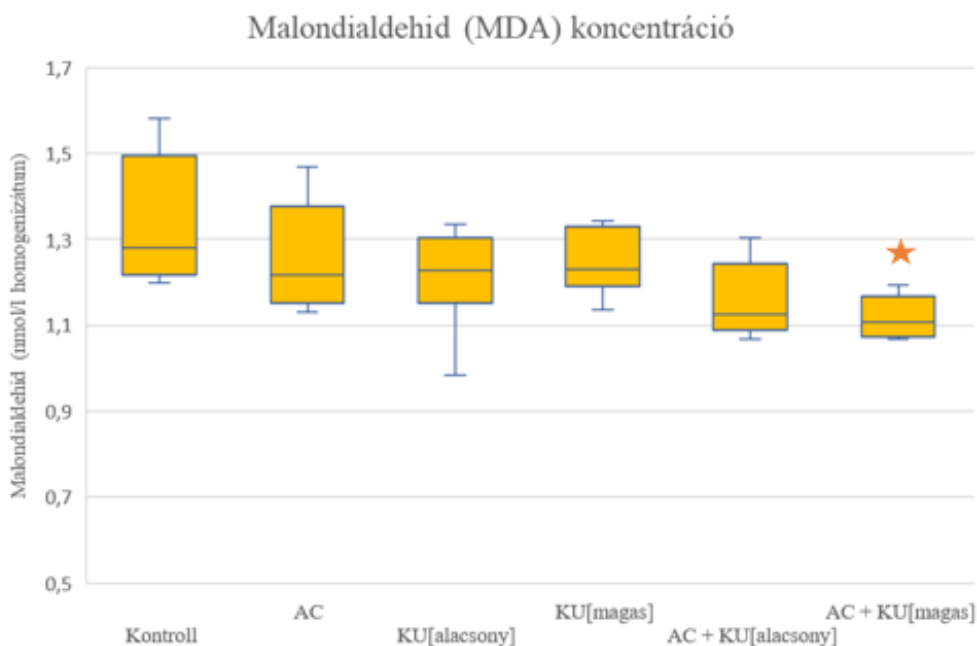
A H_2O_2 termelődés acetamiprid kezelés hatására szignifikánsan nőtt a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,001$), miközben mind acetamiprid és alacsony dózisú kurkumin kombináció ($p = 0,047$), mind acetamiprid és magas dózisú kurkumin csoport esetében ($p < 0,001$) csökkent a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyítva.



6. ábra: A H_2O_2 ($\mu\text{mol/l}$ homogenizátum) koncentrációjának vizsgálata a kontroll csoportban, a kizárólag acetamipriddel kezelt csoportban (AC), alacsony dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (KU[alacsony]), a magas dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (KU[magas]), az acetamipriddel és alacsony dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (AC+KU[alacsony]) illetve acetamipriddel és magas dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (AC+KU[magas]). A dobozok feletti kék csillagok a kontroll csoporthoz viszonyított, a narancssárga csillagok a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikanciát jelzik.
* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Malondialdehyd koncentrációja

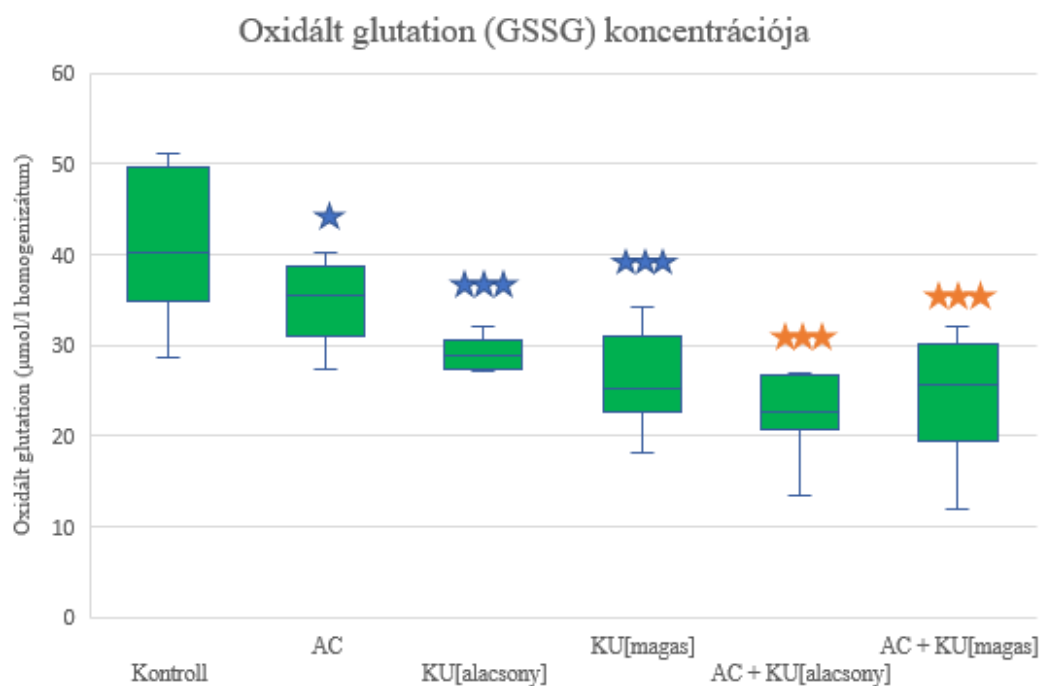
A malondialdehyd koncentrációjában nem találtunk szignifikáns eltérést az acetamipriddel kezelt csoport esetében. Ezzel szemben szignifikáns csökkenést találtunk a magasabb dózisu kurkumint tartalmazó kombinációs kezelés hatására az acetamipridnek kitett csoporthoz viszonyítva ($p=0.037$).



7. ábra: A MDA (nmol/l homogenizátum) koncentrációjának vizsgálata a kontroll csoportban, a kizárólag acetamipriddel kezelt csoportban (AC), alacsony dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (KU[alacsony]), a magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (KU[magas]), az acetamipriddel és alacsony dózisu kurkuminnal kezelt csoportban ([AC+KU[alacsony]]) illetve acetamipriddel és magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (AC+KU[magas]). A dobozok feletti narancssárga csillagok a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikanciát jelzik. * $p<0,05$

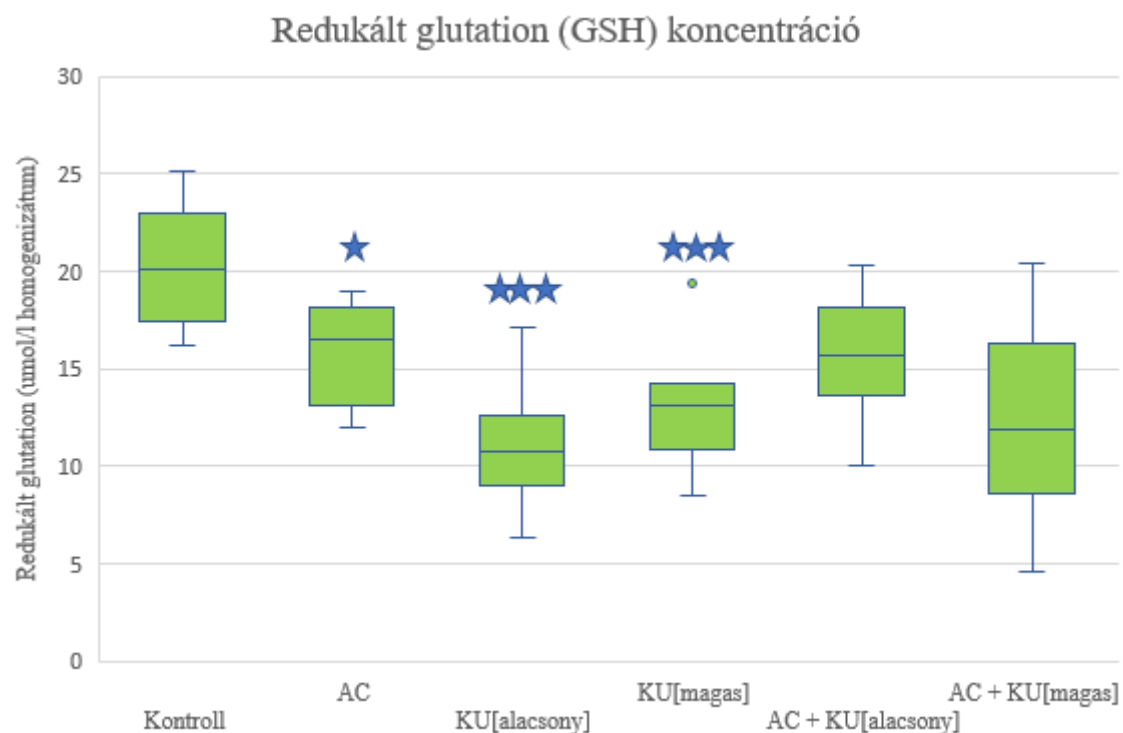
Glutation koncentrációja

A GSSG koncentrációja szignifikánsan csökkent az acetamipriddel kezelt csoportban ($p=0,048$), valamint az alacsony és magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportokban is (mindkét esetben $p<0,001$) a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezen kívül a GSSG koncentrációja szignifikánsan csökkent az acetamipriddel és alacsony dózisu kurkuminnal kezelt csoportban ($p<0,001$), illetve az acetamipriddel és magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportban ($p<0,001$) a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyítva.



8. ábra: A GSSG ($\mu\text{mol/l}$ homogenizátum) koncentrációjának vizsgálata a kontroll csoportban, a kizárólag acetamipriddel kezelt csoportban (AC), alacsony dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (KU[alacsony]), a magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (KU[magas]), az acetamipriddel és alacsony dózisu kurkuminnal kezelt csoportban ([AC+KU[alacsony]]) illetve acetamipriddel és magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportban (AC+KU[magas]). A dobozok feletti kék csillagok a kontroll csoporthoz viszonyított, a narancssárga csillagok a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikanciát jelzik.
 * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

A GSH koncentrációja a kizárólag acetamipriddel kezelt csoportban szignifikánsan csökkent ($p=0,023$) a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az alacsony és magas dózisu kurkuminnal kezelt csoportokban a GSH koncentrációja szintén szignifikánsan csökkent (mindkét esetben $p < 0,001$). Az acetamipriddel és kurkuminnal együttesen kezelt csoportokban nem mértünk szignifikáns változást az acetamipriddel kezelt csoportokhoz képest.



9. ábra: A GSH ($\mu\text{mol/l}$ homogenizátum) koncentrációjának vizsgálata a kontroll csoportban, a kizárólag acetamipriddel kezelt csoportban (AC), alacsony dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (KU[alacsony]), a magas dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (KU[magas]), az acetamipriddel és alacsony dózisú kurkuminnal kezelt csoportban ([AC+KU[alacsony]]) illetve acetamipriddel és magas dózisú kurkuminnal kezelt csoportban (AC+KU[magas]). A dobozok feletti kék csillagok a kontroll csoporthoz viszonyított, a narancssárga csillagok a kizárólag acetamipriddel kezelt csoporthoz viszonyított szignifikanciát jelzik.
- * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Megbeszélés

A neonikotinoid inszekticidek csoportjába tartozó acetamiprid méhek idegrendszerére kifejtett hatásainak vizsgálata kiemelten fontos az utóbbi években tapasztalható, méhek és más beporzó rovarfajok számában bekövetkező csökkenő tendenciák miatt. A CCD okainak tanulmányozása során feltételezhető, hogy a növényvédőszernek több egyéb tényezővel együtt szinergista hatása van a folyamatra, így pedig nagymértékben hozzájárulhatnak a kórkép kialakulásához. Habár az acetamiprid a korábban alkalmazott növényvédőszerhez, így a neonikotinoidok más képviselőihez képest biztonságos szernek mondható, és súlyos, akut mérgezések a korábbi hasonló vegyszerekhez viszonyítva ritkábban fordulnak elő, kutatások az oxidatív stressz által kiváltott negatív hatásait számos különböző nem-célállat fajban igazolták. Ezt kiegészítve a későbbiekben fontos lehet vizsgálni nem csak a növényvédőszer önmagában kifejtett hatását, hanem az egyidejűleg több növényvédőszer alkalmazásából adódó szinergizmust [73], illetve a különböző adjuváns anyagok hatását, ugyanis az egyes vegyületek talán önmagukban nem toxikusak, azonban kombinációban alkalmazva káros hatással lehetnek a méhekre [74]. Mivel az acetamiprid negatív hatásait a nikotinos acetilkolin receptorokra gyakorolt hatáson túl főképp oxidatív stressz kiváltásán keresztül éri el, ezért kísérletünk során az antioxidáns státuszt jelző paraméterek (MDA, H_2O_2 , GSH, GSSG) változását vizsgáltuk acetamiprid jelenlétében, illetve a feltételezhetően protektív hatású kurkumin alkalmazása mellett méhek központi idegrendszerében.

Az acetamiprid hatását vizsgálva kísérletünkben a H_2O_2 koncentrációja szignifikánsan emelkedett méhek agydúcában a kontroll csoporthoz viszonyítva, ezzel azt a több publikációban is leírt jelenséget támasztva alá, hogy a neonikotinoidok oxidatív stresszt indukáló vegyületek lehetnek. E folyamatok során a sejtekben jelentős mennyiségű, párosítatlan elektront tartalmazó ún. reaktív gyök keletkezhet, melyek később negatív hatást gyakorolnak a fehérjék, a lipidek, valamint a DNS szerkezetére egyaránt [49].

Vizsgálatunkban a lipidperoxidációs folyamatok és az abból következő, esetleges sejtmembránkárosodás nyomon követése céljából az MDA koncentrációjában bekövetkező változásokat kívántuk nyomon követni. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az MDA koncentrációjában nem találtunk szignifikáns eltérést a méréseink során, melynek különböző okai lehetnek, az ezzel kapcsolatos kutatási eredmények nem egységesek. A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján kijelenthetjük, hogy az MDA koncentrációjának megváltozása nagyban függhet az alkalmazott kezelőanyag koncentrációjától, valamint a káros hatású vegyületnek való kitettség hosszától is. Munkánk során célunk egy akut modell létrehozása volt, mely

kísérletben az acetamiprid rövidtávú hatásait vizsgáltuk. Több kutatócsoport is beszámolt azonban arról, hogy míg az oxidatív stresszt keltő szer azonnal, akut módon nem vezet az MDA szint változásához, közép- és hosszabb távon azonban egyértelműen megindítja a káros lipidperoxidációs folyamatokat [75]. Más kutatásokban továbbá azt is megfigyelték, hogy az acetamiprid az idő – és ezzel összefüggésben az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódása, valamint esetleges kimerülése – függvényében emelheti, vagy éppen csökkentheti is az MDA koncentrációját [76].

Egy indonéz cipőgyár dolgozóinak egészségügyi állapotával foglalkozó kutatás a fokozott vegyi terhelés munkásokra kifejtett hatását vizsgálta. Az eredmények alapján szignifikáns összefüggést találtak az MDA és a GSH szint között, melyek az oxidatív stressz során tapasztaltaknak megfelelően inverz viszonyban állnak, tehát minél magasabb az oxidatív stresszt jelző MDA szintje, annál alacsonyabb az oxidatív stressz elleni védekezésben résztvevő GSH szintje a sejtekben. Kísérletünkben nyert eredményekhez hasonlóan nem találtak szignifikáns összefüggést a vegyi terhelésnek való kitettség és munkások MDA szintje között [77]. Ezzel ellentétben egy másik rovarfajban, a selyemlepkében (*Bombyx mori*) vizsgálva a paramétereket, a kutatási eredmények szerint az alacsony dózisú acetamiprid által kiváltott oxidatív stressz hátráltatta a hernyók posterior selyemmirigyének növekedését és fejlődését, mely esetben több oxidatív károsodást jelző paraméter mellett az MDA koncentrációja is emelkedést mutatott [78].

A gyűrűsféreg (Annelida) törzsébe tartozó *Eisenia fetida* fajban acetamiprid hatására szintén megfigyelték egyes, az oxidatív stresszt jelző enzimek (SOD, GST – glutation-S-transzferáz, KAT - kataláz) aktivitásának csökkenését és néhány biomarker molekula szintjének (ROS, MDA) emelkedését [79]. Egy másik gyűrűsféreg faj, az *Eisenia andrei* esetében pedig az antioxidáns rendszer működési zavaráról, viselkedési változásról és a kokonok számának csökkenésében megnyilvánuló reprodukciós zavarról számoltak be a kutatók, mely változások szintén az oxidatív stressz káros hatásaira vezethetők vissza [80]. Az acetamiprid zebradánio embriókra kifejtett hatását termékenyítés után vizsgálták 6-120 órával, mely kísérletben bebizonyosodott fejlődési toxicitása és teratogén hatása [81].

Az emlős szervezetekre kifejtett negatív hatások vizsgálata során patkányokban az acetamiprid magasabb dózisa testsúly-gyarapodás csökkenést, relatív májtömeg és májenzim aktivitás (AST, ALT, ALP, LDH) emelkedést, vörösvértest és hemoglobin szint csökkenést, fehérvérsejtszám és vérlemezke szám emelkedést, illetve a SOD és KAT enzimek aktivitásának csökkenését okozta [82]. Hematológiai és biokémiai változások mellett az acetamiprid reprodukív rendszerre kifejtett negatív hatásaival különböző állatfajokban több kutatás

foglalkozik. Hím egerek testsúlyának csökkenésén túl a tesztoszteron rezponzív szervek (here, mellékhere, ondóhólyag, prosztata) tömegének csökkenését, a szérumban tesztoszteron szint és a spermaszám csökkenését, a spermiumok életképességének és mobilitásának romlását okozza az acetamiprid, mely hatásokat oxidatív stressz indukálásával fejt ki, így a herékben emelkedik az MDA koncentrációja, illetve csökken a KAT, GPx, és a SOD aktivitása is [83]. Egér magzatok neuronális fejlődését vizsgáló kutatásban kimutatták, hogy a krónikus dózissal acetamipridnek kitett vemhes egér utódainak neocortexében abnormális neuronális eloszlás figyelhető meg [84]. Az acetamiprid patkányok tanulási képességeire kifejtett hatásainak vizsgálata során rendellenes tanulási képességet és memóriazavart figyeltek meg egy másik kutatásban, mely jellegű viselkedési rendellenesség méhek esetében is kimutatható [85].

A fenti megállapításokat figyelembe véve a jövőben az acetamiprid oxidatív stresszt jelentő hatásainak behatóbb vizsgálatára további, több időpontban is történő mintavételezésre, más koncentrációk alkalmazására, valamint egyéb, a redox-rendszer működésében fontos szerepet betöltő faktorok meghatározására lehet szükség az általunk újonnan kidolgozott modellrendszeren annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a méhek agyában bekövetkező károsodásokról, valamint a folyamat pontos lefutásáról.

A kurkumint gyulladáscsökkentő, antioxidáns és anti-apoptotikus hatásai miatt évszázadok óta használják a hagyományos orvoslásban, melyen belül neuroprotektív hatásainak beható vizsgálata szintén ígéretes terület lehet a későbbiek folyamán. Jelen kutatásunk során a méhek idegrendszeri oxidatív stresszben nyújtott protektív hatását vizsgáltuk biztató eredményekkel. Habár az agy a test tömegének csak 2%-át teszi ki, a szervezet egész oxigén fogyasztásának 20%-át igényli. Az intenzív metabolizmus miatt az agy oxigén szükséglete magasabb, melyből következően a ROS szintek is tipikusan magasabbak, illetve a GSH koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb. Ez az egyik fő oka annak, hogy a központi idegrendszer sejtjei fokozottan érzékenyek az oxidatív stresszre, valamint az abból következő fehérjekárosodásra és lipidperoxidációs folyamatokra. Amennyiben az antioxidáns rendszer kapacitása kimerül, és nem tudja megvédeni a fehérjét, azok oxidálódnak és úgynevezett protofibrillumok keletkeznek. Ezek a protofibrillumok az agysejtek citoplazmájában felhalmozódnak és aggregálódnak, illetve mivel toxikus vegyületek, a sejt védelmi reakciója a protofibrillumok elszigetelését szolgáló zárványtest képzés, mely zárványtestek a neurodegeneratív betegségek prekurzorai [86]. Neurodegeneratív betegségek és az öregedés tanulmányozásában betöltött szerepének vizsgálata során a kurkumin egy kutatásban szignifikánsan csökkentette az MDA és a protein karbonilok szintjét, illetve növelte a SOD és GPx enzimek aktivitását [87]. Egy patkányokon végzett kísérletben, melynek során laminektómiát hajtottak végre az állatokon,

majd a kurkumin gerincevelősérülést követő antioxidáns hatását vizsgálták, és az MDA szintjében való csökkenést, illetve a SOD enzim aktivitásában bekövetkező emelkedést figyeltek meg, így megerősítették a feltevést, hogy a kurkumin számos szempontból kedvezőbb alternatívát jelenthetnek az idegrendszeri sérülések gyógyulásának támogatásában a kortikoszteroidoknál [88]. Az Alzheimer kórt vizsgálva, mely betegség fő jellemzője az extracellulárisan felhalmozódott rendellenes térszerkezetű és aggregátumot képző amiloid- β ($A\beta$) fehérje, a kurkumin ígéretes vegyületnek bizonyult a toxicitás csökkentésében, ezzel növelve az állatok élettartamát és aktivitását is *Drosophila* fajban [89]. Fontos azonban megjegyezni, hogy a legfrissebb tudományos állásfoglalások szerint az amiloid- β elméletet számos kérdőjel övezi, így a kurkumin protektív hatásainak alátámasztása ebből a szempontból egyelőre hiányosnak tekinthető. Egy másik patkányokon végzett kutatásban szintén a kurkumin Alzheimer-kór esetében megfigyelhető hatásait vizsgálták, melynek során a kórképhez hasonló állapotot $AlCl_3$ kezeléssel érték el. A kurkumin mellett szóló érvek a kór kezelésében antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásain túl, az emésztőszervi traktusban való ellenállása, melynek hatására nem bomlik le mielőtt felszívódhatna, illetve a vér-agy gáton való átjutása, így a központi idegrendszerben direkt ki tudja fejteni hatását [90].

Kísérletünkben a H_2O_2 koncentrációja az acetamipriddel kezelt csoporthoz képest az acetamipriddel és kurkumin különböző dózisaival együtt kezelt csoportokban szignifikánsan csökkent, bizonyítva a kurkumin protektív, antioxidáns hatását. Egy szintén méheken végzett kutatás szerint a kurkuminnal kezelt csoportban a méhek élettartama lényegesen hosszabb volt, mely szintén összefüggésben állhat annak antioxidáns hatásaival. Ezen kívül a kurkumin növelte a SOD, GPx, KAT, GST antioxidáns védekezési rendszer részét képező enzimek aktivitását, mely folyamat következtében biztosítja a szervezet hatékonyabb védekezését az oxidatív stresszt keltő faktorokkal szemben, bár fontos megjegyezni, hogy e vizsgálatokban nem a kurkumin központi idegrendszerre gyakorolt hatásait vizsgálták, hanem hemolimfa felhasználásával történtek meg a mérések. A fentiekkel összhangban nagy valószínűséggel esetünkben is e folyamatok állhatnak az antioxidáns védelmi rendszer aktiválódásának hátterében, ami az acetamipridnek való kitettség ellenére is biztosította a H_2O_2 koncentrációjának normalizálódását, így pedig az oxidatív stressz mérséklése révén neuroprotektív hatással is bírhat acetamiprid toxikózis esetén [91].

Az MDA kapcsán méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az acetamiprid-kurkumin kombinációs kezelések szignifikánsan csökkentették annak koncentrációját. Több kutatás is alátámasztotta, hogy az MDA szintjének nyomonkövetése az agyi sérülések, ischaemia és egyéb, például toxikus behatásra létrejövő központi idegrendszeri membránkárosodás

megbízható markere [92]. Ennek megfelelően az esetünkben megfigyelt MDA csökkenés egyértelműen alátámasztja a kurkumin idegrendszerre gyakorolt protektív hatásait az általunk alkalmazott modellrendszerben. Továbbá, egy *Drosophila* fajban végzett kutatásban a kurkumin kiegészítés hatásait vizsgálták a muslicák élettartamára, mely kísérletben bebizonyosodott, hogy a kezelés során mindkét nemben emelkedett az élettartam a kontroll csoporthoz viszonyítva, szignifikánsan csökkent az MDA szintje és emelkedett a SOD aktivitása, mely eredmények hozzájárulnak a kurkumin öregedés elleni hatásának alaposabb megértéséhez, valamint szintén megerősítik a feltevést feltevéshez, hogy a kurkumin jótékony hatásai jelentős részben annak antioxidáns hatásaival vannak összefüggésben [93].

A glutation rendszer állapotát tekintve eredményeink alapján a kurkuminnal történő kezelés nem tudta teljes hatékonysággal ellensúlyozni az acetamiprid káros hatásait. A GSH-GSSG aránya eltolódásából következtethetünk az oxidatív stressz mértékére, amennyiben a GSSG koncentrációja emelkedett és a GSH koncentrációja csökkent, úgy az oxidatív stressz fokozott mértékben van jelen. Míg a GSSG mennyiségében szignifikáns csökkenés tapasztalható a neonicotinoiddal kezelt csoporthoz viszonyítva, a GSH esetében e pozitív hatás nem megfigyelhető. A GSH-GSSG szintekben elsőre látszólagos ellentmondás tapasztalható, melynek oka előzetes ismereteink és egyes irodalmi adatok alapján valószínűleg a kezelések során bekövetkezett úgynevezett konjugátum képződésben kereshető. Egy Caco-1 sejtvonalon (*colorectal adenocarcinoma cells*) glutation és kurkumin kölcsönhatását vizsgáló kutatásban megfigyelték, hogy GST hatására a glutation és kurkumin kémiai és enzimatikusan is konjugálódhat, mely reakcióban 2 molekula monoglutationil-kurkumin keletkezik, melyek egymás diasztereomerei. E folyamat során az eredeti szerkezet megváltozásával a glutation redox homeosztázis fenntartásában betöltött szerepe is megváltozhat, valamint a keletkezett konjugátumok az általunk is bemutatott kolorimetriás tesztekkel nem minden esetben kimutathatóak. Ennek értelmében tehát jelen kutatásunkban is lehet ez a konjugátum képződés a glutation-szint várttól kissé eltérő változásának oka, mivel kurkumin jelenlétében a GSH-val képzett konjugátumok valóban megváltoztatják a glutation és kurkumin biológiai elérhetőségét. Tehát az általunk előzetesen várt változásoktól való eltérés nem feltétlenül jelzi a glutation rendszer kimerülését, azonban az összefüggés kielégítő tisztázására a jövőben további kutatások, valamint más kimutatási tesztek lehetnek szükségesek [94].

Egy lengyel kutatócsoport eredményei alapján az orálisan alkalmazott kurkumin nagymértékben növelte a SOD, GPx, KAT, GST antioxidáns védekezési rendszer részét képező enzimek aktivitását házi méhek hemolimfájában. A GST a korábban említett Caco-1 sejtvonalon leírt konjugátum képződés katalizálása által csökkenti GSH koncentrációját a

sejtekben, illetve a GPx enzim fokozott aktivitása is serkenti a GSH-GSSG átalakulást, hozzájárulva a glutation szintjének csökkenéséhez, mely tényezők magyarázatul szolgálhatnak a kísérletünkben kapott eredményeknek is [91]. Az acetamiprid mint xenobiotikum tehát serkenti a GST enzim működését, mely egy fázis 2. detoxifikáló enzim, és ilyen módon a GSH-val történő biotranszformációs folyamat egy fázis 2. detoxifikáció. A xenobiotikum lehet az acetamipriden és bomlástermékein kívül egyéb anyag is, ami fontos tényező például az egy időben több peszticidnek való kitettség esetében. Összefoglalva tehát az acetamiprid GST serkentő hatása a fázis 2. lebontó folyamat révén csökkenti a GSH elérhetőségét, mely szintén magyarázatot adhat a GSH szint csökkenésére a konjugátum képződés mellett [95].

Egy másik, patkányokon végzett kísérlet során immobilitás kiváltotta oxidatív stressz megjelenését vizsgálták az állatok agyában, májában és veséjében, mely során megfigyelték az MDA szint emelkedését, a SOD, a GPx, a GR (glutation reduktáz) és KAT enzimek aktivitásának csökkenését, és a kurkumin protektív hatásának kialakulását az oxidatív stressz csökkenésén keresztül [96]. További vizsgálatok humán májbetegségek esetében alkalmazott kurkumin védő hatásával foglalkoztak, mely során megfigyelhető volt, hogy a vegyület szuppresszálja a proinflammatorikus citokineket és a lipidperoxidációs termékek kialakulását, illetve direkt gyökfogó hatásán túl indirekt védelmet is biztosít a sejtek enzimatisz folyamatainak javításával (SOD, KAT, GPx, GSH, GR aktivitás növelés révén) [97]. A kurkumin vesevédő hatását az Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2) transzkripciósi faktor indukálásával éri el, mely az antioxidáns válasz fő regulátora, így a mitokondriumok védelmét elősegítve segít megszüntetni az oxidatív stresszt [98]. Patkányokban adenin indukált krónikus vesebetegség esetében a kurkumin csökkentette a gyulladás, az oxidatív stressz és az apoptózis mértékét szintén a Nrf2 transzkripciósi faktor működésén keresztül. A kurkumin rákellenes hatásainak vizsgálatával több kutatás is foglalkozott. Különböző típusú ráksejtek (például hasnyálmirigy-rák, mellrák, prosztataraák) kurkuminnal való kezelését követően megállapították, hogy a kurkumin hatását különböző jelátviteli útvonalak befolyásolásával éri el, melyek részt vesznek a rákos sejtek fejlődésében és proliferációjában. Ide sorolható többek között különböző gyulladásos citokinek termelődésének módosítása, proapoptotikus transzkripciósi faktorok upregulációja, és antiapoptotikus transzkripciósi faktorok downregulációja [99]. Egy másik daganatos sejtvonalon végzett kutatás szerint a kurkumin apoptotikus hatását a ROS szint emelésével és a GSH szintjének csökkentésével éri el, tehát a redox rendszer befolyásolásával. A kurkumin a kísérletben a TNF (tumor nekrosis faktor) mediált NF- κ B aktivitását gátolta, így érve el rákellenes hatását. 2 és 4 óra inkubációt követően a sejtekben kurkumin hatására szignifikánsan csökkent a GSH szintje, míg 16 és 24 óra inkubációt követően emelkedett a GSH

szint. Kutatási eredmények alapján nem világos, hogy mitől függ a kurkumin antioxidáns vagy éppen prooxidáns tulajdonsága, egy elképzelés szerint alacsony koncentrációban alkalmazva antioxidáns hatást érhetünk el vele, míg magasabb dózisban adva prooxidáns, azaz egyben apoptotikus hatású is. E kérdés tisztázására és a jövőben alkalmazható dózisok meghatározására további kutatások szükségesek mind házi méhekben, mind más állatfajokban, vagy emberben [100].

A fentieknek megfelelően a kurkumin nagyon ígéretes és hatékony takarmánykiegészítőként szolgálhat a méhek központi idegrendszerére káros hatással bíró peszticidekkel, így például a neonikotinoidokkal szemben. Kutatásunk újszerű és nagy jelentőséggel bíró eredményekkel szolgálhat a méhek védelme szempontjából, mivel napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a modern mezőgazdaságban széleskörben alkalmazott peszticidek káros hatásaival, valamint a jövőben hatékonyan alkalmazható protektív anyagokkal és takarmánykiegészítőkkel kapcsolatos vizsgálatok. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy kutatásunkban a H_2O_2 , az MDA és a glutation koncentrációjának mérése révén sikeresen vizsgáltuk az acetamiprid, az agydúc redox-homeosztázisára gyakorolt káros hatásait. Rávilágítottunk továbbá arra, hogy a kurkumin számos jótékony hatása mellett nagymértékben enyhítette az acetamiprid kitettség hatására bekövetkező központi idegrendszerbeli oxidatív stressz káros hatásait házi méhekben, mely megfigyelések elsőként általunk kerültek leírásra. Fontos megjegyezni azonban, hogy a munkánk során felmerülő újabb tudományos és módszertani kérdések tisztázása, valamint az alkalmazott anyagok pontos sejtszintű hatásainak felderítése érdekében a későbbiek folyamán további kutatások elvégzése szükséges. E jövőbeni vizsgálatok méhegészségügyi, ökológiai és nemzetgazdasági szempontból is kiemelt jelentőséggel bírhatnak.

Összefoglalás

A méhek számának drasztikus csökkenése világszerte súlyos problémát jelent az utóbbi évtizedekben. A méhek beporzó tevékenysége mind mezőgazdasági szempontból, mind annak ökológiai jelentőségét figyelembe véve felbecsülhetetlen. A gyakorlati és finansziális tényezőkön túl a társadalom erkölcsi felelőssége az élővilág diverzitásának védelme, az emberi tevékenység negatív hatásainak minimalizálása. Napjainkban a méhcsaládok számának csökkenése háttérben egyre gyakrabban az úgynevezett kolónia-összeomlás kórkép áll, mely számos tényező együttes hatása révén következhet be. A kórkép kialakulásában szerepet játszhatnak többek között paraziták, patogén baktériumok vagy más kórokozók, egyéb stresszhatások, valamint mindezek mellett a növényvédő szerek alkalmazása által okozott hatások is kiemelt szereppel bírhatnak. A neonikotinoid inszekticidek napjaink intenzív termelésű mezőgazdaságának kulcsfontosságú vegyületei, melyek közül az acetamiprid széles körben és biztonságosan alkalmazható szernek bizonyult, azonban szubletális hatásainak tanulmányozására, különösen házi méhek esetében, további kutatások szükségesek.

Kísérleteink célja az acetamiprid méhek idegrendszerének redox-homeosztázisára kifejtett hatásainak vizsgálata volt, mely vegyület ezáltal befolyást gyakorolhat az állatok táplálkozási szokásaira, viselkedésére, szaporodására, valamint elősegítheti egyes betegségek megjelenését és hozzájárulhat a kolónia-összeomlás kórkép kialakulásához is.

A kísérletben a méheket 50-50 egyedet tartalmazó kezelési csoportokra osztottuk, majd az állatokat az etetőoldatukba kevert acetamipriddel (35,5 mg/L), kurkuminnal (11, és 110 mg/L), vagy ezek kombinációjával kezeltük. A 48 órán át tartó kezelés után a méhek agydúcának kiboncolását és a homogenizálást követően a mintákat a mérések elvégzéséig -80°C-on tároltuk.

Kísérletünkben az oxidatív stressz mértékét hidrogén-peroxid (H_2O_2), malondialdehid (MDA), redukált glutation (GSH), valamint az oxidált glutation (GSSG) koncentrációjának meghatározásával vizsgáltuk. Tanulmányoztuk továbbá a kurkumin, mint antioxidáns vegyület protektív hatását önállóan és acetamipriddel való kezeléssel kombinálva.

Eredményeink alapján a vizsgált minták H_2O_2 koncentrációja szignifikánsan emelkedett acetamiprid hatására, és ehhez képest szignifikánsan csökkent a kurkuminnal való együttes kezelés következtében. Szintén csökkenést figyeltünk meg az MDA szintjében kurkumin hatására, valamint mind az acetamiprid, mind a kurkumin jelentősen befolyásolta a glutation rendszer működését.

Összességében kijelenthetjük, hogy az acetamiprid egyértelműen károsította a központi idegrendszer antioxidáns védelmi rendszerét házi méhekben, mely káros hatásokat a kurkumin nagymértékben enyhítette, így a jövőben ígéretes jelölt lehet a neonikotinoidoknak való kitettség hatásainak mérséklésében, mely eredmények mind méhegészségügyi, mind ökológiai szempontból is kiemelt jelentőséggel bírhatnak.

Summary

The drastic decline in honey bee numbers has become a serious problem in recent decades worldwide. Bee pollination is invaluable both from an agricultural point of view and in terms of its ecological importance. Beyond the practical and financial factors, society has a moral responsibility to protect biodiversity, minimise the negative impact of human activity and ensure the survival of species. Nowadays, the decline in the number of bee colonies is increasing due to the so-called colony collapse disorder, which can be caused by a combination of various factors. Parasites, pathogens, other stress factors and the use of pesticides can all play a role in the development of the phenomenon. The neonicotinoid insecticides are key compounds in today's intensive agriculture, of which acetamiprid has been shown to be a widely and safely used agent, however, further research is necessary to study its sub-lethal effects, especially in domestic bees.

The aim of our experiments was to investigate the effects of acetamiprid on the redox homeostasis of the bee central nervous system, which may consequently affect the animals' feeding habits, behaviour, reproduction, and may also contribute to the development of certain diseases and colony collapse disorder.

In the experiment, bees were divided into treatment groups of 50-50 individuals and treated with acetamiprid (35.5 mg/L), curcumin (11 and 110 mg/L) or a combination of these mixed into their feeding solution. After 48 hours of treatment, the samples were stored at -80°C until measurements were performed, after dissection of the bees' braincells and homogenization.

In our experiments we investigated the extent of oxidative stress by determining the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) concentration. We also investigated the protective effect of curcumin as an antioxidant compound alone and in combination with acetamiprid treatment.

Our results showed that H₂O₂ levels were significantly increased by acetamiprid and significantly decreased by curcumin as a protective treatment. We also observed a decrease in MDA levels following curcumin treatment, and both acetamiprid and curcumin significantly affected the function of the glutathione system.

Overall, we can conclude that acetamiprid clearly impaired the central nervous system antioxidant defence mechanism in honey bees, which adverse effects were largely attenuated by curcumin, making it a promising candidate for mitigating the effects of neonicotinoid exposure in the future, with results that may be of particular importance from both bee health and ecological perspective.

Irodalomjegyzék:

- [1] Fairbrother A, Purdy J, Anderson T, Fell R (2014) Risks of Neonicotinoid Insecticides to Honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 33, No. 4, 719-731 DOI: 10.1002/etc.2527
- [2] Hung KJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR (2018) The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. Biol. Sci.*, 285 (1870) (2018), pp. 1-8
- [3] Patel V, Pauli N, Biggs E, Barbour L, Boruff B (2020) Why bees are critical for achieving sustainable development. *Ambio* 2021, 50:49–59 <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01333-9>
- [4] Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* 540: 220–229.
- [5] Johnson R (2010) Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Congressional Research Service* 7-5700 www.crs.gov RL33938
- [6] Dainat B, vanEngelsdorp D, Neumann P (2012) Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports* (2012) 4(1), 123–125 doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x
- [7] Watson K, Stallins J A (2016) Honey Bees and Colony Collapse Disorder: A Pluralistic Reframing. *Geography Compass* 10/5 (2016): 222–236, 10.1111/gec3.12266
- [8] Beard J (2006) DDT and human health. *Science of The Total Environment Volume 355, Issues 1–3, 15 February 2006, Pages 78-89* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.02.022>
- [9] Van Dyk JC, Bouwman H, Barnhoorn IEJ, Bornman MS (2010) DDT contamination from indoor residual spraying for malaria control. *Science of The Total Environment Volume 408, Issue 13, 1 June 2010, Pages 2745-2752* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.002>
- [10] Wang X, Anadón A, Wu Q et al (2018) Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 58:471–507. <https://doi.org/10.1146/annur-ev-pharmtox-010617-052429>
- [11] Kluser S, Neumann P, Chauzat M-P, Pettis JS (2010) UNEP emerging issues: Global honey bee colony disorder and other threats to insect pollinators. United Nations Environment Program, Nairobi, Kenya.
- [12] Blacquiere T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21:973–992
- [13] Cresswell JE (2011) A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20:149–157.
- [14] Doublet V, Labarussias M, de Miranda J R, Moritz R F A, Paxton R J (2014) Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology* Volume 17, Issue 4 p. 969-983 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- [15] Gregorc A, Ellis JD (2011) Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pest Biochem Physiol* 99:200–207
- [16] Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M (2007) The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods *Annual Review of Entomology* Vol. 52:81-106 (Volume publication date 7 January 2007) <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- [17] van der Sluijs J P, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin J M, Belzunces L P (2013) Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2013, 5:293–305 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2013.05.007>
- [18] Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP (2004) A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* 47:387–395
- [19] Thany S H, Bourdin C M, Graton J, Laurent A D, Mathé-Allainmat M, Lebreton J, Le Questel J-Y (2015) Similar Comparative Low and High Doses of Deltamethrin and Acetamiprid Differently Impair the Retrieval of the Proboscis Extension Reflex in the Forager Honey Bee (*Apis mellifera*). *Insects* 2015, 6, 805-814; doi:10.3390/insects6040805
- [20] Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Adv Exp Med Biol* 2010;683:85-95 doi: 10.1007/978-1-4419-6445-8_8
- [21] Fischer J, Müller T, Spatz A-K, Greggers U, Grünewald B, Menzel R (2014) Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees. *PLoS ONE* 9(3): e91364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091364>
- [22] Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP (2005) In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Pest Manage Sci* 61:742–748

- [23] Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protect* 23:371–378
- [24] Shi J, Liao C, Wang Z, Zeng Z, Wu X (2019) Effects of sublethal acetamiprid doses on the lifespan and memory-related characteristics of honey bee (*Apis mellifera*) workers *Apidologie* (2019) 50:553–563
- [25] El Hassani A K, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C (2007) Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*) *Arch Environ Contam Toxicol* (2008) 54:653–661 DOI 10.1007/s00244-007-9071-8
- [26] Shi J, Yang H, Yu L, Liao C, Liu Y, Jin M, Yan W, Wu X B (2020) Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers *Science of The Total Environment* Volume 738, 10 October 2020, 139924
- [27] Shi J, Zhang R, Pei Y, Liao C, Wu X (2020) Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults *Environmental Pollution*. 2020 266 (Pt 2) :115345.
- [28] Li Z, Yu T, Chen Y, Heerman M, He J, Huang J, Nie H, Su S (2019). Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pesticide biochemistry and physiology*, 156, 36-43.
- [29] Rueppell O, Yousefi B, Collazo J, Smith D (2017). Early life stress affects mortality rate more than social behavior, gene expression or oxidative damage in honey bee workers. *Experimental gerontology*, 90, 19-25.
- [30] Yang W, Carmichael SL, Roberts EM, Kegley SE, Padula AM, English PB, Shaw GM (2014) Residential agricultural pesticide exposures and risk of neural tube defects and orofacial clefts among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Am. J. Epidemiol.* 179, 740e748.
- [31] Keil AP, Daniels JL, Hertz-Picciotto I (2014) Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Environ. Health* 13, 3.
- [32] Carmichael SL, Yang W, Roberts E, Kegley SE, Padula AM, English PB, Lammer EJ, Shaw GM (2014) Residential agricultural pesticide exposures and risk of selected congenital heart defects among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Environ. Res.* 135, 133e138.
- [33] Kapoor U, Srivastava MK., Srivastava LP (2011) Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49, 3086e3089.
- [34] Bal R, Turk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Kuloglu T, Baydas G, Naziroglu M, Yener Z, Etem E, Tuzcu Z (2013) Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. *Drug Chem. Toxicol.* 36, 421e429.
- [35] Toor HK, Sangha GK, Khera KS (2013) Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide Biochem. Physiol.* 105, 1e4.
- [36] Ozdemir HH, Kara M, Yumrutas O, Uckardes F, Eraslan E, Demir CF, Bal R (2014) Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models. *Cogn. Neurodyn.* 8, 411e416.
- [37] Lonare M, Kumar M, Raut S, Badgujar P, Doltade S, Telang A (2014) Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochem. Int.* 78, 122e129.
- [38] Stivaktakis PD, Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Panagiotakis MN, Fragkiadaki P, Vakonaki E, Ozcagli E, Hayes WA, Rakitskii VN, Tsatsakis AM (2016) Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. *Chemosphere* 149, 108e113.
- [39] Sekeroglu V, Sekeroglu ZA, Kefelioglu H (2013) Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environ. Toxicol.* 28, 524e531.
- [40] Kataria SK, Chhillar AK, Kumar A, Tomar M, Malik V (2016) Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. *Drug Chem. Toxicol.* 39, 59e65.
- [41] Galdikova M, Sivikova K, Holeckova B, Dianovsky J, Drazovska M, Schwarzbacherova V (2015) The effect of thiacloprid formulation on DNA/ chromosome damage and changes in GST activity in bovine peripheral lymphocytes. *J. Environ. Sci. Health. Part. B Pesticides Food Contam. Agric. Wastes* 50, 698e707.
- [42] Kocaman AY, Rencuzogullari E, Topaktas M (2014) In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Toxicol.* 29, 631e641.
- [43] Han W, Tian Y, Shen X (2018) Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview *Chemosphere* 2018 Feb;192:59-65. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.149. Epub 2017 Oct 27.

- [44] Yang C, Lim W, Song G (2021) Mechanisms of deleterious effects of some pesticide exposure on pigs *Pesticide Biochemistry and Physiology* 175 (2021) 104850 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104850>
- [45] Sies H, Jones DP (2007) Oxidative stress. In *Encyclopedia of Stress*, Vol. 3, ed. G Fink, pp. 45–48. Amsterdam: Elsevier. 2nd ed.
- [46] Selye H. (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 115:53–56
- [47] Ore S (1956) Oxidative stress relaxation of natural rubber vulcanized with di-tertiary-butyl peroxide. *Rubber Chem. Technol.* 29:1043–46
- [48] Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. B* 311:617–31
- [49] Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative Stress *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86:715–48
- [50] Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem.* 64, 97–112.
- [51] Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2017). First line defence antioxidants- superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med*, <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- [52] Góth, L., Rass, P., Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn.* 8, 141–149.
- [53] Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48, 909–930.
- [54] Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., et al. (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest.* 119, 2074.
- [55] Uchida K (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*, 28 (2000), pp. 1685-1696
- [56] Del Rio D, Stewart A J, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2005) 15, 316-328
- [57] Xu X, Wang X, Yang Y, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, Anadón A, Martinez MA. (2022) Neonicotinoids: mechanisms of systemic toxicity based on oxidative stress-mitochondrial damage. *Arch Toxicol.* 2022 Jun;96(6):1493-1520. doi: 10.1007/s00204-022-03267-5. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35344072.
- [58] Martelli F, Zhongyuan Z, Wang J et al (2020) Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 117(41):25840–25850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011828117>
- [59] Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- [60] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- [61] Friol PS, Catae AF, Tavares DA, Malaspina O, Roat TC (2017) Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? *Chemosphere* 185:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.113>
- [62] Tang D, Wei F, Khan A, Munsif F, Zhou R (2021) Degradation of mitochondrial structure and deficiency of complex I were associated with the transgenic CMS of rice. *Biol Res* 54(1):6. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00326-y>
- [63] Bizerra PFV, Guimarães ARJS, Maioli MA, Mingatto FE (2018) Imidacloprid affects rat liver mitochondrial bioenergetics by inhibiting -FoF1-ATP synthase activity. *J Toxicol Environ Health A* 81(8):229–239.
- [64] Nareshkumar B, Akbar SM, Sharma HC, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K (2018) Imidacloprid impedes mitochondrial function and induces oxidative stress in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* larvae (Hubner: Noctuidae). *J Bioenerg Biomembr* 50(1):21–32. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9739-3>
- [65] Lu C, Chang CH, Lemos B, Zhang Q, MacIntosh D (2020) Mitochondrial dysfunction: a plausible pathway for honeybee colony collapse disorder (CCD). *Environ Sci Technol Lett* 7(4):254–258. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00070>
- [66] Annabi A, Dhouib IB, Lamine AJ et al (2015) Recovery by N-acetylcysteine from subchronic exposure to imidacloprid-induced hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis tissues injury in male rats. *Toxicol Mech Method* 25(7):524–531.

- [67] Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* 480–481, 243–268.
- [68] Mendonca LM, Dos Santos GC, Antonucci GA, Dos Santos AC, Bianchi Mde L, Antunes LM (2009) Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. *Mutat. Res.* 675, 29–34.
- [69] Dhoubib IB, Annabi A, Doghri R et al (2017) Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological, and behavioral changes. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(35):27515–27524. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0331-5>
- [70] Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE, Natsopoulou ME, Neumann P, Oliver R, Paxton RJ, Pernal SF, Shutler D, Tanner G, van der Steen JJM, Brodschneider R (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* Volume 52, 2013 - Issue 1: The COLOSS BEEBOOK Part 1
- [71] Paleolog J, Wilde J, Siuda M, Bąk B, Wójcik Ł, Strachecka A (2020). Imidacloprid markedly affects hemolymph proteolysis, biomarkers, DNA global methylation, and the cuticle proteolytic layer in western honeybees. *Apidologie*, 51(4), 620-630.
- [72] Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delègue MH (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2005 Feb;48(2):242-50. doi: 10.1007/s00244-003-0262-7. Epub 2005 Feb 15.
- [73] Han W, Yang Y, Gao J, Zhao D, Ren C, Wang S, Zhao S, Zhong Y (2019) Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined *Ecotoxicology* (2019) 28:399–411 <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02030-4>
- [74] Chen L, Yan Q, Zhang J, Yuan S, Liua X (2019) Joint Toxicity of Acetamiprid and Co-Applied Pesticide Adjuvants on Honeybees under Semifield and Laboratory Conditions *Environmental Toxicology and Chemistry—Volume 38, Number 9—pp. 1940–1946, 2019*
- [75] Gasmi S, Kebieche M, Rouabhi R, Touahria C, Lahouel A, Lakroun Z, Henine S, Soulimani R (2017) Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid. *Environ Sci Pollut Res* 24, 22258–22264 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9901-9>
- [76] Guo W, Yang Y, Zhou X, Ming R, Hu D, Lu P (2022) Insight into the toxic effects, bioconcentration and oxidative stress of acetamiprid on *Rana nigromaculata* tadpoles *Chemosphere* 305 (2022) 135380
- [77] Tualeka AR, Martiana T, Ahsan A, Russeng SS, Meidikayanti W (2019) Association between Malondialdehyde and Glutathione (L-gamma-Glutamyl-Cysteinyl-Glycine/GSH) Levels on Workers Exposed to Benzene in Indonesia Open Access Maced J Med Sci. 2019 Apr 15; 7(7): 1198–1202
- [78] Lu Z, Ye W, Feng P, Dai M, Bian D, Ren Y, Zhu Q, Mao T, Su W, Lu F, Sum H, Wei J, Li B (2021) Low concentration acetamiprid-induced oxidative stress hinders the growth and development of silkworm posterior silk glands *Pesticide Biochemistry and Physiology* 174 (2021) 104824
- [79] Li B, Xia X, Wang J, Zhu L, Wang J, Wang G (2018) Evaluation of acetamiprid-induced genotoxic and oxidative responses in *Eisenia fetida* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161 (2018) 610–615
- [80] Saggiaro EM, Gundes do Espírito Santo D, Júnior SFS, Davis RAH, Correia FV (2019) Lethal and sublethal effects of acetamiprid on *Eisenia andrei*: Behavior, reproduction, cytotoxicity and oxidative stress *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183 (2019) 109572
- [81] Ma X, Li H, Xiong J, Mehler WT, You J (2019) Developmental Toxicity of a Neonicotinoid Insecticide, Acetamiprid to Zebrafish *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 2429–2436
- [82] Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E, Neffati F, Bhouri R, Sallem A, Najjar MF, Hassine M, Mehdi M, Haouas Z, Cheikh HB (2016) Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats *Environ Sci Pollut Res* (2016) 23:25191–25199 DOI 10.1007/s11356-016-7650-9
- [83] Zhang J-j, Wang Y, Xiang H-y, Li M-x, Li W-h, Ma Kai-ge, Wang X-z, Zhang J-h (2011) Oxidative Stress: Role in Acetamiprid-Induced Impairment of the Male Mice Reproductive System *Agricultural Sciences in China* 2011, 10(5): 786-796
- [84] Kagawa N, Nagao T (2018) Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to acetamiprid *J Appl Toxicol.* 2018;38:1521–1528.
- [85] Mandal PS, Mondal S, Karnam SS, Purohit K (2015) A behavioral study of learning and memory in adult sprague dawley rat in induced acetamiprid toxicity *Explor Anim Med Res*, Vol.5, Issue - 1, 2015, p. 27-32

- [86] Yulianti AB, Sumarsono SH, Ridwan A, Yusuf AT Protofibril formation: decreased total glutathione concentration as an early indicator of neuron damage in the brainstems of Wistar rats treated with rotenone [version 1; peer review: 2 approved with reservations] F1000Research 2021, 10:1158 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.73777.1>)
- [87] Abrahams S, Haylett WL, Johnson G, Carr JA, Bardien S (2019) Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review Neuroscience 406 (2019) 1–21
- [88] Şahin Kavaklı H, Koca C, Alici Ö (2011) Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery 2011;17 (1):14-18
- [89] Caesar I, Johnson M, Nilsson KPR, Thor S, Hammarström P (2012) Curcumin Promotes A-beta Fibrillation and Reduces Neurotoxicity in Transgenic Drosophila PLoS ONE 7(2): e31424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031424>
- [90] ELBini-Dhouib I, Doghri R, Ellefi A, Degrach I, Srairi-Abid N, Gati A (2021) Curcumin Attenuated Neurotoxicity in Sporadic Animal Model of Alzheimer's Disease Molecules 2021, 26, 3011. <https://doi.org/10.3390/molecules26103011>
- [91] Strachecka AJ, Olszewski K, Paleolog J (2015) Curcumin stimulates biochemical mechanisms of Apis mellifera resistance and extends the apian life-span J. APIC. SCI. Vol. 59 No. 1 2015
- [92] Zheng S, Zhu J, Li J, Zhang S, Ma Y (2019) Leonurine protects ischemia-induced brain injury via modulating SOD, MDA and GABA levels Front. Agr. Sci. Eng. 2019, 6(2): 197–205 <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018245>
- [93] Shen LR, Xiao F, Yuan P, Chen Y, Gao-Q-K, Parnell LD, Meydani M, Ordovas JM, Li D, Lai C-Q (2013) Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in Drosophila. AGE 35, 1133–1142 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9438-2>
- [94] Usta M, Wortelboer HM, Vervoort J, Boersma MG, Rietjens IMCM, van Bladeren PJ, Cnubben NHP (2007) Human Glutathione S-Transferase-Mediated Glutathione Conjugation of Curcumin and Efflux of These Conjugates in Caco-2 Cells Chem. Res. Toxicol. 2007, 20, 12, 1895–1902
- [95] Townsend D, Tew K (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene 22, 7369–7375 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- [96] Samarghandiana S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F (2017) Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney Biomedicine & Pharmacotherapy 87 (2017) 223–229
- [97] Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, Naseri R, Nabavi SM, Rahimi R, Abdollahi M (2018) Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective Nutrients 2018, 10, 855; doi:10.3390/nu10070855
- [98] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2013) Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings Redox Biology 1 (2013) 448–456
- [99] Giordano A, Tommonaro G (2019) Curcumin and cancer Nutrients 2019, 11(10), 2376; <https://doi.org/10.3390/nu11102376>
- [100] Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, Aggarwa BB (2007) Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane) Free Radical Biology and Medicine Volume 43, Issue 4, 15 August 2007, Pages 568-580

Köszönetnyilvánítás

E rövid sorokban köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni. Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mackei Máténak, hogy lelkes munkájával segített a kísérletek lebonyolításában, tanácsaival és megjegyzéseivel vezetett a dolgozat megírásához vezető úton, és motivációt nyújtott mindvégig. Ezen felül köszönöm Dr. Mátis Gábornak és Dr. Neogrády Zsuzsannának lektorálásukat, építő kritikájukat és biztató szavaikat. Köszönöm Dr. Bartha Tibor tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tett munkám megvalósulását. Köszönöm Pálincás Szilvinek, hogy segítségemre volt a mérések elvégzésében. Végül köszönöm szeretteimnek, hogy mellettem álltak munkám során.

Kutatásunkat az ÚNKP-20-3-II. sz. pályázat támogatásával végezzük,

*„Néha kialszik bennünk a fény, de aztán ismét felgyúl, ha találkozunk egy másik emberi
lénnel. Mindannyian óriási hálával tartozunk azoknak, akik képesek újból felgyújtani ezt a
belső fényt“ (Albert Schweitzer)*



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Huber Fanni Sára

Neptun-kódja: YLU94H

A témavezető neve és beosztása: Dr. Mackei Máté, egyetemi adjunktus

Tanszék: Élettani és Biokémiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: A kurkumin acetamipriddel szembeni védő hatásainak vizsgálata mézelő méhekben

Konzultáció - 1. félév

Időpont				Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021	10	06	Irodalmi háttér áttekintése	<i>[Signature]</i>
2.	2021	10	11	Irodalmi háttér feldolgozása	<i>[Signature]</i>
3.	2021	11	10	Mérések áttekintése	<i>[Signature]</i>
4.	2021	11	17	Labormérések végzése, eredmények megbeszélése	<i>[Signature]</i>
5.	2021	12	01	Labormérések végzése, eredmények megbeszélése	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

Időpont				Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	01	04	Labormérések végzése, eredmények megbeszélése	<i>[Signature]</i>
2.	2022	02	15	Eredmények prezentációjának megbeszélése, ábrák szerkesztése	<i>[Signature]</i>
3.	2022	03	01	Eredmények prezentációjának megbeszélése, ábrák szerkesztése	<i>[Signature]</i>
4.	2022	04	14	Szakedolgozat megírásával kapcsolatos konzultáció	<i>[Signature]</i>
5.	2022	05	10	Szakedolgozat megírásával kapcsolatos konzultáció	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

[Signature]
.....
témavezető aláírása

Hallgató aláírása: *[Signature]*
.....

Tanszéki előadó aláírása: *[Signature]* Átvétel dátuma: 2024. 11. 27.

NYILATKOZAT

Alulírott HUDER FANNI SÁRA..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe
A kurkumin acetanipriddel szembeni védő hatásainak vizsgálata
mézelő méhekben..... tartalmi és formai
szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián
szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2024. 11. 28......

H. F. S......

a hallgató neve és aláírása