



Állatorvostudományi Egyetem
Élettani és Biokémiai Tanszék
Biokémiai Osztály

A deltametrin és tebukonazol által okozott oxidatív
stressz vizsgálata mézelő méhek központi idegrendszerében

TDK dolgozat

Készítette: Oláh Barnabás

Témavezetők: Dr. Mackei Máté
tanszéki állatorvos
Dr. Mátis Gábor
egyetemi docens

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

<u>Tartalomjegyzék</u>	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés.....	4
A beporzók jelentősége az ökoszisztémában és az agráriumban	4
Célkitűzés	5
Irodalmi áttekintés	6
A mézelő méh (<i>Apis mellifera</i>) életmódjának rövid ismertetése	6
A kolóniaösszeomlás (Colony Collapse Disorder, CCD) kórkép és háttérbetegségei.....	7
Az oxidatív stressz és annak mérésére szolgáló paraméterek.....	9
Deltametrin	11
Tebukonazol.....	14
Anyag és módszer	17
Állatkísérleti fázis	17
Laboratóriumi mérések.....	19
Az összfehérje-koncentráció mérése	19
A redukált és oxidált glutation koncentráció mérése.....	19
A malondialdehid koncentráció mérése	19
A szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitás mérése	20
A Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimaktivitás mérése	20
Statisztikai elemzés	20
Eredmények.....	21
Redukált és oxidált glutation.....	21
Malondialdehid.....	22
Szuperoxid-dizmutáz	23
Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	24
Eredmények értékelése	25
Összefoglalás	29
Summary	30
Irodalomjegyzék	31
Köszönetnyilvánítás.....	40

Rövidítések jegyzéke

6PGD	= 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz
ALT	= alanin-aminotranszferáz
AST	= aszpartát-aminotranszferáz
CAT	= kataláz
CCD	= kolóniaösszeomlás kórkép
CYP450	= citokróm P450
DNS	= dezoxiribonukleinsav
DWV	= deformált szárny vírus
G6PD	= glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	= glutation peroxidáz
GSH	= glutation
GSSG	= glutation-diszulfid
LC ₅₀	= letális koncentráció 50
LD ₅₀	= letális dózis 50
LDL	= alacsony denzitású lipoprotein
MDA	= malondialdehid
NAD ⁺	= nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	= nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
RH	= relatív páratartalom
ROS	= reaktív oxigéngyökök/oxigénszármazékok
SOD	= szuperoxid-dizmutáz
TBARS	= tiobarbitursav reaktív anyagoknak
TG	= triglicerid
TL	= összes lipid
VLDL	= nagyon alacsony denzitású lipoprotein
XO	= xantinoxidáz

Bevezetés

A beporzók jelentősége az ökoszisztémában és az agráriumban

Napjaink egyik legégetőbb problémája a beporzó rovarok eltűnése, legyen szó akár a fajok diverzitásának, akár azok egyedszámának drasztikus csökkenéséről. Ez a komplex probléma olyan súlyos, ökológiai szempontból veszélyes tényezőkre vezethető vissza, mint például a globális felmelegedésből következő éghajlatváltozás és az ezzel járó élőhelyvesztés, a modern gazdálkodást kísérő rizikótényezők, mint a gyomirtók és nehézfémek túlzott mértékű alkalmazása, valamint az egyre terjedő pusztító betegségek [1].

Ökoszisztéma szolgáltatásoknak nevezzük azokat az emberi jólétet elősegítő tényezőket, melyek organizmusok kölcsönhatásaként jönnek létre és a legtöbb esetben nem, vagy csak hatalmas költségek árán lennének pótolhatók. Ide tartozik többek között a rovarok, vagy más állatfajok révén történő beporzás is [2]. Az aktuális becslések alapján elmondható, hogy az Európában termesztett növények 84%-a függ közvetlenül a rovarbeporzóktól, s ezen belül is kiemelt figyelmet érdemelnek a mézelő méhek (*Apis mellifera*) [3]. Más kutatások szintén azonos eredményekre jutottak, tovább színesítve a képet azzal, hogy a 108 vizsgált terményből csupán 7 nem mutatott termelésbeli növekedést rovarbeporzók jelenlétében, lévén, hogy ezek a növények kizárólag passzív- és szélmegporzás útján szaporodnak [4].

A fenti adatokból tisztán látható, hogy a megfelelő termelési mutatók elérése érdekében elengedhetetlen az agrárium számára a beporzók megléte. A meglévő tendenciák azt mutatják, hogy bár a beporzókat igénylő termények száma folyamatosan növekedett az elmúlt évtizedekben, a mézelő méhek beporzók között betöltött szerepe drasztikusan csökkent. Példaként, az Egyesült Királyságban a mézelő méhek által ellátott beporzó tevékenység mértéke az 1984-ben megállapított 70%-os csúcsról 2007-ben 34%-ra csökkent [5]. Ez némileg magyarázható a méhállomány egyedszámának és diverzitásának csökkenésével, ám fontos figyelembe venni a családok gyengülését és egészségük romlását is [6].

Célkitűzés

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a beporzók, ezen belül is a mézelő méhek szerepe mind a biodiverzitás megőrzése, mind pedig az agrárium hosszútávú fenntarthatósága szempontjából. A méhcsaládok számának folyamatos csökkenése, valamint az óriási gazdasági és ökológiai jelentőséggel bíró kolóniaösszeomlás kórkép (CCD) növekvő prevalenciája azonban egyre nagyobb aggodalomra ad okot, melyhez a természetes élőhelyek csökkenése, valamint a folyamatosan növekvő parazita és patogén terheltség mellett a növényvédőszeres széleskörű, intenzív használata is hozzájárul. Bár a rovar- és gombaölő szerek nem minden esetben kerülnek közvetlenül kapcsolatba a méhekkel, az, hogy szubletális mennyiségben milyen hatást gyakorolnak azok anyagcseréjére, még kevésbé ismert. A rovarok redox homeosztázisa az emlősökéhez képest kevésbé kutatott terület. Ennek megfelelően munkánk során a mézelő méhek központi idegrendszerében található különféle reprezentatív oxidatív paraméterek vizsgálatát tűztük ki célul, ideértve a malondialdehid (MDA) termelődését, a glutation védelmi rendszer állapotát, ennek részeként a redukált és oxidált glutation koncentrációjának arányát, valamint a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) aktivitását. Vizsgálni kívántuk továbbá a teljes antioxidáns kapacitásban bekövetkező esetleges változásokat is a szövetmintákban. A kutatás céljából választott két vegyület, a tebukonazol és deltametrin világszerte régóta, széleskörben használt hatóanyag-típusokba tartoznak, jól képviselve ezzel az azol típusú gombaellenes és a piretroid típusú rovarirtók csoportját. Mindkét anyag akut, szubletális dózisban került alkalmazásra, melynek mennyiségi meghatározásához más kutatások eredményei jelentették az alapot. A kutatás rávilágíthat a méhésztársadalmat foglalkoztató egyik legjelentősebb probléma hátterében álló okok közül az egyikre, közelebb kerülve ezzel a sikeres növényvédelemhez, mely a hatékonyságon kívül a nem célfajok védelmét is figyelembe veszi.

Irodalmi áttekintés

A mézelő méh (*Apis mellifera*) életmódjának rövid ismertetése

A mézelő méh, más néven nyugati vagy európai mézelő méh (*Apis mellifera*) rendszertani besorolása alapján a rovarok osztályán belül a hártáásszárnyúak rendjének tagja, annak részeként pedig a méhfélék családjába sorolható. A világ méhfajai közül a leggyakrabban előforduló, valamint az agrárium szempontjából a legjelentősebb szereppel bíró fajnak tekinthető [7]. Életmódját más méhfajokhoz hasonlóan euszocialitás, vagyis a szocialitás legmagasabb szintű szerveződése jellemzi, melynek során a kolóniát nagyrészt reprodukcióra nem képes nőtények vagy másnéven dolgozók, illetve az elsősorban szaporodási funkciókat betöltő, a dolgozókhoz képest elenyésző számban jelen lévő hímek, azaz herék alkotják. A méhcsalád élén egyetlen termékeny nőtény áll, melyet méhanyának nevezünk. A kolónia felépítését tekintve a mézelő méhek családjában is megtalálhatóak számos egyéb rokon fajhoz hasonló karakterisztikus jegyek, mint a dolgozók által közösen gondozott utódok, melyekre a méhek esetében fiasításként hivatkozunk, a felnőttek csoportján belül az egymást átfedő generációk és a különböző feladatok speciális megosztása az egyes kasztok között [8].

Más hártáásszárnyú fajokhoz hasonlóan az egyedfejlődés teljes átalakulással megy végbe, négy jól elkülöníthető szakasszal, melyek a pete, álca (lárva), báb és a kifejlett egyed. A petéket a méhanya helyezi el a lép méhsejtjeiben, melyet a gondozó feladattal ellátott dolgozók ápolnak, majd a kialakult álcát etetik és közel egy hét múlva befedik. Ekkor történik meg a bábozódás, majd ismét egy hét múlva az egyedek kifejlett méhként hagyják el a sejtet. Míg egyes lépsejtekből a fiasítás kap helyet, másokban pollent és mézet tárolnak, melyet szintén dolgozók tartanak rendben és fednek le [9]. A dolgozók élettartama jelentősen eltér az év során. Míg a tavasszal és nyáron kelt egyedek csupán pár, intenzív munkával eltöltött hetet élnek meg, az ősszel világra jöttek több hónapon keresztül a kolóniában maradnak a tél során. A herék nem telelnek át, a kolónia szempontjából csak tavasszal és nyáron van rájuk szükség. A méhanya ezzel szemben három-négy éven át is aktív maradhat, mielőtt a dolgozók leváltanák. Ebből is jól látszik, hogy bár a kolóniát alkotó egyedek egy év alatt többször is cserélődnek, a család éveken át fennmarad, így a méhekre szuperorganizmusként tekinthetünk [10].

A kolónia szaporodása a rajzás nevű folyamat révén zajlik, melynek lényege, hogy tavasszal, nektárban és pollenben gazdag időben, az idős anya, és a dolgozók nagyjából kétharmada, akár 10.000 méh, elhagyja a családot. A rajzást megelőzően a család több tucat fiatal anyát is kinevelhet, melyek közül az első sikeresen kikelt és bepárazott egyed veszi át a kaptárt elhagyott méhanya helyét [11]. A méhanya meghatározó szerepet tölt be a szaporodásban, mivel morfológiailag és viselkedésében is eltér a dolgozóktól. A dolgozók ugyanis bepárazásra képtelenek, azonban képesek petéket rakni, melyekből kizárólag haploid genetikai állományú herék kelhetnek ki, melyek genetikai szempontból messzebb állnak a petéző dolgozótól, mint annak nőtény dolgozótársai. A diploid kromoszómállományú királynő nőtény utódja esetén az örökítőanyag fele a herétől, másik fele pedig a méhanyától származik. Ennek megfelelően utóbbi rekombinálódik, azonban az apai haploid genom teljes mértékben továbbadódik. A folyamat eredményeként a dolgozó nőtények egymással genetikai szempontból $\frac{3}{4}$ -es egyezésben vannak, míg a hímek csupán $\frac{1}{4}$ egyezést produkálnak, vagyis a dolgozók között sokkal erősebb az altruista viselkedés, tekintettel arra, hogy a királynő utódainak túlélése ugyanannak a genetikai állománynak a terjedését segíti elő, mint amivel maguk is rendelkeznek [12].

Kommunikációjukat tekintve, a legtöbb alapvető viselkedésformát feromonok határozzák meg. Ide sorolhatók többek közt a támadó, védekező, mézelőállító, raktározó, orientációs, párzási, család- és anyafelismerő magatartások [13]. A kommunikáció másik formáját képezi a méhek tánca, melyet szintén részletes kutatások során vizsgáltak. A táplálékszerzés szempontjából az információmegosztás ezen módja elengedhetetlen, ugyanis a kaptárba visszatérő dolgozó képes megosztani a többiekkel a táplálék helyének irányát, illetve annak távolságát. Azonban megállapítható, hogy nem csupán mozgásalapú kommunikáció történik a tánc során, hanem a táncoló méh képes a fellelt táplálék szagmintáját is megosztani, melyet a többiek követni tudnak [14].

A kolóniaösszeomlás (Colony Collapse Disorder, CCD) kórkép és háttérbetegségei

A modern nyugati méhészet számos nehézsége közül fontos megemlíteni a méhbetegségeket, különös hangsúlyt fektetve az ezeket átfogó komplex kórképre, a kolóniaösszeomlásra. Ezen újkeletű, először az Egyesült Államokban felismert és kutatott,

azonban mára már az egész világot, így Európát is érintő [15] jelenség esetében nagymértékű, egy okra bizonyítottan vissza nem vezethető, elsődlegesen a kifejlett dolgozókat érintő gyors ütemű méhpusztulásról számolnak be a méhészek [16]. Részletes, átfogó kutatás során 61 egzakt paramétert vizsgáltak a méheken, azonban nem találtak egyik vizsgált okot sem szignifikánsan meghatározónak, s bár az érintett családokban kimutatható volt a kontrollcsoporthoz képest magasabb patogén terheltség valamint az alacsony koncentrációban jelenlévő atkairtó szer, azonban az eredmények inkább több háttérhatás együttes fellépésére engednek következtetni [17]. Ezek közül talán az egyik legjelentősebb probléma a méhészek körében a *Varroa destructor* atkafaj, mely speciális szájszervével szívja ki a méhek vérnyirok folyadékát, s ezen táplálkozási folyamat során több alkalommal vált gazdaállatot, így számos betegség vektoraként szolgálhat [18]. Az egyik leggyakoribb *Varroa* által hordozott vírus a deformált szárny vírus (deformed wing virus, DWV). Ezen retrovírussal fertőzött kifejlett egyedek 3 napon belül elpusztulnak, mely sokszor a családon belüli hatalmas fertőzöttségi szint miatt akár kolóniaösszeomláshoz is vezethet [19]. Mindenképpen fontos itt megemlíteni az amerikai, vagy nyúlós költésrothadás betegséget, melyet a *Paenibacillus larvae* (régebbi nevén *Bacillus larvae*) spóráképző, Gram-pozitív aerob pálcá okoz, valamint az európai költésrothadást. Ez utóbbi betegség kórokozója az *Enterococcaceae* családba tartozó *Melissococcus pluton* Gram-pozitív baktérium. Fontos különbség azonban, hogy míg az amerikai forma esetén a betegség terjedése spórákkal, az európai esetében főképp a fertőzött egyedek ürülékével és a táplálékkal történik. Mindkét esetben a fiatalabb lárvák vannak kitéve a legnagyobb fenyegetettségnek [20]. Végül említést érdemel a méhek egyik leggyakoribb emésztőszervi betegsége a nozéma, melyet a Microsporidia fajba tartozó *Nosema Apis* és a *Nosema Ceranae* okoznak. Jellemző, bár nem specifikus tünete a hasmenés, mely a középbél epithel sejtjeiben bekövetkezett fertőzés miatt jelentkezik [21]. A fentebb felsorolt betegségek csupán érintőlegesen kerültek tárgyalásra ezen dolgozat keretei között és bár csak apró szegmensét fedik le a méhbetegségek spektrumának, képet adnak azon általunk nem vizsgált faktorokról, melyek szintén a CCD hátterében állhatnak. Azonban minden méhbetegség kapcsán fontos figyelembe venni az olyan immunszuppresszáns hatásokat, mint a peszticidek által okozott oxidatív stressz, hiszen így azonos betegségek eltérő mértékben hathatnak a családokra azok antioxidáns rendszerének állapotától függően [22].

Az oxidatív stressz és annak mérésére szolgáló paraméterek

Számos méhbetegség esetében leírásra került, hogy azok káros hatásainak kialakulásában kulcsszerepet játszhat az egyre gyakrabban kialakuló fokozott oxidatív terhelés megjelenése. Oxidatív stressznek nevezzük azt az egyensúlyi eltolódást a sejten, amikor a reaktív molekulák, főként a reaktív oxigén gyökök (ROS) megjelenését az antioxidáns rendszer nem képes ellensúlyozni a szabadgyökök és az intermediér molekulák bontásával, valamint a sejtszinten okozott károk javításával. A normál redox állapot megbomlásával keletkező peroxidok és szabadgyökök képesek károsítani a fehérjéket, a lipideket, a szénhidrátokat és akár a DNS szerkezetét is. A ROS molekulák szerkezetükből kifolyólag instabil felépítésűek, ugyanis a legtöbb esetben párosítatlan elektronokat tartalmaznak, melyeknek köszönhetően elektron felvétel, vagy leadás során reakcióba lépnek stabil molekulákkal, ezáltal további szabadgyököket szabadítva fel [23]. A leggyakrabban vizsgált ROS molekulák közé tartoznak a szuperoxid-gyökök (O_2^-), hidroxil-gyökök ($OH^\cdot$) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). Továbbá fontos megjegyezni, hogy számos ROS molekula sejten belüli messenger funkciót betöltve részt vesz a redox-kommunikációban, ezáltal beavatkozhat a sejten belüli és a sejtek között zajló kommunikációba (cell signaling) [24].

Az antioxidáns rendszer szempontjából elkülöníthetünk több jelentős, részletesebben vizsgált enzimet, a szuperoxid-dizmutázt (SOD), a katalázt (CAT), a glutation-peroxidázt (GPx), a glutation-S-transzferázt (GST), a glükóz-6-foszfát dehidrogenázt (G6PDH), a xantin-oxidázt (XO) és az aldehid-dehidrogenázokat. A jelen kutatásban ezen enzimek közül kettőt választottunk részletes analízisre, a SOD-ot és a G6PDH-ot, valamint ezeket kiegészítettük további két paraméterrel, a GST aktivitása révén kialakuló redukált és oxidált glutation (GSH-GSSG) aránnyal és a malondialdehid koncentrációval.

A SOD egy olyan, az élő sejtekben megtalálható enzim, mely a szuperoxid-anion gyököt alakítja molekuláris oxigénné, illetve hidrogén-peroxiddá, melyet ezt követően a CAT semlegesít azáltal, hogy a reaktív hidrogén-peroxidot vízre és oxigénre bontja. A SOD számos formában van jelen az élő szervezetekben attól függően, hogy milyen fém foglal el központi helyet az enzim középpontjában (réz, cink, vas vagy mangán), ezáltal az antioxidáns enzimek közül a legadaptívabb és az egyik leghatásosabb [25].

A glutation-peroxidáz a CAT-hoz hasonlóan szintén a létrejött hidrogén-peroxidot redukálja tovább vízzé, melynek során a glutationt használja elektrondonorként [26]. A G6PDH a pentóz-foszfát út elsődleges limitáló faktoraként, a glükóz-6-foszfát 6-foszfoglükono-lakton átalakulást szabályozza, majd az így kapott vegyületet a 6-foszfoglükonolakton-laktonáz 6-foszfoglükonáttá alakítja, melyből a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz (6PGDH) állítja elő a NADPH-t, mely hidrogén donorként számos intermedier folyamatban játszik központi szerepet [27]. Ezáltal többek között a redukált glutation fiziológias koncentrációjának szinten tartásában is jelentősége van [28].

A GSH elsődleges szerepe, hogy intra- és extracelluláris antioxidánsként a ROS egyik legfontosabb tripeptid scavenger molekulája, melynek oxidált formájából (GSSG) a glutation-reduktáz alakítja vissza szabad, fehérjékhez kötött állapotába [29]. Számos fajban kimutatták, hogy a nyugalomban lévő sejt esetén a GSH:GSSG érték szervtől és állatfajtól függően 5:1 és 100:1 arányban változhat, ez azonban oxidatív stressz hatására jelentősen csökkenhet [30].

Az aldehid-dehidrogenázok funkciója egyes specifikus szubsztrátok oxidációja, mely során NAD^+ -t vagy NADP^+ -t használnak fel [31]. Az MDA szint meghatározásának segítségével pedig a lipidperoxidációs folyamatokra következtethetünk, ugyanis ezen folyamat során a reaktív szabadgyököknek köszönhetően létrejövő láncreakció keretében a többértékű, telítetlen lipidek oxidatív bomlása lipid-hidroperoxidokat eredményez, melyek instabilitásuknak köszönhetően szétbomlanak, olyan vegyületeket képezve mint a 4-hidroxi-2-nonenal vagy az általunk is vizsgált MDA [32]. Fontos azonban leszögezni, hogy csupán olyan peroxidok tudnak reakcióba lépni, melyek α és β telítetlen kötésekkel kapcsolódnak a peroxid csoporthoz, hogy megvalósulhasson az MDA létrejöttéhez elengedhetetlen ciklizáció.

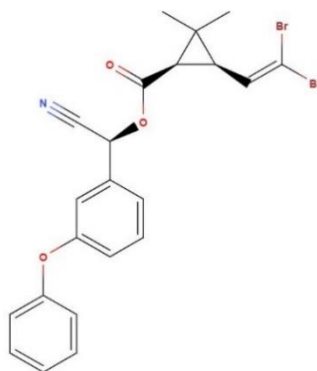
Szintén említésre méltó enzim továbbá a xantinoxidáz, mely elsősorban a hipoxantin-xantin oxidációját katalizálja, eközben pedig hidrogén-peroxidot állít elő [33]. Fontos, hogy többek között a rovarok nyílt keringési rendszerének és az emlősöknél jelenlévő olyan alapvető méregtelenítő szervek, mint a máj hiányának, valamint az eltérő enzimmérszletnek köszönhetően, nem vonható teljes párhuzam az emlősök antioxidáns rendszerével.

Ennek ékes példája, hogy mint azt egyes kutatások is bizonyították, bizonyos rovarfajok képesek a teljes megfagyás során előálló oxigénhiány okozta ROS-szint emelkedés megakadályozására, valamint az antioxidáns szintek változatlanul tartására [34]. Ezen folyamat

során az antioxidáns enzimaktivitás nem növekedett a CAT kivételével, mely viszont szignifikánsan megemelkedett. Bár az oxidált glutation szint is növekedett, a GSH:GSSG arány nem tolódott el, ugyanis ezzel arányosan növekedett a redukált glutation koncentráció is. Bár a védekezés pontos mechanizmusa nem került megállapításra, ezen értékek arra utalnak, hogy a rovarok esetében eddig még ismeretlen mechanizmusok is léteznek az oxigénhiányos állapot következtében bekövetkező oxidatív stressz leküzdésére.

Deltametrin

A deltametrin, tudományos nevén (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-cisz-3-(2,2-dibrómvinil)-2,2-dimetilciklopropán karboxalát (**1. ábra**), színtelen, szagtalan, szobahőmérsékleten szilárd anyag, mely világszerte népszerű szélesspektrumú külső parazita, rovar- és atkaölő hatása miatt a mezőgazdaságban és az állatorvosi praxisban egyaránt [35].



1. ábra. Deltametrin szerkezeti képlete (saját készítésű ábra)

A malária parazitát hordozó vektorok elleni védekezésben megkerülhetetlen szerepet játszik, mivel elsősorban szúnyoghálókat vonnak be vele, így szakember hiányában is egyszerűen, olcsón és biztonságosan használható a harmadik világbeli országokban is, hosszú hatású beltéri permetezéssel kiegészítve [36]. Hatékonyan alkalmazható szer továbbá a mai modern mezőgazdaságunkban számos növénykultúra, mint a búza, kukorica, káposztarepce, vagy napraforgó kártevő rovarokkal szembeni védelem érdekében. A piretroidok, azon belül a piretroid észterek vegyületcsoportjába tartozik, mely utóbbiak a természetben is fellelhető piretrinekhez hasonló szerkezettel rendelkező szintetikus előállított vegyületek. Stabilitásuk és hatékonyságuk is messze felülmúlja a természetben előforduló formákét, azonban ennek következtében sokszor megnövekedett veszélyt is jelenthetnek az élővilág számára [37].

Farmakológiai szempontok alapján a csoporton belül több generációt különíthetünk el. Az első generációba sorolható vegyületek krizanténsav-származékok és furán-gyűrűvel, valamint terminális oldalláncokkal rendelkező alkoholok észterei, melyek jellemzően viszonylag instabilak a környezetben. Hőre, fényre, levegőre érzékenyek és inkább repellens hatással bírnak. A második generáció vegyületei, ahová a deltametrin is tartozik, ezzel szemben a krizanténsav-származékok metilcsoportjának eltávolításával, valamint a fényérzékeny oldalláncok dibróm- és diklórvinil, illetve aromás gyűrűkre történő kicserélésével jelentősen megnövelt stabilitásra és hatékonyságra tettek szert, melynek köszönhetően széles körben elterjedtek az agráriumban [38].

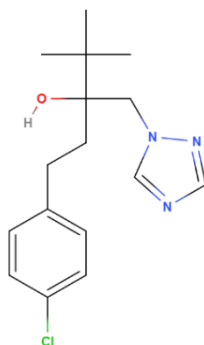
Hatásmechanizmusukat tekintve idegmérgek (neurotoxinok), melyek elsősorban az ízeltlábú parazitákkal szemben hatásosak. Ennek pontos mechanizmusát amerikai csótányok (*Periplaneta americana*) izolált axonjain vizsgálták, mely során megállapították, hogy egy lassú, fokozatos, irreverzibilis depolarizációt hoznak létre az idegsejt axonjának membránján, ezzel fokozatosan csökkentve az akciós potenciál kilengését [39]. Más, szintetikus piretroidokkal szemben feltételezhetően a feszültségfüggő nátrium-csatornáknak csupán egy kis, módosult nyílt állapotban lévő részét érintik. Az első generációs piretroidok és más azonos generációba tartozó, de kisebb aktivitást mutató vegyületek (rezmetrin, tetrametrin) esetében is megfigyelhető volt a taglózó hatás (knock-down effect), azonban a folyamat jelentősen lassabban megy végbe. Az első generációs piretroidok hatására gyakran figyelhető meg spontán kisülés az idegvégeken, mely excitációhoz vezethet [39].

A toxicitás vizsgálatakor figyelembe kell venni a piretroidok általános farmakokinetikai tulajdonságait. Mint az a szerkezetükből is látszik, nagyméretű, lipofil molekuláiknak köszönhetően, képesek a sejtmembrán lipid-struktúráját megzavarni, valamint a bőrön át jól felszívódni, azonban metabolizmusuk emlősök esetében rövid idő alatt végbemegy, inaktív metabolitokat eredményezve [40]. Ennek köszönhetően nagy biztonsággal alkalmazhatóak emlősökön és madarakon, azonban a vízi gerinctelen élőlényekre és halakra kifejezetten toxikus hatással vannak, kiváltképp a deltametrin. Az eddig vizsgált halfajok közel 40 százalékában a meghatározott LC₅₀ értékek alacsonyabbak voltak, mint 1.0 ppb (pars per billion), ami megközelíti a szúnyogok és más ízeltlábú vektorok értékeit [41].

A rovarok, ezen belül a méhek, különösen kitettek a deltametrin mérgezéseknek, hiszen a nátriumion-csatorna affinitásuk többszöröse az emlősökének, valamint a repellens hatás több órán keresztül is tarthat, ezáltal hatást gyakorolva a táplálékszerzési viselkedésre is. Korábbi kutatásokat figyelembe véve elmondható, hogy bár a laboratóriumi tesztek során megállapított LD₅₀ értékek alapján viszonylag biztonságosnak tekinthető (0.047 µg/méh kontakt útján, míg per os adagolás esetében 0.051-0.079 µg/méh) [42], újabb, akár mézelő méhekkel vagy más beporzókkal végzett vizsgálatok is árnyalják a képet. Több második generációs piretroid hatását vizsgálták *Megachile rotundata* méhfajon, s így megállapításra került, hogy a felhasznált vegyületek közül topikális adagolás során messze a deltametrin volt a legtoxikusabb, 0.0016 µg/méh értékkel, mely egyezett az *A. mellifera* és a *M. rotundata* fajokban [43]. Fontos továbbá megjegyezni, hogy több kutatás is behatóan vizsgálta a szinergista hatásokat, melyek a deltametrin és gombairtok, mint a proklazor, között fellépnek, s bár a szinergia pontos módja még nem teljes mértékig ismert, az egymás toxicitását erősítő hatás meglete szignifikáns és igazolható [44]. Egy édesvízi halfajon (*Channa punctatus*) végzett kutatás során a deltametrinnek kitett halak esetében vizsgálták a redukált glutation (GSH), a glutation S-transzferáz (GST), és az aszkorbinsav szinteket, melynek alapján elmondható volt, hogy a CAT aktivitása minden szervben csökkent, a GST aktivitása a kopolyúban csökkent, azonban a májban jelentősen megnövekedett. Ez lehet a megnövekedett reaktív oxigéngyökökre (ROS) adott válaszreakció, a CAT aktivitás csökkenést pedig, az ezzel párhuzamosan felszabaduló szuperoxid gyökök által jelentett fokozott terhelés okozhatta [45]. Nagyon hasonló folyamatok voltak megfigyelhetők deltametrinnel hosszú időn keresztül, szubakut dózisban kezelt patkányokban is, ahol azonban az erre terápiás jelleggel adott E-vitamin hatását is vizsgálták. Itt is egyértelműen bizonyítható volt az oxidatív stressz, ugyanis a GST és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szintjei szignifikánsan csökkentek, valamint a lipid peroxidáció markereiként szolgáló MDA szintje emelkedett a vérplazmában. Ezen kívül emelkedett a plazmában a totál lipid (TL), a koleszterin, az alacsony és a nagyon alacsony denzitású lipoprotein (LDL és VLDL) valamint a triglicerid (TG) szintje is. Fontos megállapítás továbbá, hogy az E-vitaminnal kezelt egyedek esetében jól látható módon csökkentek az oxidatív stressz paraméterei, valamint az E-vitamin a vérképben tapasztalt eltéréseket is korrigálta [46].

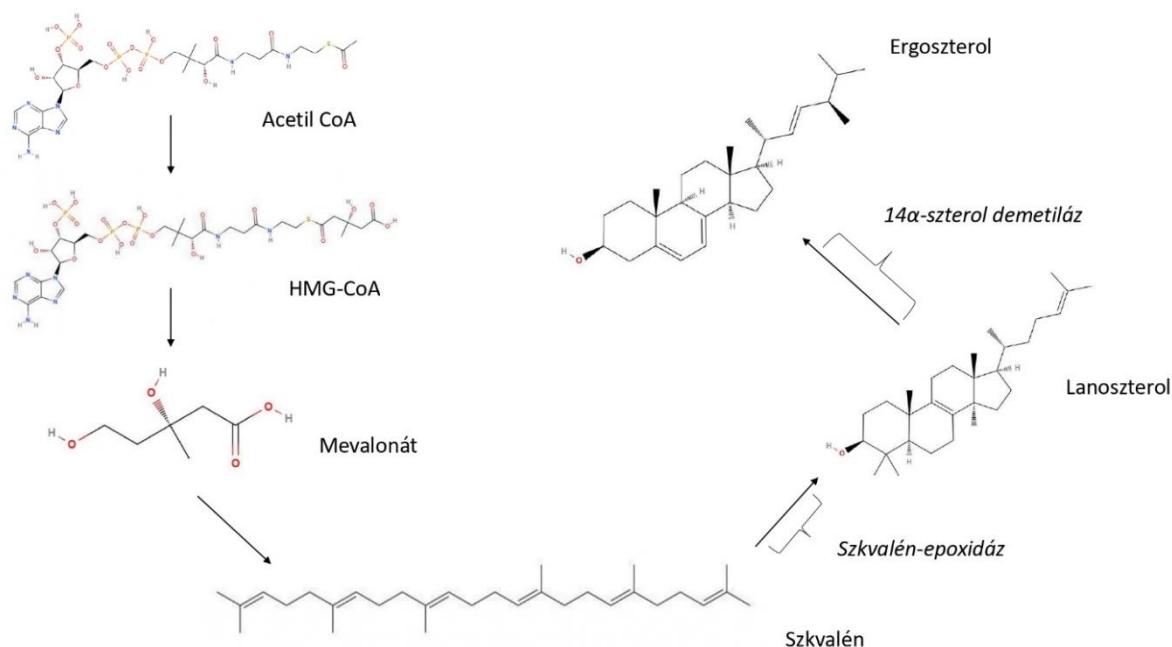
Tebukonazol

A tebukonazol, tudományos nevén 1-(4-klórfenil)-4,4-dimetil-3-(1,2,4-triazol-1-ilmethyl)pentán-3-ol (**2. ábra**), színtelen, szagtalan, szobahőmérsékleten szilárd, kristályos anyag, mely az agráriumban világszerte széleskörben alkalmazott a növények patogén gombás fertőzései, mint például a lisztharmat vagy az üszög betegségek ellen. Kiterjedt használata főképp hatékonyságának és az alkalmazását lehetővé tevő növények tág spektrumának köszönhető, állatorvosi felhasználásuk azonban nem jelentős [47].



2. ábra. Tebukonazol szerkezeti képlete (saját készítésű ábra)

Szerkezeti tulajdonságai és hatásmechanizmusa alapján a 14α -szterol demetiláz fungicid hatású inhibitorok közé sorolható be, azon belül is a triazolok csoportjának tagja [48]. A gombasejt membránjában az emlősökében jelenlévő koleszterin helyett ergoszterol található, mely szintéziséhez szükséges enzimek a mikroszómákban helyezkednek el és a gombaellenes szerek fő célpontját képezik. Az ergoszterol-szintézis egyszerűsített folyamatát a **3. ábra** szemlélteti. A gombaellenes szereken belül két csoportot szükséges elkülöníteni, melyből az első csoportba tartozók a szkvalén-epoxidáz enzimet hivatottak gátolni, mely a szkvalén-lanoszterol átalakításához szükséges, míg a második csoportba a 14α -szterol demetilázt gátló vegyületek sorolhatók, melyek így a lanoszterol ergoszterollá történő gombákra specifikus átalakulást akadályozzák meg. Így végső soron csökken az ergoszterol szintézis, a membrán szerkezeti stabilitása pedig megszűnik és a gomba elpusztul [49].



3. ábra. Az ergoszterol-szintézis egyszerűsített mechanizmusa (saját készítésű ábra)

A 14α -szterol demetiláz enzim a citokróm P450 (CYP450) csoportba tartozó enzim (másik nevén CYP51), így az arra hatást gyakorló vegyületek a teljes szelektivitás hiányában az állati CYP450 enzimeket is gátolhatják, jelentősen befolyásolva a méregtelenítő folyamatokat, vagy a szteroidszintézist [50]. Fontos továbbá, hogy a 14α -szterol demetiláz inhibitorok esetében elkülöníthetünk két nagy alcsoportot, az imidazolokat és a triazolokat, melyeknek bár a hatásmechanizmusa és az antifungális spektruma megegyezik, a kutatások alapján eltérő mértékben vannak hatással az állati CYP450 enzimekre [51]. Számos tanulmány felhívta a figyelmet a rezisztencia kialakulására többféle gombafajban az azolokat tartalmazó készítményekkel szemben, melyeknek alapjául a molekuláris célpontként szolgáló CYP51 enzim aminosavszekvenciáiban bekövetkezett up-reguláció szolgál [52]. Ennek során gyakran változást tapasztalhatunk a másodlagos szerkezeti struktúrákban, melyek az aktív- centrumot alkotják, ám a fehérjeszerkezet flexibilitásának köszönhetően nem veszíti el az elsődleges enzimátikus funkcióit. Ezen rezisztenciák kialakulását emberi és növény patogének esetében is bizonyították [53].

A tebukonazol széleskörben elterjedt használatának köszönhetően a méhkaptárakban is megjelent, kutatások bizonyították, hogy szubakut dózisban a méhviasztól kezdve egészen a királynő táplálására használt méhpempőig kimutatható [54]. Bár az akut tebukonazol toxicitás

vizsgálatok mézelő méh (*Apis mellifera*), Trichogramma darázs (*Trichogramma ostrinae*) és selyemhernyó (*Bombyx mori*) esetében főképp az utóbbiban mutattak ki elfogadhatatlan rizikótényező hányadost, annak káros hatásai a többi rovarfajban is jelentős mértékben feltételezhetők [55]. Fontos továbbá kiemelni, hogy a selyemhernyókban a hosszú távú krónikus módon adagolt tebukonazol negatívan befolyásolta a bebábozódást, sérültek a selyemkiválasztó glandulusok, valamint jelentős mértékben megváltoztak az ekdiszteroid és a juvenilis hormonok koncentrációi [56]. A tebukonazol kiváltotta oxidatív stressz kapcsán a közelmúltban patkányok esetében írtak le jelentős eredményeket. Hím patkányoknál megfigyelhető volt a glutation csökkenés és ezzel párhuzamosan növekedett a GST, a SOD, a CAT és a GPx szintje. A SOD ezen kívül a vesékben és a herékben is megnövekedett aktivitással bírt, valamint az utóbbiban csökkent a tesztoszteron koncentrációja [57]. Újabb kutatások megerősítették ezeket az eredményeket, kiegészítve a malondialdehid és proteinkarbonil szintek emelkedésével, valamint a DNS károsodásával [58]. Tebukonazollal kezelt dél-amerikai harcsákon (*Rhamdia quelen*) végzett kutatások megállapították azonban, hogy amennyiben mézet és pollent kevertek az állatok vizébe, az képes volt csökkenteni az így kialakult oxidatív stressz szintjét. A tanulmány során vizsgálták többek közt a malondialdehid és a GSH koncentrációját, valamint a GST aktivitását. Az eredmények alapján egyértelműen megállapítható volt, hogy a tebukonazol alkalmazása fokozott mértékű oxidatív terheléshez vezetett az agyban, a májban és a vesében is [59].

Anyag és módszer

Állatkísérleti fázis

A felnőtt mézelő méhek begyűjtése a korábban Williams és munkatársai által leírt módon történt meg [60]. A kutatáshoz szükséges méhek, a különböző csoportok homogenitásának biztosítása céljából, ugyanazon egészséges méhcsaládból kerültek kiválasztásra, mely nem volt kitéve semmilyen gyógyszeres, vegyszeres, vagy egyéb jellegű kezelésnek a kísérletet megelőző három hónapban. A méhek begyűjtésére fiasítás nélküli keretekről a reggeli órákban került sor, ehhez a **4. ábrán** szemléltetett befogóketrecek használtuk fel. Az állatok véletlenszerűen, körülbelül 50 egyedet tartalmazó csoportokba kerültek szétosztásra. A munka során felhasznált méhgyűjtő ketrecek 30 cm x 20 cm nagyságúak voltak és a kezelések 25 ± 2 °C-on, 50-65% relatív páratartalom (RH) mellett történtek. A mézelő méhek etetése *ad libitum* módon valósult meg, mely során az állatoknak hozzáférésük volt 50%-os szacharózoldathoz, valamint tiszta vízhez. A tanulmány első 36 órája rövid hozzászokási periódusként szolgált, mely során az állatok nem részesültek semmiféle kezelésben.



4. ábra. Hálóval ellátott befogóketrec (saját kép)

Ezt követően a kezelt egyedek a szacharózoldathoz keverve több koncentrációban deltametrint vagy tebukonazolt kaptak, mely kezelőoldatokat 8 óránként friss elegyre cseréltük az összesen 48 órás kezelési fázis ideje alatt. A kezelési koncentrációk (**1. táblázat**) kiszámítása más kutatócsoportok által kidolgozott módszereken alapult, figyelembe véve az állatok napi átlagos takarmányfelvételét, és biztosítva egyedenként a napi LD50/10, LD50/20, ill. LD50/40 mennyiségnek megfelelő kezelőanyag felvételét [22, 61–63].

1. táblázat. Az LD50 értékek alapján felállított csoportbeosztás és a hozzájuk tartozó kezelési mennyiségek.

Kontrollcsoport	Kezelésre szolgáló mennyiség
Deltametrin magas (LD50/10)	7,9 ng/méh/nap
Deltametrin közepes (LD50/20)	3,95 ng/méh/nap
Deltametrin alacsony (LD50/40)	1,975 ng/méh/nap
Tebukonazol magas (LD50/10)	8,505 µg/méh/nap
Tebukonazol közepes (LD50/20)	4,253 µg/méh/nap
Tebukonazol alacsony (LD50/40)	2,123 µg/méh/nap

A kezelést követően az állatok a ketrecek szárazjégbe helyezésével kerültek exterminálásra, majd szállításra a tanszéki laboratóriumba, ahol a mintákat további felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Óvatos kiolvasztást követően a méhek feje, tora valamint potroha eltávolításra került, majd a további boncolásokat jégen történő hűtés mellett, sztereomikroszkóp alatt végeztük, mely lépések egyik stádiumát az **5. ábrán** mutatjuk be. A központi idegrendszer preparálását követően nyert minták a protocerebrumot, az antenna lebenyeket, az optikai lobulusokat, valamint a subesophagealis gangliont is tartalmazták. A minták homogenizálását Potter-Elvehjem szövethomogenizátorral végeztük, Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) oldatban, kiegészítve Pierce Protease Inhibitor Cocktail oldattal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ezt követően a mintákat 5000 x g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a nyert felülúszókat a későbbi vizsgálatok elvégzéséig -80 °C-on tároltuk.

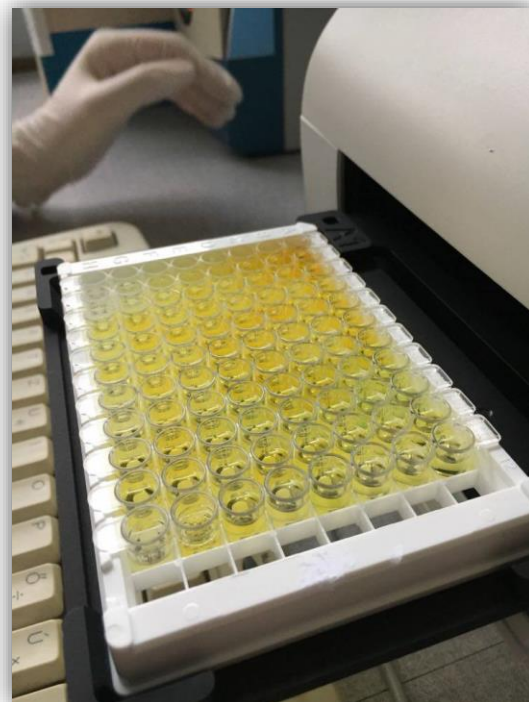


5. ábra. A méhek boncolásának megkezdése (saját kép)

Laboratóriumi mérések

Az összfehérje-koncentráció mérése

A megfelelő standardizálhatóság és a későbbi mérések korrekciója érdekében a minták összfehérje-koncentrációjának meghatározása Pierce TM Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével történt a gyártó előírásainak megfelelően. Standard oldatként szarvasmarha szérum albumint használtunk., 37 °C-on történő inkubációt követően az abszorbancia értékeket 562 nm-en olvastuk le Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. Az abszorbancia értékek leolvasását mutatja be a **6. ábra**.



6. ábra. A kolorimetriás mérés során használt lemez (saját kép)

A redukált és oxidált glutation koncentráció mérése

A GSH és a GSSG koncentrációkat szintén egy kolorimetriás teszt segítségével, Glutathione GSH/GSSG Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) felhasználásával határoztuk meg. A standardokat és a mintákat átlátszó, 96-lyukú platek-re (40 µL/lyuk), pipettáztuk, kiegészítve a gyártó által biztosított puffer eleggyel (120 µL). A lemezt 60 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd ezt követően minden lyukba 20 µL Substrate Solution került. Ezután szintén minden lyukhoz további 20 µL Coenzyme Working Solution, valamint 20 µL Enzyme Working Solution került hozzáadásra. A GSSG mérés során a fenti oldatokon felül úgynevezett Masking Solutiont pipettáztunk a mintákhoz, mely oldat lehetővé teszi az oxidált formában jelenlévő glutation célzott kimutatását. Az abszorbancia értékek mérésére 412 nm-en került sor 10 perc, 37 °C-os inkubációt követően.

A malondialdehid koncentráció mérése

A lipidperoxidációs folyamatok markereként az MDA koncentrációt mértük specifikus kolorimetriás tesztel (MDA Assay Kit; Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A gyártó előírásának megfelelően 300 µL tiobarbitursav (TBA) törzsoldatot kevertünk össze 100 µL

agyszövet homogenizátum felülúszóval, melyet 1 órás, 95 °C-os inkubáció követett. A minta jégben történő lehűtését követően sor került az abszorbancia mérésére 532 nm-en Multiskan GO 3.2 reader segítségével.

A szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitás mérése

A SOD mérések esetében a SOD Determination Kit-et alkalmaztunk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), mely mérés során a mintákat átlátszó, 96-lyukú lemezre pipettáztuk (20 µL/lyuk), valamint a vakhoz desztillált vízből adtunk 20 µL-t. Ezt követően minden lyukba 200 µL Working Solution-t pipettáztunk és összekevertük őket, majd 20 µL Dilution Buffer-t adtunk a vak lyukakhoz, valamint 20 µL Enzyme Working Solution-t adtunk a mintákhoz. Az abszorbancia értékek leolvasására 450 nm-en került sor 20 perc 37 °C -os inkubációt követően, majd megadott képlet alapján számítottuk ki a minták aktivitás-értékeit.

A Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzimaktivitás mérése

A G6PDH vizsgálata során a Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Assay Kit került felhasználásra (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A G6PDH Assay Buffer segítségével hígított, homogenizált mintákat és az előzetesen elkészített standardokat és mintákat felmértük a 96 lyukú átlátszó platekre (50 µL/lyuk). Ezt követően elkészítettük az ún. Master Reaction Mix-et 46 µL G6PDH Assay Buffer, 2 µL G6PDH Substrate Mix és 2 µL G6PDH Developer Mix felhasználásával. Az így elkészült keverékből 50 µL-t juttatunk minden lyukba. 2-3 percet követően lemértük a kezdeti abszorbancia értékeket 450 nm-en, majd 37 °C –on inkubáltuk fénytől védett állapotban, eközben 5 perces időközönként méréseket végeztünk egészen addig amíg a legaktívabb minta értéke magasabb nem lett, mint a legmagasabb standard értéke. Ezt követően a gyártó által megadott számítás segítségével határoztuk meg az enzimaktivitást.

Statisztikai elemzés

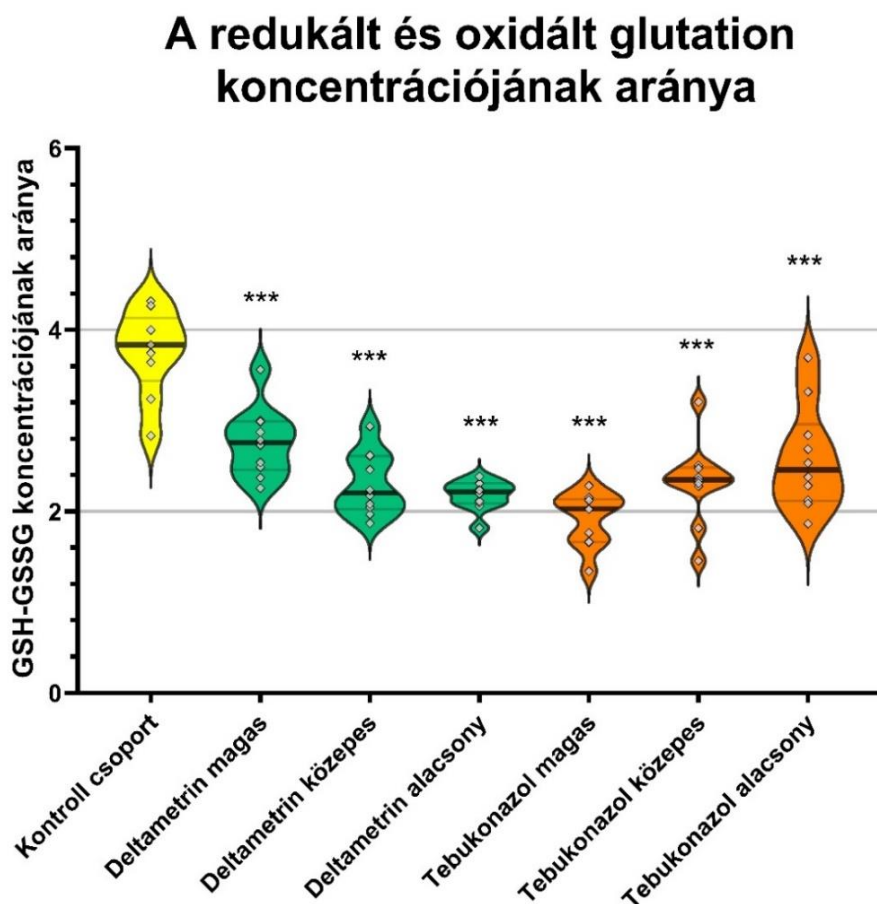
Az adatok feldolgozása és analízise a GraphPad Prism 9 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével valósult meg. A variancia homogenitást Levene próbával, a normál eloszlást pedig Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A különböző csoportok közti különbségeket egyutas ANOVA módszerrel (one-way analysis of variance) a páronkénti összehasonlításokat pedig Dunnett féle post hoc tesztekkel végeztük. A csoportok közti különbségek szignifikánsnak voltak tekinthetők abban az esetben, ha $p < 0,05$.

Eredmények

Az eredmények vizsgálatakor minden egyes minta esetén az összfehérje-koncentrációk szolgáltak a standardizálás alapjául, ugyanis ennek segítségével korrigáltuk az adatokat, a mintavételezés és mintafeldolgozás módjából fakadó metodikai vagy emberi pontatlanságok kiküszöbölése érdekében.

Redukált és oxidált glutation

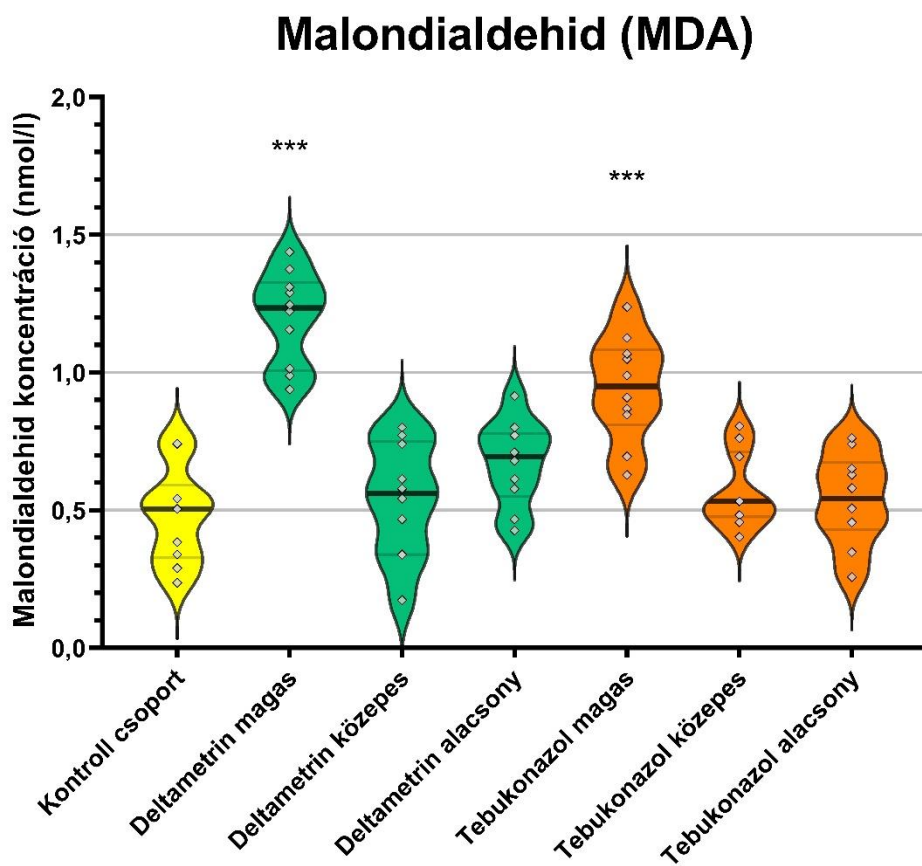
A redukált és oxidált glutation kolorimetriás tesztek segítségével megállapított eredményeket a **7. ábra** violin plot-jai foglalják össze. A grafikonokból jól látszik, hogy a GSH-GSSG koncentráció aránya az összes alkalmazott kezelési koncentráció hatására szignifikánsan csökkent mind a deltametrin ($p < 0,001$), mind a tebukonazol ($p < 0,001$) esetében a kontrollcsoporthoz képest.



7. ábra. A redukált és oxidált glutation koncentrációarányának változása a kontrollcsoport és az eltérő koncentrációjú deltametrin és tebukonazol vizsgálati csoportok esetén mézelő méhek központi idegrendszerében. A fekete vonalak a mediánt jelölik, míg a szürke vonalak az első (Q1) és a harmadik (Q3) kvartilist jelölik. Az egyedi értékeket a szürke négyzetek mutatják. *** = $p < 0,001$

Malondialdehyd

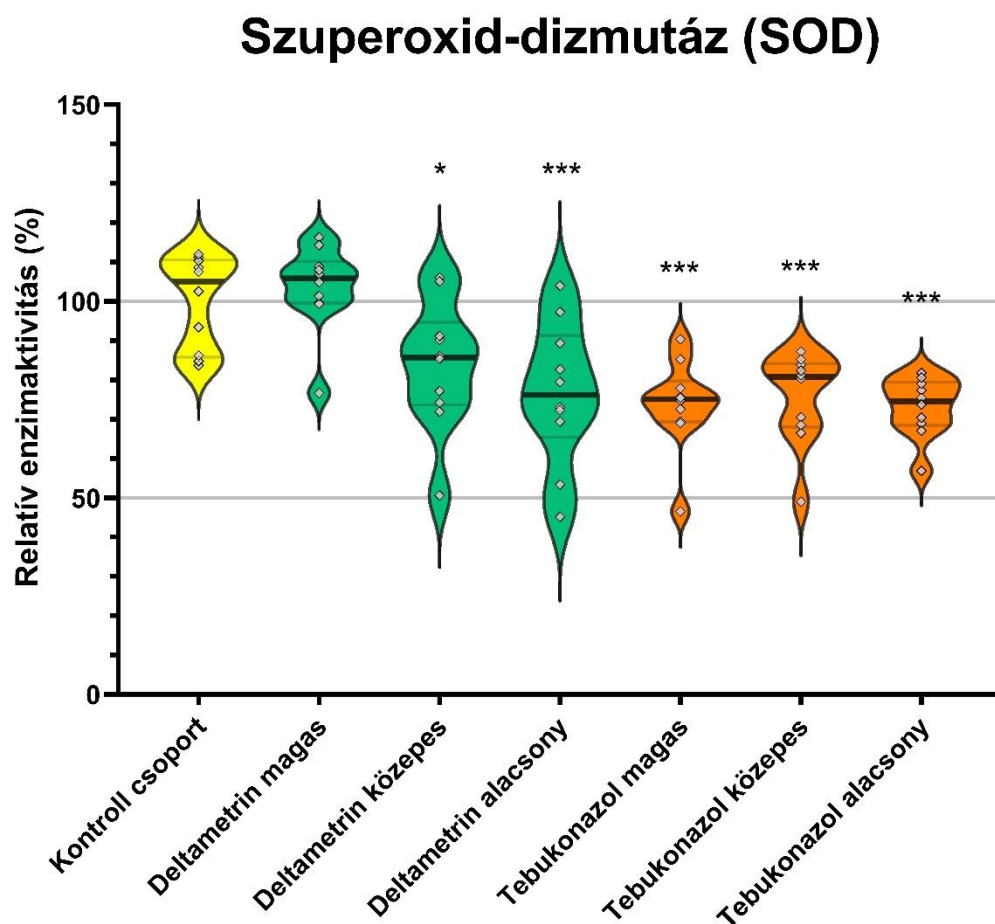
A lipidperoxidáció mérésére szolgáló malondialdehyd specifikus kolorimetriás teszttel történt vizsgálat során kapott eredményeket a **8. ábrán** található violin plot-ok mutatják be. Az MDA koncentrációjában szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kontrollcsoporthoz viszonyítva a magasabb koncentrációjú deltametrin ($p < 0,001$) és tebukonazol ($p < 0,001$) kezelést kapott csoportok esetén. A deltametrin, valamint tebukonazol közepes és alacsony mennyiségével kezelt csoportokban nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a kontrollcsoporthoz képest.



8. ábra. A malondialdehyd koncentrációváltozása a kontrollcsoport és az eltérő koncentrációjú deltametrin és tebukonazol vizsgálati csoportok esetén mézélő méhek központi idegrendszerében. A fekete vonalak a mediánt jelölik, míg a szürke vonalak az első (Q1) és a harmadik (Q3) kvartilist jelölik. Az egyedi értékeket a szürke négyzetek jelölik.
*** = $p < 0,001$

Szuperoxid-dizmutáz

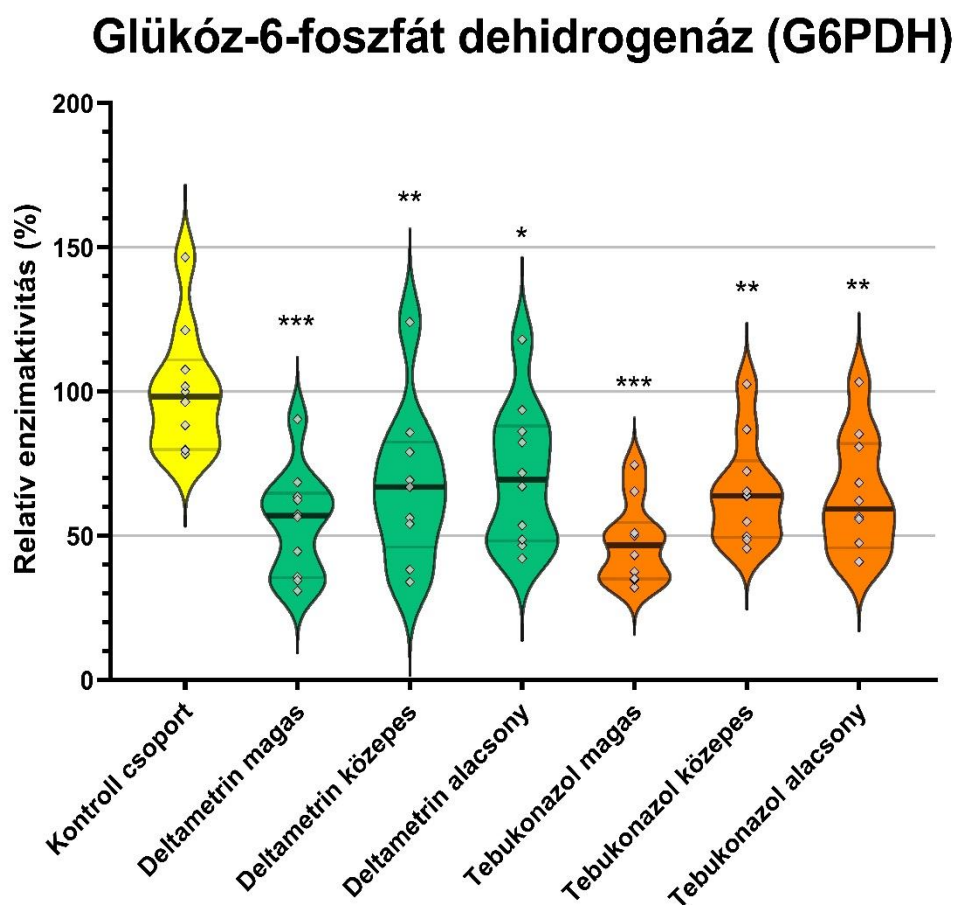
A szuperoxid-dizmutáz vizsgálata során egyértelműen megállapítható, hogy a tebukonazol mindhárom koncentrációban, hasonlóan szignifikáns mértékben gyakorol csökkentő hatást az enzimaktivitásra ($p < 0,001$ mindhárom esetben). A deltametrin kezelés során a közepes ($p=0,0351$) és az alacsony ($p < 0,001$) koncentrációk esetében megállapítható volt a szignifikáns enzimaktivitás-csökkenés ($p < 0,001$), azonban a magas deltametrin koncentráció hatására nem mutatkozott különbség a kontrollcsoporthoz képest. A **9. ábra** mutatja be részletesen a fent említett változásokat violin plot-ok segítségével.



9. ábra. A szuperoxid-dizmutáz relatív enzimaktivitásának alakulása a kontrollcsoport és az eltérő koncentrációjú deltametrin és tebukonazol vizsgálati csoportok esetén mézelő méhek központi idegrendszerében. A fekete vonalak a mediánt jelölik, míg a szürke vonalak az első (Q1) és a harmadik (Q3) kvartilist jelölik. Az egyedi értékeket a szürke négyzetek jelölik.
* = $p < 0,05$; **** = $p < 0,001$

Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz esetén, mint az a **10. ábrán** szereplő violin plot-okon is látszik, megállapítható, hogy a relatív aktivitás szignifikánsan csökkent deltametrin és tebukonazol hatására is. Bár mind a deltametrin ($p < 0,001$), mind pedig a tebukonazol ($p < 0,001$) esetében a magas koncentrációnál figyelhető meg a legnagyobb mértékű csökkenés az enzimaktivitás mértékében, a többi esetben mért értékek sem jelentősen maradtak el ezektől. (A deltametrin közepes koncentrációjánál $p = 0,0064$, az alacsonynál $p = 0,0145$, míg a tebukonazol közepes koncentrációjánál $p = 0,0024$, az alacsonynál pedig $p = 0,0016$.)



10. ábra. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz relatív enzimaktivitásának alakulása a kontrollcsoport és az eltérő koncentrációjú deltametrin és tebukonazol vizsgálati csoportok esetén mézelő méhek központi idegrendszerében. A fekete vonalak a mediánt jelölik, míg a szürke vonalak az első (Q1) és a harmadik (Q3) kvartilist jelölik. Az egyedi értékeket a szürke négyzetek jelölik. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Eredmények értékelése

Napjainkban egyre jelentősebb szerepet kapnak a beporzók megóvását célzó kutatások, mely érthető, ha figyelembe vesszük az elmúlt évtizedekben tapasztalható tendenciákat ezen a téren. Egyes rovarirtó és növényvédő szerek méhekre gyakorolt káros hatásai már évtizedek óta a kutatók, a mezőgazdasági szakemberek, valamint a méhészek figyelmének célkeresztjébe kerültek, s kisebb-nagyobb előrelépések is születtek ezen a téren az évek alatt az egyes vegyszerek alkalmazásának szabályozását illetően. A közelmúltban egyre nagyobb visszhangot keltő kolónia-összeomlás okainak kutatása során került ismét előtérbe a téma jelentősége, ugyanis ez a jelenség nem vezethető vissza egyszerűen néhány oki tényezőre, hanem több, egyenként a méhcsalád számára még tolerálható, együttesen azonban súlyos problémaként jelentkező kórformaként kell kezelni. A kutatásunk témája ennek megfelelően csupán a lehetséges okok egyikének vizsgálata, azonban mint az az eredményekből is tisztán látható, e terület tanulmányozásának jelentősége vitathatatlan.

Vizsgálatunk céljaként a deltametrin és tebukonazol által a méhek központi idegrendszerében okozott oxidatív stressz vizsgálatát tűztük ki, melynek megvalósítása során a témába vágó kutatásokhoz hasonlóan különböző redox paraméterekben bekövetkező változásokat követtük nyomon. Bár a peszticidek nem célfajokra gyakorolt hatásait több különböző nézőpontból, számos kutatócsoport vizsgálta, a kapott eredmények eltérőek lehetnek, hiszen a vizsgált vegyszerek, paraméterek, valamint a módszerek és az állatfajok tekintetében is széles spektrum lelhető fel. A munkánk során alkalmazott deltametrin és tebukonazol koncentrációk, vizsgálati eljárásmodok és értékelési szempontok saját előkísérleteink és irodalmi adatok alapján kerültek megállapításra [61, 63]. Ennek megfelelően különítettük el a három-három vizsgálati csoportot, melyeknél a magas koncentráció esetén 7,9 ng/méh/nap deltametrin és 8,505 µg/méh/nap tebukonazolt, a közepesnél 3,95 ng/méh/nap deltametrin és 4,253 µg/méh/nap tebukonazolt, az alacsony esetében pedig 1,975 ng/méh/nap deltametrin, valamint 2,123 µg/méh/nap tebukonazolt kevertünk az állatok etetésre szolgáló elegybe. Ezen koncentrációk állatonként a LD50/10, LD50/20 és a LD50/40 mennyiségnek felelnek meg, mellyel biztosítottuk a szubletális akut modell felállításához szükséges dózisok adagjait.

A deltametrin kezelés során jól megfigyelhető volt, hogy az több esetben akár már a legkisebb alkalmazott dózisban is szignifikáns hatást gyakorolt a tanulmányozott

paraméterekre. A vizsgálatunk eredményei jól összevethetőek más kutatók által gerincesekben mért értékekkel, mely tanulmányok során patkányokban (*Rattus rattus*) [46] és harcsában (*Clarias gariepinus*) [64] is vizsgálták az antioxidáns-rendszer változásait a deltametrin terhelés hatására. A fent említett tanulmányokban a GST, a lipidperoxidációs markerek (MDA), valamint a SOD vizsgálatára került sor. Az általunk kapott értékek összhangban állnak a fent említett kutatás részeként kapott eredményekkel, vagyis eltolták a GSH-GSSG arányt az oxidáció irányába, növelték az MDA koncentrációját, illetve csökkentették a SOD aktivitását. Fontos továbbá leszögezni, hogy mindkét fent említett tanulmány megállapította az alanin- (ALT) és az aszpartát-aminotranszferáz (AST) aktivitásának növekedését, valamint az E-vitamin oxidatív stresszre gyakorolt pozitív hatását is. Ezen további paraméterek vizsgálata bár gyümölcsöző lehet ízeltlábúak esetében is, jelenleg az elvégzett vizsgálataink spektrumán kívül esett. A jelen dolgozat alapját képező vizsgálatok ritkábban mért paramétere a G6PDH volt, mely a glükóz-6-foszfát 6-foszfoglükono-lakton átalakulást szabályozó enzimként a pentóz-foszfát út elsődleges szabályozójaként szolgál. A deltametrin G6PDH-ra gyakorolt hatását részletesen vizsgálták szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) egyedeken [65, 66]. E mérések során szignifikáns enzimaktivitás csökkenés volt megfigyelhető, melyhez hasonló eredmények születtek a mi vizsgálatainkban is. Ezen értékek csökkenése különösen fontos annak a fényében, hogy a G6PDH által termelt NADPH a glutation-reduktáz enzim működésének támogatása révén az oxidált GSSG forma redukálásával elengedhetetlen szerepet játszik a sejteken belüli GSH újratermelésében és annak szintjének fenntartásában, kihatva ezzel a redox védvonal egyik alappillére [67]. Ez némileg eltér egyes kutatócsoportok eredményeitől, akik hasonló dózisokban adagolt deltametrin hatására nem tapasztaltak jelentős változást a CAT és a GST aktivitásban a szövetvizsgálatok során mézelő méhekben [68]. Fontos azonban leszögezni, hogy az említett vizsgálatban az adagolás módja, a kezelési koncentrációk és a vizsgálat időtartama is eltértek az általunk alkalmazottaktól, mely faktorok eltérése állhat a különbségek hátterében. A deltametrin központi idegrendszerre gyakorolt hatását más kutatócsoportok is megerősítették, mely munka során bár nem az antioxidáns rendszerre gyakorolt hatások kerültek vizsgálatra, mérhető viselkedésbeli eltéréseket figyeltek meg, ezzel is igazolva a szubakut dózisban történő adagolás káros hatásait [61].

A tebukonazol kezelést követően is szembetűnő, szignifikáns eltéréseket tapasztalhattunk a kontrollcsoporthoz viszonyítva szinte minden mért paraméter esetében.

Oxidatív stressz vizsgálata során tebukonazollal kezelt közönséges harcsa (*Cyprinus carpio*) és zebradánió (*Danio rerio*) esetén is hasonló eredmények olvashatók a szakirodalomban. Harcsákon végzett kutatás során [69] szintén mérték a GSH és az MDA koncentrációját, valamint a SOD enzim aktivitását. E vizsgálatban is jól megfigyelhetők voltak a jelen dolgozat anyagát képző kutatás eredményeihez hasonló változások, bár az említett kísérlet során 4 napon át tartó akut toxicitást vizsgáltak, valamint az alkalmazott vegyszerkoncentrációk is eltértek a mi vizsgálatainkban használtaktól. Egy további, zebradániókon végzett kutatás [70] elsősorban a hepatotoxicitást volt hivatott vizsgálni, ennek megfelelően jelentős figyelmet kaptak a májenzimek az általunk mért paraméterek mellett. Az említett kutatásban a májkárosodás és a ROS-ok mennyiségének növekedése is jól megfigyelhető volt, valamint a nemenkénti eltérések is figyelembevételre kerültek, mely alapján az esetek túlnyomó többségében a hím példányokban magasabb koncentrációkat mértek a vizsgált paraméterek esetében. A fentebb említett tényezők tekintetében elmondható, hogy a SOD, CAT és a GST enzimaktivitás is szignifikánsan növekedett. Ezen antioxidáns enzimek elengedhetetlenek a máj detoxifikációs mechanizmusaként a reaktív molekulák ártalmatlan metabolitokká alakításához, melyek aktivitása kémiai stresszorok hatására emelkedhet vagy akár csökkenhet is [71]. Szintén hasonló eredmények születtek *Rhamdia quelen* halak májának vizsgálata során, amikor a szubletális dózisban adagolt tebukanzol szintén GST aktivitásnövekedést, emelkedett lipidpreoxidációt és GSH koncentrációnövekedést eredményezett, bár a CAT enzimaktivitása itt csökkent [72]. Más vizsgálatokban embrió és lárva stádiumban lévő zebradániókon számos paramétert mértek három azol-típusú gombaölőszert összevető tanulmány keretében, mely során tebukonazol kezelés hatására nem találtak szignifikáns eltérést a lipidperoxidációs paraméterek (MDA) tekintetében [73]. Szívárványos pisztrángok krónikus módon, harminc napon át tartó, triazol gombaölővel történő kezelését követően szintén a jelen dolgozat témáját képző vizsgálat eredményeihez hasonló változások kerültek megállapításra. Ezen kutatás során ugyanis dokumentálásra került a GSH szint csökkenése, elsősorban a kezelés idejének harmadik harmadában, valamint a lipidperoxidációt igazoló MDA szint szignifikáns emelkedése a 20. naptól kezdve [74]. Külön méhspecifikus jelentőséggel bíró kutatási eredmények is napvilágot láttak, melyben kimutatták, hogy a nagy lipofilitásának köszönhetően a tebukonazol képes felhalmozódni a méhviaszban, sőt akár a méhpempőbe is bejuthat. Továbbá az így felgyülemlett

fungicid koncentrációja növekedhet is a folyamatos mezőgazdasági tevékenység hatására, jelentősen növelve a krónikus toxicitás kialakulásának lehetőségét [54].

Mint az a fentebb leírtakból látható, a dolgozat témáját képező problémafelvetés igen újszerű, hiszen bár számos tanulmány készült e vegyületek és az ezekkel azonos kémiai csoportokba tartozó egyéb rovar- és gombaölőszerek élővilágra gyakorolt hatását kutatva, a szubletális szintű adagolás esetén felmerülő redox paraméterek változására koncentráló vizsgálatok csupán kisebb részét teszik ki ezen publikációknak. További lényeges tényező ezen kívül, hogy a rovarokra vonatkozóan viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, hiszen a gerincesek, ezen belül is elsősorban az emlősök, valamint a rovar- és gombaölőszerekkel szemben különösen érzékeny halak vizsgálata általában elsőbbséget élvez az ízeltlábúakkal szemben. Ennek megfelelően bár a dolgozat keretei között igyekeztünk minél teljesebb képet adni a tebukonazolnak és a deltametrinnek a központi idegrendszer redox homeosztázisára gyakorolt hatásairól, több új, egyelőre megválaszolatlan tudományos kérdés is felvetődött, melyeknek megválaszolásához a jövőben további kutatások végzésére lesz szükség.

Összességében a kutatásunk során nyert információk segíthetik a nem célfajokként tekinthető rovarok, azon belül is a beporzók védelmét, valamint hangsúlyozzák az akut, szubletális dózisú triazol, és piretroid expozíció esetén fellépő oxidatív stressz káros hatásainak jelentőségét mézelő méhekben. Munkánk hozzájárulhat a tebukonazol és deltametrin központi idegrendszerre kifejtett káros hatásainak megértéséhez, mely tudás mind alapkutatási, mind méhegészségügyi és agrárstratégiai szempontból kiemelt jelentőséggel bírhat. Munkánk során kidolgozott módszertanunk lehetőséget nyújthat a későbbiek folyamán további toxikológiai vizsgálatok elvégzésére, valamint egyes protektív anyagok hatásmechanizmusának részletes vizsgálatára, ezzel is támogatva a fenntartható mezőgazdaság alapelveinek megvalósulását, és ezzel összefüggésben a méhállományok védelmét hazánkban és világszerte egyaránt.

Összefoglalás

A világszerte egyre nagyobb ökológiai és gazdasági problémákat jelentő beporzópusztulás számos oka közül kutatásunk az akut peszticid-expozíció okozta oxidatív stressz vizsgálatát tűzte ki célul mézelő méhek központi idegrendszerében.

Az általunk alkalmazott inszekticid szer a piretroid észterek csoportjába tartozó deltametrin, a gombaellenes vegyület pedig a triazolok közé tartozó tebukonazol volt, mely hatóanyagokat széleskörben és nagy mennyiségben alkalmazzák napjaink modern mezőgazdaságában. A méhek begyűjtését és a vizsgálati csoportok kialakítását követően az említett anyagokat 48 óráig tartó kezelés során, szubletális dózisban (deltametrin: LD50/10 = 7,9ng/méh/nap, LD50/20 = 3,95 ng/méh/nap, LD50/40 = 1,975 ng/méh/nap, tebukonazol: LD50/10 = 8,505 µg/méh/nap, LD50/20 = 4,253 µg/méh/nap, LD50/40 = 2,123 µg/méh/nap) kevertük az állatok etetőanyagához. A vizsgálat során a központi idegrendszer preparációját követően nyert szövetminták homogenizálásra kerültek, majd ezekből kolorimetriás módszerek segítségével vizsgáltuk a malondialdehid (MDA) koncentrációját, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH) aktivitását, valamint a redukált és oxidált glutation (GSH-GSSG) arányát.

Az eredmények szinte minden vizsgált paraméter esetében alátámasztották az oxidatív stressz jelenlétét mindkét vizsgált anyag felvételét követően. A lipidperoxidációs folyamatok markereként ismert MDA koncentrációja szignifikánsan megnövekedett a legmagasabb dózisban adagolt deltametrin és tebukonazol hatására. Ezen kívül a SOD aktivitása szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a legmagasabb deltametrin koncentráció kivételével minden esetben a kezelt állatokban, mint a kontrollcsoportban, s mivel a SOD az egyik legfontosabb antioxidáns hatású, a redox rendszer elsődleges védvonalaként szolgáló enzim, a kapott eredmények az antioxidáns védelmi rendszer zavarára, lassulására utalhatnak, mely oxidatív stressz fokozott kockázatára enged következtetni. A GSH-GSSG arány minden kezelt csoportban szignifikánsan csökkent, jól reprezentálva ezzel a méhek agydúcában végbemenő oxidációs folyamatokat és a redox homeosztázisban nagy jelentőséggel bíró glutation-rendszer kimerülését. Ezen túlmenően a pentóz-foszfát ciklusban kulcsszerepet játszó G6PDH esetében szintén szignifikáns enzimaktivitás-csökkenést tapasztaltunk, mely gátló hatások hozzájárulhatnak a glutation-rendszer kimerüléséhez.

A kutatásunk során nyert eredményeink alátámasztották a feltevést, hogy a deltametrin és a tebukonazol fokozott mértékű oxidatív stressz kialakulásához vezethet a méhek központi idegrendszerében, mely hatások közrejátszhatnak számos további jelentős méhegészségügyi probléma, így például a méhek eltűnésével járó, máig sem teljes mértékben tisztázott kóroktanú kolóniaösszeomlás kórkép kialakulásában.

Summary

Among the many causes of pollinator decline, which is a growing ecological and economic problem worldwide, our research aimed to investigate oxidative stress caused by acute pesticide exposure in the central nervous system of honeybees.

Deltamethrin was used throughout the investigation as a representative of the pyrethroid ester insecticide group besides tebuconazole, a triazole fungicide, since these compounds are widely and extensively used in modern agriculture. After gathering the honeybee subjects and forming the test along with the control groups, the aforementioned substances were administered in sublethal doses (deltamethrin: LD50/10 = 7,9 ng/bee/day, LD50/20=3,95 ng/bee/day, LD50/4 =1,975 ng/bee/day, tebukonazol: LD50/10=8,505 µg/bee/day, LD50/20 = 4,253 µg/bee/day, LD50/40 = 2,123 µg/bee/day) during a 48-hour period through the feeding solution. In this study, tissue samples obtained after preparation of the central nervous system were homogenized and colorimetric measurements were performed for the following parameters: malondialdehyde (MDA) concentration, superoxide dismutase (SOD) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzyme activity, as well as reduced and oxidized glutathione ratio (GSH-GSSG).

The results for almost all parameters supported the presence of oxidative stress for both tested substances. The MDA concentrations, which were used as a marker of lipid peroxidation, were significantly elevated by the highest tested dosages of deltamethrin and tebuconazole. In addition, a significantly decreased SOD enzyme activity was observed compared to the control group in every test group except for the one with the highest dose of deltamethrin, and since this enzyme serves as one of the most potent antioxidants in the first line of redox defense mechanisms, it can indicate a disturbance or slowing down of the antioxidant system, which may point to an increased risk of oxidative stress. The GSH-GSSG ratio significantly decreased in all test groups, which represents the oxidation processes taking place in the cerebral ganglion as well as the depletion of the glutathione system, which plays a key role in redox homeostasis. Furthermore, a significant decrease was observed in the activity of G6PDH, which is a key enzyme in the pentose phosphate pathway. These inhibitory effects may also contribute to the depletion of the glutathione system.

Our results confirm the hypothesis that deltamethrin and tebuconazole may lead to increased levels of oxidative stress in the central nervous systems of honeybees, which can contribute to the development of a number of major health problems, such as colony collapse disorder, which still has an unknown etiology and results in the disappearance of bees.

Irodalomjegyzék

1. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25:345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
2. Palmer M, Bernhardt E, Chornesky E, Collins S, Dobson A, Duke C, Gold B, Jacobson R, Kingsland S, Kranz R, Mappin M, Martinez ML, Micheli F, Morse J, Pace M, Pascual M, Palumbi S, Reichman OJ, Simons A, Townsend A, Turner M (2004) Ecology for a Crowded Planet. *Science* 304:1251–1252. <https://doi.org/10.1126/science.1095780>
3. Mwebaze P, Marris G, Budge G, Brown M, Potts S, Breeze T, Macleod A (2010) QUANTIFYING THE VALUE OF ECOSYSTEM SERVICES: A CASE STUDY OF HONEYBEE POLLINATION IN THE UK
4. Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B Biol Sci* 274:303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
5. Breeze TD, Bailey AP, Balcombe KG, Potts SG (2011) Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agric Ecosyst Environ* 142:137–143. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.020>
6. Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351–354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
7. Engel MS (1999) The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *J Hymenopt Res* 8:165--196
8. Almeida EAB, Porto DS (2014) Investigating Eusociality in Bees while Trusting the Uncertainty. *Sociobiology* 61:355–368. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.355-368>

9. Brouwers EVM, Ebert R, Beetsma J (1987) Behavioural and Physiological Aspects of Nurse Bees in Relation to the Composition of Larval Food During Caste Differentiation in the Honeybee. *J Apic Res* 26:11–23. <https://doi.org/10.1080/00218839.1987.11100729>
10. Tautz J (2008) *The Buzz about Bees*. Springer, Berlin, Heidelberg
11. Seeley TD, Buhrman SC (1999) Group decision making in swarms of honey bees. *Behav Ecol Sociobiol* 45:19–31. <https://doi.org/10.1007/s002650050536>
12. Barron AB, Oldroyd BP, Ratnieks FL (2001) Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behav Ecol Sociobiol* 50:199–208. <https://doi.org/10.1007/s002650100362>
13. Free JB (1987) *Pheromones of Social Bees*. Comstock Pub. Associates
14. Grüter C, Farina WM (2009) The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends Ecol Evol* 24:242–247. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.12.007>
15. Dainat B, Vanengelsdorp D, Neumann P (2012) Colony collapse disorder in Europe. *Environ Microbiol Rep* 4:123–125. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
16. Evans JD, Chen Y (Judy) (2021) Colony Collapse Disorder and Honey Bee Health. In: *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 229–234
17. Vanengelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One* 4:e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
18. Peck DT (2021) The Parasitic Mite *Varroa destructor*. In: *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 235–251
19. Bernardi S, Venturino E (2016) Viral epidemiology of the adult *Apis Mellifera* infested by the *Varroa destructor* mite. *Heliyon* 2:e00101. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00101>

20. Milbrath M (2021) Honey Bee Bacterial Diseases. In: Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner. John Wiley & Sons, Ltd, pp 277–293
21. López-Urbe MM (2021) Wild Bees. In: Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner. John Wiley & Sons, Ltd, pp 81–91
22. Jumarie C, Aras P, Boily M (2017) Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere* 168:163–170.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056>
23. Betteridge DJ (2000) What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3–8.
[https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
24. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18:6104–6111.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203128>
25. Bafana A, Dutt S, Kumar A, Kumar S, Ahuja PS (2011) The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J Mol Catal B Enzym* 68:129–138.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.007>
26. Nikolenko A, Saltykova E, Gaifullina L (2012) Molecular Mechanisms of Antioxidant Protective Processes in Honey Bee *Apis Mellifera* A. G. Nikolenko, E. S. Saltykova, L. R. Gaifullina. pp 279–293
27. Tian W-N, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi Q-C, Tian X, Stanton RC (1998) Importance of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity for Cell Growth *. *J Biol Chem* 273:10609–10617. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10609>
28. Yang H-C, Wu Y-H, Yen W-C, Liu H-Y, Hwang T-L, Stern A, Chiu DT-Y (2019) The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells* 8:1055.
<https://doi.org/10.3390/cells8091055>
29. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R (2012) Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 4:1247–1253.
<https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>

30. Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA (1994) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 310:273–281. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1167>
31. Hjelle JJ, Petersen DR (1983) Metabolism of malondialdehyde by rat liver aldehyde dehydrogenase. *Toxicol Appl Pharmacol* 70:57–66. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90179-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(83)90179-5)
32. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím Nova* 32:169–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
33. Olson JS, Ballou DP, Palmer G, Massey V (1974) The mechanism of action of xanthine oxidase. *J Biol Chem* 249:4363–4382
34. Joannis DR, Storey KB (1998) Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem Mol Biol* 28:23–30. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00070-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00070-2)
35. Shrivastava B (2011) Impact of Deltamethrin on Environment, use as insecticide and its bacterial degradation - A Preliminary study. *Int J Environm Sci* 0976-4402 Vol I:976–985. <https://doi.org/10.6088/ijessi.0010520027>
36. Barlow SM, Sullivan FM, Lines J (2001) Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food Chem Toxicol* 39:407–422. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00152-6)
37. Valentine WM (1990) Pyrethrin and Pyrethroid Insecticides. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 20:375–382. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50031-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50031-5)
38. Kaneko H (2010) Chapter 76 - Pyrethroid Chemistry and Metabolism. In: Krieger R (ed) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). Academic Press, New York, pp 1635–1663

39. Laufer J, Roche M, Pelhate M, Elliott M, Janes NF, Sattelles DB (1984) Pyrethroid insecticides: Actions of deltamethrin and related compounds on insect axonal sodium channels. *J Insect Physiol* 30:341–349. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(84\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(84)90089-1)
40. Zaim M, Aitio A, Nakashima N (2000) Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 14:1–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00211.x>
41. Rehman H, Aziz AT, Saggu S, Abbas ZK, Mohan A, Ansari AA (2014) Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *J Entomol Zool Stud* 2:60–70
42. Mestres R, Mestres G (1992) Deltamethrin: Uses and Environmental Safety. In: Ware GW (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. Springer, New York, NY, pp 1–18
43. Piccolomini AM, Whiten SR, Flenniken ML, O'Neill KM, Peterson RKD (2018) Acute Toxicity of Permethrin, Deltamethrin, and Etofenprox to the Alfalfa Leafcutting Bee. *J Econ Entomol* 111:1001–1005. <https://doi.org/10.1093/jee/toy014>
44. Chalvet-Monfray K, Sabatier P, Belzunces LP, Colin ME, Fléché C (1996) Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach. *Environ Toxicol Chem* 15:525–534. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150418>
45. Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S (2003) Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf* 56:295–301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)
46. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH (2006) Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 227:240–247. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.008>
47. Ma H, Song J, Huang T, Lü X, Xu K, Sun X (2009) Molecular Structure, Theoretical Calculation and Thermodynamic Properties of Tebuconazole. *Chin J Chem* 27:1035–1040. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200990173>

48. Cui N, Xu H, Yao S, He Y, Zhang H, Yu Y (2018) Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. *Environ Sci Pollut Res* 25:25468–25475. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2587-9>
49. Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Sen Gupta S, Improvisi L, Marichal P, Odds FC, Provost F, Ronin O (1994) Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol Bi-Mon Publ Int Soc Hum Anim Mycol* 32 Suppl 1:189–202. <https://doi.org/10.1080/02681219480000821>
50. Zarn JA, Brüscheweiler BJ, Schlatter JR (2003) Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect* 111:255–261. <https://doi.org/10.1289/ehp.5785>
51. Bossche HV, Lauwers W, Willemsens G, Marichal P, Cornelissen F, Cools W (1984) Molecular basis for the antimycotic and antibacterial activity of N-substituted imidazoles and triazoles: The inhibition of isoprenoid biosynthesis. *Pestic Sci* 15:188–198. <https://doi.org/10.1002/ps.2780150210>
52. Albarrag AM, Anderson MJ, Howard SJ, Robson GD, Warn PA, Sanglard D, Denning DW (2011) Interrogation of Related Clinical Pan-Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains: G138C, Y431C, and G434C Single Nucleotide Polymorphisms in *cyp51A*, Upregulation of *cyp51A*, and Integration and Activation of Transposon *Atf1* in the *cyp51A* Promoter ∇ . *Antimicrob Agents Chemother* 55:5113–5121. <https://doi.org/10.1128/AAC.00517-11>
53. Becher R, Wirsal SGR (2012) Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:825–840. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4195-9>
54. Raimets R, Naudi S, Mänd M, Bartkevičs V, Smagghe G, Karise R (2022) Translocation of Tebuconazole between Bee Matrices and Its Potential Threat on Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus) Queens. *Insects* 13:45. <https://doi.org/10.3390/insects13010045>

55. Gang L, Jiyang X, Haikun G, Lu L, Xinju L (2021) Acute Toxicity and Primary Risk Assessment of 75% Tebuconazole·Azoxystrobin SP to Three Insect Species. *Asian J Ecotoxicol* 323–333. <https://doi.org/10.7524/AJE.1673-5897.20200706002>
56. Li S, Jiang H, Qiao K, Gui W, Zhu G (2019) Insights into the effect on silkworm (*Bombyx mori*) cocooning and its potential mechanisms following non-lethal dose tebuconazole exposure. *Chemosphere* 234:338–345. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.105>
57. Yang J-D, Liu S-H, Liao M-H, Chen R-M, Liu P-Y, Ueng T-H (2018) Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environ Toxicol*. <https://doi.org/10.1002/tox.22575>
58. Othmène YB, Hamdi H, Salem IB, Annabi E, Amara I, Neffati F, Najjar MF, Abid-Essefi S (2020) Oxidative stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat. *Chem Biol Interact* 330:109114. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109114>
59. Ferreira D, Unfer TC, Rocha H, Carlos K, Koakoski G, Barcellos L (2011) Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotropical Ichthyol* 10:215–220. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012000100021>
60. 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. *J Apic Res* 52:1–36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>
61. 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* 48:242–250. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0262-7>
62. Helmer SH, Kerbaol A, Aras P, Jumarie C, Boily M (2015) Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants

- in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Sci Pollut Res* 22:8010–8021.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>
63. Gauthier M, Aras P, Paquin J, Boily M (2018) Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Sci Rep* 8:16274.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34625-y>
64. Amin KA, Hashem KS (2012) Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC Vet Res* 8:45. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-45>
65. Şentürk M, Ceyhun SB, Erdoğan O, Küfrevioğlu Öİ (2009) In vitro and in vivo effects of some pesticides on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Pestic Biochem Physiol* 95:95–99.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.07.005>
66. Ceyhun SB, Şentürk M, Ekinci D, Erdoğan O, Çiltaş A, Kocaman EM (2010) Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 152:215–223. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.008>
67. Tang H-Y, Ho H-Y, Wu P-R, Chen S-H, Kuypers FA, Cheng M-L, Chiu DT-Y (2015) Inability to maintain GSH pool in G6PD-deficient red cells causes futile AMPK activation and irreversible metabolic disturbance. *Antioxid Redox Signal* 22:744–759.
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.6142>
68. Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, Brunet J-L, Badiou-Beneteau A (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem* 32:2117–2124.
<https://doi.org/10.1002/etc.2288>
69. Toni C, Ferreira D, Kreutz LC, Loro VL, Barcellos LJG (2011) Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere* 83:579–584.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.022>

70. Li S, Jiang Y, Sun Q, Coffin S, Chen L, Qiao K, Gui W, Zhu G (2020) Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 241:125129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125129>
71. Jiang J, Hu G, Zhang C, Zhao X, Wang Q, Chen L (2017) Toxicological analysis of triadimefon on endocrine disruption and oxidative stress during rare minnow (*Gobiocypris rarus*) larvae development. *Environ Sci Pollut Res Int* 24:26681–26691. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0317-3>
72. Ferreira D, da Motta AC, Kreutz LC, Toni C, Loro VL, Barcellos LJG (2010) Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79:914–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.024>
73. Kumar N, Awoyemi O, Willis A, Schmitt C, Ramalingam L, Moustaid-Moussa N, Crago J (2019) Comparative Lipid Peroxidation and Apoptosis in Embryo-Larval Zebrafish Exposed to 3 Azole Fungicides, Tebuconazole, Propiconazole, and Myclobutanil, at Environmentally Relevant Concentrations. *Environ Toxicol Chem* 38:1455–1466. <https://doi.org/10.1002/etc.4429>
74. Li Z-H, Zlabek V, Grabic R, Li P, Randak T (2010) Modulation of glutathione-related antioxidant defense system of fish chronically treated by the fungicide propiconazole. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 152:392–398. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.06.006>

Köszönetnyilvánítás

Elsődlegesen Dr. Mackei Máté témavezetőmnek szeretnék köszönetet mondani állhatatos munkájáért és fáradhatatlan támogatásáért, mellyel már az első perctől kezdve, a dolgozat témájának megfogásától kezdve, a kutatás és a vizsgálatok aprólékos és precíz, odafigyelést igénylő szakaszain keresztül egészen az utolsó simításokig mellettem állt és lehetővé tette ezen dolgozat létrejöttét. Köszönettel tartozom továbbá másik témavezetőmnek Dr. Mátyás Gábornak, ki egyben a Biokémiai Osztály vezetője is, hiszen az Ő segítségével kerülhettem közel a tanszékhez, emellett pedig szakmai tudásával és tapasztalatával végig segítette a munkámat. Köszönet illeti továbbá Dr. Neogrády Zsuzsanna Tanárnőt is, ki sok éves tapasztalatával és a hallgatók iránt tanúsított töretlen lelkesedésével mutatott utat a dolgozatírás útvesztőjében. Külön köszönöm Bartha Tibor Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy bekapcsolódhassak a tanszéken folyó kutatásba, valamint köszönettel tartozom minden egyes tanszéki dolgozónak, akik segítettek ennek a projektnek a megvalósulását. Végzősorán pedig köszönettel tartozom a páromnak és családomnak a felbecsülhetetlen támogatásért és kifogyhatatlan türelmükért, valamint megértésükért, melyet irántam tanúsítottak a munkám elkészülése során.

Kutatásunkat az ÚNKP-22-4-II. sz. pályázat támogatásával végeztük.