

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Élettani és Biokémiai Tanszék

Biokémiai Osztály



Az acetamiprid redox-rendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálata mézelő méhek agydúcában

Készítette:

Horváth Evelin

IV. évfolyamos állatorvostan-hallgató

Témavezetők:

Dr. Mackei Máté

ÁTE, Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

egyetemi adjunktus

Dr. Fébel Hedvig

ÁTE, Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

kutatóprofesszor

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Célkitűzések	6
Irodalmi áttekintés	7
Nyugati mézelő méh	7
A méhcsalád felépítése.....	7
A méhek ökológiai szerepe	9
A méhek fertőző betegségei	10
Elnéptelenedés szindróma (Colony Collapse Disorder, CCD)	10
Neonikotinoidok	12
Acetamiprid	13
Acetamiprid hatása gerincesekben.....	15
Oxidatív stressz.....	17
Anyag és Módszer	19
Begyűjtés és kezelés	19
Laboratóriumi mérések	21
Összfém- és -koncentráció (TPC) mérése.....	21
Hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂) koncentráció mérése	21
Malondialdehid (MDA) koncentráció mérése.....	21
Redukált-oxidált glutation (GSH-GSSG) arányának meghatározása	21
Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzimaktivitás mérése	22
Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás mérése	22
Statisztika.....	23
Eredmények.....	24
Hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂) koncentráció	24
Malondialdehid (MDA) koncentráció.....	25

Redukált-oxidált glutation (GSH-GSSG) koncentráció	26
Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzimaktivitás	27
Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás	28
Megbeszélés.....	29
Összefoglaló	33
Irodalomjegyzék	34
Köszönetnyilvánítás	40

Rövidítések jegyzéke

ABPV: acute bee paralysis virus, heveny méhbénulás vírus	LD50: letális dózis 50
ATP: adenzin-trifoszfát	MDA: malondialdehyd
BSA: bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin	nAChR: nikotinos acetyl-kolin receptor
CAT: kataláz	NADPH + H ⁺ : redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
CBPV: chronic bee paralysis virus, idült méhbénulás vírus	NMDA: N-methyl-D-aspartát
CCD: colony collapse disorder, kolónia-összeomlás kórkép	NO: nitrogén-monoxid
CYP450: citokróm P450	O ₃ : ózon
DWV: deformed wing virus, deformált szárny vírus	9-ODA: 9-oxodecensav
G6PDH: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz	PER: proboscis extension reflex, szájszerv nyújtási reflex
GSH: redukált glutation	RCS: reactive chlorine species, reaktív klór szabadgyökök
GSSG: oxidált glutation	RH: relative humidity, relatív páratartalom
GST: glutation-S-transzferáz	RNS: reactive nitrogen species, reaktív nitrogén szabadgyökök
H ₂ O ₂ : hidrogén-peroxid	ROS: reactive oxygen species, reaktív oxigén szabadgyökök
HRP: horseradish peroxidase, tormaperoxidáz	SOD: szuperoxid-dizmutáz
IAPV: israeli acute paralysis virus, izraeli heveny méhbénulás vírus	TBA: tiobarbitursav
JH: juvenilis hormon	TPC: total protein concentration, összfehérje-koncentráció

Bevezetés

A különböző beporzó rovarfajok kimagasló jelentőséggel bírnak az agrárium, az ökológia és az élelmiszeripar számára. A rohamosan gyarapodó népességszámmal párhuzamosan a fogyasztott élelmiszerek mennyisége is növekvő tendenciát mutat. Ezen élelmiszereknek jelentős hányada pedig olyan növényekből származik, melyeknek fejlődése beporzáshoz kötött [1]. Az elmúlt évtizedekben azonban hosszútávon és éves veszteséggént is jelentkezett a beporzó ízeltlábúak populációinak csökkenése. Ennek hátterében számos ok állhat, többek között a fertőző betegségek, kártevők (*Varroa destructor*), agrokémiai hatások [2], szállítás által okozott stressz, nem megfelelő takarmányozás, éghajlati változások [3], illetve az elektromágneses sugárzásnak való fokozott kitettség [4]. Mivel nem lehet megnevezni egy oki tényezőt a beporzók eltűnésének hátterében, ezért egy ezen faktorokat összefoglaló betegségként hivatkoznak rá. Ez a kolónia-összeomlás kórkép (Colony Collapse Disorder, CCD), mely globálisan is egyre nagyobb figyelmet kap. A kórkép tipikusan a méhcsalád dolgozóinak eltűnésével jár [5]. A kaptár így hátramarad a méhanyával, herékkel, fiasítással, valamint pollen- és mézraktárakkal. A család a munkáméhek nélkül azonban nem marad sokáig életképes, így elpusztul.

Célkitűzések

Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb mértéket ölt a beporzó rovarfajok számának csökkenése. Ez a probléma nemcsak ökológiai szempontból, hanem a mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára is drasztikus következményekkel jár. A beporzó rovarfajok eltűnésének hátterében számos tényező áll, melyek közül a kolónia-összeomlás kórkép az egyik legfontosabb, mely világszerte jelentős figyelmet kap. E kór kialakulásában több faktor játszik szerepet, köztük a különböző fertőző betegségek, a stressz által okozott negatív hatások, a természetes élőhelyek és a biodiverzitás csökkenése. Az említett faktorok közül is kiemelkedő szerepet tulajdonítanak az intenzív mezőgazdaság során alkalmazott növényvédőszernek való kitettségnek.

Az emberek által fogyasztott élelmiszer jelentős hányada olyan növényekből származik, melyek különböző beporzóktól függenek. Az agrárium számára kimagasló jelentőséggel bírnak a mézelő méhek, melyeknek populációi a beporzó rovarfajok legnagyobb hányadát adják. A rohamosan növekvő népességszámmal párhuzamosan az élelmiszerellátmánynak is növekednie kell, mely tendencia elérhetetlen lenne a mezőgazdaságban használt növényvédőszer használata nélkül. Ezen szerek azonban nem szelektívek, így negatív hatással vannak a nem célállatfajokra is, köztük a mézelő méhekre. A neonikotinoid inszekticidek is ilyen széles körben alkalmazott szerek, melyek befolyásolják többek között a méhek memóriáját és orientációs képességét. Az első generációs neonikotinoidok csoportjába tartozó acetamiprid világszerte biztonságosnak vélt hatóanyag, melynek alkalmazására kevésbé szigorú előírások vonatkoznak, mint például a szintén első generációs imidakloprid esetében. Hatásuk azonban tagadhatatlan a nem célállatfajokra, amit korábban számos tanulmányban bizonyítottak, azonban a mézelő méhekre mért következményeiről kevés elérhető kutatás létezik.

Jelen dolgozat célja az acetamiprid akut, szubletális hatásainak vizsgálata a nyugati mézelő méh (*Apis mellifera*) központi idegrendszerének redox-homeosztázisára. A felgyülemelő reaktív vegyületek miatt feltehetően kialakuló oxidatív stressz károsítja a méhek egészségét és potenciálisan hozzájárul a CCD kialakulásához. Kimutatásának és mértékének meghatározása céljából vizsgált paraméterek a H_2O_2 , valamint MDA koncentrációja, a GSH-GSSG aránya, továbbá a G6PDH és SOD enzimek aktivitása voltak. Eredményeink hozzájárulhatnak a jövőben a növényvédőszernek a biztonságosabb és tudatosabb használatához, figyelembe véve a beporzó rovarfajok sértetlenségét és egészségét.

Irodalmi áttekintés

Nyugati mézelő méh

A nyugati mézelő méh (*Apis mellifera*), Carl von Linné svéd természettudós rendszere szerint, az ízeltlábúak (Arthropoda) törzsébe, a rovarok (Insecta) osztályába, a hártyásszárnyúak (Hymenoptera) rendjébe, a méhfélék családjába (Apidae), a mézelő méhek (Apinae) alcsaládjába és az *Apis* nembe tartozik. Ebbe a nembe tartozó méhfélék valamennyien nektárt gyűjtenek és belőle mézet készítenek. A méhészkedés, méhgazdálkodás szempontjából azonban a nyugati- és a keleti mézelő méhnek (*Apis cerana*) van kimagasló jelentősége [6]. Jelen dolgozat a nyugati mézelő méhhez kapcsolatos vizsgálatokra tér ki.

A méhcsalád felépítése

A mézelő méhek a rovarok azon csoportjába tartoznak, melyeknek fejlődése teljes átalakulással (holometamorfózis) történik. Ez azt jelenti, hogy a lárva és a bebábozódás után kikelő rovar eltér mind morfológiában, mind viselkedésben. A fejlődés szakaszai: pete, álca (lárva), báb, kifejlett egyed. Az egészséges méhcsalád tagjait az általuk végzett munka alapján részarányosan, három kasztba lehet besorolni. A három kasztot a méhanya, a herék és a dolgozók jelentik. A munkásméhek egyedszáma a nyári periódusban hozzávetőlegesen 60.000 (ennek a harmada az áttelelő népesség), a herék száma néhány százra tehető, míg méhanya csak egy van [6]. A család ezen felosztási egyensúlyának a felborulása akár végzetes is lehet az egész kaptárra nézve, így a méhészeknek hatalmas felelőssége van abban, hogy méhészetükben észrevegyék az anyátlan vagy ályanyás méhcsaládokat. A méhek euszociális társadalomban élnek, ami azt jelenti, hogy csak az anya feladata a szaporodás, és minden más egyed a kaptárban ennek az utóda. A nászrepülés során 15-25 herével párosodik. A spermium a méhanya spermatheca-jában raktározódik, így az anya vagy megtermékenyített, vagy megtermékenyítetlen petét képes rakni. A megtermékenyített diploid sejtből később majd vagy dolgozó vagy újabb anya lesz, a megtermékenyítetlen haploid sejtből pedig here fog kifejlődni. A mézelő méhekben ez a haplodiploid ivarmeghatározási módszer egy egyedülálló embriogenezist segít elő [7]. Az anya a sikeres nászrepülés befejeztével kezdi el rakni petéit, amit élete végéig folytat. Ez természetes körülmények között négy-öt évet is jelenthet, viszont a méhészetekben a minőségi méhszaporulat érdekében legtöbbször 2-3 év után szelektálnak. A méhanya ezen kívül termel egy anyaterméknek nevezett vegyületet, a 9-oxodecensavat (9-ODA) [8]. Ez a vegyület

megakadályozza a munkásméhek petefészkeinek működését, továbbá, hogy a dolgozók az ő ideje alatt újabb anyát neveljenek. A herék egyetlen feladata a méhanya megtermékenyítése a nászrepülés során.

A dolgozók mind szaporodásra képtelen nőtények és az ő feladatkörük a legszéleskörűbb. A fiatalabb egyedek etetik az álcákat és az anyát, takarítanak, őrködnek vagy építenek. A tájékozódó kirepülések után kezdődik meg a munkásméh kaptáron kívüli munkája, a virágpor, nektár és propolisz gyűjtése. A táplálékkeresést általában életük 21. napja után kezdik el, aminek hátterében a juvenilis hormon (JH) megnövekedett szintje áll [9]. Ez a hormon modulálja továbbá az oktopamin koncentrációját, ami a kirepülő munkásméhek agyának antenna lebenyében sokkal nagyobb arányban van jelen, mint a dajkáknak [10]. Bár a méhek nagyon fejlett tájékozódó képességgel rendelkeznek, mégis különböző hatásokra előfordulhat, hogy nem találják vissza a kaptárba. Ez a jelenség az eltájolás, melynek hátterében legújabb ismereteink szerint számos ok állhat. Ilyenek lehetnek például az elektromágneses sugárzásnak való fokozott kitettség [4], egyes hirtelen éghajlati változások [3], vagy éppen az agráriumban használt növényvédőszerrel szembeni fokozott kitettség [2].

Karl von Frisch mézelő méhek viselkedését érintő tanulmányában hívta fel a figyelmet a méhek táncának fontosságára. A táplálékkereső munkásméhek táncal képesek a legelőn a táplálékforrás megtalálásához szükséges távolságra és irányra vonatkozó információkat átadni. Ezen túl szagmintákat is hagynak, melyek könnyebbé teszik megtalálását [11]. A táncon kívül a feromonoknak is meghatározó szerepe van és az egyik legfejlettebb kommunikációs módot jelentik a társas rovarok között. A feromonok olyan kémiai anyagok, melyeket belső elválasztású mirigyek segítségével választanak ki. Ezen vegyületek elengedhetetlenek a méhtársadalom komplexitásának megőrzésében, és kellő mennyiségű rugalmasságot biztosítanak ahhoz, hogy a változó környezeti feltételekhez a kolónia egésze alkalmazkodni tudjon [12]. Ha a méheket kirepülésük után elfogták és egy tetszőleges helyen szabadon engedték, a kaptárig való visszatalálásig rögzített repülési útvonalak igazolták a méhek térképszerű térbeli memóriáját. A táplálékkereső méhek azt az irányt repülnek, amelyen elfogásukkor voltak, vagy pedig amelyet táncos kommunikáció során tanultak. A tájékozódó repülésre a lassú sebesség és a gyakori irányváltogatás a jellemző [13].

A méhek ökológiai szerepe

Az élet a földön rendkívül fontos természet adta javaktól függ, ezek az úgynevezett ökoszisztéma szolgáltatások. E szolgáltatások biztosítják az élőlények diverzitását, valamint az embereknek is szükséges ételkészlet, takarmány, fa, biomassza, vagy akár tüzelőanyag előállítását [14]. A beporzás is egy ilyen ökoszisztéma szolgáltatás, mely történhet abiotikus úton a szél és víz által, azonban a legtöbb virágos növénynek a biotikus, azaz más élőlény általi beporzásra van szüksége. Az állati beporzású növények átlagos aránya a mérsékelt égövi közösségekben a fajok 78%-át, a trópusi közösségekben pedig 94%-át érinti [15]. A mézelő méhek beporzó tevékenysége nélkülözhetetlen az agrárium számára, hiszen a beporzó rovarok összességét nézve ők vannak a legnagyobb számban jelen [14]. A nyugati mézelő méh világszerte 215 milliárd dollár értékű terményt poroz be [16]. Bár a méhcsaládok száma 1961 óta 45%-kal nőtt globálisan, a beporzóktól függő növények aránya 300%-kal emelkedett, ami nagy mértékben megterheli a beporzási kapacitást [17]. Az emberek által fogyasztott ételkészlet 35%-a olyan növényekből származik, melyek a rovarok általi beporzástól függenek [1].

A mézelő méhcsaládok száma azonban az elmúlt évtizedekben rohamosan csökken, mely csökkenés mind hosszú távon, mind éves veszteségként leginkább Európa és USA szerte jelentkezett [18]. A potenciálisan káros következmények közé tartozik a terméshozamok csökkenéséből eredő gazdasági veszteség, és az alacsonyabb termelékenység következményeként mezőgazdaságra gyakorolt szélesebb körű hatások [19]. A beporzók éppen ezért létfontosságúak a fenntartható mezőgazdaság és ételbiztonság szempontjából. A mézelő méhpopulációk jelenlegi hanyatlása hangsúlyozza annak szükségességét, hogy felmérjük, milyen gazdasági károkat okozhat ez a jövőben. Ennek a számbeli visszaesésnek több oka is lehet, ezek közé tartozik az élőhely és genetikai diverzitás csökkenése, különböző fertőző megbetegedések, peszticideknek való fokozott kitettség, valamint a hirtelen bekövetkező időjárási és éghajlati változások [20]. A pollinátor fajok számának csökkenéséből fakadó problémákra már korábban is számos alkalommal felhívták a figyelmet. Ezen beláthatatlan következményekkel járó katasztrófa megelőzése elengedhetetlen az emberiség és az általunk ismert ökoszisztéma fenntartása szempontjából.

A méhek fertőző betegségei

A mézelő méheket számos fertőző megbetegedés fenyegeti. Ezek egyike a varroa atkának (*Varroa destructor*) való kitettség, mely amellet, hogy a méhek hemolimfájával táplálkozik, a kifejlett egyedeket, a fiasítást és az imágót is károsítja. A varroa atka számos kórokozót terjeszt, köztük a retrovírusok közé tartozó deformált szárny vírust (deformed wing virus, DWV), mely elsősorban a fiasítást károsítja [21]. Egyéb vírusos megbetegedések közé tartozik a heveny méhbénulás vírus (acute bee paralysis virus, ABPV) és az idült méhbénulás vírus (feketekór, CBPV), melyek hatására a fő észrevehető klinikai tünet a remegés. Fontos megemlíteni még az izraeli heveny méhbénulás vírust (israeli acute bee paralysis virus, IAPV), melynek szintén nagy jelentőséget tulajdonítanak a kolóniaösszeomlás kialakulásában [22]. A légcsőatka (*Acarapis woodi*) szintén hemolimfával táplálkozik, melyhez a légzőszervhez tapadva jut hozzá. A mikrosporidiumok két faja, a *Nosema apis* és a *Nosema ceranea* pedig károsíthatják a méhek bélrendszerét, számos baktériumnak és vírusnak kitéve azt. Bár a *Nosema apis* a legrégebben diagnosztizált faj a méhekben, a nyugati mézelő méh esetében a legnagyobb károkat a *Nosema ceranea* okozza [23]. Baktérium általi jelentős megbetegedés a *Paenibacillus larvae* által okozott nyúlós vagy amerikai költésrothadás. Ez a Gram-pozitív, burokkal rendelkező és aerob spóráképző baktérium a fiasítás során a lárvákat fertőzi meg, elszaporodva azok közepbelében. Spóráképző lévén gyógyítása nehéz, hiszen azon szerek koncentrációja, ami elpusztítaná a spórákat, már a kolónia egészére is végzetes lenne. A betegség a hatályos szabályozásoknak megfelelően szigorúan bejelentési kötelezettség alá tartozik és az érintett családok elégetés révén történő megsemmisítését vonja maga után [24]. A méhegészségügy szempontjából számos további vírus, bakteriális, gombás megbetegedés vagy egyéb kártevő (pl. kis kaptárbogár; *Aethina tumida*) által okozott érintettség is további jelentőséggel bír, melyeket azonban, mivel nem képezik szorosan a dolgozat témáját, részleteiben nem ismertetünk.

Elnéptelenedés szindróma (Colony Collapse Disorder, CCD)

A nyugati nagyüzemi méhészeteket már számos kár fenyegette az idők során, kezdve a fent említett ízeltlábú kártevőktől a különböző betegségekig. A 2006-os év őszén, egy addig még soha nem látott, minden előzmény nélküli kiürülés történt a nyugati mézelő méheket érintő kolóniákban az Egyesült Államokban. A jelenség először a keleti partvidék mentén jelentkezett, de pár hónappal később a nyugati partvidéken is felütötte a fejét. Ezt a hirtelen

kaptár elnéptelenedést, mivelhogy korábban semmi ehhez hasonlót nem írtak le, ideiglenesen „Fall Dwindle Disease” -nek nevezték el, ami később jelentős nemzeti és nemzetközi figyelmet kapott [25]. A kórképre azóta leginkább Colony Collapse Disorder-ként (CCD), vagy magyarul elnéptelenedési szindrómaként hivatkoznak, hiszen a fő jellemzője a kolónia dolgozó méhállományának hirtelen elvesztése. A kolónia-összeomlás kórképet Európában először 2009-ben, Svájcban dokumentálták, azóta azonban már szinte az összes országban is visszavezethető volt rá a méhcsaládok pusztulása [26]. Annak érdekében, hogy számszerűsíteni lehessen az Egyesült Államok méhészeteiben 2006 szeptembere és 2007 márciusa között tapasztalt veszteségek mértékét és nagyságát, az Apiary Inspectors of America (AIA) 384 méhészeti tevékenységet, és összesen 143816 méhcsaládot vizsgált meg. Az átlagos méhvesztesség 31,8% és 37,6% között alakult. Ebből a bizonyítottan CCD-ben szenvedő méhészeteknek 45%-os, míg a CCD-ben nem szenvedő méhészeteknek 25,4%-os összvesztessége volt [27].

A kór egyik okának a növényvédelemre alkalmazott rovarirtószereket tartják, melyeknek való tartós kitettség megzavarhatja az idegi kolinerg és oktopaminerg jelátvitelt. Ez a neuronális jelátvitel gátlás a közvetlen bénító hatás mellett károsítja az olfaktorikus tanulást és memóriát, így a dolgozó méhek nem tudnak visszatérni a kaptárba [2]. A kaptár így hátramarad a királynővel, a herékkel és viszonylag bőséges méz- és pollenraktárral. A visszamaradt méhcsalád azonban nem tudja fenntartani magát a dolgozók nélkül, így végül elpusztul. A CCD egyéb kórképektől, például akut rovarirtószer-mérgezéstől való megkülönböztetése a kaptárban, vagy akörül lévő tetemek alapján történik. CCD esetén ugyanis az akut mérgezéstől eltérően nagyon kevés, vagy szinte egyáltalán nem látható halott méh a kaptár közelében. A kaptárkártevők inváziója és a lopással járó parazitizmus (kleptoparazitizmus) a szomszédos méhcsaládokból is késleltetve következik be [5]. A kolónia-összeomlás oka ma sem tisztázott, több faktor együttes hatása állhat a háttérben. A legvalószínűbbnek tartott okok közé tartozik az invazív varroa atka okozta veszteség, az izraeli akut paralízisvírus, a bélp parazita Nosema, a termesztett növényekre vagy méhkaptárakban előforduló atkák ellen alkalmazott peszticideknek való kitettség, szállítás okozta stressz, nem megfelelő takarmányozás [28], a királynők genetikai variabilitásának csökkenése, agrokémia alkalmazása a mezőgazdaságban és a rossz méhészeti gazdálkodás [29]. Végeztek már korábban vizsgálatot a kockázati tényezőknek való kitettség összehasonlítása érdekében a CCD által érintett és nem érintett populációk között. A 61 vizsgált változó közül, egyik mért érték sem bizonyult a CCD egyedüli okának. A kísérletek további eredményei alapján a CCD által érintett méhcsaládok kórokozó terhelése magasabb

volt, mint a kontrollcsoportoké, ezzel ellentétben a *Varroa destructor* parazita ellen használt atkaölő szer szintje alacsonyabb értéket mutatott [30]. Az egyéb kémiai hatásoknak való kitétel, a kaptárban alkalmazott rovarölő szerek és antibiotikumok, stressz hatásai is kedvezőtlenül hatnak a méhek immunrendszerére [31].

Neonikotinoidok

A neonikotinoidok az agráriumban jelenleg a legszélesebb körben alkalmazott szintetikus kártevőirtó szerek világszerte. A nikotinhoz hasonlóan a rovarok idegrendszerére hatnak a posztzinaptikus nikotinos acetil-kolin receptorokon (nAChR) keresztül [32]. Agonista hatásuk révén megváltoztatják a membránpotenciált, ami neuronális hiperexcitációhoz, végül bénuláshoz és halálhoz vezet. Gerincesekre nem tartják nagymértékben károsnak, mivel a vér-agy gát megakadályozza a központi idegrendszerben nagy koncentrációban való megoszlását [33]. A neonikotinoidokat az 1970-es években fejlesztették ki, a heterociklikus nitrometilének rovarölő szerként való felhasználásra történő fejlesztései során [34]. A Nihon Bayer Agrochem vegyészei 1984-ben fedezték fel az imidaklopridot, amikor az alapmolekulához hozzáadtak 3 piridilmetilcsoportot. Ez a hozzáadás csökkentette az emlősökre gyakorolt toxicitást, ugyanakkor megnövelte a rovarölő hatást [33]. A 8 leggyakoribb neonikotinoidot csoportosítani lehet generációk szerint. Az első generációba tartozók az imidakloprid, nitenpiram, tiakloprid, és acetamiprid. Második generációs a tiametoxam és a klotianidin. Harmadik generációba pedig a dinotefuran tartozik. Eddigi generációs vegyületek mindegyike rendelkezik egy vagy több amin csoporttal. A negyedik generációs szulfoxaflor ez alól az egyedüli kivétel [35]. 2015-ben a globális növényvédőszerpiac 25%-át a neonikotinoidok tették ki [36].

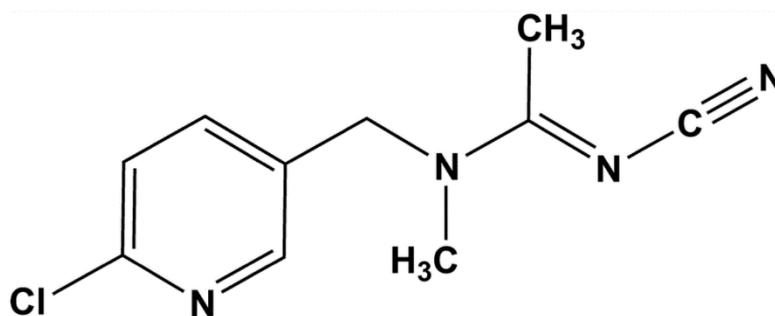
Mivel vízzoldhatóságuk lehetővé teszi a növényi szövetekben való hatékony megoszlást, alkalmazásukat követően jelen lesznek a virágporban és a nektárban is, így ezek a virágforrások mérgezővé válnak a beporzók számára. A neonikotinoidok hosszú távon kimutatható koncentrációja bár a növényvédelem szempontjából hasznos, azonban a vegyszerek károsító hatása is megmarad, még akkor is, ha az első alkalmazásra a virágozási időszakon kívül került sor [37]. Hosszabb időn keresztül megmaradhatnak a talajban is, így a kitétség a virágzáson túlra, a következő évre is nyúlhat. A hatóanyag megtalálható a növények guttációs folyadékában is, ezzel növelve a veszélyességét a nem célszervezetekre. A mézelő méhek így több fronton is ki vannak téve a hatóanyagoknak és azok potenciálisan káros hatásainak.

Az öt leggyakrabban használt neonikotinoid általi méz kontaminációt globálisan mérve, a vizsgált minták 75%-a tartalmazott minimum egy hatóanyagot. Ebből 30%-ból mutattak ki egy, 45%-ból kettő-öt, 10%-ból négy-öt féle neonikotinoidot. A többszörös kontamináció Észak-Amerikában bizonyult a legjellemzőbbnek. Az előfordulási gyakoriság az imidakloprid esetében volt a legmagasabb, és klotianidin esetében a legalacsonyabb. A pozitív mintáknál a maximális és átlag koncentrációk az acetamiprid és a tiakloprid esetében voltak a legmagasabbak [38]. Ezen peszticideknek való kitettség negatívan befolyásolta a méhek mozgását, viselkedését, tanulását és memóriáját. Ezeken túl még a dolgozók tájékozódását is megzavarták [39].

A neonikotinoidok károsítani képesek a mitokondriumokat, azok morfológiájának megváltoztatásával [40]. Ezek a patofiziológiai rendellenességek a méretben és a szerkezetben, gátolják az élettani funkciókat. A mitokondriumok majd minden sejtünkben megtalálható sejtorganellumok, melyek egyik legfőbb feladata az oxidatív foszforiláció és az adenzin-trifoszfát (ATP) szintézise, ami a hatóanyagnak való kitettség hatására sérül és sejtszintű energiahány lép fel. Ezen káros hatások mellett a neonikotinoidok feltehetően oxidatív stresszt indukálnak, amit a reaktív molekulák felszaporodásából eredő redox homeosztázis felborításával okoznak, ami a klinikai megfigyelések hátterében is állhat [41].

Acetamiprid

Az acetamiprid ((E)-N'-[(6-klóro-3-piridil)metil]-N²-ciano-N'-metilacetamidin) egy N-cianoamidinek közé tartozó, klórozott, első generációs neonikotinoid. Kémiai szerkezetét az **1. ábra** szemlélteti. Metabolizmusa emlősökben főképp a májban történik, olyan enzimek által, mint az aldehid-oxidáz és a citokróm P450 (CYP450) rendszer, majd legnagyobb mennyiségben a vizelettel ürül [42]. Először 1984-ben szintetizálták és 2002-ben került kereskedelmi forgalomba növények és haszonállatok számára. Az utóbbi évtizedben az acetamipridet széles körben használják mezőgazdasági, háztartási és közegészségügyi tevékenységekben a több szempontból is veszélyesebb organofoszfátok, karbamátok és piretroidok helyettesítésére [43].



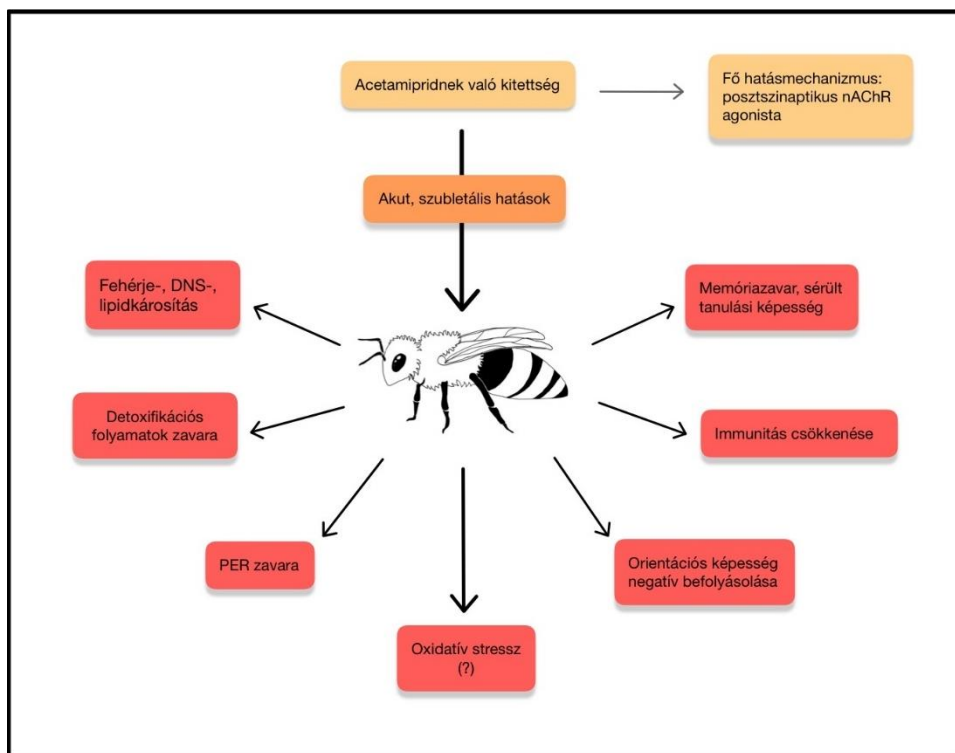
1. ábra Az acetamiprid kémiai szerkezete, Forrás: Silva és mtsai., 2019 [44]

Laboratóriumi tesztek kimutatták, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő neonikotinoidok közül a nitroszubsztituált vegyületek, mint például az imidakloprid, tiametoxam és klotianidin a legtoxikusabbak. A cianoszubsztituált vegyületek, mint az acetamiprid sokkal alacsonyabb LD50 értékeket mutattak. 2 µg/méh acetamiprid a torra cseppentve jelentősen csökkentette a mézelő méhek élettartamát, korai táplálékkereső aktivitást indukált, befolyásolta a munkásméhek körforgását és csökkentette a munkásméhek táplálékkereső kirepüléseit [45]. Az élettartam csökkenését ezen koncentráció alkalmazásával más kísérlet is bizonyította. 2 µg/méh hatóanyaggal kezelt méhek csoportjának a fele elpusztult a kísérlet 15. napjáig. Alacsonyabb dózissal kezelt csoportok esetében az elhullás 20. napon vagy később következett be [46]. Egy másik kísérlet eredményei szerint 5 mg/l acetamipridnek való tartós expozíció a lárvális fejlődés során negatívan hat a méhlárvák immunrendszerére és detoxifikációs folyamataira [47]. Az acetamiprid metabolitjaival végzett vizsgálatok esetén még 50 µg/méh esetében sem bizonyultak letálisnak topikális alkalmazás esetén [48].

A CYP450 enzimeknek fontos szerepük van az acetamiprid detoxifikációjában, és így a méhekre gyakorolt toxicitásra. Emiatt egyes hatóanyagok, mint a fungicidek közé tartozó azol típusú tebukonazol szigorú szabályozás alá esik. Ez ugyanis gátolja a CYP450 enzimek működését, amik így az acetamipridet képtelenek lebontani, ami a méhekre nézve fatális következményekkel jár [49]. Emiatt a tebukonazolt csak éjjel lehet alkalmazni, mivel nappal a táplálékkereső méhek nagymértékben ki lennének téve a káros hatásainak. Az acetamiprid alkalmazására kevésbé szigorú szabályok vonatkoznak, továbbá az egyetlen neonikotinoid, amely 2018-tól korlátozások nélkül használható a szabadföldi termesztésben az EU-ban is, engedélyét 2033. február 28-ig megújították a 2018/113-as rendelet értelmében.

Acetamiprid különböző dózisaival (2 µg/méh, 1 µg/méh, 0,5 µg/méh) kezelt házi méhek esetében az eredmények igazolták, hogy sérült mind a memória, mind a tanulási képesség, csökkent a szájszerv nyújtási reflex (proboscis extension reflex, PER) sikeressége, továbbá negatívan befolyásolta a munkáméhek hazatérő képességét [46].

Gerinces és gerinctelen állatokban is kimutatták a neonikotinoidok, ezzel együtt az acetamiprid által okozott fehérje-, DNS- és lipidkárosítást. Az így felszabaduló reaktív oxigén- (reactive oxygen species, ROS) és reaktív nitrogén szabadgyökök (reactive nitrogen species, RNS) oxidatív stresszt okoznak. A méhekkel ellentétben egyéb fajokban *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel igazolták, hogy az acetamipridnek való kitettség fokozza a ROS termelődését, ami felborítja az antioxidáns egyensúlyt [50]. A központi idegrendszer, különösen a kisagy érzékeny az oxidatív stresszre, a magas oxigénfogyasztás és többszörösen telítetlen zsírsavak, valamint az antioxidáns enzimek alacsony koncentrációja végett [51]. Az acetamiprid hatására mézelő méhekben bekövetkező káros hatásokat a **2. ábra** foglalja össze.



2. ábra Acetamiprid kitettség hatására bekövetkező káros következmények méhekben (Forrás: saját ábra)

Acetamiprid hatása gerincesekben

Emlősökben az alacsony affinitású nAChR-ok ellenére is neurotoxikus hatásokról számoltak be acetamiprid expozíciót követően. Hím patkányoknak szondán keresztül naponta, 28 napon át 10, 20 és 40 mg/ttkg acetamipridet adtak be. A tájékozódó memóriát

Morris-féle labirintussal vizsgálták, továbbá a hippocampuszt szövettanilag is értékelték. Az eredmények szerint az alacsony dózis csökkentette a hippocampusban a glutamát és az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok expresszióját, ezzel károsította a memória rögzülését, a magas dózis alkalmazása pedig a *gyrus dentatus*ban lévő idegsejtek degenerációját okozta [52]. Egy másik kísérletben a patkányokat 3 hónapig 3,14 mg/ttkg dózisban (LD50/60) kezelték. A mitokondriális citokróm-c aktivitás jelentős fokozódása az agysejtekben apoptózist indukált, továbbá a peszticidnek való kitettség megváltoztatta különböző neurotranszmitterek arányát, ami csökkentette a patkányok tanulási képességét [53]. 100 mg/kg dózisban 7 napon keresztül Sprague Dawley patkányoknak adagolt acetamiprid hatására szintén blokkolódott a tanulási képesség, továbbá a már kialakult memória visszahívása [54]. *In vitro* körülmények közt, újszülött patkányokból származó kisagyi neuronok tenyészetén is vizsgálták az acetamiprid káros hatását az idegfejlődés különböző szakaszaiban. Az acetamiprid nAChR-ra mért gerjesztése vagy deszenzitizációja volt megfigyelhető 1 $\mu\text{mol/l}$ -nél nagyobb koncentrációban, ami már negatív hatással lehet a fejlődő emlősök idegrendszerére, a neurotoxikus nikotinhoz hasonlóan [55]. Az acetamiprid idegrendszert károsító hatását zebradánióban is igazolták [56].

Nemcsak az idegrendszerben, de a reprodukív szervekben is károsodás figyelhető meg acetamiprid hatására. 35 napig kezelt Kunming hím egerek tesztoszteronra reagáló szerveinek, a herének, mellékherének, ondóhólyagnak és prosztatának a tömegét csökkentette, továbbá a spermiumok számát, életképességét és mozgékonyságát is negatívan érintette. Az acetamipridnek való fokozott kitettség ezzel összhangban a szérum tesztoszteron koncentrációját is szignifikánsan csökkentette. A vizsgálatok megerősítették továbbá, hogy a reprodukív funkciók károsodása az acetamiprid oxidatív stresszt okozó tulajdonsága miatt következett be [57]. 90 napon át, különböző dózisokkal (12,5 mg/kg, 25 mg/kg, 35 mg/kg) kezelt hím patkánycsoportokban is hasonlóan megfigyelték a tesztoszteron szintjének és spermiumok számának csökkenését. Továbbá lipidperoxidációt és a redukált glutation (gamma-glutamil-ciszteil-glicin, GSH) mennyiségének csökkenését okozta a herékben. Ez a toxikus hatás szintén az oxidatív stresszel hozható összefüggésbe [58]. Ugyanezen hatásokat hím tengerimalacokban is bizonyították, amiket 90 napon keresztül kezelték acetamipriddel [59].

A kételtű populációk csökkenésében is szerepet tulajdonítanak a neonikotinoidoknak, bár még kevés kutatás létezik ezen témában. Toxicitásuk összefügg nagy vízdékonyságukkal. Egy tanulmányban az acetamiprid akut toxicitását vizsgálták *Rana nigromaculata* ebihalakban. Az antioxidáns rendszer markerei, mint a szuperoxid-

dizmutáz (SOD), kataláz (CAT) és malondialdehid (MDA) koncentrációi is oxidatív stressz jelenlétét jelezték [60].

Oxidatív stressz

A prooxidánsok vagy reaktív vegyületek keletkezése az aerob anyagcsere természetes velejárói. Ezek ellensúlyozására különböző enzimatis és nem enzimatis antioxidáns rendszerek vannak jelen a különböző sejtekben és szövetekben. Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, ha a prooxidáns-antioxidáns egyensúly felborul a prooxidánsok javára. A legfontosabb prooxidánsok a ROS-ok csoportjába tartozó vegyületek. A ROS egy gyűjtőfogalom, amelybe különböző szabadgyökök és nem gyökös oxidáló anyagok tartoznak. A szabadgyökök külső elektronhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak, amittől nagy mértékben reakcióképesek és veszélyesek lesznek. Ilyen vegyületek a hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) és szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gyökök. A nem gyökös oxidáló anyagok stabilabbak, de előanyagaik a szabadgyököknek, amikké különböző behatásokra könnyen átalakulhatnak. A hidrogén-peroxid (H_2O_2) és az ózon (O_3) ilyen reaktív vegyületek. A ROS-ok fiziológiás esetben is keletkeznek különböző anyagcsere folyamatok során, és részt vesznek különböző enzimatis reakciókban, jelátvitelben, mitokondriális elektrontranszportban, nukleáris transzkripció faktorok aktiválásában, valamint a génexpresszióban [61]. A neutrofil granulociták továbbá granulumaikban mieloperoxidázt tartalmaznak, amely H_2O_2 és Cl^- felhasználásával hipoklórossavat képez antimikrobiális hatásának eléréséhez [62]. Ebből egy reaktív klór szabadgyök (reactive chlorine species, RCS) képződhet, a hipoklorit-gyök ($\text{ClO}^\bullet$). További fontos csoport az RNS-ek, melyek az arginin nitrogén-monoxid szintáz által nitrogén-monoxiddá (NO) történő bontásából keletkeznek [63]. Oxidatív stressz esetén DNS mutációk, a fehérjék térszerkezeti változásai okán funkciózavar, a telítetlen zsírsavak lipidperoxidációja révén pedig membránkárosodás következhet be. Az oxidatív stressz létrejöttét egyes enzimek is elősegíthetik, ilyen enzim például a xantin-oxidáz [64] és a piruvát-dehidrogenáz [65].

Ezen káros folyamatok ellensúlyozására lévő antioxidáns rendszert két csoportba lehet osztani aszerint, hogy enzimatis vagy nem enzimatis vegyületről van szó. A vitaminok közül az A-, E- és a C-vitaminok rendelkeznek antioxidáns tulajdonsággal, de a vitaminszerű vegyületek közé tartozó flavonoidok, továbbá a GSH is ide sorolhatók. A fontosabb enzimek pedig a SOD, CAT, glutation peroxidáz, glutation-S-transzferáz (GST), és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH).

A G6PDH enzim a pentóz-foszfát-ciklus oxidatív szakaszának első lépésében, glükóz-6-foszfátból készít 6-foszfo-glükono-laktont. Ezen átalakítás során redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) koenzimet termel, mely a reduktáz enzimeket feltöltve biztosítja a hidrogént a koleszterin és zsírsav szintézishez. De nemcsak ezen metabolikus folyamatokat segíti elő, hanem az egyik legfontosabb antioxidáns, a GSH oxidált alakjának visszaredukálását végző enzim, a glutation-reduktáz működését is. A mitokondriumokban zajló légzési lánc folyamata során nagy a valószínűség a ROS-ok keletkezésére. Az itt található antioxidáns és méregtelenítő enzimek közül a GSH-nak van a legfontosabb szerepe. A redox-egyensúly fenntartásával ellensúlyozza a kialakuló hidrogén-peroxidot, lipid-hidroperoxidokat, vagy akár különböző xenobiotikumokat. Ezen tulajdonságát különböző antioxidáns enzimek, mint a glutation-peroxidáz vagy a GST redukálásával éri el [66]. A G6PDH és a GSH így kitűnő markerei egy fennálló oxidatív stressznek, melyet antioxidáns ellensúlyozó tevékenységük közben bekövetkező kimerülésükkel jellemezhetünk.

A SOD az oxidatív stressz elleni védelem elsővonalas metalloenzime. Az aktív centrumában lévő fémion oxidációjával és redukciójával alakítja át a sejtben lévő szuperoxid anion szabadgyököt hidrogén-peroxidra és molekuláris oxigénre. A hidrogén-peroxidot ezt követően a kataláz alakítja tovább vízzé és oxigénné, vagy a glutation-peroxidáz GSH-val vízzé és GSSG-vé [67].

Oxidatív stressz esetén a felgyülemlett reaktív vegyületek károsítják a többszörösen telítetlen zsírsavakat, lipidperoxidációt okozva. Ilyenkor a zsírsavakból lipidgyökök majd lipid-peroxid keletkezik. A folyamat végén visszamaradó MDA koncentrációja a lipidperoxidáció mértékével arányosan nő [68]. Az acetamiprid hatására bekövetkező MDA koncentráció növekedését oxidatív stresszben más állatfajokban már egyéb kísérlettel is igazolták [57].

Anyag és Módszer

Begyűjtés és kezelés

A kísérletben felhasznált méhek egy Veszprém vármegyei családi méhészetből, Ugodról származnak. Azért, hogy az eredmények megbízhatóak és reprezentatívak legyenek, a vizsgálatba bevont méhcsaládok a kezelést megelőző három hónapban semmilyen gyógyszert, vagy vegyszeres készítményt nem kaptak. A kutatásban résztvevő méhcsaládok egészségügyi állapotát a munkát megelőző három hónapban szintén nyomon követtük annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk azok parazitamentességről (pl. varroa atka) valamint, hogy a családban nem áll fenn semmilyen egyéb fertőzés klinikai tünete sem. A kísérletbe bevont dolgozók kiválasztása, begyűjtése és a későbbi kezelési csoportok kialakítása véletlenszerűen történt a fenti méhcsaládok egyikéből. A begyűjtés Williams és munkatársai által már korábban leírt eljárás szerint történt [69] fiasítás nélküli, mézes keretéről a kora reggeli órákban. A befogáshoz használt méhgyűjtő ketrecek 30 cm x 20 cm nagyságúak voltak, melyekbe csoportonként 50 méhet helyeztünk el. A későbbi kezeléseket 25 ± 2 °C-on és 50-65% relatív páratartalom (relative humidity, RH) mellett végeztük. A befogás után egy 36 órás hozzászoktatási fázis következett, mely idő alatt még semmilyen kezelésben nem részesültek. Ez idő alatt egyedül víz és 50%-os szacharóz oldat állt *ad libitum* rendelkezésükre.

A rövid ideig tartó akkomodáció után az etetőoldatokat acetamipriddel egészítettük ki, a kontroll csoport mellett három különböző kezelési koncentrációt kialakítva. A kezelés 48 órán át tartott, és ez idő alatt az etetőoldatokat 8 óránként frissre cseréltük. A különböző csoportokban alkalmazott kezelési koncentrációkat az alábbi táblázat tartalmazza (**1. táblázat**).

1. táblázat Kezeléshez használt acetamiprid koncentrációk

Csoport	Alkalmazott koncentráció
Kontroll	-
Acetamiprid alacsony (LD50/40)	8,75 mg/l etetőoldat
Acetamiprid közepes (LD50/20)	17,5 mg/l etetőoldat
Acetamiprid magas (LD50/10)	35 mg/l etetőoldat

A kezelés során alkalmazott acetamiprid koncentrációkat korábbi tanulmányokban leírt eredmények alapján határoztuk meg [70, 71], figyelembe véve a méhek napi átlagos

takarmányfelvételét, mely megközelítőleg 41 µl/méh mennyiséget tesz ki [72]. Az általunk alkalmazott hatóanyagmennyiséget LD50 (letális dózis 50)/10, LD50/20 és LD50/40 koncentrációknak feleltethetők meg, mely modell alkalmas az acetamiprid akut, szubletális hatásainak részletes vizsgálatára [48, 73].

A kezelés befejeztével a gyűjtőketrecek szárazjégre helyezve a kísérletben felhasznált méhek exterminálásra kerültek. Ezután az egyetem Biokémiai Osztályának laboratóriumába való szállítását követően az állatok tárolása a mintafeldolgozásig -80 °C-on valósult meg. Óvatos kiolvasztás után az egyedek fejének eltávolítása történt, melyek további boncolása később jégen való hűtés mellett, sztereomikroszkóp alatt valósult meg. A kipreparált részek a központi idegrendszer nagy részét tartalmazták, így a méhek protocerebrumát, antenna és optikus lebenyét, valamint a subesophagealis gangliont is. Az így kapott minták homogenizálása (10 állat/csoport) Potter-Elvehjem homogenizátorral történt T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) oldatban, amit Pierce 1% Protease Inhibitor Cocktail oldattal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) egészítettünk ki. Ezt követően 10 percen keresztül, 5000 g-n történő centrifugálás következett, majd a kapott felülúszókat a későbbi mérések elvégzéséig továbbra is -80 °C-on tároltuk. A kísérletek során végzett laboratóriumi munkák egyik részfolyamatát a **3. ábra** szemlélteti.



3. ábra Laboratóriumi munka (Forrás: saját kép)

Laboratóriumi mérések

Összfehérje-koncentráció (TPC) mérése

A mintákkal elvégzett különböző paraméterek mérése előtt, a TPC-t határoztuk meg a standardizálhatóság, és a mintafeldolgozási eljárások során fellépő esetleges mérési pontatlanságok korrekciója céljából. Ehhez Pierce BCA Protein Assay Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, a gyártó által meghatározott előírásnak megfelelően. Standard oldatnak szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin, BSA) használtunk. 30 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően Multiskan GO 3.2 reader-rel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 562 nm-en olvastuk le az abszorbancia értékeket.

Hidrogén-peroxid (H_2O_2) koncentráció mérése

A H_2O_2 koncentrációt Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) felhasználásával határoztuk meg. Az Amplex Red reagens (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) a hidrogén-peroxiddal 1:1 sztöchiometriai arányban reakcióba lép, tormaperoxidáz (horseradish peroxidase, HRP) jelenlétében. Az így bekövetkező reakció során O_2 és fluoreszcens rezorufin keletkezik. Utóbbi mérésével adhatjuk meg a mintában eredetileg jelen lévő H_2O_2 mennyiségét. 50 μ l Amplex Red oldathoz 50 μ l szövethomogenizátumot adtunk 96 lyukú lemezen. 30 perces szobahőmérsékleten történő, fénytől védett inkubációt követően a fluoreszcens rezorufin mérését Victor X2 2030 microplate olvasóval végeztük (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Malondialdehyd (MDA) koncentráció mérése

A lipidperoxidáció mértékének meghatározása céljából végzett MDA méréséhez egy specifikus kolorimetriás tesztet, az MDA Assay Kit-et használtuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A gyártó által meghatározott eljárásnak megfelelően, 300 μ l tiobarbitursav (TBA) törzsoldathoz 100 μ l minta felülúszót adtunk. 1 óra, 95 °C-on történő inkubációt, majd jégen való lehűtést követően, 532 nm-en mértük az abszorbancia értékeket Multiskan GO 3.2 reader használatával.

Redukált-oxidált glutation (GSH-GSSG) arányának meghatározása

A GSH és GSSG koncentrációkat az eddigiekhez hasonlóan kolorimetriás tesztel mértük. Az alkalmazott Glutathione GSH/GSSG Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) használatakor 96 lyukú lemezre mértük fel a standardokat és a mintákat.

Ezekhez hozzápipettáztuk a gyártó által biztosított puffer elegyet. 60 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően minden lyukba került 20 µl Substrate Solution, Coenzyme Working Solution és Enzyme Working Solution. A glutation oxidált alakjának (GSSG) méréséhez a mintához a fentebb felsorolt oldatokon túl, egy Masking Solutiont is pipettáztunk. Majd további 10 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően 412 nm-en mértük az abszorbancia értékeket Multiskan GO 3.2 reader segítségével.

Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzimaktivitás mérése

A G6PDH enzimaktivitás méréséhez a Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Assay Kit-et alkalmaztuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A már előzőleg elkészített standard sort és mintákat felpipettáztuk a 96 lyukú lemezre, melyekhez hozzáadtuk még a G6PDH Assay Buffer-rel hígított és homogenizált mintákat. Ezután 46 µl G6PDH Assay Buffer, 2 µl G6PDH Substrate Mix, valamint 2 µl G6PDH Developer Mix felhasználásával elkészítettük a Master Reaction Mix-et, amiből aztán 50 µl pipettáztunk még minden lyukba. 450 nm-en lemértük a kezdeti abszorbancia értékeket, majd 37 °C-on, fénytől védetten inkubáltuk, miközben 5 percenként újabb mérést végeztünk egészen addig, amíg a legaktívabb minta abszorbanciája a legmagasabb standardénél magasabb értéket nem ért el. Az enzimaktivitás mértékét ezután a gyártó által megadott egyenlet alkalmazásával kaptuk meg. A kísérlethez felhasznált lemez a **4. ábrán** látható.



4. ábra Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz kolorimetriás méréséhez használt 96 lyukú lemez (Forrás: saját kép)

Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás mérése

A SOD vizsgálatához SOD Determination Kit-et használtunk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A 96 lyukú lemez mindegyikéhez 20 µl mintát, a vakhoz pedig

20 µl desztillált vizet mértünk fel. További 200 µL Working Solution került minden lyukba, majd az összekeverést követően a vak lyukakhoz 20 µl Dilution Buffer-t, továbbá a mintákhoz 20 µl Enzyme Working Solution-t pipettáltunk. 20 perces, 37 °C-on történő inkubációt követően az abszorbancia értékeket 450 nm-en olvastuk le. Ezután a gyártó által megadott képlet alapján határoztuk meg az enzimaktivitás mértékét.

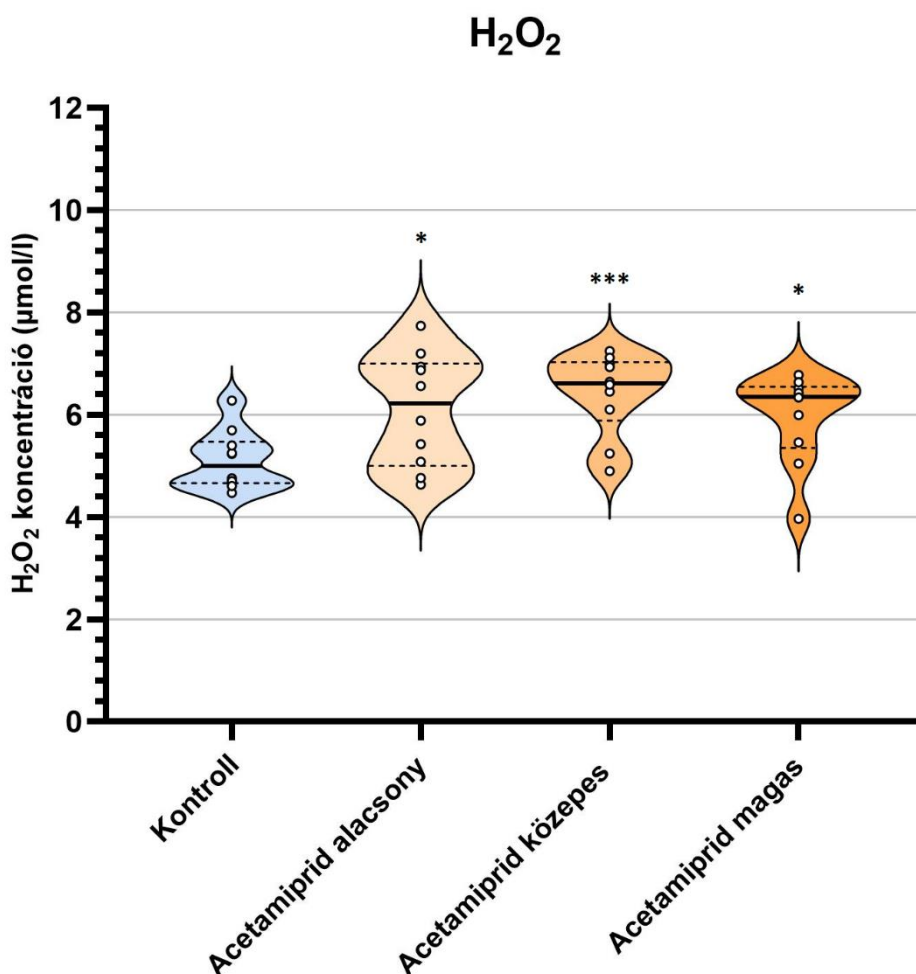
Statisztika

Az adatok feldolgozása és analízise a GraphPad Prism 9 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) használatával történt. A normális eloszlást Shapiro-Wilk-teszttel ellenőriztük. Az egyes csoportok közti szignifikáns eltéréseket Student típusú kétmintás t-próbák segítségével határoztuk meg. Az analízis során csoportoként n=10 mintával dolgoztunk.

Eredmények

Hidrogén-peroxid (H_2O_2) koncentráció

A mintákban mért hidrogén-peroxid koncentráció az acetamipriddel való kezelés hatására szignifikáns növekedést mutatott a kontrollcsoporthoz viszonyítva mindhárom kezelési koncentrációban, melyet az **5. ábra** szemléltet. A szignifikancia érték a legkisebb és a legnagyobb kezelési koncentrációkban megegyezett ($p < 0,05$), míg a közepes kezelési koncentráció esetében még ennél is alacsonyabb értéket mutatott ($p < 0,001$).

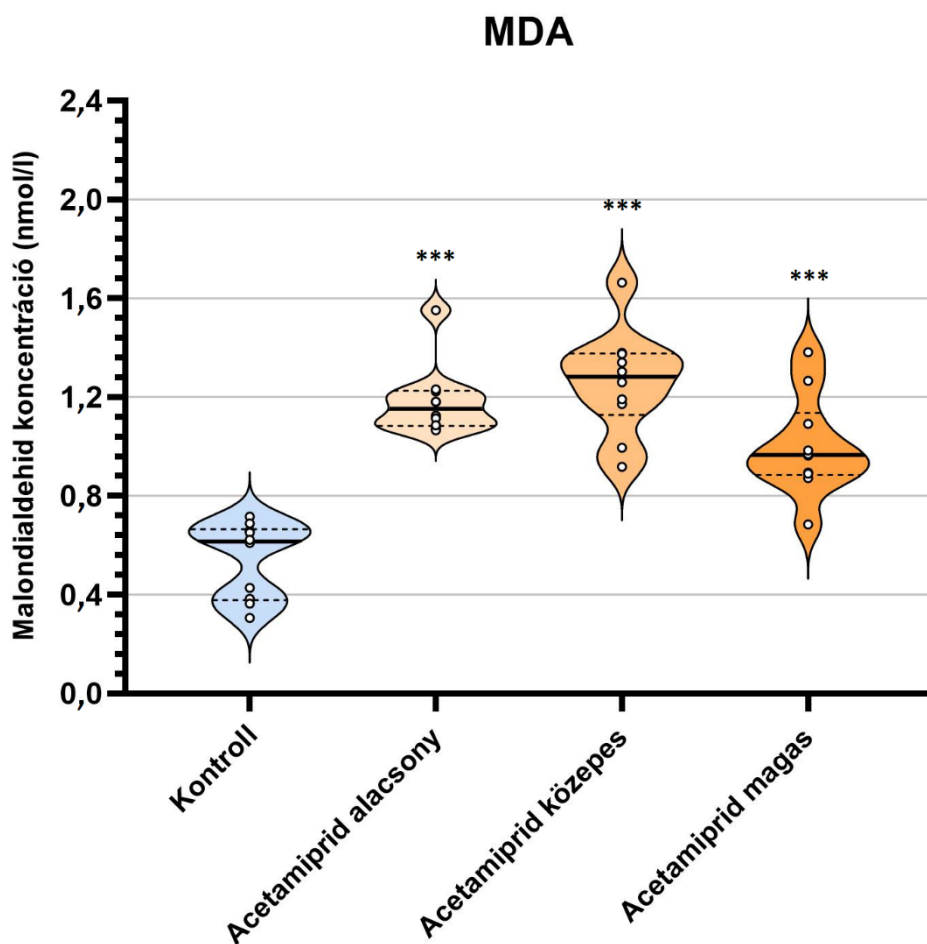


5. ábra Az acetamipriddel történő kezelés hatására bekövetkező hidrogén-peroxid koncentráció változása a különböző kezelési koncentrációkban a kontrollcsoporthoz viszonyítva, violin-ploton szemléltetve. A középső vastag fekete vonal a mediánt, a felette lévő szaggatott vonal a felső kvartilist (Q3), az alatta lévő szaggatott vonal pedig az alsó kvartilist (Q1) jelöli. Az ábrák felett lévő fekete csillagok a szignifikancia értékeket jelölik.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Malondialdehyd (MDA) koncentráció

A specifikus kolorimetriás teszttel végzett mérés eredményeként megállapítottuk, hogy az acetamipriddel való kezelés hatására szignifikánsan ($p < 0,001$) nőtt a malondialdehyd koncentrációja mindhárom kezelési koncentrációban a kontrollcsoporthoz viszonyítva, amit a **6. ábra** szemléltet.

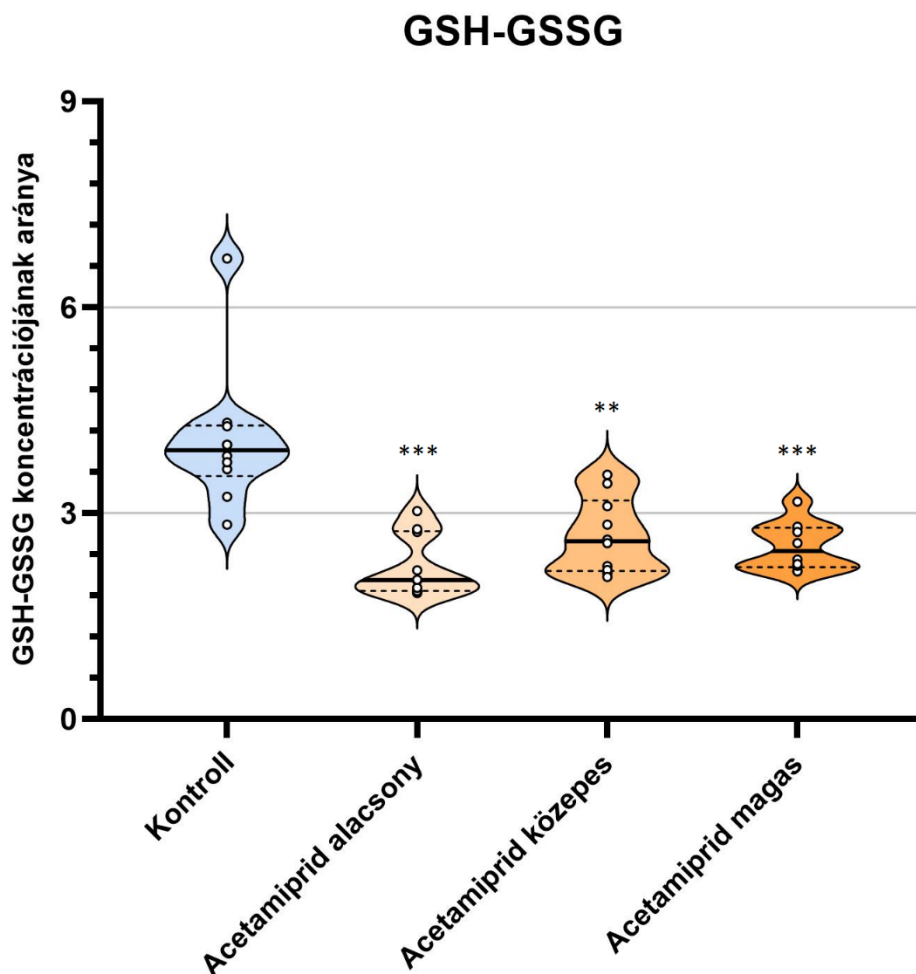


6. ábra Az acetamipriddel történő kezelés hatására bekövetkező malondialdehyd koncentráció változása a különböző kezelési koncentrációkban a kontrollcsoporthoz viszonyítva, violin-ploton szemléltetve. A középső vastag fekete vonal a mediánt, a felette lévő szaggatott vonal a felső kvartilist (Q3), az alatta lévő szaggatott vonal pedig az alsó kvartilist (Q1) jelöli. Az ábrák felett lévő fekete csillagok a szignifikancia értékeket jelölik.

*** $p < 0,001$

Redukált-oxidált glutation (GSH-GSSG) koncentráció

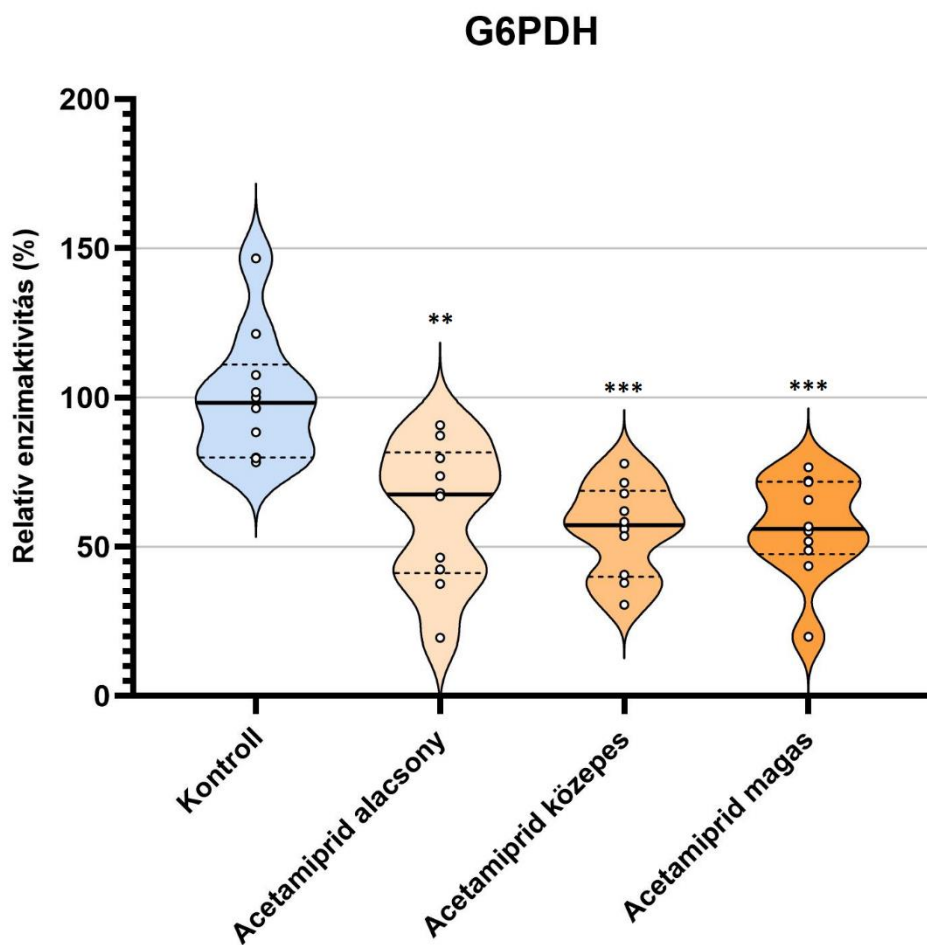
A glutation redukált és oxidált alakjának koncentrációit szintén kolorimetriás teszttel mértük, eredményeinket pedig a **7. ábra** mutatja. A redukált és oxidált glutation (GSH-GSSG) arány a legkisebb koncentrációval kezelt csoportban szignifikánsan csökkent ($p<0,001$), csakúgy, mint a közepes ($p<0,05$) és legnagyobb ($p<0,001$) kezelési koncentrációk esetében.



7. ábra Az acetamidriddel történő kezelés hatására bekövetkező GSH-GSSG koncentráció arányának változása a különböző kezelési koncentrációkban a kontrollcsoporthoz viszonyítva, violin-ploton szemlélítve. A középső vastag fekete vonal a mediánt, a felette lévő szaggatott vonal a felső kvartilist (Q3), az alatta lévő szaggatott vonal pedig az alsó kvartilist (Q1) jelöli. Az ábrák felett lévő fekete csillagok a szignifikancia értékeket jelölik. ** $p<0,05$ *** $p<0,001$

Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) enzimaktivitás

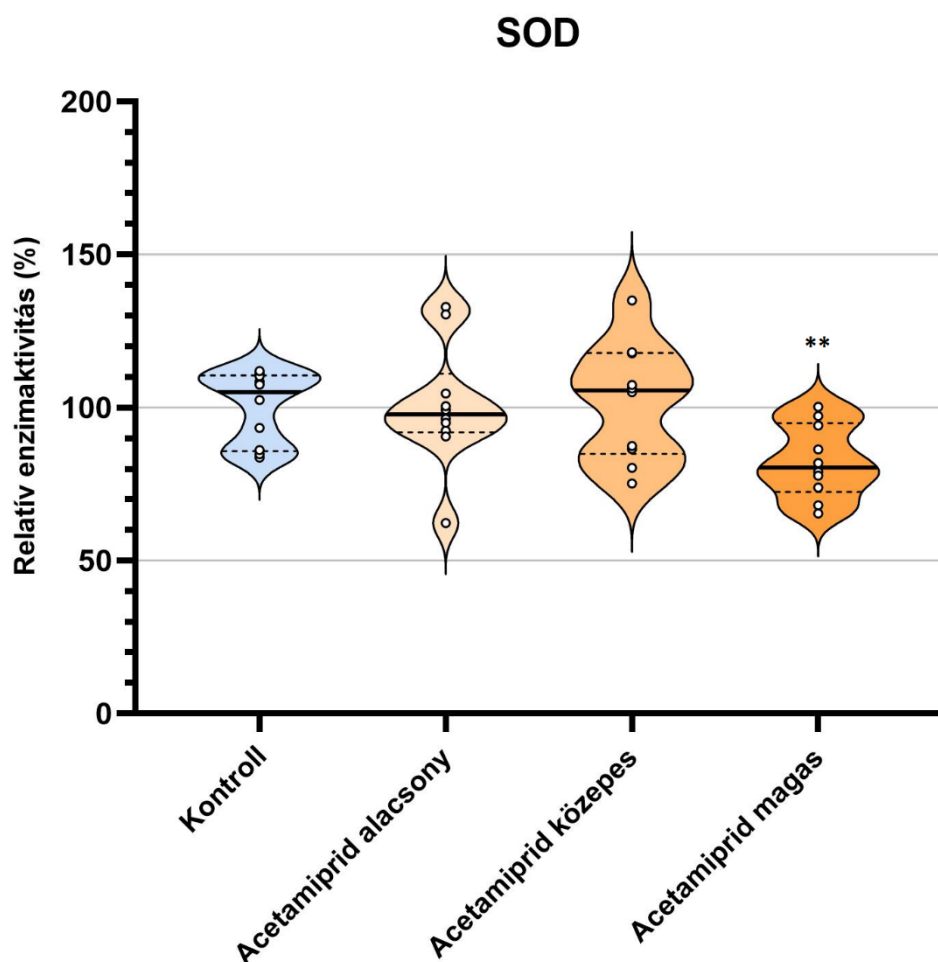
A mintákban mért glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz aktivitása a kezelés hatására szignifikánsan csökkent a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A szignifikancia értékek a közepes és legnagyobb kezelési koncentrációkban is $p < 0,001$ értéket mutattak. A legkisebb kezelési koncentrációban mért adat ehhez képest magasabb értéket mutatott ($p = 0,001$). A méréseink során kapott eredményeket a **8. ábra** szemlélteti.



8. ábra Az acetamidriddel történő kezelés hatására bekövetkező glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzimaktivitásának változása a különböző kezelési koncentrációkban a kontrollcsoporthoz viszonyítva, violin-ploton szemléltetve. A középső vastag fekete vonal a mediánt, a felette lévő szaggatott vonal a felső kvartilist (Q3), az alatta lévő szaggatott vonal pedig az alsó kvartilist (Q1) jelöli. Az ábrák felett lévő fekete csillagok a szignifikancia értékeket jelölik. ** $p = 0,001$ *** $p < 0,001$

Szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimaktivitás

A szuperoxid-dizmutáz mérése során eredményül kapott adatokat a **9. ábra** foglalja össze. Az acetamipridnek való kitettséget követően, a kezelés befejeztével a fentebb leírtakkal ellentétben nem mértünk szignifikáns eltérést mindhárom kezelési koncentráció esetén. A szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitása nem változott szignifikánsan sem a legkisebb, sem a közepes kezelési koncentráció alkalmazását követően, ugyanakkor szignifikánsan csökkent a legnagyobb kezelési koncentráció esetén ($p < 0,05$).



9. ábra Az acetamipriddel történő kezelés hatására bekövetkező szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitásának változása a különböző kezelési koncentrációkban a kontrollesoporthoz viszonyítva, violin-ploton szemlélítve. A középső vastag fekete vonal a mediánt, a felette lévő szaggatott vonal a felső kvartilist (Q3), az alatta lévő szaggatott vonal pedig az alsó kvartilist (Q1) jelöli. Az ábrák felett lévő fekete csillagok a szignifikancia értékeket jelölik. ** $p < 0,05$

Megbeszélés

A gyors ütemben növekvő világnépesség élelmiszerrel való ellátása érdekében a kémiai rovarölő szerek kimagasló jelentőséggel bírnak az intenzív mezőgazdasági rendszerben. A különböző rovarölőszer-csoportokon belül, a neonikotinoid inszekticidek a neurotoxinok fontos csoportját alkotják, melyek a posztzinaptikus nAChR agonistáiként viselkednek. Ez a receptor folyamatos aktiválódását okozza, ami a neurotoxicitás tüneteire vezet. Ilyen módon az idegi jelátvitel zavarásával fejtik ki hatásukat. A neonikotinoidok nagyobb aktivitással rendelkeznek a rovarok, mint az emlősök receptoraihoz, így a toxicitásuk is jelentősebb ezen fajok esetében [74].

Az acetamiprid egy első generációs neonikotinoidok közé tartozó klórpiridinil-vegyület. Továbbá cianoamidin csoportot tartalmaz, így kevésbé poláris és reaktív tulajdonságokkal rendelkezik, mint például a szintén első generációs nitroguanidin csoportot tartalmazó imidakloprid [48]. Az acetamipridnek való kitettség megváltoztatja a membránpotenciált, így megzavarja az idegi jelátvitelt, aminek következményeként neuronális hiperexcitációhoz, bénuláshoz, végül pedig a rovarok halálához vezet [50]. Bár már számos állatkísérletben bizonyították az acetamiprid dóziszfüggő toxicitását, illetve oxidatív stressz kialakulását különböző szervekben, a mézelő méhekre mért káros hatásokról és azok következményeiről jelenleg kevés elérhető kutatás létezik.

Jelen dolgozat célja az acetamipridnek való kitettség által okozott oxidatív stressz kimutatása a nyugati mézelő méh (*Apis mellifera*) központi idegrendszerében. A kísérletbe bevont méhcsaládokat korábbi tanulmányokban leírt eljárások szerint gyűjtöttük be és kezeltük az acetamiprid különböző koncentrációival, melyet az etetőoldatukhoz keverve *ad libitum* vettek fel. A legkisebb koncentrációval kezelt csoport etetőoldatába 8,75 mg/l, a közepes koncentrációval kezelt csoportéba 17,5 mg/l, a legmagasabb koncentrációval kezelt csoportéba pedig 35 mg/l acetamipridet kevertünk. Ezen koncentrációk csoportonként LD50/40, LD50/20 és LD50/10-nek feleltek meg, mellyel az akut, szubletális modell felállításához szükséges feltételeket biztosítottuk. Az oxidatív stressz kimutatására, illetve annak mérésére különböző biokémiai paramétereket használtunk fel.

Amennyiben a redox-homeosztázis felborul a prooxidánsok javára, oxidatív stressz alakul ki a szervezetben. A legfontosabb prooxidánsok a ROS-ok csoportjába tartozó vegyületek, melyek lehetnek szabadgyökös és nem gyökös eredetűek. A nem gyökös reaktív vegyületek közé tartozó H₂O₂ koncentrációjának változása lehetővé teszi az oxidatív stressz jelenlétének bizonyítását és mértékének mérését. Vizsgálataink során kapott eredmények a

H₂O₂ koncentrációjának szignifikáns emelkedését mutatták, mely az acetamipridnek való kitettség következményeként bekövetkező hatások eredményének tudható be. A H₂O₂ emelkedését és ezzel együtt oxidatív stressz kialakulását acetamiprid hatására más állatfajokkal végzett kutatásokban is bizonyították már. Wistar albínó hím patkányok központi idegrendszerében napi 3,14 mg/ttkg per os acetamipriddel való 90 napig tartó kezelés hatására szintén a H₂O₂ növekedése következett be, a felvételt követően bekövetkező kataláz enzimaktivitásának csökkenése mellett [75]. Ehhez hasonlóan, selyemhernyóval (*Bombyx mori*) végzett kutatás is a H₂O₂ koncentrációjának emelkedését bizonyította, különösen a kezelés 48. órájában. A selyemhernyókat 0,15 mg/l acetamipriddel kezelték, amit az állatok a jelen kutatáshoz hasonlóan szintén *per os* vettek fel [76].

Az oxidatív stresszben felszabaduló szabadgyökök számos egyéb hatásuk mellett lipidperoxidációt is okozhatnak. A sejtmembránokban lévő többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjával az MDA túlprodukciója következik be, melynek koncentrációja a lipidperoxidáció mértékével párhuzamosan növekszik, így e vegyület kiváló redox státusz marker. Kutatásunk során acetamipriddel történő kezelés hatására a MDA koncentrációjának szignifikáns emelkedését mértük mindhárom kezelési koncentrációban a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Wistar patkányokkal végzett kísérletben mutatták ki az MDA koncentrációjának szignifikáns emelkedését, 26,25 mg/ttkg és 105 mg/ttkg acetamiprid dózisokkal való szájon át történő kezelés után az állatok májában, veséjében és agyában [77]. Egy másik kutatásban szintén Wistar patkányokat kezelték 40 mg/ttkg acetamipriddel szájon át, ahol a fellépő lipidperoxidáció következményeként szintén az MDA koncentráció szignifikáns emelkedését mérték az állatok cerebellumában [78].

Oxidatív stressz esetén a glutation védekező rendszer aktiválódása miatt a redukált glutation (GSH) koncentrációja csökken, míg az oxidált glutation (GSSG) koncentrációja növekszik. A GSSG-t a glutation-reduktáz alakítja vissza GSH-vá, oxidatív stressz esetén azonban az enzim működése gyakran nem tud lépést tartani a keletkező GSSG mennyiségével, valamint gyakran a visszaalakításhoz szükséges NADPH+H⁺ mennyiségének párhuzamos csökkenése is bekövetkezik, így a GSH-GSSG arány csökkenés. A fentiekkel összhangban vizsgálataink során esetünkben is a GSH-GSSG arány szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető mindhárom kezelési koncentrációban. Egyéb kísérletekben szintén a GSH szint csökkenését mérték Wistar patkányban 3,14 mg/ttkg per os [79], és *Catla catla* pontyban 0,5 mg/l és 1 mg/l acetamipridnek való kitettséget követően [80].

A G6PDH a pentóz-foszfát-ciklus szabályozó enzime, amely a glükóz-6-foszfát 6-foszfo-glukono-laktonná történő átalakítását végzi, miközben $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -t termel, amelynek segítségével a glutation-reduktáz képes a GSSG-t visszaalakítani GSH-vá. Oxidatív stressz esetén azonban a G6PDH enzimaktivitásának az antioxidáns rendszer ellensúlyozó folyamatai révén történő kimerülése követ, ami által a nem megfelelő mennyiségben keletkező $\text{NADPH} + \text{H}^+$ nem lesz képes a glutation-reduktázon keresztül az oxidált glutationt visszaredukálni. Vizsgálataink során mérésünk eredményeül mi is a G6PDH aktivitásának szignifikáns csökkenését kaptuk minden kezelési koncentrációban, ezzel is bizonyítva a mintáinkban végbemenő oxidatív folyamatokat. Hasonló változásokról számoltak be a szintén neonikotinoidok csoportjába tartozó imidakloprid esetében, 10 napos kezelés után méhek torában. Acetamiprid esetében azonban az említett faktor kapcsán eddig semmilyen adat nem állt rendelkezésre.

A SOD az egyik legfontosabb antioxidáns enzim, ami katalizálja a szuperoxid-anion (O_2^-) hidrogén-peroxiddá és oxigénné történő átalakítását, az előbbit pedig majd a kataláz vagy glutation-peroxidáz alakítja tovább vízzé és oxigénné. A SOD aktivitásában szignifikáns változást csak a legmagasabb kezelési koncentrációban mértünk, ahol is az aktivitása szignifikánsan csökkent. Bár az antioxidáns tevékenysége révén aktivitásának az emelkedését várnánk, más kutatásokban is számoltak be hasonló eredményről. Egy másik kutatásban Wistar hím patkányokat kezeltek szájon át az acetamiprid különböző koncentrációival. A legkisebb kezelési koncentrációban 10,85 mg/ttkg, a közepes kezelési koncentrációban 21,7 mg/ttkg, a legmagasabb kezelési koncentrációban pedig 43,3 mg/ttkg acetamipriddel kezeltek, amik LD50/20, LD50/10 és LD50/5 dózisoknak feleltek meg. A SOD aktivitása szignifikáns dóziszfüggő csökkenést mutatott a magasabb dózissal való kezelés esetén, hasonlóan a mi eredményeinkhez [81]. Egy másik kísérletben 8 hetes Wistar patkányokat kezeltek alacsony (27,5 mg/ttkg), közepes (50 mg/ttkg) és magas (110 mg/ttkg) koncentrációjú acetamipriddel szájon át. Eredményül itt is a SOD aktivitásának csökkenését kapták az állatok májában a közepes és a magas kezelési koncentrációk esetében [82]. Valószínűleg a SOD enzim aktivitásának csökkenése szintén nagymértékben hozzájárulhat olyan káros folyamatok kialakulásához, mint amilyen az esetünkben is megfigyelt MDA emelkedés és következetes lipidperoxidáció.

Kutatásunk és abban elért eredményeink újszerűek, ugyanis az acetamiprid redox-rendszerre gyakorolt hatásaira kevésbé térnek ki az egyes tanulmányok, továbbá a beporzó ízeltlábúakra specifikus kutatások száma is meglehetősen kevés. Az acetamiprid kitettség nem célállatfajokra kifejtett hatásait leginkább gerincesekben, ezen belül is elsősorban

emlősökön vizsgálták, azonban ökológiai és agrárgazdasági szempontból elengedhetetlen a beporzó rovarfajokra, különösen a mézelő méhekre mért hatások nyomon követése. Az „Egy Egészség” (One Health) szemlélet értelmében is kiemelkedő jelentőségű tudnunk az acetamiprid káros hatásainak következményeit a beporzó fajokra és következetesen a teljes ökoszisztémára.

A kutatásunk során nyert eredményeink alátámasztották a hipotézist, mely szerint az acetamipridnek való kitettség oxidatív stresszt okoz a nyugati mézelő méh központi idegrendszerében, mely a már korábban leírt tájékozódási, kognitív és egyéb nem specifikus zavarok megjelenésének hátterében állhat, így pedig hozzájárulhat a kolónia-összeomlás kórkép kialakulásához. Már a legkisebb kezelési koncentráció alkalmazásánál szignifikáns eltéréseket mértünk az egyes vizsgált paraméterek esetében, így az alacsony dózisú acetamiprid is ugyanannyira károsnak bizonyult, mint a magas, ezért nagyon veszélyes használata. Fontos megemlíteni, hogy mivel a témával kapcsolatban kevés elérhető tanulmány létezik, a munkánk során felmerülő kérdések megválaszolásához további vizsgálatok szükségesek. A kutatásunk során kidolgozott módszertan hozzájárulhat a jövőben különböző toxikológiai mérések elvégzéséhez, mely kutatások kivitelezése méhegészségügyi, ökológiai, agrárgazdasági és élelmiszerbiztonsági szempontból is közös érdek. Távlati célunkként továbbá a téma alapkutatási jelentősége mellett olyan vizsgálatok elvégzését tervezzük, melyek során protektív takarmánykiegészítők alkalmazására nyílna lehetőség a méhcsaládok védelmének elősegítése érdekében.

Összefoglaló

Az elmúlt évtizedekben a beporzó rovarfajok populációinak drasztikus csökkenése figyelhető meg, mely ökológiai és agrárgazdasági szempontból napjaink egyik legégetőbb problémáját jelenti. Ezen fajok eltűnésének hátterében számos ok állhat, többek között az egyre nagyobb visszhangot keltő kolónia-összeomlás kórkép, aminek kialakulásában több tényező szinergista hatása játszik szerepet. Ilyen faktorok közé tartozik az intenzív mezőgazdasági munka során alkalmazott növényvédőszernek való kitettség. A neonikotinoid inszekticidek csoportjába tartozó acetamiprid világszerte széles körben alkalmazott, biztonságosnak gondolt hatóanyag, melynek mézelő méhekre gyakorolt hatásainak további vizsgálata elengedhetetlen, ugyanis számos esetben leírtak a fajra vonatkozó negatív következményeket, az elérhető tanulmányok száma azonban igen kevés és nem adnak választ a kialakult hatások hátterében álló sejtszintű folyamatokra.

Jelen dolgozat az acetamiprid akut, szubletális hatásait vizsgálja a nyugati mézelő méh (*Apis mellifera*) agydúcának redox-homeosztázisára. A kísérletünkbe bevont méhek 50-50 egyedet tartalmazó csoportjait különböző koncentrációjú acetamipriddel kezeltük, amit *ad libitum* az etetőoldatukhoz keverve vettek fel (8,75 mg/l; 17,5 mg/l és 35 mg/l). A 48 óráig tartó kezelést követően nyert mintákban bekövetkező oxidatív stressz kimutatására és mértékének meghatározására a hidrogén-peroxid (H_2O_2), malondialdehid (MDA), glutation (GSH-GSSG), glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH) és szuperoxid-dizmutáz (SOD) koncentrációit és enzimaktivitását mértük.

Eredményeink alapján a vizsgált mintákban a H_2O_2 koncentráció szignifikáns növekedést mutatott mindhárom kezelési koncentrációban. A lipidperoxidációs folyamatokat, membránkárosodást jelző MDA koncentrációja is szignifikánsan emelkedett mindhárom csoportban. A GSH-GSSG arány szignifikáns csökkenést mutatott a kezelt csoportokban, ami a redox-homeosztázis fenntartásáért felelős glutation-rendszer kimerülését jelzi. Ezzel együtt a pentóz-foszfát-ciklus szabályozó enzimének, a G6PDH-nak enzimaktivitása is szignifikánsan csökkent minden csoportban. Az oxidatív stressz elleni védelem kulcsenzimének, a SOD-nak aktivitása szignifikánsan kisebb volt a legnagyobb kezelési koncentráció esetében a kontrollcsoporthoz viszonyítva, melynek hátterében az antioxidáns rendszer zavara állhat.

A kutatásunk során nyert eredmények alátámasztották a hipotézist, mely szerint az acetamipridnek való kitettség oxidatív stresszt okoz a mézelő méhek központi idegrendszerében, mely a más kutatócsoportok által megfigyelt kognitív károsodásban is közrejátszhat. Eredményeink az acetamiprid hatásainak részletes vizsgálata révén jelentősen hozzájárulhatnak a neonikotinoid inszekticidek beporzókra gyakorolt káros hatásainak vizsgálatához, mely jelentős szerepet játszhat a kolónia-összeomlás kórkép kialakulásában.

Irodalomjegyzék

1. Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tschamntke T (2006) 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>
2. Farooqui T (2013) A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochem Int* 62:122–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.020>
3. Wakgari M, Yigezu G (2021) Honeybee keeping constraints and future prospects. *Cogent Food Agric* 7:1872192. <https://doi.org/10.1080/23311932.2021.1872192>
4. Santhosh Kumar S (2018) Colony Collapse Disorder (CCD) in Honey Bees Caused by EMF Radiation. *Bioinformation* 14:521–524. <https://doi.org/10.6026/97320630014521>
5. Cox-Foster D, Conlan S, Holmes E, Palacios G, Evans J, Moran N, Quan P-L, Briesse T, Hornig M, Geiser D, Martinson V, VanEngelsdorp D, Kalkstein A, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Simons J, Lipkin W (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318:283–7. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>
6. Ruff János (2007) A méhészmester könyve. Szaktudás Kiadó Ház Zrt., Budapest
7. Pires CV, Freitas FC de P, Cristino AS, Dearden PK, Simões ZLP (2016) Transcriptome Analysis of Honeybee (*Apis Mellifera*) Haploid and Diploid Embryos Reveals Early Zygotic Transcription during Cleavage. *PLOS ONE* 11:e0146447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146447>
8. Wanner KW, Nichols AS, Walden KKO, Brockmann A, Luetje CW, Robertson HM (2007) A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *Proc Natl Acad Sci* 104:14383–14388. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705459104>
9. Elekonich M, Schulz D, Bloch G, Robinson G (2001) Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: Foraging experience and diurnal variation. *J Insect Physiol* 47:1119–1125. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00090-7)
10. Schulz DJ, Barron AB, Robinson GE (2003) A Role for Octopamine in Honey Bee Division of Labor. *Brain Behav Evol* 60:350–359. <https://doi.org/10.1159/000067788>
11. Gould JL (1974) Honey bee communication. *Nature* 252:300–301. <https://doi.org/10.1038/252300a0>
12. Bortolotti L, Costa C (2014) Chemical Communication in the Honey Bee Society. In: Mucignat-Caretta C (ed) *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
13. Menzel R, Greggers U, Smith A, Berger S, Brandt R, Brunke S, Bundrock G, Hülse S, Plümpe T, Schaupp F, Schüttler E, Stach S, Stindt J, Stollhoff N, Watzl S (2005) Honey bees navigate according to a map-like spatial memory. *Proc Natl Acad Sci* 102:3040–3045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408550102>
14. Kevan PG, Viana BF (2003) The global decline of pollination services. *Biodiversity* 4:3–8. <https://doi.org/10.1080/14888386.2003.9712703>
15. Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120:321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
16. Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68:810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
17. Aizen MA, Harder LD (2009) The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Curr Biol* 19:915–918. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.071>

18. Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, Daszak P (2013) Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth* 10:434–445. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0870-2>
19. Bauer, D. M., & Wing, I. S. (2010). Economic consequences of pollinator declines: A synthesis. *Agr. Resource Econ. Rev.*, 39, 368–383. <https://www.cambridge.org/core/journals/agricultural-and-resource-economics-review/article/abs/economic-consequences-of-pollinator-declines-a-synthesis/88F27F7491BAA6C831161992D62BA447>. Accessed 30 Jul 2023
20. Paudel YP, Mackereth R, Hanley R, Qin W (2015) Honey Bees (*Apis mellifera* L.) and Pollination Issues: Current status, impacts and potential drivers of decline. *J Agric Sci* 7:p93. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n6p93>
21. de Miranda JR, Genersch E (2010) Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 103:S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
22. Hou C, Rivkin H, Slabezki Y, Chejanovsky N (2014) Dynamics of the Presence of Israeli Acute Paralysis Virus in Honey Bee Colonies with Colony Collapse Disorder. *Viruses* 6:2012–2027. <https://doi.org/10.3390/v6052012>
23. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL (2009) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 1:110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>
24. Ebeling J, Knispel H, Hertlein G, Fünfhaus A, Genersch E (2016) Biology of *Paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:7387–7395. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7716-0>
25. D. vanEngelsdorp et al., “Fall Dwindle Disease: Investigations into the Causes of Sudden and Alarming Colony Losses Experienced by Beekeepers in the Fall of 2006,” December 15, 2006
26. 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>
27. VanEngelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes J (2007) An Estimate of Managed Colony Losses in the Winter of 2006 - 2007: A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America. *Am Bee J* 147:599–603
28. US EPA O (2013) Colony Collapse Disorder. <https://www.epa.gov/pollinator-protection/colony-collapse-disorder>. Accessed 18 Jul 2023
29. Beki B, Jelo M, Subi J (2014) HONEY BEE COLONY COLLAPSE DISORDER (*Apis mellifera* L.) -. 14:
30. 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>
31. Watanabe ME (2008) Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun. *BioScience* 58:384–388. <https://doi.org/10.1641/B580503>
32. Buckingham SD, Lapied B, Le Corrone H, Grolleau F, Sattelle DB (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200:2685–2692. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.21.2685>
33. Ensley SM (2018) Chapter 40 - Neonicotinoids. In: Gupta RC (ed) *Veterinary Toxicology* (Third Edition). Academic Press, pp 521–524
34. Bass C, Field LM (2018) Neonicotinoids. *Curr Biol* 28:R772–R773. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.061>

35. Xu X, Wang X, Yang Y, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Martínez-Larrañaga M-R, Wang X, Anadón A, Martinez M-A (2022) Neonicotinoids: mechanisms of systemic toxicity based on oxidative stress-mitochondrial damage. *Arch Toxicol* 96:1493–1520. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03267-5>
36. Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R (2015) The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic Biochem Physiol* 121:78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
37. Hopwood J, Vaughan M, Shepherd M, Biddinger D, Mader E, Black SH, Mazzacano C ARE NEONICOTINOIDS KILLING BEES?
38. Mitchell EAD, Mulhauser B, Mulot M, Mutabazi A, Glauser G, Aebi A (2017) A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358:109–111. <https://doi.org/10.1126/science.aan3684>
39. Christen V, Mittner F, Fent K (2016) Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environ Sci Technol* 50:4071–4081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00678>
40. Friol PS, Catae AF, Tavares DA, Malaspina O, Roat TC (2017) Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiidae) 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>
41. 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* 50:21–32. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9739-3>
42. Marfo JT, Fujioka K, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Mizukawa H, Aoyama Y, Ishizuka M, Taira K (2015) Relationship between Urinary N-Desmethyl-Acetamiprid and Typical Symptoms including Neurological Findings: A Prevalence Case-Control Study. *PLOS ONE* 10:e0142172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142172>
43. Phogat A, Singh J, Kumar V, Malik V (2022) Toxicity of the acetamiprid insecticide for mammals: a review. *Environ Chem Lett* 20:1453–1478. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01353-1>
44. Silva CF, Borges KB, Nascimento CS (2019) Computational study on acetamiprid-molecular imprinted polymer. *J Mol Model* 25:104. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-3990-y>
45. Shi J, Yang H, Yu L, Liao C, Liu Y, Jin M, Yan W, Wu XB (2020) Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Sci Total Environ* 738:139924. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139924>
46. 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* 50:553–563. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00669-w>
47. 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. *Environ Pollut* 266:115345. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115345>
48. Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23:371–378. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
49. Zhang Y, Chen D, Du M, Ma L, Li P, Qin R, Yang J, Yin Z, Wu X, Xu H (2021) Insights into the degradation and toxicity difference mechanism of neonicotinoid pesticides in honeybees by mass spectrometry imaging. *Sci Total Environ* 774:145170. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145170>
50. Zuščíková L, Bažány D, Greifová H, Knížatová N, Kováček A, Lukáč N, Jambor T (2023) Screening of Toxic Effects of Neonicotinoid Insecticides with a Focus on Acetamiprid: A Review. *Toxics* 11:598. <https://doi.org/10.3390/toxics11070598>

51. PUFA and their derivatives in neurotransmission and synapses: a new hallmark of synaptopathies | Proceedings of the Nutrition Society | Cambridge Core. <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/pufa-and-their-derivatives-in-neurotransmission-and-synapses-a-new-hallmark-of-synaptopathies/E81D0BD91D243863FCA51F2E0C7B9170>. Accessed 22 Aug 2023
52. Shamsi M, Soodi M, Shahbazi S, Omid A (2021) Effect of Acetamiprid on spatial memory and hippocampal glutamatergic system. *Environ Sci Pollut Res* 28:27933–27941. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12314-6>
53. Gasmi S, Chafaa S, Lakroun Z, Rouabhi R, Touahria C, Kebieche M, Soulimani R (2019) Neuronal Apoptosis and Imbalance of Neurotransmitters Induced by Acetamiprid in Rats. *Toxicol Environ Health Sci* 11:305–311. <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0417-1>
54. Mondal S (2014) Impaired Learning and Memory after a Week Long Exposure of Acetamiprid in Adult Rats. *Adv Anim Vet Sci* 2:543–548. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.10.543.548>
55. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H (2012) Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. *PLOS ONE* 7:e32432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032432>
56. Araujo G de F, Soares LOS, Junior SFS, Barreto de Carvalho LV, Rocha RCC, Saint’Pierre T, Hauser-Davis RA, Correia FV, Saggiaro EM (2022) Oxidative stress and metal homeostasis alterations in Danio rerio (zebrafish) under single and combined carbamazepine, acetamiprid and cadmium exposures. *Aquat Toxicol* 245:106122. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106122>
57. Zhang J, Wang Y, Xiang H, Li M, Li W, Ma K, Wang X, Zhang J (2011) Oxidative Stress: Role in Acetamiprid-Induced Impairment of the Male Mice Reproductive System. *Agric Sci China* 10:786–796. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60063-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60063-1)
58. Arıcan EY, Gökçeoğlu Kayalı D, Ulus Karaca B, Boran T, Öztürk N, Okyar A, Ercan F, Özhan G (2020) Reproductive effects of subchronic exposure to acetamiprid in male rats. *Sci Rep* 10:8985. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65887-0>
59. University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon., Kenfack A, Guiekep AJN, University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon., Ngoula F, University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon., Vemo BN, University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon., Bouli FPNO, University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon., Pamo ET, University of Dschang, Faculty of Agronomy and Agricultural Sciences, Department of Animal Sciences, P. O. Box 188 Dschang, Cameroon. (2018) Reproductive toxicity of acetamiprid in male Guinea pig (*Cavia porcellus*). *J Anim Sci Vet Med* 3:105–111. <https://doi.org/10.31248/JASVM2018.101>
60. 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* 305:135380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135380>
61. Bayr H (2005) Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 33:S498. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>
62. Winterbourn CC, Kettle AJ (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 29:403–409. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00204-5)
63. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM (2016) Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>

64. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH (1997) Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age* 20:127–140. <https://doi.org/10.1007/s11357-997-0012-2>
65. Fisher-Wellman KH, Gilliam LAA, Lin C-T, Cathey BL, Lark DS, Darrell Neuffer P (2013) Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H₂O₂-emitting source under conditions of nutrient overload. *Free Radic Biol Med* 65:1201–1208. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.008>
66. Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC (2009) Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11:2685–2700. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2695>
67. Younus H (2018) Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci* 12:88–93
68. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P (2004) [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiadomosci Lek Wars Pol* 57:453–455
69. 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>
70. 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>
71. 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>
72. 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>
73. Mackei M, Sebök C, Vöröházi J, Tráj P, Mackei F, Oláh B, Fébel H, Neogrady Z, Mátis G (2023) Detrimental consequences of tebuconazole on redox homeostasis and fatty acid profile of honeybee brain. *Insect Biochem Mol Biol* 159:103990. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103990>
74. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P (2015) A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res* 22:103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
75. Gasmi S, Rouabhi R, KEBIECHE M, aya S, Boussekine S, Chahinez T, Sarra H, Bouteraa Z, belgacem D (2016) Neurotoxicity of Acetamiprid in Male Albino Rats and the Opposite Effect of Quercetin. *Biotechnol Indian J* 12:14–22
76. Lu Z, Ye W, Feng P, Dai M, Bian D, Ren Y, Zhu Q, Mao T, Su W, Li F, Sun H, Wei J, Li B (2021) Low concentration acetamiprid-induced oxidative stress hinders the growth and development of silkworm posterior silk glands. *Pestic Biochem Physiol* 174:104824. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104824>
77. Doltade S, Lonare M, Raut S, Telang A (2019) Evaluation of Acetamiprid Mediated Oxidative Stress and Pathological Changes in Male Rats: Ameliorative Effect of Curcumin. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 89:191–199. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0934-0>
78. Dhoubib IB, Annabi A, Doghri R, Rejeb I, Dallagi Y, Bdiri Y, Lasram MM, Elgaaiied A, Marrakchi R, Fazaa S, Gati A (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* 24:27515–27524. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0331-5>
79. 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9901-9>
80. Veedu SK, Ayyasamy G, Tamilselvan H, Ramesh M (2022) Single and joint toxicity assessment of acetamiprid and thiamethoxam neonicotinoids pesticides on biochemical indices and antioxidant enzyme activities of a freshwater fish *Catla catla*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 257:109336. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109336>
 81. Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E, Neffati F, Bhouiri R, sallem A, Najjar MF, Hassine M, Mehdi M, Haouas Z, Ben Cheikh H (2016) Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res* 23:25191–25199. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7650-9>
 82. Devan RK, Mishra A, Prabu P, Mandal T, Panchapakesan S (2015) Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. *Toxicol Environ Chem* 97:1236–1252. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1092542>

Köszönetnyilvánítás

E rövid sorokban szeretném hálámat kifejezni mindazok felé, akik támaszaim voltak ezen dolgozat megírásának során. Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Mackei Máténak, aki az első perctől kezdve támogatott, motivált és hihetetlen odafigyeléssel kísért végig a dolgozat megírásának és a kísérletek lebonyolításának folyamán. Dr. Fébel Hedvignek, másik témavezetőmnek is köszönettel tartozom, hogy lektorálásával és építő kritikájával hozzájárult ezen dolgozat létrejöttéhez. Köszönet illeti továbbá a Biokémiai Osztály vezetőjét, Dr. Mátis Gábort, kinek segítségével kerülhettem közel a tárgy szeretetéhez és a tanszékhez. Külön köszönöm Dr. Bartha Tibor tanszékvezető úrnak, hogy lehetővé tette, hogy bekapcsolódhassak a tanszéken folyó tudományos kutatásba. Végül pedig köszönöm családomnak és barátaimnak a biztató szavakat, valamint, hogy mellettem álltak a dolgozat megírásához vezető út során.