

Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ

Természettudományi Kar

Állattani Tanszék

**Cyfluthrin növényvédőszer hatása feszültségfüggő
nátriumáramokra tenyésztett idegsejteken**



Konzulens:

Dr. Molnár Péter

Egyetemi docens

Készítette:

Varga Holda

Biológia Bsc

Szombathely

2014

Tartalom

1	Bevezetés	1
2	Célkitűzés.....	2
3	Irodalmi áttekintés.....	3
3.1	Toxikológia.....	3
3.1.1	A toxikológia és a farmakológia tudománya.....	3
3.1.2	Idegrendszer toxikológiája	5
3.1.3	A környezeti toxikológia, toxinok és az élővilágra gyakorolt hatásai ...	6
3.2	Növényvédőszeresek	9
3.2.1	A peszticidek alkalmazásának rövid története	10
3.2.2	Inszekticidek.....	11
3.2.3	Piretroidok.....	12
3.3	Cyfluthrin	13
3.4	Ioncsatornák és velük kapcsolatos betegségek	14
3.4.1	Ioncsatornák és típusaik	14
3.4.2	Betegségek	17
3.5	Ioncsatornákra ható vegyületek vizsgálati lehetőségei.....	18
3.5.1	Extracelluláris módszerek	18
3.5.2	Intracelluláris módszerek	19
3.6	Sejt- és szövetkultúrák felhasználása a toxikológiai kutatásban	20
3.6.1	Típusok	20
3.7	Patch clamp	21
3.7.1	Kialakulásának története	21
3.7.2	Általános elve	21
3.7.3	Patch clamp felhasználása a toxikológiában	23
4	Módszerek	24
4.1	Csirke idegsejt tenyészet készítése	24
4.1.1	Embrióagy kiperarálása	24

4.1.2	Médium	24
4.1.3	Neuronok disszociálása és kihelyezése fedőlemezre	24
4.2	Patch clamp mérés	25
5	Eredmények	26
5.1	Csirke neuron tenyészet.....	26
5.1.1	Felületkezelés	26
5.1.2	A tenyészetek időbeli fejlődése	26
5.2	Patch clamp mérések	26
5.3	Anyagok vizsgálata	27
5.3.1	Lidocaine (referencia nátriumcsatorna-blokkoló) hatása	28
5.3.2	Cyfluthrin hatása	29
6	Megvitatás	30
7	Köszönetnyilvánítás	31
8	Irodalomjegyzék.....	32

1 Bevezetés

Napjainkban számos olyan vegyszer van forgalomban, amivel szervezetünk nap mint nap találkozik. Vegyi anyagok találhatóak például az élelmiszerekben, a tisztítószerekben és a mezőgazdasági terményekben is. Ide sorolhatjuk az általánosan és széles körben alkalmazott növényvédőszeret. Ezek alapvetően jólétünket szolgálják, hiszen az emberi szempontból kártevők irtását végzik és a mezőgazdasági termelés hatékonyságát növelik, azonban fontos megvizsgálni nem elhanyagolható káros hatásait is. Ezek a vegyszerek környezetvédelmi problémát jelentenek és egészségkárosítók is lehetnek, hiszen funkciójuknál fogva mérgek. Használatukat különösen kockázatosá teszi, hogy nehezen bomlanak le, az élőlények szervezetében könnyen felhalmozódnak. Hatásuk lehet teratogén, mutagén, karcinogén, immunmoduláló. Magyarországon több, korábban engedélyezett peszticidről derült ki, hogy daganatkeltő hatású. A környezetbe kerülve nem csak az emberi szervezetre károsak, de megbetegíthetnek haszonállatokat, hal- és madárpusztulást is okozhatnak. Ezekből az okokból fontos vizsgálni a növényvédőszer hatóanyagait, hiszen saját érdekünk ismerni a környezetre és egészségünkre kifejtett hatásait.

Szakedolgozatom témája egy széles körben használt növényvédőszer hatóanyagának, a cyfluthrinnak a vizsgálata volt.

2 Célkitűzés

1. Növényvédőszeres, kiemelten a cyfluthrin toxikológiájának áttekintése az irodalom alapján
2. Ioncsatornákkal kapcsolatos betegségek, az ioncsatornák vizsgálatának lehetőségei, a patch clamp módszer bemutatása az irodalom alapján
3. Csirkeembrió agyából idegsejt tenyészet készítése
4. A cyfluthrin és a referencia vegyület lidocaine feszültségfüggő nátriumcsatornákra kifejtett hatásainak vizsgálata patch clamp módszerrel idegsejtenyészeteken

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Toxikológia

3.1.1 A toxikológia és a farmakológia tudománya

A farmakológia vagy gyógyszer-tan a kémiai anyagok, gyógyszerek és az emberi szervezet kölcsönhatásaival, a gyógyszerek fizikai-kémiai tulajdonságaival, gyógyító és toxikus hatásaival, a hatás módjával, a gyógyszer szervezeten belüli sorsával foglalkozó tudományág (Brassai 2010).

A gyógyszer-tanból önállósodott és alakult ki a toxikológia, mint tudomány és vele együtt saját fogalomrendszere. Feladata a különböző anyagok élő szervezetre gyakorolt káros fizikai, kémiai és biokémiai hatásának vizsgálata (ELTE1). A kémiai anyagok felszívódásának, hatásmechanizmusának, környezeti ártalmainak és toxikológiai határértékeinek vizsgálatával is foglalkozik. A káros hatások és a vegyi anyagok sokféleségének köszönhetően rendkívül széleskörű tudomány, amely ennek megfelelően különböző területekre osztható (Moreau 2007).

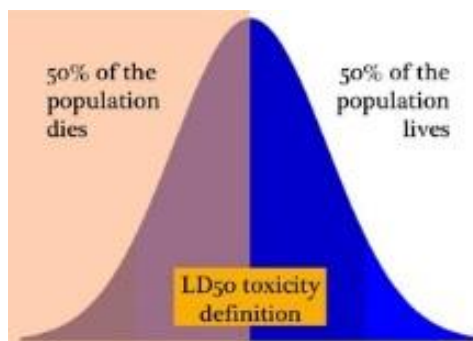
A szakmai tevékenységet illetően két fő kategóriát említhetünk: kísérletes és alkalmazott toxikológia. A kísérletes toxikológia állatokon illetve *in vitro* modelleken, például sejtenyészeten végzett kutató munkát jelent. Főként a mechanizmusok feltárásával és a kereskedelmi forgalmazásra szánt anyagok (pesticidek, gyógyszerek) leírásával foglalkozik. Az alkalmazott toxikológián belül a szakmai tevékenység alapján különböztetünk meg szakágakat. A klinikai toxikológia emberi mérgezésekkel, a foglalkozási toxikológia munkahelyi vegyületekkel, az igazságügyi toxikológia mérgezéses halálesetekkel foglalkozik, a szabályozás-toxikológusok kémiai vonatkozású szabályokat alkotnak, a környezeti toxikológia pedig a természetes környezetükben élő élőlényekre gyakorolt környezetszennyező hatású vegyületek hatásával foglalkozik (Perjési 2014).

A mérég fogalmára a mai napig nincsen egységes megfogalmazás. Paracelsus szerint minden anyag mérég, ha egy bizonyos mennyiséget meghaladva jut be a szervezetbe.

A gyakorlatban azonban azokat az anyagokat tekintjük toxikusnak, amelyek csekély mennyiségben egészségkárosodást vagy halált okoznak (Szűcs 2002).

A toxikus anyagokat csoportosíthatjuk toxicitásuk, kémiai szerkezetük, eredetük és a károsított célszerv szerint.

A toxicitás szerinti csoportosítás alapja a félhalálos dózis (Szűcs 2002). Ez a dózis az LD₅₀ értékkel jellemezhető, amely az anyag egyszeri adása után, két héten belül az állatok 50%-ának pusztulását eredményező mennyiségét jelöli (**1. és 2. ábra**). Az LD₅₀ mellett az illékony vagy bőrön keresztül felszívódó vegyületeket akut inhalációs és dermális mérgező hatásuk alapján is minősítik, ez az LC₅₀ érték (Hodgson 2004). Viszont ezek az értékek csak megközelítő tájékoztatást nyújtanak a humán toxicitásról, hiszen az állatkísérletek nem tükrözik pontosan az emberre kifejtett egészségkárosító hatásokat (Szűcs 2002).



1. ábra LD₅₀ vagy félhalálos dózis; az az érték, ahol a tesztelt vegyület egyszeri adása után két héten belül az állatok fele elpusztul (<http://www.quazoo.com/q/LD50>)

LD ₅₀ [mg/testtömeg kg]	minősítés	vegyület
LD ₅₀ <50	erős mérgező	nikotin, sztrichnin, paration
50<LD ₅₀ <500	mérgező	kadmium-klorid, allilalkohol, aldrin
500<LD ₅₀ <5000	gyenge mérgező	koffein, anilin, nátrium-klorid
LD ₅₀ >5000	mérgező kategóriába nem sorolható	etanol, etilénlikol, toluol

2. ábra A toxikus anyagok csoportosítása LD₅₀ értékük alapján (Szűcs 2002)

Kémiai szerkezetük alapján a mérgek lehetnek szervetlenek, ide tartoznak a savak a lúgok, a gázok, a fémek és vegyületeik, vagy a szerves toxinok, amelyek lehetnek alifások, aromások, alkoholok, aldehidek és szénhidrogének.

Eredetük szerint megkülönböztetünk növényi, állati, bakteriális, ásványi és szintetikus eredetű mérgeket (**3. ábra**, Szűcs 2002).

Csoportok	Példák
növényi	ópium, morfin
állati	kígyóméreg
bakteriális	tetanus
ásványi	higany, ólom
szintetikus	benzol

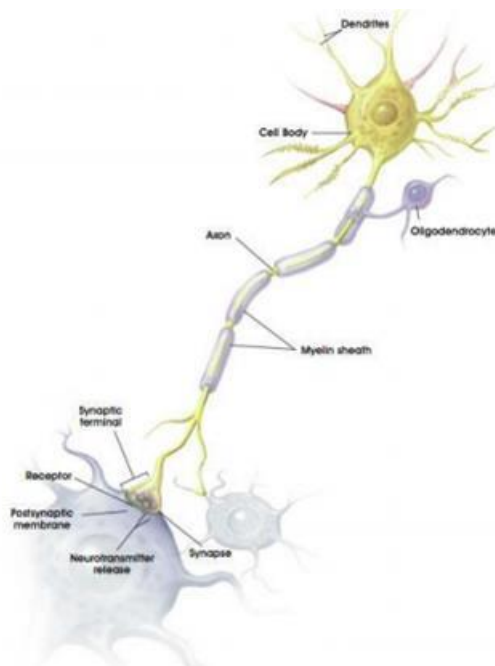
3. ábra Mérgező anyagok csoportosítása eredetük szerint példákkal (Szűcs 2002)

A károsított célszerv alapján is csoportosíthatunk. A célszerv vagy szervrendszer lehet a máj, a vese, a légzőrendszer, a bőr, a keringési és a szaporodó rendszer, vagy az idegrendszer (Tóthfalusi 2011).

3.1.2 Idegrendszer toxikológiája

Az idegrendszer kifejezetten érzékeny a mérgekre. Ennek oka, hogy morfológiailag és funkcionálisan is rendkívül összetett rendszer, a regenerációja korlátozott. Az agy és a neuronok fokozott glükóz és oxigén igényűek, érzékenyek a hipoxiára és a hipoglikémiára, valamint fontos megemlíteni a mérgek szinapszisokra, ion-csatornákra és a vér-agy gátra gyakorolt hatásait is (Bordás 2006).

A lipidoldékony mérgek eljutnak, majd felhalmozódnak az idegsejtekben, amelyek lipidben gazdagok. A károsító anyag által okozott elváltozás lehet rövid idejű, például oxigénhiány, vagy krónikus, mint az idegsejtek maradandó strukturális változása, illetve a neurotransmissziós zavarok (Szűcs 2002). Okozhatnak teljes vagy perifériás neuronpusztulást is (Tóthfalusi 2011). A idegsejtekre specifikus neurotoxinok célpontjai így lehetnek az axon (pl. kolchicin), a myelinhüvely, a szinapszis (pl. botulotoxin) vagy a feszültségfüggő csatornák (pl. DDT) (**4. ábra**).



4. ábra Idegsejt és részei (<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter8.aspx>)

Neurotoxikus hatású vegyi anyagok lehetnek fémvegyületek, szerves oldószerek, növényvédőszeresek vagy gázok (Szűcs 2002).

3.1.3 A környezeti toxikológia, toxinok és az élővilágra gyakorolt hatásai

A környezeti toxikológia az emberi tevékenység által a környezetbe juttatott mérgező anyagok vizsgálatával foglalkozó ága a toxikológiának (Szűcs 2002). Feladata a természeti környezet védelme; vizsgálja a levegőbe, a vizekbe és a táplálékba bekerülő toxikus anyagok szintjét. Populációk szintjén vizsgálja a toxicitást (Tóthfalusi 2011). Feltárja és azonosítja a környezeti veszélyforrásokat, valamint a korai ártalmak felismerésével hozzájárul a környezeti eredetű betegségek megelőzéséhez (Szűcs 2002).

A környezetünkbe kerülő különböző vegyi anyagok hatnak az ökoszisztéma szerkezetére és funkciójára, ezzel együtt pedig az emberre is veszélyesek. Ezek a toxikus anyagok globális problémát jelentenek. Azonban nem csak a szintetikus anyagok jelentenek veszélyt, hanem a természetes, szerves vagy szervetlen

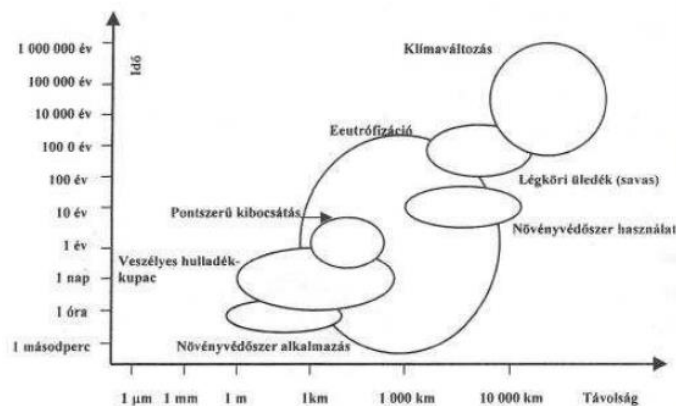
vegyületek is, amelyek a megszokottól eltérő mennyiségben, esetleg extrém értékben kerülnek környezetünkbe (Gruiz 2001).

A környezeti toxikológia multidiszciplináris tudomány, számos tudomány terület közreműködéséről beszélhetünk, úgy, mint az ökológia, biológia, biokémia, természetvédelem, stb. (Milinki 2014).

3.1.3.1 Környezetre káros vegyi anyagok

A környezetre káros vegyi anyagoknak három csoportját különböztetjük meg: légszennyező anyagok, toxikus fémek és szerves szennyező anyagok.

A légszennyező anyagok globális károkat is okozhatnak, így nagyon fontosnak számítanak; ide tartozik az ózon, a CO vagy a fluoridok (5. ábra). A toxikus fémek közé főként a nehézfémeket soroljuk: a leggyakrabban előfordulók az arzén, a cink, a higany és az ólom. Szerves szennyező anyagok a peszticidek, a kőolajszármazékok, az ipari vegyi anyagok, a fenolok stb. (Gruiz 2001).

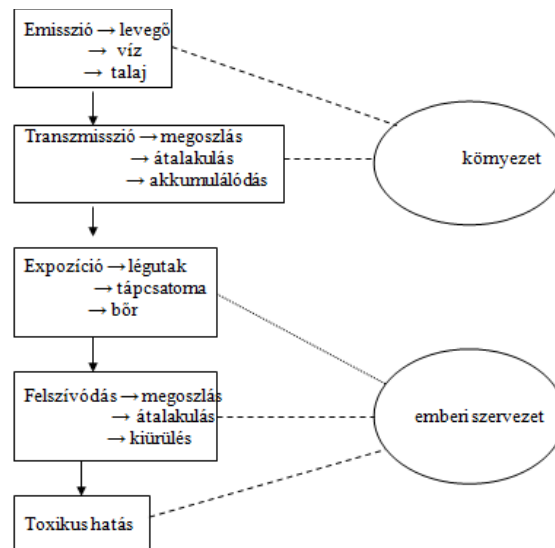


5. ábra A környezetkárosító hatások megoszlása időben és térben (Gruiz 2001)

3.1.3.2 Toxikus anyagok környezetbe kerülése és hatásuk

Az ember által a környezetbe kerülő veszélyes vegyületek toxikus hatásának több egymásra épülő folyamatát figyelhetjük meg (6. ábra). Az emisszió után a toxikus anyagok a levegőbe, a vízbe és a talajba kerülnek; ez a három alapvető környezeti elem vagy mátrix. Ezekből a mátrixokból növényi vagy állati szervezetekbe jutnak a

káros anyagok. Transzmissziójuk után, az expozíció során a bőrön, a légutakon vagy a tápcsatornán keresztül jutnak be az emberi szervezetbe, ahol egészségkárosító hatásukat kifejthetik (Szűcs 2002).



6. ábra A mérgező hatások kialakulásában szerepet játszó folyamatok (Szűcs 2002)

3.1.3.3 Levegőbe került vegyületek sorsa

A toxikus anyagok főként párolgással, égetéssel jutnak a levegőbe. Az emisszió helyétől diffúzióval vagy vízszintes irányú mozgással (szél útján) távolodnak. A fosszilis tüzelőanyagokból származó oxidok vízcseppekben oldódnak, kicsapódnak és savas eső formájában kerülnek a talajba és a felszíni vizekbe. Abszorpcióval is bejuthatnak a mérgező gázok, gőzök a vizekbe. A szilárd anyagok ülepedéssel a talajba vagy a növények felületére kerülnek. Fotokémiai reakciók hatására pedig másodlagos légszennyezők keletkezhetnek (pl. ózon) (Szűcs 2002).

3.1.3.4 Vízbe került vegyületek sorsa

A felszíni vizekbe leginkább az ipari, a mezőgazdasági és a kommunális szennyvizekből és az olajszenyveződések kioldódásával kerülnek toxikus anyagok. A káros vegyületek diffúzióval és a víz mozgásával távolodnak. Hidrolízissel vagy

fotolízissel átalakulhatnak, illetve le is bomolhatnak. A szennyezők ezután koagulálhatnak vagy adszorbeálódhatnak (Szűcs 2002).

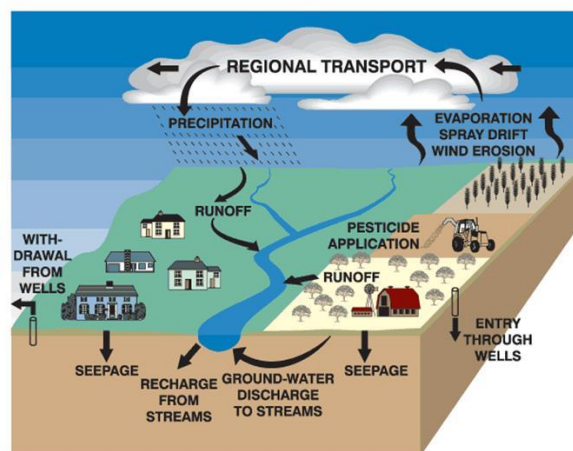
3.1.3.5 Talajba került vegyületek sorsa

A toxikus anyagok a szennyeződés helyén lerakódnak, majd oldódnak. Az oldódott anyagok diffúzió módon vagy adszorbeálódással jutnak tovább, de komplexeket is képezhetnek más vegyületekkel. A felső rétegben található szennyezők fotolízissel lebomolhatnak vagy felszívódhatnak növényekbe (Szűcs 2002).

3.2 Növényvédőszer

A növényvédőszeret a mezőgazdaságban felhasznált agrokemikáliák közé sorolhatjuk (Domokos 2012). Ezek olyan anyagok, amelyeket mezőgazdasági haszonnövények, termények károsodásának megakadályozására használunk. Feladatuk az ember számára kártevő szervezetek elpusztítása, a növények kémiai védelme. Az 1950-es évektől alkalmazunk ilyen típusú szereket. Ezeknek az anyagoknak nem csak a toxicitását kell vizsgálni, hanem a természetes lebomlásukat is. Mivel ezek az anyagok környezetidegenek, hosszú ideig megmaradnak a természetben (perzisztensek) (7.ábra) (ELTE2).

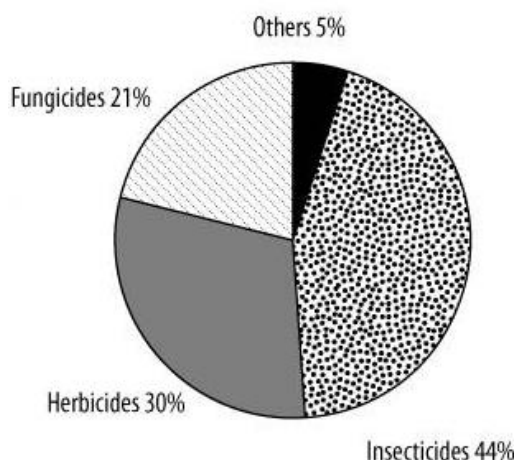
Peszticidok szándékosan vagy baleset következtében is kerülhetnek környezetünkbe.



7. ábra A peszticidok körforgása környezetünkben (<http://pubs.usgs.gov/fs/2005/3087/>)

Fontos figyelembe venni a peszticidek környezeti hatásait. A WHO adatai alapján 20 ezer haláleset és 400 ezer megbetegedés köszönhető a növényvédőszernek. Körülbelül 600 olyan hatóanyag és 1000 olyan vegyülettípus ismert, amelyet ebből a célból használunk fel (Georgikon). A növényvédőszer környezetterhelésének mértéke függ a mennyiségtől, azonban a kis mennyiség nem feltétlenül jelent kisebb mértékű károsítást. Ennek oka kémiai szerkezetüknek és hatásmódjuknak a különbözősége. Jelenlétük, megmaradásuk és átalakulásuk is különböző terhelést jelent.

Csoportosíthatjuk őket felhasználásuk szerint; így megkülönböztethetünk gyomirtó herbicideket, gombaölő fungicideket, rovarirtó inszekticideket, baktériumölő baktericideket és víruspusztító viricideket (**8. ábra**, Domokos 2012).



8. ábra A világon felhasznált peszticidek csoportjainak százalékos eloszlása (Aktor 2009)

3.2.1 A peszticidek alkalmazásának rövid története

A ként mint peszticidet már a mezopotámiai sumérok is alkalmazták. A 15. században arzént, higanyt és ólmot használtak a termés védelme érdekében. A 17. században vált elterjedtté a dohányból kivont nikotin-szulfát rovarölőként történő hasznosítása. A 19. században további két vegyszert állítottak elő: a pyrethrumot krizantém virágából, a rotenont pedig egy trópusi hüvelyes gyökeréből. Az 1940-1950-es években hatalmas mértékben nőtt a kereskedelmi forgalomban lévő

pesticidok száma. Mérőföldkőnek számított a DDT felfedezése, amiért Paul Müller Nobel-díjat is kapott. A vegyületet a tífuszt, pestist, maláriát és sárgalázat terjesztő tetvek, bolhák és szúnyogok ellen használták; ám egészségkárosító hatása miatt már kivonták a forgalomból. Az 1970-es évektől nem a kártevők teljes kiirtása, hanem szabályozásuk volt a cél; az 1990-es évektől pedig megkezdődött a biológiai eredetű anyagok kutatása, ezek célja a kártevők populációjának támadása és a célcsoporton kívüli rovarok kímélése (Domokos 2012).

3.2.2 Inszekticidok

Az inszekticidok használata a kártevő rovarok elleni küzdelemben nélkülözhetetlenek számunkra. Számos esetben azonban nem csak előnnyel jár ezek használata, mivel egyes hatóanyagok súlyos egészségkárosító hatásúak lehetnek.

Először az arzén alapú rovarölők voltak használatosak, majd megjelent a DDT, amely számos fontos betegség terjesztését végző rovar ellen hatásos, viszont egészségkárosító hatása is számottevő, ezért ki is vonták a forgalomból (Zsigó György). Mivel zsírban oldódó vegyületről van szó, a táplálékláncban keresztül eljut a végző fogyasztókig, bennük pedig felhalmozódik. Vizsgálatok igazolták, hogy a ragadozó madarakban felhalmozódva gátolja a kalciumfelvételt, így vékony tojáshéjat eredményez. Azokon a területeken, ahol nagy mennyiségben DDT-t használtak, bizonyítottan megnőtt a koraszülöttek és az értelmi fogyatékkal születettek aránya is.

A DDT kivonása után számos új rovarölő jelent meg, ezek főleg piretroidok voltak. Majd megkezdődött a környezetkímélő biológiai készítmények gyártása; ilyen például a Dipel, amely lepkelárvák ellen hatásos és a bélcsatorna kémhatására aktiválódik (Domokos 2012).

A rovarölő szerek hathatnak az idegrendszerre vagy a rovarfejlődést befolyásolhatják. Az idegrendszerre hatnak a klórozott szénhidrogének, a szerves foszforsav vegyületek, a karbamátok, a neonicotinoidek és a piretroidok (Zsigó György).

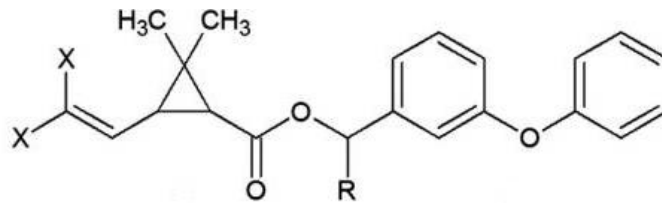
A klórozott szénhidrogének gyorsan hatnak és erősen toxikusak. Akár 15 évig is megmaradnak a talajban és feldúsulhatnak az élő szervezetek zsírszövetében. Állati szervezetekben az idegsejtek membránjának iontranszport folyamatait és ezzel együtt az ingerületvezetést gátolják. A legtöbb ilyen szert már betiltották.

A szerves foszforvegyületek hatásukat acetilkolinészteráz enzim gátlásával fejtik ki. Ennek segítségével leblokkolják az ingerületvezetést a kolinerg szinapszisokban. Előnyük, hogy kevésbé stabilak és ebből kifolyólag sem akkumuláció, sem biomagnifikáció nem jellemző rájuk. Viszonylag gyorsan biológiailag inaktív vegyületekre bomlanak.

A karbamátok karbamilsav származékok, szintén könnyen degradálódó anyagok. Nem hatolnak be a központi idegrendszerbe, így enyhébb tünetekkel járnak (Domokos 2012).

3.2.3 Piretroidok

A piretroidok optikailag aktív, magas forráspontú észterek (**9. ábra**). Először természetes piretroidokat állítottak elő krizantém megszáritott és porrá tört virágából. Azonban ezek a természetes piretroidok napfény hatására könnyen lebomlottak. Instabilitásuk, valamint előállításuk költsége miatt ma már nem jellemző ezek használata a mezőgazdaságban, ezért az elmúlt évtizedekben szintetikus piretroidok kerültek forgalomba. Ezek stabilak és általánosan hatékonyak a mezőgazdasági rovar kártevők ellen. Általában különböző izomerek keverékei. Legalább négy sztereoizomerük van, amelyek hatásukban és stabilitásukban is különbözhetnek. Hatásukat az idegsejtek membránján lévő nátriumcsatornákon fejtik ki. A környezetbe jutva a talajon abszorbeálódnak alacsony vízdékonyságuk miatt (Ware 2004).



9. ábra A piretroidok általános képlete (Chandor-Proust 2013)

Az inszekticidek ezen csoportja általánosan négy generációra osztható.

Az első generációba egyetlen vegyület tartozik, az 1949-ben megjelent allethrin. Szintézise nagyon komplex, 22 reakció szükséges a végső termék előállításához. Emberre és madarakra nem veszélyes, de magas toxicitású méhekre és halakra nézve.

A második generációs vegyületek az első generációhoz tartozó hatóanyagok molekulaszervezetének megváltoztatásával, egy cianocsoport hozzáadásával jöttek létre. Ide tartozik a tetramethrin, a resmethrin, a bioresmethrin, a phonotrin.

Az első mezőgazdaságban felhasznált piretroidok a harmadik generáció tagjai voltak. Ezek már napfényre stabilak, jó rovarölő hatásúak. Harmadik generációs vegyület a permethrin.

A negyedik generáció tagjai mind fotostabilak. Ezek közé tartozik a bifenthrin, cypermethrin, deltamethrin, tefluthrin, cyfluthrin stb.

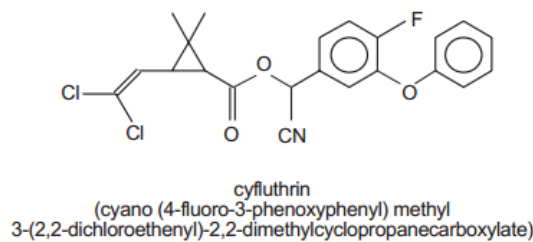
Kémiai szerkezetük és toxikus hatásuk szerint is két csoportra oszthatjuk a piretroidokat. Az I-es típusúakból hiányzik a cianocsoport, mérgezésük remegést, görcsöket okoz. A II-es típusú piretroidok cianocsoporttal rendelkeznek, toxicitásuk nyáladzást, klónusos görcsrohamokat vált ki (Ware 2004).

3.3 Cyfluthrin

A cyfluthrin széles körben elterjedt rovarkártevő elleni szer, a II-es típusú piretroidok közé tartozik (**10. ábra**). Először 1987-ben használták az Amerikai Egyesült Államokban. Itt a mezőgazdaságban főleg gyapot és körte kezelésére alkalmazzák.

Neurotoxin, hatásmechanizmusa hasonló a DDT-hez. Komplex módon befolyásolja a normál idegrendszeri működést. Az idegsejtek membránján indukál változásokat, így hatására rendellenes nátrium- és káliumáramok jönnek létre, és végül ezek eredményezik a görcsöket.

Akut mérgező hatásai közé tartoznak a remegés, görcs, vérnyomáscsökkenés, nehézlégzés. A kísérleti állatokon végzett vizsgálatok szerint a krónikus mérgezési tünetek a fogyás, a hányás és a vesegyulladás. Befolyásolja a szaporodást is, nyulakon végzett kísérletek során, terhesség folyamán a cyfluthrinnak kitett nyulak nagyobb része vetélt el, mint a cyfluthrinnal nem kezelték. Ökológiai vizsgálatok igazolták, hogy a tószzerű rendszerek több taxonját (algák, fonálférges, halak, rovarok) is érinti a hatóanyag toxicitása (Cyfluthrin).



10. ábra Cyfluthrin képlete (Cyfluthrin)

3.4 Ioncsatornák és velük kapcsolatos betegségek

3.4.1 Ioncsatornák és típusaik

Az ionok transzportjában alapvetően két típusú membránfehérje vesz részt, ezek az ioncsatornák és az ionpumpák. Az ioncsatornák fő funkciója, hogy a hidrofil molekulák számára gátat állító lipid sejtmembránon ki- és bejutást biztosítsanak. Több fehérje alegységből álló struktúrák, körkörös elrendezésűek, felépülhetnek azonos vagy különböző tetramer alegységből. Olyan transzmembrán fehérjék, amelyeken át ionok haladhatnak a sejten belüli és a sejten kívüli folyadéktér között. Szelektív pórusok, elektrokémiai erősség szerint engedik át a különböző molekulákat

a membránon. Nyitni és zárni képesek, ezt a folyamatot kapuzásnak hívjuk. Az ioncsatornák nyílását olyan specifikus ingerek okozhatják, mint a membránpotenciál megváltozása, a kémiai stimulusok vagy a mechanikai változások. Fontos szerepet játszanak abban, hogy a gyógyszerterti hatás létrejöhesse (Debrecen1).

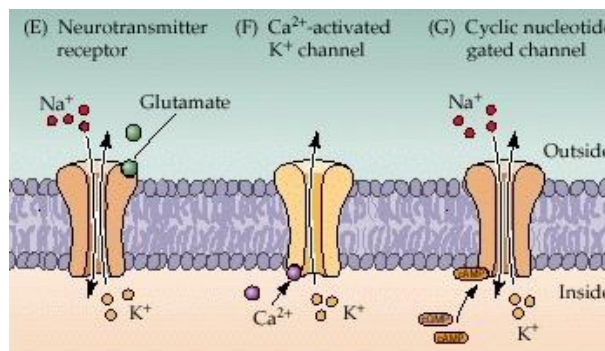
Ioncsatornák nemcsak a plazmamembránon találhatóak, hanem olyan sejten belüli organelleumokon is, mint az endoplazmatikus retikulum, a mitokondrium, az endoszómák vagy a lizoszómák.

Osztályozásukkor két nagy családot különböztetünk meg: így feszültség- és ligandfüggő ioncsatornákról beszélhetünk (11. ábra, Fermini 2008).

Ion channel	Selectivity	Activator
Voltage-gated channels		
Potassium	K ⁺	Membrane potential
Sodium	Na ⁺	Membrane potential
Calcium	Ca ²⁺	Membrane potential
Chloride	Cl ⁻	Membrane potential
HCN	Na ⁺ , K ⁺	Membrane potential
Ligand-gated channels		
nAChR	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Ach, nicotine
GABA _{A,C}	Cl ⁻	GABA
Glycine	Cl ⁻	Glycine, strychnine
5-HT ₃	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Serotonin
AMPA	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Glutamate, AMPA
Kainate	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Glutamate
NMDA	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	Glutamate, NMDA
CNG	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺	cAMP
IP ₃ R	Ca ²⁺	IP ₃
P2X, P2Z	Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	ATP

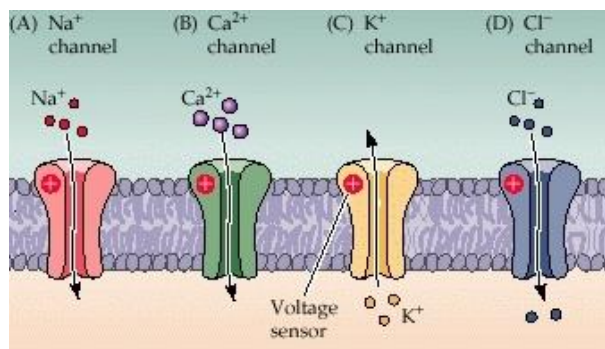
11. ábra Ioncsatornák két nagy családja (Fermini 2008)

A ligandfüggő csatornák ionotróp receptorokhoz kapcsolódnak, specifikus neurotranszmitterek vagy más ligandok hatására nyitnak, illetve zárnak (12. ábra). Jellemző rájuk a gyors jeltovábbítás. Ezek a csatornák felelősek az impulzusok bekapcsolásáért, vagyis az ingerelhető sejtek kezdeti depolarizációjáért. Ligandfüggő csatornák közé tartozik az acetilkolin, a glutamát, a GABA, a glicin, a szerotonin, az ATP-függő csatornák (Szegec1).



12. ábra A ligandfüggő csatornák aktivátorai közé tartozik a glutamát mint neurotranszmitter (E), a Ca^{2+} mint másodlagos hírvivő (F), vagy a ciklikus nukleotidok, a cAMP és a cGMP (G). (Purves 2001)

A feszültségfüggő csatornák a megváltozott membránpotenciálra reagálnak (**13. ábra**). Alapvető szerepük az ingerelhető szövetekben van, ugyanis gyors és koordinált depolarizációt tesznek lehetővé. Ezek rendkívül szelektívek az adott ionra, jellemző képviselőik a nátrium- és kálium-csatornák, amelyek az idegekben és az izmokban találhatóak, illetve a kalcium-csatornák, amelyek a preszinaptikus idegvégződések neurotranszmitter felszabadulásában játszanak szerepet (Szege1).



13. ábra Feszültségfüggő ioncsatornák, amelyek szelektíven engedik át pl. a Na^+ (A), a Ca^{2+} (B), a K^+ (C) vagy a Cl^- (D) ionokat. (Purves D, 2001)

A feszültségfüggő nátriumcsatornák a neuronok közötti kommunikációban játszanak kulcsszerepet, továbbítják az akciós potenciált, valamint részt vesznek a sejt szintű plaszticitásban és a dendritekre érkező szignálok feldolgozásában is. Előfordulnak az agyban, a perifériás idegrendszerben, a harántcsíkolt izomban, szívizomban,

hátsógyöki ganglionokban, a szívben, a méhben, a tüdőben, a gliasejtekben (Lehmann-Horn 1999).

Kalciumcsatornák jelen vannak a legtöbb sejt membránjában. A kalcium létfontosságú molekula, ezek a csatornák szabályozzák az intracelluláris folyamatokat, részt vesznek az izom összehúzódásában, a neurotransmisszióban és a génexpresszióban is (Wikipedia1).

A káliumcsatornák kulcsfontosságú szabályozói a membrán ingerelhetőségének. Az akciós potenciál frekvenciáját irányítják, szabályozzák a hormonok szekrécióját, membránpotenciált hoznak létre a sejtplazmában (Wikipedia2).

A kloridion-csatornák jelen vannak minden neurontípusban, fontos szerepük van a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában, a pH szabályozásában, a homeosztázis fenntartásában, a szerves oldott anyag szállításában (Lehmann-Horn 1999).

3.4.2 Betegségek

Az ioncsatornák az elektromos szignál transzdukció mellett számos funkcióval rendelkeznek, többek között az ionkoncentráció, a pH és a sejttérfogat szabályozásában, a só és a víz transzportjában, valamint a kémiai jelátvitelben is szerepük van. Éppen emiatt az ioncsatornák zavara számos szövetben különböző betegségeket okozhat.

Az ioncsatornák rendellenes működése más-más okokból adódhat, lehetnek autoimmun, iatrogén (orvosi kezelés következménye), toxikus vagy genetikus jellegűek is. Autoimmun betegség esetén autoantitestek akadályozzák meg, hogy a fehérje a csatornához kötődjön, így alakul ki a csatorna funkcióvesztése. Egy baktérium vagy protozoa által kiválasztott toxin is blokkolhatja a csatornát, de a legismertebb ioncsatorna-betegségek genetikai eredetűek (Hübner 2002).

A központi idegrendszer ismert ioncsatorna-betegségei: epilepszia, ataxia, retinális betegségek, sükettség, Alzheimer-kór, skizofrénia, migrén, krónikus fájdalom.

Kloridioncsatorna betegségek: myotonia congenita (izommerevség), epilepszia, vesebetegségek, cisztás fibrózis.

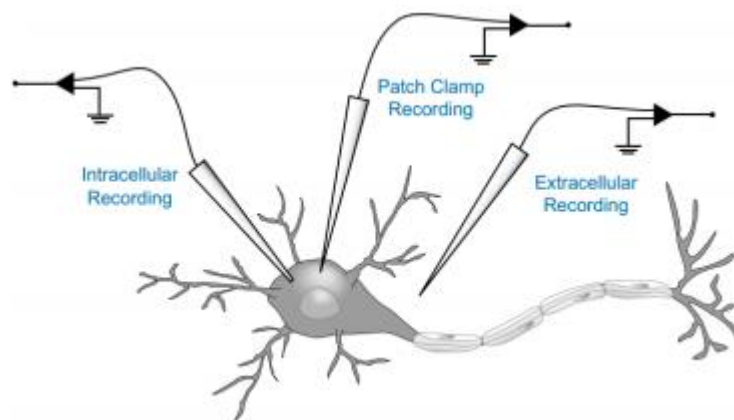
Nátriumcsatorna betegségek: különböző vázizom-betegségek, epilepszia, migrén, autizmus, szívbetegségek, emésztőrendszeri betegségek.

Káliumcsatorna betegségek: neuromyotonia (Isaac szindróma), epizodikus ataxia, újszülöttkori görcsök, örökletes sükettség, periodikus paralízis.

Kalciumcsatorna betegségek: vázizom betegségek - periodikus paralízis, szívbetegségek, éjszakai vakság, migrén (Neuromuscular).

3.5 Ioncsatornákra ható vegyületek vizsgálati lehetőségei

Az élő sejtek vagy szövetek elektromos tulajdonságainak vizsgálatát elektrofiziológiai módszerekkel végezhetjük (14. ábra). A módszerek között megkülönböztetünk intracelluláris és extracelluláris méréseket (ELTE3).



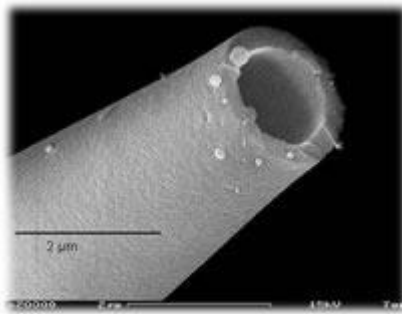
14. ábra Az elektrofiziológia módszerei (ELTE4)

3.5.1 Extracelluláris módszerek

Az extracelluláris vizsgálatok akciós potenciálok mérésére alkalmazhatók sejten kívüli elektródával. A membrán potenciál nem mérhető közvetlenül, helyette a membránon át folyó ionáramok által generált elektromos teret regisztrálják. A

folyadékfürdő összetételének megváltoztatásával állíthatjuk be a mérési körülményeket.

Kis átmérőjű (1 μm -nél kisebb) elektródával egyetlen idegsejt aktivációja is mérhető, így kis amplitúdójú jelek detektálhatóak (**15. ábra**). Ha az elektróda átmérője nagyobb, nem csak egy, hanem több közeli sejt aktivációja mérhető; de mivel egy adott sejt mindig azonos kisülést hoz létre, a sejtek aktiválódása szétválasztható (Maróti 1993).



15. ábra Elektródáról készült scanning elektronmikroszkópos kép (<http://www.wikidoc.org/index.php/Electrophysiology>)

3.5.2 Intracelluláris módszerek

Az intracelluláris méréseknél a neuron sejttestébe kell vezetni az elektródát a membránon keresztül (ELTE4). A mérés két fajtája használt: a hegyes elektródás és a patch elektródás elvezetés.

3.5.2.1 Voltage clamp

A voltage clamp módszer feszültségrögzítő áramkört alkalmaz, amely adott értéken rögzíti a membránpotenciált. Ezt úgy éri el, hogy a membránpotenciált folyamatosan méri, és ha az eltér a megadott értéktől, megfelelő áram bejuttatásával kiegyenlíti azt. Az elektróda és az erősítő között árammérő található, amellyel meghatározható a membránáram (Maróti 1993).

3.5.2.2 Current clamp

A current clamp módszerrel mérhető az adott állandó vagy időben változó áram hatására kialakuló membránpotenciál. A szinaptikus bemenet által termelt áram nagysága detektálható, így a neurotranszmitterek hatását lehet jól modellezni (The Axon Guide 2012).

3.5.2.3 Patch clamp

A patch clamp módszer segítségével az egyetlen ioncsatornán áthaladó ionok áramát mérhetjük időfelbontásban (ELTE2).

3.6 Sejt- és szövetkultúrák felhasználása a toxikológiai kutatásban

A sejtenyésztés 1907 óta ismert módszer, az 1950-es évektől kezdve pedig fontos és elterjedt technikának számít. Meghatározó szerepe van a klónozásban, a rákkutatásban, a vakcinák készítésében és a mesterséges szervek létrehozásában. Sejtenyészetben belül jól vizsgálhatók a sejt–sejt kölcsönhatások neuronok között (Szeged2).

A sejt- vagy szövettenyészet olyan készítmény, amelyben a sejteket legalább 24 órán át fenntartják és szaporítják (Madarász 2004).

A tenyésztőedényben fenntartott sejt- és szövetpreparátumok számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Folyamatosan figyelhetők, a beavatkozásra adott reakciók közvetlenül detektálhatók, kizárólag egyféle szöveti sejtet vagy többféle meghatározott sejtet tartalmazó preparátum is létrehozható.

Azonban a kísérlet megtervezésénél és a kiértékelésnél figyelembe kell venni, hogy a modellen megfigyelt reakciók nem jelzik biztosan az azonos sejtek *in vivo* válaszait (Madarász 2004).

3.6.1 Típusok

A primer sejtenyészet egy adott szövetből izolált sejtek heterogén halmaza. Ezeknek a sejteknek az élettartama véges, csak korlátozott ideig, hetekig vagy néhány hónapig

tarthatók fenn (Szeged2). Az elsődleges tenyésztéből – attól függően, hogy hányszor ültetjük át – másodlagos, harmadlagos, stb. sejttenyészet hozható létre (Madarász 2004).

A sokszorosán átültetett (40-70), egymáshoz fenotípusban hasonló, homogén preparátumok a sejtvonalak. Ezek élettartama korlátlan, végtelen ideig fenntarthatók. Előnyük, hogy az adott sejtet nem kell izolálni, így könnyebbé teszik a munkát. Hátránya, hogy nem minden élettani és szövettani tulajdonságot őriz meg (Szeged2).

Sejttörzs is létrejöhet, ennek élettartama véges, de az eredeti fiziológiás tulajdonságok megmaradnak.

A korai embrionális sejtek jól szaporodnak, ezért a csirkeembriót gyakran használnak ebből a célból (Sotepedia).

3.7 Patch clamp

3.7.1 Kialakulásának története

A membrán és a sejtek ingerlékenysége mindig is kiemelkedő jelentőségű volt az idegrendszer kutatásának szempontjából. 1952-ben Huxley mutatott ki először akciós potenciált voltage clamp módszer segítségével, ezzel 1963-ban el is nyerte a fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat (Veitinger 2011). Az 1970-es évek végén Sakmann és Neher munkájának köszönhetően sikerült egyetlen ioncsatorna működését mérni béka vázizmon, végül nekik köszönhetően 1976-ban megjelent a patch clamp módszer is (Wikipedia3). Mára a biológiai és az orvosi kutatások legfontosabb eszközévé vált a patch clamp technika az idegrendszer egyes sejtjeinek és hálózatainak szintjén is (Veitinger 2011).

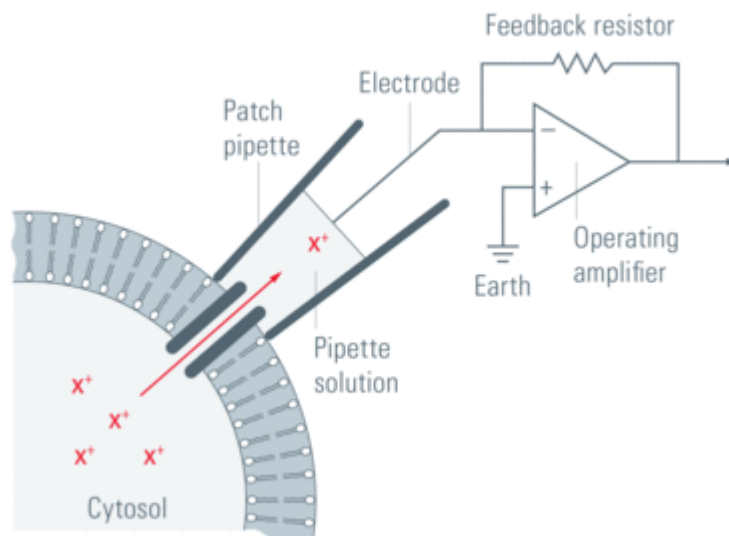
3.7.2 Általános elve

A patch clamp módszer használható az egyes ioncsatornákon vagy több csatormán átfolyó ionáramok, akciós potenciálok mérésére is. Lehetővé teszi, hogy részletesen

elemezhessük a mechanizmusokat és az ioncsatornák válaszreakcióit az egyes hatóanyagokra (Karmazinova 2010).

Egy ioncsatormán 10 millió ion halad át másodpercenként, ám az átfolyó áram csak néhány pikoamper nagyságú, és ebben a nagyságrendben elég nehéz az áram detektálása.

Elektrolit oldatot tartalmazó, vékony üveg vagy kvarc elektródot használunk, amelynek tompa vége szívással a membránra tapad (Veitinger 2011). Így négyzetmikronos felületen lehet regisztrálni az ioncsatornákon átfolyó áramokat. A regisztrálás feltétele, hogy az elektróda megfelelő erősséggel tapadjon a membránhoz, az ellenállás gigaohm tartományba essen (Szedeg3). A membránra tapadó pipetta szigetel, a hozzá tartozó ezüstklorid elektróda egy erősítőhöz kapcsolódva rögzíti az áramot. Az erősítő, mint egy negatív visszacsatolást végző rendszer, olyan kiegyenlítő áramot generál, amely a membránpotenciált a beállított értéken tartja (voltage clamp, **16. ábra**) (Veitinger 2011).



16. ábra Patch clamp módszer működési elve (Veitinger 2011)

3.7.3 Patch clamp felhasználása a toxikológiában

Szinte minden elektrofiziológiai módszer jól használható a neurotoxikológiában. A patch clamp technikák kifejezetten fontosak, hiszen ezzel a módszerrel az egyes ioncsatornák vizsgálata is megoldható. A technikáknak megfelelően mérhetünk ionáramot anyagadás nélkül, illetve sejten belül vagy a sejt külső felszínén, attól függően, hogy hol található a toxikus vegyület célpontja.

Bizonyos mérgező vegyületek változtathatják a neuronok ioncsatornáinak nyitvatartási idejét, nyitási vagy zárási frekvenciáját. Mivel számos toxikus anyag hat az idegrendszerre, kifejezetten fontos a patch clamp módszer ennek a tudományágnak a vizsgálataiban során (ELTE3).

4 Módszerek

4.1 Csirke idegsejt tenyésztés készítése

4.1.1 Embrióagy kiperarálása

A megtermékenyített tojásokat a Bábolna-TETRA (Uraiújfalú) Kft.-től szereztük be. A tojásokat 10 napig keltettük 38 °C-on, 80%-os páratartalom mellett. A tojásokból steril körülmények között kiemeltük a csirkeembriót, Petri-csészébe helyeztük, majd kiperaráltuk az embrió agyát. Ezután az embrióagyhoz 5 ml médiumot öntöttünk, majd a szövetet körülbelül 1 mm³-es darabokra vágtuk zsilettpenge segítségével.

4.1.2 Médium

A sejtenyésztéshez 10% Fetal Bovine Serum-ot (FBS, Sigma) tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumot használtunk, melyhez antibiotikumot (gentamicin, Sigma) adtunk ezerszeres hígításban.

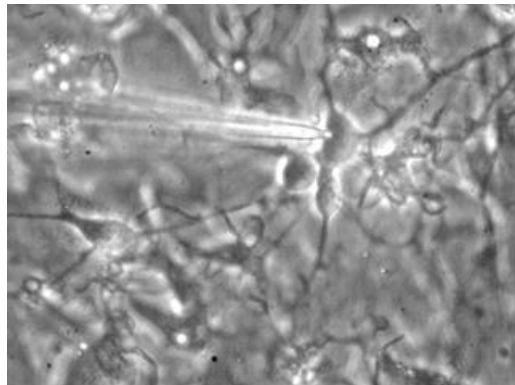
4.1.3 Neuronok disszociálása és kihelyezése fedőlemezre

A médiumba helyezett agyszövetet pipetta segítségével mechanikusan disszociáltuk. Ezután további 5 ml szérumban tartalmú médiumot adtunk hozzá, majd centrifugáltuk 500-1000 fordulaton. Így a sejtek leülepedtek, a fennmaradó folyadékot vákuum segítségével leszívattuk és 2 ml médiumot adtunk a cső alján lévő sejtekhez és újból disszociáltuk őket.

Ezután az előzetesen NaOH és poly-L-lysin segítségével kezelt, kisméretű Petri-csészékbe helyezett kerek fedőlemezekre pipettával osztottuk el a kapott oldatot. Ezt követően a Petri-csészéket lefedtük és CO₂ inkubátorba helyeztük. Körülbelül egy óra alatt a sejtek letapadtak, és a harmadik napon már patch clamp mérést végezhetünk rajtuk.

4.2 Patch clamp mérés

A letapadt sejteket tartalmazó tenyészeteket invertált fázis kontraszt mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük, és médiumot adtunk hozzájuk. Az előzőleg Shutter P97 elektróda húzóval készített körülbelül 1 μm hegy-átmérőjű üvegelektrodát intracelluláris oldattal töltöttük fel (összetétele: 140 K-gluconate, 1 EGTA, 2 MgCl_2 , 5 ATP, 10 HEPES), erre a fiziológias környezet megteremtése miatt volt szükség. A mikroszkóp segítségével olyan neuront kerestünk, amely jól hozzáférhető membránnal rendelkezett, és egy 3 dimenziós mikromanipulátorral az elektrodát a közelébe helyeztük. A fém-elektrolit kontakt potenciál kiegyenlítés után az intracelluláris oldattal feltöltött elektrodát, amelynek ellenállása 12-16 MOhm volt, hozzáértettük a membránhoz, ahol a gigaseal gyorsan kialakult (17. ábra). Ezután szívással kilyukasztottuk a membránt és WinPCP programmal elvégeztük a mérést.



17. ábra Idegsejt az elektrodával

A patch clamp méréseket cyfluthrinnal és referencia vegyületként lidocaine-nal végeztük el. Először anyagbeadás előtt mértünk, majd a vegyületeket törzsoldatból 100x hígítással két dózisban a mérőkamrába juttattuk. A méréseket az Axon Clampfit programmal értékeltük ki. Statisztikai elemzésre a Microsoft Excel beépített statisztikai rutinjait használtuk.

5 Eredmények

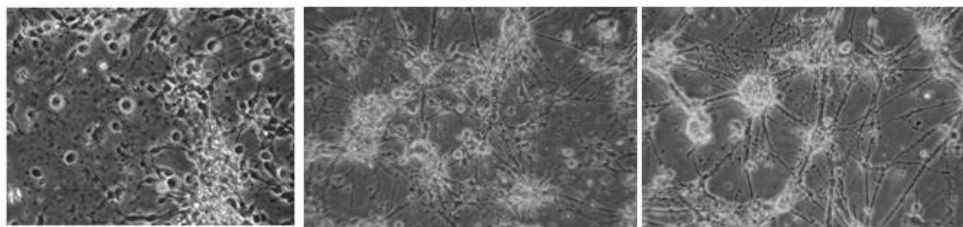
5.1 Csirke neuron tenyészet

5.1.1 Felületkezelés

A sejtek tenyésztését üveg fedőlemezekon végeztük. A fedőlemezek felületét először NaOH segítségével tisztítottuk, ezt követően pedig legalább egy órán keresztül inkubáltuk poly-L-lysinnel (PLL) (0.5mg/ml). A felületkezelésre azért volt szükség, mert nélküle az idegsejtek nem tapadtak le a felületre.

5.1.2 A tenyészetek időbeli fejlődése

Miután a tíznapos csirkeembrió-agyból származó idegsejteket kiültettük a PLL-lel kezelt felületre, egy óra múlva letapadtak, és elkezdtek regenerálni axonjaikat és dendritjeiket. Ez a folyamat a harmadik napra fejeződött be. Tapasztalataink alapján a harmadik napra a membránban található ioncsatornák is reexpresszálódtak. Az ionáramok mérését a tenyészetben töltött harmadik és a tizedik nap között végeztük (**18. ábra**). A tizedik nap után a neuronok csoportokba (clamp-ekbe) szerveződtek, ez nehezítette a patch clamp vizsgálatokat. A tenyészetek több hétig is életképesek voltak.

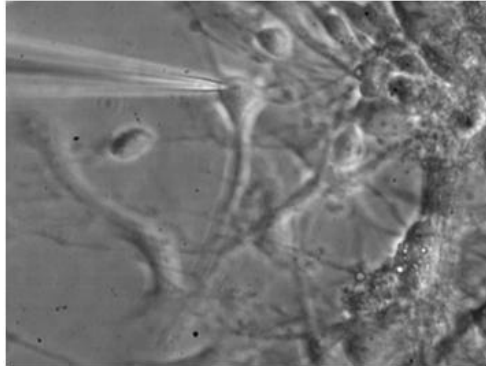


18. ábra Tenyészetek fejlődése: Az első képen a tenyészet kiültetés utáni napon, a középső képen a tenyészet 5. napján, a harmadik képen a 10. napján látható

5.2 Patch clamp mérések

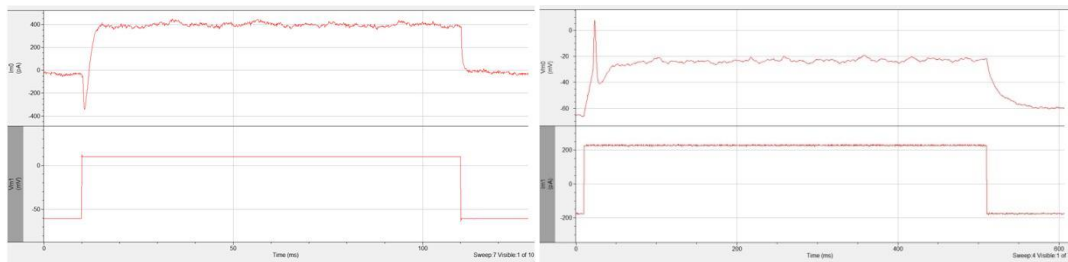
A létrehozott sejtenyészetek jól használhatóak voltak a patch clamp mérésekhez, mivel az ehhez szükséges izolált, könnyen hozzáférhető sejtmembránú neuronokat

tartalmaztak. Az intracelluláris oldattal töltött 12-16 MOhm ellenállású elektródákkal gyorsan megtörtént a gigaseal képződése és utána az intracelluláris elvezetés elérése. Nem tapasztaltunk mechanikai rezgést, mozgást az elektróda és a sejt között, az intracelluláris elvezetés stabil volt a több mint fél órás mérés folyamán (19. ábra).



19. ábra Idegsejt elektródával a patch clamp mérés során

A mért idegsejtek membránpotenciálja -30 és -40 mV között változott, membránkapacitásuk 100 pF körül mozgott. A vizsgált neuronok több mint 90%-ában találtunk nátrium- és káliumáramokat (feszültség zár módszerrel mérve), valamint képesek voltak akciós potenciál generálására is (áram zár módszerrel mérve) (20. ábra).



20. ábra Az első ábrán voltage clamp, a másodikon current clamp mérés látható

5.3 Anyagok vizsgálata

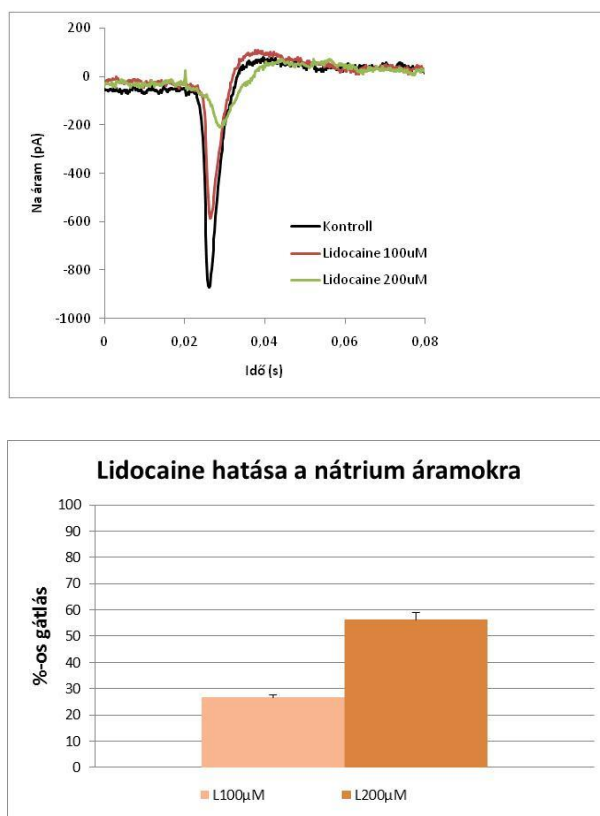
A vizsgálatokat cyfluthrinnal végeztük, referencia vegyületnek pedig a lidocaine-t használtuk. Mindkettő vegyülettel 3-3 mérést hajtottunk végre, aminek során először az anyag beadása előtt, majd a vegyületek két dózisban történő bejuttatása után

mértük az ionáramokat. A mérések során sikeresen detektáltunk nátriumáramokat. A vegyületeket a százszoros hígítású törzsoldatból a mérőkamrába juttattuk, amelynek térfogata 2 ml volt. Tapasztalataink szerint a vegyületeknek legalább 3-5 percre volt szükségük, hogy hatásukat kiváltsák, a késés oka a diffúzió lassúsága volt.

5.3.1 Lidocaine (referencia nátriumcsatorna-blokkoló) hatása

A lidocaine amid típusú helyi érzéstelenítő, bizonyítottan gátolja a nátriumáramokat.

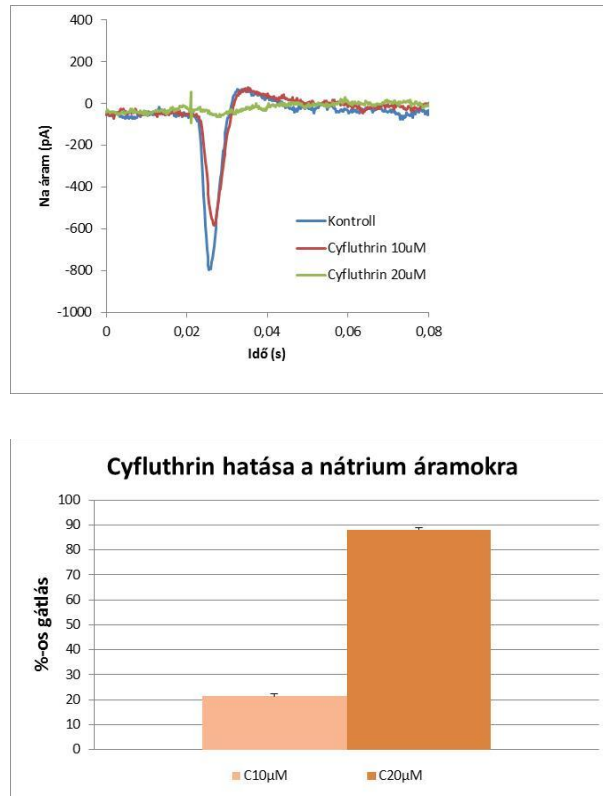
A lidocaine-nal történő mérések során egyértelművé vált a hatóanyag nátriumáram gátlása. A nátriumáram erőssége az anyagbeadások alkalmával csökkent, a kontrollhoz képest az első lidocaine-os kezeléskor átlagosan $26,6 \pm 12,1$ %-kal (mean \pm SEM), a második beadáskor $56,3 \pm 2,6$ %-kal (**21. ábra**).



21. ábra A felső diagramon a nátriumáram változását követhetjük nyomon lidocaine hozzáadása után az idő függvényében. Az alsó ábra százalékosan mutatja a vegyület nátriumáram-csökkentő hatását a dózisos alapján.

5.3.2 Cyfluthrin hatása

A cyfluthrinnal való kezelés során szintén csökkent a nátriumáram. A kontrollhoz képest az első anyagbeadáskor átlagosan $21,3 \pm 7,4$ %-kal, a második dózis alkalmával átlagosan $88,6 \pm 7,3$ %-kal változott. (22. ábra)



22. ábra A felső diagram a nátriumáramok változását ábrázolja a két dózisban hozzáadott cyfluthrin hatására az idő függvényében. Az alsó ábrán százalékos arányban látható az ionáram csökkenése.

6 Megvitatás

Elsődleges célunk a cyfluthrin mint széles körben alkalmazott növényvédőszer idegrendszerre kifejtett hatásának vizsgálata volt. Ennek oka a peszticidek köztudott károsító hatása mind környezetünkre, mind egészségünkre. Mivel ezek a vegyszerek részt vesznek a mindennapi életünkben, jó, ha ismerjük a negatív oldalukat is.

Vizsgálatainkat csirkeembrió idegsejtjein végeztük. Természetesen emlősökre vonatkoztatva nem lehet 100%-ban megbízható következtetéseket levonni, de előnyünkre vált, hogy a korai embrionális sejtek jól szaporodnak, a tojás viszonylag könnyen beszerezhető, ezért a csirkeembrió megfelelő a sejttenyészetek készítéséhez. A mérésekhez, célkitűzésünknek megfelelően, sikeresen létre tudtunk hozni csirkeembrió-agyból neurontenyészeteket. A tenyészetek a mérésekhez megfelelőek voltak, nem fertőződtek be és több hétig életképesek maradtak.

A neuron tenyészeteken patch clamp méréseket végeztünk, referencia vegyületként a lidocainet használtuk, amely bizonyítottan nátriumcsatorna-blokkoló szer. A mérések során két dózisban adva mértük az idegsejtek membránján átfolyó nátriumáramokat. Mindkét hatóanyaggal három-három mérést végeztünk, amely mérések igazolták feltevésünket, miszerint a nátriumáram csökken cyfluthrin hatására. Azonban a mérések alacsony száma nem engedi, hogy biztosan kijelentsük a peszticid nátriumcsatorna-blokkoló hatását, ehhez további vizsgálatok lennének szükségesek.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Nyugat-magyarországi Egyetem Savaria Egyetemi Központ Természettudományi Karának és konzulensemnek, Dr. Molnár Péternek a dolgozat megírásában nyújtott sok segítséget.

Köszönöm a Bábolna TETRA Kft.-nek a tojások biztosítását.

Hálás vagyok Szüleimnek és Barátaimnak, hogy támogattak.

8 Irodalomjegyzék

Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1–12.

Bordás Imre (2006). *Toxikológia Jegyzet*, Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Budapest

Brassai Attila, Dóczy K. Zoltán, Bán Erika-Gyöngyi (2010). *Általános gyógyszerteran alapjai*, Studium Alapítvány Kiadó

Chandor-Proust A., (2013). The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling, *The Biochemical Journal* 455: 75-85

Domokos Endre, Némethy Sándor, Kárpáti Árpád (2012). *Mezőgazdaság környezeti hatásai (TÁMOP-4.1.2 A1 és a TÁMOP-4.1.2 A2 könyvei)*, Pannon Egyetem

Ernest Hodgson (2004). *A Textbook of Modern Toxicology, Third Edition*, 4 John Wiley & Sons, Inc., 1-12.

Fermini B., T. Priest B., (2008). *Ion channels*, Springer Science & Business Media, 1-27.

George W. Ware and David M. Whitacre (2004). *The Pesticide Book*, 6th ed*. (2004), Published by MeisterPro Information Resources, A division of Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio

Gruiz Katalin (2001). *Környezettoxikológia*, Műegyetemi Kiadó

Hübner, C.A. & Jentsch, T.J., (2002). Ion channel diseases, *Human molecular genetics*, *The Biochemical Journal* 455: 75-85

Karmazinova M., (2010). Measurement of Cellular Excitability by Whole Cell Patch Clamp Technique, *The Biochemical Journal* 455: 75-85

Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K., (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological reviews*, *The Biochemical Journal* 455: 75-85

Madarász Emília, Szerk. Szabó Gábor, (2004). *Sejt- és szövettenyésztés: módszertani alapismeretek*, *Sejtbiológia, Medicina*

Maróti Péter, Laczkó Gábor, (1993). *Bevezetés a biofizikába*, Szeged, Szegedi Egyetemi Kiadó

Milinki Éva (2014). Ökotoxikológia és környezetvédelem, EKF TTK Biológiai Intézet, Eger

Moreau, R. L. de M. (2007). Principles of toxicology. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 43: 662-662.

Perjési Pál (2014). Gyógyszermetabolizmus és gyógszertoxicitás. Pécsi Tudományegyetem, 12-70.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, (2001). Neuroscience. 2nd edition, Sunderland

Szűcs Sándor (2002). Környezet-toxikológia, Népegészségügyi Iskola Megelőző Orvostani Intézet, Debrecen, 2-14.

The Axon Guide, (2012). Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques, Third Edition

Veitinger S., (2011). Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Germany:

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

Cyfluthrin, Journal of Pesticide Reform (1994):

<http://www.pesticide.org/get-the-facts/pesticide-factsheets/factsheets/cyfluthrin>
(2014. 12. 27.)

Debrecen1 Ioncsatornák:

http://biophys.med.unideb.hu/sites/default/files/3_ioncsatornak_memb_pot_2012.pdf
(2014. 10. 21.)

ELTE1 Neurotoxikológia I.:

http://physiology.elte.hu/eloadas/Neurotoxikologia/Neurotox_1_2014.pdf
(2014. 12. 25.)

ELTE2 Neurotoxikológia II. :

http://physiology.elte.hu/eloadas/Neurotoxikologia/Neurotox_2_2011.pdf
(2014. 12. 25.)

ELTE3 Neurotoxikológia VII. :

http://physiology.elte.hu/eloadas/Neurotoxikologia/Neurotox_7_2011.pdf

(2014. 12. 25.)

ELTE4 Ex vivo elektrofiziológia:

http://physiology.elte.hu/gyakorlat/BSc_30h/Ex_vivo_elektrofiziologia.pdf

(2014. 11. 08.)

Georgikon A peszticidek környezeti hatásai:

http://www.georgikon.hu/tanszerek/ppss/en/component/docman/doc_download/88-mg-termeles-6-1-fejezet-a-pesticidek-kornyezeti-hatasai

(2014. 12. 25.)

LD50: <http://www.quazoo.com/q/LD50>

(2014. 12. 27.)

Neuromuscular: <http://neuromuscular.wustl.edu/mother/chan.html#nachandisorder>

(2014. 11. 08.)

Neuron: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter8.aspx>

(2014. 11. 08)

Pesticides in ground water: <http://pubs.usgs.gov/fs/2005/3087/>

(2014. 12. 25.)

Sotepedia Sejttenyésztés:

http://sotepedia.hu/_media/aok/targyak/immun_5hetsejtenyesztesdoc_1_.doc

(2014. 10. 21.)

Szeged1 Egy idegsejt működése:

<http://web.med.u-szeged.hu/mdbio/hun/anyagok/2012-2013/2.felev/3/2.Egy-idegsejt-Mukodese-word.pdf>

(2014. 11. 08.)

Szeged2 Tuboly Eszter, Állatkísérletek az orvostudományban- In vitro modellek élő állatok helyettesítésére:

http://web.szote.u-szeged.hu/exsur/allatkiserletek/In%20vitro%20modellek_alternativ%20technikak_Tuboly%20Eszti.pdf

(2014. 10. 21.)

Szeged3 A folt-feszültségzár (Patch-clamp) módszer:
<http://phys.bio.u-szeged.hu/DT/elettan/ch03s03.html>
(2014. 11. 08.)

Tóthfalusi László (2011) Toxikológia I, Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani
Intézet:
http://sotepedia.hu/_media/gytk/targyak/hatastan/2011_hatastan_toxicologia_wwp.pdf
(2014. 12. 25.)

Wikipedia1 Calcium channel: http://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_channel
(2014. 10. 21.)

Wikipedia2 Potassium channel: http://en.wikipedia.org/wiki/Potassium_channel
(2014. 10. 21.)

Wikipedia3 Erwin Neher: http://hu.wikipedia.org/wiki/Erwin_Neher
(2014. 11. 08.)

<http://www.wikidoc.org/index.php/Electrophysiology>

Zsigó György, Rovarölő szerek:
<http://www.zsigogyorgy.hu/tanfolyamok/kartevek.pdf>
(2012. 12. 27.)