Rovarirtószerek idegrendszeri hatásainak elemzése *ex vivo* túlélő agyszelet technika alkalmazásával

Varró Petra

Témavezető: **Dr. Világi Ildikó** egyetemi docens, PhD

Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna egyetemi tanár, D.Sc.

Idegtudomány és Humánbiológia Doktori Program

Vezetője: Dr. Détári László egyetemi tanár, D.Sc.

ELTE TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék 5

Bevezetés 6

Irodalmi áttekintés 7

A rovarirtószerek csoportjai, történelmi áttekintés 7

„Első generációs” inszekticidek 7

„Második generációs” inszekticidek 8

„Harmadik generációs” inszekticidek 10

Biológiai védekezés 11

Növényvédőszerekre vonatkozó előírások, toxikológiai vizsgálatok, élelmiszerbiztonság 12

A vizsgált rovarirtószerek és molekuláris célpontjaik 14

A kolinerg transzmisszió és a nikotinos acetilkolin-receptor 14

A neonikotinoidok illetve a bensultap hatása a kolinerg transzmisszióra 19

A GABA-erg transzmisszió, az ionotróp GABA-receptor 21

A fenilpirazolok illetve a fipronil hatása a GABA-erg transzmisszióra 24

A feszültségfüggő Na^+-csatornák 26

A piretroidok illetve az eszfenvalerát hatása a feszültségfüggő Na^+-csatornákra 30

A vizsgált agyterületek bemutatása, a mezőpotenciálok mérésének elvi alapjai 34

Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg szerkezete és működése 34

A neocortexben mérhető kiváltott potenciálok 36

A hippocampus 37

A hippocampusban mérhető kiváltott potenciálok 39

Szinaptikus plaszticitási jelenségek 40

A rövidtávú szinaptikus plaszticitás 40

A hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP) 42

Epileptiform aktivitás agyszeletekben 44

Célkitűzések 45
Anyag és módszer 46
A kísérleti állatok tartása 46
A patkányok illetve az agyszeletek rovarirtószerrel történő kezelése 46
Túlélő agyszeletek készítése, standard agyszelet technika 47
Kiváltott mezőpotenciálok regisztrálása 47
Mérési protokoll 48
A jelek rögzítése, kiértékelése 49
Eredmények 51
A bensultap hatása 51
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás 51
Plasztikus folyamatokra gyakorolt hatás 52
A fipronil hatása 53
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás 53
Plasztikus folyamatokra gyakorolt hatás 53
Az eszfenvalerát hatása *in vitro* kezelés esetén 54
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás kérgi szeleteken 54
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás hippocampus szeleteken 55
Plasztikus folyamatok vizsgálata kérgi szeletekben 58
Plasztikus folyamatok vizsgálata hippocampus szeletekben 59
Az eszfenvalerát hatása *in vivo* kezelés esetén 60
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás a kérgi szeleteken 60
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás a hippocampus-szeleteken 61
Plasztikus folyamatok vizsgálata kérgi szeletekben 62
Plasztikus folyamatok vizsgálata hippocampus szeletekben 63
Görcskészség vizsgálata 4-aminopiridinnel kérgi szeleteken 64

Az eredmények megvitatása ... 65
A bensultap hatásának elemzése ... 65
A fipronil hatásának elemzése ... 68
Az eszfenvalerát hatásának elemzése ... 70
In vitro kezelés után kapott eredmények ... 70
In vivo kezelés után kapott eredmények ... 74
Konklúzió – az agyszeleten végzett elektrofiziológiai mérések használhatósága a rovarirtószerek toxicitási vizsgálatában ... 78
Összefoglaló ... 80
Summary ... 82
Irodalomjegyzék ... 84
Köszönetnyilvánítás ... 98

Rövidítésjegyzék

4-AP – 4-amino-piridin

ACh – acetil-kolin

AChE – acetilkolin-észteráz

ACSF – mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

α–BTX – α–bungarotoxin

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2- oxazol-4-il)propánsav (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2- oxazol-4-yl)propanoic acid)

ATX II – *Anemonia sulcata* toxin II

CA1-3 – cornu Ammonis 1-3 régió (a hippocampusban)

CaMKII – kalcium-kalmodulin-függő kináz II

EPSP – serkentő posztszinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)

GABA – gamma-amino-vajsav (gamma-amino-butyric acid)

GD – gyrus dentatus

IPSP – gátló posztszinaptikus potenciál (inhibitory postsynaptic potential)

KA – kainát (kainic acid)

LTP – a szinapszisok hosszútávú hatékonyságnövekedése (long-term potentiation)

mAChR – muszkarinos acetilkolin-receptor

nAChR – nikotinos acetilkolin-receptor

NMDA – N-metil-D-aszpartát

NTX – nereistoxin

PKA – protein-kináz A

PKC – protein-kináz C

POPS – populációs spike

PPF – rövidtávú serkentődés (paired-pulse facilitation)

PPI – rövidtávú gátlás (paired-pulse inhibition)

STX – szaxitoxin

TTX – tetrodotoxin

Bevezetés

Manapság, az intenzív, jellemzően monokultúrás mezőgazdálkodás korában világszerte nagy mennyiségben alkalmaznak különféle növényvédőszereket (gyomirtókat, gombaölő- és rovarirtószereket) a haszonnövények termésátlagának növelésére. Mivel ezek a kemikáliák a kártevők elpusztítását célzó mérgező anyagok, nagyon fontos a környezetre (a nem cél-fajokra) és az ember egészségére kifejtett esetleges károsító hatásaik vizsgálata. A növényvédőszerek a gyártás, alkalmazás során közvetlenül kapcsolatba kerülhetnek az emberrel, illetve a kezelt növények révén a táplálékláncba juthatnak. A sokféle növényvédőszer közül a rovarirtószerek (inszekticidek) jelenthetik az egyik legnagyobb kockázatot az emberre nézve, hiszen ezek hasonló felépítésű és működésű receptorokon, ioncsatornákon, enzimeken hatnak, mint amilyenek az emberi szervezetben is megtalálhatóak.

A rovarirtószerek egy jelentős csoportja idegrendszeri célpontokon, illetve az ideg-izom áttevődésen fejti ki hatását. A neurotranszmissziós rendszerek az állatvilágon belül igen hasonló módon működnek, ezért a rovar-célpontok ellen kifejlesztett szerek az emlősök, így az ember számára is potenciálisan neurotoxikusak. A dolgozatban három, különböző módon ható rovarirtószer idegrendszeri hatásának elemzésével foglalkozom, ezek a Bancol® (hatóanyaga a bensultap), a Regent® (hatóanyaga a fipronil) és a Sumi-Alfa® (hatóanyaga az eszfenvalerát). A kísérleteket patkány agyából készült túlélő agyszelet-preparátumokon végeztem, mikroelektrofiziológiai módszerek alkalmazásával, amelyek alkalmasak arra, hogy a szereknek az általános ingerlékenységre ill. az alapvető szinaptikus működésére kifejtett hatását vizsgáljuk.

Irodalmi áttekintés

A rovarirtószerek csoportjai, történelmi áttekintés

„Első generációs” inszekticidek

A XIX. sz. elejéig a rovarkártevők elleni harc nagyrészt abból állt, hogy a kártevőket egyszerűen leszedegették vagy lemosták a növényekről. Néhány **szervetlen anyagot** is alkalmaztak, pl. ként füstölésre (Kínában már Kr. e. 1000-től kezdve) és gombaölőként, arzént, ólom-arzenátot, bórsavat, bordói-lét (réz-szulfátot), párizsi zöldet (réz-acetát-arzenitet). Ezek az anyagok általános mérgek, nem szelektívek a rovarokra nézve (Casida és Quistad, 1998).

A szervetlen anyagok bevezetése után kezdődött el a különféle **növényi eredetű anyagok** használata, amelyek eleinte nehezen elérhetőek és igen drágák voltak. Ezen kívül hátrányuk, hogy szabad levegőn és erős fényben általában igen gyorsan bomlanak, emiatt szántóföldi alkalmazásuk nem nagyon hatékony. Ennek ellenére a **piretrum** csaknem 2 évszázadon keresztül a legjelentősebb növényi eredetű rovarirtószernek számított. Ez bizonyos *Chrysanthemum*-fajokból (1. ábra), pl. a *Chrysanthemum cinerariaefolium*-ból és a *Chrysanthemum cineum*-ból kivonható alkaloidok keveréke, amelyek a feszültségfüggő Na^+-csatornákon fejtik ki hatásukat. A növényeket először Örményországban kezdték termeszteni a XIX. sz. első felében. Később az Adriai-tenger vidékén, Japánban, a XX. században pedig Kelet-Afrikában (Kenya, Tanzánia) termesztették nagy mennyiségben. Napjainkban is használatos növényvédőszer. A megszárított virágokból szerves oldószerrel, pl. hexánnal vonják ki a piretrumot (Casida, 1980). A **nikotin**t, a dohányból (*Nicotiana tabacum*) származó alkaloidot szintén sokáig alkalmazták rovarirtószerként, ez a rovarok szervezetében igen nagy mennyiségben előforduló nikotinos acetilkolin-receptor (nAChR) agonistája. Hátránya, hogy emlősökre is erősen toxikus, bőrön át is jól felszívódik, ezért alkalmazása nem veszélytelen. Magyarországon felhasználása szigorúan korlátozott, mert számos véletlen és öngyilkossági célzattal történt mérgezés okozója volt (Bordás, 2006). Az előbb említetteken kívül még

1. ábra *Chrysanthemum cinerariaefolium* virágai (agricultureinformation.com)

alkalmaztak számos alkaloidot, pl. a rianodint (a dél-amerikai *Ryania speciosa* nevű növényből származik), a veratridint (a zászpafélékből (*Veratrum sp.*) származik) és nem alkaloid szerkezetű növényi anyagokat, pl. a rotenont (szubtrópusi és trópusi, a *Lonchocarpus* és *Derris* nemzetségekbe tartozó növényekből vonható ki).

„Második generációs" inszekticidek

Az 1920-as években, a kémia és a vegyipar nagymértékű fellendülésével párhuzamosan, elkezdték szerves kémiai módszerekkel feltárni a növényi eredetű rovarirtószer-molekulák szerkezetét, illetve szintézisükre különféle módszereket kidolgozni. A molekuláris szerkezet módosításával igyekeztek nagyobb hatékonyságú, szelektívebb és főként stabilisabb vegyszereket előállítani. Az 1930-as évektől kezdve már az volt a fő cél, hogy újabb szerves rovarirtószereket szintetizáljanak a növényi anyagok alapján. Könnyen tenyészthető rovarkártevők segítségével hatékony szűrési, „screenelési" rendszert dolgoztak ki a szintetikus szerek hatékonyságának tesztelésére.

1939-ben Paul Hermann Müller felfedezte a **DDT** (diklór-difenil-triklóretán)-t. Ez nagy áttörést jelentett, hiszen rendkívül nagy hatékonyságú, viszonylag olcsó szer, sokféle kártevőt képes kontrollálni, hosszú időn keresztül. A DDT-nek köszönhetően szorult vissza a szúnyog által terjesztett malária és egyéb járványok, pl. a tetvek által közvetített tífusz is. Az új szer jelentőségét érzékelteti, hogy Müller később orvosi Nobel-díjat kapott felfedezéséért. A DDT sikerességén felbuzdulva fejlesztették ki a többi **klórozott szénhidrogén-származékot**, pl. a hexaklór-ciklohexánt, a lindánt, a dieldrint, az aldrint és az endoszulfánt. A vegyületek molekuláris célpontjai a feszültségfüggő Na^+-csatornák, illetve az ionotróp γ-aminovajsav (GABA)-receptorok. Ezeket a szereket 1940-es évektől kezdve nagy mennyiségben alkalmazták világszerte, ám kiderült, hogy a rovarirtás szempontjából előnyös nagy stabilitásuk, perzisztenciájuk miatt jelentős környezeti és egészségügyi kockázatot hordoznak. Lipidoldékony vegyületek lévén képesek bizonyos élőlényekben felhalmozódni, a táplálékláncban feldúsulni, így főként a csúcsragadozókban észlelték káros hatásaikat. Ezért az 1960-as, '70-es években egyre több országban bevonták őket, korlátozták használatukat. A harmadik világ egyes részein viszont még ma is alkalmaznak DDT-t és egyes klórozott szénhidrogéneket, mert nincs eléggé hatékony és mégis elérhető alternatívájuk (Roberts és mtsai, 1997).

A második generációs inszekticidek másik nagy csoportja a **szerves foszforsavészterek** és a **karbamátok** voltak, amelyeket valamivel később, az 1960-as években kezdtek nagy

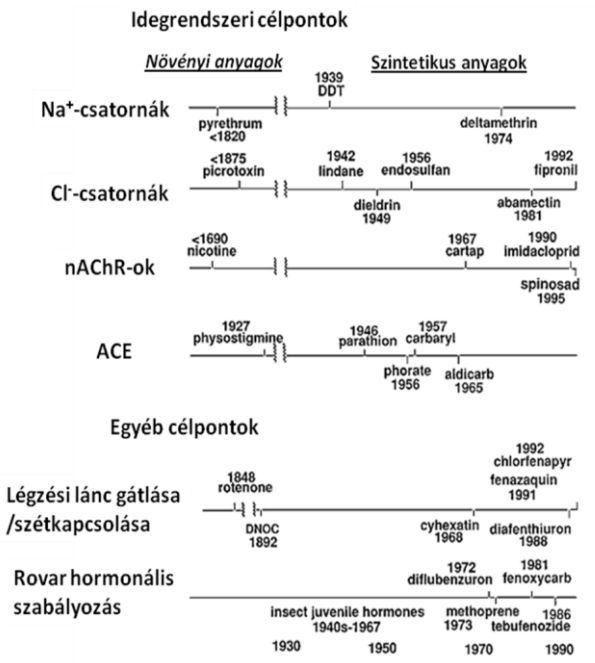
mennyiségben alkalmazni (pl. chlorpyriphos malathion, parathion). Ezek az acetilkolin-észteráz (AChE) enzim gátlása révén fejtik ki hatásukat, szintézisük során a physostigmin nevű alkaloidból indultak ki. Vannak köztük szisztémás vegyületek, amelyek a növény nedvkeringésébe jutva viszonylag hosszú időn át védettséget biztosítanak számára. Ezeknek a vegyületeknek nagy előnye, hogy kevésbé perzisztensek, mint a klórozott szénhidrogének, így a környezet számára kisebb terhet jelentenek. Viszont nem szelektívek a rovarokra, így más élőlényekre, az emberre is igen veszélyesek, főként nagy dózisú, akut expozíció esetén. Komoly toxikológiai kockázattal jár a gyártásuk és kihelyezésük is.

A **piretroidok** a piretrum-alkaloidok alapján kifejlesztett szintetikus rovarirtószer-család, az 1970-es, ’80-as évektől kezdve alkalmazzák őket. Kifejlesztésük során törekedtek, hogy fotostabilisabb vegyületekhez jussanak, amelyek szelektív toxicitása magasabb a rovarokra nézve, mint az emlősökre. Vannak közöttük olyan vegyületek, amelyek a piretrum helyettesítésére alkalmasak, tehát nem perzisztensek (pl. alletrin, tetrametrin) és vannak stabilisabb, szántóföldi növényvédelemre alkalmas szerek (pl. permetrin, decametrin, fenvalerát és az általam is vizsgált eszfenvalerát). A piretroidok, bár fény hatására nem bomlanak, mégsem jelentenek akkora környezeti veszélyt, mint a régebbi perzisztens rovarirtók. Lipidoldékonyságuk révén a növények leveleiről nehezen mosódnak le, a kutikulába beoldódnak, illetve a talajban is kevéssé mobilisak, a talajszemcsékhez kötődnek. A talaj baktériumflórája és maguk a növények is néhány hét alatt lebontják őket (Casida, 1980). A biztonságosságukat tovább növeli szelektív toxicitásuk, amelynek köszönhetően a rovarirtásra alkalmazott mennyiség emlősökre általában nem veszélyes. Méhekre, más gerinctelenekre és halakra viszont veszélyt jelentenek (Eisler, 1992).

A második generációs inszekticidek nagy mennyiségben történő felhasználása szükségképpen ellenálló (rezisztens) rovarpopulációk kialakulásához vezetett, hiszen a vegyszerek hosszútávú alkalmazásával szelekciós előnyhöz jutnak a toleráns egyedek. A régebbi neurotoxikus rovarirtószerek esetében sok fajban megjelentek olyan, a célmolekulát érintő mutációk, melyek ellenállóvá teszik az egyedeket. Ugyanazon a célponton ható vegyszercsaládok között pedig keresztrezisztencia is felléphet (pl. DDT-piretroidok, organofoszfátok-karbamátok). Sok esetben a rezisztens rovartörzsek kialakulása új molekuláris célpontok kereséséhez vezetett.

A **neonikotinoidok** kifejlesztésére az organofoszfát- és karbamát-rezisztencia kialakulása miatt került sor. Ezek a vegyületek a nereistoxin analógjai, a nAChR-on hatnak, de hatékonyabbak és szelektívebbek, mint a nikotin. Ide tartozik az imidacloprid, a cartap és az általam is vizsgált bensultap.

Újabb GABA-receptoron ható molekula-családokat is kifejlesztettek, amelyeknek a régebbi klórozott szénhidrogén rovarirtókkal ellentétben már ez a fő molekuláris célpontjuk (a klórozott szénhidrogének a feszültségfüggő Na^+-csatornákon is hatnak). Ilyenek pl. a **fenilpirazol** típusú szerek, amelyek közé az általam is vizsgált fipronil is tartozik (Casida és Quistad, 1998).



2. ábra A rovarirtószerek felfedezésének illetve bevezetésének kronológiája, a szerek célpontjuk szerint vannak csoportosítva.
(Casida és Quistad 1998-as cikkéből, módosítva)

„Harmadik generációs” inszekticidek

A harmadik generációs szerek szelektivitásukban különböznek az előző csoportoktól, hiszen ezek olyan célpontokra hatnak, amelyek csak a célcsoportban, vagyis a rovarok szervezetében vannak jelen. Ilyenek a rovarok hormonális rendszerére ható szerek, pl. a **juvenilhormon-analógok** (methoprene, phenoxycarb). Ezek a juvenilis hormon hatását utánozzák, így a vedlést akadályozzák, a rovarok nem képesek túljutni a lárvaállapoton. Egy másik típus az **ekdizon (vedlési hormon) agonisták** csoportja pl. tebufenozid, amelyek túl korai vedlést indukálnak. Szintén ízeltlábúakra szelektív a **kitin-bioszintézist gátló szerek** csoportja. Ide tartozik a diflubenzuron, a buprofezin és a cycromazine.

Ezek a vegyületek nem terjedtek el széles körben, annak ellenére, hogy nagyon hatékonyak, sok esetben fajspecifikusak, és az emlősökre nézve teljesen biztonságosak. Hatásuk lassan alakul ki, és a rovarok életciklusának csak egy bizonyos periódusában képesek beavatkozni (Casida és Quistad, 1998).

A különféle korszakokra jellemző rovarirtószereket összefoglalva a 2. ábrán láthatjuk.

Biológiai védekezés

A szintetikus rovarirtószerek káros környezeti és egészségügyi hatásai miatt egyre inkább előtérbe kerül a természetes vegyületekhez való visszatérés, illetve az újabb típusú biológiai védekezési módok kidolgozása.

A neem nevű indiai növény *(Azadirachta indica)* gyógyító és rovarölő tulajdonságai évezredek óta ismertek. A belőle származó **azadirachtin** több száz rovarfaj ellen hatékony, megzavarja a rovarok egyedfejlődését, párosodását és főként a növényevő rovarokra repellens hatással van. Reverzibilis reprodukciós toxicitást mutat az emlősökre nézve, de rendeltetésszerű használat esetén az ember egészségére nincs káros hatással.

A **spinosynok** a *Saccharopolyspora spinosa* nevű sugárgomba anyagcseretermékei, a belőlük készült „bio-inszekticidet", a spinosadot 1997-ben dobták piacra. Több rovarcsoport ellen is használható, igen hatékony rovarirtószer, az idegrendszer túlserkentődését okozza. Kimutatták, hogy az ionotróp GABA-receptorok és a nAChR-ok működését is befolyásolja, de az utóbbiak esetében más receptor-alegységekhez köt, mint a neonikotinoidok (Millar és Denholm, 2007). Az emberre nem fejt ki káros hatást és a hasznos rovarfajokra, madarakra is kevéssé mérgező.

A ***Bacillus thuringiensis*** (BT) –ből származó termékek teszik ki a bio-inszekticid piac 90 %-át. A BT több száz alfajának spóráit tartalmazó rovarölőszerekből sokféle változat van forgalomban, ezek viszonylag szelektívek pl. kétszárnyúakra, lepkékre, ill. bogarakra. A baktériumok által termelt endotoxin a rovarok középbelébe jutva a bél megbénulását okozza, a rovarok abbahagyják a táplálkozást és elpusztulnak. Ez a védekezési mód szelektivitása és a szer gyors lebomlása miatt előnyös, a gyors lebomlás miatt viszont szükség lehet többszöri alkalmazásra (López és mtsai, 2005).

A **genetikai manipuláció** lehetősége a rovarirtást is forradalmasította. Immár fehérje-természetű anyagok is felhasználhatók inszekticidként, ezeket bakteriális, virális hordozókkal lehet a rovarok szervezetébe juttatni. Egy másik módszer a génmódosított növények előállítása, amelyek pl. BT endotoxint termelnek, már évek óta termesztenek ilyen gyapotot, kukoricát, burgonyát. Ennek a módszernek a hátránya az, hogy a toxinnak folyamatosan kitett rovarpopulációkban nagy valószínűséggel kialakul ellene rezisztencia. Így a BT endotoxin alkalmazásával sem hagyhatók el teljesen a szintetikus kemikáliák (Casida és Quistad, 1998).

Növényvédőszerekre vonatkozó előírások, toxikológiai vizsgálatok, élelmiszerbiztonság

A növényvédőszerekkel kapcsolatos egészségügyi és környezetvédelmi aggodalmak az 1960-as években merültek fel először, miután két évtizeden át óriási mennyiségben alkalmazták az újonnan kifejlesztett szintetikus rovarirtószereket. A közvéleményre nagy hatással volt Rachel Carson 1962-es *Silent spring (Néma tavasz)* című könyve, amely főként a madarakra is veszélyes DDT használata ellen irányult. Egymás után alakultak meg a nemzeti és nemzetközi szervezetek, amelyek a növényvédőszerek engedélyeztetéséért felelősek, az engedélyeztetéshez kapcsolódó szabályozást nagyon megszigorították. Az összes addig forgalomban lévő szert megvizsgálták toxikológiai és környezetvédelmi szempontból, és a szerek mintegy felét be is vonták. Manapság egy új rovarirtószer kifejlesztési költségének nagy hányadát a kötelező toxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálatok elvégzése teszi ki (Casida és Quistad, 1998).

A **növényvédőszerek engedélyezése** jelenleg egységes elvek, adatkövetelmények mellett történik az Európai Unió tagországaiban. A hatóanyagokat közös eljárásban a 91/414 Európai Gazdasági Közösség irányelv alapján, míg a hatóanyagból előállított készítményeket tagországi szinten engedélyezik. Hazánkban ezt a folyamatot a növényvédő szerek forgalomba hozatalának és felhasználásának engedélyezéséről, valamint a növényvédő szerek csomagolásáról, jelöléséről, tárolásáról és szállításáról szóló 89/2004. számú, a Földművelési és Vidékfejlesztési Minisztérium által kiadott rendelet szabályozza (Bura, 2007).

A **toxikológiai megítélés** alapjául szolgáló biztonsági vizsgálatokat a nemzetközi ajánlásoknak (OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)-irányelveknek) megfelelően köteles elvégezni a gyártó cég. Állatkísérletekben megállapítják az akut halálos félérték-dózist (LD_{50}) többféle felszívódási folyamat esetén. Megállapítják a szer farmakokinetikai tulajdonságait is (felszívódás, megoszlás, metabolizmus, kiürülés jellemzői). Vizsgálják a kontakt hatásokat is (szem-, bőr- és nyálkahártyairritáció). A krónikus kísérletek között szerepelnek a teratogenitási, karcinogenitási vizsgálatok. Szervspecifikus hatásokat is vizsgálnak egyes esetekben, pl. máj-, vese-, idegrendszer-, immunrendszer-, endokrin károsító hatások. Ezeket az emberre vonatkoztatott toxikológiai vizsgálatokat ökotoxikológiai vizsgálatok is kiegészítik. A környezeti hatásokat vízi gerincteleneken, halakon, méheken, madarakon modellezik.

Mindezen adatok alapján állapítják meg a szer besorolását és a rá vonatkozó élelmiszerbiztonsági paramétereket, pl. a munkaegészségügyi és az élelmiszerbiztonsági várakozási időt, a maximálisan tolerálható napi bevitelt (Várnagy, 1997).

A növényvédőszer-mérgezések 30-40%-a foglalkozás körében történik, főként a szereket gyártó, csomagoló üzemek dolgozói veszélyeztetettek. Ezenkívül a szerek alkalmazása során is előfordulnak mérgezések. Ezek nagy része a megfelelő védőfelszerelések használatával, az előírások betartásával elkerülhető lenne.

A növényvédőszerek maradványok formájában az élelmiszerekben is megjelenhetnek. Főként a zöldségekben, gyümölcsökben, gabonanövényekben, takarmányban, valamint ez utóbbival táplált állatok tejében és a tejtermékekben fordulhatnak elő. Az élelmiszerekben egyéb szennyező anyagok is előfordulhatnak, pl. antibiotikumok, hormonok, mikotoxinok, toxikus nyomelemek, dioxinok, amelyek kombinált hatást is kifejthetnek (Százados, 2005). A fejlett országokban az élelmiszerek ellenőrzése nagyon szigorú. Az élelmiszerek peszticidekkel történő fertőzésének megelőzését, az élelmiszerek ellenőrzését világszerte az ENSZ Mezőgazdasági és Élelmezési Világszervezete (FAO) és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) koordinálja (Bordás, 2006).

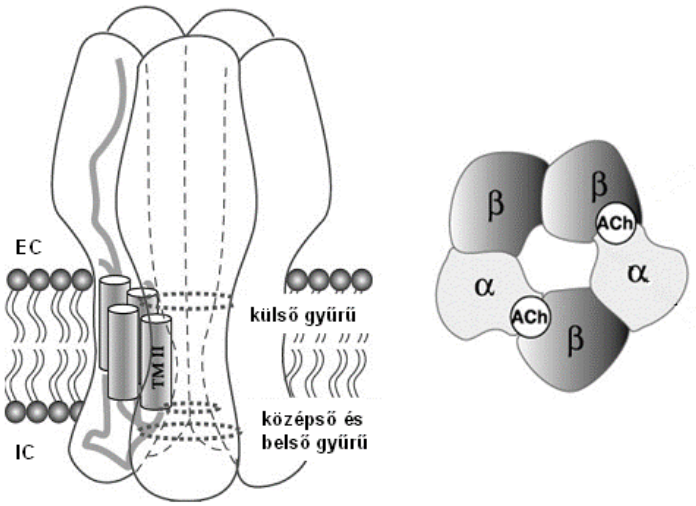
A vizsgált rovarirtószerek és molekuláris célpontjaik

A kolinerg transzmisszió és a nikotinos acetilkolin-receptor

Az acetil-kolin (ACh) volt az első anyag, amelynek neurotranszmitter szerepét felfedezték. 1921-ben Otto Loewi derítette ki híres kísérletében, hogy a nervus vagus kibocsát egy olyan mediátort, amely a békaszív működését lassítja. Később kiderült, hogy az ACh-nak gerincesekben nemcsak vegetatív hatásai vannak, hanem a neuromuszkuláris szinapszisok és a központi idegrendszer működésében is fontos szerepet játszik. Az élővilágban elterjedt neurotranszmitter, a laposférgektől kezdve minden állattörzsben megtalálható, amiből arra következtethetünk, hogy ingerületátvivő szerepe evolúciósan már korán kialakult (Walker és mtsai, 1996). A rovarok központi idegrendszerében pedig az ACh a legfontosabb serkentő neurotranszmitter (Breer és Sattelle, 1987). Két fő receptortípusát különböztethetjük meg agonistáik alapján: a muszkarinos (mAChR) és nikotinos (nAChR) receptorokat. Gerincesekben a muszkarinos receptorok a perifériás- és a központi idegrendszerben fordulnak elő, míg a nikotinos típus a neuromuszkuláris szinapszisra, a vegetatív ganglionokra és a központi idegrendszerre jellemző.

A **mAChR-ok** hét transzmembrán régiót tartalmazó, G-fehérjéhez kapcsolt receptorok. Mint a G-fehérjéhez kötött (metabotróp) receptorokra általában jellemző, aktiválásukkor a sejt válasza lassabban alakul ki és tovább marad fenn, mint a gyors nikotinos típus (ionotróp receptor) esetében. Gerincesekben 5 altípusukat írták le, amelyek közül egyesek gátló (M2, M4), mások serkentő hatásúak (M1, M3 és M5), attól függően, hogy milyen típusú G-fehérjével állnak kapcsolatban. A receptorok számos agyterületen jelen vannak, preszinaptikus vagy posztszinaptikus helyzetben. A muszkarinos receptorok a gerinceseken kívül megtalálhatók az ízeltlábúakban és a puhatestűekben is. A rovarok központi idegrendszerében is előfordulnak, de a nikotinos receptoroknál sokkal kisebb mennyiségben, míg a gerincesek központi idegrendszerére ennek fordítottja igaz. A gerinctelenekben is többféle mAChR-altípus létezik, pl. ecetmuslicából *(Drosophila melanogaster)* eddig kétféle mACh receptort kódoló gént izoláltak. A rovarok központi idegrendszerében is előfordulnak preszinaptikus (általában gátló) és posztszinaptikus (általában serkentő) típusok, amelyek hozzájárulnak a szenzoros információ feldolgozásához és a centrálisan irányított mozgásmintázatok, reflexek modulációjához (Trimmer, 1995).

A **nAChR-ok** a ligandvezérelt ioncsatornák családjába tartoznak; az ionotróp GABA-, glicin- és szerotoninreceptorokkal, valamint a gerincteleneknél előforduló glutamátvezérelte kloridcsatornákkal mutatnak rokonságot. Ezek a receptorok 5 alegységből állnak, melyek mindegyike 4 transzmembrán régiót tartalmaz. Mivel a nAChR-ok Na^+-ot (és esetenként Ca^{2+}-ot) engednek át, ezért aktiválódásuk minden esetben depolarizálja (serkenti) a posztszinaptikus sejtet. Az egyes alegységek általában különböző altípusokhoz tartoznak, gerincesekben 10-féle α–, 4 β–, ezenkívül γ–, δ– és ε-alegységeket írtak le. Az újabb kutatások szerint a receptoron 2 ACh-kötőhely van, melyek egy α– és egy nem-α– alegység határfelületén találhatók és kooperatív módon működnek (3. ábra). A különféle alegységek leggyakrabban heteromer receptorokat alkotnak (de a homomer forma is előfordul), így összetételük alapján a receptorok nagyon sokfélék lehetnek, kissé eltérő kinetikai paraméterekkel és érzékenységgel (Millar és Denholm, 2007). A receptoroknak többféle állapotát különböztethetjük meg (zárt, nyitott, lassan- illetve gyorsan deszenzitizálódott, stb.), melyek esetén a ligandum iránti affinitás és az ionáteresztő képesség eltérő (Changeux és mtsai, 1998). A nAChR-ok két nagyobb csoportra oszthatók farmakológiai tulajdonságaik és ion-szelektivitásuk alapján: a muszkuláris típusú nAChR-okat gátolja az α-bungarotoxin (α–BTX) és szinte kizárólag Na^+-iont eresztenek át, míg a neurális típus nem érzékeny α–BTX–ra és a Na^+-ionokon kívül Ca^{2+}-ra is áteresztő (Itier és Bertrand, 2001). Általánosságban elmondható, hogy az α7- vagy α8-alegységet tartalmazó receptorok α–BTX-szenzitívek.



3. ábra A nAChR oldal- és felülnézetben. EC: extracelluláris, IC: intracelluláris oldal. Megfigyelhető az 5 db alegység és a két ACh-kötőhely az α és β alegységek határán.
(Itier és Bertrand 2001-es cikkéből, módosítva)

A **rovarok** szervezetében szintén sokféle nAChR fordulhat elő, *Drosophilá*ban 7-féle α- és 3-féle β-alegységet írtak le (Millar és Denholm, 2007). A gerinceseknél leírt farmakológiai csoportosítás itt is érvényes: az α7-szerű alegységek α–BTX-ra érzékeny receptorok

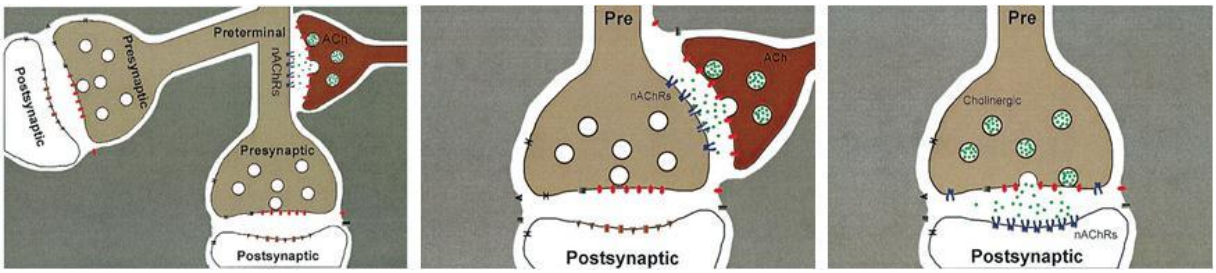
felépítésében vesznek részt. A rovar nAChR-ok heterológ expressziója során felmerült technikai nehézségek miatt arról még viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, hogy pontosan milyen összetételű receptorok fordulnak elő és ezeknek milyen jellemzőik vannak (Thany és mtsai, 2007).

Az emlős agyban a kolinerg pályák több egymással szoros kapcsolatban lévő alrendszert alkotnak. A főbb kolinerg neuroncsoportok a bazális előagyban (Meynert-féle mag, septum), a köztiagyban, a striatumban, és az agytörzsben találhatóak. Ezek közül a striatumban és a köztiagyban elhelyezkedő neuronok lokális hálózatok kialakításában vesznek részt, míg a többi agyterületről hosszú projekciós pályák erednek: a bazális előagy felől a neocortex és a hippocampus, a köztiagy felől szintén bizonyos kéregterületek, az agytörzs felől pedig a bazális előagy, a thalamus és a kisagykéreg kap kolinerg beidegzést (Gotti és mtsai, 1997). Bizonyos agyterületeken elszórt kolinerg interneuronok jelenlétét is kimutatták, így a neocortexben is. Az agyban a nikotinos és a muszkarinos kolinerg rendszer nem független, némely esetben ugyanazon a sejten is megtalálható mindkét receptortípus (Gu, 2002).

Receptorainak elhelyezkedésétől függően az ACh alapvetően háromféle hatást válthat ki a neuronhálózatokban. A preszinaptikus helyzetben lévő gátló muszkarinos autoreceptorok segítségével a preszinaptikus végződés depolarizációjának mérséklése révén csökkentheti saját felszabadulását. Preszinaptikus heteroreceptorok révén más transzmitterek felszabadulását szabályozhatja. Végül posztszinaptikus receptorokon a receptortípustól függően közvetlenül serkentheti vagy gátolhatja a posztszinaptikus sejtet (Dani, 2001).

A továbbiakban a gerincesekben fellelhető nAChR-okkal foglalkozom, hiszen az általam vizsgált neonikotinoid szer ezeken fejti ki hatását. Az emlősök agyában a nikotinos receptorok egy része posztszinaptikusan található, de nagyon jelentős részük preszinaptikus helyzetű. Funkcionális posztszinaptikus nAChR-ok jelenlétét kimutatták többek között hippocampális interneuronokon (Alkondon és mtsai, 1998) és neokortikális piramissejteken is (Chesell és Humphrey, 1995; Chu és mtsai, 2000). A nikotinos receptorok által közvetített serkentés azonban az összes serkentő bemenetnek csak töredéke, hiszen ezeket elsősorban a glutamát közvetíti (Dani, 2001). A preszinaptikus helyzetű nAChR-okat sokkal szélesebb körben vizsgálták. Szinte mindegyik transzmitterről (glutamát, GABA, dopamin, szerotonin, noradrenalin, ACh) kimutatták, hogy felszabadulásuk fokozódhat a preszinaptikus végződésen elhelyezkedő nikotinos receptorok aktivációja révén. Ezekhez csatlakozó axo-axonikus szinapszisok létezését azonban sok esetben nem sikerült bizonyítani, lehetséges,

hogy ezekhez a receptorokhoz parakrin úton jut el az ACh. A receptorokon át beáramló Na^+- és Ca^{2+}-ionok depolarizációt okoznak, amely a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák aktiválódásához, így a transzmitter exocitózisához vezet. Mivel a nAChR-ok ionpermeabilitása hipopolarizált membránpotenciál-értékeknél lecsökken, főként hiperpolarizált, illetve nyugalmi állapotban lehet jelentős a szerepük (Wonnacott, 1997). A szinaptikus végződéstől kissé távolabb elhelyezkedő, ún. preterminális nAChR-ok pedig azt biztosíthatják, hogy csak axonarborizáció egyes ágain terjedjen tovább az akciós potenciál (Dani, 2001) (4. ábra).



4. ábra A nAChR-ok háromféle lehetséges elhelyezkedése a neuronhálózatokban. Sorrendben: preterminális, preszinaptikus és posztszinaptikus pozíció. (Dani 2001-es cikkéből)

Összefoglalva, a kolinerg bemeneteknek elsősorban moduláló szerepet tulajdonítanak, amelyek diffúz vetülésüknek köszönhetően kiterjedt neuronhálózatok érzékenységét képesek módosítani, egyes neuronhálózatok működését szinkronizálni. Ezt a szerepet tükrözi az, hogy a kolinerg transzmisszió mennyiféle fiziológiás (és patológiás) folyamatban játszik fontos szerepet. A kolinerg aktiváció növeli az éberségi szintet, a figyelmet, befolyásolja a cirkadián ritmust, az egyes alvási szakaszokat (Sarter és Bruno, 2000; Hut és Van der Zee, 2011). Talán legjelentősebb a kolinerg transzmisszió szerepe a szinaptikus plaszticitási folyamatokban, melyek a tanulás és memória sejtszintű megfelelői. Az a tény, hogy Ca^{2+}-ionokat is áteresztenek, lehetőséget nyújt a sejten belüli hosszabbtávú változások kialakulására a receptor aktiválódása után. A posztszinaptikus helyzetű nAChR-ok, többféle konformációs állapotuknak köszönhetően egy bizonyos időablakon belül valószínűleg koincidencia-detektorként működhetnek, így szerepet játszhatnak a megerősítési folyamatokban, az emléknyomok kialakulásában (Changeux és mtsai, 1998). A nAChR-okat a neurodegeneratív betegségekkel is kapcsolatba hozták, Alzheimer-kórban és Parkinson-kórban bizonyos alegységek mennyisége lecsökken, és összefüggés mutatható ki a receptorvesztés és az amiloid plakkok megjelenése között is. Régóta ismert tény, hogy az Alzheimer-kór előrehaladtával szelektíven a bazális előagyi kolinerg neuronok pusztulnak el (Clementi és

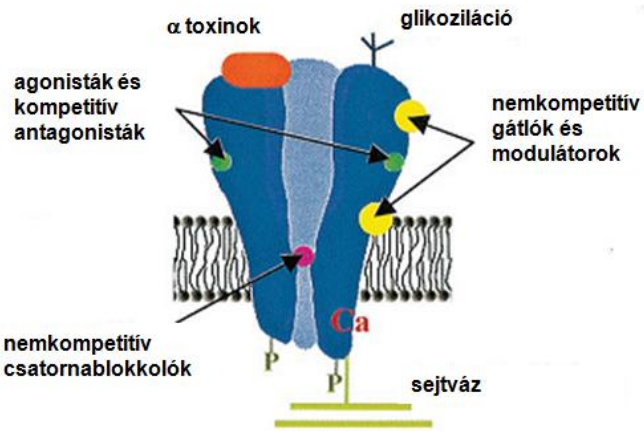
mtsai, 2000). Az idegrendszer egyedfejlődésében, a sejtek túlélésében, a nyúlványnövekedés irányításában is közreműködnek a nikotinos receptorok (Bruel-Jungerman és mtsai, 2011).

A nikotinos receptorok farmakológiája

A nikotinos receptoron ható anyagok között megkülönböztethetünk kompetitív agonistákat és antagonistákat, amelyek a ligandkötő helyekhez kapcsolódnak, és allosztérikus modulátorokat, amelyeknek más kötőhelyük van. Ezenkívül vannak csatornablokkoló vegyületek is, amelyek nemkompetitív módon hatnak, a pórusba kötődnek (5. ábra).

A természetes **agonisták** közül a legismertebb a már említett alkaloida, a rovarirtószerként is használt nikotin, de más hasonló szerkezetű anyagok is aktivátor hatásúak, pl. az anatoxin-a (az *Anabaena flos-aquae* nevű kékmoszat méreganyaga) és az ebibatidin (nyílméregbékák, pl. az *Epipedobates tricolor* bőréből származó méreg). Kutatási célokra kifejlesztettek szintetikus nAChR-agonistákat is, pl. ABT-418, RJR-2403, SIB-1765F.

Az **antagonisták** között szintén találunk alkaloidokat, ilyen a perifériás izomrelaxánsként alkalmazott d-tubokurarin (a *Chondrodendron tomentosum* alkaloidja) és a koniin (a bürök-*Conium maculatum* méreganyaga). Fontos nAChR-antagonisták a peptid szerkezetű állati mérgek is: az Elapidae és Hydrophidae családokba tartozó mérgeskígyók toxinjai közül az α-BTX csak a muszkuláris receptorokat gátolja, míg a κ-neurotoxinok a neurális típusú nikotinos receptorok antagonistái. Az α-conotoxinok, bizonyos tengeri kúpcsigák (*Conus sp.*) méreganyagai, típustól függően a muszkuláris vagy neuronális receptorok kompetitív antagonistái (Arias, 1997; Gotti és mtsai, 1997).



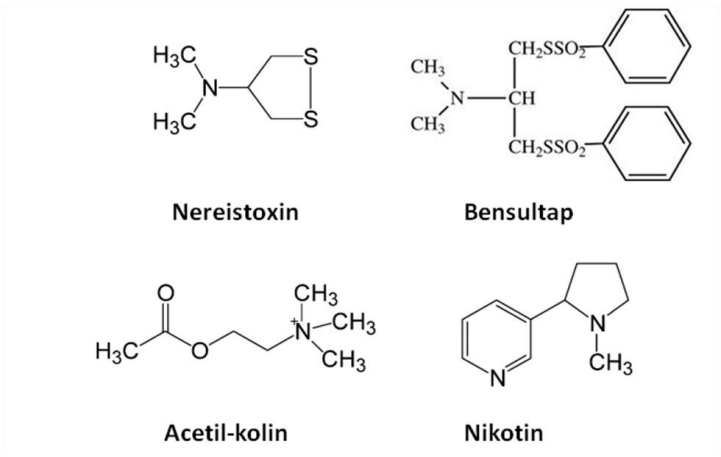
5. ábra A nAChR ligandumkötő helyei. (Dani 2001-es cikkéből, módosítva)

Az **allosztérikus modulátorok** között találjuk a nereistoxint (a Lumbriconereis heteropoda tengeri gyűrűsféregből származó méreg) és ennek származékait, a neonikotinoid csoportba tartozó rovarirtószereket, amelyekről még bővebben lesz szó. A kutatásban gyakran alkalmazott antagonista az eredetileg ganglionblokkoló gyógyszernek kifejlesztett mecamylamine. A physostigmin és más acetilkolin-észteráz gátlók aktiváló hatásúak, míg

magas koncentrációban csatornagátlóként működnek. Endogén vegyületek pl. neuroszteroidok és a szerotonin allosztérikus inhibitorokként működnek, sőt a természetes ligandum, vagyis az ACh is gátló hatást fejt ki magas koncentrációban, valószínűleg ez védelmet biztosíthat a túlzott mértékű aktiváció ellen (Arias, 1997). Az extracelluláris Ca^{2+}-szintnek is közvetlen hatása van a receptor működésére, a Ca^{2+} allosztérikus aktivátorként növeli a csatorna nyitási gyakoriságát (Mulle és mtsai, 1992).

A neonikotinoidok illetve a bensultap hatása a kolinerg transzmisszióra

Mivel a rovarok központi idegrendszerében az ACh a legfontosabb serkentő transzmitter, a kolinerg rendszer magától értetődően a rovarirtószer-kutatás egyik célpontja lett (Matsuda és mtsai, 2001). Eleinte a nikotint és egyéb növényi eredetű anyagokat alkalmaztak, majd sor került az acetilkolin-észteráz gátló szerek bevezetésére. Ezek azonban nagyon nagy toxikológiai kockázatot hordoztak, némelyik igen perzisztens, és rezisztencia is kialakult ellenük, ezért a kutatók visszatértek a nAChR-on ható szerek fejlesztéséhez. Már az 1960-as évektől kezdve kísérleteztek a **nereistoxin**nal, a *Lumbriconereis heteropoda* nevű tengeri gyűrűsféreg méreganyagával. Ez a toxin kettős hatású, koncentrációfüggően parciális agonista illetve antagonista módon befolyásolja a nikotinos szinapszisokban zajló transzmissziót, a nAChR allosztérikus modulátora (Eldefrawi és mtsai, 1980). Későbbi tanulmányokban patch-clamp módszerrel is kimutatták, hogy fő hatásként nem-kompetitív módon gátolja a nAChR működését (Raymond-Delpech és mtsai, 2003). A legkorábbi **neonikotinoidok** ennek származékai, az ún. nereistoxin-analógok: a cartap, a bensultap és a thiocyclam (6. ábra). Bizonyos kártevők, pl. a burgonyabogár ellen igen hatékonyak, de összességében a rovarirtószer-piacnak csak igen kis részét képviselik. Bizonyos országokban újabban korlátozták is a használatukat, mert nem eléggé szelektívek, az emlősökre is veszélyesek lehetnek. Az 1990-es évektől kezdődően forgalmazott újabb neonikotinoidok a nereistoxin-analógokkal ellentétben általában serkető hatást fejtenek ki a nikotinos receptorokon. Ennek a csoportnak legjelentősebb képviselői az



6. ábra A nikotinos receptorok ligandumainak, egyes modulátorainak szerkezeti képlete.
(Raymond-Delpech és mtsai 2003-as cikkéből, módosítva)

imidacloprid, a thiamethoxam és a dinotefuran, világszerte jelentős mennyiségben alkalmazzák őket a mezőgazdaságban és az állatorvoslásban egyaránt (Millar és Denholm, 2007). Az emlősökre kevéssé veszélyesek, nagy szelektivitásukat a molekulában jelen lévő negatív töltésű nitro- vagy cianocsoportnak köszönhetik, amely leginkább egy, a rovar nAChR-on található pozitív töltésű régióhoz kötődik. Az emlősök receptorain nincs jelen ez a kötőhely (Tomizawa és Casida, 2003).

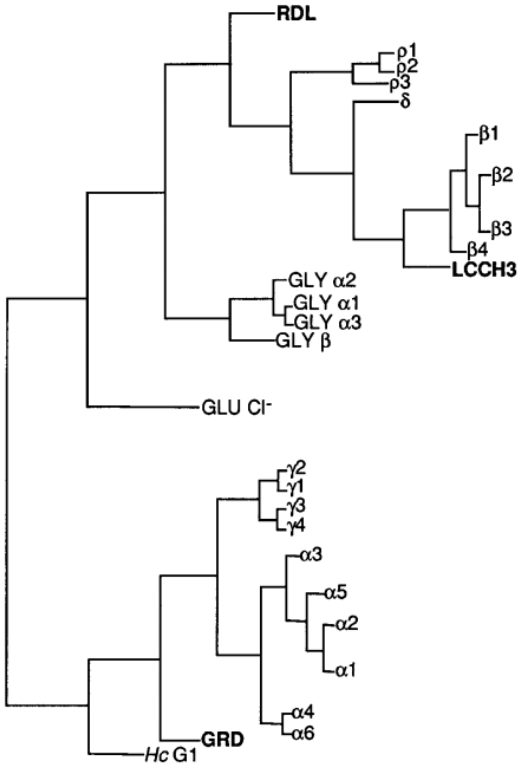
A neonikotinoidok intenzív használata néhány esetben rezisztencia kialakulásához vezetett, ám ez viszonylag kevés kártevőfajban jelentkezik. A rezisztencia mechanizmusa kétféle lehet: egyrészt a méregtelenítésért felelős enzimek megnövekedett expressziója (Nauen és Denholm, 2005), másrészt a célfehérjén történő mutáció. A *Nilaparvata lugens* nevű, főként rizsen élősködő kártevőben azonosítottak a nAChR-on egy olyan pontmutációt, amely az ACh-kötést nem befolyásolja, viszont az összes neonikotinoid szer megkötődését nagymértékben csökkenti (Liu és mtsai, 2006).

A **bensultap** (S,S0-2-dimethylaminotrimethylene di(benzen-ethiosulfonate)) egy nereistoxin-analóg típusú nikotinoid rovarirtószer, 1993-ban került forgalomba. Főként a burgonyabogár és egyéb kártevők ellen alkalmazzák (Civelek és Weintraub, 2003). A nereistoxin-analógok pro-inszecticidnek tekinthetők, amelyek a rovarok szervezetében metabolizmus (oxidáció) során alakulnak át nereistoxinná. Sokáig úgy tartották, hogy csak a nereistoxin a hatásos, aktív vegyület, később viszont a cartapról és a bensultapról is kiderült, hogy átalakulás nélkül is gátolják a nAChR-t (Lee és mtsai, 2004). A bensultap emlősökre enyhén mérgező, hosszantartó expozíció esetén máj- és vesekárosító hatású (Ge és mtsai, 2011). Képes átjutni a vér-agy gáton és zsíroldékonysága révén felhalmozódik az agyszövetben (Dóczi és mtsai, 1999). Laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok során már kimutatták különféle idegrendszeri hatásait itatásos vagy etetéses bejuttatás után (Dóczi és mtsai, 1999; Szegedi és mtsai, 2005). Magyarországon a bensultap hatóanyagú rovarölőszerek használatát 2007-től korlátozták, csak bizonyos termesztett növényeken alkalmazhatóak.

A GABA-erg transzmisszió, az ionotróp GABA-receptor

A GABA az állatvilágban igen elterjedt szinaptikus átvivőanyag, a gerinces központi idegrendszerben ez a legfontosabb gátló neurotranszmitter, de bizonyos gerinctelenekben (puhatestűekben) és az egyedfejlődés során emlősökben átmenetileg serkentő hatást is közvetíthet. Ahogyan az acetilkolinnak, a GABA-nak is vannak ionotróp ($GABA_A$ és $GABA_C$) és metabotróp ($GABA_B$) receptorai, amelyek specifikus antagonistákkal (pl. picrotoxin illetve baclofen) különíthetők el. A lassúbb kinetikájú $GABA_B$ receptorok G-fehérjéhez kötöttek, K^+- vagy Ca^{2+}-csatornákon keresztül befolyásolják a neuronok membránpotenciálját. Az egész agyban előfordulnak, preszinaptikus vagy posztszinaptikus helyzetben, így a transzmitter-felszabadulást gátolják, illetve hosszantartó posztszinaptikus gátlást közvetítenek (Kerr és Ong, 1995). Az ionotróp receptorok ligandfüggő anioncsatornák, amelyek Cl^-- és HCO_3^--ionokat engednek át 4:1 arányban. Amint már előzőleg is említettem, a nAChR-okkal, a glicin- és szerotoninreceptorokkal, valamint a gerincteleneknél előforduló glutamátvezérelte kloridcsatornákkal egy családba tartoznak, hasonló felépítésűek. Ezek a receptorok 5 alegységből állnak, gerincesekben eddig 16-féle α, β, γ, δ, ε, π és θ alegységet írtak le, amelyek sokféle kombinációban állnak össze, eltérő kinetikai paraméterekkel (Möhler, 2006). A retinában előforduló, ρ-alegységekből összeálló homomer receptorok külön csoportot alkotnak, amelyet egyesek a $GABA_C$ receptorcsaládként tartanak számon, mások a $GABA_A$ receptorcsaládba sorolják őket (Bormann, 2000).

A GABA-receptorok az egész állatvilágban rokon szerkezetűek (7. ábra). **Gerinctelenekben** a metabotróp receptortípus valószínűleg kisebb mennyiségben fordul elő, mint az ionotróp típus, de elterjedt lehet, hiszen több puhatestű- és rovarfajban leírták már őket. Az ionotróp receptorokról több adat áll rendelkezésre. Nagy mocsári csigában *(Lymnaea stagnalis)* és ecetmuslicában



7. ábra A rovar és gerinces GABA-receptor alegységek rokonságát bemutató dendrogram. A gerinces alegységeket görög betűk jelölik. (Hosie és mtsai 1997-es cikkéből)

(Drosophila melanogaster) is ismeretesek a gerincesek α- és β-alegységeihez hasonló $GABA_A$-szerű receptor-alegységek, amelyeknek aminosavsorrendje a gerincesekéivel 30-50 %-os homológiát mutat (Walker és mtsai, 1996). Az ecetmuslicában háromféle alegység-osztályt írtak le: ezek az Rdl („resistance to dieldrin), a Grd („GABA and glycine-like receptor of *Drosophila"*) és az Lcch3 („ligand-gated chloride-channel homologue 3"). Ezen alegységek szerkezeti felépítése nagyon hasonló a gerincesekéihez, viszont farmakológiai érzékenységük igen eltérő lehet: pl. a bicuculline-ra, amely a gerinces $GABA_A$-receptorokat gátolja, a legtöbb rovar-alegység inszenzitív, bár a picrotoxin nevű csatornablokkoló ezeken is hatásos (Hosie és mtsai, 1997).

A gerinctelenekben az ionotróp GABA-receptorokhoz hasonló szerkezetűek a gátló glutamátreceptorok (IGluR) vagy glutamát-vezérelte kloridcsatornák (GluCl), amelyek gerincesekben nem fordulnak elő. A glutamát vagy valamely agonista, pl. iboténsav kötődésének hatására az ioncsatornán Cl^--ionok áramlanak a sejtbe, amely hiperpolarizálódik. Rovarokban az idegszövetben és az izomrostokon, a neuromuszkuláris szinapszisok környékén találhatók meg (Cleland, 1996).

A kifejlett **gerincesek** agyában a GABA jellemzően gátló interneuronokból szabadul fel, amelyek a serkentő principális sejtekkel szinaptizálva csökkentik azok aktivitását. Bár az agyban csak mintegy a neuronok 20%-a GABA-erg, kulcsszerepet játszanak a hálózatok aktivitási szintjének, érzékenységének állításában, az aktivitás szinkronizálásában. Ezzel a tanulási folyamatokban is jelentős szerepet játszanak. A legjobban kutatott agyterületeken, a neocortexben és a hippocampusban számos interneuron-típust írtak le. Az egyes típusok agyterület-specifikusak, sőt, a posztszinaptikus sejt adott részén szinaptizálnak. Előfordulnak extraszinaptikusan elhelyezkedő receptorok is, amelyek a szinaptikus receptorokkal ellentétben a hosszantartó, tónusos gátlásért felelősek. A $GABA_A$ receptorok alegység-összetétele minden esetben a funkciójukat tükrözi (Mody és Pearce, 2004).

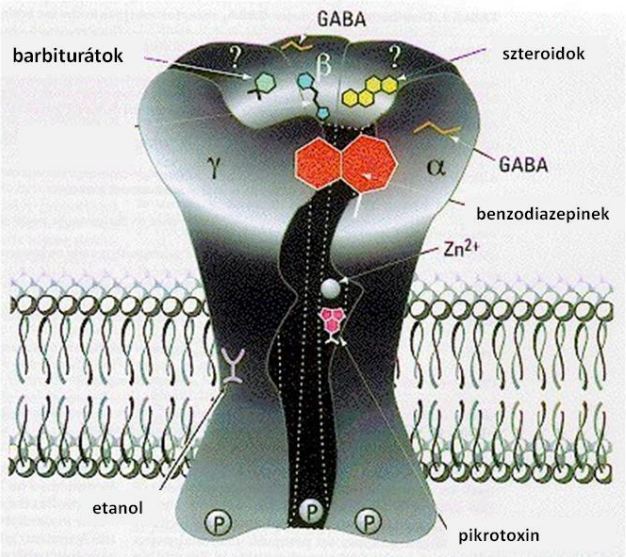
A gerincesekben GABA igen fontos szerepet tölt be az idegrendszer egyedfejlődése során. A glutamáttal együtt már a szinapszisok kialakulása előtt trofikus faktorként működik, befolyásolja a neuronok osztódását, vándorlását, differenciációját és túlélését (Luján és mtsai, 2005; Represa és Ben-Ari, 2005). A GABA az idegrendszer fejlődésének korai szakaszában (embrionálisan és a születés utáni első napokban) a $GABA_A$-receptorokon keresztül depolarizáló, serkentő hatást fejt ki, mivel a sejten belüli Cl^--koncentráció ebben az időszakban magasabb, mint az érett neuronokban, így a receptor aktivációjakor a Cl^--ionok

kifelé áramlanak (Ben-Ari és mtsai, 1997). A szinapszisok kialakulásában és a kapcsolatok stabilizálódásában/eliminálódásában szintén nélkülözhetetlen a megfelelő arányú GABA-szignalizáció, amely ebben az időszakban már gátló hatást közvetít (Möhler, 2006).

A $GABA_A$ receptorok farmakológiája

A $GABA_A$ receptorok farmakológiája talán a legkomplexebb a ligandfüggő ioncsatornák közül. Nagyon sokféle vegyület képes befolyásolni a működésüket, az eltérő összetételű receptorok érzékenysége eltérő az egyes anyagokra. Sok anyag kötőhelye két alegység határán helyezkedik el, pl. a GABA is az α- és a β-alegységek határán kötődik meg (8. ábra).

A $GABA_A$ receptorok klasszikus **kompetitív antagonistá**ja a bicuculline, ennek segítségével különítették el őket a baclofenre érzékeny metabotróp receptortípustól. A bicuculline a *Dicentra cucullaria* nevű növény alkaloidja, görcskeltő hatású, főként négyértékű sóit alkalmazzák, pl. a bicuculline-methiodidot. Az SR95531 vagy gabazine a GABA egy szintetikus származéka, szintén a kutatásban alkalmazott kompetitív antagonista.



8. ábra A $GABA_A$-receptorok kötőhelyei. (http://huguenard-lab.stanford.edu)

A **nemkompetitív antagonisták** közül talán legfontosabb a picrotoxin, a *Menispermaceae* növénycsalád alkaloidja, erősen görcskeltő hatású. A $GABA_A$ receptorok kloridcsatornáit blokkolja, kötőhelye az ioncsatorna környékén van. A picrotoxinhoz hasonló módon hatnak bizonyos klórozott szénhidrogén, pl. ciklodién típusú rovarirtószerek. Endogén nemkompetitív antagonistaként hat a Zn^{2+}, amely a szinaptikus végződésekből felszabadulva a $GABA_A$ receptorokon kívül az NMDA- és az ATP-receptorokat is befolyásolhatja.

A légyölő galócában megtalálható vegyület, a muszcimol a $GABA_A$ receptorok **agonistá**ja, valószínűleg ez a vegyület felelős a gomba pszichoaktív hatásaiért a glutamáterg transzmissziót befolyásoló iboténsav mellett (Johnston, 1996).

A $GABA_A$ receptorok fontos gyógyszercélpontok, a legtöbb ilyen szer agonista hatású, a GABA-erg gátlást erősíti. Az 1960-as évek óta használt szorongáscsökkentő hatású

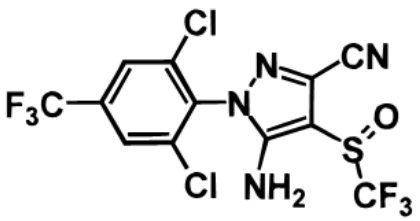
benzodiazepinek a receptornak egy allosztérikus modulátor-kötőhelyéhez kapcsolódnak, és megnövelik az ioncsatorna nyitási gyakoriságát (Stephenson, 1995). A barbiturátok szintén allosztérikus agonisták, hatásmechanizmusuk és kötőhelyük eltér a benzodiazepinekétől: az ioncsatorna nyitvatartási idejét hosszabbítják meg. Az 1900-as évek eleje óta alkalmazzák őket altató-nyugtató és görcsgátló szerként.

Az etil-alkohol elsődleges célpontjai a $GABA_A$ receptorok, működésüket koncentrációfüggő módon serkenti. Agonista módon hatnak még az endogén neuroszteroidok és a modern gáznarkotikumok is (Johnston, 1996).

A fenilpirazolok illetve a fipronil hatása a GABA-erg transzmisszióra

Több rovarirtószer-családnak is a rovar $GABA_A$-receptorok a célpontjai; mivel a rovar receptorok farmakológiai profilja a gerincesekétől eltér, ezek a szerek általában viszonylag jó szelektivitást mutatnak. Az első nagyobb GABA-receptoron ható rovarirtószer-családba klórozott szénhidrogének tartoztak. Jelentőségükre utal, hogy az ecetmuslicában leírt egyik $GABA_A$-receptor alegység neve Rdl, amely a dieldrinrezisztenciára utal. A dieldrin egy, a ciklodiének közé tartozó második generációs inszekticid, amely ellen a túlzott használat miatt sok rovarfajban rezisztencia alakult ki. A ciklodiénrezisztencia a legnagyobb volumenű ember által véghezvitt genetikai szelekciónak tekinthető. Ennek a hátterében az Rdl alegységnek egy pontmutációja áll. A rezisztens rovartörzsek vizsgálatakor kiderült, hogy ezek a picrotoxinra is kevésbé érzékenyek, mint a vad típus, így fény derült arra is, hogy a dieldrin kötőhelye, ahogyan a picrotoxiné is, az ioncsatorna falában található (Hosie és mtsai, 1997).

A dieldrinrezisztencia elterjedése és a környezetvédelmi-toxikológiai megfontolások miatt fejlesztettek ki egy újabb GABA-receptoron ható rovarirtószer-családot, a fenilpirazolokat, amelyek kevésbé toxikusak a nem cél-fajokra. A **fipronil** (5-amino-1-(2,6-dikloro-α,α,α-trifluoro-*p*-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazol-3-karbonitril) (9. ábra) 1993-ban került forgalomba. Népszerű szer az állatorvoslásban kutyák és macskák bolha illetve tetű elleni kezelésére, pl. a Frontline® nevű készítmény hatóanyaga is ez (Beugnet, 2004; Pollmeier és mtsai, 2002). A fipronilt főleg bogarak és lepkék lárvái, kifejlett bogarak (pl. burgonyabogár) és sáskák ellen használják a mezőgazdaságban (Durham és mtsai, 2001). Szúnyog-, csótány- és hangyairtásra



9. ábra A fipronil szerkezeti képlete

szintén alkalmazzák épületekben pl. vendéglátó-ipari egységekben is (Chaton és mtsai, 2001; Scott és Wen, 1997; Lopez és mtsai, 2000).

A fipronil és más **fenilpirazolok** általában a dieldrin-rezisztens kártevők ellen is hatásosak, bár kisebb mértékben, mint a vad típusú rovarok ellen. A hatásmechanizmus felderítésére irányuló vizsgálatok során kiderült, hogy ezek a szerek nemkompetitív gátló hatást fejtenek ki az ionotróp GABA-receptorokon (Cole és mtsai, 1993), viszont a dieldrinétől eltérő módon hatnak (Le Corronc és mtsai, 2002). Ezenkívül fontos tulajdonságuk, hogy a gátló glutamátreceptorokat (GluCl) is képesek blokkolni, ez hozzájárul a rovarok irányában mutatott nagyobb szelektivitáshoz is, hiszen ilyen típusú csatornák a gerincesekben nem fordulnak elő (Ikeda és mtsai, 2003; Narahashi és mtsai, 2010). A szelektivitásért azonban elsősorban a fő célmolekulák, vagyis a $GABA_A$-receptorok eltérő fipronil-affinitása felelős: *in vitro* receptorkötési tesztekből, illetve patch clamp vizsgálatokból kiderült, hogy a rovarok receptorai, 1-2 nagyságrenddel érzékenyebbek a fipronilra, mint az emberé és a patkányé (Hainzl és mtsai, 1998; Zhao és mtsai, 2003). A fipronil kötőhelye valószínűleg a β3-receptoralegységen található (Ratra és mtsai, 2001), ez az alegység egyébként igen konzervatív szerkezetű, aminosavszekvenciája nagyfokú homológiát mutat a rovarok és az emlősök között (Sirisoma és mtsai, 2001). A gerincesekben a heteromer receptort kialakító többi alegység befolyásolja úgy a fipronil kötődését, hogy a receptor érzékenysége a rovarokénak csak töredéke lesz (Ratra és Casida, 2001).

Bár a fipronil alkalmazása kisebb környezeti kockázattal jár, mint pl. a ciklodiéneké, az Egészségügyi Világszervezet a mérsékelten veszélyes vegyi anyagok közé sorolja. Méhek, madarak és édesvízi gerinctelenek számára igen mérgező (El Hassani és mtsai, 2005; Tingle és mtsai, 2003; Mize és mtsai, 2008; Wirth és mtsai, 2004). Emlősök számára viszonylag veszélytelen, de az egészségügyi kockázat nem teljesen elhanyagolható. Egy, a szer belélegzésével járó mérgezéses eset leírásában azt olvashatjuk, hogy tipikus általános idegrendszeri tüneteket okozott, fejfájást, szédülést és hányingert. A tünetek 5 óra elteltével spontán elmúltak (Chodorowski és Anand, 2004). Egy másik esetben a kisebb hatóanyagtartalmú hangyacsali véletlen elfogyasztása semmiféle tünetet nem okozott (Fung és mtsai, 2003).

A fipronil a májban citokróm p450-függő mikroszómális oxigenázok segítségével egy szulfon metabolittá alakul át, amely azonban hasonló vagy erősebb toxikus hatást mutat, mint az eredeti vegyület (Hainzl és mtsai, 1998). A fipronil a májban indukálni képes különféle

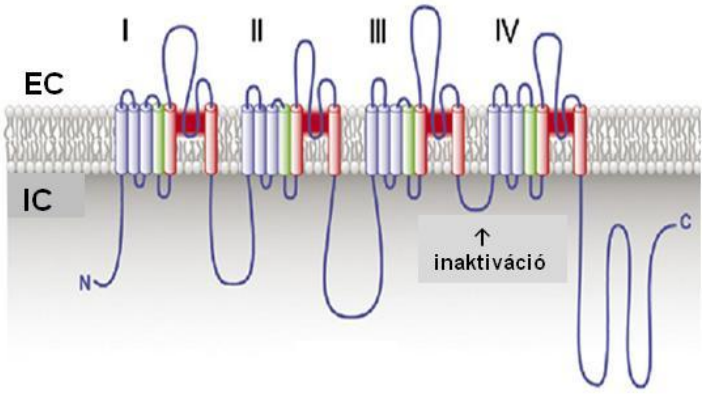
citokróm p450 izoformákat, magasabb koncentrációban pedig hepatotoxikus hatású (Das és mtsai, 2006). A fipronil jelenléte befolyásolni képes egyéb xenobiotikumok (pl. gyógyszerek) és endogén hormonok (pl. szteroidok, pajzsmirigyhormonok) metabolizmusát is (Tang és mtsai, 2004). Ez krónikus fipronilbevitel esetén patkányokban pajzsmirigyrák kialakulásához vezethet (Leghait és mtsai, 2009). A fipronil idegrendszeri illetve viselkedésre gyakorolt hatását szintén vizsgálták már emlősökben (Szegedi és mtsai, 2005; Tercariol és Godinho, 2011).

A feszültségfüggő Na^+-csatornák

A feszültségfüggő Na^+-csatornák felelősek az ingerlékeny szövetekben (ideg- és izomszövet) kialakuló akciós potenciálok létrehozásáért és tovaterjedéséért, így elsődleges szerepük van a szervezeten belüli gyors kommunikációban, információtovábbításban és a mozgások koordinálásában. Evolúciósan a csalánozókban jelennek meg először, amelyeknek már specializált idegsejtjeik vannak (Anderson és Greenberg, 2001). Ionszelektivitásuk nagy, főként Na^+-t engednek át, egyéb kationok csak 1%-nál kisebb valószínűséggel haladnak át a csatornán. A Na^+-permeabilitás gyors, rövid ideig tartó megnövekedése felelős az akciós potenciál felszálló ágáért (Marban és mtsai, 1998). A nyugalmi membránpotenciálnál zárt állapotban lévő ioncsatornák depolarizáció hatására kb. -40 mV-os membránpotenciálnál megnyílnak, majd néhány ms elteltével a membrán repolarizációjától függetlenül inaktiválódnak. Ekkor megszűnik az ionáram, de a csatornák nem aktiválható – inaktív – állapotban vannak. A plazmamembrán repolarizációja során a Na^+-csatornák újra zárt, aktiválható állapotba kerülnek. Végeredményben tehát a feszültségfüggő Na^+-csatornáknak háromféle állapota létezik: zárt, nyitott és inaktív. Már a XX. sz. 50-es éveiben feltételezték, hogy ennek a háromféle konformációnak a kialakításához legalább 2 „kapu” szükséges, így írták le az aktivációért felelős m kaput és az inaktivációért felelős h kaput (Hodgkin és Huxley, 1952).

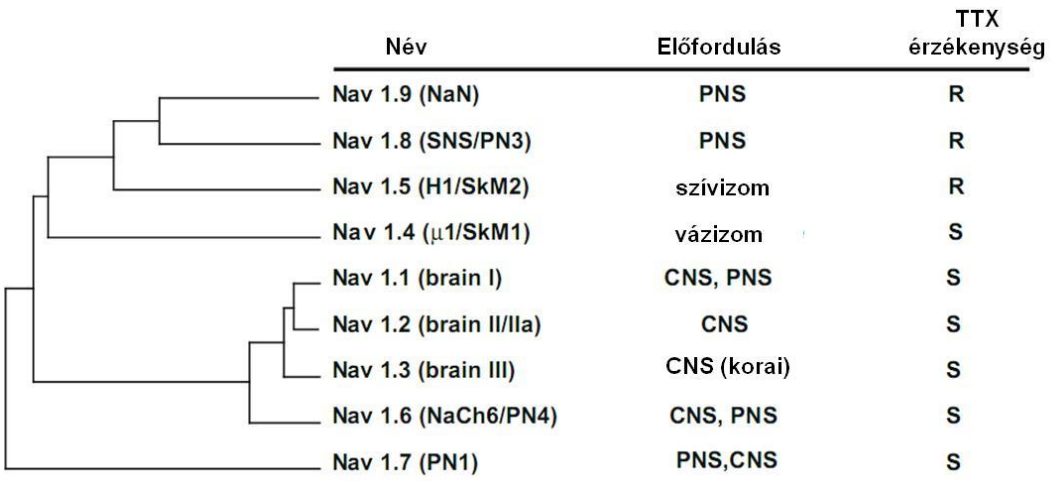
Az **emlős feszültségfüggő Na^+-csatornák** egy nagyobb méretű, pórusformáló α- és egy vagy több kisebb, moduláló illetve kihorgonyzó szerepű β-alegységből állnak. A β-alegységek jelenléte elengedhetetlen a normális kinetikához és feszültségfüggő működéshez (Isom és mtsai, 1992, 1995). Ezenkívül hozzájárulnak a csatornák megfelelő eloszlásához is, pl. feldúsulásukhoz az axondombon és a Ranvier-befűződésekben (Srinivasan és mtsai, 1998). Az α-alegység 4 homológ egységből áll (I-IV.), amelyek mindegyike 6 transzmembrán

domént tartalmaz (S1-S6). A feszültségfüggő konformációváltozásért (aktivációért) a mindegyik egységben megtalálható S4 domének felelősek, amelyek egy, sok pozitív töltésű aminosavból álló α-hélixet tartalmaznak, így feszültségszenzorként működnek (10. ábra). A plazmamembrán depolarizációja esetén az S4 egységek az extracelluláris tér felé mozdulnak el, és a velük kapcsolatban álló S6 egységek egy részlete (az ún. m kapu) szintén elmozdul, megnövelve a csatorna permeabilitását. Az inaktivációs folyamatért a III. és IV. homológ egység között elhelyezkedő intracelluláris hurok felelős (h kapu). Az ezen található 3 pozitív töltésű aminosavat tartalmazó peptidszakasz szintén az extracelluláris tér felé mozdul el a membrán depolarizációja esetén, így visszahajolva elzárja a csatorna pórusát (Catterall, 2000).



10. ábra A Na^+-csatorna α-alegységének szerkezete. A hengerek a transzmembrán α-hélixeket jelölik. Kék: S1-S3 szegmensek, piros: S5-S6 pórusformáló szegmensek, zöld: S4 feszültségszenzor szegmens.
(Catterall és mtsai 2007-es cikkéből)

Az emlősökben 9-féle, különálló gének által kódolt α-alegység ismert (az újabb nevezéktan szerinti $Na_v1.1$-$Na_v1.9$), amelyek kifejeződése szövetspecifikus és az egyedfejlődés folyamán is változik. A $Na_v1.4$ elsősorban a vázizomszövetben, míg a $Na_v1.5$ a szívizomszövetben fejeződik ki. Négyféle alegység elsősorban a központi idegrendszerre jellemző: $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ és $Na_v1.6$, ezek közül a $Na_v1.3$ csak embrionális korban és perinatálisan van jelen, míg a többi a felnőtt idegrendszerben is. A perifériás idegrendszerben pedig a $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ és $Na_v1.9$ típusok fordulnak elő. Általában egy idegsejt membránjában többféle alegységszerkezetű csatorna is kifejeződik. Az egyes alegységek kinetikája és farmakológiai érzékenysége eltérő. A központi idegrendszerre és a vázizomszövetre jellemző izoformákat már nanomoláris koncentrációban blokkolja a tetrodotoxin (TTX), míg a szívizomszövetben megtalálható izoforma érzékenysége jóval kisebb, a toxin ezt csak mikromoláris koncentrációtartományban blokkolja („TTX-rezisztens”). A perifériás idegrendszerre jellemző ioncsatornák közül a $Na_v1.7$ TTX-érzékeny, míg a $Na_v1.8$ és $Na_v1.9$ TTX-rezisztens izoformák (Goldin, 1999) (11. ábra).



11. ábra A patkány Na_v1 izoformák evolúciós rokonsága. Zárójelben az alegységek régebbi elnevezése is fel van tüntetve, ezenkívül a jellemző előfordulásuk (CNS: központi idegrendszer, PNS: perifériás idegrendszer) és tetrodotoxin (TTX) iránti érzékenységük is. (Soderlund 2010-es cikkéből, módosítva)

A feszültségfüggő Na^+-csatornák **mutációi** emberben többféle örökletes megbetegedéshez vezethetnek. A vázizomra jellemző csatornatípusnak az inaktivációs kapun jelentkező domináns öröklődésű mutációi okozzák a periodikus paralízis-szindrómát és a paramyotonia congenitát. Ezekben az állapotokban a Na^+-csatornák túlműködése jellemző, legtöbbször az inaktiváció lassulása, késleltetése miatt. A Na^+-áramok mértékétől függően ismétlődő tüzelés vagy depolarizációs blokk alakulhat ki, myotoniához vagy bénuláshoz vezetve (Cannon, 1996). A szívizom feszültségfüggő Na^+-csatornáinak mutációja okozza pl. a hosszú QT-szindrómát, amely életveszélyes kamrai aritmiához vezethet. Ennél a betegségnél szintén a csatornák inaktivációja gátlódik, emiatt abnormális mértékben meghosszabbodik a szívizom akciós potenciálja (Bennett és mtsai, 1995). Az agyi Na^+-csatornák β-alegységének mutációja olyan módon változtatja meg a csatornák működését, amely az idegsejtek túlserkentéséhez vezet, örökletes lázgörcsöket vagy generalizált epilepsziát okozva (Wallace és mtsai, 1998).

A **rovarok feszültségfüggő Na^+-csatornáiról** sokkal kevesebb információ áll jelenleg rendelkezésre, mint az emlősökéiről. Esetükben egyféle fő alegység ismert, az ezt kódoló gén neve *para,* amely azonban a *Xenopus*-petesejtben végzett génexpressziós kísérletek tanúsága szerint önmagában nem alkot működőképes csatornát, egy kisebb méretű, *TipE* nevű membránfehérjére is szükség van a Na^+-áram kialakulásához (Feng és mtsai, 1995). A *para* alegység kb. 50 %-os homológiát mutat az emlősök feszültségfüggő Na^+-csatornájának α-alegységeivel, viszont a *TipE* fehérje nem tekinthető a β-alegységek homológjának. A rovaroknál is megfigyelhető különböző Na^+-csatorna-altípusok jelenléte, ezek azonban mind a

para gén termékei, amelyek alternatív illesztés (splicing) vagy RNS-átszerkesztés (editing) útján keletkeznek (Loughney és mtsai, 1989).

A feszültségfüggő Na^+-csatornák farmakológiája

A feszültségfüggő Na^+-csatornák többféle neurotoxin-csoport molekuláris célpontjai, amelyek legalább 6-féle különböző kötőhelyhez köthetnek a csatornán. Ezek az anyagok magas affinitásuknak és specifikusságuknak köszönhetően az ioncsatornák kutatásában is értékes eszközök (Catterall és mtsai, 2007).

Az **antagonisták** közül talán legismertebb a tetrodotoxin (TTX), a gömbhalfélék (*Tetrodon* sp.) májában és petefészkében termelődő méreganyag, amely a Na^+-csatornákon át történő ionáramlást gátolja, pórusblokkoló hatású. A toxin kötőhelye a csatornapórus extracelluláris nyílásához közel, az ionszelektivitást biztosító hurkon található. A hasonló szerkezetű szaxitoxin (STX) szintén ehhez a helyhez kötődik (Hille, 1975), ezt a méreganyagot bizonyos *Dinoflagellata* (páncélos ostoros egysejtű) fajok termelik. A kúpcsigák (*Conus sp.)* egyik méreganyaga, a μ-conotoxin is hasonló hatásmechanizmusú méreg. A tetrodotoxinnak fontos szerepe volt a Na^+-csatorna fehérjék tisztításában és a szerkezeti vizsgálatokban (Yu és Catterall, 2003), és manapság is alkalmazzák pl. patch clamp méréseknél a Na^+-áramok kiiktatására. Az egyes csatorna-altípusok TTX-érzékenysége eltérő (lásd fentebb).

A helyi érzéstelenítők (pl. lidokain) molekuláris célpontjai szintén a feszültségfüggő Na^+-csatornák. Ezek a vegyületek a plazmamembránon átoldódva az intracelluláris oldalról kötődnek a pórushoz illetve annak közelébe, és az inaktivációt gyorsítva gátolják a csatorna működését (Balser és mtsai, 1996). Az idegi ingerületvezetés gátlása révén fejtik ki érzéstelenítő hatásukat. Bizonyos antikonvulzáns és antiaritmiás szerek (fenitoin, kinidin) más módon, de ugyanezt a kötőhelyet módosítják.

A feszültségfüggő Na^+-csatornák működését **serkentő anyagok** között többek között polipeptid toxinokat is találunk. Ilyen a β-skorpiótoxin, amely az extracelluláris tér felől kapcsolódik a II. egység S4 feszültségszenzor doménjéhez, ezáltal negatívabb irányba tolja el az érzékenységi küszöböt, növeli a csatorna aktiválhatóságát. Így a csatorna már kisebb mértékű depolarizáció hatására is megnyílik (Cestele és mtsai, 1998). Az α-skorpiótoxin és az *Anemonia sulcata* toxin II (ATX II) az inaktivációs folyamatot gátolják, a IV. egység S4 doménjéhez kötődve. Hatásukra a csatorna a normálisnál hosszabb ideig aktív, nyitott állapotú marad (Catterall és mtsai, 2007).

A növényi alkaloidok közül pl. az akonitin (*Aconitum sp.* – sisakvirág) és a veratridin (*Sabadilla sp., Veratrum sp.* – zászpa) hatásmódja az előbb említett toxinokéhoz hasonló. A veratridint alkalmazzák is bio-rovarölőszerként (Bloomquist, 1996). A batrachotoxin, bizonyos dél-amerikai békafajok (pl. *Phyllobates aurotaenia*) mérge szintén serkenti a csatornák működését.

A természetes toxinokon kívül bizonyos szintetikus anyagok is a feszültségfüggő Na^+-csatornákon fejtik ki hatásukat. Ilyenek pl. a rovarirtószerek közül a DDT és a piretroidok. A DDT-t a második világháború után használták óriási mennyiségben, de ártalmas környezeti hatásai és perzisztenciája miatt sok helyen betiltották, és alkalmazását többek között a piretroidok helyettesítik. Hatásmechanizmusuk a Na^+-csatorna inaktiválódásának lassítása, és az érzékenységi küszöb eltolása (Zlotkin, 1999; Bloomquist, 1996).

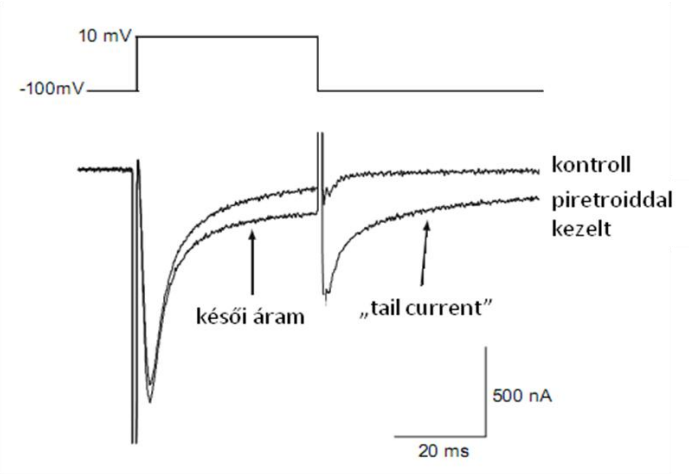
A piretroidok illetve az eszfenvalerát hatása a feszültségfüggő Na^+-csatornákra

A piretroidok a rovarirtószereknek egy jelentős csoportját alkotják, széles körben alkalmazzák őket a mezőgazdaságban, az állatorvoslásban és a közegészségügyben egyaránt. 2002-ben a világ rovarirtószer-kereskedelmének 18%-át a piretroidok tették ki (Soderlund, 2012). Szintetikus rovarirtószerek, amelyeket az 1970-es évektől kezdve fejlesztettek ki a természetes piretrum-alkaloidok vizsgálata alapján. A szintetikus származékok erősebb hatású és stabilisabb vegyületek, mint természetes elődeik (Casida, 1980). A legtöbb piretroid észter típusú molekula, amelyek 2 kiralitáscentrumot tartalmaznak, így négyféle sztereoizomerjük lehet, amelyeknek hatékonysága általában különböző.

A piretroid rovarirtószerek a rovarokban először hiperexcitációs tüneteket, majd bénulást, így a repülő rovarok lehullását okozzák („knockdown effect”). Hatásukat főként a központi idegrendszeren fejtik ki, fő molekuláris célpontjuk a feszültségfüggő Na^+-csatorna (Narahashi és mtsai, 1992). Ezt többféle piretroid-rezisztencia mutáció feltérképezésével erősítették meg, amelyek, mint kiderült, a feszültségfüggő Na^+-csatorna egyes alegységein jelentek meg.

Később elektrofiziológiai módszerek segítségével részletesen leírták a piretroidok **molekuláris hatásmechanizmusát**. Ezek a vegyületek a feszültségfüggő Na^+-csatorna működésének kinetikáját változtatják meg, lassítva az aktivációt és az inaktivációt egyaránt (Chinn és Narahashi, 1986). A piretroidok hatását *Xenopus*-petesejtben kifejeztetett rekombináns rovar- illetve emlős Na^+-csatornákon végzett patch-clamp mérésekkel igen részletesen vizsgálták. A legtöbb piretroid már nM-os koncentrációtartományban is

hatékonyan lassítja a rovar Na^+-csatornák megnyílását és záródását, ezenkívül az is megfigyelhető, hogy az aktiválódáshoz szükséges hipopolarizáció-szint negatívabb membránpotenciál-értékek irányába tolódik el (Warmke és mtsai, 1997). A Na^+-áramok időtartama megnő, lecsengésük extrém mértékben elnyújtottá válhat piretroidokkal való kezelés hatására, ez a nyugalmi potenciálra való visszaállás után jelentkező ún. „tail current" megjelenéséhez vezet (12. ábra). A normális latenciaidejű Na^+-áram és a „tail current" amplitúdójának arányából kiszámítható a piretroid által módosított Na^+-csatornák aránya (Tatebayashi és Narahashi, 1994). A normálisnál hosszabb időtartamú Na^+-áram az idegsejteken depolarizáló utó-potenciálokhoz vezet (Vais és mtsai, 2001). Ha a Na^+-csatornáknak elég nagy hányada módosult állapotba kerül, akkor ezek az utópotenciálok elérik az akciós potenciál kiváltásához szükséges küszöböt és ismétlődő utókisülések jönnek létre, amelyek a mérgezési tünetek hátterében állnak (Song és Narahashi, 1996).



12. ábra Kontroll és piretroid-kezeléssel módosított Na^+-áramok voltage clamp körülmények között. Látható, hogy a piretroid hatására a depolarizáló feszültséglépcső közben megnő a késői áram amplitúdója és a nyugalmi potenciálra való visszatéréskor a „tail current" is megjelenik. (Soderlund 2010-es cikkéből)

A piretroidokat szerkezetük alapján két csoportra osztják, **I. és II. típusú piretroidokra**. A II. típusú vegyületekben jelen van az α–kiralitáscentrumon egy cianocsoport, amely az I. típusúaknál hiányzik. A két csoport emlősökben jellegzetesen eltérő mérgezési tünetegyüttest okoz. I. típusú piretroiddal történt akut mérgezés esetén ún. T-szindrómát figyelhetünk meg, vagyis az egész testre kiterjedő remegést („tremor"), agresszív magatartást, megnövekedett ingerlékenységet. II. típusú piretroidoknál a CS-szindróma jellemző („choreoathetosis and salivation"), amely fokozott nyálelválasztást és hullámzó rángógörcsöket foglal magában (Lawrence és Casida, 1982). A két alcsoport hatása molekuláris szinten is eltérő: a II. típusúak nagyobb mértékben lassítják a feszültségfüggő Na^+-csatornák inaktiválódását, így általában hosszabb tail current figyelhető meg patch clamp mérés során (Choi és Soderlund, 2006).

Azt is kimutatták, hogy a legtöbb piretroid, főként a II. típusúak, nagyobb affinitással kötődnek a nyitott állapotú Na^+-csatornákhoz, mint a zárt csatornákhoz (Soderlund, 2010). Ha

depolarizáló ingersorozattal aktiválják a csatornákat vagy a Na^+-csatorna nyitvatartási idejét megnövelő ATX II-t adnak a rendszerhez, a piretroid-hatás gyorsabban kialakul és erősebb (Warmke és mtsai, 1997; Vais és mtsai, 2000).

A piretroidok évtizedes használata során sok rovarfajban **rezisztencia** alakult ki ellenük. A legfontosabb rezisztencia-mechanizmus az ún. „knock-down resistance" (kdr), amely a feszültségfüggő Na^+-csatornák csökkent piretroid-érzékenységén alapul. Az elérő érzékenységet a rovar Na^+-csatornák *para* alegységében kialakult pontmutációk okozzák, amelyeket a házi légyben *(Musca domestica)* azonosítottak és írtak le először (Williamson és mtsai, 1996; Farnham és mtsai, 1987). Később az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) genomjának feltérképezése során több különböző mutációt azonosítottak, így ma már többféle *kdr*- és különösen ellenálló *super-kdr* mutáns törzs ismert. Ezen mutációk előfordulását sokféle rovarkártevőben is kimutatták, pl. a burgonyabogárban (S. H. Lee és mtsai, 1999), a káposztamolyban (Schuler és mtsai, 1998), a zöld őszibarack-levéltetűben (Martinez-Torres és mtsai, 1999b), valamint szúnyogfélékben is, pl. a malériaszúnyogban (Martinez-Torres és mtsai, 1998) és a dalos szúnyogban (Martinez-Torres és mtsai, 1999a).

A kdr rezisztencia-mutációk a Na^+-csatornák inaktivációját gyorsítják meg és/vagy az aktiválódáshoz szükséges depolarizáció-szintet a pozitívabb membránpotenciál-értékek irányába tolják el, ezzel ellensúlyozzák a piretroidok hatását (D. Lee és mtsai, 1999; Zhao és mtsai, 2000).

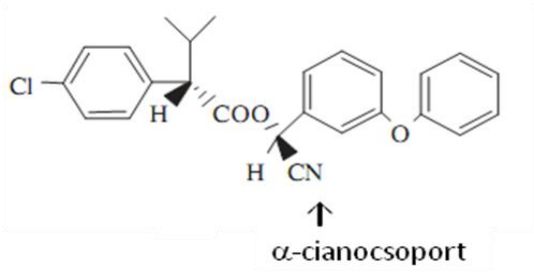
Azt, hogy a piretroidok pontosan hová kötődnek a Na^+-csatornán, magas lipofilitásuk miatt még nem sikerült megállapítani. Ám az biztos, hogy létezik egy specifikus kötőhelyük az α-alegységen, amely valószínűleg részben átfed az α-skorpiótoxin kötőhelyével (Trainer és mtsai, 1997). Egyéb Na^+-csatorna-modulátorokkal, pl. tetrodotoxinnal, helyi érzéstelenítőkkel viszont nem mutatható ki kölcsönhatás.

A piretroidok hatása igen nagyfokú **szelektivitás**t mutat a rovarokon az emlősökhöz képest. A rovarok Na^+-csatornái átlagosan ezerszer érzékenyebbek a piretroid-modulációra, mint az emlősökéi általában. *In vitro* tesztekben pl. a patkány IIA ($Na_v1.2$) típusú Na^+-csatorna alegységen csak μM-os piretroid koncentráció-tartományban alakulnak ki a Na^+-áram jellegzetes változásai (Vais és mtsai, 1997; Smith és Soderlund, 1998). Az emlős Na^+-csatornák piretroid-érzékenysége erősen típusfüggő és fordítottan korrelál a tetrodotoxin-érzékenységgel. Kiderült, hogy a patkány hátságyöki ganglionjában található TTX-rezisztens

Na^+-csatornákra a piretroidok szubmikromoláris koncentrációban is képesek hatást kifejteni, míg a TTX-szenzitív csatornák kevésbé érzékenyek (Song és mtsai, 1996; Song és Narahashi, 1996). A gerinctelen, rovar Na^+-csatornák (amelyek egyébként TTX-szenzitívnek számítanak) piretroid-érzékenysége összevethető a TTX-rezisztens emlős csatornákéval. A rovarok Na^+-csatornái nagyobb érzékenységükön kívül még abban is különböznek az emlősökéitől, hogy rajtuk a piretroid-hatás nehezebben visszafordítható, így *in vitro* rendszerben hosszabban kell kimosni a szert a hatás csökkenéséhez. A szelektivitáshoz az is hozzájárul, hogy a piretroidok hatékonysága negatív hőmérsékletfüggést mutat, emiatt a rovarok alacsonyabb testhőmérsékletén erősebb a hatás. A piretroidok enzimatikus lebontása, detoxikációja az emlősökben átlagosan 3x gyorsabb, mint rovarokban, ez a tényező is csökkenti az emlősök érzékenységét a rovarokhoz viszonyítva (Narahashi és mtsai, 1995).

A piretroidok elsődleges célpontjukon, a feszültségfüggő Na^+-csatornán kívül egyéb ioncsatornákat és receptorokat is befolyásolhatnak, így a feszültségfüggő Ca^{2+}- és Cl^--csatornákon és az ionotróp GABA-receptorokon is kifejthetnek hatást, ezek a másodlagos hatások hozzájárulhatnak a mérgezési tünetek kialakulásához (Burr és Ray, 2004; Ray és Fry, 2006).

Az **eszfenvalerát (**(S)-α-ciano-3-phenoxibenzil-(S)-2-(4-chlorophenil)-3-metilbutirát) 1986. óta bejegyzett hatóanyag, a II. típusú piretroidok közé tartozik (13. ábra). A fenvalerátból fejlesztették ki, pontosabban annak leghatékonyabb (S,S-) sztereoizomerjét tartalmazza tisztított formában. Az eszfenvalerát 3-4-szer olyan hatékony rovarölőszer, mint a fenvalerát (Ma és mtsai, 2009).



13. ábra Az eszfenvalerát szerkezeti képlete. Megfigyelhető a két sztereocentrum és a II. típusú piretroidokra jellemző cianocsoport az α-szénatomon. (Ma és mtsai 2009-es cikkéből)

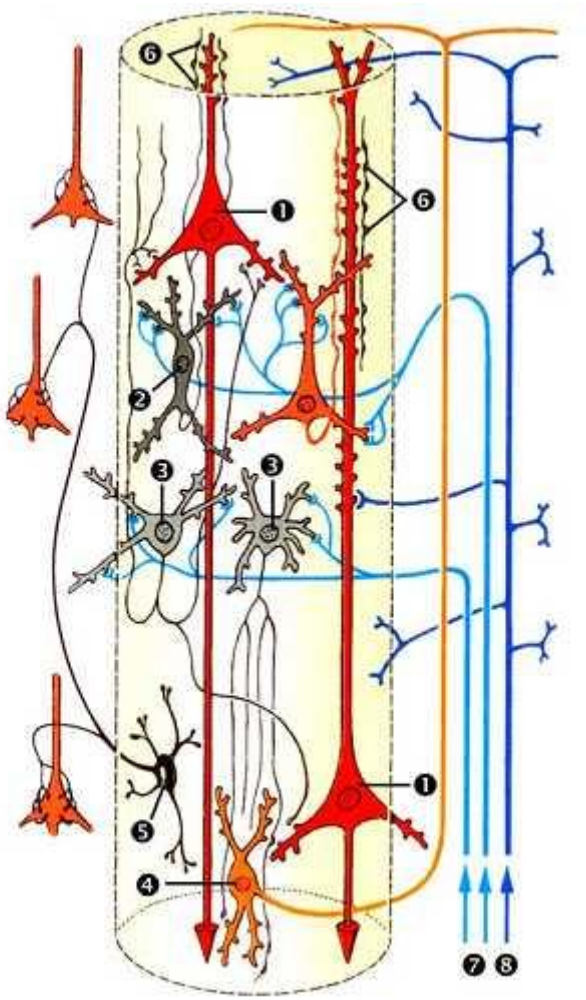
Toxikokinetikai vizsgálatokban kimutatták, hogy az orális úton bejutott eszfenvalerát gyorsan eliminálódik a szervezetből (Isobe és mtsai, 1990). Leginkább az akut hatásai jelentősek. Fenvaleráttal történő kezeléskor nem találtak anatómiai elváltozásokat az agyban akkora dózis esetén, amely akut mérgezési tünetekkel jár (Parker és mtsai, 1985). Ennek ellenére nem zárhatjuk ki, hogy az eszfenvalerát-mérgezés okozhat kisebb mértékű, hosszútávú változásokat az idegrendszer működésében.

A vizsgált agyterületek bemutatása, a mezőpotenciálok mérésének elvi alapjai

Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg szerkezete és működése

Az emlősök nagyagykérge (neocortex) az agy törzsfejlődéstanilag legfiatalabb, legmagasabb rendű területe. Érzékelési, motoros és kognitív funkciókat egyaránt ellát, ennek megfelelően elsődleges és magasabb rendű érző- és mozgatóterületekre, valamint asszociációs kéregterületekre osztható. A neocortex 6 rétegre tagolódik és igen sokféle sejttípust tartalmaz, amelyek összetett kapcsolatban állnak egymással. Az egyes eltérő funkciójú kéregtípusoknál a rétegek egymáshoz viszonyított vastagsága, megjelenése eltérő (Douglas és Martin, 1998). Az érzőkérgi területekre jellemző a jól fejlett IV. réteg, ahol csillagsejtek találhatóak, amelyek a thalamus felől érkező bemeneteket fogadják. A mozgató kérgekre az jellemző, hogy a IV. réteg szinte teljesen hiányzik, viszont az V. réteg igen vastag, és nagyméretű piramissejteket tartalmaz. Az V. réteg piramissejtjei alkotják a neocortex kimenetét az alsóbb agyi területek felé, míg csúcsi dendritjeik révén az összes felsőbb réteggel kapcsolatban állnak. A II. és III. rétegben kisebb piramissejtek helyezkednek el, amelyek a kérgen belüli kapcsolatok kialakításáért felelősek. A neocortexben a sejtek működés szempontjából 300-500 μm-es átmérőjű oszlopokat (kolumnákat) alkotnak, amelyekben a serkentő és gátló idegsejtek meghatározott módon kapcsolódnak egymáshoz.

A nagyagykéregben a fő serkentő sejttípusok a piramissejtek és a csillagsejtek, míg a gátló működésért sokféle interneuron felelős. Az idegsejteknek hozzávetőlegesen 75 %-át a serkentő, glutamáterg sejtek, míg 25 %-át a GABA-erg interneuronok teszik ki (Jones, 1995). A glutamáterg sejtek dendritjei általában tüskések, míg az interneuronokéi simák. A piramissejtek a kéregnek szinte minden rétegében előfordulnak (II-VI.), a csillagsejtek viszont specifikusan a IV. rétegre jellemzőek. A piramissejtek alakja nagyon jellegzetes: a gúla alakú szómából 1 apikális és 2 bazális dendrit-ág ered, a csillagsejteknél hiányzik az apikális dendrit. A piramissejteken belül megkülönböztethető többféle típus, pl. tüzelési mintázat alapján (Bannister 2005).



14. ábra A neokortikális kolumna egyszerűsített felépítése. 1) piramissejtek a II-III. és az V. rétegben, 2) kettőscsokor-sejt, 3) csillagsejt a IV. rétegben, 4) Martinotti-sejt a VI. rétegben, 5) kosársejt az V. rétegben, axoszomatikus kapcsolatot létesít a piramissejtekkel, 6) kettőscsokor-sejtek en passant axonjai, a piramissejtek apikális dendritjeivel létesítenek kapcsolatot, 7) thalamikus afferensek, 8) asszociációs rostok
(Lübke és Feldmeyer 2007-es cikkéből, Szentágothai János nyomán)

Az interneuronoknak sokféle típusát írták le (Benardo és Wong, 1995) morfológiájuk és molekuláris markerek (GAD, neuropeptidek, Ca^{2+}-kötő fehérjék) jelenléte alapján: kosársejt, csillársejt, kettőscsokor-sejt, neurogliaform sejt. A kosársejtek és a csillársejtek főként az ún. horizontális gátlásért felelősek, axonjaik a szomszédos kolumnákba átnyúlnak. A kosársejtek szómája főként a III. és az V. rétegben található, az itt lévő piramissejtek sejttestjei és proximális dendritjei körül a kosársejtek axonkollaterálisaikból kosár alakul ki, hatékony gátlást létrehozva. A csillársejtek (axo-axonikus sejtek) a II-V. réteg között fordulnak elő, ezek a kosársejtekénél is hatékonyabb gátló hatást fejtenek ki, hiszen a serkentő sejtek axoneredési dombján szinaptizálnak. A kettőscsokor-sejtek az előbb leírtakkal ellentétben a kérgi oszlopon belüli vertikális, interlamináris gátlásért felelősek. Sejttestjük általában a II-III. rétegben van, axonjuk több kérgi rétegen áthúzódik. Célpontjuk a serkentő sejtek disztális dendritjei vagy dendrittüskéi, így az általuk kifejtett gátlás mérsékeltebb, mint a kosár- és csillársejteké. A gátló interneuronok nemcsak serkentő idegsejteken szinaptizálhatnak, hanem másik gátlósejten is, így diszinhibíció alakulhat ki. Az egyes gátló pályákkal nagyon gyakran párhuzamosan futnak a különböző serkentő pályák (Somogyi és mtsai, 1998).

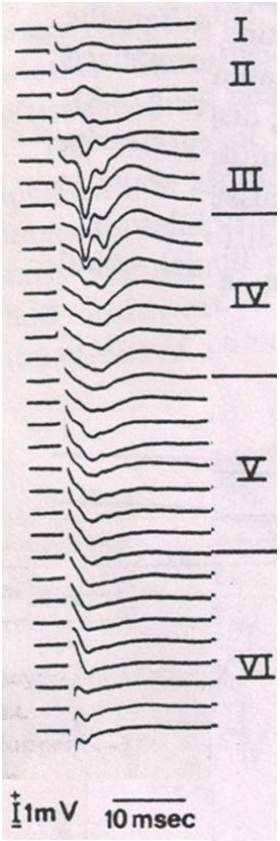
Az elsődleges szomatoszenzoros kérgen belüli serkentő neuronkörök egyszerűsített képe a következő (14. ábra): a thalamikus bemenet főként a IV. rétegben található csillagsejtekre

érkezik, amelyek kiterjedt egyirányú kapcsolatban állnak a II-III. réteg piramissejtjeivel. Ezeknek a piramissejteknek egyik, függőleges irányultságú axonja az V. réteg piramissejtjeihez fut, míg a másik, vízszintesen haladó axon a szomszédos oszlopok azonos rétegben található piramissejtjeihez. Így a II-III. rétegi piramissejtek integrálják és továbbítják a IV. rétegbe érkező információt az adott kolumnán belül és a kolumnák között is. Az V. rétegben található piramissejtek képviselik a neocortex kimenetét, axonjuk különféle kéreg alatti struktúrákhoz fut (thalamus, híd, agytörzs, gerincvelő). Az eddig leírt serkentő jellegű információtovábbító hálózaton kívül a gátló interneuronok is aktiválódnak a thalamikus bementek hatására. Az aktivált oszlop mellett közvetlenül elhelyezkedő oszlopok ezáltal gátlódnak normál működés esetében. Ezenkívül a piramissejtek között kiterjedt reciprok kapcsolatok is vannak, amelyek serkentő visszacsatolást eredményezhetnek. Ezen a „kanonikus" neuronkörön kívül más jeltovábbító útvonalak is léteznek: a thalamusból a VI. rétegbe is érkezik bemenet, majd innen közvetlenül vagy a IV. rétegen át visszavetül az információ a thalamusba. Emellett más kérgi területekről a corpus callosumon át érkezik bemenet az I. rétegbe is, ahol az összes rétegben lévő piramissejtek csúcsi dendritjei megtalálhatóak (Bannister, 2005). Az itt felvázolt kép nagymértékben egyszerűsített, általában egy adott réteg azonos típusú sejtjei sem alkotnak homogén populációt. A sejtek konnektivitása (pontosan milyen sejttípusnak mely sejten belüli régiójához kapcsolódnak) és a szinapszisok működésének dinamikus paraméterei (pl. nagyfrekvenciájú ingerléshez való alkalmazkodás) nem véletlenszerűek, funkcionális szempontból döntő fontosságúak, ezekkel a részletekkel kapcsolatban jelenleg is folyamatosan bővülnek az ismereteink (Lübke és Feldmeyer, 2007).

A neocortexben mérhető kiváltott potenciálok

A kiváltott mezőpotenciál egy szinkrón működő, rendezett struktúrájú sejtcsoport elektromos aktivitásának összegződésével jön létre, elektromos ingerlés vagy a szenzoros bemenet aktiválásának hatására. Agyszelet-preparátumban a neokortikális kolumnák sejtjeit, neuronhálózatait a corpus callosumból felszálló rostok elektromos ingerlésével egyszerre aktiválni lehet. Egy másik lehetőség a kérgen belüli elektromos ingerlést alkalmazni, pl. a IV. rétegben futó thalamikus eredetű rostokat így szelektíven aktiválni lehet. A különböző kérgi rétegekben a kiváltott válasz megjelenése eltérő, a II-III. rétegben figyelhetők meg a legnagyobb amplitúdójú csúcsok (15. ábra). A következő néhány sorban a corpus callosum-ingerléssel kiváltott, a II-III. rétegben regisztrálható kiváltott válaszok komponenseit ismertetem, Abbes és mtsai 1991-es cikke alapján, az elnevezéseket kissé módosítva. Mivel a

fehérállomány ingerlésekor a kéregből leszálló rostok is ingerlődnek, a kiváltott válaszban először az antidrómos módon az axonokon visszaterjedő aktiváció okozta csúcsok jelennek meg. Ezek a komponensek a szinaptikus átvitelhez szükséges Ca^{2+} hiányában is kialakulnak, az ingerlés pillanatától számított latenciaidejük 1-3 ms. A nagyobb latenciaidővel megjelenő komponensek szinaptikus átvitel révén alakulnak ki, Ca^{2+} -mentes oldatban eltűnnek. A 4-6 ms-os latenciaidővel megjelenő nagy negatív csúcs létrehozásában főként az egyes piramissejteken létrejövő serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP-k), de kisebb mértékben az akciós potenciálok összegződéséből származó populációs spike-ok is részt vesznek (Walcott és Langdon, 2002). Ennek a komponensnek az amplitúdóját AMPA és kainát receptor-antagonisták adagolása csökkenti. Az első negatív csúcsot követő pozitív csúcs valószínűleg a gátló interneuronok működése nyomán kialakuló gátló posztszinaptikus potenciáloknak (IPSP-knek) tulajdonítható. Ezt követheti még egy késői, lassú komponens, melynek latenciaideje 50-100 ms is lehet, amplitúdója pedig Mg^{2+}-mentes oldatban megnő, arra utalva, hogy ez a komponens főként az NMDA-receptorok aktivációját tükrözi (Langdon és Sur, 1990).



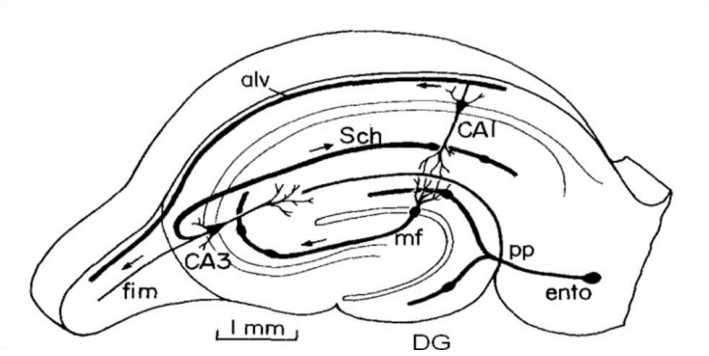
15. ábra Fehérállomány-ingerléssel kiváltott neokortikális mezőpotenciálok patkány szenzomotoros kérgében mérve, a római számok a különböző kérgi rétegeket jelzik. (Abbes és mtsai 1991-es cikkéből)

A hippocampus

A hippocampus (vagy Ammon-szarv) az emlős idegrendszernek egyik legrészletesebben leírt területe, egyrészt nagyon rendezett réteges szerkezetének, másrészt a tanulási folyamatokban betöltött szerepének köszönhetően. Alapvető fontosságú a térbeli tájékozódásban és az emléknyomok rögzítésében, sérülése anterográd amnéziát okoz. A gyrus dentatusszal (GD), a subiculummal és az entorhinális kéreggel együtt a hippocampus-formáció része. Maga a hippocampus törzsfejlődéstanilag ősi kéregtípus, archicortexnek tekinthető, 3 rétegű. Fő sejttípusa a piramissejt, ezek megjelenése alapján osztható a hippocampus 3 kisebb régióra (CA1-3). A piramissejtek 1 rétegben helyezkednek el (*stratum pyramidale)*, sűrűn elágazó apikális (*stratum radiatum*) és bazális dendritjeik (*stratum oriens)* a piramissejtes réteg két oldalán szintén laminárisan találhatók (a piramissejtek dendritjei, ahogy a neocortexben is,

tüskések). A piramissejteken kívül sokféle GABA-erg interneuron is található a hippocampusban, ezek sima dendritűek és általában a GABÁ-n kívül valamilyen peptid transzmittert (pl. vasoaktív intesztinális peptid - VIP, kolecisztokinin - CCK) is szekretálnak. Az axo-axonikus sejtek, amelyek a piramissejtek axoneredési dombján szinaptizálnak, erősen gátolják azok tüzelését. A kosársejtek közül egyesek a piramissejtek sejttestjeivel, mások az apikális és bazális dendritekkel alkotnak többszörös szinapszisokat.

A hippocampus pályáinak alapvető felépítése lényegében már a XX. sz. elején ismert volt, később a benne futó jellegzetes egyirányú serkentő (glutamáterg) pályát triszinaptikus pályának nevezték el. Ez a hippocampus fő bemeneti területéről, az entorhinális kéreg II. rétegéből indul ki, az itt lévő piramissejtek axonjai alkotják a perforáns pályát, amely többek között a GD szemcsesejtjeivel áll kapcsolatban. A GD szemcsesejtjeinek axonjai, az ún. moharostok a CA3 piramissejtekre vetülnek. A CA3 piramissejtek axonjainak jelentős része a Schaffer-kollaterálisokba összeszedődve a CA1 régió piramissejtjeinek apikális dendritjeivel szinaptizál. A CA1-ből az információ közvetlenül vagy a subiculumon keresztül az entorhinális kéreg mélyebb rétegeibe jut, tehát a hippocampusban történt feldolgozás után visszakerül a kiindulási területre (16. ábra). Ebbe az eddig leírt serkentő hálózatba természetesen a gátló sejtek is bekapcsolódnak, szabályozzák a piramissejtek érzékenységét és tüzelésüknek szinkronizáltságát. Az interneuronok a Schaffer-kollaterálisok, commissurális pályák, piramissejtek felől kapnak serkentő bemeneteket, ezenkívül egymással is kölcsönös gátló kapcsolatban állnak, ez lehetővé teszi szinkronizációjukat az oszcillációk kialakításakor. A hippocampus kéregalatti bemenetei közül fontos megemlíteni a septumot, ahonnan kolinerg és GABA-erg, illetve a raphe magokat, ahonnan szerotoninerg bemenet érkezik a hippocampus egyes interneuron-populációira. A kéregalatti kimenetek közül pedig a CA3 régióból a fornixon át a corpus mammillareba vezető pálya és a septumba vetülő rostok jelentősek (Johnston és Amaral, 1998).

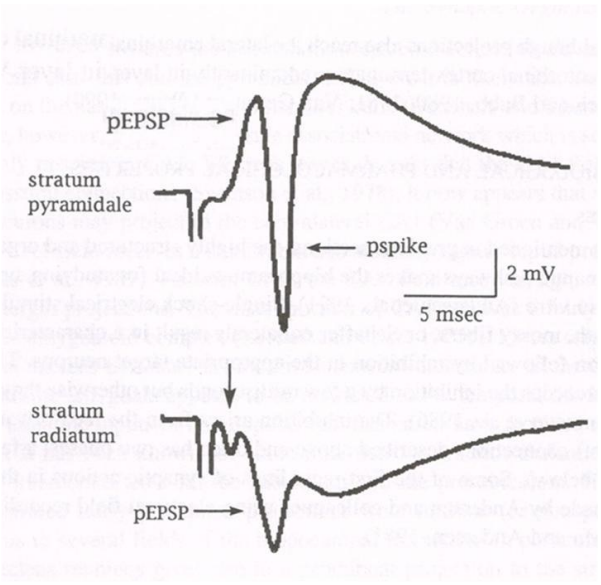


16. ábra Patkány hippocampus keresztmetszeti képe. Alv: alveus, Sch: Schaffer-kollaterálisok, fim: fimbria, DG: gyrus dentatus, mf: moharostok, ento: entorhinális kéreg, pp: perforáns pálya (Andersen és mtsai 1971-es cikkéből)

A hippocampusban mérhető kiváltott potenciálok

A hippocampus a benne található sejtek és kapcsolatok nagyfokú térbeli rendezettségének köszönhetően ideális modell a szinapszisok működésének tanulmányozásához. A perforáns pálya, a moharostok vagy a Schaffer-kollaterálisok elektromos ingerlésekor jellegzetes serkentő, majd gátló válasz mérhető az adott axonköteg cél-neuronjaiban. A hippocampus az extracelluláris kiváltott potenciálok mérésére is alkalmas, hiszen a rostkötegek ingerlésével a sűrűn elhelyezkedő piramissejtek nagy populációi aktiválódnak egyszerre, így nagy amplitúdójúak a kiváltott válaszok. Leginkább a *stratum radiatum*-ba vagy a *stratum pyramidale*-ba szokták a mérőelektródokat elhelyezni.

Az elektromos ingerlés hatására a piramissejtek apikális dendritjein pozitív ionok áramlanak a sejtekbe, serkentő posztszinaptikus potenciálokat (EPSP-ket) hozva létre. Ezek a *stratum radiatum*ba helyezett extracelluláris mérőelektróddal mérve egy nagy negatív irányú kitérést okoznak. Ez a mezőpotenciál a piramissejtes rétegben mérve viszont már pozitív irányultságú, hiszen a dendriteken történő áram-beáramlással párhuzamosan a sejttest szintjén áram-kiáramlás történik. Ha az aktiváció elég erős ahhoz, hogy elérje a piramissejtek tüzelési küszöbét, akkor az akciós potenciálok közben a pozitív ionok beáramlásának hatására a piramissejtes rétegben egy nagy negatív irányú kitérés is mérhető az EPSP közben, ez a populációs spike (POPS) (17. ábra). A POPS egymáshoz közeli, körülbelül egyszerre tüzelő sejtek akciós potenciáljainak összegződése, amplitúdója a szinkrón módon tüzelő sejtek számával arányos (Andersen és mtsai, 1971). A piramissejtes rétegben elhelyezett mérőelektróddal tehát olyan mezőpotenciálok mérhetők, amelyeknek elemzése információt ad a piramissejtekre érkező serkentő bemenetek erősségéről (a field EPSP kezdeti meredeksége) és a piramissejtek tüzelési aktivitásáról is (POPS amplitúdója) (Johnston és Amaral, 1998).



17. ábra Hippocampális kiváltott mezőpotenciálok patkány CA1 piramissejt-rétegében és a *stratum radiatum*ban mérve, a Schaffer-kollaterálisok ingerlésének hatására. Az ábrán bejelölt két paraméter a populációs EPSP (pEPSP) és a populációs spike (pspike). (Johnston és Amaral 1998-ban megjelent könyvfejezetéből)

Szinaptikus plaszticitási jelenségek

Donald O. Hebb vetette fel az elsők között az 1940-es években, hogy a működő szinapszisok aktivitása, hatékonysága a használattól függően változhat. Vannak olyan agyterületek, ahol ez a szinaptikus hatékonyság nagyon könnyen változtatható (a hippocampus ezek közé tartozik). A megváltozott aktivitás tartóssága, időtartama alapján rövid- és hosszútávú plaszticitási jelenségek különíthetők el, ezek háttérmechanizmusai eltérőek lehetnek.

A rövidtávú szinaptikus plaszticitás

Rövidtávú plaszticitásnak az 1 s-nál rövidebb ideig tartó, a szinapszis hatékonyságában bekövetkező változást nevezzük. Ezt a jelenséget általában rövid időközzel adott ingerpárok segítségével vizsgálják (páros ingerlés). Ekkor a második ingerre adott válasz nem független az elsőtől, serkentődés (facilitáció) vagy gátlás (depresszió) figyelhető meg. A rövidtávú depresszió kialakulása azzal magyarázható, hogy az első ingerléskor a preszinaptikus végződésben rendelkezésre álló vezikulák nagy része kiürül, és a második inger érkezéséig még nem képesek újratöltődni, így kevesebb transzmitter szabadul fel és kisebb posztszinaptikus potenciált vált ki. Előfordulhat az is, hogy az első inger során felszabaduló transzmitter preszinaptikus gátló (általában metabotróp) receptorokhoz köt, és ezek aktiválódása révén csökken a második ingerre felszabaduló transzmittermennyiség (homoszinaptikus gátlás). A rövidtávú facilitáció legelfogadottabb magyarázata az ún. reziduális Ca^{2+} hipotézis: a preszinaptikus végződésben az akciós potenciál hatására Ca^{2+}-beáramlás történik, a Ca^{2+}-koncentráció sokszorosára nő, és ez váltja ki a transzmittert tartalmazó vezikulák sejthártyával való fúzióját és kiürülésüket. Ha a második inger érkezésekor a preszinaptikus végződésben a Ca^{2+}-szint még nem állt vissza a nyugalmi értékre, akkor az újabb beáramló Ca^{2+}-ionok miatt a citoplazmatikus koncentráció magasabb lesz, mint az első inger esetében, így több transzmitter ürül, nagyobb posztszinaptikus választ okozva. Kimutatták, hogy a preszinaptikus intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció korrelál a serkentődés mértékével (Zucker és Regehr, 2002). Valószínűleg minden szinapszisban történhet rövidtávú facilitáció és depresszió is, csak attól függ, melyik fog dominálni, hogy mekkora valószínűséggel szabadul fel transzmitter a preszinaptikus végződésből egy akciós potenciál hatására. Ha nagy mennyiség szabadul fel, a depresszió jellemző, ha pedig viszonylag kevés, akkor facilitáció következhet be. A transzmitter-felszabadulás valószínűsége agyterületre jellemző, függ az ultrastrukturális paraméterektől is, pl. a dokkolt

vezikulák számától, a szinapszis méretétől, gliasejtek jelenlététől a szinapszis környezetében (Xu-Friedman és Regehr, 2004).

Ahogy az eddig leírtakból kitűnik, a szinapszisok rövidtávú plaszticitását leginkább a preszinaptikus végződésben bekövetkező változások okozzák, de vannak olyan posztszinaptikus folyamatok is, melyek befolyásolhatják. Bizonyos receptortípusok telítődhetnek vagy deszenzitizálódhatnak, ez rövidtávú szinaptikus gátláshoz vezethet. Ezenkívül, ha a posztszinaptikus végződésben is jelentősen megnő a Ca^{2+}-szint, akkor aktiválódhatnak kinázok (pl. CaMK – kalcium-kalmodulin-függő kináz), amelyek az AMPA-receptorok foszforilálásával megnövelik azok érzékenységét, ez rövidtávú serkentődést okozhat (Wang és Kelly, 1997).

A dolgozatban vizsgált agyterületeket tekintve, a nagyagykéregben általában kisebb a második kiváltott válasz amplitúdója, mint az elsőé, rövidtávú gátlás lép fel (PPD - paired-pulse depression). Kontroll körülmények között a neokortikális serkentő szinapszisokból nagy mennyiségű transzmitter szabadul fel, a vezikulák nagy része kiürül. Emiatt a rövid időn belül érkező második ingerre adott válasz kisebb amplitúdójú lesz. A hippocampusban viszont egy ingerléskor a vezikulák kisebb része ürül ki, a rövid időn belül érkező újabb inger idején a preszinaptikus végződésben még magas a Ca^{2+}-szint, így a második kiváltott potenciál nagyobb amplitúdójú lesz, rövidtávú serkentődés lép fel (PPF – paired-pulse facilitation). A PPD és a PPF mértéke természetesen függ a két inger között eltelt időköztől is, álltalában 50-100 ms-os időköznél látható a legerősebb eltérés (Castro-Alamancos és Connors, 1997).

A rövidtávú plaszticitási folyamatok erőssége, sőt még iránya is függhet attól, hogy milyen a szinapszisban az alap transzmisszió szintje, erőssége. Ezért ha valamilyen beavatkozással megváltoztatjuk az alap ingerlékenységet, valószínűleg változást tapasztalunk a PPD vagy PPF mértékében is. Általában depresszálódó szinapszisban az alap transzmisszió-szint emelkedésekor a rövidtávú gátlás erősödése várható, az alap transzmisszió szint csökkenésekor pedig gyengül a gátlás. Facilitációra hajlamos szinapszisokban pedig az alap transzmisszió-szint emelkedésekor a PPF csökken, az alap transzmisszió szint csökkenésekor pedig nő (Zucker és Regehr, 2002).

A hosszútávú szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP)

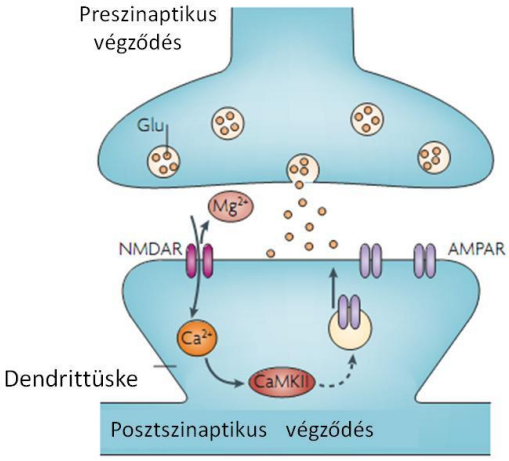
Mára már széles körben elfogadott elmélet, hogy szinaptikus hatékonyság hosszútávú változása a memória alapja, ezzel a mechanizmussal kódolja és tárolja el agyunk az emléknyomokat (Bliss és Collingridge, 1993). Az LTP (long-term potentiation), a szinapszisok hosszútávú hatékonyságnövekedése a tanulás sejtszintű modelljének tekinthető. Az LTP *in vitro* körülmények között, agyszeletben is vizsgálható, nagyfrekvenciás elektromos ingerléssel kiváltható, és a potenciáció akár egy órán át fennmarad. Az LTP folyamatát leginkább a hippocampusban tanulmányozták, az emléknyomok kódolásában betöltött szerepe miatt, de azért is, mert szinapszisaiban nagymértékű hatékonyságváltozások figyelhetők meg. A jelenséget a neocortex több területén is leírták, így a szomatoszenzoros kéreg II-III. rétegében is. A neocortexben a hippocampusban kódolt emléknyomok hosszútávú tárolása történik.

Az LTP kialakulásának hátterében sokféle jelenség állhat. A szinaptikus hatékonyságnövekedés alapfeltétele, hogy a posztszinaptikus végződésben megnőjön az intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció. Ez kétféle módon következhet be: az NMDA-receptorok és a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák aktiválódása révén. Így két alaptípust különböztethetünk meg: az NMDA-receptor-függő és az NMDA-receptor-független (vagy feszültségfüggő Ca^{2+}-csatorna-függő) LTP-t. Ez a két alap-mechanizmus nem tekinthető teljesen függetlennek, hiszen a különféle szignalizációs útvonalak között kapcsolat van: kimutatták, hogy az NMDA-receptorok aktivációja a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornák működését is serkenti (Chetkovich és mtsai, 1991). Az LTP kialakulásának mechanizmusa változik az egyedfejlődés során, függ az agyterülettől, a szinapszistól és a kísérletben alkalmazott ingerlési protokolltól is (Malenka és Bear, 2004). A továbbiakban az NMDA-receptor-függő LTP-vel foglakozom, hiszen ez a legrészletesebben leírt forma. Kiváltható a kísérleteimben vizsgált hippocampális CA1 régióban és a nagyagykéregben is, a két agyterületen hasonló mechanizmus révén alakul ki (Lee és Kirkwood, 2011).

Normál fiziológiás körülmények között a serkentő szinaptikus transzmisszió nagyrészt az AMPA-receptorokon keresztül valósul meg, az NMDA-receptorok blokkolva vannak, és csak akkor aktiválódnak, ha a posztszinaptikus végződés depolarizációja elér egy küszöböt, amelyet átlépve az NMDA-receptorok pórusát elzáró Mg^{2+}-ion kiszabadul. Ehhez a preszinaptikus és a posztszinaptikus végződés egyidejű aktivációja szükséges, a preszinaptikus glutamát-felszabadulásnak időben egybe kell esnie a posztszinaptikus

végződés depolarizációjával, az NMDA-receptorok tehát egyfajta koincidencia-detektorként működnek. Megnyílásuk során jelentős mennyiségű Ca^{2+}-ion is áramlik be a sejtbe (a Na^{+}-ionokon kívül), így az intracelluláris Ca^{2+}-szint megnő a posztszinaptikus végződésben (Teyler, 1999).

A Ca^{2+}-szint megemelkedése a sejten belül egy sor szignalizációs folyamatot indít el, többek között aktiválódnak Ca^{2+}-függő kinázok, pl. a CaMKII (kalcium-kalmodulin-függő kináz II) és a PKC (protein-kináz C). Ezek a fehérjék felelősek az LTP korai fázisáért (2-3 óra), annak köszönhetően, hogy autofoszforilációra képesek, és aktivitásuk fennmarad a Ca^{2+}-szint nyugalmi értékre való visszatérése után is (Kumar, 2011). Ebben a szakaszban többek között az AMPA-receptorok foszforilációja kulcsfontosságú, a foszforiláció megnöveli a receptorok konduktanciáját és befolyásolja a lokalizációjukat is. Az AMPA-receptorok folyamatosan diffundálnak a plazmamembránban, ezenkívül reciklizálódnak is (endocitózissal visszavevődnek, majd exocitózissal újra kihelyeződnek a membránba). A receptorok foszforilációja következtében nagyobb valószínűséggel helyeződnek ki és maradnak a posztszinaptikus denzitásban, így erősödik a szinaptikus hatékonyság (Lee és Kirkwood, 2011) (18. ábra). A hippocampus CA1 régójában azt is kimutatták, hogy az LTP-ben nagy szerepe az ún. csendes szinapszisok („silent synapses”) aktiválódásának. A csendes szinapszisokban csak NMDA-receptorok találhatók, működő AMPA-receptorok nincsenek jelen. Így nem alakulhat ki az NMDA-receptorok aktiválódásához szükséges depolarizáció. Az LTP-indukció során AMPA-receptorok helyeződnek ki a szinapszisba, a csendes szinapszis működni kezd (Isaac és mtsai, 1996). Ennek a folyamatnak az idegrendszer érése során is nagy jelentősége van az aktív szinaptikus kapcsolatok stabilizálódásakor.



18. ábra Az NMDA-receptor-függő LTP mechanizmusa. Az NMDA-receptor Mg^{2+}-blokkjának feszültségfüggő megszűnése segítségével a szinapszis „érzékeli” az egyidejűleg történő preszinaptikus glutamát-felszabadulást és posztszinaptikus depolarizációt. Az NMDA-receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+}aktiválja a CaMKII kinázt, ennek működése elősegíti az AMPA-receptorok beépülését a posztszinaptikus membránba. (Kauer és Malenka 2007-es cikkéből, módosítva)

Az LTP későbbi fázisában, amely 5-6 óráig marad fenn *in vitro*, már génexpresszió-változás és fehérjeszintézis is történik, ebben a szakaszban Ca^{2+}-függő adenilát-cikláz – cAMP (ciklikus adenozin-monofoszfát) – PKA (protein-kináz A) útvonal aktiválódásának köszönhetően transzkripciós faktorok is aktiválódnak és génexpressziós változások jelentkeznek (Kumar, 2011). Az LTP késői fázisában az érintett szinapszisokban szerkezeti átalakulások is történnek: a dendrittüskék mérete megnő, új tüskék keletkeznek, a szinapszis mérete növekszik, egy posztszinaptikus denzitás ketté is válhat, így két új szinapszis keletkezik (Malenka és Bear, 2004).

Epileptiform aktivitás agyszeletekben

Az agyszeletek ingerlékenysége jellemezhető a görcskészséggel is, vagyis azzal, hogy egyes görcskeltő hatású vegyületek alkalmazásakor milyen mértékben, milyen gyorsan alakul ki a szeletekben spontán (nem elektromos ingerléssel kiváltott) aktivitás. Ezek az *in vitro* rendszerben megfigyelhető spontán elektromos tevékenységek nagyon hasonlítanak az élő állatban kiváltott epilepsziás rohamok közben megfigyelhető elektrofiziológiai jelekhez. Az agyszeletben kiváltott spontán aktivitás kétféle mintázatot mutat, megkülönböztetünk ún. iktális és interiktális aktivitást. Iktális aktivitásnak a hosszabb, több kisülésből összetevődő görcsrohamot nevezzük (ictus=görcs), interiktális aktivitásnak pedig a rövid, egyszerű kisüléseket. Az interiktális aktivitás előfordulhat az iktális mintázattal felváltva (innen a neve), de egymástól függetlenül is felléphetnek, attól függően, hogy pontosan milyen neuronális mikrohálózat aktiválódik. A görcskeltővel kiváltott epileptiform tevékenység alapja, hogy a serkentő és gátló ingerületátvitel egyensúlyát valamely ioncsatorna-receptor komplex működésének megváltoztatásával eltolják a túlserkentettség irányába (Heinemann és mtsai, 2006). Pl. a gátló ingerületátvitel gátlásával vált ki görcsöket a $GABA_AR$-antagonista hatású bicuculline és picrotoxin. Az extracelluláris Mg^{2+}-koncentráció csökkentése az NMDA-receptorok túlaktiválódását eredményezi a Mg^{2+}-blokád megszüntetésével (Valenzuela és Benardo, 1995). A K^+-csatornák gátlása szintén a serkentő folyamatok felerősödése révén okoz túlaktivációt, ilyen módon hat a dolgozatban is szereplő 4-amino-piridin (4-AP) (Traub és mtsai, 1995).

Célkitűzések

Kísérleteimben azt tanulmányoztam, hogy háromféle rovarölőszernek, a bensultapnak (Bancol 50 WP®), a fipronilnak (Regent 80 WG®) és az eszfenvalerátnak (Sumi-Alfa 5 EC®) emlős modellállaton milyen idegrendszeri hatása van, a hatások mennyire jól mutathatók ki *in vitro* tesztrendszerben. A kísérleteket patkányból készült túlélő agyszeleteken végeztem, kiváltott mezőpotenciálok regisztrálásával. A bensultap és a fipronil esetében közvetlenül, az agyszeletek perfúziós folyadékába adagoltam a szereket (*in vitro* kezelés), az eszfenvalerát esetében az *in vitro* és *in vivo* (intragasztrikus) adás hatásait is vizsgáltam.

A következő konkrét kérdésekre kerestem a választ:

- a vizsgált szereknek van-e hatása a vizsgált agyterületek (szomatoszenzoros kéreg és hippocampus) általános ingerelhetőségére? A kezelés hatására változik-e az ingerküszöb és a kiváltott válaszok nagysága?
- hatnak-e a rövidtávú szinaptikus hatékonyság megváltozására? Azaz kettős ingerléskor a két kiváltott válasz aránya más-e, mint kontroll esetben?
- hatnak-e a hosszútávú szinaptikus hatékonyságváltozásra? Az LTP (long-term potentiation) kiváltása ugyanolyan hatású-e a kontroll és kezelt szeletekben?
- kiváltanak-e spontán epileptiform aktivitást az agyszeletekben? Görcskeltő alkalmazásakor megváltoztatják-e a szeletek érzékenységét, görcskészségét?

Anyag és módszer

A kísérleti állatok tartása

A méréseket 80-200 g közötti súlyú, fiatal hím Sprague-Dawley laboratóriumi patkányokon végeztem (Toxicoop Kft., Budapest). Az állatokat állandó körülmények között, 22 ± 2°C-on, 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk. Extrudált patkánytápot (Toxicoop Kft., Budapest) és csapvizet tetszés szerint fogyaszthattak.

A patkányok illetve az agyszeletek rovarirtószerrel történő kezelése

In vitro kezelés esetében a szeleteken átáramoltatott mesterséges agyfolyadékban (ACSF-ben) oldottam fel a rovarirtószereket. Emlős agyszeletekkel kapcsolatos szakirodalom hiányában az alkalmazott kiinduló koncentrációkat korábban elvégzett szintén *in vitro* idegi preparátumokon, csiga ganglionokon végzett kísérletek alapján állapítottuk meg. Bensultapos kezeléshez a Bancol 50 WP® nevű készítményt használtam (hatóanyag-tartalma 50%), 30 ill. 60 μM-os hatóanyag-koncentrációban. Fipronilos kezeléshez a Regent 80 WG®-t alkalmaztam 10 és 20 μM-os koncentrációban (fipronil-tartalma 80%). Az eszfenvalerátos kezelés a Sumi-Alfa 5 EC® nevű szerrel történt (hatóanyag-tartalma 5%), 10, 20 és 40 μM-os koncentrációban. Mivel a Sumi-Alfa® készítmény 85%-ban xilolt tartalmaz, és esetleg ez is befolyásolhatja az agyszeletek működését, ebben az esetben a standard ACSF-fel történő kontrollmérésen kívül végeztem xilolos kontrollméréseket is, amelyek során a legnagyobb, tehát 40 μM-os szerkoncentrációnak megfelelő mennyiségű xilolt oldottam az ACSF-ben.

Az eszfenvalerát hatását úgy is megvizsgáltam, hogy az állatokat *in vivo* kezeltem a szerrel, majd a kezelt és kontroll állatokból készített agyszeletek működését hasonlítottam össze. A kezelt állatoknak gyomorszondával, egyszeri alkalommal adtunk be Sumi-Alfa® -oldatot, az alkalmazott eszfenvalerát-dózis 20 mg/testsúlykg volt. Ez a letális félérték-dózis negyedének megfelelő mennyiség, szakirodalmi adatok alapján választottuk ezt a dózist, amely általában nem okoz mérgezési tüneteket az állatoknál. Az eredeti készítményt fiziológiás sóoldattal 5x-ösére hígítottuk és ebből adtunk be 0,2-0,5 ml közötti mennyiséget a 20 mg/kg dózis eléréséhez. Ahogyan az *in vitro* kezelésnél, itt is két kontroll csoport volt: az egyik csoport a kezeltekkel azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapott, a másik pedig a megfelelő mennyiségű xilolt tartalmazó fiziológiás sóoldatot. Mivel kíváncsiak voltunk a szer hatásának

dinamikájára, a hatás esetleges lecsengésére, a méréseket a kezelés után különböző időpontokban végeztem: a kezelés után 1, 2 illetve 7 nappal. A kontroll és a xilolos kontroll csoportok esetében a mérés a kezelést követő napon történt. A másik két szert, a bensultapot és a fipronilt korábban már vizsgálták hasonló *in vivo* kezelés után történő méréssel (Szegedi és mtsai, 2005).

Túlélő agyszeletek készítése, standard agyszelet technika

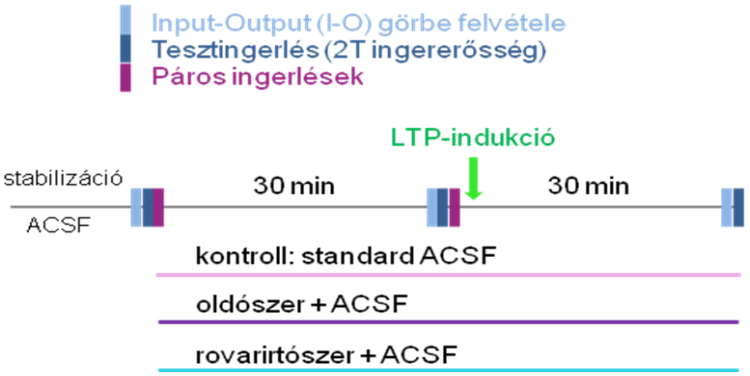
A patkányokat klorál-hidráttal elaltattuk és dekapitáltuk, az agyat kiemeltük és a szomatoszenzoros kérget és a hippocampust tartalmazó blokkot metszettünk ki belőle. Ebből jéghideg, karbogénnel (95% O_2+5% CO_2) átbuborékoltatott HEPES-tartalmú pufferoldatban (pH 7,0-7,4) vibrotómmal (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) 400 μm vastag koronális szeleteket készítettünk. A szeleteket egy órán keresztül a HEPES-tartalmú oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten. A HEPES-tartalmú pufferoldat összetétele: 120 mM NaCl, 2 mM KCl; 1,25 mM KH_2PO_4, 2 mM $MgSO_4$, 20 mM $NaHCO_3$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz, 6,7 mM savas HEPES, 3,3 mM Na-HEPES. Ezután az agyszeletek interface típusú mérőkamrába (FST, North Vancouver, Kanada) kerültek, amelyet 33°C-on termosztáltunk. Itt folyamatosan karbogénnel telített ACSF-oldatot áramoltattunk át rajtuk 1,5 ml/perc sebességgel. Az ACSF oldat összetétele: 126 mM NaCl, 1,8 mM KCl, 1,25 mM K_2PO_4, 1,3 mM $MgSO_4$, 26 mM $NaHCO_3$, 2,4 mM $CaCl_2$, 10 mM glükóz (pH 7,0-7,4). A vegyszerek a Sigma-Aldrichtól (Budapest) származtak.

Kiváltott mezőpotenciálok regisztrálása

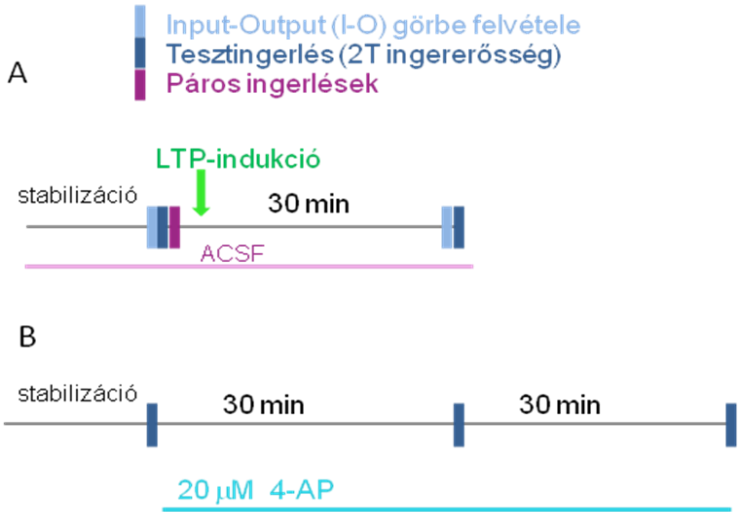
A mezőpotenciálok méréséhez 1 M NaCl-oldattal töltött üveg mikroelektródokat használtunk, ezek ellenállása 5-10 MΩ volt. A mérőelektródot a neokortikális szeleteknél a szomatoszenzoros kéreg II-III. rétegébe helyeztük. Az ingerlés bipoláris wolfram elektróddal történt, a corpus callosum és a VI. réteg határán, 100 μs szélességű négyszögimpulzusokkal (Biostim, Supertech Kft., Pécs, Hungary). A hippocampus szeleteken a mérőelektródot a CA1 régió piramissejt-rétegébe, míg az ingerlő elektródot a Schaffer-kollaterálisok köré szúrtuk be. Először meghatároztuk az ingerküszöböt (T), azt a legkisebb feszültségértéket, amely szomatoszenzoros kéregben az EPSP, illetve hippocampusban a populációs spike kiváltásához már elegendő. Ezután 3T-ig fokozatosan emelve az ingerlési feszültséget rögzítettük a kiváltott válasz nagyságát. Az ingerlési feszültség növelésével a kiváltott válaszok amplitúdói telítési görbét írnak le, ennek ábrázolásával kapjuk az ún. I-O (input-output) görbét.

Mérési protokoll

Először tiszta ACSF-ben megállapítottuk az ingerküszöböt, és I-O görbét valamint tesztingerlést (10 kiváltott válasz 2T ingererősséggel) regisztráltunk. Kettős ingerléseket is alkalmaztunk, a két inger közötti időintervallum 500, 200, 100, 50 ill. 20 ms, az ingerlési feszültség a küszöb kétszerese (2T) volt. Ezután az *in vitro* kezelések esetében 30 percig rovarirtószer-tartalmú oldatot áramoltattunk át a szeleten, majd újabb I-O görbét, tesztingerek által kiváltott válaszokat és páros ingerléssel kiváltott válaszokat vettünk fel. Végül LTP-t váltottunk ki nagyfrekvenciás ingersorozatokkal (tetanizáció): 4x5 másodpercig ingereltük a szeletet 10 másodperces szünetekkel, 2T feszültséggel, 100 Hz-es frekvenciával. A tetanizáció után fél órával változatlan paraméterekkel újabb I-O görbét és tesztingerek által kiváltott válaszokat regisztráltunk (19. ábra).



19. ábra A mérés menete *in vitro* rovarirtószerrel (bensultappal, fipronillal vagy eszfenvaleráttal) kezelt agyszeletek esetén.



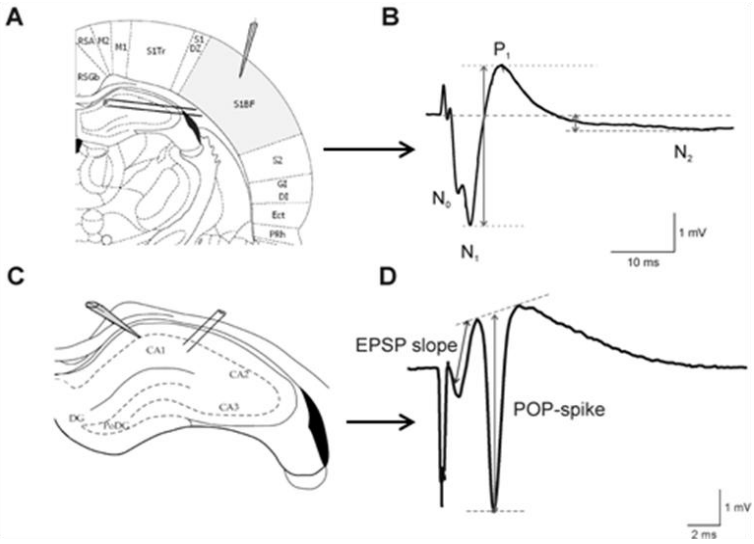
20. ábra A mérés menete *in vivo* rovarirtószerrel (eszfenvaleráttal) kezelt állatokból készült agyszeletek esetén. **A**: általános ingerlékenység és plaszticitás vizsgálata kérgi és hippocampus szeleteken. **B**: görcskészség vizsgálata kérgi szeleteken.

A Sumi-Alfával *in vivo* kezelt állatokból készült szeleteken a következő volt a protokoll: I-O görbe, tesztingerlés és kettős ingerlés felvétele után LTP-t váltottunk ki, majd fél óra elteltével újabb I-O görbét és tesztingerlést vettünk fel. Ebben a kísérletsorozatban vizsgáltuk a szernek a szeletek görcskészségére kifejtett hatását is. Ehhez 60 percen keresztül 20 µM-os koncentrációban 4-amino-piridint (4-AP) tartalmazó ACSF-et áramoltattunk át kérgi szeleteken. 2T ingerintenzitással történő tesztingerléssel kiváltott válaszokat rögzítettünk a 4-AP-perfúzió előtt valamint 30 és 60 perc elteltével (20. ábra).

A jelek rögzítése, kiértékelése

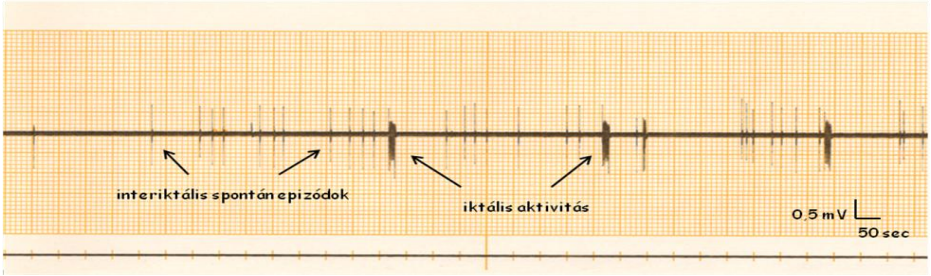
A jeleket erősítés (1000x) (Bioamp, Supertech Kft., Pécs) és szűrés (0,16-500 Hz) (Linear Amp, Supertech Kft., Pécs) után számítógépen rögzítettük a SPEL Advanced Intrasys szoftverrel (Experimetria Kft., Budapest). A kiértékelés is az Intrasys program segítségével történt. A spontán tevékenységet az egy órás perfúzió alatt végig papíríróval regisztráltuk (Gould, Eichstetten, Németország).

Az alap ingerelhetőség jellemzéséhez összevetettem az egyes csoportok küszöbfeszültség értékeit. Kérgi szeletek esetében a kiváltott válaszok két komponensét különböztettük meg latenciaidejük alapján. A korai komponens nagysága az N1 csúcstól P1 csúcsig tartó amplitúdót jelenti (N1-P1). A késői komponens pedig az N2 csúcs alapvonaltól való távolsága. Hippocampus-szeleteken az EPSP kezdeti meredekségét és az első populációs spike amplitúdóját mértem le (21. ábra). Ezekből az adatokból szerkesztettem meg az EPSP-spike kapcsolatot jellemző (E-S) görbét is. A tesztingerléssel kiváltott válaszokon a (nem minden esetben megjelenő) második populációs spike amplitúdóját is lemértem.



21. ábra Az elektródák elhelyezése és a kiváltott potenciálok képe a szomatoszenzoros kérgi (**A** és **B**) és a hippocampus-szeletekben (**C** és **D**).

Az olyan kísérletekben, ahol spontán görcstevékenységet is mértünk, papíríró segítségével regisztráltuk a kérgi szeletek aktivitását. A 4-AP-vel kezelt agyszeletekben iktális (hosszabb, összetett görcsepizódok) és interiktális (egyszerű kisülések) jellegű spontán tevékenység egyaránt előfordult (22. ábra). A spontán aktivitás elemzésekor a következő paraméterek szempontjából értékeltem ki a regisztrátumokat: első bármilyen spontán tevékenység latenciaideje, görcstevékenység (iktális aktivitás) latenciaideje, a 4-AP adagolás második 30 perce alatt jelentkező iktális és interiktális epizódok száma. A 4-AP-perfúzió előtt valamint 30 és 60 perc elteltével rögzített tesztingerlésekre adott kiváltott válaszokat a fentebb leírtak szerint elemeztem (N1-P1 és N2).



22. ábra 4-aminopiridin perfúzióval kiváltott epileptiform tevékenység, a regisztrátum a perfúzió második 30 percét tartalmazza. A fiziológiás sóoldattal „kezelt" kontroll állatból származó kérgi szeletben interiktális típusú egyszerű kisülések és komplex görcsaktivitás (iktális tevékenység) is kialakult.

A páros ingerlési tesztek esetében kiszámítottam a második és az első kiváltott válasz amplitúdójának hányadosát, és ezt az értéket hasonlítottam össze az egyes kezelt csoportoknál.

Az LTP-indukciós kísérletekben pedig az LTP utáni és előtti kiváltott válaszok amplitúdójának hányadosával jellemeztem a válasz növekedését, az LTP-indukció hatékonyságát.

Az adatok statisztikai elemzésekor, amikor több párhuzamos csoport páronkénti összehasonlítására volt szükség, egytényezős variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztam, Levene-teszttel ellenőrizve a varianciák homogenitását és Newman-Keuls- illetve Tukey-féle post-hoc teszttel kimutatva a különbségeket. Amikor kezelés előtti és utáni adatsorokat hasonlítottam össze, párosított Student-féle t-próbát alkalmaztam. A szignifikanciaszint minden esetben $p<0,05$ volt.

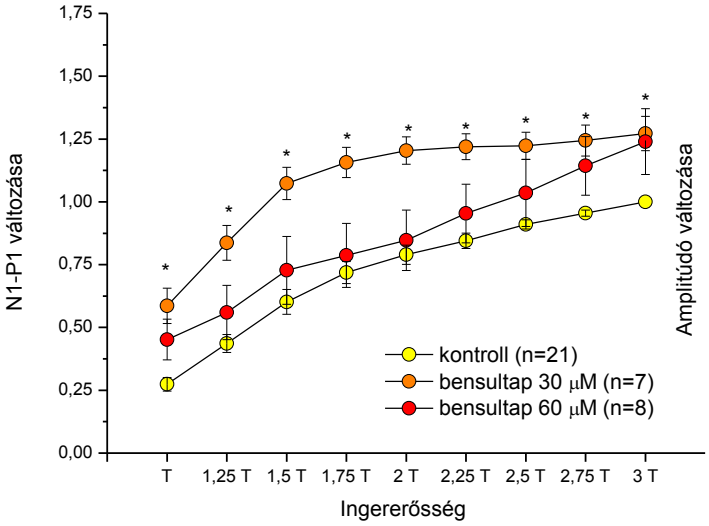
Eredmények

A bensultap hatása

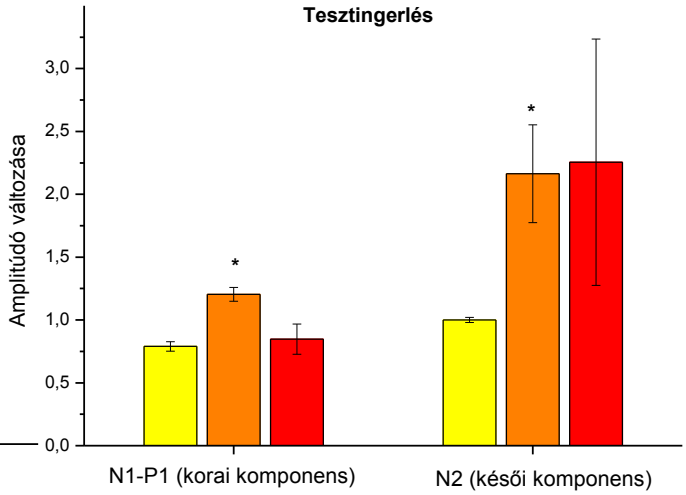
Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás

Ebben és a hasonló kísérletsorozatokban, amelyekben *in vitro* kezelést alkalmaztunk, így rendelkezésünkre áll egy-egy I-O görbe a kezelés előtt és után egyaránt, a következő módszerrel értékeltem ki az adatokat: minden szelet esetében a kezelés előtt mért maximális (3T ingererősséggel) kiváltott válasz amplitúdóját vettem 100 %-nak, a többi értéket pedig ennek függvényében számítottam ki, ezek az értékek adják a „relatív" I-O görbét. Így csökkenthető a szeletek eltérő válaszkészségéből adódó szórás, viszont a kezelések hatása jobban kimutatható. Az ábrákon a „kontroll" értékek a kezelés előtti értékek és a kezeletlen kontroll csoport értékeinek összevonásából származnak. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket az ábrákon csillag jelöli.

A perfúziós oldatban adott bensultap 30 μM-os koncentrációban szignifikánsan megnövelte az elektromos ingerléssel kiváltott EPSP korai komponensének (N1-P1) amplitúdóját a neokortikális szeleteken, az egész I-O görbe feljebb tolódott. A nagyobb koncentrációjú, 60 μM-os oldattal történő kezelés viszont csak ennél jóval kisebb mértékű növekedést okozott, a kiváltott válaszok szignifikánsan nem tértek el a kontroll értékektől (23, 24. ábra).



23. ábra Bensultap hatása a neokortikális szeletekben az EPSP korai komponensének amplitúdójára.

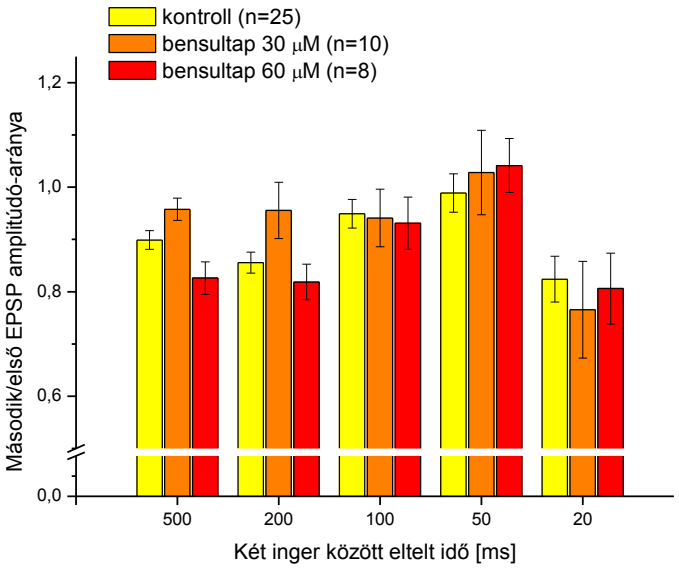


24. ábra Bensultap hatása a neokortikális szeletekben az EPSP késői komponensének amplitúdójára.

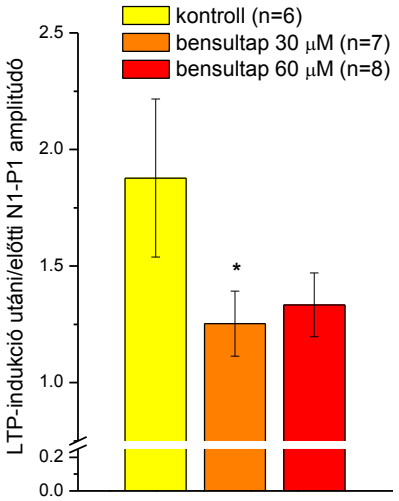
A kiváltott válasz késői komponense (N2) esetében nem tüntettem fel a teljes I-O görbét, csak a 2T ingererősségű tesztingerléssel kiváltott válaszok amplitúdójának változását. A késői komponens nagyságát a bensultappal történő kezelés szintén megnövelte, ez a változás a kisebbik koncentráció esetében statisztikailag szignifikáns volt (24. ábra).

Plasztikus folyamatokra gyakorolt hatás

Ingerpárok alkalmazásakor a neocortexre jellemző módon a második inger által kiváltott válasz kisebb amplitúdójú volt, mint az első. Ennek a gátlásnak (paired-pulse inhibition – PPI) a mértékében azonban nem volt különbség a bensultappal kezelt és a kontroll szeletek között (25. ábra).



25. ábra Bensultap hatása a neokortikális szeletekben a páros ingerlésre.



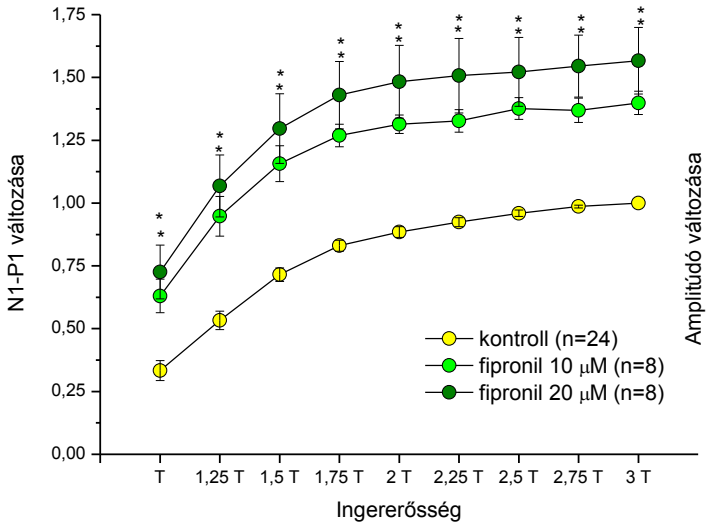
26. ábra Bensultap hatása a neokortikális szeletekben az LTP-indukció által kiváltott növekedésre.

Az LTP-indukció során a nagyfrekvenciás ingerlés a kiváltott válasz hosszútávú növekedését eredményezte, ennek mértéke a kontroll szeletekben átlagosan 74,4% volt. A bensultap mindkét alkalmazott koncentrációban csökkentette az LTP kiválthatóságát, a kiváltott potenciálok amplitúdó-növekedése a kezelt szeletekben jelentősen kisebb volt, mint a kontroll esetben, 25,3% illetve 33,4%. A 30 μM-os koncentráció esetében ez statisztikailag is szignifikáns csökkenést jelentett (26. ábra).

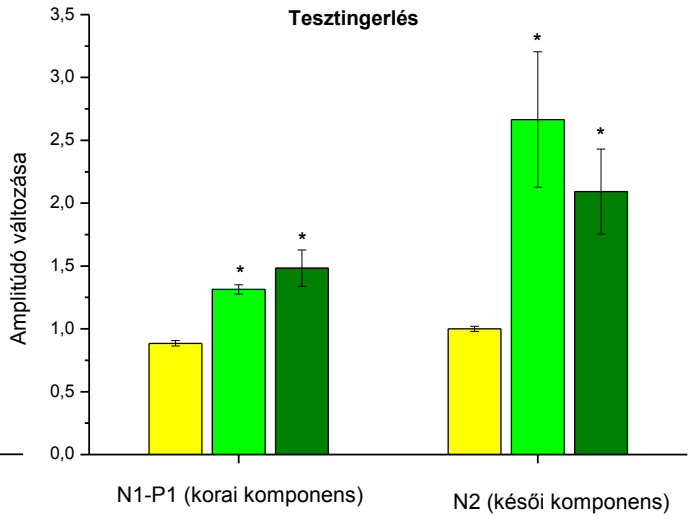
A fipronil hatása

Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás

A fipronil mindkét alkalmazott koncentrációban, 10 és 20 μM-nál egyaránt szignifikánsan megnövelte a kiváltott válasz korai komponensének amplitúdóját, az I-O görbék feljebb tolódtak (27. ábra). Az EPSP késői komponense szintén növekedett a fipronilos kezelés hatására, illetve számos szeletben csak a kezelés közben alakult ki ez a komponens (28. ábra).



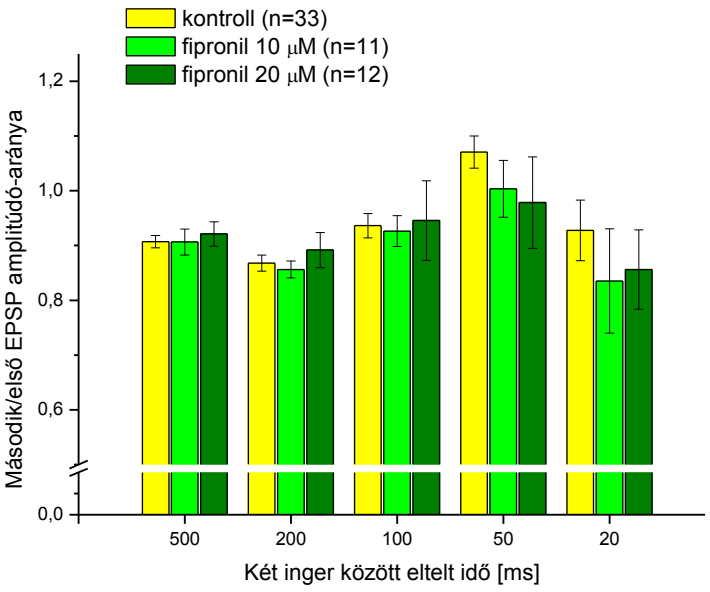
27. ábra Fipronil hatása a neokortikális szeletekben az EPSP korai komponensének amplitúdójára.



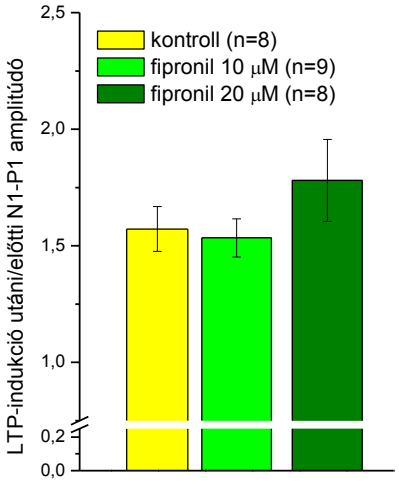
28. ábra Fipronil hatása a neokortikális szeletekben az EPSP késői komponensének amplitúdójára.

Plasztikus folyamatokra gyakorolt hatás

A páros ingerléssel megfigyelhető rövidtávú plaszticitás mértékében nem volt különbség a kontroll és a fipronillal kezelt szeletek között (29. ábra). Az LTP-indukció hatására a kontroll szeletekben átlagosan 57%-kal nőtt az EPSP amplitúdója, a 10 μM-os koncentrációjú fipronil-oldattal kezelt szeletekben hasonló mértékben, 53%-kal, míg a 20 μM-os oldattal kezelt szeletekben ez a növekedés nagyobb volt, átlagosan 78%-os, de a különbség a kontrollhoz képest nem volt statisztikailag szignifikáns (30. ábra).



29. ábra Fipronil hatása a neokortikális szeletekben a páros ingerlésre.



30. ábra Fipronil hatása a neokortikális szeletekben az LTP-indukció által kiváltott növekedésre.

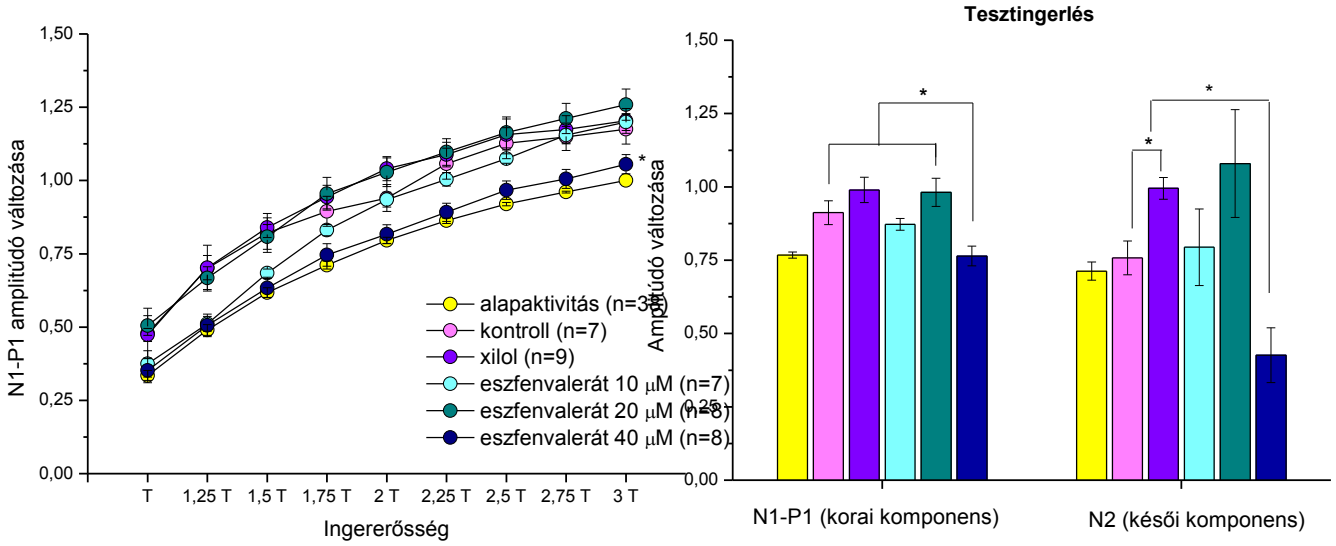
Az eszfenvalerát hatása *in vitro* kezelés esetén

Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás kérgi szeleteken

A kezelés előtti adatokat az összes kezelt és kontroll csoportban összevonva kaptam az „alapaktivitást". A továbbiakban sem a kiváltott válaszok abszolút amplitúdóit ábrázoltam, hanem relatív értékeket (a maximális 3T erősségű ingerléssel kiváltott válasz arányával számolva), amelyek jól demonstrálják a kezelés hatására bekövetkező változásokat.

Félórás perfúzió hatására a kontroll szeletekben a korai komponens növekedését tapasztaltuk, az ACSF-es kontroll csoportban ez kb. 17%-os, a xilolos kontrollban 20%-os volt. Az eszfenvalerát-kezelés hatása erre az alap növekedésre tevődött rá. A 10 μM-os csoportban hasonló mértékű növekedést tapasztaltunk, mint a kontrollokban (20%), a 20 μM-os csoportban kissé, de nem szignifikánsan nagyobbat (25%). A 40 μM-os eszfenvalerát-oldattal történő kezelés viszont erősen gátolta a kiváltott válasz növekedését, ez az érték itt szignifikánsan kisebb volt, mint a többi csoportban (5% körül) (31. ábra).

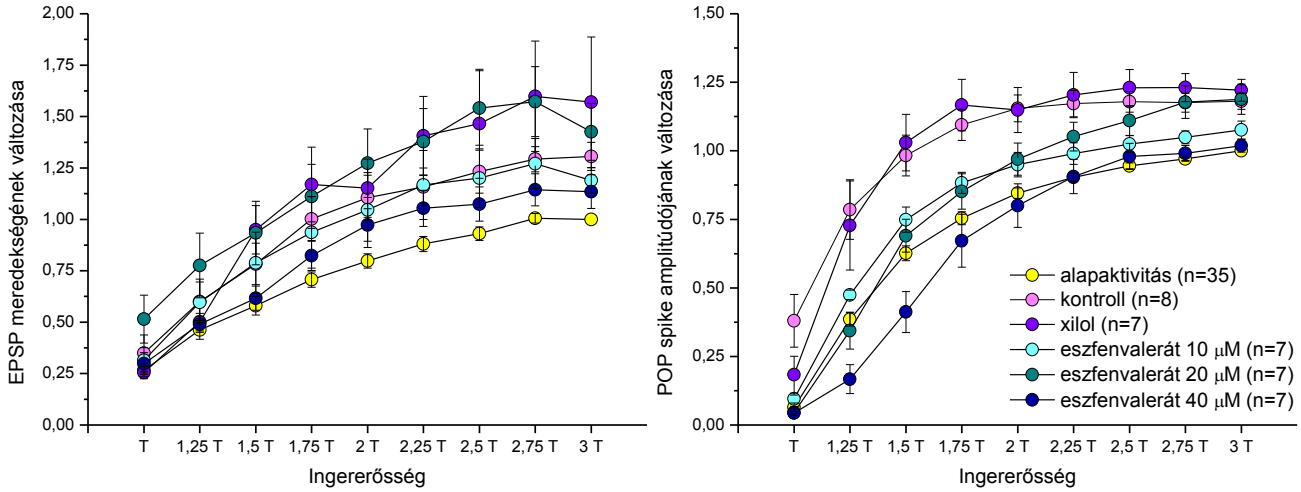
A késői komponens amplitúdója az ingererősség függvényében ábrázolva nem mutat olyan szabályos telítési görbét, mint a korai komponensé, erről csak a 2T ingererősséggel felvett tesztingerlést mutatom be. Az ACSF-es kontroll csoport esetében a fél órás perfúzió hatására az N2 komponens amplitúdója alig változott, 10% alatti növekedést tapasztaltunk. Viszont a xilolos kontroll csoport esetében a növekedés ennél szignifikánsan nagyobb volt, 20% körüli. A 20 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportoknál hasonló mértékű volt a növekedés, de a nagyobb szórások miatt nem adódott szignifikáns különbség a kontrollhoz képest. A 40 μM-os kezelt csoportban viszont a késői komponens amplitúdójának szignifikáns (25-40%-os) csökkenését tapasztaltuk, mind az ACSF-es, mind a xilolos kontroll csoporthoz képest (31. ábra).



31. ábra *In vitro* eszfenvalerát kezelés hatása kérgi szeletekben az EPSP korai (N1-P1) és késői (N2) komponensének amplitúdó-változására (I-O görbe és tesztingerlés 2T ingererősséggel).

Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás hippocampus szeleteken

A hippocampusban az EPSP meredeksége jelentősen nőtt a félórás perfúzió során, az ACSF-es kontroll csoportban átlagosan 37%-kal. Ennél nagyobb mértékű volt a növekedés a xilolos kontroll csoportban (44%) és a 20 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportban (58%). A 10 μM-os kezelt csoportban 30%, a 40 μM-os kezelt csoportban csak 21%-os volt az EPSP-meredekség növekedése. A különböző kezelési csoportok között megfigyelt különbségek nem volt statisztikailag szignifikánsak (32. ábra).



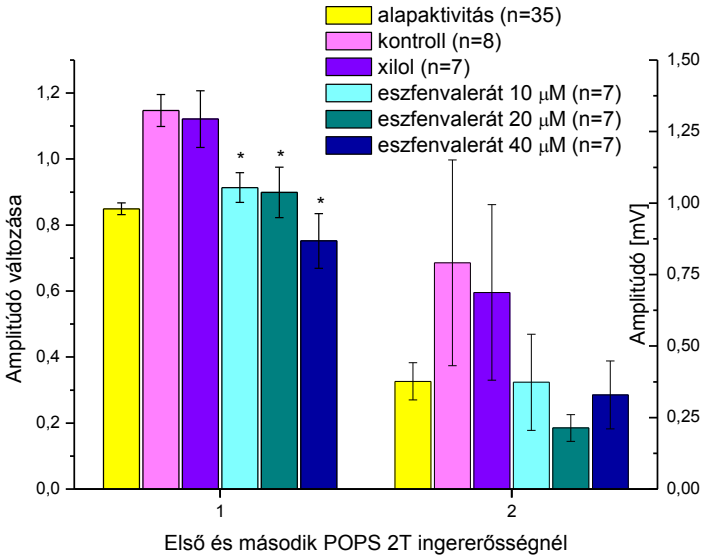
32. ábra *In vitro* eszfenvalerát kezelés hatása hippocampus szeletekben az EPSP meredekségére és a populációs spike amplitúdójának változására.

A félórás perfúzió közben a populációs spike amplitúdója is átlagosan jelentősen növekedett a kontroll csoportokban, az ACSF-es kontroll esetében 35%-kal, a xilolos kontrollnál 32%-kal. A 10 és 20 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportoknál a növekedés szignifikánsan kisebb mértékű volt, 7 illetve 6%-os. A 40 μM-os kezelt csoportban pedig a populációs spike amplitúdójának átlagosan 12%-os csökkenését tapasztaltuk, így ez a csoport is szignifikánsan eltér a kontrolltól (32. ábra).

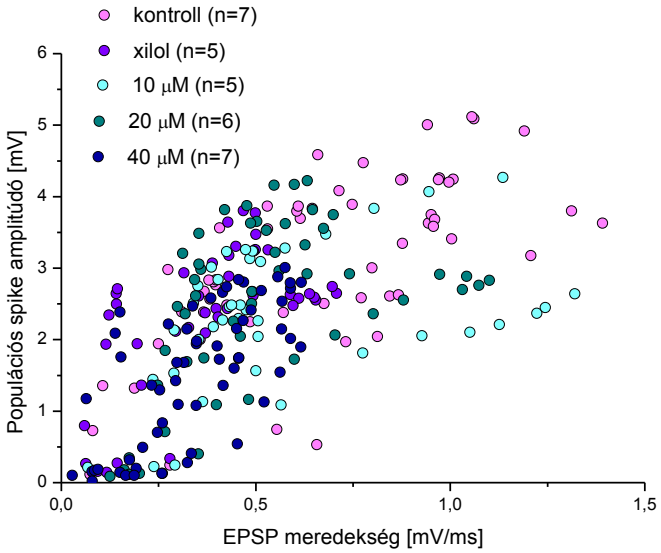
A hippocampus-szeletek általános serkenthetőségére jellemző a második populációs spike jelenléte, nagysága is. Az általunk alkalmazott ingererősség-tartományban (ingerküszöb (T) – ingerküszöb háromszorosa (3T)) általában csak egyetlen POPS jelenik meg egy inger alkalmazásakor, a félórás ACSF-es perfúzió hatására viszont több szeletben kialakult, illetve megnőtt az amplitúdója. Mivel sok esetben a kísérlet elején egyáltalán nem volt jelen második POPS, itt nem az alapállapothoz képest történő változás mértékét, hanem az abszolút amplitúdót mutatom be mV-ban. A második populációs spike nagysága nem különbözött szignifikánsan a kontroll és a kezelt szeletek esetében, a nagy szórásértékek miatt, de megfigyelhető egy tendencia: a kontroll csoportokban az átlagos amplitúdó 0,7-0,8 mV, míg a kezelt csoportokban ennél kisebb 0,2-0,4 mV között volt (33. ábra).

Hippocampus szeleten az EPSP-meredekség és a populációs spike-amplitúdó összefüggésének elemzésével következtetni lehet arra, hogy egy kezelés inkább a preszinaptikus vagy posztszinaptikus végződés befolyásolása révén hat a szinaptikus átvitelre. Az EPSP-meredekség a piramissejtekre érkező serkentő bemenettel arányos, a populációs

spike amplitúdója pedig a piramissejtek tüzelési valószínűségével arányos, vagyis a posztszinaptikus serkenthetőséggel. A két paraméter összefüggését EPSP-Spike (E-S) kapcsolatnak vagy E-S görbének nevezik. A Wheal és mtsai által 1998-ban leírt módszer szerint, ha pontdiagram formájában ábrázoljuk az EPSP-meredekség és POPS amplitúdó adatpárokat, a pontok eloszlásából következtetni lehet a hatás jellegére. Ha a görbe balra tolódik, az arra utal, hogy a POPS nőtt nagyobb mértékben, ha pedig jobbra, akkor az EPSP meredekség. Az *in vitro* eszfenvalerát-kezelés nem változtatta meg jelentősen az E-S kapcsolatot, az egyes kezelési csoportok adatpontjai a grafikonon egyenletesen oszlanak el, nem fedezhető fel egyértelmű jobbra vagy balra tolódás a kezelt csoportoknál (34. ábra).



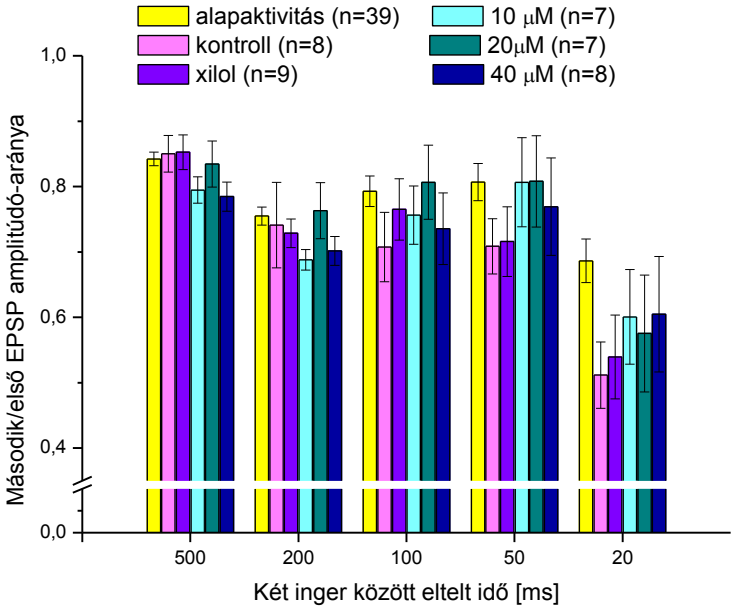
33. ábra *In vitro* eszfenvalerát kezelés hatása hippocampus szeletekben az első és második populációs spike amplitúdójára.



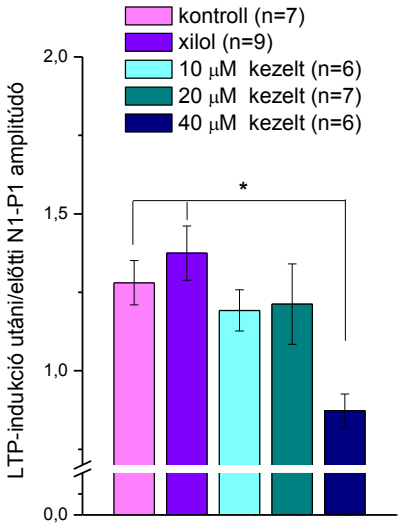
34. ábra *In vitro* eszfenvalerát kezelés hatása hippocampus szeletekben az EPSP- POPS kapcsolatra.

Plasztikus folyamatok vizsgálata kérgi szeletekben

A neocortexre jellemző módon a kontroll és a kezelt szeletekben egyaránt a második kiváltott válasz 15-25%-os gátlódását figyelhettük meg. Ennek mértékében nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok között (35. ábra).



35. ábra *In vitro* eszfenvalerát hatása kérgi szeletekben a páros ingerlésre.



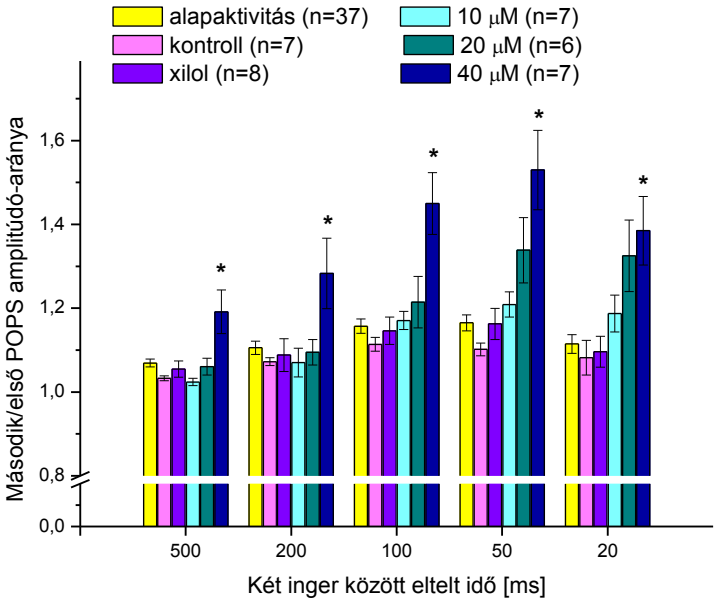
36. ábra *In vitro* eszfenvalerát kezelés hatása kérgi szeletekben az LTP-indukcióra.

Az ACSF-es és xilolos kontroll csoportokban az LTP-indukció hatására az EPSP korai komponense 28 illetve 37%-os növekedést mutatott. A 10 és 20 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportokban a növekedés ezeknél valamennyivel kisebb, 19 illetve 21% volt. A 40 μM-os kezelt csoportban viszont nem is sikerült a kiváltott válasz hosszútávú növekedését kiváltani, ebben a csoportban az amplitúdó kb. 12 %-os csökkenését tapasztaltuk, ez szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (36. ábra).

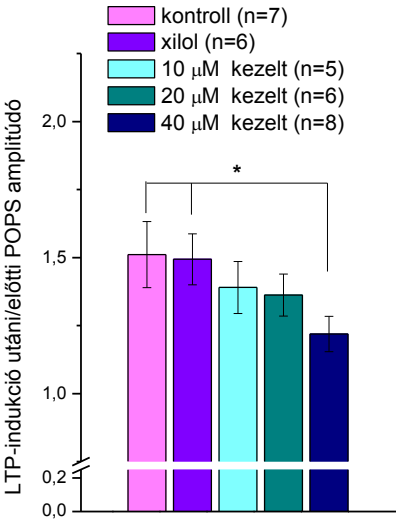
Plasztikus folyamatok vizsgálata hippocampus szeletekben

Páros ingerlésnél a hippocampusra jellemző módon a második kiváltott válasz serkentődését figyeltük meg, ez a 40 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportban minden ingerlési időköznél szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a többi csoportnál (37. ábra).

LTP-indukció hatására a populációs spike a kontroll csoportokban 51 illetve 49%-kal nőtt, ez a növekedés az eszfenvaleráttal kezelt csoportokban kisebb mértékű volt. A 10 és 20 μM-os eszfenvaleráttal kezelt csoportoknál átlagosan 39 illetve 36% növekedést tapasztaltunk, a 40 μM-os kezelt csoportban viszont a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb volt az LTP-indukció hatékonysága, alig haladja meg a 20%-ot (38. ábra).



37. ábra *In vitro* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben a páros ingerlésre.



38. ábra *In vitro* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben az LTP-indukcióra.

Az eszfenvalerát hatása *in vivo* kezelés esetén

Összesen 32 patkányt kezeltünk Sumi-Alfával gyomorszondán keresztül, az alkalmazott eszfenvalerát-dózis 20 mg/kg volt, amely a patkány orális LD_{50} érték negyedének felel meg. 10 patkány esetében a kezelés után 1-2 órán belül súlyos görcsrohamok alakultak ki, ezeket az állatokat túlaltattuk. A többi állat is mutatott diszkomfortra utaló jeleket, de specifikus tünetek nem alakultak ki náluk.

Ötféle kezelési csoportunk volt: egy fiziológiás sóoldattal kezelt kontrollcsoport, egy xilollal (az oldószerrel) kezelt kontrollcsoport, valamint 3, egyféle dózisú eszfenvaleráttal kezelt csoportunk, amelyeknél a mérés a kezelés utáni különböző időpontokban történt (a kezelés utáni első, második ill. hetedik napon). Ezeket az alábbiakban az egyszerűség kedvéért egynapos, kétnapos és egyhetes kezelt csoportoknak fogom nevezni.

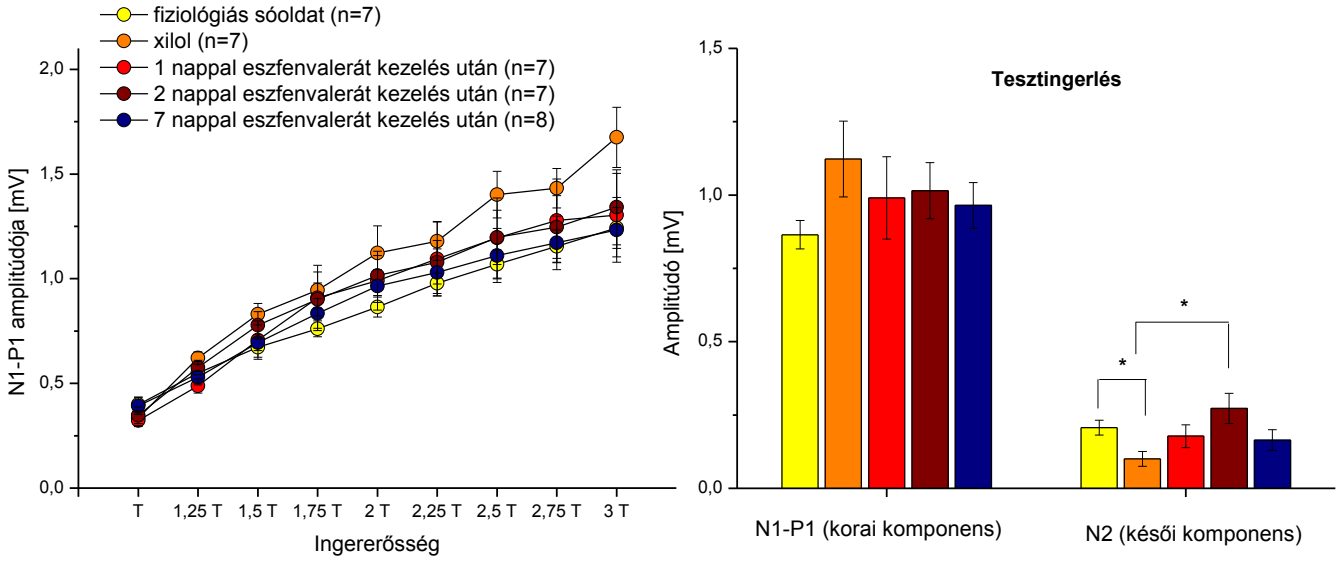
Mivel ennél a kísérletnél nincs lehetőség a szer hatását a kezelés előtt és után történő párhuzamos mérésekkel jellemezni, ezért itt az alap ingerlékenység kiértékelésekor nem számoltam relatív amplitúdó-értékeket a kiváltott válaszokra, hanem az abszolút értékeket ábrázoltam mV-ban.

Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás a kérgi szeleteken

A válaszok kiváltásához szükséges küszöbfeszültség-értékek szignifikánsan magasabbak voltak az egynapos és kétnapos kezelt csoportban, mint a xilolos kontroll csoportban (1. táblázat). A korai komponens amplitúdóját az eszfenvalerát és a xilol egyaránt kissé növeli a fiziológiás sóoldatos kontrollhoz képest, de nem szignifikáns mértékben. A késői komponens nagysága a xilolos kontroll csoportban szignifikánsan kisebb volt, mint a fiziológiás sóoldatos kontrolloknál. A kétnapos kezelt csoportban viszont szignifikánsan nagyobb volt a késői komponens, mint a xilolos kontroll csoportban (39. ábra).

Kezelési csoport	Fiz. sóoldatos kontroll	Xilolos kontroll	Egy nappal eszfenvalerát után	Két nappal eszfenvalerát után	Hét nappal eszfenvalerát után
Küszöbfeszültség [V] (átlag ±S.E.M.)	1,94 ± 0,15	1,56 ± 0,13	2,16 ± 0,12 *	2,16 ± 0,18 *	1,87 ± 0,06

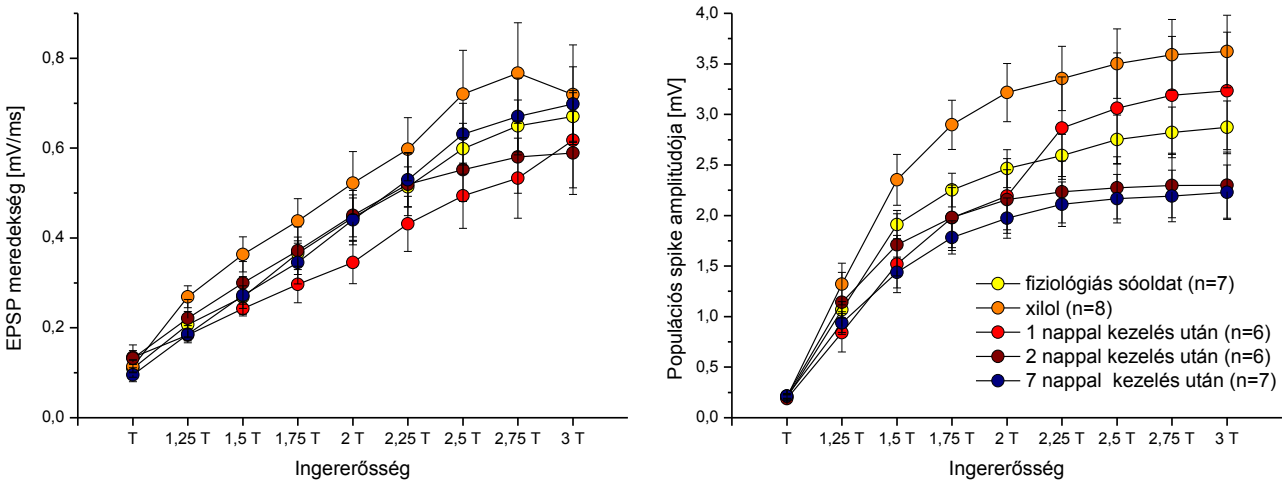
1. táblázat *In vivo* eszfenvalerát kezelés hatása neocortex szeletekben az EPSP kiváltásához szükséges küszöbfeszültség-értékre.



39. ábra *In vivo* eszfenvalerát kezelés hatása neocortex szeletekben az EPSP korai és késői komponensének amplitúdójára.

Alap ingerlékenységre gyakorolt hatás a hippocampus-szeleteken

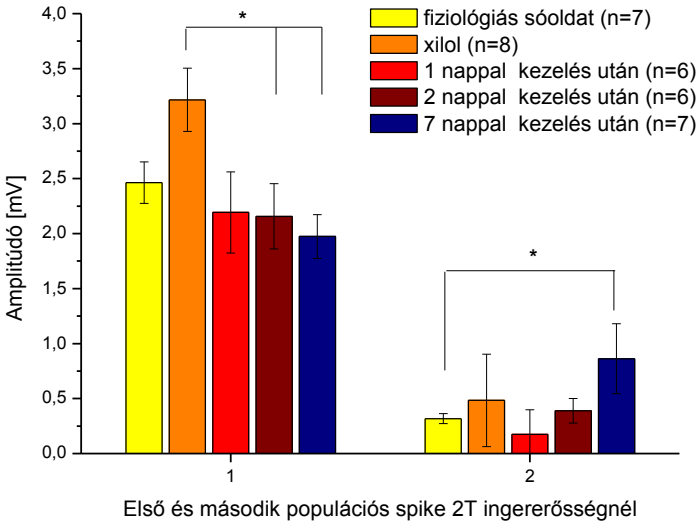
A hippocampus-szeletek esetében nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok ingerküszöbértékei között. Az EPSP meredeksége sem különbözött az egyes csoportok között. A populációs spike amplitúdója viszont a kétnapos és egyhetes csoportokban szignifikánsan kisebb volt, mint a xilolos kontroll csoportban (40. ábra).



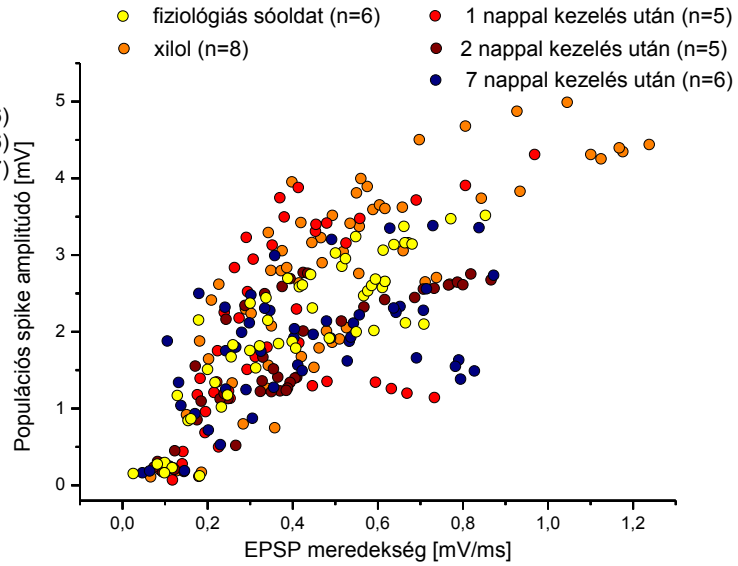
40. ábra *In vivo* eszfenvalerát kezelés hatása hippocampus szeletekben az EPSP meredekségére és a populációs spike amplitúdójára, az ingererősség függvényében.

A második populációs spike megjelenése gyakoribb volt, illetve ezek szignifikánsan nagyobb amplitúdójúak voltak az egyhetes kezelt csoportnál, mint a fiziológiás sóoldatos kontroll esetében. A kétnapos csoportban is érzékelhető volt ez a tendencia (41. ábra).

Az EPSP-meredekség vs. populációs spike-amplitúdó elemzés során nem találtunk különbséget a kezelési csoportok között, az adatpontok egyenletesen oszlanak el a pontdiagramon, az egyes csoportok pontjai nem különülnek el (42. ábra).



41. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben a populációs spike-ok amplitúdójára 2T

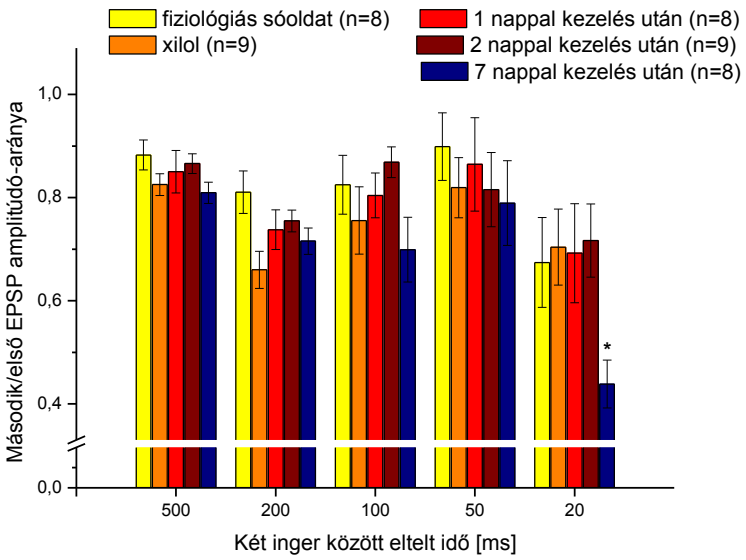


42. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben az EPSP- POPS kapcsolatra.

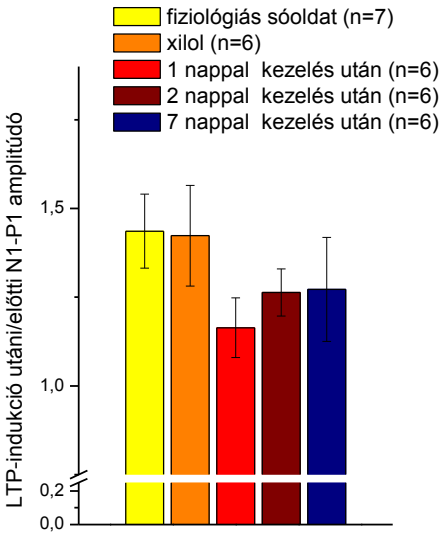
Plasztikus folyamatok vizsgálata kérgi szeletekben

Páros ingerlésnél nem találtunk egyértelmű különbséget a kezelési csoportok között. Csak a 20 ms-os ingerintervallumnál volt az egyhetes kezelés esetében szignifikánsan erősebb a második kiváltott válasz gátlódása, mint a többi csoportnál (43. ábra).

LTP-indukció hatására a kontroll csoportokban az EPSP korai komponensének 40% körüli növekedését tapasztaltuk. Az egynapos, kétnapos és egyhetes kezelt csoportokban ez a növekedés kisebb, átlagosan 16, 26 illetve 27% körüli volt, de ezek az eltérések egyik esetben sem jelentenek szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest (44. ábra).



43. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása neokortikális szeletekben a páros ingerlésre.

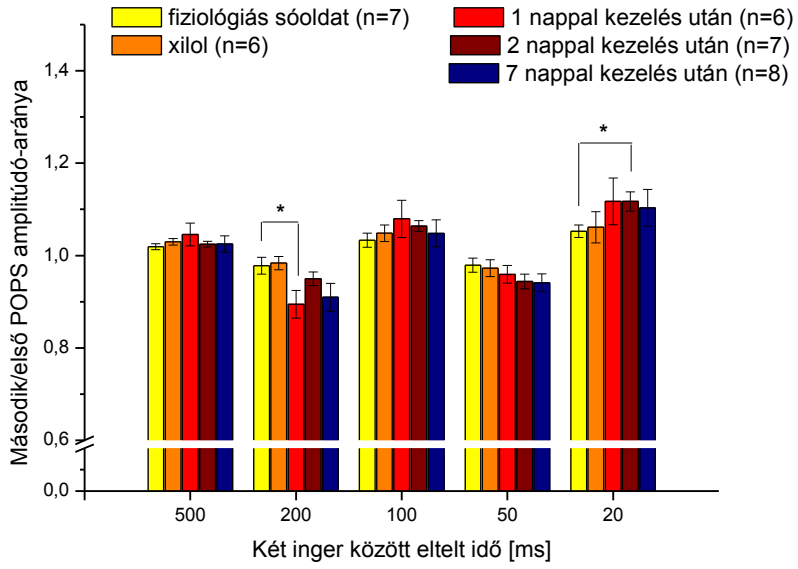


44. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása neocortex szeletekben az LTP-indukcióra.

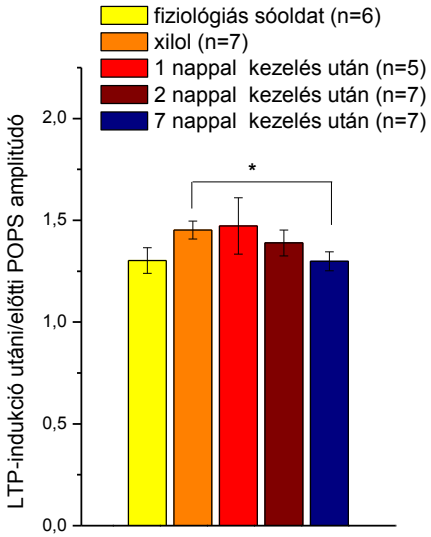
Plasztikus folyamatok vizsgálata hippocampus szeletekben

Az eszfenvalerátnak a hippocampális páros ingerlésre kifejtett hatása nem volt egyértelmű. A 200 ms-os ingerlési időköz esetén a kezelés után egy nappal a második kiváltott válasz nagyobb mértékű gátlódását tapasztaltuk, mint a kontroll csoportokban. 20 ms-os intervallumnál pedig a kétnapos csoportban volt megfigyelhető nagyobb mértékű növekedés, mint a kontroll esetében (45. ábra).

LTP-indukció hatására a populációs spike amplitúdó-növekedése az ACSF-es kontroll csoportban 30%, a xilolos kontroll csoportban 45% volt. Az egynapos, kétnapos és egyhetes



45. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben a páros ingerlésre.



46. ábra *In vivo* eszfenvalerát hatása hippocampus szeletekben az LTP-indukcióra.

kezelt csoportokban a megfelelő érték 47, 39 illetve 30% volt. Az egyhetes kezelt csoport esetében ez szignifikánsan kisebb mértékű növekedést jelent, mint a xilolos kontroll csoportban (46. ábra).

Görcskészség vizsgálata 4-aminopiridinnel kérgi szeleteken

A 60 percig tartó 4-AP-val történő perfúzió minden csoportban megnövelte a kiváltott válaszok amplitúdóját, az EPSP korai és késői komponense egyaránt növekedett. A növekedés mértékében azonban nem volt jelentős különbség az eszfenvaleráttal kezelt és a kontroll csoportok között. A 4-AP-val kiváltott görcsaktivitás tekintetében sem láttuk egyértelmű különbséget. Az egyes szeletek aktivitása minden csoporton belül meglehetősen különbözött egymástól, így nagyon szórtak az adatok. Talán a kezelés után két nappal vizsgált csoportról mondhatjuk el, hogy érzékenyebbnek tűnik a többinél, gyorsabban kialakul a spontán tevékenység és több epizód figyelhető meg, mint a többi csoportban (2. táblázat).

Kezelési csoport	Fiz. sóoldatos kontroll	Xilolos kontroll	Egy nappal eszfenvalerát után	Két nappal eszfenvalerát után	Hét nappal eszfenvalerát után
Korai komponens növekedése [%]	45,9 ± 10,1	55,9 ± 15,3	29,9 ± 19,1	62,2 ± 12,9	53,8 ± 9,6
Késői komponens növekedése [%]	147,3 ± 51,1	494,9 ± 263,5	200 ± 86,1	101,6 ± 38,7	187,3 ± 106,7
Iktális aktivitású szeletek száma	4/8	4/8	3/8	3/7	2/8
Első spontán epizód latenciája [min]	18,58 ± 5,53	20,9 ± 5,27	26,36 ± 11,39	14,94 ± 5,39	16,77 ± 3,62
Első iktális aktivitás latenciája [min]	28,8 ± 6,08	44,96 ± 7,89	28,97 ± 14,05	20,13 ± 10,5	36,75 ± 4,15
Iktális epizódok száma	2,88 ± 1,94	1,88 ± 1,55	2,43 ± 2,42	5,86 ± 5,59	0,88 ± 1,28
Interiktális epizódok száma	12,88 ± 11,7	17,25 ± 16,54	1,25 ± 1,06	53,6 ± 20,41	27,14 ± 12,5
Epizódok frekvenciája [1/min]	0,65 ± 0,12	0,96 ± 0,11	0,43 ± 0,03	2,3 ± 0,96	1,17 ± 0,37

2. táblázat *In vivo* eszfenvalerát kezelés hatása neocortex szeletekben a kiváltott válaszok 4-amino-piridin okozta amplitúdó-növekedésére és a spontán tevékenységre. Feltüntetett adatok: átlag ± S.E.M.

Az eredmények megvitatása

A bensultap hatásának elemzése

Az agykérgi szeletek alap ingerlékenységét a bensultap a következőképpen befolyásolta: az EPSP korai komponense 30 μM-os kezeléskor szignifikánsan nőtt, a 60 μM-os kezeléskor lényegében nem változott. Az EPSP késői komponense enyhén növekedett, de nem szignifikáns mértékben. Az LTP okozta amplitúdó-növekedés mértékét viszont a szer mindkét alkalmazott koncentráció esetén csökkentette, ez a 30 μM-os oldatnál szignifikáns eltérést jelentett. A rövidtávú plaszticitást tesztelő páros ingerlésre a bensultapos kezelés semmilyen hatással nem volt.

A bensultap, neonikotinoid rovarirtószer lévén, a **nikotinos acetilkolin-receptorokon** fejti ki hatását. A patkány nagyagykérgében a nikotinos kolinerg jelátvitelért egyrészt az alsóbb agyi területekről felszálló kolinerg pályák, másrészt a lokális kolinerg interneuronok felelősek (von Engelhardt és mtsai, 2007). A nAChR-ok leginkább a piramissejteken fordulnak elő, főként preszinaptikus helyzetben. Ezen receptorok aktivációja így elősegíti a serkentő neurotranszmitterek felszabadulását, így a neocortex ingerlékenysége, válaszkészsége megnő (Chu és mtsai, 2000; McGehee és Role, 1996). Ezeket a hatásokat *in vitro* rendszerekben is sikerült kimutatni. Különféle nikotinos agonisták serkentik a serkentő aminosav-transzmitterek felszabadulását, amint azt patkány frontális kérgéből készült, a pre- és posztszinaptikus membránokat tartalmazó preparátumok (szinaptoszómák) segítségével kimutatták (Rousseau és mtsai, 2005). A kérgi kolinerg interneuronokról is kimutatták, hogy aktivációjuk kismértékben növeli a környező piramissejtek tüzelési frekvenciáját (von Engelhardt és mtsai, 2007). Ily módon az ACh növeli a kiváltott válaszok amplitúdóját és megváltoztatja a szinapszisok transzmissziós hatékonyságát is. Ugyanakkor vannak nikotinos receptorok a GABA-erg interneuronokon is, így ezek aktivációja a piramissejtek aktivitás-csökkenéséhez vezethet, de akár diszinhibícióhoz is, az adott neuronkör felépítésétől függően (Albuquerque és mtsai, 2000). A galantamin, egy nikotinos serkentő ligandum, amely allosztérikus módon növeli a nAChR-ok ACh iránti érzékenységét, neokortikális és hippocampális agyszeletekben növelte a glutamáterg és a GABA-erg posztszinaptikus potenciálok amplitúdóját is (Santos és mtsai, 2002). Összességében tehát a nikotinos receptorokon keresztül többféle, serkentő vagy gátló irányú moduláló hatás érvényesülhet (Dani és Bertrand, 2007).

Régóta ismert tény, hogy a nikotinos jelátvitelnek fontos szerepe van a tanulási és memória-folyamatokban, tehát az idegrendszer plaszticitásában is. Kimutatták, hogy a nikotin és nikotinos receptor-agonisták elősegítik az LTP kialakulását a hippocampusban (Fujii és mtsai, 2000; Hunter és mtsai, 1994).

Mindezen adatok alapján egy nAChR-agonista szertől összességében az agyszövet általános ingerelhetőségének növekedését, és a plaszticitás erősödését várhatjuk, tehát a kiváltott mezőpotenciálok amplitúdójának és az LTP hatékonyságának növekedését. A nikotinos antagonista hatású vegyületek (amilyen a bensultap) pedig valószínűleg ezzel ellentétes hatást váltanának ki. Mi is azt tapasztaltuk, hogy a bensultapos kezelés csökkenti az LTP-indukció hatékonyságát, viszont a kisebbik alkalmazott koncentráció esetében fél órás kezelés után az EPSP amplitúdó-növekedését figyeltük meg. Ennek oka az lehet, hogy a bensultap nem tisztán nikotinos antagonistaként viselkedik vagy a hálózati aktivitásra kifejtett komplexebb hatás érvényesült.

A bensultap molekuláris szintű hatásairól kevés az irodalmi adat, viszont a **nereistoxin**t és egy másik nereistoxin-analóg rovarirtószert, a cartapot több tanulmányban is vizsgálták. A nereistoxinnak kettős hatása van a nAChR-on. Alacsonyabb koncentrációban parciális agonistaként viselkedik, patkány és béka izomszövetben eleinte depolarizációt okoz, és *Torpedo* (elektromos rája) elektromos szervének membránjain serkenti a Na^+-beáramlást (Eldefrawi és mtsai, 1980). Elsősorban azonban gátló hatású, amint azt ideg-izom preparátumokon (Eldefrawi és mtsai, 1980; Liao és mtsai, 2003) és rovar ganglionokban is kimutatták (Sattelle és mtsai, 1985). Az utóbbi tanulmány szerint a gátlás feszültségfüggő volt, ami kompetitív/csatornablokkoló hatásmechanizmusra utal, ellentétben a gerinces preparátumokon tapasztaltakkal, amelyek inkább az allosztérikus hatás felé mutatnak. Biokémiai módszerrel kimutatták, hogy a nereistoxin méh nAChR-okon kötődik egy agonista és egy nemkompetitív blokkoló helyhez is (Lee és mtsai, 2003). *Drosophila* és csirke rekombináns receptorokon végzett patch clamp-vizsgálatokban viszont csak nemkompetitív gátló hatást mutattak ki (Raymond-Delpech és mtsai, 2003).

A **cartap** hatásmechanizmusa szintén többféle lehet: emlős nAChR-okon single-channel patch clamp vizsgálatok tanúsága szerint csatornablokkoló hatású (Nagata és mtsai, 1997), méh nAChR-okon pedig nemkompetitív antagonistaként viselkedik (Lee és mtsai, 2003). Egér illetve nyúl izolált rekeszizom-preparátumon viszont az elvárt gátló hatás helyett görcsös összehúzódást okoz (Liao és mtsai, 2000, 2003). A bensultappal végzett patch clamp-

mérésekben a vegyület egyértelműen gátló hatást fejtett ki a nAChR-okon: csiga neuronokon az ACh-indukálta ionáramokat koncentrációtól és inkubációs időtől függő mértékben gátolta (Győri és mtsai, 2007).

A nereistoxin és a cartap hatásmechanizmusainak különbözőségére az egyes fajokban és kísérleti rendszerekben még nincs világos magyarázat, az eltérések oka lehet koncentrációfüggés vagy a receptorok felépítésének, így érzékenységének különbözősége.

A bensultap hatása patkány **agyszeleteken** a nereistoxinéhoz hasonló módon kétfázisú lehet. Valószínű, hogy kis koncentrációban az agonista, majd nagyobb koncentrációban az antagonista hatás dominál, ez megmagyarázná, hogy miért tapasztaltuk 30 μM-os koncentrációnál a kiváltott válaszok növekedését. A 60 μM-os koncentrációjú oldattal való kezeléskor az amplitúdó nem változott lényegesen. Az LTP-indukciót viszont a kisebb és a nagyobb koncentrációjú oldat egyaránt gátolta. Ennek oka a mérési protokollunk lehet, hiszen az LTP-indukció után történő regisztráláskor az agyszeleten már 60 perce a rovarirtószer-tartalmú oldatot áramoltattuk át. Mivel a bensultap lipofil anyag, az agyszövetben felhalmozódásra hajlamos, ennyi idő alatt a kisebb koncentrációjú oldat esetén is elérhette az agyszeletben jelenlévő koncentráció a gátló hatáshoz szükséges mértéket.

A laborunkban korábban elvégzett kísérletekben, amelyek során a bensultap hatását *in vivo* kezelés után vizsgálták, elsősorban gátló jellegű hatásokat mutattak ki. Krónikus orális bevitel esetén a kérgi szeletekben a kiváltott válaszok amplitúdója és a görcskészség csökkent (Dóczi és mtsai, 1998). Akut nagydózisú orális kezelés után pedig a páros ingerléskor fellépő gátlás erősödése és az LTP-indukció csökkent hatékonysága volt megfigyelhető (Szegedi és mtsai, 2005). Ezen hatások közül az LTP gátlását az *in vitro* kezelés esetében is láthattuk.

Összességében az agyszeletek *in vitro* történő kezelésével az *in vivo* adatokkal összevethető eredményekhez jutottunk, amelyek értelmezhetőek a szer molekuláris hatásmechanizmusának ismeretében.

A fipronil hatásának elemzése

A fipronilnak mindkét alkalmazott koncentrációban serkentő hatása volt az agyszeletek alap ingerlékenységére, 10 és 20 μM-nál egyaránt megnövelte a kiváltott válaszok korai komponensének amplitúdóját. Az EPSP késői komponense szintén nőtt a fipronilos kezelés hatására. A szinaptikus plaszticitást vizsgáló kísérletekben viszont nem találtunk különbséget a fipronillal kezelt és a kontroll szeletek között, csak a tetanizáló ingersorozat hatására létrejövő növekedés volt kismértékben nagyobb a magasabb koncentrációjú oldattal kezelt szeleteken.

A fipronil fő hatásmechanizmusa a **$GABA_A$ receptorok** gátlása (Cole, 1993). Kimutatták, hogy nemcsak a rovarok, hanem az emlősök hasonló receptorait is gátolja, habár kisebb affinitással. Patkány hátságyöki ganglionsejteken a fipronil 1-30 μM koncentrációban csökkenti GABA-áramokat (Ikeda és mtsai, 2001). Humán α1β3ε $GABA_A$ receptorokon pedig a spontán ionáramot gátolja a fipronil 5,3 μM-os IC_{50} értékkel (Maksay és mtsai, 2003). A rovarok és emlősök központi idegrendszerében egyaránt a GABA a fő gátló transzmitter. A kifejlett gerincesek agyában főként interneuronokból szabadul fel, amelyek a serkentő principális sejtekkel szinaptizálva csökkentik azok aktivitását. Ezek kulcsszerepet játszanak a hálózatok aktivitási szintjének, érzékenységének állításában, az aktivitás szinkronizálásában. A rovarok idegrendszerében még nincsenek olyan részletesen feltárva a szinaptikus kapcsolatok, mint az emlősöknél, de pl. a szaglási információ feldolgozásáért felelős antennális lebenyben náluk is jellemzően az emlős interneuronokhoz hasonló, rövid axonú lokális neuronok GABA-ergek, amelyek a serkentő projekciós sejtekre adnak bemeneteket (Wilson és Laurent, 2005). A GABA-erg transzmisszió megváltoztatása a gátló sejtekkel kapcsolatban lévő serkentő sejtek érzékenységét, aktivitását is megváltoztatja. Lepkelárvákból készült hasdúclánc-preparátumon a fipronil fokozta a spontán elektromos aktivitást 10 μM koncentráció mellett (Durham és mtsai, 2001). A patkány agyszeletes kísérletekhez hasonló koncentráció-tartományban vizsgáltuk a fipronilt mocsári csiga neuronokon is, ezekben dózisfüggő módon csökkentette a tüzelési frekvenciát, a membránpotenciál megváltoztatása nélkül. Csigában a vizsgált idegsejten a GABA depolarizáló hatású. A fipronil így az ionotróp GABA-receptor antagonizálásával gátló hatást fejthetett ki a sejt ingerlékenységére (Varró és mtsai, 2009).

A fipronil közvetlen hatását **emlős agyszeletben** extracelluláris mérési technikával még nem vizsgálták, de más $GABA_A$ receptor-antagonista anyagoknak, pl. a pikrotoxinnak vagy a

bicuculline-nak hasonló hatásai vannak: alacsony koncentrációban diszinhibíció révén megnövelik a neuronhálózatok ingerlékenységét, magas koncentrációban görcskeltőként viselkednek (McCormick, 1989). Patkány agykérgi szeleteken a bicuculline alkalmazásakor elektromos ingerlésre több komponensből álló, komplex, epileptiform kiváltott potenciálok mérhetők (Chagnac-Amitai és Connors, 1989). Ezekhez hasonló elnyújtott kiváltott válaszokat mi is megfigyeltünk a fipronil alkalmazásakor, és az eredmények számszerű kiértékelésekor is kitűnt, hogy a fipronil megnöveli a görbék késői komponensének előfordulási esélyét, amplitúdóját. Az általunk alkalmazott anyagkoncentráció elég magas volt ahhoz, hogy megnövelje az elektromos ingerléssel vizsgálható válaszkészséget, de spontán görcstevékenységet nem okozott. Egy, a laborunkban korábban végzett kísérletsorozatban orális úton patkányokat kezeltek fipronillal, és túlélő agykérgi szeletpreparátumon az idegi serkenthetőség átmeneti megnövekedését mutatták ki a kezelést követően (a kiváltott potenciálok amplitúdója megnőtt), ez egyezik az *in vitro* kezeléssel kapott eredményekkel (Szegedi és mtsai, 2005).

A **páros ingerlés**es tesztekben nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a fipronillal kezelt szeletek között a rövidtávú gátlás (PPD) mértékében. A fipronil-kezelés hatására az alap transzmissziós szint emelkedett a GABA-erg gátlás gyengülése miatt, ilyen esetben a rövidtávú gátlás erősödése várható neocortex-szeleteken (Zucker és Regehr, 2002). A hatás elmaradását okozhatta az, hogy kontroll esetekben sem volt nagymértékű a PPD, lehetséges, hogy az általunk alkalmazott ingererősség (2T) túl alacsony volt ahhoz, hogy az első ingerlés „kiürítse” a szinaptikus vezikulákat, és így a második ingerre adott válasz jelentősen csökkenjen az elsőhöz képest.

Az **LTP** kialakulása neocortexben nagymértékben az NMDA-receptorok aktiválódásától és a posztszinaptikus végződés intracelluláris Ca^{2+}-szintjének emelkedésétől függ (Castro-Alamancos és Connors, 1996). A GABA-erg transzmisszió megváltoztatása befolyásolni képes a posztszinaptikus depolarizáció mértékét és így az intracelluláris Ca^{2+}-koncentrációt. Az alap ingerlékenység növekedését, az NMDA-receptorok aktiválódására utaló késői komponens növekedését megfigyelhettük a fipronil-kezelés hatására, így azt vártuk, hogy az LTP-indukció által kiváltott növekedés is nagyobb lesz a kezelt szeletekben, mint a kontrollban. Felnőtt állatokban kísérletesen gyakran alkalmaznak $GABA_A$-receptor antagonistákat alacsony koncentrációban az LTP kialakulásának elősegítésére (Malenka, 1995). Mi fiatal állatokat használtunk, így kontroll esetben is megfigyelhető volt a kiváltott

potenciálok növekedése, de a fipronil mint GABA-receptor antagonista kismértékben megnövelte ennek hatékonyságát.

A fipronil serkentő jellegű hatását patkányon *in vivo* kezelés esetén is több tanulmányban bizonyították. Egyszeri nagy dózisú dermális alkalmazás után viselkedésvizsgálatokban megnövekedett aktivitást tapasztaltak (Tercariol és Godinho, 2011). A már említett, laborunkban korábban végzett kísérletsorozatban, amelyben orális úton adtak be fipronilt patkányoknak egy nagy dózisban, szintén megnövekedett aktivitást tapasztaltak a porond-tesztben, amely a rágcsálók spontán explorációs tevékenységét jellemző elterjedten alkalmazott vizsgálati módszer (Szegedi és mtsai, 2005).

Az eszfenvalerát hatásának elemzése

In vitro kezelés után kapott eredmények

Az agyszeletek alap ingerlékenységére a Sumi-Alfával történő kezelés elsősorban gátló hatással volt. A kisebb koncentrációknál (10 és 20 μM) megfigyelhettünk serkentő jellegű hatásokat is, főként a neocortex-szeleteken, itt az EPSP korai és késői komponensének enyhe, nem szignifikáns növekedését tapasztaltuk a kontrollhoz képest. A legnagyobb, 40 μM-os koncentrációban viszont az eszfenvalerát mindkét komponens amplitúdóját csökkentette. A hippocampusban mindhárom alkalmazott koncentráció szignifikánsan csökkentette a populációs spike amplitúdóját. Páros ingerlésnél a hippocampusban a 40 μM-os oldat szignifikánsan megnövelte a PPF mértékét. Az LTP pedig mind a cortexben, mind a hippocampusban gátlódott, a két kisebb koncentráció esetében enyhén, a legnagyobbnál szignifikáns mértékben.

Az *in vitro* preparátumokon végzett mérések során legtöbbször tiszta piretroid-hatóanyagokat alkalmaznak, mi viszont egy kereskedelmi forgalomban kapható készítményt, a Sumi-Alfa 5 EC® -t használtuk, amelynek eszfenvalerát-tartalma 5%, és emulgeálószert valamint 85%-ban **xilol**t tartalmaz oldószerként. Ezért kísérleteimben megvizsgáltam a xilol hatását is egy külön kontroll csoport létrehozásával. A neokortikális szeletekben az ACSF-es kontroll csoporthoz képest a xilolos kontroll csoportban félórás perfúzió hatására szignifikánsan nőtt a kiváltott válasz késői (N2) komponensének amplitúdója, viszont semmilyen más paraméterben nem találtunk eltérést, sőt, az *in vivo* kezelt csoportban ezzel pontosan ellentétes hatást láttunk, így

ez az eredmény valószínűleg mérési hibának tulajdonítható. A szakirodalomban nem találtam olyan tanulmányt, amelyben a xilol vagy egyéb szerves oldószer hatását vizsgálnák *in vitro* idegrendszeri preparátumon. Úgy tűnik, az általunk alkalmazott koncentrációban (kb. 3 mM) nincsen hatása az agyszeletek életképességére, ingerlékenységére, esetleg a piretroid diffúzióját változtathatja meg a szeleten belül, így elképzelhető, hogy a tiszta hatóanyagot alkalmazva kissé más eredményeket kaptunk volna.

Az eszfenvalerát a **feszültségfüggő Na^+-csatornák agonistája** a csatorna inaktivációját lassítva megnöveli az ionáram időtartamát (pl. Choi és Soderlund, 2006). Ezenkívül a Na^+-csatornák aktivációs küszöbét negatívabb membránpotenciálok irányába tolja el, így azok már kisebb mértékű hipopolarizáció esetén megnyílnak. Ezzel az idegsejtek depolarizációját idézi elő, ami ismétlődő kisülésekhez, túlserkentődéshez vezethet. Ha viszont a membrán depolarizációja elér egy kritikus szintet és nem tér vissza a nyugalmi potenciálra, akkor a Na^+-csatornák tartósan inaktív állapotban maradnak, depolarizációs blokk lép fel, az idegsejtben nem jönnek létre akciós potenciálok (Vijverberg és van den Bercken, 1990; Narahashi, 2000). Ezért az alkalmazott preparátumtól, koncentrációtól, kezelési időtől függően a hatás változó típusú, serkentő vagy gátló lehet.

A dolgozatban tárgyalt, agyszeleten végzett kísérletek jobban összevethetőek azokkal a tanulmányokkal, amelyek nem az egyes, legtöbbször heterológ rendszerben kifejeztetett ion-csatornákon vizsgálták a **piretroidok** hatásait, hanem ennél magasabb szerveződési szintű kísérleti rendszerben. Ilyenek például a **primer sejttenyészetek**, amelyekben serkentő és gátló idegsejtek, gliasejtek működő hálózatokat alkotnak. Sejttenyészeteken végzett mérésekben többször tapasztalták az idegsejtek aktivitásának csökkenését, a mi eredményeinkhez hasonlóan.

Patkány hippocampus-tenyészetben kimutatták, hogy a permetrin és a deltametrin 1-10 μM-os koncentrációban egyaránt csökkenti a $GABA_AR$ blokkoló jelenlétében kialakuló spontán, glutamát-közvetítette EPSC-burst-ök gyakoriságát és időtartamát. A veratridin nevű alkaloidnak, amely feszültségfüggő Na^+-csatorna agonista, hasonló hatása volt. Az említett piretroidok a sejtek tüzelési gyakoriságát szintén szignifikánsan csökkentették, ahogyan a veratridin is. Érdekes, hogy alacsonyabb koncentrációban (0,1 μM) és $GABA_AR$ blokkolók nélkül viszont a permetrin és a deltametrin is serkentő hatással van a hippocampális neuronhálózatok működésére, növelik a spike-ok számát és a burst-ök időtartamát (Meyer és

mtsai, 2008). Ezek a hatások preszinaptikus eredetűek, feszültségfüggő Na^+-csatorna által közvetítettek.

A permetrin és a deltametrin egér frontális kéreg- és gerincvelő-tenyészetben (glutamáterg hálózat, $GABA_AR$ blokkoló jelenlétében) szintén koncentráció-függően csökkentették a spike-ok számát, megváltoztatták a burst-ök paramétereit (kevesebb spike, nagyobb intervallumokkal). 5 μM deltametrin már teljesen megszüntette a sejtek tüzelését. Néhány esetben visszafordítható volt a hatás, ez mutatja, hogy nem citotoxicitás okozta (Shafer és mtsai, 2008). Hátsógyöki dúcsejtekből készült tenyészeten is kimutatták a deltametrin (1 μM) depolarizáló és akciópotenciál-gátló hatását (Tabarean és Narahashi, 1998).

A sejttenyészeteken és az agyszeleteken végzett kísérletek összehasonlításakor figyelembe kell vennünk, hogy a primer tenyészeteket embrionális sejtekből állítják elő, így a sejtek valószínűleg eltérő Na^+-csatorna készlettel rendelkeznek, mint a felnőtt agyszövetből készített agyszeletek esetében. Az embrionálisan jellemző $Na_v1.3$ típusú csatorna érzékenyebb a piretroidokra, mint a felnőtt formák, ezért tenyészetekben alacsonyabb koncentráció mellett is kimutatható hatás (Meacham és mtsai, 2008).

A II. típusú piretroidokról **agyszeleteken** végzett kísérletben is kimutatták, hogy depolarizációs blokk okozása révén meggátolják az idegsejtek tüzelését. A deltametrin 0,1 μM-os koncentrációban csökkentette a hypoglossus-mag motoneuronjainak tüzelési frekvenciáját és az akciós potenciálok amplitúdóját egér agytörzsi szeletben (Rekling és Theophilidis, 1995).

Az általunk alkalmazott agyszeleteken végzett mezőpotenciál-mérés módszerével vizsgálták a piretroidokéhoz hasonló hatásmechanizmussal bíró alkaloidok, az **akonitin és a veratridin** hatását. Ezek a növényi hatóanyagok szintén a Na^+-csatornák inaktivációját gátolják, és aktivációs küszöbértéküket negatívabb membránpotenciálok felé tolják el. Ameri és mtsai 1996-ban leírták, hogy patkány hippocampus szeletben az akonitin és a veratridin 0,01-1 μM-os koncentrációban adva csökkentette a CA1 piramissejtjeiből elvezetett populációs spike amplitúdóját. Ez igaz volt az ortodromos és antidromos ingerléssel kiváltott spike-ok esetében is (az előbbi esetében az ingerület a „normális” úton, a preszinaptikus sejtről a dendriteken át éri el a piramissejt sejttestét, az utóbbi esetben a piramissejt axonján terjed vissza az ingerület a sejttest felé). Ez arra utal, hogy a veratridin elsősorban az axonális ingerületvezetést akadályozza. A gátlás kialakulása előtt általában a spike amplitúdójának kismértékű

növekedése volt tapasztalható. Egy másik kísérletsorozatban a mezőpotenciálok mérésével párhuzamosan a CA1 piramissejtekben intracelluláris regisztrálást is végeztek. Ebből kiderült, hogy a veratridin az idegsejtekre serkentő hatással volt, egyenárammal történő ingerlésre a kezelt neuronok egyszerű akciós potenciálok helyett burst-ös tüzeléssel reagáltak. Viszont a Schaffer-kollaterálisok ingerlésével kiváltott populációs spike-ok amplitúdója már 0,3 μM-os veratridin-koncentráció esetén teljesen lecsökken. Tehát az anyag a szinaptikus átvitelt vagy még inkább az axonokon történő ingerületvezetést gátolta meg (Otoom és mtsai, 1998).

A **kétfázisú** (alacsony koncentrációban serkentő, magas koncentrációban gátló) hatásnak nemcsak molekuláris szintű magyarázata lehet. 3 piretroid *in vivo* hatását vizsgálva a hippocampusból történő glutamát- és GABA-felszabadulásra kimutatták, hogy a deltametrin dózisfüggően növeli, a cihalotrin viszont csökkenti a glutamát-felszabadulást, míg az alletrinnek bifázikus hatása van. A GABA-felszabadulás mennyisége mindig fordítottan arányos a glutamátéval (Hossain és mtsai, 2008). A szerzők úgy értelmezik ezeket az eredményeket, hogy valószínűleg eltérő preferenciával kötődnek a szerek a glutamáterg és a GABA-erg neuronokhoz, és vagy a közvetlenül a serkentő sejteken kifejtett hatás az erősebb, vagy az interneuronokon keresztül megvalósuló közvetett hatás. Az agyszeleten mért mezőpotenciálokban szintén tükröződik a serkentő és gátló idegsejtek működése egyaránt, így a mi eredményeinkben is szerepet játszhat ilyesmi.

A **rövidtávú szinaptikus hatékonyságváltozás**t vizsgáló páros ingerléses tesztek közül csak a hippocampus szeleteken tapasztaltunk szignifikáns eltérést, a legnagyobb koncentrációjú, 40 μM-os eszfenvalerát-oldattal történő kezelés során: megnőtt a rövidtávú serkentődés, a PPF mértéke. Az alap ingerlékenység a kontrollénál jelentősen alacsonyabb volt ebben a kezelési csoportban, így ez az eredmény összhangban van a Zucker és Regehr 2002-es cikkében leírt „szabályszerűséggel”, miszerint az alap transzmisszió szint csökkenésekor a facilitáció nő.

A rövidtávú szinaptikus hatékonyságváltozások nagymértékben a preszinaptikus végződés intracelluláris Ca^{2+}-szintjétől függenek. A piretroidok feltételezett másodlagos célpontjai között megtaláljuk a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákat is. Egy elmélet szerint toxicitásukhoz hozzájárul az is, hogy serkentik a neurotranszmitter-felszabadulást a preszinaptikusan elhelyezkedő feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákon kifejtett aktiváló hatásuk révén. Az eszfenvalerát Ca^{2+}-csatorna hatása nem bizonyított, ellentmondásos eredmények születtek ezzel kapcsolatban. Patkány szinaptoszóma-preparátumokon vizsgálva már a nM-os

koncentráció-tartományban a Ca^{2+}-beáramlás serkentését, és fokozott glutamát-felszabadulást mutattak ki (Symington és mtsai, 2008), TTX jelenlétében, ez a közvetlen Ca^{2+}-csatornákon kifejtett hatást bizonyítja. Viszont Cao és mtsai 2011-ben neokortikális sejttenyészeten végzett kísérletei során TTX-szel blokkolható volt az eszfenvalerát okozta Ca^{2+}-szint emelkedés: eszerint nem közvetlen a hatás, hanem a Na^{+}-csatornák hosszabb nyitvatartása miatti depolarizáció váltja ki a Ca^{2+}-csatornák aktiválódását. Így ezek valószínűleg csak másodlagos célpontok a mérgezés kialakulásában (Soderlund, 2012).

Ami a **hosszútávú szinaptikus plaszticitás**t illeti, az LTP kiválthatósága mindkét vizsgált agyterületen gyengült az eszfenvalerát-kezelés hatására, a két kisebb koncentráció esetében enyhén, a legnagyobbnál szignifikáns mértékben. A piretroidokkal kapcsolatban nem találtam olyan adatot, amikor az LTP *in vitro* kiválthatóságát vizsgálták. Viszont az általános ingerlékenység csökkenése általában a hosszútávú plaszticitás csökkenésével jár. A LTP kiváltásában elsődleges szerepe van a Ca^{2+}-szint megemelkedésének a posztszinaptikus végződésben. A Ca^{2+} az NMDA-receptorokon keresztül vagy pedig a feszültségfüggő Ca^{2+}-csatornákon keresztül áramlik be a sejtbe, ezek pedig csak a sejt bizonyos mértékű hipopolarizációja esetén aktiválódnak, tehát a szinaptikus aktivitás a plaszticitás kialakulásának előfeltétele (Teyler, 1999).

In vivo kezelés után kapott eredmények

Miután a Sumi-Alfát gyomorszondával adagoltuk a patkányoknak az eszfenvalerátra vonatkozó LD_{50} érték negyedrészének megfelelő dózisban, az állatok kb. 30%-ánál súlyos **görcsrohamok** alakultak ki. Az eszfenvalerát a II. típusú piretroidok közé tartozik, amelyek nyáladzással és rángógörcsökkel járó mérgezési tünetegyüttest okoznak (choreoathetosis and salivation – CS syndrome) (Soderlund, 2012), mi is ilyen tüneteket figyeltünk meg az érintett állatokon.

Az agyszövet általános ingerlékenységének csökkenésére utal viszont, hogy a neocortexben kezelés után egy és két nappal az EPSP kiváltásához szükséges ingerlési küszöbfeszültség megnövekedését tapasztaltuk. Hippocampusban a populációs spike nagysága a kétnapos és egyhetes csoportokban alacsonyabb volt, mint a kontroll esetben. Viszont túlserkentődésre utaló jeleket is láthattunk, a kezelés után két nappal a neokortikális szeletekben az EPSP késői komponense megnőtt, hippocampusban pedig az egyhetes kezelt csoportban volt szignifikánsan nagyobb a második populációs spike amplitúdója, mint a kontrollnál. Ami a plaszticitási folyamatokat illeti, neocortexben a kezelés után egy héttel a páros ingerlésnél

jellemző gátlás erősödését láttuk a 20 ms-os intervallumnál. Neocortexben és hippocampusban egyaránt csökkent hosszútávú plaszticitást tapasztaltunk, ez a hippocampális szeletekben a kezelés után egy héttel szignifikáns mértékű volt.

Az oldószerrel (**xilol**lal) kezelt csoportból készült szeletek működése nem különbözött jelentősen a fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll csoportétól, csak a neocortex szeleteken mért késői (N2) komponens volt szignifikánsan kisebb a félórás perfúzió után. Ez az egyetlen eltérés valószínűleg csak a véletlennek köszönhető, annál is inkább, mert az *in vitro* kezeléskor ezzel ellentétes hatást tapasztaltunk ugyanerre a paraméterre. A hordozóanyagoknak/oldószereknek ritkán van önálló toxikus hatásuk, de a hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságait, felszívódását gyakran befolyásolni képesek. Egy tanulmányban a kukoricaolajban oldott tiszta fenvalerát és egy fenvalerát készítmény (nagy %-ban szerves oldószer-tartalmú emulzió) akut toxicitását hasonlították össze egéren. Eredményeik alapján a hordozóanyag megnövelte a toxicitást, a készítmény LD_{50} értéke alacsonyabb, mint a tiszta fenvaleráté (Williamson és mtsai, 1989). A xilolra megállapított krónikus NOAEL érték (a legnagyobb, káros hatással még nem rendelkező dózis) 250 mg/testsúlykg/nap (Faust, 1994), az általunk alkalmazott dózis ennek körülbelül kétszerese volt, de csak egyszeri alkalommal kapták a patkányok, így nem valószínű, hogy jelentősebb hatása lett volna. A xilolról főként krónikus bevitel esetén mutattak ki idegrendszer-károsító hatást, pl. tanulási és memória-deficitet (Hass és mtsai, 1997; Wang és mtsai, 1999).

A szakirodalomban kevés az olyan cikk, amely a piretroidok *in vivo* adagolása után elemi idegrendszeri folyamatokra gyakorolt hatásról számol be, inkább **viselkedésvizsgálati eredményekből** találunk sokat. Porond-tesztben és nyolckarú labirintusban legtöbbször az általános aktivitás csökkenését tapasztalták (Wolansky és mtsai, 2006), lehetséges, hogy ez az aktivitáscsökkenés szorongáskeltő hatás miatt alakul ki, amint azt a fenvalerátról kimutatták (De Sousa Spinoza és mtsai, 1999). A piretroidok hatással vannak egyéb motoros funkciókra (pl. a fogáserősséget csökkentik, rontják a motoros koordinációt) és a szenzomotoros integrációra is (pl. a megrezzenési reflex amplitúdója, lefutása változik) (Wolansky és Harrill, 2008). A mérgezési tünetek, viselkedési változások alapos leírása a kockázatbecslés szempontjából is fontos, vitatott, hogy jogos-e a piretroidokat egy csoportként kezelve kumulatív kockázatbecslést alkalmazni, vagy több csoportba kell-e sorolni őket (Weiner és mtsai, 2009). Természetesen ezek az eredmények közvetlenül nem összevethetőek az agyszeleteken történő mérésekkel, amikor izolált neuronkörök aktivitását vizsgáljuk.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a Sumi-Alfa kezelés egyrészt az általános ingerlékenység csökkenését okozta (küszöbfeszültség növekedése, a hippocampusban a POPS amplitúdójának csökkenése), másrészt pedig **epileptiform** kiváltott potenciálokat is megfigyelhettünk (a neocortexben N2 komponens növekedése, hippocampusban második POPS megjelenése). *In vivo* mérésekben is kimutatták, hogy a cianocsoportot tartalmazó piretroidok az EEG-n epileptiform aktivitást váltanak ki, viszont hatásukra a szomatoszenzoros és hallási kiváltott potenciálok amplitúdója csökken (Vijverberg és van den Bercken, 1990).

A **rövidtávú szinaptikus plaszticitás** vizsgálatakor neocortexben a kezelés után egy héttel a páros ingerlésnél jellemző gátlás erősödését láttuk a legrövidebb 20 ms-os intervallumnál, hippocampusban a 200 ms-os intervallumnál. Egy másik szinapszisra jellemző, kissé más hátterű, páros ingerléskor jelentkező gátlás (a gyrus dentatusban fellépő rekurrens gátlás) vizsgálatakor szintén a gátlás erősödését írták le közvetlenül orális fenvalerát kezelés után (Gilbert és mtsai, 1989). Az alap EPSP meredekség egyébként ebben a kísérletben sem változott, a mi eredményeinkhez hasonlóan.

A **hosszútávú szinaptikus plaszticitás** vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy kezelt állatokból származó szeleteken az LTP-indukció általában kisebb mértékű növekedést váltott ki a kiváltott válaszok amplitúdójában, mint a kontroll esetben. Ez jól egyezik az *in vitro* kezeléssel kapott eredményekkel. Az LTP-t a tanulás és memória szinapszis szintű modelljének tekintik. Számos vizsgálatban kimutatták, hogy a fenvalerát illetve eszfenvalerát expozíciónak káros hatása van a kísérleti állatok tanulási folyamataira, az emléknyomok tárolására. Fiatal posztnatális korban egereket két héten át 5 mg/kg-os dózisban fenvaleráttal kezelve a Morris-féle vízi labirintusban csökkent teljesítményt tapasztaltak, csökkent a platform helye feletti átúszások száma, tehát a szer rontotta a térbeli tanulás hatékonyságát (Zhang és mtsai, 2008). Egy félelmi kondicionálás-teszt, az ún. „stepdown test” során az állatoknak azt kell megjegyezniük, hogy ha lelépnek a dobozban található platformról, akkor a ketrec padlóján keresztül áramütést kapnak. Fenvaleráttal kezelt egerekben a tévedések száma nőtt, a lelépés latenciája csökkent (Gao és mtsai, 2009). A fenvaleráttal kezelt patkányokban pedig az operáns kondicionálás és az aktív elkerüléses tanulási tesztek során tapasztaltak gyengébb teljesítményt, mint a kontroll állatokban (Moniz és mtsai, 1994).

A szeletek **görcskészségét** eredményeink szerint nem befolyásolta a Sumi-Alfa kezelés, a 4-amino-piridinnel kiváltott spontán aktivitás a kezelt szeletekben nem különbözött

szignifikánsan a kontrolltól. Bár az eszfenvalerát akut módon epileptikus görcsöket vált ki, a görcsaktivitás a kezelés után néhány órával megszűnik. A méréseink a kezelés után 1-7 nappal történtek, ekkor már spontán epileptiform tevékenység nem is várható. A görcskeltő iránti érzékenység megváltozását sem sikerült kimutatnunk, de ezek az adatok nagyon szórtak.

Ami az eszfenvalerát **farmakokinetikáj**át illeti, az orális úton bejutott szer néhány napon belül kiürül a szervezetből. Az általunk alkalmazottnál jóval alacsonyabb dózisban (2,5 mg/kg) patkányoknak és egereknek beadott radioaktívan jelzett eszfenvalerátból 2 napon belül az anyag több mint 90%-a távozott a vizelettel ill. széklettel. Kis mennyiségű anyag viszont még a beadás után 7 nappal is jelen volt az állatok szervezetében, főként a zsírszövetben találtak maradványokat (Isobe és mtsai, 1990).

Mi még a kezelés után 7 nappal is tapasztaltunk elváltozásokat, a hippocampusban epileptiform populációs spike-okat mértünk (az első csúcs csökkent amplitúdójú volt, a második a kontrollnál nagyobb), és az LTP során tapasztalható amplitúdó-növekedés is szignifikánsan elmaradt a kontroll szeletekétől. Ekkor már valószínűleg nincs jelentős mennyiségű szer az állatok szervezetében, hanem az akut hatáskor fellépő változások még nem csengtek le, kompenzációs mechanizmusok is beindulhatnak.

Konklúzió – az agyszeleten végzett elektrofiziológiai mérések használhatósága a rovarirtószerek toxicitási vizsgálatában

A rovarirtószerek nagy részét idegrendszeri célpontok ellen fejlesztették ki, ezért kézenfekvő az emlősök szervezetére kifejtett esetleges káros hatásaikat idegrendszeri modell rendszeren, így túlélő agyszeleten vizsgálni. Az *ex vivo* és *in vitro* technikák egyre nagyobb szerepet kapnak a toxikológiai vizsgálatokban és a kockázatbecslésben, hiszen világszerte az állatkísérletek visszaszorítására törekszenek. A túlélő agyszelet technikával megvalósítható pl. a kísérleti állatok számának csökkentése, hiszen egy állatból több preparátum nyerhető, amelyek különböző módon kezelhetők, esetleg különböző mérések végezhetők rajtuk. Ha nem az állatokat kezeljük, hanem az agyszeleteket *in vitro*, akkor az állatokat még a kezelés okozta diszkomforttól, rosszulléttől is megkímélhetjük. Természetesen a kísérletek egy részét mindenképpen élő állatokon kell elvégezni, hiszen például a szerek felszívódását, metabolizmusát, a vér-agy gáton való átjutásukat meg kell ismerni az izolált szerveken végzett mérések előtt.

A túlélő agyszelet technikának számos előnye és ugyanakkor hátránya is van. A hátrányok közé sorolhatjuk, hogy a teljes szervezetből kiszakított alrendszerről van szó, így nagyon sok moduláló hatás nincs jelen a mérés során (hormonok, növekedési faktorok, extraszinaptikus neuromodulátorok). A folyamatos, mesterséges agyfolyadékkal történő perfúzió kimossa a szeletben termelődő, endogén modulátor anyagokat is. Emiatt, és a szeletelési folyamat miatt is, az agyszeletek ingerelhetősége, a serkentő és gátló folyamatok egyensúlya különbözik az *in vivo* szituációtól, pl. a spontán aktivitás alacsonyabb. Általában csak egy monoszinaptikus pálya vizsgálható egy szeleten belül, így az idegi hálózatok nagyon egyszerűsített modelljének tekinthető. Egyszerűsége egyben előnyei közé is tartozik: pl. egy bizonyos anyag szinapszisokra gyakorolt hatását az idegrendszer, a szervezet többi része által kifejtett „zavaró” hatások nélkül tanulmányozhatjuk. Nagy előnye az agyszelet technikának a könnyen módosítható környezet: a perfúziós oldattal vagy lokálisan bármilyen anyagot, farmakológiai modulátort juttathatunk a szeletre (Teyler, 1999). A rovarirtószerek esetében ez az anyagadagolás sok esetben problémás, hiszen általában vízben nehezen oldódó, lipofil anyagokról van szó, így a készítményekben szerves oldószerek, emulgeálószerek is lehetnek, amelyek hatását külön is meg kell vizsgálni. Viszont, mivel az élőlények ebben a formában érintkezhetnek az anyagokkal, releváns a forgalomban lévő készítmények vizsgálata a kockázatbecsléshez. A tiszta hatóanyag oldásakor pedig DMSO vagy egyéb detergens

alkalmazása szükséges. Főként az ilyen lipofil anyagok esetében a perfúziós oldatban fennálló szer-koncentráció csak nominálisnak tekinthető és nem feltétlenül egyezik meg azzal a koncentrációval, amely az agyszelet belsejében, a mérés helyén fennáll, lehet alacsonyabb az akadályozott diffúzió miatt, de előfordulhat az agyszövet nagy zsírtartalma miatti felhalmozódás is.

Mindezen szempontok figyelembe vételével az agyszeleteken végzett mezőpotenciálok mérése egy viszonylag egyszerű, gyors technika a rovarirtószerek emlősökre (így az emberre) kifejtett hatásainak vizsgálatára. Segítségével megállapítható, hogy az emlős idegszövetre gyakorolt hatás mechanizmusában, mennyiségi viszonyaiban mennyire hasonló a rovar-idegrendszeren kifejtett hatásokhoz. Az emlősök nem cél-szervezetek („non-target organism”) a rovarirtószerek szempontjából; általában minél korszerűbb szerről van szó, annál inkább szelektív a hatás a rovarokra nézve és annál kevésbé károsítja a nem célszervezeteket. Viszont a célpont-molekuláknak az állatvilágon belül fennálló evolúciós rokonság miatt a hatások soha nem lesznek teljesen elhanyagolhatóak, legfeljebb a nem-cél szervezeteknek a szer iránti érzékenysége csökkenthető. Mivel a rovarirtószereknek való kitettség nem zárható ki teljesen – balesetek bekövetkezésekor nagy dózisú expozíció történhet vagy a táplálékláncon át krónikus módon, alacsony dózisban juthatnak szervezetünkbe illetve a környezetbe ezek az anyagok –, fontos az agrokemikáliák hatásmechanizmusának minél alaposabb megismerése környezet-egészségügyi és környezetvédelmi szempontból egyaránt.

Összefoglaló

A környezetünkben alkalmazott kémiai anyagok közül az egészségre az egyik legnagyobb veszélyt a rovarirtószerek jelentik, hiszen az evolúciós rokonság miatt a rovarok számára mérgező anyagok az emberre is többé-kevésbé káros hatással vannak. Sok rovarirtószer célpontja az idegrendszerben található neurotranszmitter-receptor vagy ioncsatorna, így ezeket a szereket neurobiológiai módszerekkel tanulmányozni lehet. Dolgozatomban háromféle, (a közelmúltban vagy jelenleg is) elterjedten használt, különféle hatásmechanizmusú rovarirtószer-készítmény hatását vizsgáltam patkányból készült túlélő agyszeleteken elektrofiziológiai módszerrel, extracelluláris mezőpotenciálok elemzésével.

A Bancol® (hatóanyaga a bensultap) a neonikotinoidok közé tartozó szer, a nikotinos receptorokon fejt ki moduláló (koncentrációtól függően agonista ill. antagonista) hatást. A rovarok szervezetében nagy mennyiségben előforduló acetilkolin-receptor-típus az emlősök agyában is fontos szerepet játszik, modulálja a hálózatok aktivitási szintjét, és a tanulásban, memória-folyamatokban is nélkülözhetetlen. Az agykérgi szeletek tápfolyadékában oldott bensultap a kiváltott serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP-K) amplitúdóját növelte (agonista hatás). A tanulás szinaptikus modelljének tekintett hosszútávú szinaptikus potenciáció (LTP) hatékonysága viszont a szer hatására romlott (antagonista hatás).

A fenilpirazol családba tartozó Regent® (hatóanyaga a fipronil) az ionotróp GABA-receptorokon fejt ki antagonista hatást. A GABA a rovarok és az emlősök idegrendszerében egyaránt a legfontosabb gátló transzmitter, hatásának csökkentése a neuronhálózatok túlserkentődéséhez vezet. A perfúziós oldatban adagolt fipronil a kérgi EPSP-k amplitúdójának növekedését és serkentődésre utaló, nagyobb latenciájú komponensek megjelenését eredményezte. Az LTP hatékonyságát szintén növelte.

A piretroid típusú Sumi-Alfa® (hatóanyaga az eszfenvalerát) a feszültségfüggő Na^+-csatornák agonistája. Ezek az ioncsatornák minden ingerlékeny sejttípuson megtalálhatóak, az akciós potenciálok létrehozásáért és vezetéséért felelősek. A piretroidok a csatorna nyitvatartási idejét növelik, így túlserkentettség lép fel, többszörös kisülések jelennek meg, viszont egy bizonyos membránpotenciál-értéken túl már depolarizációs blokk következik be, megszűnnek az akciós potenciálok. Ezért az alkalmazott preparátumtól, koncentrációtól, kezelési időtől függően a hatás változó típusú, serkentő vagy gátló lehet. A háromféle koncentrációban *in vitro* adagolt eszfenvalerát a neocortex- és hippocampus-szeletek működésére egyaránt inkább

gátló hatással volt, csökkentette az EPSP-k illetve populációs spike-ok (POPS) amplitúdóját (a kisebb alkalmazott koncentrációk esetében nem szignifikáns mértékű növekedés is megfigyelhető volt). Az LTP kiválthatósága szintén csökkent a kezelt szeletek esetében (főként a legnagyobb alkalmazott koncentrációnál). *In vivo*, gyomorszondával történő eszfenvalerát-beadás esetén szintén láttunk az általános ingerlékenység csökkenésére utaló jeleket (ingerlési küszöbfeszültség növekedése, a hippocampusban a POPS amplitúdójának csökkenése), másrészt pedig epileptiform kiváltott potenciálokat is megfigyelhettünk (a neocortexben a késői komponens növekedése, hippocampusban második POPS megjelenése). Ahogyan az *in vitro* adagolásánál, ennél a kezelési módnál is megfigyelhető volt az LTP csökkent mértéke. A kérgi szeletek görcskészségét azonban a kezelés számottevően nem befolyásolta.

Összességében a patkány túlélő agyszeleten történő extracelluláris kiváltott potenciálok elemzése alkalmas arra, hogy különféle környezeti szennyező anyagoknak az alapvető szinaptikus folyamatokra gyakorolt hatását vizsgáljuk. A háromféle rovarirtószer tanulmányozásakor minden esetben kimutatható volt az emlős idegrendszerre kifejtett hatás, az eredmények a szakirodalmi adatok ismeretében értelmezhetőek voltak. A rovarirtószerek idegrendszeri hatásainak vizsgálatához ez egy viszonylag egyszerű tesztrendszer, amely a klasszikus toxikológiai vizsgálatokhoz képest kevesebb kísérleti állatot igényel.

Summary

Among the many chemical substances present in our environment, one of the greatest risk factors for human health is insecticides; chemicals that are toxic to insects may have harmful effects for humans due to their evolutionary relationship in the animal kingdom. The molecular targets of several insecticides are neurotransmitter receptors or ion channels present in the nervous system, this fact allows studying their effects with neurobiological methods. In my thesis, I examine the effects of three insecticides with different mechanisms of action, which are widely used now or were being used recently. The study was carried out on surviving rat brain slices with electrophysiological methods, by recording and analyzing extracellular field potentials.

Bancol® (active ingredient: bensultap) belongs to the neonicotinoid group, it modulates nicotinic acetyl-choline receptors, acting as their agonist or antagonist depending on concentration. This type of receptor is very abundant in the nervous system of insects and it plays an important role in the mammalian brain also, by modulating the activity level of neuronal networks, and it is also indispensable in learning and memory processes. When dissolved in the perfusion solution of neocortical slices, bensultap increased the amplitude of evoked excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) (agonistic effect). In contrast, the efficacy of long-term synaptic potentiation (LTP), which is considered as the synaptic model of learning, decreased due to treatment (antagonistic effect).

The phenylpyrazole Regent® (active ingredient: fipronil) is an antagonist of ionotropic GABA-receptors. GABA is the most important inhibitory neurotransmitter in both insect and mammalian nervous system; the inhibition of GABAergic transmission leads to overexcitation of neuronal networks. Dissolution of fipronil in the perfusion solution of the slices resulted in the increase in amplitude of cortical EPSPs and in the occurrence of late components, which indicate an increase in excitability. The efficacy of LTP was also increased.

The pyrethroid type insecticide Sumi-Alfa® (active ingredient: esfenvalerate) is an agonist of voltage-gated Na^+ channels. These ion channels are present on all excitable cell types, they are responsible for the generation and propagation of action potentials. Pyrethroids prolong the opening time of the channels, thus leading to overexcitation and repetitive firing, but beyond a critical membrane potential value depolarization block occurs, action potentials

disappear. For this reason, the effect of pyrethroids may be different, excitatory or inhibitory, depending on the applied preparation, on concentration and treatment time. Esfenvalerate applied *in vitro* at three different concentrations had rather inhibitory effects on the functions of neocortical and hippocampal slices: it decreased the amplitude of EPSPs and population spikes (POPS); in case of the lower concentrations, non-significant increases could also be observed. Also the efficacy of LTP-induction was reduced in treated slices, mostly in case of the largest applied concentration. *In vivo*, intragastric esfenvalerate treatment resulted in signs indicating the decrease of general excitability (increase of voltage threshold, decrease of POPS amplitude in hippocampus), on the other hand, also epileptiform evoked potentials occurred (increase of late component in neocortex, appearance of a second POPS in hippocampus). Similarly to the experiments using *in vitro* treatment, this treatment also reduced the extent of LTP. However, seizure susceptibility of neocortical slices was not significantly influenced.

To summarize, the analysis of extracellular evoked potentials on rat surviving brain slices is a suitable method to examine the effects of different environmental pollutants on basic synaptic processes. Concerning the study with the three insecticides, mammalian nervous system effects were evidenced in all cases and the interpretation of results was possible on the basis of the scientific literature. This is a relatively simple test system suitable to examine nervous system effects of insecticides, requiring less experimental animals than classical toxicological methods.

Irodalomjegyzék

1. Abbes, S., Louvel, J., Lamarche, M. & Pumain, R. (1991) Laminar analysis of the origin of the various components of evoked potentials in slices of rat sensorimotor cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, **80**, 310-320.

2. Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Mike, A., Eisenberg, H.M., Maelicke, A. & Alkondon, M. (2000) Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. *Behav Brain Res*, **113**, 131-141.

3. Alkondon, M., Pereira, E.F. & Albuquerque, E.X. (1998) alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res*, **810**, 257-263.

4. Ameri, A., Shi, Q., Aschoff, J. & Peters, T. (1996) Electrophysiological effects of aconitine in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, **35**, 13-22.

5. Andersen, P., Bliss, T.V. & Skrede, K.K. (1971) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*, **13**, 208-221.

6. Anderson, P.A. & Greenberg, R.M. (2001) Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **129**, 17-28.

7. Arias, H.R. (1997) Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev*, **25**, 133-191.

8. Balser, J.R., Nuss, H.B., Orias, D.W., Johns, D.C., Marban, E., Tomaselli, G.F. & Lawrence, J.H. (1996) Local anesthetics as effectors of allosteric gating. Lidocaine effects on inactivation-deficient rat skeletal muscle Na channels. *J Clin Invest*, **98**, 2874-2886.

9. Bannister, A.P. (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res*, **53**, 95-103.

10. Benardo, L.S. & Wong, R.K.S. (1995) Inhibition in the Cortical Network. In Gutnick, M.J., Mody, I. (eds) *The Cortical Neuron*. Oxford University Press, New York, pp. 141-155.

11. Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O. & Gaiarsa, J.L. (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci*, **20**, 523-529.

12. Bennett, P.B., Yazawa, K., Makita, N. & George, A.L., Jr. (1995) Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature*, **376**, 683-685.

13. Beugnet, F. (2004) External antiparasitic drugs for dogs and cats. *EMC-Vétérinaire* **1**, 138-153.

14. Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-39.

15. Bloomquist, J.R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol*, **41**, 163-190.

16. Bordás, I. (2006) Veszélyes anyagok, készítmények - Peszticidek. *Az Országos Kémiai Biztonsági Intézet kiadványa*.

17. Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 16-19.

18. Breer, H. & Sattelle, D.B. (1987) Molecular-Properties and Functions of Insect Acetylcholine-Receptors. *J Insect Physiol*, **33**, 771-790.

19. Bruel-Jungerman, E., Lucassen, P.J. & Francis, F. (2011) Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res*, **221**, 379-388.

20. Bura, L. (2007) Növényegészségügy - Növényvédő szerek forgalomba hozatala. *A Földművelési és Vidékfejlesztési Minisztérium Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézetének kiadványa*.

21. Burr, S.A. & Ray, D.E. (2004) Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol Sci*, **77**, 341-346.

22. Cannon, S.C. (1996) Ion-channel defects and aberrant excitability in myotonia and periodic paralysis. *Trends Neurosci*, **19**, 3-10.

23. Cao, Z., Shafer, T.J. & Murray, T.F. (2011) Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx in neocortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **336**, 197-205.

24. Casida, J.E. (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*, **34**, 189-202.

25. Casida, J.E. & Quistad, G.B. (1998) Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol*, **43**, 1-16.

26. Castro-Alamancos, M.A. & Connors, B.W. (1996) Short-term synaptic enhancement and long-term potentiation in neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1335-1339.

27. Castro-Alamancos, M.A. & Connors, B.W. (1997) Distinct forms of short-term plasticity at excitatory synapses of hippocampus and neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4161-4166.

28. Catterall, W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **26**, 13-25.

29. Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K. & Scheuer, T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, **49**, 124-141.

30. Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron*, **21**, 919-931.

31. Chagnac-Amitai, Y. & Connors, B.W. (1989) Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol*, **61**, 747-758.

32. Changeux, J.P., Bertrand, D., Corringer, P.J., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C., Le Novere, N., Marubio, L., Picciotto, M. & Zoli, M. (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**, 198-216.

33. Chaton, P.F., Ravanel, P., Meyran, J.C. & Tissut, M. (2001) The Toxicological Effects and Bioaccumulation of Fipronil in Larvae of the Mosquito Aedes aegypti in Aqueous Medium. *Pestic Biochem Physiol*, **69**, 183-188.

34. Chessell, I.P. & Humphrey, P.P. (1995) Nicotinic and muscarinic receptor-evoked depolarizations recorded from a novel cortical brain slice preparation. *Neuropharmacology*, **34**, 1289-1296.

35. Chetkovich, D.M., Gray, R., Johnston, D. & Sweatt, J.D. (1991) N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca2+ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6467-6471.

36. Chinn, K. & Narahashi, T. (1986) Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *J Physiol*, **380**, 191-207.

37. Chodorowski, Z. & Anand, J.S. (2004) Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil--a case report. *J Toxicol Clin Toxicol*, **42**, 189-190.

38. Choi, J.S. & Soderlund, D.M. (2006) Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Na v 1.8 sodium channels expressed in Xenopus oocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, **211**, 233-244.

39. Chu, Z.G., Zhou, F.M. & Hablitz, J.J. (2000) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Brain Res*, **887**, 399-405.

40. Civelek, H.S. & Weintraub, P.G. (2003) Effects of bensultap on larval serpentine leafminers, Liriomyza tirfolii (Burgess) (Diptera : Agromyzidae), in tomatoes. *Crop Prot*, **22**, 479-483.

41. Cleland, T.A. (1996) Inhibitory glutamate receptor channels. *Mol Neurobiol*, **13**, 97-136.

42. Clementi, F., Fornasari, D. & Gotti, C. (2000) Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol*, **393**, 3-10.

43. Cole, L.M., Nicholson, R.A. & Casida, J.A. (1993) Action of Phenylpyrazole Insecticides at the GABA-Gated Chloride Channel *Pestic Biochem Physiol*, **46**, 47-54.

44. Dani, J.A. (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, **49**, 166-174.

45. Dani, J.A. & Bertrand, D. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 699-729.

46. Das, P.C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E. & Rose, R.L. (2006) Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem Biol Interact*, **164**, 200-214.

47. De Souza Spinosa, H., Silva, Y.M., Nicolau, A.A., Bernardi, M.M. & Lucisano, A. (1999) Possible anxiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats. *Physiol Behav*, **67**, 611-615.

48. Dóczi, J., Világi, I., Banczerowski-Pelyhe, I., Örsi, F. & Szentpétery, Z. (1999) In-vitro study on the effect of pesticides on neuronal activity. *Pesticide Science*, **55**, 1037-1040.

49. Douglas, R. & Martin, K. (1998) Neocortex. In Shepherd, G.M. (ed) *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, New York, pp. 459-509.

50. Durham, E.W., Scharf, M.E. & Siegfried, B.D. (2001) Toxicity and Neurophysiological Effects of Fipronil and Its Oxidative Sulfone Metabolite on European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Crambidae). *Pestic Biochem Physiol*, **71**, 97-106.

51. Eisler, R.M. (1992) Fenvalerate Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review *Contaminant Hazard Reviews*, pp. 1-47.

52. El Hassani, A.K., Dacher, M., Gauthier, M. & Armengaud, C. (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (Apis mellifera). *Pharmacol Biochem Behav*, **82**, 30-39.

53. Eldefrawi, A.T., Bakry, N.M., Eldefrawi, M.E., Tsai, M.C. & Albuquerque, E.X. (1980) Nereistoxin interaction with the acetylcholine receptor-ionic channel complex. *Mol Pharmacol*, **17**, 172-179.

54. Farnham, A.W., Murray, A.W.A., Sawicki, R.M., Denholm, I. & White, J.C. (1987) Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super-kdr to pyrethroids in the housefly (Musca domestica L.). *Pesticide Science*, **19**, 209-220.

55. Faust, R.A. (1994) Toxicity summary for xylene. *Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. US. Department of Energy* [Contract No. DE-AC05-84OR21400]

56. Feng, G., Deak, P., Chopra, M. & Hall, L.M. (1995) Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances Drosophila para sodium channel function. *Cell*, **82**, 1001-1011.

57. Fujii, S., Jia, Y., Yang, A. & Sumikawa, K. (2000) Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain Res*, **863**, 259-265.

58. Fung, H.T., Chan, K.K., Ching, W.M. & Kam, C.W. (2003) A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *J Toxicol Clin Toxicol*, **41**, 245-248.

59. Gao, B., Liu, Z. & Liu, X. (2009) Effect of Fenvalerate on the Activity of Acetylcholinesterase and Learning and Memory Function in Mouse Brain Tissue. 《*Occupation and Health*》 **19**, DOI: CNKI:SUN:ZYJK.0.2009-2019-2005.

60. Ge, Y., Liu, Y. & Bo, C. (2011) Study on Subchronic Toxicity of Bensultap to Rats. *Practical Preventive Medicine*, DOI: CNKI:SUN:SYYY.0.2011-2001-2060.

61. Gilbert, M.E., Mack, C.M. & Crofton, K.M. (1989) Pyrethroids and enhanced inhibition in the hippocampus of the rat. *Brain Res*, **477**, 314-321.

62. Goldin, A.L. (1999) Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 38-50.

63. Gotti, C., Fornasari, D. & Clementi, F. (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol*, **53**, 199-237.

64. Gu, Q. (2002) Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*, **111**, 815-835.

65. Gyori, J., Varro, P., Zielinska, E., Banczerowski-Pelyhe, I. & Vilagi, I. (2007) Bensultap decreases neuronal excitability in molluscan and mammalian central nervous system. *Toxicol in Vitro*, **21**, 1050-1057.

66. Hainzl, D., Cole, L.M. & Casida, J.E. (1998) Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem Res Toxicol*, **11**, 1529-1535.

67. Hass, U., Lund, S.P. & Simonsen, L. (1997) Long-lasting neurobehavioral effects of prenatal exposure to xylene in rats. *Neurotoxicology*, **18**, 547-551.

68. Heinemann, U., Kann, O. & Schuchmann, S. (2006) An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices. In Pitkanen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshe, S.L. (eds) *Models of Seizures and Epilepsy*. Academic Press, New York, pp. 35-44.

69. Hille, B. (1975) The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophys J*, **15**, 615-619.

70. Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, **117**, 500-544.

71. Hosie, A.M., Aronstein, K., Sattelle, D.B. & ffrench-Constant, R.H. (1997) Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci*, **20**, 578-583.

72. Hossain, M.M., Suzuki, T., Unno, T., Komori, S. & Kobayashi, H. (2008) Differential presynaptic actions of pyrethroid insecticides on glutamatergic and GABAergic neurons in the hippocampus. *Toxicology*, **243**, 155-163.

73. Hunter, B.E., Defiebre, C.M., Papke, R.L., Kem, W.R. & Meyer, E.M. (1994) A Novel Nicotinic Agonist Facilitates Induction of Long-Term Potentiation in the Rat Hippocampus. *Neuroscience Letters*, **168**, 130-134.

74. Hut, R.A. & Van der Zee, E.A. (2011) The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behav Brain Res*, **221**, 466-480.

75. Ikeda, T., Zhao, X., Kono, Y., Yeh, J.Z. & Narahashi, T. (2003) Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. *Neurotoxicology*, **24**, 807-815.

76. Isaac, J.T., Oliet, S.H., Hjelmstad, G.O., Nicoll, R.A. & Malenka, R.C. (1996) Expression mechanisms of long-term potentiation in the hippocampus. *J Physiol Paris*, **90**, 299-303.

77. Isobe, N., Kaneko, H., Shiba, K., Saito, K., Ito, S., Kakuta, N., Saito, A., Yoshitake, A. & Miyamoto, J. (1990) Metabolism of Esfenvalerate in Rats and Mice and Effects of Its Isomers on Metabolic Fates of Esfenvalerate. *J Pestic Sci*, **15**, 159-168.

78. Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L. & Catterall, W.A. (1992) Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science*, **256**, 839-842.

79. Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1995) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, **83**, 433-442.

80. Itier, V. & Bertrand, D. (2001) Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett*, **504**, 118-125.

81. Johnston, D. & Amaral, D.G. (1998) Hippocampus. In Shepherd, G.M. (ed) *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, New York, pp. 417-458.

82. Johnston, G.A. (1996) GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, **69**, 173-198.

83. Jones, E.G. (1995) Overview: Basic Elements of the Cortical Network. In Gutnick, M.J., Mody, I. (eds) *The Cortical Neuron*. Oxford University Press, New York, pp. 111-122.

84. Kauer, J.A. & Malenka, R.C. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 844-858.

85. Kerr, D.I. & Ong, J. (1995) GABAB receptors. *Pharmacol Ther*, **67**, 187-246.

86. Kumar, A. (2011) Long-Term Potentiation at CA3-CA1 Hippocampal Synapses with Special Emphasis on Aging, Disease, and Stress. *Front Aging Neurosci*, **3**, 7.

87. Langdon, R.B. & Sur, M. (1990) Components of field potentials evoked by white matter stimulation in isolated slices of primary visual cortex: spatial distributions and synaptic order. *J Neurophysiol*, **64**, 1484-1501.

88. Lawrence, L.J. & Casida, J.E. (1982) Pyrethroid toxicology: Mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pestic Biochem Physiol*, **18**, 9-14.

89. Le Corronc, H., Alix, P. & Hue, B. (2002) Differential sensitivity of two insect GABA-gated chloride channels to dieldrin, fipronil and picrotoxinin. *J Insect Physiol*, **48**, 419-431.

90. Lee, D., Park, Y., Brown, T.M. & Adams, M.E. (1999) Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol*, **55**, 584-593.

91. Lee, H.K. & Kirkwood, A. (2011) AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Semin Cell Dev Biol*, **22**, 514-520.

92. Lee, S.H., Dunn, J.B., Marshall, C.J. & Soderlund, D.M. (1999) Molecular Analysis of kdr-like Resistance in a Permethrin-Resistant Strain of Colorado Potato Beetle *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **63**, 63-75.

93. Lee, S.J., Caboni, P., Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2004) Cartap hydrolysis relative to its action at the insect nicotinic channel. *J Agric Food Chem*, **52**, 95-98.

94. Lee, S.J., Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2003) Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel. *J Agr Food Chem*, **51**, 2646-2652.

95. Leghait, J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P.L. & Viguie, C. (2009) Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*, **255**, 38-44.

96. Liao, J.W., Kang, J.J., Liu, S.H., Jeng, C.R., Cheng, Y.W., Hu, C.M., Tsai, S.F., Wang, S.C. & Pang, V.F. (2000) Effects of cartap on isolated mouse phrenic nerve diaphragm and its related mechanism. *Toxicol Sci*, **55**, 453-459.

97. Liao, J.W., Pang, V.F., Jeng, C.R., Chang, S.K., Hwang, J.S. & Wang, S.C. (2003) Susceptibility to cartap-induced lethal effect and diaphragmatic injury via ocular exposure in rabbits. *Toxicology*, **192**, 139-148.

98. Liu, Z., Williamson, M.S., Lansdell, S.J., Han, Z., Denholm, I. & Millar, N.S. (2006) A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *J Neurochem*, **99**, 1273-1281.

99. López, O., Fernandez-Bolanos, J.G. & Gil, M.V. (2005) New trends in pest control: the search for greener insecticides. *Green Chemistry*, **7**, 431-442.

100. Lopez, R., Held, D.W. & Potter, D.A. (2000) Management of a mound-building ant, Lasius neoniger Emery, on golf putting greens and tees using delayed-action baits or fipronil. *Crop Sci*, **40**, 511-517.

101. Loughney, K., Kreber, R. & Ganetzky, B. (1989) Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in Drosophila. *Cell*, **58**, 1143-1154.

102. Lubke, J. & Feldmeyer, D. (2007) Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct*, **212**, 3-17.

103. Lujan, R., Shigemoto, R. & Lopez-Bendito, G. (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, **130**, 567-580.

104. Ma, Y., Chen, L., Lu, X., Chu, H., Xu, C. & Liu, W. (2009) Enantioselectivity in aquatic toxicity of synthetic pyrethroid insecticide fenvalerate. *Ecotoxicol Environ Saf*, **72**, 1913-1918.

105. Maksay, G., Thompson, S.A. & Wafford, K.A. (2003) The pharmacology of spontaneously open alpha 1 beta 3 epsilon GABA A receptor-ionophores. *Neuropharmacology*, **44**, 994-1002.

106. Malenka, R.C. (1995) Synaptic Plasticity in Hippocampus and Neocortex: A Comparison. In Gutnick, M.J.M., I. (ed) *The Cortical Neuron*. Oxford University Press, New York, pp. 98-108.

107. Malenka, R.C. & Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, **44**, 5-21.

108. Marban, E., Yamagishi, T. & Tomaselli, G.F. (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol*, **508 (Pt 3)**, 647-657.

109. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. & Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. *Insect Mol Biol*, **7**, 179-184.

110. Martinez-Torres, D., Chevillon, C., BrunBarale, A., Berge, J.B., Pasteur, N. & Pauron, D. (1999a) Voltage-dependent Na+ channels in pyrethroid-resistant Culex pipiens L mosquitoes. *Pesticide Science*, **55**, 1012-1020.

111. Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L. & Williamson, M.S. (1999b) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol*, **8**, 339-346.

112. Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M. & Sattelle, D.B. (2001) Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 573-580.

113. McCormick, D.A. (1989) GABA as an Inhibitory Neurotransmitter in Human Cerebral Cortex *J Neurophysiol*, **62**, 1018-1027.

114. McGehee, D.S. & Role, L.W. (1996) Presynaptic ionotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 342-349.

115. Meacham, C.A., Brodfuehrer, P.D., Watkins, J.A. & Shafer, T.J. (2008) Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to alpha-cyano containing pyrethroids. *Toxicol Appl Pharmacol*, **231**, 273-281.

116. Meyer, D.A., Carter, J.M., Johnstone, A.F. & Shafer, T.J. (2008) Pyrethroid modulation of spontaneous neuronal excitability and neurotransmission in hippocampal neurons in culture. *Neurotoxicology*, **29**, 213-225.

117. Millar, N.S. & Denholm, I. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci*, **7**, 53-66.

118. Mize, S.V., Porter, S.D. & Demcheck, D.K. (2008) Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. *Environ Pollut*, **152**, 491-503.

119. Mody, I. & Pearce, R.A. (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci*, **27**, 569-575.

120. Mohler, H. (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*, **326**, 505-516.

121. Moniz, A.C., Bernardi, M.M. & Spinosa, H.S. (1994) Effects of a pyrethroid type II pesticide on conditioned behaviors of rats. *Vet Hum Toxicol*, **36**, 120-124.

122. Mulle, C., Lena, C. & Changeux, J.P. (1992) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*, **8**, 937-945.

123. Nagata, K., Iwanaga, Y., Shono, T. & Narahashi, T. (1997) Modulation of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Channel by Imidacloprid and Cartap. *Pestic Biochem Physiol*, **59**, 119-128.

124. Narahashi, T. (2000) Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future. *J Pharmacol Exp Ther*, **294**, 1-26.

125. Narahashi, T., Carter, D.B., Frey, J., Ginsburg, K., Hamilton, B.J., Nagata, K., Roy, M.L., Song, J.H. & Tatebayashi, H. (1995) Sodium channels and GABAA receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicol Lett*, **82-83**, 239-245.

126. Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L. & Yeh, J.Z. (2010) Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic Biochem Physiol*, **97**, 149-152.

127. Nauen, R. & Denholm, I. (2005) Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol*, **58**, 200-215.

128. Otoom, S., Tian, L.M. & Alkadhi, K.A. (1998) Veratridine-treated brain slices: a cellular model for epileptiform activity. *Brain Res*, **789**, 150-156.

129. Parker, C.M., Albert, J.R., Vangelder, G.A., Patterson, D.R. & Taylor, J.L. (1985) Neuropharmacologic and Neuropathologic Effect of Fenvalerate in Mice and Rats. *Fund Appl Toxicol*, **5**, 278-286.

130. Pollmeier, M., Pengo, G., Jeannin, P. & Soll, M. (2002) Evaluation of the efficacy of fipronil formulations in the treatment and control of biting lice, Trichodectes canis (De Geer, 1778) on dogs. *Vet Parasitol*, **107**, 127-136.

131. Ratra, G.S. & Casida, J.E. (2001) GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett*, **122**, 215-222.

132. Ratra, G.S., Kamita, S.G. & Casida, J.E. (2001) Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, **172**, 233-240.

133. Ray, D.E. & Fry, J.R. (2006) A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol Ther*, **111**, 174-193.

134. Raymond Delpech, V., Ihara, M., Coddou, C., Matsuda, K. & Sattelle, D.B. (2003) Action of nereistoxin on recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. *Invert Neurosci*, **5**, 29-35.

135. Rekling, J.C. & Theophilidis, G. (1995) Effects of the pyrethroid insecticide, deltamethrin, on respiratory modulated hypoglossal motoneurons in a brain stem slice from newborn mice. *Neurosci Lett*, **198**, 189-192.

136. Represa, A. & Ben-Ari, Y. (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci*, **28**, 278-283.

137. Roberts, D.R., Laughlin, L.L., Hsheih, P. & Legters, L.J. (1997) DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerg Infect Dis*, **3**, 295-302.

138. Rousseau, S.J., Jones, I.W., Pullar, I.A. & Wonnacott, S. (2005) Presynaptic alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate [3H]d-aspartate release from rat frontal cortex in vitro. *Neuropharmacology*, **49**, 59-72.

139. Santos, M.D., Alkondon, M., Pereira, E.F., Aracava, Y., Eisenberg, H.M., Maelicke, A. & Albuquerque, E.X. (2002) The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol Pharmacol*, **61**, 1222-1234.

140. Sarter, M. & Bruno, J.P. (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience*, **95**, 933-952.

141. Sattelle, D.B., Harrow, I.D., David, J.A., Pelhate, M., Callec, J.J., Gepner, J.I. & Hall, L.M. (1985) Nereistoxin - Actions on a Cns Acetylcholine-Receptor Ion Channel in the Cockroach Periplaneta-Americana. *J Exp Biol*, **118**, 37-52.

142. Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R. & Williamson, M.S. (1998) Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, Plutella xylostella (L.). *Pestic Biochem Physiol*, **59**, 169-182.

143. Scott, J.G. & Wen, Z.M. (1997) Toxicity of fipronil to susceptible and resistant strains of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and house flies (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol*, **90**, 1152-1156.

144. Shafer, T.J., Rijal, S.O. & Gross, G.W. (2008) Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *Neurotoxicology*, **29**, 203-212.

145. Sirisoma, N.S., Ratra, G.S., Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2001) Fipronil-based photoaffinity probe for Drosophila and human beta 3 GABA receptors. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 2979-2981.

146. Smith, T.J. & Soderlund, D.M. (1998) Action of the pyrethroid insecticide cypermethrin on rat brain IIa sodium channels expressed in xenopus oocytes. *Neurotoxicology*, **19**, 823-832.

147. Soderlund, D.M. (2010) State-Dependent Modification of Voltage-Gated Sodium Channels by Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol*, **97**, 78-86.

148. Soderlund, D.M. (2012) Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol*, **86**, 165-181.

149. Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R. & Buhl, E.H. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**, 113-135.

150. Song, J.H., Nagata, K., Tatebayashi, H. & Narahashi, T. (1996) Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, **708**, 29-37.

151. Song, J.H. & Narahashi, T. (1996) Differential effects of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant single sodium channels. *Brain Res*, **712**, 258-264.

152. Srinivasan, J., Schachner, M. & Catterall, W.A. (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15753-15757.

153. Stephenson, F.A. (1995) The GABAA receptors. *Biochem J*, **310 (Pt 1)**, 1-9.

154. Symington, S.B., Frisbie, R.K. & Clark, J.M. (2008) Characterization of 11 commercial pyrethroids on the functional attributes of rat brain synaptosomes. *Pestic Biochem Physiol*, **92**, 61-69.

155. Százados, I. (2005) A maradékanyagokról. *A Baromfi (szaklap)*.

156. Szegedi, V., Bardos, G., Detari, L., Toth, A., Banczerowski-Pelyhe, I. & Vilagi, I. (2005) Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology*, **214**, 67-76.

157. Tabarean, I.V. & Narahashi, T. (1998) Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the type II pyrethroid deltamethrin. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**, 958-965.

158. Tang, J., Amin Usmani, K., Hodgson, E. & Rose, R.L. (2004) In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem Biol Interact*, **147**, 319-329.

159. Tatebayashi, H. & Narahashi, T. (1994) Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, **270**, 595-603.

160. Tercariol, P.R.G. & Godinho, A.F. (2011) Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. *Pestic Biochem Physiol*, **99**, 221-225.

161. Teyler, T.J. (1999) Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. *Methods*, **18**, 109-116.

162. Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B. & Lapied, B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 14-22.

163. Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S. & King, W.J. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol*, **176**, 1-66.

164. Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol*, **48**, 339-364.

165. Trainer, V.L., McPhee, J.C., Boutelet-Bochan, H., Baker, C., Scheuer, T., Babin, D., Demoute, J.P., Guedin, D. & Catterall, W.A. (1997) High affinity binding of pyrethroids to the alpha subunit of brain sodium channels. *Mol Pharmacol*, **51**, 651-657.

166. Traub, R.D., Colling, S.B. & Jefferys, J.G. (1995) Cellular mechanisms of 4-aminopyridine-induced synchronized after-discharges in the rat hippocampal slice. *J Physiol*, **489 (Pt 1)**, 127-140.

167. Trimmer, B.A. (1995) Current excitement from insect muscarinic receptors. *Trends Neurosci*, **18**, 104-111.

168. Vais, H., Williamson, M.S., Devonshire, A.L. & Usherwood, P.N. (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Manag Sci*, **57**, 877-888.

169. Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W., Usherwood, P.N. & Cohen, C.J. (2000) Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J Gen Physiol*, **115**, 305-318.

170. Vais, H., Williamson, M.S., Hick, C.A., Eldursi, N., Devonshire, A.L. & Usherwood, P.N. (1997) Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett*, **413**, 327-332.

171. Valenzuela, V. & Benardo, L.S. (1995) An in-Vitro Model of Persistent Epileptiform Activity in Neocortex. *Epilepsy Res*, **21**, 195-204.

172. Várnagy, L. (1997) A toxikológia hazai és nemzetközi szabványrendszere. In Kiss, I. (ed) *Toxikológia*. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, pp. 161-183.

173. Varro, P., Gyori, J. & Vilagi, I. (2009) In vitro effects of fipronil on neuronal excitability in mammalian and molluscan nervous systems. *Ann Agric Environ Med*, **16**, 71-77.

174. Vijverberg, H.P.M. & van den Bercken, J. (1990) Neurotoxicological Effects and the Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. *Critical Reviews in Toxicology*, **21**, 105-126.

175. von Engelhardt, J., Eliava, M., Meyer, A.H., Rozov, A. & Monyer, H. (2007) Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci*, **27**, 5633-5642.

176. Walcott, E.C. & Langdon, R.B. (2002) Synaptically driven spikes and long-term potentiation in neocortical layer 2/3. *Neuroscience*, **112**, 815-826.

177. Walker, R.J., Brooks, H.L. & Holden-Dye, L. (1996) Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology*, **113 Suppl**, S3-33.

178. Wallace, R.H., Wang, D.W., Singh, R., Scheffer, I.E., George, A.L., Jr., Phillips, H.A., Saar, K., Reis, A., Johnson, E.W., Sutherland, G.R., Berkovic, S.F. & Mulley, J.C. (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na+-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*, **19**, 366-370.

179. Wang, J.H. & Kelly, P.T. (1997) Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol*, **78**, 2707-2716.

180. Wang, X.L., Jin, X.P., Fu, H., Chen, Z.Q., Da, C.D., Huang, X.F. & Ding, B.Q. (1999) Xylene-induced effects on brain neurotransmitters, behavior and fos protein in rats. *Biomed Environ Sci*, **12**, 116-124.

181. Warmke, J.W., Reenan, R.A., Wang, P., Qian, S., Arena, J.P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G.J., Van der Ploeg, L.H., Ganetzky, B. & Cohen, C.J. (1997) Functional expression of Drosophila para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J Gen Physiol*, **110**, 119-133.

182. Weiner, M.L., Nemec, M., Sheets, L., Sargent, D. & Breckenridge, C. (2009) Comparative functional observational battery study of twelve commercial pyrethroid insecticides in male rats following acute oral exposure. *Neurotoxicology*, **30 Suppl 1**, S1-16.

183. Wheal, H.V., Bernard, C., Chad, J.E. & Cannon, R.C. (1998) Pro-epileptic changes in synaptic function can be accompanied by pro-epileptic changes in neuronal excitability. *Trends Neurosci*, **21**, 167-174.

184. Williamson, E.G., Long, S.F., Kallman, M.J. & Wilson, M.C. (1989) A comparative analysis of the acute toxicity of technical-grade pyrethroid insecticides and their commercial formulations. *Ecotoxicol Environ Saf*, **18**, 27-34.

185. Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. & Devonshire, A.L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet*, **252**, 51-60.

186. Wilson, R.I. & Laurent, G. (2005) Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the Drosophila antennal lobe. *J Neurosci*, **25**, 9069-9079.

187. Wirth, E.F., Pennington, P.L., Lawton, J.C., DeLorenzo, M.E., Bearden, D., Shaddrix, B., Sivertsen, S. & Fulton, M.H. (2004) The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. *Environ Pollut*, **131**, 365-371.

188. Wolansky, M.J., Gennings, C. & Crofton, K.M. (2006) Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicol Sci*, **89**, 271-277.

189. Wolansky, M.J. & Harrill, J.A. (2008) Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. *Neurotoxicol Teratol*, **30**, 55-78.

190. Wonnacott, S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci*, **20**, 92-98.

191. Xu-Friedman, M.A. & Regehr, W.G. (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev*, **84**, 69-85.

192. Yu, F.H. & Catterall, W.A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*, **4**, 207.

193. Zhang, Y., Wang, Q., Wang, Z., Zhang, Q. & Zhang, Y. (2008) Neurobehavior and learning and memory of mice after postnatal exposure to fenvalerate. 《*Journal of Toxicology*》, **2**, DOI: CNKI:SUN:WSDL.0.2008-2002-2005.

194. Zhao, X., Salgado, V.L., Yeh, J.Z. & Narahashi, T. (2003) Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 914-924.

195. Zhao, Y., Park, Y. & Adams, M.E. (2000) Functional and evolutionary consequences of pyrethroid resistance mutations in S6 transmembrane segments of a voltage-gated sodium channel. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 516-521.

196. Zlotkin, E. (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol*, **44**, 429-455.

197. Zucker, R.S. & Regehr, W.G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, **64**, 355-405.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Világi Ildikónak szeretnék köszönetet mondani a munkám sok éve tartó szakmai irányításáért, a konzultációkért, a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségért és nem utolsósorban a laborban uralkodó kellemes légkör megteremtéséért.

Köszönettel tartozom még az ELTE TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék minden munkatársának, különösen Dr. Borbély Sándor tanársegédnek, valamint Szabó Eszter és Czégé Dávid PhD hallgatóknak, akik megosztották velem a laboratóriumban töltött hétköznapokat.

Köszönöm Sándor Zoltánné (Kati) és Pataj Dávid asszisztenseknek a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Banczerowski-Pelyhe Ilonának a kézirat gondos átnézését és a hasznos észrevételeket, megjegyzéseket.

Végül köszönöm családom és barátaim biztatását és támogatását!