



**MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM**

**FELSZÍNIVÍZ-SZENNYEZŐK KIMUTATÁSA ÉS VIZSGÁLATAI  
IMMUNANALITIKAI ÉS BIOKÉMIAI MÓDSZEREKKEL**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**GÉMES BORBÁLA LETÍCIA**

**GÖDÖLLŐ**

**2024**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudományok

**Vezetője:** Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika  
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet

**Témavezető:** Prof. Dr. Székács András  
egyetemi tanár, az MTA doktora  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b> .....	<b>6</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>10</b>
2.1. <i>Növényvédőszer-maradékok a környezetben</i> .....	10
2.1.1. A glyphosate gyomirtószer-hatóanyag jellemzése .....	14
2.2. <i>Mikotoxinok a környezetben</i> .....	18
2.2.1. A zearalenon (ZON) mikotoxin jellemzése .....	20
2.3. <i>Analitikai módszerek mezőgazdasági szerves mikroszennyezők meghatározására</i> .....	23
2.3.1. Műszeres analitikai módszerek zearalenon (ZON) és glyphosate meghatározására .....	25
2.3.2. Immunanalitikai módszerek.....	26
2.3.3. A klasszikus enzimjelzéses immunszorbens vizsgálatok típusai.....	31
2.3.4. Immunanalitikai módszerek zearalenon (ZON) és glyphosate mennyiségi meghatározására .....	33
2.4. <i>Az integrinek jellemzése</i> .....	33
2.4.1. RGD-specifikus integrinek .....	36
2.4.2. RGD-receptorhoz kötődő humán patogének .....	37
2.4.3. RGD-kötőhelyhez kapcsolódó xenobiotikumok.....	38
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>39</b>
3.1. <i>A vizsgálatokhoz használt anyagok és minták származása</i> .....	39
3.1.1. A zearalenon (ZON) jelöléses immunanalitikai vizsgálataihoz használt anyagok és minták származása .....	39
3.1.2. A glyphosate jelöléses immunanalitikai vizsgálataihoz használt anyagok és minták származása .....	39
3.1.3. Az integringátlási vizsgálatokhoz használt anyagok és minták származása.....	40
3.2. <i>A zearalenon (ZON) és glyphosate enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay vizsgálatainak fluoreszcens detektálásához alkalmazott műszerprototípus leírása</i> .....	42
3.3. <i>A fejlesztett vizsgálati módszerek jellemzésére alkalmazott Rodbard-egyenlet</i> .....	44
3.4. <i>A zearalenon (ZON) önálló fluoreszcenciájának mérése</i> .....	46
3.5. <i>A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay</i> .....	46
3.5.1. A zearalenon (ZON) elleni szérumok előállítására végzett immunizálás és a szérumok titrálása.....	47
3.5.2. A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay folyamata .....	47
3.6. <i>Zearalenontartalom meghatározása nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel</i> .....	49
3.7. <i>Zearalenontartalom meghatározása teljes belső visszaverődéses ellipszometria (TIRE) módszerrel</i> .....	49
3.8. <i>A glyphosate-tartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay</i> .....	50
3.8.1. Hapténszintézis és konjugáció .....	50

3.8.2. A glyphosate-tartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay folyamata .....	51
3.9. A receptorgátlás vizsgálatához módosított enzimjelzéses immunszorbens vizsgálat folyamata .....	52
3.10. Az elvégzett vizsgálatok statisztikai értékelése.....	54
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....</b>	<b>55</b>
4.1. Zearalenonmeghatározási vizsgálatok.....	55
4.1.1. Zearalenon (ZON) meghatározása autofluoreszcencia mérésével.....	55
4.1.2. A zearalenon (ZON) elleni szérum titrálási és gátlási vizsgálata .....	56
4.1.3. Zearalenon (ZON) meghatározása abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával.....	58
4.1.4. A fényintenzitás változtatásának hatása .....	61
4.1.5. A zearalenonspecifikus antiszérum keresztreaktivitási vizsgálata a ZON bomlástermékeivel.....	62
4.1.6. A fejlesztett módszer összehasonlítása más immunanalitikai módszerekkel .....	63
4.1.7. Zearalenon (ZON) meghatározása teljes belső visszaverődéses ellipszometria módszerrel .....	64
4.1.8. Zearalenon (ZON) meghatározása nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel.....	65
4.2. Glyphosate-meghatározási vizsgálatok.....	67
4.2.1. Glyphosate-tartalom meghatározása abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával.....	67
4.2.2. Az immunoassay optimalizálása.....	70
4.2.3. A glyphosate-specifikus antitestek keresztreaktivitásának vizsgálata.....	71
4.2.4. A módszer alkalmazása környezeti és biológiai mintákon.....	72
4.3. A glyphosate gátló hatásának vizsgálata egyes RGD-specifikus integrinek RGD-szekvenciához vagy saját ECM fehérjéhez való kötődésére.....	75
4.3.1. Gátló hatás $\alpha$ V $\beta$ 3-ra RGD szekvenciát tartalmazó biopolimerrel való érzékenyítés esetén.....	78
4.3.2. Gátló hatás $\alpha$ V $\beta$ 3-ra vitronektinnel való érzékenyítés esetén.....	79
4.3.3. Gátló hatás $\alpha$ V $\beta$ 3-ra SARS-CoV-2 tüskefehérje receptorkötő doménjével való érzékenyítés esetén .....	79
4.3.4. Gátló hatás $\alpha$ 5 $\beta$ 1-re RGD szekvenciát tartalmazó biopolimerrel való érzékenyítés esetén.....	80
4.3.5. Gátló hatás $\alpha$ Ib $\beta$ 3-integrinre fibrinogénnel való érzékenyítés esetén .....	80
4.3.6. A környezeti szempontból legfontosabb glyphosate és AMPA gátló hatása .....	80
4.3.7. Biokémiai és lehetséges egészségügyi vonatkozások.....	83
<b>5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....</b>	<b>86</b>
5.1. A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett módszer következtetései.....	86
5.2. A glyphosate-tartalom meghatározására fejlesztett módszer következtetései.....	86
5.3. A receptorgátlási vizsgálatok eredményeinek következtetései .....	87
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>88</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>90</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>M1. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>97</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>113</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- 2,4-D – 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (*2,4-dichlorophenoxyacetic acid*)  
ACE-2 – angiotenzin-konvertáló enzim-2 (*angiotensin-converting enzyme 2*)  
ADHP – 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazin (*10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*)  
AMPA – N-amino-metil-foszfonsav (*Aminomethyl phosphonic acid*)  
BSA – szarvasmarha-szérumalbumin (*bovine serum albumin*)  
CAS – vegyi anyagok azonosítására használt *Chemical Abstracts Service* regisztrációs szám  
CONA – konalbumin (*conalbumin*)  
CR% – az antitesttel mutatott keresztreaktivitás százalékos aránya (*cross reactivity %*)  
DDT – diklór-difenil-triklór-etán (*dichlorodiphenyltrichloroethane*)  
DON – deoxinivalenol (*deoxynivalenol*)  
DT<sub>50</sub> – lebomlási felezési idő (*50% degradation time*)  
ECM – extracelluláris mátrix (*extracellular matrix*)  
EFSA – Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (*European Food Safety Authority*)  
ELFIA – enzimjelzések fluoreszcens immunoassay (*enzyme-linked fluorescent immunoassay*)  
ELISA – enzimjelzések immunszorbens vizsgálat (*enzyme-linked immunosorbent assay*)  
EPSPS – 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát szintetáz enzim (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*)  
GM – géntechnológiai úton módosított (*genetically modified*)  
HEPES – 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)  
HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (*high performance liquid chromatography*)  
HRP – tormaperoxidáz enzim (*horseradish peroxidase*)  
HSA – humán szérumalbumin (*human serum albumin*)  
IARC – Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (*International Agency for Research on Cancer*)  
IC<sub>50</sub> – adott paraméter 50%-os gátlását eredményező koncentráció (*50% inhibitory concentration*)  
IgG – immunoglobulin G (*immunoglobulin G*)  
LOD – kimutatási határ (*limit of detection*)  
LOQ – mennyiségi meghatározási határ (*limit of quantitation*)  
MRL – maximálisan megengedett szermaradékérték, határérték (*maximum residue level*)  
OPD – 1,2-fenilén-diamin-hidroklorid (*o-Phenylenediamine dihydrochloride*)  
PBS – foszfátpufferes sóoldat (*phosphate buffered saline*)  
PLL-PEG-RGD – arginin-glicin-aszparaginsav oligoszekvenciát tartalmazó (poli-(L-lizin)- és poli-(etilén-glikol)-kopolimer  
PMIDA – N-(foszfono-metil)-imino-diecsav (*N-(phosphonomethyl) iminodiacetic acid*)  
R<sup>2</sup> – determinációs együttható  
RFU – relatív fluoreszcenciaegység (*relative fluorescence unit*)  
RGD – arginin-glicin-aszparaginsav oligoszekvenca, az integrinek legrövidebb felismerőmotívuma  
THF – tetrahydrofuran (*tetrahydrofuran*)  
TIRE – teljes belső visszaverődéses ellipszometria (*total internal reflection ellipsometry*)  
TMB – 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*)  
UV – ibolyántúli hullámhossztartomány (*ultraviolet range of wavelength*)  
UV-VIS – ibolyántúli-látható hullámhossztartomány (*ultraviolet and visible range of wavelength*)  
ZON – zearalenon (*zearalenone*, további nemzetközileg alkalmazott rövidítések: ZEA, ZEN)

# 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A mezőgazdasági, elsősorban is a növénytermesztési tevékenységek többségükben olyan nyílt technológiák, melyeknek működése a környezettel közvetlen kapcsolatban áll, nem elszigetelt. Szemben a zárt technológiákkal, ahol a nyersanyagokat egy környezettől elszigetelt rendszerbe viszik be, és a kontrollált kibocsátás a termékekre és a hulladékanyagokra szorítkozik, a mezőgazdasági tevékenységek folyamatai a környezetükkel állandóan fennálló kapcsolat során egyidőben anyagokat fogadnak onnan be és bocsátanak ki oda. Nyílt technológia lévén a különböző összetevők megjelenhetnek a folyamatban, melyek lehetnek a környezetből a rendszerbe bejutó, illetve a technológiából a környezetbe kijutó szennyezőanyagok is. A két terület nem minden esetben különíthető el, mert előfordulhat, hogy a mezőgazdasági technológiából kikerülő szennyezőanyag a technológia későbbi folyamatai során a környezetből bejutó szennyezőként jelenik meg a rendszerben vagy akár a termékben.

A mezőgazdasági technológiákból származó két legjelentősebb szerves mikroszennyező-típus a haszonnövények kártevői ellen alkalmazott növényvédő szerek, valamint bizonyos növénypatogén gombák által termelt mikotoxinok. Minthogy a haszonnövény az adott művelési területen az élőhely legnagyobb egyedszámban előforduló növényfaja, az így létrehozott koncentrált megjelenése e fajnak (monokultúra) kifejezetten vonzó mind az azt fogyasztó fitofág kártevők, mind pedig az azt fertőzni képes patogén gombafajok számára, és a tápanyagokért versengő kártevő szervezetekként a gyomok is megjelennek. Emiatt minden növénytermesztési technológiában rendelkezni kell olyan módszerrel, amivel a haszonnövényt ezen – a monokultúras termesztés miatt megnövekedett kártételre képes – kártevők ellen védjük. Az iparszerű mezőgazdasági technológiákban a leggyakoribb forma a kémiai növényvédelem, ahol a védekezés növényvédő szerek kijuttatásával történik. Ez a tevékenység környezeti szempontból szennyezőforrásként mutatkozik.

A mezőgazdaság fokozódó kémiai környezetterheléséből adódó környezetegészségügyi problémákat már az 1950-es évek dereka óta fokozódó figyelemmel követik. E folyamat kezdeti szakaszának kiemelkedően fontos pontja Rachel Louise Carson „Néma tavasz” című könyvének megjelenése, melyben már csaknem két emberöltővel ezelőtt aggodalmát fejezte ki a környezetben lassan lebomló (perzisztens) növényvédő szerek környezetre gyakorolt hatásai miatt (CARSON 1962). Carson munkássága két új elemet is bevont a növényvédő szerek környezeti megítélésének kérdésébe: egyrészt felhívta a figyelmet arra, hogy a környezeti kockázatok értékelését kiemelt súllyal kell kezelni a hatósági engedélyezés folyamatában, másrészt pedig ebbe az értékelésbe a

közvéleményt is hangsúlyosan bevonta. Az ő munkásságának a közvetlen eredménye volt, hogy az Amerikai Egyesült Államok 1970-ben megalapította a Környezetvédelmi Hivatal (*United States Environmental Protection Agency*, US EPA) intézményét (LINTHORST 2010), melynek feladata az emberi egészség védelme a természeti erőforrások megőrzésén, valamint a vegyi anyagokkal, köztük a növényvédő szerekkel kapcsolatos szabályozásokon keresztül.

A fokozódó figyelem egyben a növényvédő szerek használatának szabályozásában és az engedélyezési folyamatok változásaiban is tükröződik. A mai növényvédő szerek engedélyezési szabályai egyre szigorúbbak, és kizárnak olyan korábban alkalmazott vegyülettípusokat, amelyeket ma már szennyezőként tartunk számon valamely jellemzőjük miatt (pl. higany- és arzénsók, klórozott szénhidrogének). Ilyen jellemző lehet például a perzisztencia vagy az akut és/vagy krónikus toxicitás alacsony dózis vagy koncentráció esetén. Az Európai Unió területén az érvényes jogi szabályozás szerint egy engedélyezett növényvédő szer nem lehet káros hatással az emberi és állati egészségre semmilyen expozíciós útvonalon keresztül, valamint a környezetre sem gyakorolhat elfogadhatatlan mértékű terhelést, beleértve a nem célszervezetekre, a biológiai sokféleségre és az ökoszisztémára gyakorolt hatást. Erről a vonatkozó jogszabály, az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EK rendelete (2009. október 21.) a növényvédő szerek forgalomba hozataláról valamint a 79/117/EGK és a 91/414/EGK tanácsi irányelvek hatályon kívül helyezéséről (EURÓPAI PARLAMENT ÉS TANÁCS 2009) a II. fejezet 1. szakasz 1. alszakaszának 4. cikk (3) bekezdésében az engedélyezett növényvédő szerekről konkrétan eképp fogalmaz: „... (b) nem lehet azonnali vagy késleltetett káros hatása az emberi egészségre – ideértve a sérülékeny csoportok egészségét is – vagy állatok egészségére, sem közvetlenül, sem ivóvízen ..., élelmiszeren, takarmányon vagy levegőn keresztül, sem munkahelyi terhelés következményeként, sem más közvetett hatáson keresztül, figyelembe véve az ismert halmozódó és szinergikus hatásokat is, ... sem pedig a felszín alatti vizekre; ... (e) nem terheli elfogadhatatlan mértékben a környezetet különös tekintettel a következő szempontokra: (i.) további sorsa és eloszlása a környezetben, különösen a felszíni vizek, ... valamint a levegő és a talaj szennyezését illetően; ... (ii.) a nem célszervezetekre gyakorolt hatása, beleértve az e fajok viselkedésére gyakorolt hatást; (iii.) a biológiai sokféleségre és az ökoszisztémára gyakorolt hatása”.

A mezőgazdaság által alkalmazott szintetikus növényvédő szerek idegen anyagok (xenobiotikumok), melyek a környezetben szennyezőanyagként jelennek meg. Felhalmozódási koncentrációjuk értéke általában ng/l – µg/l nagyságrendű, ezért a szerves mikroszennyezők csoportjába soroljuk őket. A szerves mikroszennyezők nemcsak a növénytermesztési és növényvédelmi technológiák munkafolyamataiból származhatnak, de termelődhetnek a mezőgazdasági területen belül is, erre példák a növénypatogén gombákból származó mérgező

másodlagos anyagcseretermék mikotoxinok, melyeknek termelődése az őket termelő gombaszervezet számára túlélési előnyökkel jár a vele az élőhelyért versengőkkel szemben.

A szerves mikroszennyezők a mezőgazdasági termelésből külső közegekbe kijutva környezet- és élelmiszerbiztonsági veszélyt jelenthetnek. Mindkét említett csoport (növényvédő szerek, mikotoxinok) megjelenhet felszíni és felszín alatti vizekben, valamint talajban, ami veszélyeztetheti a környezetbiztonságot, továbbá terményekben is, mely esetben élelmiszerbiztonsági veszélyt vagy kockázatot jelenthet.

A növényvédő szerek és maradékaik adott időszakokban és adott környezeti elemekben való megjelenése tekintetében meghatározó tényezők egyrészt a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai, perzisztenciája és vízdoldhatósága, másrészt a kijuttatás mennyisége. Egyes hatóanyagok nem meglepő módon azon időszakokban jelentek meg jelentős környezetszennyezőként, amikor használatuk jelentős mértékű volt. Ez jól megfigyelhető gyomirtó szereknél, mivel ezek az növényvédőszer-kijuttatás legnagyobb részét teszik ki nemzetközi szinten és hazánkban is (DARVAS és SZÉKÁCS 2022). Napjainkban a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyaggal kapcsolatban merül fel környezeti aggályként, hogy – elsősorban a globálisan kiemelkedő kijuttatása okán – szermaradéka általános (ubikviter) szennyezőként jelenik meg a felszíni vizekben, s hogy az ezen kisdózisú, de folyamatos kitettség nyomán krónikus egészségügyi hatások merülhetnek fel. Mikotoxinok közül a *Fusarium* gombanemzetség (fonalas gombák) által termelt zearalenon egyrészt korábban feltárt hormonmoduláns hatása miatt lényeges, másrészt immár ez a szerves mikroszennyező is megjelenik felszínivíz-szennyezőként. Mindez még jobban kiemeli, hogy elengedhetetlenül fontos megfelelő módszerekkel rendelkezünk a mezőgazdasági eredetű szerves szennyezőanyagok monitorozására a különböző közegekben, valamint lehetséges (öko)toxikológiai hatásaik kimutatására.

Kutatómunkámat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Környezettudományi Intézetének (KÖTI) Agrár-környezettudományi Kutatóközpontjában (AKK) végeztem (korábban Nemzeti Agrárkutató és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézet), mely konzorciumvezetőként részt vett az Aquafluosense projektben (NVKP\_16-1-2016-0049) (AQUAFLUOSENSE 2024). A projekt keretein belül egy komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris érzékelő- és műszercsalád került kifejlesztésre, melyhez a kimutatási módszerek a TKP2021-NVA-22 (MATE 2024) projektben kerültek további fejlesztés alá. E fejlesztésben a PhD-tanulmányaimhoz kapcsolódó célkitűzések a projekt céljaival összhangban az alábbiak voltak:



- Olyan enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) rendszer kialakítása, mely a projekt által fejlesztett fluorimétermodul-prototípus segítségével alkalmas vízmintákban a zearalenon (ZON) mikotoxin hatósági előírásoknak megfelelő érzékenységű kimutatására és mennyiségi meghatározására *in situ* körülmények között. A munka magába foglalta a célvegyület önálló fluoreszcenciájának vizsgálatát, a fejlesztett módszer alkalmazhatóságának vizsgálatát felszínivízmintákon, az esetleges mátrixhatás és keresztreakciók meghatározását, valamint a gerjesztés fényerősségváltoztatásának mérési folyamatra gyakorolt hatásának vizsgálatát.
- ELFIA módszer kialakítása vízminták *glyphosate*-tartalmának kimutatására és meghatározására, beleértve ebbe a módszer alkalmazhatóságának vizsgálatát egyéb környezeti és biológiai mintákon (talaj és növényi szövet), valamint az esetleges mátrixhatás és keresztreakciók vizsgálatát.
- A *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyagának, valamint bomlástermékeinek és egyéb rokon vegyületeinek az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) oligoszekvenciát felismerő integrinek (receptorok) ligandumkötő képességére gyakorolt lehetséges gátló hatásának vizsgálata módosított enzimjelzéses *immunoassay* módszer alkalmazásával.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Növényvédőszer-maradékok a környezetben

A szerves mikroszennyezők (olyan szerves vegyületek, amelyek emberi tevékenység hatására szennyezőként jelennek meg környezeti mátrixokban vagy termékekben, többek között gyógyszer- és növényvédőszer-maradékok, táplálékkiegészítők, kozmetikai anyagok, festékek és mikroműanyagok) gyakran előforduló felszíni- és talajvízszennyezők, melyeknek diffúz szennyezőkénti megjelenése veszélyt jelent az ökológiai környezetben (PETRIE et al. 2015, BHATT et al. 2022, ZIYLAN-YAVAS et al. 2022, KALITA et al. 2024). A mezőgazdasági tevékenység számos szerves mikroszennyező forrása, melyek közül a növényvédőszer-maradékok megjelenése a vizekben folyamatos ellenőrzést igényel (SZÉKÁCS et al. 2015, LUNDQVIST et al. 2019, CAMPANALE et al. 2021, WŁODARCZYK-MAKUŁA 2024).

Az iparszerű mezőgazdasági technológiákban a növényvédő szerek kritikus szerepet játszanak a rovarkártevők, a növénybetegségek és a gyomnövények visszaszorításában, s ezen keresztül a terméshozzáadásban. Tudi és munkatársai tanulmánya szerint alkalmazásuk nélkül a gyümölcsstermés 78%-kal, a zöldségstermés 54%-kal, a gabonatermés pedig 32%-kal esne vissza világszinten (TUDI et al. 2021). Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (*Food and Agriculture Organization*, FAO) álláspontja is hasonló (FAO 2024a), és nyilvántartása szerint a növényvédőszer-hatóanyagok mezőgazdasági felhasználása 2021-ben évi 3,78 millió tonnát tett ki, melynek 48,5%-a gyomirtó szer, 23,3%-a gomba- és baktériumölő szer, 21,8%-a rovarirtó szer, 6,4%-a pedig egyéb mezőgazdasági alkalmazás volt (FAO 2024b). Ebben az évben az öt legnagyobb felhasználó Brazília (19,1%), az Amerikai Egyesült Államok (12,1%), Indonézia (7,5%), Argentína (6,4%) és Kína (6,2%) voltak (STATISTA INC. 2024). A 2021-es év magyarországi mezőgazdasági célú növényvédőszer hatóanyag-felhasználása a FAO nyilvántartása szerint 8858 tonna volt, melynek csaknem felét (4358 tonnát) a gyomirtó szerek tették ki (FAO 2024b), ugyanakkor a nyilvánosan elérhető legutóbbi hivatalos hazai növényvédőszer-értékesítési adatok szerint a gyomirtó szerek (8928 tonna 2019-ben) a magyarországi növényvédőszer-forgalomnak csupán az egyharmadát tették ki (KSH 2024). Becslések szerint azonban a kijuttatott mennyiségnek csak körülbelül 0,1–1%-a éri el a célszervezeteket (PIMENTEL 1995, BERNARDES et al. 2015, TUDI et al. 2021), s hasonló hazai becslés is közlésre került (SZÁSZ ÉS PETRÓ 1997). A fennmaradó mennyiség bekerülhet a

környezeti elemekbe, nem célzott szervezeteket érhet el, valamint az emberi egészségre is hatást gyakorolhat.

Bizonyos vegyi anyagok kártevők elleni használata az ókorig visszanyúlik, amikor a kártevők és gyomok visszaszorítására például kén és szódahamut alkalmaztak. Szervetlen anyagok és biológiai eredetű vegyületek ilyen célú használata évszázadokon át fennmaradt. Az 1600-as években arzénvegyületeket használtak kifejezetten az ízeltlábúak ellen, s az 1800-as évek végén még kalcium-arsenátot használtak e célra Európában és az Amerikai Egyesült Államokban is, vagy természetes alkaloidokat, mint például nikotint és anabazint (dohányextraktum) vagy ezek sóit. Az ún. „modern” növényvédő szerek alkalmazását az ipari forradalom, ezen belül is a szerves vegyipar fejlődése hozta el, amikor számos olcsón gyártható és hatékony szintetikus növényvédőszer-hatóanyagot állítottak elő és forgalmaztak (MAHMOOD et al. 2016, MATTHEWS 2018). Az 1950-es évekkel a növényvédő szerek piacán robbanásszerű növekedés indult meg. Az akkor világszerte engedélyezett növényvédőszer-hatóanyagok 100 körüli száma a hetvenes évekre 250-re, a kilencvenes évekre pedig nagyjából 500-ra nőtt (PHILLIPS MCDUGALL 2018). Ezek az újonnan engedélyezett hatóanyagok részben ismert hatásmechanizmusú vegyületcsaládok újabb tagjai, részben pedig új hatásmechanizmusok felfedezésének eredményei voltak. Növényvédő szerek közül a gyomirtó szerek területén új hatásmódú aktív hatóanyagokat a kilencvenes évekig átlagosan háromévente vezettek be, azonban ez a folyamat az ezredfordulóra teljességgel leállt, és az utolsó új hatásmechanizmusú *isoxaflutole* 1992-es engedélyezése óta ilyen irányú bővülés egyáltalán nem történt (HEAP és DUKE 2018, SZÉKÁCS 2021, SZÉKÁCS 2024). Az elérhető növényvédő szerek körét a másik oldalról a hatóanyag-visszavonások, tiltások és -korlátozások limitálják. Az Európai Unió például az elmúlt években fokozatosan csökkentette az újraengedélyezett hatóanyagok számát, mely 1995. és 2009. között 700 hatóanyagot érintett (ANTON et al. 2014). Ez a trend nem mindenhol mutatkozik azonos mértékben, így azon hatóanyagok nagy része, melyet Brazília, Kína vagy az Európai Unió (mint legnagyobb mezőgazdasági termelői térségek) közül legalább kettő területén már betiltottak, az Amerikai Egyesült Államok területén még forgalomban van (DONLEY 2019). A szabályozási eltérések miatt lehetséges az, hogy a 2018-ban világpiacon vezető nyolc gyomirtószer hatóanyag (sorrendben: *glyphosate*, *glufosinate*, *mesotrione*, 2,4-D, *atrazine*, *metolachlor*, *paraquat* és *acetochlor*) közül öt az Európai Unió területén már nem engedélyezett.

Hazánkban a Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint (KSH 2024) a 2000-2019. közötti időszakban a mezőgazdasági végfelhasználásra értékesített növényvédő szerek mennyisége közel két és félszeresére nőtt, és a 2019-ben értékesített 26783 tonna növényvédő szer 33%-át tették ki a gyomirtó szerek. Ugyanezen évben a nem kizárólag mezőgazdasági célra forgalomba hozott

növényvédő szerek összesen 7827 tonna hatóanyagot tartalmaztak, melynek 49,9%-a volt gyom- és mohairtó szerek hatóanyaga. A Nemzeti növényvédelmi cselekvési terv 2013-2023 dokumentumban (AGRÁRMINISZTERIUM 2020) Magyarország növényvédőszer-felhasználásának modellezésére kiválasztott megfigyelt hat szántóföldi és kertészeti kultúra adatai alapján a három legnagyobb mennyiségben felhasznált növényvédőszer-hatóanyag a kén, mely gombaölő szerek hatóanyaga, valamint az *S-metolachlor* és a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyagok. Bár az egy hektárra jutó mennyiség tekintetében az *S-metholachlor* értéke nagyobb, mind teljes felhasznált mennyiség, mind kezelt alapterület tekintetében a *glyphosate* hazánkban is vezető gyomirtószer-hatóanyagnak tekinthető. A Központi Statisztikai Hivatal 2017-2019. közötti adatai alapján az egy hektár mezőgazdasági területre jutó növényvédőszer-hatóanyag mennyisége szerint Magyarország az Európai Unió középmezőnyében helyezkedik el.

A szintetikus növényvédő szerek fejlesztése és intenzívebb alkalmazása nyomán környezeti aggályok merültek fel, már az 1950-60-as évektől. Ennek orvoslására a rendkívül lassú lebomlású (perzisztens), klórozott szénhidrogén típusú rovarölőszer-hatóanyagokat – köztük a DDT-t – betiltották az Amerikai Egyesült Államokban (1972), világszerte és hazánkban is (a tiltás meghirdetésében Magyarország világelső volt, 1968-ban). A fokozódó környezeti aggályok figyelembevételének hosszú távú következménye pedig a korábbi hatóanyagok felülvizsgálata és az újonnan engedélyezésre várók körültekintőbb vizsgálatai voltak az engedélyezési folyamat során (DAVIS 2014). Ma az új növényvédő szerek engedélyezési folyamatába beletartozik a humán- és állategészségügyi hatások korábbiaknál körültekintőbb vizsgálata, a nem célszervezetekre gyakorolt hatások feltárása, valamint a növényvédő szer sorsának vizsgálata a környezetbe kikerülését követően is (MAHMOOD et al. 2016, PELKONEN et al. 2023, CHEN et al. 2023). A növényvédő szerek környezetben való megjelenését közvetlenül befolyásolja piaci elérhetőségük és forgalmazási/kijuttatási szintjük, mely nagyban összefügg a fentebb említett engedélyezési és tiltási folyamatokkal.

A nem célzott szervezetek közül a vízi élőlények a táplálkozáson kívül is állandó kitettségben vannak a növényvédőszer-maradékoknak, hiszen a vizes közeg az élőhelyük. Más szervezetek (így az emberi szervezet) növényvédő szereknek való elsődleges kitettségét általában a szennyezett élelmiszerek és ivóvíz fogyasztása okozza, azonban alacsonyabb dózisu, de folyamatos terhelés a környezetből is származhat. A kijuttatást követően ugyanis e vegyületek terjedhetnek a környezetben sodródás, felszíni lefolyás vagy bemosódás révén. A környezetben való megjelenés mértékét, az érintett mátrixok közötti megoszlást és a szennyezés fennmaradásának idejét a szennyezők saját fizikai-kémiai tulajdonságai mellett a különböző környezeti tényezők is befolyásolják. A talaj felszínén vagy ahhoz közel felhalmozódott mennyiségek könnyen

mobilizálódhatnak és szállíthatnak felszíni lefolyással, ezért a kijuttatást követő első esőzés bekövetkezésének ideje nagy hatással van a relatív anyagveszteség mértékére. A folyamat további befolyásoló tényezője a talajhoz való kötődés erőssége. A talajalkotókhöz gyengébben kötődő növényvédő szerek nem feltétlenül szállítódnak könnyebben a felszíni vízzel, mert éppen a gyenge kötődés miatt könnyen mosódnak be a talaj mélyebb rétegeibe. Az idő előrehaladtával a felszíni lefolyás általi szállítás lecsökken, főleg a növényvédő szerek lebomlása, illetve a felszíni és talajvízbe, majd a hidroszférába történő bemosódás által (MAGGI et al. 2023). A talajba és azon keresztül a talajvízbe való bemosódás mértékét kémiai, fizikai és biológiai tényezők – a mikrobiális lebontáson keresztül – is befolyásolják, beleértve a növényvédő szer fizikai-kémiai tulajdonságait, a talaj áteresztőképességét, textúráját, szervesanyag-tartalmát, de a kijuttatott mennyiséget és a kijuttatás során alkalmazott módszert is. A klímaváltozás ugyancsak fontos tényező, mivel a hőmérséklet változásai és a csapadékeloszlás közvetlen, míg az agroökosztisztémában bekövetkező változások (a földhasználat változásának okán, a kijuttatás idejének módosítása következtében vagy új típusú növényvédő szerek használatba vételével az újonnan megjelenő kórokozók, betegségek vagy gyomok ellen) közvetett befolyással bírnak (STEFFENS et al. 2015). A közvetlen hatásokat tekintve a megemelkedett hőmérséklet elősegíti a növényvédő szerek felszabadulását a talajrészecskékről, és gyorsítja a lebomlás sebességét, így általánosságban a bemosódás mértékét csökkenti, más oldalról azonban a megemelkedett csapadékmennyiség a bemosódás esélyét növeli. A víz és a benne oldott vegyületek talajon keresztül történő mozgását legerősebben a talaj és a vegyület fizikai-kémiai tulajdonságai által befolyásolt megkötődési (adszorpció) és lebomlási folyamatok alakítják. A megkötődés és a felszabadulás (adszorpció és deszorpció) közvetlenül szabályozzák a bemosódás sebességét és mélységét. A talaj szervesanyag-tartalmát tekintik a legerősebb tényezőnek a vegyületek lebomlása, megkötődése és talajon belüli mobilitása szempontjából, melytől a vízben, a talajban és a levegőben való előfordulás megoszlása elsődlegesen függ (PÉREZ-LUCAS et al. 2019). A különböző transzportfolyamatok eredményeként a növényvédő szerek és bomlástermékeik elérhetik a felszíni és felszín alatti vizeket, elszennyezve ezzel a vízi szervezetek élőhelyeit és más élőlények vízforrásait.

A növényvédő szerek lebomlásának folyamata a környezetben történhet biotikus úton mikroorganizmusok és növények által, vagy abiotikus folyamatok eredményeként kémiai és fotokémiai reakciók során. Az adott növényvédő szer lebomlását részben szerkezete határozza meg, részben pedig azok a körülmények, amelyek közé eloszlása és a transzportfolyamatok eredményeként kerül. A talajban, az üledékben és a víztestekben fellépő oxidációs és redukációs folyamatok gyakran meghatározzák, milyen biotikus vagy abiotikus folyamatok mehetnek végbe,

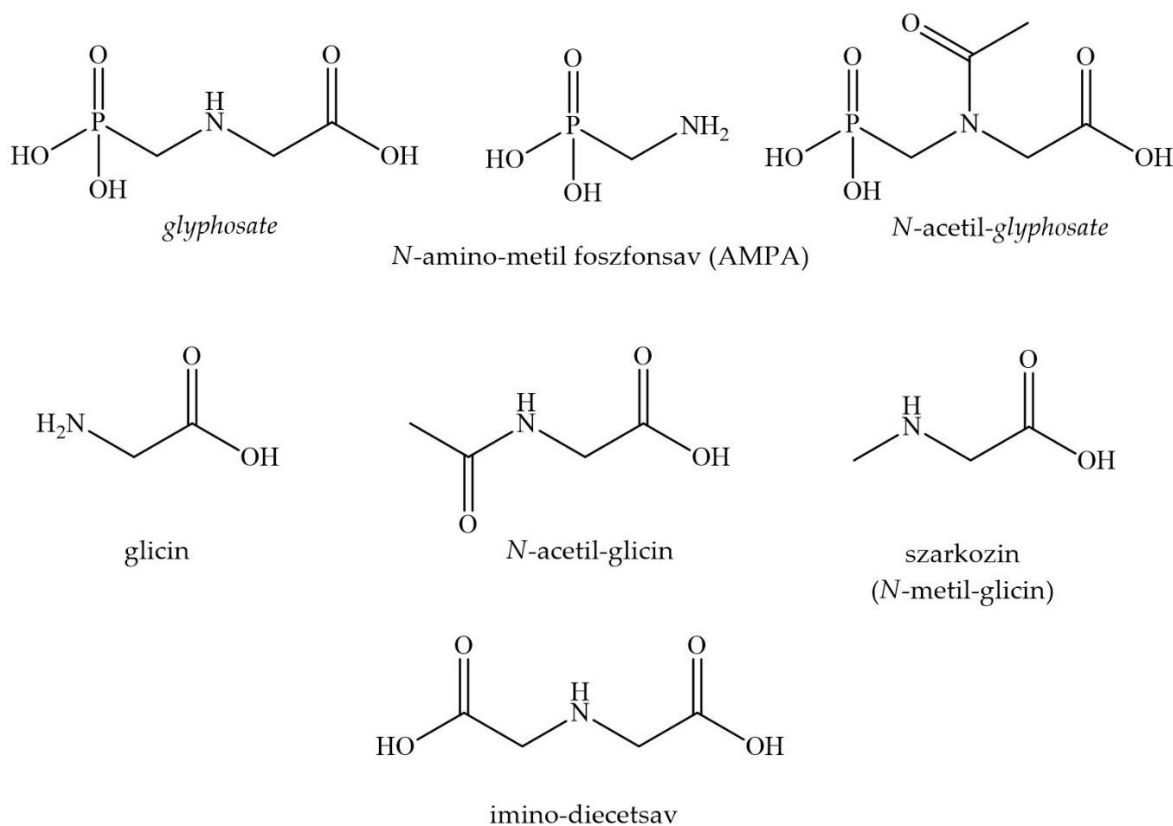
a fotokémiai lebomlás pedig a napfénynek közvetlenül kitett területeken lehetséges, például a víztestek felső rétegeiben, illetve a növények és a talaj felszínén (FENNER et al. 2013). A növényvédő szerek mikrobiális lebontása általában összetett folyamat, mely enzimek által katalizált biokémiai reakciók sorozatából áll. A lebomlást akkor tekintjük teljesnek, ha a kiindulási vegyület teljes mértékben oxidálódik vagy redukálódik olyan egyszerű molekulákká, mint a széndioxid, metán, nitrát, ammónium vagy víz. A biológiai lebontás folyamatát a vegyület tulajdonságain túl befolyásolja a talaj szervesanyag-tartalma, kémhatása és textúrája, valamint olyan környezeti tényezők, mint a nedvességtartalom, a hőmérséklet és az oxigénellátottság. A folyamat számára az ideális talaj meleg, vízben és oxigénben gazdag, kémhatása pedig semleges. A növényvédő szerek lebontásáért a mikroorganizmusok transzferáz, izomeráz, hidroláz és ligáz enzimei felelősek. Az általuk katalizált metabolikus reakció eredménye lehet például hidrolízis, oxidáció, oxigénaddíció kettős kötésre, aminocsoport oxidációja nitrocsoporttá, kénatom kicserélése oxigénre vagy gyűrűfelhasadás (VERMA et al. 2014). Mind a biológiai, mind a kémiai, mind a fotokémiai lebomlási folyamatok köztes és végtermékeként létrejöhetnek olyan növényvédőszer-bomlástermékek, melyek perzisztensebbek vagy toxikusabbak az alapvegyületnél, így ezeket adott esetben be kell vonni a környezeti monitorozás és a toxikológiai vizsgálatok során a vizsgált anyagok körébe. A környezeti szennyezés kockázatának feltérképezésére egy – a világ 168 országban a leggyakrabban alkalmazott 92 növényvédőszer-hatóanyagra vonatkozó – számítógépes modellezési vizsgálat becslése szerint az adott vizsgálatban felmért mezőgazdasági területek 64%-a esik veszélyeztetett kategóriába, egynél több aktív hatóanyag szennyezése szempontjából (TANG et al. 2021).

Az általunk vizsgált *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag mind a mai napig a legnagyobb forgalmú növényvédő szer (SZÉKÁCS és DARVAS 2012, DARVAS és SZÉKÁCS 2016, SZÉKÁCS és DARVAS 2018). A kiugró mennyiségű felhasználás eredményeként világszerte előfordul talajokban, felszíni és felszín alatti vizekben egyaránt, ezért a mezőgazdasági tevékenységekből fakadó környezetterhelés jelentős részéért felelős.

### **2.1.1. A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag jellemzése**

A széles spektrumú, nem szelektív *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag napjaink legelterjedtebb, világvezető növényvédőszer-hatóanyaga, mind felhasználási terület, mind kijuttatott mennyiség tekintetében. Kémiai szerkezetét tekintve foszfonsavval N-szubsztituált aminosav (N-foszfonometil-glicin), móltömege 169,07 g/mol, erősen poláris, ikerionos szerkezetű, vagyis vízoldhatósága – a növényvédőszer-hatóanyagok között atipikusan – igen nagy, 25°-on 11,6 g/l

(SZÉKÁCS és DARVAS 2012). A *glyphosate*-ot, főbb bomlástermékeit és a jelen munkában alkalmazott szerkezeti analógjait az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag, főbb bomlástermékei, az *N*-amino-metil-foszfonsav (AMPA) és az *N*-acetyl-*glyphosate*, valamint egyes szerkezeti analógjainak kémiai szerkezete.

A hatóanyagot jelenleg több, mint 150 gyomfaj irtására alkalmazzák, beleértve egy- és kétszikű, egynyári és évelő fajokat is. Felhasználási területe nem korlátozódik a monokultúras mezőgazdasági tevékenységekre, alkalmazzák például erdészetekben, városi környezetben és vízi kultúrákban is (KANISSERY et al. 2019). Az első *glyphosate* hatóanyagtartalmú növényvédő szer 1974-es forgalomba kerülése óta az éves eladási össz mennyiség töretlenül nő. Ezt a növekedést nagyban segíti, hogy a géntechnológiai úton módosított (GM) növények termőterületeinek mintegy 90%-át kitevő gyomirtószer-toleráns állományok túlnyomó része *glyphosate*-tűrő GM növényállomány, mely a hatóanyaggal együtt a gyomok elleni védelem az elmúlt két évtizedben a világ jelentős részén (Európán kívül) terjedő megoldását jelenti (DUKE 2018, SZÉKÁCS és DARVAS 2018). Alkalmazása többoldalú, a hagyományos növényvédelmi kezelések mellett – nem *glyphosate*-tűrő GM növényeken – kémiai állományszárításra (deszikkálásra) is használják, betakarítás előtt vagy után, mely ugyancsak hozzájárul piaca és környezetterhelése

növekedéséhez. A *glyphosate* hatásmechanizmusa az 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát szintetáz (EPSPS) enzim működésének gátlásán alapszik, mely a sikimát útvonal része. Az útvonal gátlása számos folyamat köztes lépésének végbemenését gátolja, megakadályozva ezzel a növényekben elsősorban aromás aminosavak (tirozin, fenil-alanin és triptofán), de emellett hormonok, és más fontos növényi metabolitok szintézisét, beleértve flavonoidokat, lignineket és egyéb fenolvegyületeket is (DILL 2005). Ezek a vegyületek csak növényekben, baktériumokban és gombákban termelődnek, állatokban nem, így – nem rendelkezve EPSPS enzimmel – azokra tekintve a hatásmódból adódó várható akut toxicitás alacsony (APARICIO et al. 2013). A hatóanyag szisztémikus hatása: a növényekbe felszívódik a leveleken és egyéb zöld szöveteken, a gyökérszeten, a száron vagy a rügyeken keresztül, majd gyorsan transzlokálódik az aktívan növekedő részekbe. A kijuttatás után az egyedek 1-3 héten belül elpusztulnak, és az általános elterjedés miatt nincs olyan növényi rész, amely túlélne (KANISSERY et al. 2019).

Hatalmas mértékű felhasználása (> 800 000 tonna/év; a teljes növényvédőszer-piac ~22%-a, ezen belül a gyomirtó szerek ~44%-a) következményeként általánosan előforduló vízszennyezővé vált (BATTAGLIN et al. 2014, SZÉKÁCS és DARVAS 2018, CARLES et al. 2019). Környezeti körülmények között kedvező tulajdonságai, például vízben 2-91, talajban pedig 2-215 napos (BATTAGLIN et al. 2014) lebomlási felezési ideje (DT<sub>50</sub>) ellenére a nagy mennyiség miatt környezetszennyezőnek számít. Megemlítendő továbbá, hogy bizonyos speciális körülmények mind lebomlását, mind eloszlását nagymértékben lassíthatják. Ilyen például a talaj magas fémiontartalma (alumínium, vas, mangán és cink), melyekkel a *glyphosate* komplexet képez (VERECKEN 2005, SZÉKÁCS és DARVAS 2012). Vízoldhatósága 11,6 g/l 25°C-on, ez más növényvédőszer-hatóanyagokhoz viszonyítva kiemelkedően magasnak számít, és hozzájárul világszerte felszínvíz-szennyezőként való megjelenéséhez. A különböző készítményekben alkalmazott sóinak vízoldhatósága nagyobb a szabad savas alakénál (HANKE et al. 2010, SZÉKÁCS és DARVAS 2018, CAMPANALE et al. 2021). A vegyület tulajdonságai alapján bioakkumulációra nem hajlamos, és perzisztensnek sem tekinthető, mégis gyakran azonosítják talaj- és vízminták mellett mezőgazdasági termények mintáiban, többek között gabonafélékben, zöldségekben és gyümölcsökben, például kukoricában, szójában, olajos magvakban, lencsében (állományszárítás hatására), spárgában, körtében, narancsban és almában is (VICINI et al. 2021, SOARES et al. 2021). Az emberi szervezet és a haszonállat-állomány kitettségének bizonyítékeként vérben és vizeletben is előfordul (KRÜGER et al. 2013, ZOLLER et al. 2020, GRAU et al. 2022). A hatóanyag lebomlása a környezetben elsősorban mikrobiális folyamatok útján megy végbe, ahol elsődleges bomlástermékként az egyik útvonalon amino-metil-foszfonsav (AMPA), a másikon pedig glicin és szarkozin képződik. A *glyphosate* bomlása ezen kívül más



útvonalakon is végbemehet, vizsgálati jelentések alapján azonban az egyéb mátrixokban talált bomlástermékek több mint 90%-a AMPA (KANISSERY et al. 2019). Az AMPA vízdoldhatósága 5,8 g/l, ami a szülővegyületénél valamivel alacsonyabb, lebomlási felezési idejét ( $DT_{50}$ ) pedig 60-240 nap közé becsülik (BATTAGLIN et al. 2014), így környezeti mintákban általában a *glyphosate* és AMPA vegyületeket együttesen találják meg (COUPE et al. 2012). A hatóanyag ökotoxikológiai hatásai kiterjedtek szárazföldi (KLÁTYIK et al. 2023) és vízi (KLÁTYIK et al. 2024a) szervezeteken egyaránt, és vízi környezetben hormetikus hatását is kimutatták (KLÁTYIK et al. 2024b). Bár mind a *glyphosate*, mind az AMPA emlősfajokra gyakorolt akut toxicitása alacsony, egyre több adat támasztja alá, hogy a nagyon alacsony dóziszú krónikus kitettséggel kapcsolatba hozott lehetséges egészségügyi hatások összefüggésben lehetnek a vegyületek környezeti felhalmozódásával, emellett humán egészségügy tekintetében korrelációt mutattak ki a hatóanyag növekvő használata és bizonyos betegségek megjelenése között, melyekbe beletartozik például a vesekárosodás, a rákos megbetegedések különböző típusai, az autizmus, az Alzheimer- és a Parkinson-kór (VAN BRUGGEN et al. 2018). A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) a hatóanyagot kizárólag nyirokrendszeri daganatok kialakulásával találta bizonyítottan összefüggésbe hozhatónak (IARC 2017).

Mint láttuk, felszíni vizekbe kerülése kritikus kérdés az ubikviter vízszennyező tulajdonság kialakulásában. A hatóanyagot alkalmazásának korai időszakában nem találták problematikusnak, hiszen az akkori klasszikus műszeres analitikai módszerek alacsony érzékenysége miatt a környezeti vizsgálatok során a *glyphosate* és az AMPA jelenlétét csak a minták kisebb részéből mutatták ki. Az elmúlt nagyjából húsz évben azonban az alacsonyabb kimutatási határokkal rendelkező újabb módszerek megjelenésével mind a hatóanyagot, mind a bomlástermékeit egyre gyakrabban azonosítják (SZÉKÁCS és DARVAS 2018). Az Amerikai Egyesült Államok területén 2001. és 2010. között gyűjtött, 34 államból származó felszíni és felszín alatti vizek (patakok, talajvíz, vizesárok és lefolyók, nagy folyók, nagyobb és kisebb tavak, mocsarak), sőt csapadékvíz, szennyvíztisztító telep kifolyói, valamint talaj és üledékminták 39,4%-ában mutattak ki *glyphosate*-ot 476  $\mu\text{g/l}$ , 55%-ában pedig AMPA-t 397  $\mu\text{g/l}$  koncentrációig (BATTAGLIN et al. 2014), amit későbbi vizsgálatok is megerősítettek (MEDALIE et al. 2020). Mexikóban a Yucatán-félsziget területéről származó, 2016-ban vett talajvízminták 90%-a tartalmazott *glyphosate*-ot 1,4  $\mu\text{g/l}$  koncentrációig (RENDÓN-VON OSTEN és DZUL-CAAMAL 2017), majd 2021-ben 57,0-510,5  $\mu\text{g/l}$  koncentrációtartományban mutatták ki felszíni vizekből (SILVA-MADERA et al. 2021). Argentínában 2014. és 2015. között az El Crespo folyó üledék- és vízmintáiból mutatták ki Buenos Aires tartomány területén, ahol a *glyphosate* a minták 78–79%-ában fordult elő 18,5  $\mu\text{g/l}$  koncentrációig, míg az AMPA a minták 96,5%-ában 47,5  $\mu\text{g/l}$ -ig (PÉREZ et al. 2017). Hasonlóan

gyakori szennyező volt mindkét vegyület 2020-ban is (LUTRI et al. 2020), illetve kifejezetten ijesztő, hogy *glyphosate*-ot 2018-ban lehulló esővízből is kimutattak 1,24–67,3 µg/l koncentrációtartományban (ALONSO et al. 2018). Kolumbiában a Pamplonita és Zulia folyókban 204,5 és 441,5 µg/l koncentrációkban mértek *glyphosate*-ot (LIMA et al. 2023). Brazíliában 2017-ben mezőgazdasági területek elfolyóiban 1240 és 6100 µg/l, patakjaiban pedig átlagosan 970 µg/l koncentrációban mérték (ÁLVAREZ BAYONA et al. 2022), míg 2021-2022-ben alacsonyabb szinten, de nagyobb gyakorisággal találták, azaz 52 talajvízminta mindegyike tartalmazott *glyphosate*-ot (1,59 µg/l maximális koncentráción) és AMPA-t (0,28 µg/l maximális koncentráción), míg 90 felszínvízmintából csak 27 tartalmazott *glyphosate*-ot és AMPA-t (a talajvíznél közel két nagyságrenddel kisebb koncentráción) (PIRES et al. 2023). Ausztráliában Queensland állam területén 2005. és 2010. között végzett vizsgálatok során a hatóanyagot 54 µg/l-ig mutatták ki vízmintákból (DAVIS et al. 2013), míg lápokban a koncentrációkat egy nagyságrenddel alacsonyabbnak, de gyakori előfordulásúnak találták (OKADA et al. 2020). Európa területén alacsonyabb koncentrációban ugyan, de rendszeresen előfordul. Franciaország területén 2003. és 2006. között gyűjtött felszínvízminták 99,7%-ában mutatták ki 90 µg/l-ig, a legmagasabb AMPA-tartalom pedig 3,6 µg/l volt (COUPE et al. 2012). 2010-ben svájci felszínvízmintákból mutatták ki *glyphosate*-ot 4,2 µg/l koncentrációig, azonban megjelenése nem magyarázható kizárólag a mezőgazdasági tevékenységgel, mert a minták több, mint fele városi környezet vízelvezetőiből, és szennyvíztisztítótelepek kivezetőiből származott (HANKE et al. 2010). Olasz felmérések a hatóanyag szermaradékait az olaszországi felszíni vizek leggyakoribb növényvédő szer szennyezőinek találták (LA PORTA et al. 2021, PACE et al. 2022, GOMARASCA et al. 2024). Hazánkban 2010-2011-ben 42 felszínvízminta 50%-a tartalmazta a hatóanyagot 0,98 µg/l koncentrációig (MÖRTL et al. 2013), valamint 2017-2020-ban a Balaton vízgyűjtő területén 203 felszínvízminta 10,3%-ában detektáltak AMPA-t 3,0 µg/l legnagyobb koncentrációban, míg a *glyphosate*-nak mind gyakorisága, mind legnagyobb koncentrációja (2,0 µg/l) alacsonyabb volt ennél (TÓTH et al. 2022).

## 2.2. Mikotoxinok a környezetben

A szintetikus növényvédő szerek környezetben való megjelenése mellett a természetes eredetű mikotoxinszennyezés a mai mezőgazdaság szintén egyre súlyosbodó problémája. A mikotoxinok olyan alacsony molekulatömegű, hőstabil, mérgező, magas bioakkumulációs hajlammal rendelkező vegyületek, melyeket egyes patogén mikroszkopikus gombák másodlagos anyagcsereterméként választanak ki. Jelenleg több, mint háromszáz ilyen vegyületet ismerünk.

Gyakran fordulnak elő terményekben, élelmiszerekben és takarmányokban, magukkal hordozva a mérgezés veszélyét mind emberi, mind állati szervezetekre nézve (KHANEGHAH et al. 2019). Élő szervezetre számos negatív hatást gyakorolhatnak, beleértve a genotoxikus, citotoxikus, mutagén, teratogén és rákkeltő hatásokat (CIMBALO et al. 2020). Az IARC besorolása szerinti 1-es csoportba (emberben rákkeltő) tartozik többek között az aflatoxin B1 és az aflatoxin B2 (IARC 2012), a 2B csoportba (emberben lehetségesen rákkeltő) pedig például az ochratoxin A (IARC 1993) és a szterigmatocisztin (IARC 1987), míg a deoxinivalenol és a zearalenon a 3. csoport (nem osztályozható emberi rákkeltőként) tagjai (IARC 1993).

A mikotoxinok szintéziséhez optimális körülménynek számít, ha a növényi szövetek nedvességtartalma meghaladja a 15%-ot, a levegő relatív páratartalma 70% fölött van, és nagy mennyiségben elérhetők olyan mikroelemek, mint a cink, a magnézium és a kobalt. Ezeken kívül számos környezeti faktor is befolyásoló hatással bír, például a pH, a nedvességtartalom vagy a hőmérséklet, ahol 20-30°C az optimális tartomány (ROGOWSKA et al. 2019). A mikotoxinok termelődése a haszonnövényeken történhet a betakarítás előtt és azt követően a tárolás során is (KHANEGHAH et al. 2019).

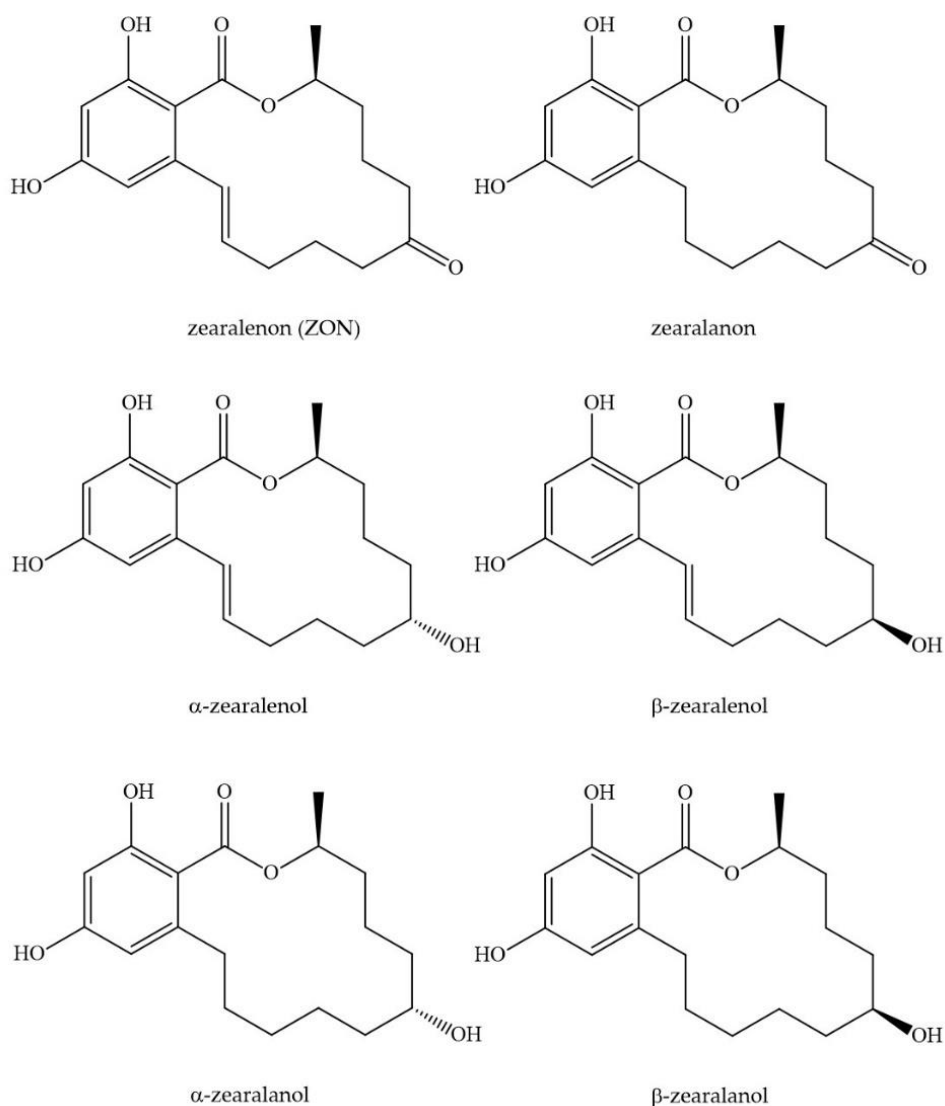
Az összes toxintermelő gombafajok közül az *Aspergillus*, a *Fusarium* és a *Penicillium* nemzetségek tagjai kiemelhetők, melyek olyan rendszeresen előforduló és emiatt széles körben tanulmányozott mikotoxinokat termelnek, mint például az aflatoxinok, az ochratoxin A, a deoxinivalenol (DON), a T-2 toxin, a fumonizinek és a ZON (KRSKA és MOLINELLI 2006). Az általuk okozott probléma súlyosságát kiemeli, hogy mikotoxinokat emberi vizeletmintákban is találtak, ami felveti a krónikus kitétség lehetőségét (RUBERT et al. 2011), a klímaváltozás hatásai pedig a növénypatogén gombafajok északi irányú terjedését elősegíthetik (VAN DER FELSKLERX et al. 2012, VALVERDE-BOGANTES et al. 2020, VALENCIA-QUINTANA et al. 2020), s ezt magyarországi megfigyelések is alátámasztották (DOBOLYI et al. 2013).

Emberi szervezet számára kitétséget nemcsak a növényi élelmiszerek jelenthetnek, hanem közvetetten az állati eredetűek is, például a vese, a máj, a tojás és a tej (YAZAR és OMURTAG 2008). Az élelmiszer- és takarmányeredetű mérgezések mellett az egészségre a felszíni vizek szennyezettsége miatt is hatással lehetnek. Számos növénypatogén gombáról, többek között *Aspergillus* és *Fusarium* fajokról is kimutatták, hogy másodlagos anyagcseretermékeik kiválasztására vízben is képesek (PATERSON et al. 1997, KELLEY és PATERSON 2003, RUSSELL és PATERSON 2007, OLIVEIRA et al. 2016, OLIVEIRA et al. 2018, PICARDO et al. 2019), mely mikotoxinterhelés szempontjából újabb potenciális expozíciós útvonalat jelenthet az emberi szervezet számára (RUSSELL és PATERSON 2007). Több vizsgálat során mutattak ki mikotoxinokat és tárták fel bekerülési útvonalait felszíni és talajvízbe (BUCHELI et al. 2008,

GROMADZKA et al. 2009, GROMADZKA et al. 2012, WAŚKIEWICZ et al. 2012, JAROŠOVÁ et al. 2015, GROMADZKA et al. 2015a, LARANJEIRO et al. 2017). Megjelenhetnek felszíni vizekben direkt szennyezésként a fertőzött mezőgazdasági talajokból való bemosódással, például gabona-termőterületekről vagy olaj- és takarmánynövények ültetvényeiről (AL-GABR et al. 2013, HARTMANN et al. 2007), de a mikotoxinok vízben történő bioszintézisének (CRIADO et al. 2005, PEREIRA et al. 2010) vagy átalakulásának (EMÍDIO et al. 2017) is lehetnek eredményei. Mindezek mellett a mikotoxinterhelést olyan környezetszennyezésnek tekintik, amely diffúz és pontforrásokból is származhat (KOLPIN et al. 2014), így a vizek gombafertőzöttségét az ivóvízminőség biztonsága szempontjából bizonyítottan emelkedő veszélynek tekintik (BABIČ et al. 2017). Dél-angliai vízmintákban 0,1 és 1,7 ng/ml közötti koncentrációkban találtak aflatoxin B1-et és G2-t (PATERSON et al. 1997), a portugáliai Tagus folyóban pedig maximum 0,035 ng/ml-es koncentrációig találtak aflatoxin B1-et és B2-t, fumonizin B3-at, valamint ochratoxin A-t (OLIVEIRA et al. 2018). Fitoösztrögének és mikotoxinok monitorozása során Iowa (Amerikai Egyesült Államok) mezőgazdasági tevékenység alatt álló vízgyűjtő területeiről származó mintákból rendszeresen mutattak ki deoxinivalenolt (DON) 0,1 ng/ml feletti koncentrációban (KOLPIN et al. 2010), Portugáliában toxikológiai veszélyt nem jelentő koncentrációban (0,0007 ng/ml) mutattak ki ochratoxin A-t palackozott vízből (MATA et al. 2015). A fenti példákön túlmenően az általunk vizsgált ZON mikotoxinról is kimutatták, hogy felszínivíz-szennyező tulajdonságokat is mutat (ld. 2.2.1.).

### ***2.2.1. A zearalenon (ZON) mikotoxin jellemzése***

Északi mérsékelt klímájú területeken a *Fusarium* az egyik legelterjedtebb fonalagombanemzetség, melyet rendszeresen azonosítanak Amerika, Ázsia és Európa területén termelt gabonafélékben. A rezorcilaktonok kémiai csoportjába tartozó ZON gyakran előforduló mikotoxin, melyet e nemzetség fajai termelnek, beleértve a *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. cerealis* és *F. equiseti* fajokat (DÄNICKE és WINKLER 2015). A ZON gyengén poláros, móltömege 318,36 g/mol, vízzoldhatósága 0,02 g/l. A ZON és a jelen munkában alkalmazott főbb bomlástermékei kémiai szerkezetét a 2. ábra mutatja be.



2. ábra: A zearalenon (ZON) és főbb bomlástermékei kémiai szerkezete.

Tárolás során nagy stabilitást mutat, sem magas hőmérséklet, sem pasztörizálás hatására nem bomlik le. További terhelést jelenthet, hogy más mikotoxinokhoz hasonlóan a *Fusarium*-fajokkal fertőzött növényeken nemcsak a vegetációs időszakban termelődhet, hanem a betakarítást követő tárolás során is, főleg, ha a tárolási módszer nem megfelelő (ROGOWSKA et al. 2019). A ZON-t elsősorban kukoricát szennyező mikotoxinként tartják számon, de előfordul zabban, árpában, búzában és cirokban is, emellett feldolgozott élelmiszerekben is megtalálható, beleértve a malátát, a lisztet, a csokoládét vagy a sört (DÄNICKE és WINKLER 2015, ROGOWSKA et al. 2019). A gyakori előfordulást jól példázza, hogy Brazíliából 2017-ben begyűjtött rizsminták 60%-ában, 2015-ben Kínából származó búzaminták 69%-ában, 2018-ban spanyolországi sörminták 65%-ában, valamint 2019-ben libanoni fűszerminták 30%-ában és gyógynövenyminták 3%-ában mutatták ki (ROGOWSKA et al. 2019).

Emlős szervezetekre gyakorolt legismertebb hatása a hormonmoduláns hatás. A ZON és származékai ösztrogénhatást mutatnak (mikoösztrogének), mely számos hormonok által szabályozott folyamatban okozhat változásokat, például befolyásolhatja a folliculus-stimuláló és a luteinizáló hormon termelődését, és gátolhatja a Leydig- és granulosa-sejtek megfelelő működését, valamint csökkentheti számukat (ZHENG et al. 2019). A ZON és bizonyos származékai ösztrogénhatása a szervezetben előforduló 17- $\beta$ -ösztradiolhoz való szerkezeti hasonlatosságnak köszönhető. E hasonlatosság miatt a ZON génaktivációs úton serkenti az ösztrogéntermelést, és ezzel befolyásolja a reprodukciós rendszer működését (KOWALSKA et al. 2016). Negatív hatását először *Fusarium*-fajokkal fertőzött takarmánnyal etetett sertések reprodukciójának változásán figyelték meg. Már az 1920-as évek jelentéseiben beszámoltak hiperösztrogenizmusról és szaporítószervi gyulladásokról egyes penészgombafajokkal fertőzött kukoricával etetett egyedeknél, melyet később számos további genitális elváltozás megfigyelése követett (METZLER et al. 2010). Mára több fajon folytattak le vizsgálatokat, így a sertés mellett rendelkezünk adatokkal szarvasmarha, ló, csirke, más madárfajok, kutya és macska esetében is, emellett számos *in vitro* vizsgálat is kimutatta a ZON hormonmoduláns hatását (EFSA 2017). A különböző fajok erősen eltérő érzékenységét több tényező befolyásolhatja. Bizonyos tanulmányok feltételezése szerint az érzékenység attól függ, hogy a metabolizmus során a szülővegyületből milyen arányban képződnek az  $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalenol bomlástermékek. A két bomlástermék ösztrogénhatásának erőssége eltérő, a ZON-hoz viszonyítva az  $\alpha$ -zearalenol hatása ötszázszor magasabb, míg a  $\beta$ -zearalenolé tizenhatszor alacsonyabb. Ezért azok a fajok, melyekben több  $\alpha$ -zearalenol képződik (például a patkány vagy a sertés), a mikotoxinra sokkal érzékenyebbek bizonyulnak (ZHENG et al. 2019). Az ösztrogénjellegű hatás mellett a ZON genotoxikus, immuntoxikus, karcinogén és májkárosító tulajdonsággal is rendelkezik (ROGOWSKA et al. 2019). Az emlősfajokon túl a *Fusarium*-fajok toxinjai (beleértve a ZON-t is) hormonális (ösztrogénjellegű), májkárosító és genotoxikus hatást fejthetnek ki halakon (PIETSCH 2017, KHEZRI et al. 2018). Bár az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) két tudományos szakvéleményében is tett javaslatot ZON (és más mikotoxinok) elfogadható szintjére állati takarmányozásra szánt termékekben (EFSA 2014, EFSA 2017), felszíni vízre vagy ivóvízre meghatározott határérték jelenleg még nincsen. Emberi és állati szervezetekre gyakorolt negatív hatásaira tekintettel az EFSA maximális elfogadható mennyiségeket határozott meg élelmiszertermékekre, melyek 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feldolgozott kukoricaalapú bébiételekben, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feldolgozott gabonaalapú élelmiszerekben, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  feldolgozott kukoricaalapú élelmiszerekben, feldolgozatlan kukoricában pedig 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (EUROPEAN COMMISSION 2023). Az elfogadható napi bevitel értékét 0,25  $\mu\text{g}/\text{tkg}$ -ban állapították meg (EFSA 2011). A

szigorú előírások és az állandó monitorozás ellenére bizonyos becslések szerint a ZON átlagos napi bevitele felnőttek esetében 0,8 és 29 ng/ttkg közé esik, míg gyermekek esetében 6–55 ng/ttkg (MINERVINI et al. 2005).

Más mikotoxinokhoz hasonlóan a ZON is a vízszennyező mikotoxinok közé tartozik (RUSSELL és PATERSON 2007). Lengyelország területén megtalálták felszíni és felszín alatti vizekben, valamint szennyvizekben is 0,081 ng/ml koncentrációig, mely szennyezés gabonából/mezőgazdasági biomasszából (GROMADZKA et al. 2009, GROMADZKA et al. 2012, WAŚKIEWICZ et al. 2012, GROMADZKA et al. 2015b) vagy szennyvíztelepek elfolyóvizéből (GROMADZKA et al. 2015a) származott. Brazíliai felszínivíz-mintákban zearalanon,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol és  $\beta$ -zearalanol származékaival együtt 4,12 ng/ml koncentrációig volt kimutatható (OLIVEIRA et al. 2016, EMÍDIO et al. 2020). 159, Illinois (Amerikai Egyesült Államok) központi területéről származó felszínivízmintából 32 adott pozitív eredményt, melyből 10 esetben 0,002 és 0,006 ng/ml közötti koncentrációban találtak ZON-t (MARAGOS 2012), portugál folyókból és patakokból gyűjtött nyolc mintában pedig 0,006 és 0,083 ng/ml közti koncentrációkban fordult elő (LARANJEIRO et al. 2017). Svájcban *F. graminearum*-mal fertőzött földről levezetett vízben egy kétéves szabadföldi kísérlet során a nyári vegetációs időszakban magasabb koncentrációban volt kimutatható (HARTMANN et al. 2008). Alacsony, de detektálható koncentrációban (0,002–0,005 ng/ml) megtalálták Olaszországban a Tevere folyóban is (LAGANÀ et al. 2004). A mikotoxinok megjelenése a vízi környezetben a teljes ökoszisztémára negatív hatást gyakorolhat, melyek miatt a ZON monitorozása élelmiszerekben és más árucikkekben rutinfeladattá vált, ami az elmúlt évtizedekben számos analitikai módszer kifejlesztéséhez vezetett, illetve a vízi környezetben a ZON és a DON mikotoxinok párhuzamos *in situ* mérésére immunanalitikai immunesztcsík-típusú eszközt is fejlesztettek (LI et al. 2023).

### **2.3. Analitikai módszerek mezőgazdasági szerves mikroszennyezők meghatározására**

A mezőgazdasági tevékenységből származó szerves mikroszennyezők a környezeti mátrixok (talaj, felszíni víz, talajvíz vagy levegő) mellett megjelennek növényekben, terményekben és feldolgozott élelmiszerekben is, ezért olyan meghatározási módszerekre van szükség, melyek az adott célvegyületeket a különböző tulajdonságú mintákban minél alacsonyabb koncentrációban kimutatni képesek. Növényvédőszer-maradékok és még inkább mikotoxinok esetében ezen megbízható és megfelelően érzékeny módszerek megléte kifejezetten fontos, mert toxikus hatásukat igen kis dózis esetén is képesek kifejteni, és ennek megfelelően a hatóságilag

megengedett szintjük (határérték, *maximum residue level*, MRL) a jogszabályokban rögzített környezeti mátrixokban (EUROPEAN COMMISSION 1998, EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2020) és terményekben, élelmiszerekben (EUROPEAN COMMISSION 2005, EUROPEAN COMMISSION 2023) alacsony (ivóvízben növényvédőszer-maradékokra 0-0,1 µg/l, élelmiszerben és takarmányban mikotoxinokra 0,002–0,50 mg/kg, növényvédőszer-maradékokra 0,01–0,20 mg/kg).

Az analitikai kimutatás során alapvető fontosságú, hogy olyan módszerrel rendelkezünk, amely a célvegyületre (vagy célvegyületek csoportjára) specifikus, mérhető analitikai jelet szolgáltat, amellyel az analitikai kimutatási határ (*limit of detection*, LOD) legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb a hatósági MRL értéknél, és a mennyiségi meghatározási határ (*limit of quantitation*, LOQ) is az MRL értéke alatti. Kromatográfiás analitikai eljárások esetén a minta összetevőit valamilyen kromatográfiás rendszerben áramló rendszerben szilárd állófázison való megkötődési erősség szerint elválasztják, így az egyes komponensek külön-külön érkeznek a detektorhoz, és szolgáltatnak analitikai jelet. Növényvédő szerek és mikotoxinok kimutatása során az elválasztás történhet vékonyréteg-kromatográfia, valamint gáz- és folyadékkromatográfia segítségével. Napjainkra a legelterjedtebb módszerre a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia vált. Ezen elválasztási módszereket különféle detektálási módszerekkel (például fluoreszcencia, UV vagy diódasoros detektálás) kombinálják, az alapvetően nem poláros, illékony vegyületek (növényvédő szerek) meghatározására alkalmas gázkromatográfiás módszert emellett elektronbefogásos detektorral például szerves klórvegyületek meghatározására, lángfotometriás detektorral kén- és foszfortartalmú vegyületek meghatározására vagy nitrogén-foszfor detektorral nitrogén- és foszfortartalmú vegyületek meghatározására alkalmazzák. A legtöbb kémiai információt (fragmentum- és molekulatömeg) a tömegspektrometriás vagy több tömegspektrométer egymás után kapcsolásával a tandem tömegspektrometriás detektálás szolgáltatja. A tömegspektrometriás detektálás mellett az összes említett módszerhez viszonyítva nagyobb érzékenységet és pontosságot, valamint jobb reprodukálhatóságot mutat. Az olyan korlátozó tényezők, mint például a származékképzés szükségessége a tömegspektrometriával kapcsolt folyadékkromatográfiás módszereket előtérbe helyezték az ugyanilyen detektálással kapcsolt gázkromatográfiás módszerekkel szemben. Nem illékony és/vagy nem hőstabil növényvédő szerek, valamint a termikusan érzékeny mikotoxinok vizsgálatára a folyadékkromatográfiás módszerek hatékonyak. Minta-előkészítés tekintetében a hagyományos szerves oldószeres kivonás (folyadék–folyadék-extrakció, szilárd–folyadék-extrakció) mellett számos egyéb eljárást is alkalmaznak, például a szilárd fázisú extrakció, a szilárd fázisú mikroextrakció, a szuperkritikus folyadékextrakció módszereket, valamint mind gyakrabban a diszperzív QuEChERS (*Quick Easy Cheap Rough and*



*Safe*) eljárást vagy az immunaffinitási oszlopokat. Az oldószer és a minta-előkészítési módszer megválasztása nagyban befolyásolja a kivonás sikerességét. A megfelelő oldószer olcsó, használójára nézve biztonságos és csökkenti a mérési eredményeket befolyásoló körülmények előfordulási esélyét. Erre a célra leggyakrabban metanol és víz vagy acetonitril és víz különböző arányú elegyét használják a mikotoxinok analízise során (AGRIPOULOU et al. 2020). A kromatográfiás vizsgálatokhoz a minta-előkészítés szinte mindig összetett folyamat, amely szakképzett munkaerőt igényel, a költség- és az időigény megnövekedésével jár, így ezek a módszerek *in situ* monitorozási vizsgálatok végzésére általában nem alkalmasak (SURI et al. 2009). Jelenleg erős trend mutatkozik az egyidejűleg több növényvédőszer-maradék (SAMSIDAR et al. 2018, RÖSCH et al. 2023) vagy mikotoxin (KRSKA és MOLINELLI 2006, NUNES et al. 2021) kimutatására alkalmas módszerek irányába.

### **2.3.1. Műszeres analitikai módszerek zearalenon (ZON) és glyphosate meghatározására**

ZON meghatározására számos analitikai módszer létezik, melyek a minta összetett voltától és egyéb körülményektől függően a mérési alapelvben vagy a minta-előkészítés folyamatában is eltérhetnek egymástól. Az olyan klasszikus kromatográfiás eljárások esetében, mint a nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (TURNER et al. 1983, MAJERUS et al. 2009, SEBAEI et al. 2012), a vékonyrétegekromatográfia (SCOTT et al. 1970, SOARES 1992, LARIONOVA et al. 2011), a tömegspektrométerrel kapcsolt gázkromatográfia (THOUVENOT és MORFIN 1979) vagy folyadékkromatográfia (JODLBAUER et al. 2000, DE SANTIS et al. 2017, YAN et al. 2018), mind a LOD, mind a LOQ alacsony, de általában az összetett minta-előkészítési folyamat miatt időigényes mérési technikák, melyek speciális műszerezettséget igényelnek.

Ezek a jellemzők az elmúlt években *glyphosate* meghatározására fejlesztett műszeres analitikai módszerekre is igazak (KODAMA et al. 2008, QIAN et al. 2009, SONGA et al. 2009, SÁNCHEZ-BAYO et al. 2010). A *glyphosate* koncentrációját terményekben, élelmiszerben és talajban általában kromatográfiás módszerekkel határozzák meg (STALIKAS és KONIDARI 2001). Ezek a módszerek származékképzési folyamatot is tartalmaznak, mely az analitikai módszertől és a detektálás típusától függ. Gázkromatográfiás mérés esetén a származékképzés a kiindulási vegyület polaritásának és illékonyságának növelése érdekében szükséges (KATAOKA et al. 1996, TSENG et al. 2004). Ugyancsak szükséges a származékképzés UV-VIS és fluoreszcenciás detektálásos kromatográfia vagy kapilláris elektroforézis módszerek alkalmazása esetén, mert a *glyphosate* sem kromofór, sem fluorofór tulajdonsággal nem rendelkezik, amely a mérésekhez szükséges (QIAN et al. 2009, DURÁN-MERÁS et al. 2005, FREUZE et al. 2007). Még LC-MS módszer használatánál is szükséges a származékképzés a molekula kromatográfiás

tulajdonságainak javításához (VREEKEN et al. 1998, IBÁÑEZ et al. 2006). Bár ezek a módszerek a *glyphosate* mennyiségi meghatározásra alkalmasak környezeti mintákban, idő- és költségigényesek, főleg nagy mintaszám esetén. További mérési lehetőség a kolorimetriás módszerek használata hidrogén-peroxiddal történő oxidálást követően (GLASS 1981), ám a mérési koncentrációtartomány itt viszonylag magas (1–20 µg/ml), és az agresszív reagens miatt a bepárlási lépésnél intenzív reakció fordulhat elő. Egy újabb módszernél a *glyphosate*-ot széndiszulfiddal reagáltatták, és az így kialakult ditiokarbamátcsoportot kelátorként használták (JAN et al. 2009). A rézzel való kelátképzés során alakuló sárga szín 435 nm hullámhosszon mérhető. A módszer hátránya, hogy a mintát a mérés előtt be kell töményíteni. Az UV-VIS detektálási módszerek egyikénél a származékképzést 9-fluorenil-metoxi-karbonil-kloriddal végezték, majd az abszorbanciát 265 nm hullámhosszon mérték (WAIMAN et al. 2012). A módszer mérési tartománya további fejlesztést követően 84 ng/ml – 21,8 µg/ml, a mérési eredmények megfeleltek a referenciaként alkalmazott tandem tömegspektrometriával kapcsolt nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás módszer eredményeinek. Ez az eljárás elsősorban talajminták mérésére alkalmas (ALBERS et al. 2009).

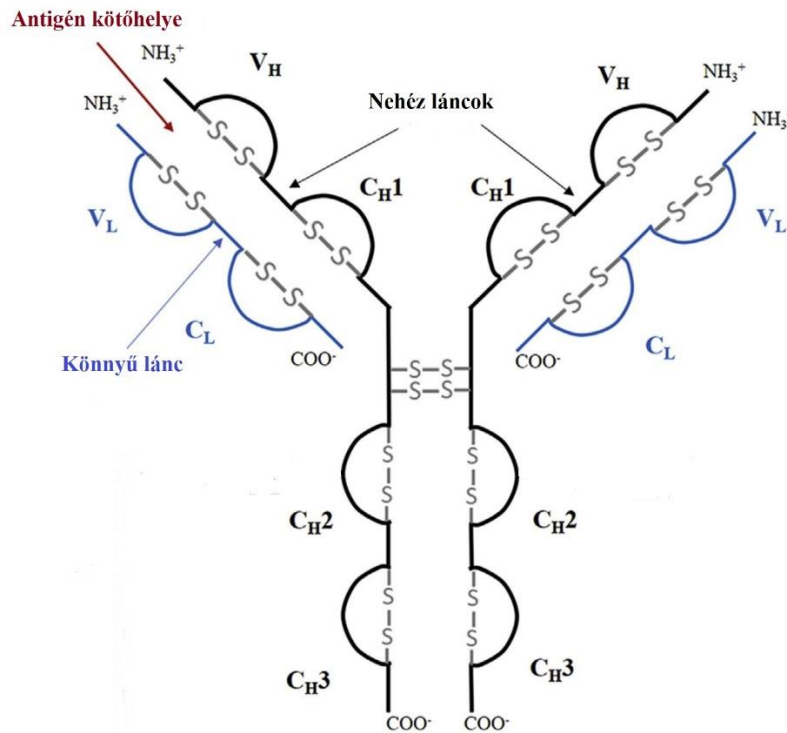
### 2.3.2. *Immunanalitikai módszerek*

A növényvédő szerek és mikotoxinok vizsgálatára fejlesztett analitikai módszerek másik nagy csoportját képviselik – a kromatográfiás rendszereken túl – azon teszt- vagy szenzortechnikák, amelyek a célvegyület elválasztástechnikái helyett szelektív felismerésére biológiai eredetű (antitest, aptamer) vagy szintetikus összetevőket (molekuláris lenyomatú polimer) alkalmaznak. E módszerekben a célvegyület és a felismerő reagens közötti szelektív reakció a specifikus kimutatás kulcsa. Elválasztási lépés ezekben a folyamatokban is szerepel, mivel a felismerési reakció valamelyik összetevőjét gyakran szilárd fázison rögzítik, hogy a kötődésre nem képes frakciót elválasszák a kötődöttől.

Mivel a felismerő elemként alkalmazott antitestek a gerincesekben működő immunrendszer kulcsreagensei, az antitestalapú bioanalitikai eljárásokat immunanalitikai vagy *immunoassay* módszereknek is nevezik. A célvegyület és az arra specifikus antitest kölcsönhatásán alapuló immunanalitikai módszerek közé tartoznak a klasszikus enzimjelzéses immunszorbens vizsgálatok (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), az azon alapuló új fejlesztett módszerek és az immunszenzorok is. Ezek a módszerek költséghatékonyak, érzékenyek, a szennyezők *in situ* monitorozására alkalmasak, ráadásul vizes oldatokban közvetlenül alkalmazhatók, melyeknek használhatóságát kiszélesíti, hogy specifikus antitestek megfelelő kémiai átalakítások nyomán kis molekulatömegű vegyületek ellen is előállíthatók (SURI et al.

2009). A specifikus antigén–antitest-kölcsönhatást módszertípustól függően használhatják például a célvegyület rögzítésére valamely felszínhez, illetve jelöléses módszerek esetében a jelölő rögzítéséhez a célvegyülethez vagy az antitestekhez. A célvegyületek lehetnek mikro- és makromolekulák, így növényvédő szerek, toxinok, de akár vírusfehérjék vagy – főleg humánegészségügyi és kutatási területen – az emberi szervezet saját fehérjéi, hormonjai és biomarkerei is (VASHIST és LUONG 2018, HAYRAPETYAN et al. 2023).

Az antitestek a gerinces élőlények immunrendszerének jelölőfehérjéi, melyek szinte végtelen variációban képződhetnek a szervezetben a különböző szervezeteiden anyagok (xenobiotikumok) ellen (TIJSSEN 1985). A kereskedelemben elérhetőek szintetikus antitestek is, de a vizsgálni kívánt célvegyületre specifikus antitesteket általában immunizálás (indukált antitesttermelés laboratóriumi állatokban) útján állítják elő. Az elmúlt évtizedek folyamatos fejlesztési munkájának eredményeként mára számos olyan technika létezik, mely ezen a specifikus antigén–antitest-kapcsolaton alapszik, ilyen például az ELISA, mely a módszerek közül az egyik legkorábban kifejlesztett, így a ma elérhető újabb formátumok többségének az alapját képezi (VASHIST és LUONG 2018). A fentebb említett antigén–antitest-kapcsolat specifikitását az antitest adott antigént felismerő kötőhelye biztosítja. Az antigének szerkezeti felépítésének diverzitásából következően az antitest által felismert szakasz (epitóp) ugyancsak nagyon változatos. Ezt a változatosságot követik le az antitest kötőhelyei (paratópok), melyek a fehérje N-terminális szakaszán található variábilis (változékony) régióban helyezkednek el. A fehérje további része a C-terminális szakaszon az úgynevezett konstans régió, mely sokkal kevésbé változatos, és az effektor sejtekkel vagy molekulákkal való kapcsolódást biztosítja (BARKER 2019). Az emberi szervezetben az antitesteknek öt osztályát ismerjük, melyek közül az *immunoassay* vizsgálatokhoz legáltalánosabban használt az immunglobulin G (IgG). Az IgG fehérjeszerkezete mutatja azt a jellegzetes Y-formát (3. ábra), melyet a köztudatban az antitestekhez kapcsolnak. Négy polipeptidláncból áll, melyekből kettő a belső oldalon található egyforma nehéz lánc, kettő pedig a külső oldalon található egyforma könnyű lánc. A könnyű láncok egy-egy konstans és egy-egy variábilis domént tartalmaznak, míg a nehéz láncok három-három konstans régió mellett egy-egy variábilis domént.



3. ábra: Az antitestek felépítésének sematikus ábrája (VASHIST és LUONG 2018 alapján). C<sub>H</sub>1-3: a nehéz láncok konstans doménjei, C<sub>L</sub>: a könnyű láncok konstans doménjei, V<sub>H</sub>: a nehéz láncok variábilis doménje, V<sub>L</sub>: a könnyű láncok variábilis doménje.

A könnyű és nehéz láncok variábilis régióját kovalens diszulfidhidas kötések és nem kovalens kölcsönhatások kötik össze, és együtt alakítják ki az antigén kötőhelyeit az Y alak karjainak végén. Az IgG nagyjából 440 aminosavból épül fel, molekuláris tömege körülbelül 150 kDa (ebből a könnyű lánc körülbelül 25 kDa, míg a nehéz lánc körülbelül 50 kDa). A további négy immunglobulin-osztály (IgM, IgA, IgE és IgD) eltérő nehézláncokkal rendelkezik. Az IgD, az IgE és az IgG monomer, az IgA általában négy kötőhellyel rendelkező dimer (bár monomer formában is előfordul), míg az IgM pentamer 10 kötőhelyet tartalmaz (VASHIST és LUONG 2018). A különböző antitestek a szervezetben eltérő funkciókkal rendelkeznek a különböző immunválaszokban.

Az *immunoassay*-vizsgálatok során a mérések pontosságát nagyban befolyásolja az antitestek specifitása és érzékenysége, továbbá a potenciálisan előforduló keresztreakciók és mátrixhatások. Mindkét utóbbi jelenség a vizsgált mintában esetlegesen előforduló egyéb összetevőknek a mérési jelre gyakorolt befolyásoló hatását tükrözi. Az antitestek olyan anyagokhoz is kötődnek, amelyek a célvegyületével azonos vagy ahhoz hasonló epitópot tartalmaznak, ezt nevezzük keresztreakciónak (LIPMAN et al. 2005). Amikor pedig a vizsgált mintaközegben (mátrixban) olyan összetevők vannak jelen, amelyek nem antigénspecifus módon befolyásolják az antitest

kötőképességét, a hatást mátrixhatásnak szokás nevezni. Mindezeket közvetlenül befolyásolja, hogy az eljárásokban monoklonális vagy poliklonális antitesteket alkalmaznak-e (LIPMAN et al. 2005). A szervezetben az immunválasz során adott xenobiotikum (immunogén) ellen különféle specifitáspofilú antitestek termelődnek, melyek a célvegyület eltérő részeihez kötődhetnek, és mindegyiket külön-külön B-sejtek (klónok) termelik. Ezeket az antitesteket ezért poliklonális antitesteknek nevezzük. A sokféle B-sejt közül az egyes klónok elkülöníthetők, és az egyedi klónok által termelt antitesteket monoklonális antitesteknek nevezzük, melyekben az összes specifikus felismerőhely a célvegyület azonos epitópjára irányul. Immunizálás során az antigént az állati szervezetbe juttatják, ahol megkezdődik az ellenanyagok termelődésének folyamata. Ezt követően bizonyos idő letelte után a vérből tisztítás útján kinyerhető az antiszérum, ami a poliklonális antitesteket tartalmazza és *immunoassay* tesztekben használható. A natív poliklonális antitesteket állatok, például ló, nyúl, kecske, egér vagy béka (ISHIKAWA 1999) laboratóriumi immunizálása során nyerik ki, míg a monoklonális antitesteket egérből nyert, antitesteket termelő B-sejtekből ezt követő hibridizációs eljárással sejt kultúrában termeltetik. Poliklonális antitestek esetében a keresztreaktivitás előfordulásának esélye nagyobb, mely alacsonyabb specifitást eredményezhet. Az *immunoassay*-vizsgálatok alkalmasak a mintában jelen levő célvegyület koncentrációjának meghatározására, melyhez a mintákat a célvegyület ismert koncentrációjú hígítási sorának pontjaira illesztett sztenderd görbéhez kalibrálják, illetve hasonlítják (NISTOR és EMNÉUS 2005).

A különböző *immunoassay*-típusok többféleképpen osztályozhatók. Az általánosan használt felosztások szerint a jelölést alkalmazó módszer lehet homogén fázisú (nem szeparatív) vagy heterogén fázisú (szeparatív) rendszer; osztályozható versengő (kompetitív) vagy nem versengő (nem kompetitív) rendszerekre; csoportosítható rögzített antigén- és rögzített antitest-alapú rendszerekre a rögzítésre kerülő immunreagens jellege szerint; illetve besorolható direkt (közvetlen – melyben a méréshez használt jelölést (lásd később) a célvegyületen vagy az arra specifikus antitesten helyezik el) és indirekt (közvetett – ahol a jelölés valamilyen további összetevőn található) módszerekre.

A homogén (nem szeparatív) módszerek esetében a specifikus antigén–antitest-kötődés és a reakció eredménye is a fázisban (oldatban) történik, így a szabadon maradt és a jelölt antitesttel kapcsolatba lépett molekulák szétválasztása nem történik meg. Ezek a módszerek viszonylag egyszerűek és könnyen automatizálhatók, azonban a mátrixhatás előfordulásának esélye nagyobb, mint a heterogén módszerek esetében (KHANNA 1991, DINIS-OLIVEIRA 2014). Heterogén (szeparatív) módszereknél az elválasztást a szilárd fázis (mely legtöbbször a vizsgálathoz használt mikrotiterlemez felszíne) segítségével végzik. A szilárd fázison rögzítik az

immunkomplex valamelyik tagját, melyhez megfelelő inkubáció során a másik komponens tud kötődni a folyadékközegből. Mivel a felszínen rögzített összetevőhöz az oldatból meg nem kötődött komponenseket a rendszerből eltávolítják (mosás), a célvegyület jelenlétét, koncentrációját vagy esetleges hiányát a mintából a felszínhez rögzült frakció mérésével végzik el (JOHANNSSON 1991). A le nem kötődött frakciót legtöbbször mosással, esetleg paramágneses részecskék segítségével távolítják el a mérés előtt.

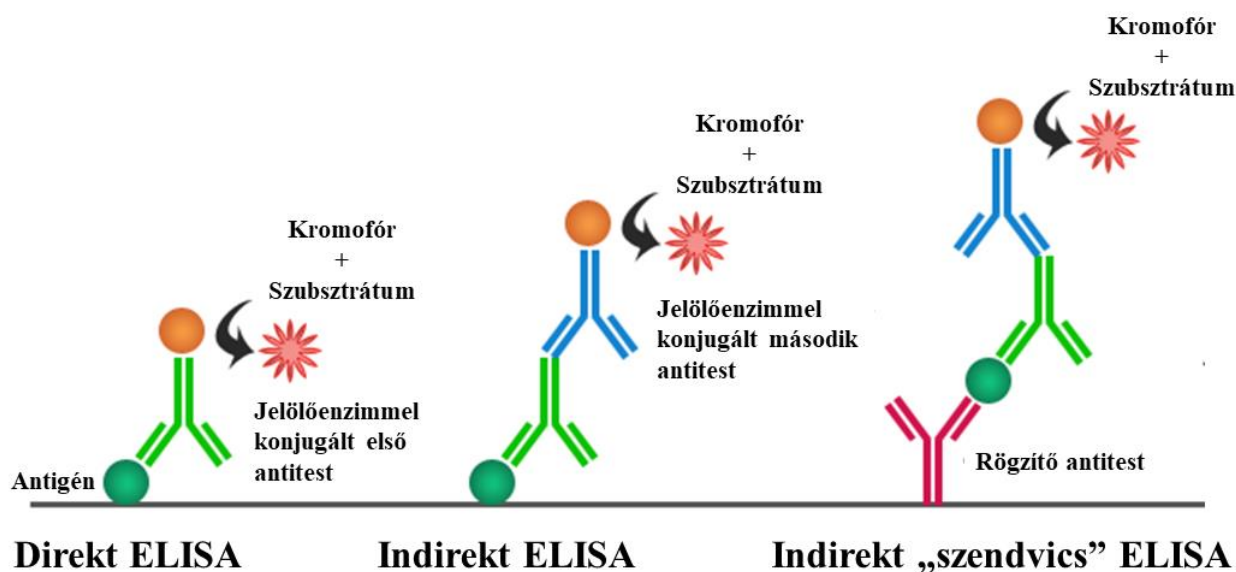
A versengő módszereket általában kis molekulatömegű célvegyületek (például xenobiotikumok) esetén alkalmazzák. Működési elvük technikai alapját az képezi, hogy a rendszerben egy időben van jelen a célvegyület egyrészt ismeretlen koncentrációban a mintában, másrészt előre meghatározott mennyiségben a rendszerbe juttatva (például a mikrotiterlemez felszínéhez kötve vagy előre jelölt formában). Ehhez a rendszerhez adják hozzá az antitestet, mely a célvegyülethez kapcsolódni tud. A versengés a célvegyület két eltérő formája között folyik a specifikus antitest kötőhelyeiért (DARWISH 2006). A módszer legszélesebb körben elterjedt formája a szilárd felszínhez kötés, ilyen esetben a le nem rögzült antigén–antitest-komplexet kimossák a rendszerből. Ha a jelet az antitesthez kötődött, előre jelölt célvegyület generálja, a jelerősség a megfelelő koncentrációtartományban fordítottan arányos a célvegyület koncentrációjával a mintában, ilyen például a homogén fázisú fluoreszcenciapolarizációs *immunoassay* vagy a heterogén fázisú ELISA. Ha azonban a mintából származó jelöletlen célvegyület kötődése jár jelfejlődéssel, a jel erőssége a megfelelő koncentrációtartományban egyenesen arányos a célvegyület a koncentrációjával, például a homogén fázisú enzimmultiplikációs *immunoassay* esetében (DINIS-OLIVEIRA 2014).

A nem versengő, avagy immunometriás (más néven antigénszendvics) módszer általában két antitestet használ, melyek a célvegyület különböző részeit ismerik fel. A célvegyületek viszonylag nagy molekulatömegűek, például fehérjék, peptidek vagy poliszacharidok, így elfér rajtuk a két eltérő epitóp, melyekhez a két különböző antitest kötődik (LIU et al. 2018). Alapesetben a rögzítő (*capture*) antitestet nagy feleslegben kötik valamilyen szilárd felületre, például mikrogöngyökre vagy a mikrotiterlemez felszínére. A minta inkubációs ideje alatt a célvegyület kötődik ezekhez a rögzített antitestekhez. Mosás után a rendszerhez adagolják a jelzett második antitestet, kialakítva az úgynevezett „szendvics” formátumot (antitest–célvegyület–antitest). A le nem kötődött második antitesteket mosással eltávolítják a rendszerből, majd – ha szükséges – hozzáadják a szubsztrátumot. A jelintenzitás nem versengő módszerek esetén a megfelelő koncentrációtartományban egyenesen arányos a célvegyület koncentrációjával (DINIS-OLIVEIRA 2014).

A jelölés típusa további osztályozásra ad lehetőséget, mely alapján a módszer lehet például radioizotópos, elektrokémiai vagy enzimjelöléses, de az avidinhez (streptavidinhez) való nagy affinitású kötődése miatt alkalmas jelölő lehet a biotin is, illetve jelölőként használnak többek között liposzómákat, latex- és kolloid fémrészecskéket, valamint fluoreszcens és kemilumineszcens anyagokat is (MIYAI 1991, KHANNA 1991).

### 2.3.3. A klasszikus enzimjelzéses immunszorbens vizsgálatok típusai

A klasszikus ELISA a számos *immunoassay*-típus közül talán a legelterjedtebb, esetében a jelölés olyan enzimmel történik, amely a szubsztrátum hozzáadása után mérésre alkalmas színreakciót katalizál. A célvegyületre specifikus antitesthez (vagy a kialakított immunkomplex más komponenséhez) tehát valamilyen jelölőenzimet kapcsolnak, erre általában alkalikus foszfatáz, tormaperoxidáz (HRP) vagy  $\beta$ -galaktozidáz enzimet használnak (SAKAMOTO et al. 2018). Bár az ELISA módszerek száma meglehetősen nagy, alapvetően az összes besorolható a fent említett három nagyobb csoport (direkt, indirekt, szendvics) valamelyikébe (4. ábra).



4. ábra: A direkt, az indirekt, és az indirekt szendvics ELISA sematikus rajza.

Alkalikus foszfatáz enzim használata esetén a működés optimális pH-tartománya 9–10, szubsztrátuma lehet például a p-nitrofenil-foszfát, a színreakció eredménye (p-nitrofenol) 405 nm hullámhosszon mérhető (PORSTMANN és KIESSIG 1992, SAKAMOTO et al. 2018). Az általában *Escherichia coli*-ből származó  $\beta$ -galaktozidáz enzim működésének optimális pH-tartománya 6–8, leggyakrabban alkalmazott kromofór színreagensei pedig az o-nitro-fenil- $\beta$ -D-

galaktopiranozid és a klórfenol vörös- $\beta$ -D-galaktopiranozid, melyeknek reakciótermékei (a 2-nitro-fenol és a klórfenol vörös vagy 3,3-bisz-(3-klór-4-hidroxi-fenil)-3H-2,1 $\lambda$ <sup>6</sup>-benzoxatiol-1,1-dion) 420 és 574 nm hullámhosszon mérhetők. Ezen kívül alkalmaznak még többek között glükóz oxidáz, peroxidáz és ureáz enzimeket is, de az ELISA módszer jelölőenzimeit közül egyértelműen a leggyakrabban alkalmazott a HRP, mely számos kis molekulaméretű színreagens oxidációját katalizálja hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) jelenlétében (PORSTMANN és KIESSIG 1992). Ez az enzimátikus folyamat a pH radikális csökkentésével leállítható. A HRP kis molekulaméretű színreagensi csoportjába tartozik a 2,2'-azino-bisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)-diammóniumsó, a 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB) és az 1,2-fenilén-diamin-hidroklorid (OPD) is.

A hagyományos ELISA-vizsgálatokat 96- vagy 384-lyukú mikrotiterlemezekon végzik. A módszer fejlődésével megjelentek olyan változatok, mint az enzimjelzéses immunspot módszer, amely az ELISA alapelvein nyugszik, de a célvegyület meghatározása helyett inkább a célvegyületet termelő sejtek számának megbecslésére alkalmas. Citokin célvegyület esetén például a vizsgálathoz használt membránon megjelenő pontok a citokinkiválasztó sejtek rövid távú stimulációjának eredményei, melyek számolásával megadható az antigénspecifikus sejtek száma. Bár a módszert eredetileg antitestet termelő sejtek mennyiségi meghatározására fejlesztették ki, ma már használják vakcinakutatásokban és a rák elleni kutatásban is (MASHISHI és GRAY 2002). További példák a módszer fejlődésére a *multiplex microarray* ELISA, mely a hagyományos technikával ellentétben a mikrotiterlemezek azonos üregében egyszerre több célvegyület detektálására is képes, vagy a nano-ELISA rendszerek, melyeket az élelmiszerbiztonság területén gyakran alkalmaznak nagy érzékenységük miatt (LIN 2015, WU et al. 2019).

Jelöléses *immunoassay* vizsgálatok során a mennyiségi meghatározásra alkalmas jel nem csak a látható fény hullámhossz-tartományában mérhető színreakció eredménye lehet: luminofór reagens (pl. luminol, 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindion) használata esetén kemilumineszcencia mérhető (SAKAMOTO et al. 2018), fluorofór (pl. 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazin, ADHP) alkalmazásával pedig ELFIA alakítható ki. Az ELFIA tehát mind formátumában, mind munkafolyamatában megegyezik a klasszikus ELISA módszerrel, sajátossága csupán annyi, hogy a jelölőenzim fluoreszcens jelet eredményező folyamatot katalizál. A leggyakrabban használt jelölőenzimek ELFIA esetében is a HRP, az alkalikus foszfatáz vagy a  $\beta$ -galaktozidáz, a színreagens azonban nem kromofór, hanem fluorofór (esetleg mind a kettő). Ugyanazon enzim használatával a mérés akár ezerszer érzékenyebb lehet fluorofór, mint kromofór reagens esetén (OZINSKAS 2002).



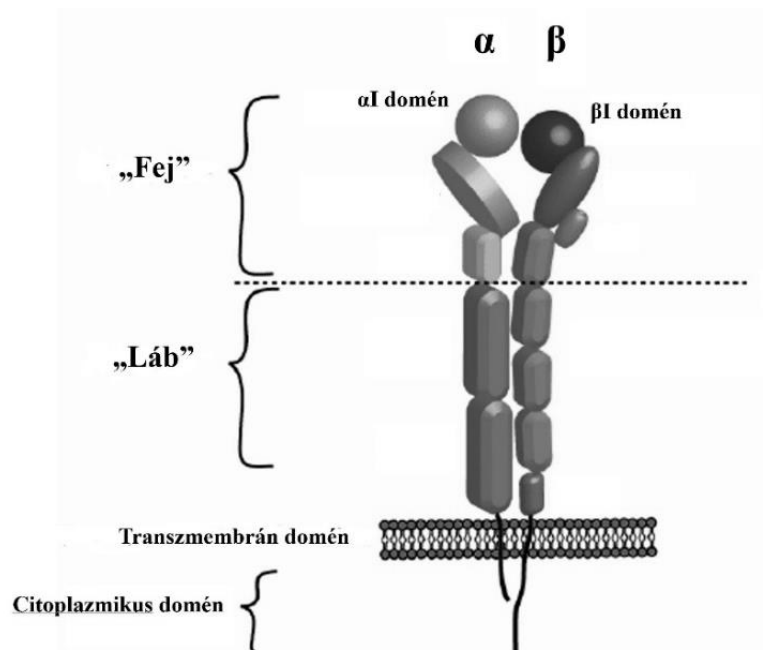
### **2.3.4. Immunanalitikai módszerek zearalenon (ZON) és glyphosate mennyiségi meghatározására**

Mind *glyphosate*, mind ZON meghatározására alkalmaznak immunanalitikai módszereket (CAGLAYAN et al. 2020, VALLE et al. 2019), mivel költséghatékony eljárások, melyek több célvegyület egyidejű, gyors detektálására alkalmasak (PESTKA és ABOUZIED 1995, MARAGOS és KIM 2004, HAO et al. 2017, RENAUD et al. 2019). Ebben a kategóriában egyértelműen az ELISA a legelterjedtebb módszer (LIU et al. 1985, THOUVENOT és MORFIN 1983, PICHLER et al. 1998, RADOVÁ et al. 2001, THONGRUSSAMEE et al. 2008, TANG et al. 2014, LIU et al. 2015, DONG et al. 2018). Az immunanalitikai módszerek fejlődésével a mérések érzékenysége javult, így a LOD és LOQ értékek megközelítik a kromatográfiai módszerekét. Jelenleg az immunszenzorok jelentik a legnagyobb fejlődési lehetőséget, melyek a mikrotiterlemez- és immuncsíkalapú módszereknél érzékenyebb mérésre képesek (VAN DER GAAG et al. 2003, URRACA et al. 2005, CHUN et al. 2009, HOSSAIN és MARAGOS 2018, GOUD et al. 2019, NABOK et al. 2021, SZÉKÁCS et al. 2021).

### **2.4. Az integrinek jellemzése**

A szerves mikroszennyezők megjelenése a környezetben annak terhelése mellett egyben újabb lehetséges expozíciós útvonalakat jelent, melyeken keresztül az élő szervezeteket elérhetik. Emiatt e vegyületek élettani hatásainak vizsgálata elengedhetetlen, s kiemelten igaz ez az emberi egészségre gyakorolt hatásokra. Egy korábbi vizsgálatunk során kimutattuk a *glyphosate* gátló hatását  $\alpha\beta3$  integrin kötődésére RGD felismerőszekvenciájához (SZÉKÁCS et al. 2018). A jelen tanulmányban alkalmazott ELISA receptortesztet ezt az újonnan felismert hatást vizsgáltuk az integrinfehérjék és a lehetséges gátlószerek szélesebb körében. A terület háttéréül az alábbiakban bemutatom az integrinfehérjéket és élettani szerepüket.

Az integrinek a sejtek felszínekhez és egymáshoz történő kapcsolódását szabályozó kétirányú jelző- és adhézions receptorok, melyek fontos szerepet töltenek be az egyedfejlődés során, a sejt-sejt-kölcsönhatásokban, valamint a patológiai folyamatokban. Felépítésük és elhelyezkedésük szerint transzmembrán,  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységéből álló heterodimerek (5. ábra).



5. ábra: Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységből álló heterodimer, transzmembrán receptorfehérje integrinek szerkezeti felépítése (BAHMBERG et al. 2009 alapján).

Gerinces szervezetekben és bizonyos gerinctelenekben is megtalálhatók, sőt az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységekkel homológ aminosav-szekvenciák prokariótákban is jelen vannak (JOHNSON et al. 2009). Az integrinek egyik legfontosabb feladata a sejt és az extracelluláris mátrix (ECM) közötti kapcsolat fenntartása. Az ECM a kötőszöveti sejtek közötti térben található nem sejtes makromolekuláris hálózat, melynek alkotói például kollagének, proteoglikánok, lamininek és egyéb más glikoproteinek. A mátrix összetevői egymással is, valamint a sejt felszíni receptorokkal is kölcsönhatásba léphetnek. A sejt felszíni receptorok e kölcsönhatásokkal a külső jeleket továbbítják az ECM-től a sejt belseje felé, ezzel állandó kapcsolatot fenntartva a sejt és külső környezete között, valamint ezen keresztül különböző sejt funkciókat szabályozva (THEOCHARIS et al. 2016).

Az extracelluláris mátrixban (ECM) található ligandumok (olyan ECM-fehérjék, melyeket a receptor specifikusan felismerni és megkötni képes) specifikus kötőhelyei (mindkét alegység esetén) az integrinreceptorok sejt felszínén kívül eső, úgynevezett „feji” szakaszán helyezkednek el (BARCZYK et al. 2010). A sejtmembrán belső oldalán található citoplazmikus szakasz köti össze az integrineket a sejt vázzal, mely a jelátviteli útvonalat aktiválja, és lehetővé teszi a kémiai és mechanikai jelátvitelt (MORSE et al. 2014). Eltérő szerkezetüktől függően az integrinek különböző ECM-fehérjéket képesek megkötni, típusonként egyet vagy többet, melyek átfedésben lehetnek (HAAS és PLOW 1994). A kötődés által számos sejtélettani folyamatot szabályozhatnak, például a sejt szaporodást, a motilitást és a differenciációt (MIRANTI és BRUGGE 2002). A család

tagjait azonosították emlősökben, csirkében és zebra-dánióban (*Danio rerio*), de olyan alacsonyabb rendű eukariótákban is, mint a *Caenorhabditis elegans*, melyben két  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -alegységből két különböző integrin épül fel, vagy az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), melyben öt  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -alegységből öt van jelen. Az alegységeknek számos típusa létezik, emberi szervezetben 18  $\alpha$ - és 8  $\beta$ -alegységet azonosítottak, melyek különböző kombinációiból eddig 24 integrint ismerünk (TAKADA et al. 2007). A 24 integrin négy csoportba sorolható: a leukocita-, a kollagén-, a laminin- és az RGD szekvenciát felismerők csoportjába (MEZU-NDUBUISI és MAHESHWARI 2021). A ligandum megkötését követően az integrinek konformációs változásokon mennek keresztül, melyek a külső behatásra adott válaszként számos sejten belüli útvonalat aktiválhatnak (LUO et al. 2007). Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységek több domént tartalmaznak, közöttük rugalmas, alakváltozást lehetővé tevő összekötő szakaszokkal. Minden alegységben található egy nagyobb extracelluláris, ún. „feji” rész, egy egyszeres membránátívelő szakasz és egy rövid, általában strukturálatlan citoplazmatikus szakasz a C-terminális régióban (CAMPBELL és HUMPHRIES 2011). Az extracelluláris részt  $> 700$ , a transzmembránt  $> 20$ , a citoplazmatikust pedig 13–70 aminosav alkotja. A ligandum felismerése szempontjából a legfontosabb rész az I domén. Az  $\alpha$ I domén az  $\alpha$ -alegységek mintegy felében jelenik meg, míg a  $\beta$ -alegységek mindegyike tartalmazza a  $\beta$ I domént. Azon integrinek esetében, ahol az  $\alpha$ I domén megjelenik, ez az elsődleges ligandumkötő régió. Amennyiben az integrin  $\alpha$ I domént nem tartalmaz, a kötőhely kialakításában mindkét alegység közvetlenül részt vesz (NIU és CHEN 2011). A különböző integrinek közötti eltérések függenek az általuk megkötött ligandum(ok)tól, a ligandumkötési képességüket aktiváló mechanizmusoktól, attól, hogy a sejtvezeték mely komponenseihez kapcsolódnak, valamint, hogy a sejten belül milyen jelátviteli útvonalakat aktiválnak (SHIMAOKA et al. 2003). A legtöbb  $\beta$ -alegység intracelluláris szakasza tartalmazza a talin és a kindlin fehérjék (általános integrinaktivátorok) konzervált felismerőmotívumát, melyeknek bekötődése az  $\alpha$  és  $\beta$ -alegységek transzmembrán és intracelluláris szakaszai közötti kapcsolatok megszakításával olyan konformációs változásokat indukál az extracelluláris doménben, mellyel az integrin aktiválódik, azaz kötőhelye az ECM-ben található ligandumfehérje számára elérhetővé válik. Az  $\alpha$ -alegységek intracelluláris szakaszának membránközeli régiója tartalmazza a konzervált glicin-fenilalanin-fenilalanin-lizin-arginin motívumot, mely a két alegység sejten belüli szakaszai közötti kapcsolatok fenntartását segíti elő. A különböző  $\alpha$ -alegységek membrántól távolabb eső intracelluláris szakaszai mind hosszban, mind elsődleges szerkezet tekintetében erősen eltérnek, szerepük az integrinek aktivációjában és jelátvitelében nem teljesen tisztázott (THINN et al. 2018). A fentebb említett aktiváció tehát egyrészt olyan gyors, reverzibilis változásokat jelent az integrin extracelluláris doménjének konformációjában, melyek eredményeként az integrin affinitása a

ligandum felé megnő. A legtöbb integrin többlépéses aktivációs folyamat során kerül zárt konformációból nyitott, nagy ligandumkötő képességű állapotba. Zárt konformációban gyakran kapcsolódnak citoplazmatikus inaktiváló fehérjékhez, és az alegységek intracelluláris szakaszai közel helyezkednek el egymáshoz. Az intracelluláris aktiváció eredményeként (bentről kifelé irányuló jelzés) az integrin extracelluláris doménje kinyúlik, az alegységek sejten belüli szakaszai eltávolodnak egymástól, és a  $\beta$ -alegység egy sejtvázat alkotó fehérjéhez kötődik (például talin, vinkulin, ezrin vagy radixin), mely aktiválja az integrint és a sejtvázat aktinjához kapcsolódik. A megnövekedett ligandumkötő képesség következtében létrejövő interakció az aktív integrin és az ECM-ben található ligandum között aktiválja a kintről befelé irányuló jelzést a fokális adhézions kinázon, az integrin adhézions komplex proto-onkogén tirozin-protein kináz enzim által mediált foszforilációján vagy más sejtvázkomponenseken keresztül, melyek számos sejten belüli jelátviteli útvonalat aktiválnak. Ezen kétirányú jelzőplatformon keresztül a sejtek képesek finomhangolni a környezetükre adandó választ, és szabályozni a sejtfunkciókat a környező ECM felől érkező jelek szerint (CHASTNEY et al. 2021). Működési zavaruk az alapvető sejt tulajdonságok megváltozását vonhatja magával, mely embrionális szakaszban fejlődési rendellenességeket okozhat, például a szövetek nem megfelelő fejlődését vagy szerkezeti hiányosságát, de már a beágyazódást is gátolhatja, végső esetben pedig a magzat elhalását eredményezheti (NIU és CHEN 2011). Kifejlett szervezetben a nem megfelelő sejtadhézió és -migráció magával vonhatja bizonyos betegségek kialakulását, beleértve olyan gyulladással megbetegedéseket, mint a reumás ízületi gyulladás, a gyulladással járó bélbetegségek vagy az asztma, valamint szív-érrendszeri betegségeket, trombózist és rákos megbetegedéseket is okozhat (HUVENEERS et al. 2007).

#### **2.4.1. RGD-specifikus integrinek**

Az RGD (arginin–glicin–aszparaginsav) tripeptidszekvenciát Pierschbacher és Ruoslahti írta le először 1984-ben, mint a legrövidebb felismerőmotívumot. Emberi szervezetben nyolc integrin tudja azonosítani: az  $\alpha 5\beta 1$ , az  $\alpha 8\beta 1$ , az  $\alpha v\beta 1$ , az  $\alpha v\beta 3$ , az  $\alpha v\beta 5$ , az  $\alpha v\beta 6$ , az  $\alpha v\beta 8$  és az  $\alpha 11\beta 3$  (BARCZYK et al. 2010, PIERSCHBACHER és RUOSLAHTI 1984). Számos ECM fehérje tartalmazza ezt a szekvenciát, például a fibrinogén, a fibronectin, a vitronektin, a látens transzformáló növekedési faktor  $\beta$ - és transzformáló növekedési faktor  $\beta 3$ -kötő proteinek vagy a nefronektin (BARCZYK et al. 2010). Bár a család minden tagja felismeri az RGD-szekvenciát, mert a  $\beta$ -alegységük tartalmazza a receptorát, az  $\alpha$ -alegységük további kötőhelyei a ligandumspecifitást és a kötődési képességet befolyásolhatják (TAKAGI 2004). Mivel biokémiai szerepük széles palettát fed le a sejtadhézió, a sejtszaporodás, a sejt vándorlás és a véredényképzés során, az RGD-specifikus integrinek gyakori célcsoportot jelentenek orvosi diagnosztika,

képződés és kísérleti gyógyszeres kezelések területén fibrózisos betegségek, reumás ízületi gyulladás és trombózis esetén (WANG et al. 2019, WILKINSON et al. 2021, ZHANG et al. 2021). Az elmúlt évtizedben az RGD-szekvenciát tartalmazó ligandumokat a rákkutatásban is vizsgálták lehetséges gyógyszerként, mivel bizonyos integrinek nagyobb mértékű kifejeződését figyelték meg több típusú rákos megbetegedés során. Az  $\alpha\beta3$ -integrin megemelkedett szintjét például kapcsolatba hozták bőr-, emlő-, prosztatá-, hasnyálmirigy-, petefészek-, méhnyak- és vastagbélrákkal, valamint agydaganat kialakulásával is (CHENG és YI 2019). Az  $\alpha5\beta1$  közvetlenül befolyásolja a csontszövetek fejlődését, a T-sejtek működését és túlélését, valamint szoros összefüggésben áll a sejtöregedés folyamatával. Megemelkedett kifejeződése tüdőrák és melanoma esetében a tumor metasztázisát indukálta, ezzel szemben emlő- és vastagbélrák sejtvonalakra tumorszuppresszív hatást gyakorolt (HOU et al. 2020).

A fentebb említett  $\alpha\beta3$ - és  $\alpha5\beta1$ -integrinek kifejeződnek endotéliumsejteken, limfocitákon, makrofágokon, vérlemezkéken és csontvelő-össejteken (emellett az  $\alpha\beta3$  kifejeződik neutrofil sejteken, simaizomsejteken, csontfaló óriássejteken és fibroblasztsejteken is), míg az  $\alpha\text{IIb}\beta3$  elsősorban csontvelő-óriássejteken, vérlemezkéken és bizonyos tumorsejteken fejeződik ki (SCHAFFNER és DARD 2003). A véráramban található vérlemezkéken általában inaktív állapotban található, aktivációját olyan agonisták stimulációja váltja ki, mint a kollagén, az adenzin-trifoszfát, a trombin vagy az epinefrin. Aktivált állapotban megkötött ligandumai közül a fibrinogén és a von Willebrand-faktor hídként funkcionálhat az egymáshoz közeli vérlemezkék felszínén található  $\alpha\text{IIb}\beta3$ -integrinek összekötéséhez, míg más ligandumok megkötése esetén a vérlemezkék összetapadását szabályozza (BLEDZKA et al. 2013).

#### **2.4.2. RGD-receptorhoz kötődő humán patogének**

Vannak olyan humán patogén baktériumok, gombák és vírusok, melyek az integrineken keresztül kötődnek a célsejtekhez. A *Staphylococcus aureus* csomósodási faktor A fehérjéje kötődik a fibrinogénhez és a von Willebrand-faktorhoz, a *Streptococcus pneumoniae* fő sejtfaalkotó fehérjéje pedig a vitronektinhez, melyen keresztül a baktériumokat az  $\alpha\beta3$ -integrinhez kapcsolják (CLAES et al. 2017, VOSS et al. 2013). Az *Escherichia coli* külső membránjában levő A-típusú fehérje tartalmazza az RGD-motívumot, így közvetlenül kötődik az  $\alpha\beta3$ -integrinhez. Bizonyos vírusoknál feltételezhető, hogy az RGD kifejeződése a sejtek integrinjeihez való kapcsolódást segíti, mely által kapcsolódhatnak, vagy be is juthatnak a sejtbe. Az egészségügyi szempontból jelentős, RGD-szekvenciát tartalmazó vírusok közé tartozik a humán metapneumovírus, az ötös típusú humán adenovírus, a humán cytomegalovírus és az Epstein-Barr vírus (NADER et al. 2020). A COVID-19 világjárvány alatt a téma aktualitását kiemelte, hogy miután Tai és munkatársai

(2020) meghatározták az ACE-2 receptorkötési domént a SARS-CoV-2 tüskefehérjéjén, Sigrist és munkatársai (2020) rámutattak, hogy az RGD-szekvencia a fehérje felszínén az ACE-2 doménjének közelében található, így elősegítheti a vírus bejutását a sejtbe.

Az integrinek számos olyan folyamatban is részt vesznek, melyeknek megzavarása nem fertőző betegségek kialakulásához vezethet. Itt olyan súlyos betegségek is említhetők, amelyek a programozott sejthalál (apoptózis) egyensúlyának felborulásával, így akár malignus karcinogén elváltozásokkal is járhatnak.

### ***2.4.3. RGD-kötőhelyhez kapcsolódó xenobiotikumok***

Sokféle szervezeten anyagról tudni, hogy a sejtfolyamatokat a receptorok, köztük az integrinek működésének befolyásolásával zavarhatják (OMIECINSKI et al. 2011). Az integrinantagonisták általában oligopeptidok vagy nagyobb peptidok (RUOSLAHTI 1996, HECKMANN és KESSLER 2007), melyek gyakran terápiás célokra is ígéretesnek mutatkoznak (STADEL et al. 1994). Előfordul, hogy a kis méretű ligandumok allosztérikus integrininhibitorokként viselkednek (HARTMAN et al. 1992, MILLER et al. 2000, SHIMAOKA et al. 2003, SMALHEER et al. 2004, NAGARAJAN et al. 2006), melyeket gyakran alkalmaznak gyógyszeres terápiában. Ezen kis, nem peptid xenobiotikumok egyike a foszfono-metil-aminosav-származék *glyphosate* (N-foszfono-metil-glicin) (SZÉKÁCS et al. 2018). Korábbi jelölésmentes immunszenzoron és módosított ELISA rendszerben végzett vizsgálataink során kimutattuk a *glyphosate* gátló hatását  $\alpha\beta3$  kötődésére az RGD-szekvenciához. Ezekkel a módszerekkel a hatóanyag csaknem teljes gátlást ért el 11 mM-os koncentrációnál. Munkánk további részében a *glyphosate* és rokon vegyületei vizsgálatát végeztük az ELISA rendszerben a fentebb említett  $\alpha\beta3$ -integrin mellett két másik RGD-szekvenciát felismerő integrint bevonva. A *glyphosate* mellett a vizsgált vegyületek körébe bekerült két fő bomlásterméke, az AMPA és az N-acetil-*glyphosate*, valamint a kisebb mennyiségben képződő bomlástermékek és aminosav-analógok közül a glicin, az N-acetil-glicin, a szarkozin és az imino-diecetsav.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A vizsgálatokhoz használt anyagok és minták származása

##### 3.1.1. A zearalenon (ZON) jelöléses immunanalitikai vizsgálataihoz használt anyagok és minták származása

A szerves vegyületek és oldószerek, a ZON és származékai, a második antitestként alkalmazott, kecskében termelt, HRP enzimmel konjugált nyúl elleni immunglobulin G (anti-nyúl kecske IgG–HRP), valamint a pufferoldatok sói a Sigma-Aldrich Inc.-től (St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) származtak. A ZON,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalanon,  $\alpha$ -zearalanol és  $\beta$ -zearalanol analitikai sztenderdek tisztasága  $\geq 98\%$  volt. Az ELISA vizsgálatokat nagy felületi adszorpciójú 96-lyukú mikrotiterlemezeken (Nunc Inc., Roskilde, Dánia) végeztük. Fluoreszcencia méréséhez alacsony felületi kötőképességű 96-lyukú mikrotiterlemezeket használtunk (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok), melyeknek üregei fehérek a fluoreszcencia mérésének elősegítése érdekében. Az immunanalitikai vizsgálatok utolsó lépéséhez *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztsomagot (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A felszíni vízminták a Duna budapesti szakaszáról, a Velencei-tóból, valamint a Balatonból származtak. A mintavételi helyek szélességi és hosszúsági GPS koordinátái: dunai mintánál 47,517519 és 19,045519, velencei-tavi mintánál 47,200922 és 18,578361, balatoni mintánál 46,914043 és 17,893401.

##### 3.1.2. A glyphosate jelöléses immunanalitikai vizsgálataihoz használt anyagok és minták származása

A vizsgálatokhoz használt szerves vegyületeket, oldószereket, a *glyphosate*-ot, valamint a szerkezetileg hasonló rokon vegyületeit továbbá a pufferek előállításához használt sókat a Sigma-Aldrich Inc.-től (St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) szereztük be. A *glyphosate*, AMPA, acetyl-*glyphosate* és glicin analitikai sztenderdek, valamint az imino-diecetsav és szarkozin reagensok tisztasága  $\geq 98\%$ , az N-(foszfono-metil)-imino-diecetsav (PMIDA) tisztasága 95%. A csirkében termelt poliklonális, *glyphosate*-analóg–HSA-konjugátum elleni első antitest (anti-*glyphosate*-analóg–HSA) csirke IgG) az Agrisera AB-től (Vannas, Svédország) került beszerzésre. A második antitestként alkalmazott, HRP enzimmel jelölt, kecskében termelt csirke

elleni immunglobulin G-t (anti-csirke kecske IgG–HRP) a TS Labortól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A vizsgálatokat SER-TAIN™ módszer szerinti  $\gamma$ -besugárzással kezelt, polisztirolból készült 96-lyukú Costar HB mikrotiterlemezeken (Corning Inc., Corning, NY, Amerikai Egyesült Államok) végeztük, majd az enzimreakció leállítását követően a képződött terméket a kolorimetriás detektálást követően alacsony felületi kötőképességű, 96-lyukú mikrotiterlemezeken (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) emeltük át fluoreszcens detektálás előtt, melynek fehér üregei a fluoreszcencia mérését elősegítik. Az ELISA folyamat utolsó lépése során a *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztsomagot (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztuk.

A *glyphosate*-vizsgálatokban használt felszínivízminták a Velencei-tó két pontjáról, a visegrádi Pisztrángos-tóból, annak tápláló forrásából, a Duna budapesti szakaszáról és a Balatonból származtak. A mintavételi pontok szélességi és hosszúsági koordinátái: Velencei-tó Agárdnál: 47,190938, 18,584617, Velencei-tó Pákozdánál: 47,213213, 18,577223, visegrádi Pisztrángos-tavak: 47,774661, 18,986223, tápláló forrásuk: 47,773565, 18,985176, Duna budapesti szakasza: 47,518549, 19,046216, Balaton: 46,913958, 17,893470. A talaj- és növényi szövetminták napraforgón (*Helianthus annuus*) végzett környezeti *glyphosate*-terhelési kísérletből származtak, melyet a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Tájépítészeti, Településtervezési és Díszkertészeti Intézetével közösen folytattunk le (KISVARGA et al. 2023).

#### 3.1.2.1. A talaj- és növényi szövetminták előkészítése

A mátrixhatás (lásd 2.3.2. fejezet) meghatározásához végzett vizsgálatokban használt talaj- és növényi szövetminták (gyökér és levél) kivonataihoz a mintákból minden esetben 40 mg mennyiséget használtunk. A mintákat dörzsmozsárba helyeztük, hozzáadtunk 1 ml foszfátpufferes sóoldatot, a mintákat a homogenizálást követően 1,5 ml térfogatú Eppendorf csövekbe helyeztük, majd centrifugáltuk őket 15 percig (20°C, 12000 rpm). Ezután a folyadékfázist újabb csöbe átemeltük, majd mesterségesen szennyeztük őket a vizsgálatok során alkalmazott, megfelelő koncentrációjú *glyphosate*-oldatokkal. Szükség esetén a mérés megkezdéséig a kivonatokat - 20°C-on tároltuk.

#### 3.1.3. *Az integrálgátlási vizsgálatokhoz használt anyagok és minták származása*

Minden anyagot, beleértve a pufferoldatok sóit, a fibrinogént, a vitronektint, a SARS-CoV-2 tüskefehérjét (S-fehérje), a második antitestként alkalmazott, HRP enzimmel jelölt egér elleni immunglobulin G-t (anti-egér IgG–HRP) és a gátlószereket a Merck Life Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) vagy jogelődjeitől szereztük be, amennyiben más származási hely nincs



jelezve. A mikrotiterlemezek RGD-felismerőmotívummal való érzékenyítéséhez használt GGGGYGRGDSP (aminosavak egybetűs kódja, ahol G: glicin, Y: tirozin, R: arginin, D: aszparaginsav, S: szerin, P: prolin) aminosavszekvenciával lezárt (poli-(L-lizin)- és poli-(etilén-glikol) kopolimer (PLL-PEG-RGD) a SuSoS AG-től (Dübendorf, Svájc) érkezett. A *glyphosate*-ot (N-foszfono-metil-glicin, CAS No.: 1071-83-6) a tesztekben izopropil-ammóniumsója (CAS No: 386411-94-0) formájában alkalmaztuk, melyet a Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Kanada) cégtől vásároltunk az N-acetil-*glyphosate* (CAS No: 129660-96-4) származékkal együtt. A vizsgálatokban alkalmazott gátlószerek fizikai-kémiai tulajdonságait az 1. táblázat tartalmazza. A rekombináns humán  $\alpha\beta3$ - és  $\alpha5\beta1$ -integrineket az R&D Systems Inc.-től (Minneapolis, MN, Amerikai Egyesült Államok), a vérlemezkékből tisztított humán  $\alpha11\beta3$ -integrint pedig az Enzyme Research Laboratories Ltd.-től (Swansea, Egyesült Királyság) szereztük be. Az egérben termelt integrin elleni első antitestek (humán  $\alpha\beta3$  elleni CD51/CD61, humán  $\alpha5$  alegység elleni CD49e és humán  $\alpha11\beta3$  elleni CD41b) a Becton, Dickinson and Company-től (Franklin Lakes, NJ, Amerikai Egyesült Államok) származtak.

1. táblázat: A receptorgátlási vizsgálatban gátlószerként alkalmazott vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságai

Gátlószer	CAS No. <sup>1</sup>	Moláris tömeg	Vízoldhatóság (g/L)	log P <sub>o/w</sub> <sup>2</sup>	Megjegyzés
<i>glyphosate</i>	1071-83-6	169,07	157 (pH 7,0)	-4,6 *	gyomirtó
<i>glyphosate</i> izopropilammónium-só <sup>3</sup>	386411-94-0	228,19	1050	-4,16	szerek aktív hatóanyagai
amino-metil-foszfonsav (AMPA)	1066-51-9	111,04	56,0 (20 °C)	-4,7 *	bomlástermék
N-acetil- <i>glyphosate</i>	129660-96-4	211,11	csekély	-2,4 *	bomlástermék
glicin	56-40-6	75,07	250 (25 °C)	-3,2 *	aminosav, bomlástermék
N-acetil-glicin	543-24-8	117,10	26,3 (15 °C)	-1,2 *	acilezett aminosav
szarkozin	107-97-1	89,09	89,1 (20 °C)	-3,2 -2,8 *	bomlástermék
imino-diecetsav	142-73-4	133,10	24,3 (5 °C)	-3,3 *	kismértékű szennyező

<sup>1</sup>A Chemical Abstract Service regisztrációs száma a vegyületek egyéni azonosításához.

<sup>2</sup>A vegyület nem poláris szerves fázis (oktanol) és víz közötti megoszlási együtthatójának logaritmus, mely a lipofilitást írja le. A \*-gal jelöltek XLOGP3-AA módszerrel számított értékek az Amerikai Egyesült Államok Orvostudományi Nemzeti Könyvtárának (Bethesda, MD, Amerikai Egyesült Államok) PubChem nyílt adatbázisából (PUBCHEM 2024, IUPAC 2024). Az XLOGP3-AA adott molekula lipofilitását egy referenciamolekula ismert lipofilitása alapján a molekuláris összevetők lipofilitását figyelembe vevő additív modell szerint írja le.

<sup>3</sup>Kiegészítő információ. A *glyphosate* izopropilammónium-sóját herbicidkészítményekben az aktív hatóanyag vízoldhatóságának növelése érdekében használják. A két vegyület fizikai-kémiai paraméterei eltérnek, ezért mind a kettő bekerült a listába.

### 3.2. A zearalenon (ZON) és *glyphosate* enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay vizsgálatának fluoreszcens detektálásához alkalmazott műszerprototípus leírása

Kutatóközpontunk (Agrár-környezettudományi Kutatóközpont, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, korábban Agrár-környezettudományi Kutatóintézet, Nemzeti Agrárkutatási- és Innovációs Központ) konzorciumvezetőként részt vett az Aquafluosense projektben (NVKP\_16-1-2016-0049), melynek célja egy komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris, érzékelő és műszercsalád kifejlesztése, továbbá az alkalmazási területek kutatása volt (AQUAFLUOSENSE 2024). A fejlesztés legfőbb újszerűsége a direkt fluoreszcencia és az

immunfluoreszcencia mérésére is alkalmas, optikai és fotonikai elemekből létrehozott műszermodulok kifejlesztése volt.

A ZON-tartalom meghatározására fejlesztett ELFIA módszer fluoreszcens detektálását a 6. ábrán feltüntetett fluorimétermodul-prototípussal végeztük. A műszert részben (motor, optika, mintatartó) az Optimal Optik Kft.-nél (Budapest, Magyarország), részben (detektorelektronika) a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen (Budapest, Magyarország) fejlesztették Dr. Kocsányi László vezetésével, és úgy alakították ki, hogy a saját tervezésű, 3D nyomtatási módszerrel előállított 96-lyukú mikrotiterlemez-tartó befogadására alkalmas legyen. A mikrotiterlemez-tartó keret célja, hogy gerjesztés esetén az üregek közötti áthallást minimalizálja. A mintákat kétféjes konfigurációban világították meg, mindegyik fejben egy nagy teljesítményű LED-del (Cree XPEBGR-L1-0000-00F01), melynek domináns hullámhossztartománya 520-535 nm. A műszer a kibocsátott fluoreszcenciát dikroikus sugárúton méri nagy aktív területű ( $d = 27,9$  mm) szilícium-fotodiódákkal (PIN-25D, OSI Optoelectronics, Hawthorne, CA, Amerikai Egyesült Államok). A szükséges nagy spektrumú blokkolást és kontrasztot dikroikus (Semrock FF562-Di03, él: 562 nm) és sáváteresztő optikai szűrők kombinációjával sikerült elérni mind a gerjesztés (Semrock FF01-531/40-25, csúcs: 531 nm, szélesség: 40 nm), mind az emittálás (Semrock FF01-593/40-25, csúcs: 593 nm, szélesség: 40 nm) esetén. A fotodetektor jelét egy kétfokozatú erősítőegységbe (1. fokozat: OPA129 elektrométeres előerősítő, Texas Instruments, Dallas, TX, Amerikai Egyesült Államok; 2. fokozat: AD620 műszererősítő, Analog Devices, Cambridge, MS, Amerikai Egyesült Államok) csatolták, majd egy 12 bites analóg-digitális átalakítóba (Analog Devices AD7864-2 0–5 V-os unipoláris bemeneti tartománnyal) vezették, amely 4095 maximumértékű feloldható relatív fluoreszcenciaegységet (RFU) eredményez. A 2. fokozat erősítését és eltolását, valamint a LED optikai teljesítményét 256-fokozatú (8 bites) digitális potenciométerek szabályozták. Mivel a LED teljesítménybeállítása nem volt egyenlő távolságban, az optikai teljesítmény-szabályozási számgörbét FieldMaxII-TO (koherens) teljesítménymérővel kalibrálták OP-2 VIS szenzorfejjel 532 nm névleges hullámhosszra. A műszert léptetőmotorokkal szerelték fel, hogy a detektorfejeket a 96-lyukú mikrotiterlemezek felett mozgatva az egyedi RFU-k gyors és hatékony meghatározását biztosítsák a mikrotiterlemez minden üregében.



6. ábra: Az Aquafluosense projekt keretein belül fejlesztett műszercsalád fluorimétermodulja (balra) és az eszköz terepi alkalmazáshoz gépjárműbe szerelve (jobbra).

### 3.3. A fejlesztett vizsgálati módszerek jellemzésére alkalmazott Rodbard-egyenlet

A Rodbard-egyenlet négyparaméteres (nem szimmetrikus esetben ötparaméteres) logisztikai regresszió, mely biológiai rendszerekre megfelelően alkalmazható, beleértve a dózis-válasz, vagy a receptor–ligandum–kötési teszteket. Általánosan használják ELISA és ELFIA rendszerek jellemzésére. Versengő rendszerű analitikai mérések során a négy tipikus paraméter jelentése:

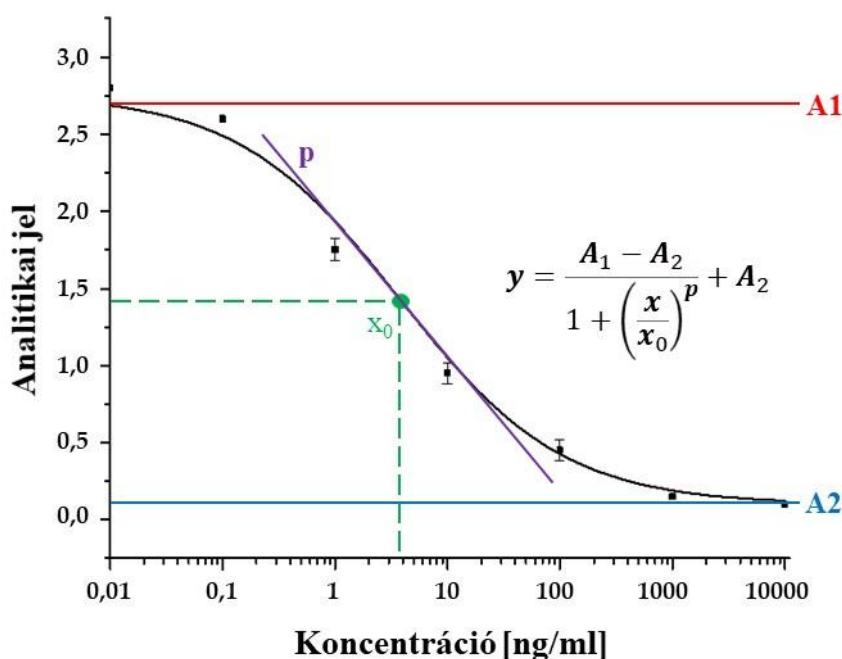
$$F(x) = \frac{A_1 - A_2}{\left[1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p\right]^g} + A_2$$

ahol

- $A_1$ : a rendszer maximális jelszintjét leíró felső plató – versengő rendszer esetén az a szint, amely a teljesen gátolatlan esetben tapasztalható,
- $A_2$ : a rendszer háttér-jelintenzitását leíró alsó plató – versengő rendszer esetén az a szint, amely teljes gátlás esetében tapasztalható,
- $x_0$ : a görbe inflexiós pontjához tartozó  $x$  érték – versengő rendszer esetén az a koncentráció, mely 50%-os gátlást eredményez ( $IC_{50}$ ),
- $p$ : a görbe inflexiós pontjához illesztett egyenes meredeksége – jellemzi a módszer jelintenzitás-változásának koncentrációfüggését (érzékenységet),
- $g$ : aszimmetria-faktor, amely a görbe fel- és lefutási szakaszai közötti alakjának különbségét fejezi ki (1-es értéke esetén a görbe szimmetrikus).

Amint látható, szimmetrikus görbék esetén ( $g=1$ ) az ötparaméteres Rodbard-egyenlet négyparaméteresre egyszerűsödik. Mivel vizsgálataink során (dózis–válasz- és receptor–

ligandum-kötési tesztek) kizárólag szimmetrikus görbék jellemzésére került sor, a dolgozat további fejezeteiben a négyparaméteres egyenletet alkalmaztuk (7. ábra).



7. ábra: A szimmetrikus görbéket jellemző négyparaméteres Rodbard-egyenlet (ahol az ötparaméteres formátum aszimmetriát jellemző ötödik paramétere,  $g=1$ ) és paramétereinek elhelyezkedése, melyek versengő analitikai mérések esetén: A1 a rendszer maximális jelszintjét leíró felső plató, A2 a rendszer háttér-jelintenzitását leíró alsó plató,  $x_0$  a görbe inflexiós pontjához tartozó koncentrációérték (IC<sub>50</sub>: 50%-os gátlást okozó koncentráció), p a görbe inflexiós pontjához illesztett egyenes meredeksége, mely jellemzi a módszer jelintenzitásváltozásának koncentrációfüggését (érzékenységet).

A kimutatási és mennyiségi meghatározási határainak értékét (LOD, LOQ) a maximális (gátolatlan) jelszint átlagos értékéből és annak szórásából számítottuk: az LOD a maximális jelszintnek a szórás háromszorosával csökkentett értékéhez tartozó koncentráció, LOQ a maximális jelszintnek a szórás ötszörösével csökkentett értékéhez tartozó koncentráció.

$$LOD = A_1 - 3 \times \sigma_{A_1}$$

$$LOQ = A_1 - 5 \times \sigma_{A_1}$$

ahol

- LOD és LOQ: a rendszer kimutatási határa (*limit of detection*) és mennyiségi meghatározási határa (*limit of quantation*),
- A<sub>1</sub>: a rendszer maximális jelszintjét leíró felső plató – versengő rendszer esetén az a szint, amely a teljesen gátolatlan esetben tapasztalható,

- $\sigma_{A1}$ : a rendszer maximális jelszintjéhez tartozó szórásérték.

### **3.4. A zearalenon (ZON) önálló fluoreszcenciájának mérése**

Mielőtt *immunoassay* módszer fejlesztésébe kezdtünk, megvizsgáltuk a ZON mennyiségi kimutatásának a vegyület saját indukált fluoreszcenciáján (autofluoreszcencia) alapuló lehetőségét, mely a legegyszerűbb megoldás lett volna a fluoreszcens detektálásra. A ZON saját fluoreszcenciájának spektrumát SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) eszköz segítségével rögzítettük szkenneléses mérés segítségével. Itt 250 és 830 nm hullámhossz között 10 nm lépésenként változtattuk a gerjesztési hullámhosszt, valamint 270 és 830 nm között az emisszió detektálásának hullámhosszát. A tartományok alsó határa közötti különbséget az adja, hogy az emisszió detektálási hullámhosszának legalább 20 nm-rel magasabbnak kell lennie a gerjesztésinél. A spektrumtérképet foszfátpufferes sóoldatban (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, pH 7,4) felvett 2000 ng/ml koncentrációjú ZON oldat szkenneléses mérése során rögzített RFU-k adták meg, háttérként számításba véve a PBS által kibocsátott jelet. A vizsgálatban a ZON-t 1 mg/ml-es törzsoldatban használtuk metanolban oldva. A spektrumtérkép által meghatározott optimális gerjesztési és detektálási hullámhosszpárt alkalmaztuk a ZON autofluoreszcenciájának kalibrációs görbéje meghatározásánál a 0,6–2000 ng/ml koncentrációtartományban, valamint LOD értéke megállapításához. Az autofluoreszcenciás mérésekhez alacsony felületi kötőképességű, 96-lyukú mikrotiterlemezeket használtunk.

### **3.5. A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay***

A ZON mennyiségi kimutatására irányuló jelen immunanalitikai módszerfejlesztés alapját a kutatócsoportunk által már korábban kifejlesztett ELISA módszer adta. A haptén- és konjugátumszintézist az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében végezték Dr. Székács András vezetésével. E korábbi, Thouvenot és Morfin (1983) módszere alapján végzett munka során állították elő a ZON-ból annak hapténjét (ZON-6'-karboxi-metil-oxim), melyet ebben a formában a szarvasmarha-szérumalbumin (BSA), illetve konalbumin (CONA) hordozófehérjékhez tudtak kötni amidkötés segítségével (SZÉKÁCS 1998, DONG et al. 2018). A konjugáció sikerességét UV spektroszkópia segítségével monitorozták (SZÉKÁCS 1998). Az így létrejött ZON-6'-karboxi-metil-oxim–BSA (ZON–BSA) és ZON-6'-karboxi-metil-oxim–CONA (ZON–CONA)

haptén–fehérje–konjugátumok a továbbiakban az irodalmi adatokra alapozva egyrészt a mikrotiterlemezek érzékenyítése (ZON–BSA), másrészt pedig a specifikus antitestek termelése érdekében a laboratóriumi nyulak immunizálására (ZON–CONA, lásd 3.5.1.) kerültek felhasználásra. A fehérjekonjugátumokat  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### ***3.5.1. A zearalenon (ZON) elleni szérumok előállítására végzett immunizálás és a szérumok titrálása***

Az immunizálást a Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ Élelmiszertudományi Kutatóintézetének (NAIK-ÉKI) Biológia Osztályán végezték Dr. Nagy András vezetésével ZON–CONA-konjugátummal, két, 2,5-3 kg testtömegű, új-zélandi fehér fajtájú nőstény nyúl használatával. A nyulak immunizálása az intézmény Állatkísérletek Etikai Tanácsa és a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság felügyelete alatt történt, a Pest Megyei Kormányhivatal engedélyével és felügyelete mellett. A hivatalos, állatkísérletekre szóló engedély száma #PE/EA/45-6/2020, az utolsó jóváhagyás időpontja 2020. február 21. Az immunizálások során 25  $\mu\text{g}/\text{tt kg}$  immunogént (ZON–CONA) foszfátpufferes sóoldatban oldották, majd ennek Freund-féle komplett vagy inkomplett adjuvánssal készített 1:1 térfogatarányú emulgeátumát injektálták szubkután úton a nyulakba. A kiinduló immunizáláshoz Freund-féle komplett adjuvánst használtak. Ezt követte 2-hetes intervallumokban 3 emlékeztető immunizálás, melyek során az emulgeáláshoz Freund-féle inkomplett adjuvánst alkalmaztak. Minden immunizálás után egy héttel az állatoktól vért vettek, melyet koagulálódás után (egy éjszaka  $4^{\circ}\text{C}$ -on) centrifugáltak (2400 g, 15 perc). Az így nyert szérumot ammónium-szulfátos kicsapás útján tisztították. A szérumoknak az antigénepitóphoz való kötőképességét szérumtitrálási vizsgálatokban jellemeztük. A titrálás a szérum hígításának változtatásával, illetve az érzékenyítő antigén és a szérumhígítás párhuzamos változtatásával kétdimenziós (*checkboxboard*) titrálással történt.

### ***3.5.2. A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay folyamata***

A mikrotiterlemezeket 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú ZON–BSA-konjugátummal érzékenyítettük, melyet karbonátpufferbe (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6) oldottunk be. A mikrotiterlemez egy éjszakán keresztül (~8 óra) inkubáltuk  $4^{\circ}\text{C}$ -on. A felszínhez ki nem kötődött haptén–fehérje–konjugátumot négyszer ismételt mosással távolítottuk el 0,2% Tween20-tartalmú PBS használatával. A mikrotiterlemez felszínén esetlegesen szabadon maradt kötőhelyeket üregeként 150  $\mu\text{l}$ , 1% zselatint tartalmazó PBS hozzáadásával blokkoltuk. A blokkolási lépés inkubációja másfél óráig tartott, mely alatt a mikrotiterlemez a mérőműszer által biztosított  $37^{\circ}\text{C}$ -

os környezetben tároltuk a zselatin megszilárdulásának elkerülése érdekében. Mosás után a következő lépésben ment végbe a kompetíció, melyhez az üregekbe először 50 µl ZON analitikai sztenderdet (0,004 pg/ml és 2000 ng/ml közötti koncentrációkkal), majd 50 µl tisztított, anti-(ZON-CONA) nyúl IgG-t tartalmazó szérumot adtunk. Mindkettőt 0,05% Tween20-at tartalmazó PBS pufferben vittük a mikrotiterlemezre a kutatócsoportunk korábban fejlesztett módszerét (SZÉKÁCS et al. 1998) követve, a szérumot 1:1000 arányban hígítottuk, míg a ZON sztenderdet 2000, 400, 80, 16, 3,2, 0,64, 0,128 ng/ml, továbbá 25,6, 5,12, 1,024, 0,205, 0,0410, 0,00819 és 0,004 pg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A hígítási sort abszolút metanolban oldott, 1 mg/ml-es ZON-törzsoldatból készítettük. Egyórás, 37°C-on történő inkubáció után a mikrotiterlemezeket négyszer mostuk, majd második antitestként 100 µl/üreg anti-nyúl kecske IgG–HRP-t adtunk a rendszerhez 0,05%-os Tween20 tartalmú PBS pufferben, 1:7500 arányú hígításban. Az egyórás inkubáció utáni négy mosási lépés során alkalmazott PBS a *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztcsomag gyártói ajánlásának megfelelően nem tartalmazott Tween20-at (THERMOFISHER SCIENTIFIC 2008). Az utolsó lépésben üregenként 100 µl mennyiséget vittünk fel a mikrotiterlemezre a tesztcsomag összetevőiből összeállított munkaoldatból. A munkaoldat 1:50:50 térfogatarányban tartalmazza három összetevőjét, melyek a *QuantaRed ADHP concentrate*, a *QuantaRed Enhancer Solution* és a *QuantaRed stable Peroxide*. A tesztcsomag ADHP kromofórt tartalmaz, mely nem fluoreszcens vegyület, de a HRP enzimmel (ebben a vizsgálatban a második antitest jelölőenzime) reakcióba lépve a folyamatban rezorufin (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-on) képződik. A rezorufin jól oldódó, erősen fluoreszcens vegyület, mely kolorimetriás módszerrel is mérhető jelet ad. Ötperces inkubáció után az enzimreakciót 10 µl/üreg *QuantaRed Stop Solution* hozzáadásával állítottuk le. Ezután először abszorbancia detektálása történt, mivel az elvégezhető a teljes folyamat végrehajtására használt mikrotiterlemezen. A mérés befejezése után a folyékony fázist (mely az enzimreakció termékét tartalmazza) áttemeltük a fehér, alacsony felületi kötőképességű 96-lyukú mikrotiterlemezre, melyen a fluoreszcencia detektálása történt. Az abszorbancia mérését 576 nm hullámhosszon végeztük SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) eszközzel végpont módban, míg az RFU-k meghatározása az Aquafluosense projekt keretében fejlesztett fluorimétermodul-prototípussal történt (AQUAFLUOSENSE 2024, CSŐSZ et al. 2019). A sztenderd görbéket három helyről (Balaton, Velencei tó, Duna) származó felszínivízmintákban is felvettük a lehetséges mátrixhatás meghatározásához természetes vizek ZON-tartalmának vizsgálata esetén.

A munkánk során fejlesztett *immunoassay* módszert úgy alakítottuk ki, hogy a moduláris műszerrel a mérés akár egy járműben kialakított mobil laboratóriumban is lefolytatható legyen. A



mikrotiterlemezek ZON–BSA-konjugátummal való érzékenyítése megvalósítható a mérések előtt, laboratóriumi körülmények között, így maga a mérés az előre elkészített mikrotiterlemezen *in situ* is elvégezhető. Jelenlegi formájában a teljes folyamat 2,5 órát vesz igénybe. Mivel az immunfluoreszcencia-modult léptetőmotorokkal szerelték fel, a teljes mikrotiterlemez fluoreszcens detektálása körülbelül két percig tart. A módszer időigényének csökkentése lehetséges az érzékenyítési és blokkolási lépések előző napi elvégzésével, ebben az esetben az érzékenyítés szobahőmérsékleten 1 óra alatt elvégezhető, az 1%-os, PBS-ben oldott zselatinnal történő blokkolás pedig 1,5 óráig tart. Az előkészített mikrotiterlemez 4°C-on tárolhatók a mérés megkezdéséig, a párolgás elkerülése érdekében parafilmmel lezárva.

### **3.6. Zearalenontartalom meghatározása nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel**

A kalibrációs görbe és a LOD meghatározását nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kutatóhelyem (MATE KÖTI AKK) Környezetanalitikai Osztályán végezték el Dr. Mörthl Mária vezetésével, melyhez Younglin YL9100 HPLC rendszert használtak YL9150 automata mintavevőrendszerrel (YL Instruments, Anyang, Dél-Korea). Az elválasztást PerfectSil 100 ODS-3 oszlopon (MZ-Analysentechnik GmbH, Mainz, Németország) végezték (150 × 4,6 mm i.d., 5 µm) 30°C-on, C18-tartalmú álló fázissal. Az UV-detektor a jeleket  $\lambda_1 = 236$  nm és  $\lambda_2 = 274$  nm hullámhosszokon rögzítette. Az eluens áramlási sebessége 1,0 ml/perc volt izokratikus elúcióval 10 percig (A és B eluens aránya 30:70, A eluens: víz és metanol 90:10 arányban, B eluens: metanol). A ZON retenciós ideje ilyen körülmények között 6,12 perc volt. A LOD meghatározása sztenderd oldatokkal történt, ahol a LOD az a koncentráció, melynek jele a háttérjeltől a háttérjel szórásának háromszorosával eltér. A mérésekhez 1 g/ml-es ZON-törzsoldatot használtak metanolban oldva. A kalibrációs görbéket hét sztenderd oldattal vették fel, melyek koncentrációja 10 és 2000 ng/ml között volt metanol és víz 7:3, valamint metanol és PBS (0,1 M, pH 7,4) 1:1 arányú elegyében. Az oszlopra felvitt minták térfogata 20 µl volt.

### **3.7. Zearalenontartalom meghatározása teljes belső visszaverődéses ellipszometria (TIRE) módszerrel**

A teljes belső visszaverődéses ellipszometriás (TIRE) szenzoros vizsgálatokat a Sheffield Hallam University munkatársai végezték Prof. Alexei Nabok vezetésével, M-2000 típusú automata spektroszkópikus ellipszométer (J.A.Woollam Co., Lincoln, NE, Amerikai Egyesült Államok)

használatával, mely 370-1000 nm hullámhossztartományban működik a laboratóriumban vákuumpárologtatással előkészített üvegalapú szenzorchippelel kiegészítve. A szenzorfelszín előkészítéséhez egy 3 nm vastag króm- és egy 25 nm vastag aranyréteget rögzítettek optikai üveglemezre, ahol a krómréteg az arany megtapadását segítette elő. Az aranyréteget 2-merkaptóetil-szulfonsav nátriumsójával módosították, a felszínen szulfonátion-réteget képezve. Az ellipszométerben egy 68°-os trapéz prizmát használtak, mely a fényt az üveglemez aranyrétegébe csatolta. A 0,2 ml térfogatú reakciókamrát a ki- és bevezető csövekkel az aranyfelszín alá csatlakoztatták, így lehetővé téve, hogy a vegyületek közötti kötődés létrejöhessen. Az ellipszometriasppektrumok szkennelése sztenderd Trisma/HCl pufferoldatban történt (pH 7,5) minden kötődési fázis befejeződése után. A versengő *immunoassay* lefolytatásához a ZON-BSA-konjugátumot elektrosztatikusan rögzítették az aranyfelszínhez poliállilamin-hidroklorid-réteg segítségével. A szabadon maradt kötőhelyeket BSA segítségével blokkolták. Ezután a reakciókamrába az anti-(ZON-CONA) nyúl IgG-t tartalmazó antiszérum és ZON különböző koncentrációjú oldatainak keverékét injektálták. A ZON-oldatok koncentrációtartománya 0,01 ng/ml és 10 µg/ml volt. A keverékeket az injektálás előtt öt percreg inkubálták. Az injektálások között a kamrát pufferoldattal kimosták. A  $\Delta$ -spektrumokat a ZON rögzített antitesthez való kötődése után rögzítették.

### **3.8. A *glyphosate*-tartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay***

#### **3.8.1. Hapténszintézis és konjugáció**

A mikrotiterlemezek érzékenyítéséhez szükséges *glyphosate*-analóg előkészítését, valamint az érzékenyítést és a blokkolást az Izotóp Intézet Kft (Budapest, Magyarország) munkatársai végezték Dr. Keszei Csaba vezetésével. A kereskedelembe kapható N-(foszfono-metil)-imino-diecetsavat (PMIDA) borostyánkősav-anhidriddel reagáltatták, konjugálták humán szérumalbuminnal (HSA), majd az így létrehozott *glyphosate*-analóg haptén-fehérje-konjugátumot (*glyphosate* analóg-HSA) passzív adszorpció útján rögzítették a mikrotiterlemezek felszínéhez. A szacharóz 2%-os vizes oldatával történt stabilizálás után a szárított mikrotiterlemez 4°C-on tárolható (száraz körülmények között körülbelül egy évig).

### 3.8.2. A glyphosate-tartalom meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay folyamata

Az Aquafluosense projekt (NVKP\_16-1-2016-0049) keretében kialakított immunanalitikai vizsgálatot a *glyphosate* koncentrációjának meghatározására fejlesztettük ki felszínivíz-, élelmiszer- és gabonamintákban. A tesztek lefolytatása előtt szükséges volt a 0 és 400 ng/ml közötti *glyphosate*-koncentrációjú, pufferoldatban felvett sztenderdek és *glyphosate*-mentes kontrolljuk (puffer) származékképzése vízmentes acilező reagens (0,53 M acetanhidrid acetonitril oldószerben) segítségével. A származékképzést polipropilén mikrotiterlemezekon végeztük, először 100 µl sztenderdet vagy kontrollt az üregekbe helyezve. Ezután hozzáadtunk 40 µl származékképző elegyet, majd óvatos rázással homogenizáltuk az oldatot. A következő lépésben 100 µl gyártói előírás szerint hígított borátpuffert (0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,4) is hozzáadtunk, majd újabb homogenizálás után a mintákat 20 percig inkubáltuk. A származékképzési lépés után 20 µl sztenderdet vagy kontrollt vittünk fel a *glyphosate*-analóg–HSA-konjugátummal érzékenyített mikrotiterlemezre, majd első antitestként hozzáadtunk 100 µl anti-(*glyphosate*-analóg–HSA) csirke IgG-t 0,4 µg/ml koncentrációban. A kétórás, szobahőmérsékleten történő inkubálás után a mosást üregenként 250 µl, gyártói előírás szerint hígított mosópufferrel (5% Triton-X 100-tartalmú borátpuffer) végeztük. Ezt követően második antitestként 100 µl anti-csirke kecske IgG–HRP-t adtunk az üregekbe 0,5 µg/ml koncentrációban. A mikrotiterlemezt szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig, majd a ki nem kötődött második antitesteket hat ismétléssel lemostuk a mikrotiterlemezről. Az utolsó lépésben ennél a módszernél is a *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztsomagot (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) alkalmaztuk a gyártói előírások szerint, melynek munkafolyamatából üregenként 100 µl-t vittünk fel a mikrotiterlemezre. Az öt perces inkubációt követően leállítottuk az enzimreakciót 10 µl *QuantaRed Stop Solution* hozzáadásával. A képződött rezorufin végtermék abszorbanciáját 576 nm hullámhosszon mértük a gyártó ajánlása szerint (THERMOFISHER SCIENTIFIC 2008) SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) eszközzel végpont módban. A fluoreszcencia detektálása a rezorufin indukált fluoreszcenciájának hullámhossz-tartományába eső 593 nm hullámhosszon történt. A fejlesztett ELFIA pontosságát intra- és inter-*assay* vizsgálatokkal ellenőriztük. A specifitás értékeléséhez az első antitestek gátlását vizsgáltuk az elsődleges bomlástermék AMPA, szerkezetileg hasonló vegyületek (glicin, imino-diecetsav, PMIDA, N-acetil-glicin, szarkozin) és a foszfát, mint lehetséges keresztreakciós vegyülettel.

A *glyphosate* sztenderd görbét a 0–100 ng/ml koncentrációtartományban a 3.1.2.1. fejezet szerint előkészített felszínvíz-, talaj-, valamint növényi levél- és gyökérmintákban is felvettük a mátrixhatás vizsgálatához.

### **3.9. A receptorgátlás vizsgálatához módosított enzimjelzéses immunszorbens vizsgálat folyamata**

A tesztek nagy felületi adszorpciójú 96-lyukú mikrotiterlemezeken (Nunc, Roskilde, Dánia, #442404) végeztük. A PLL-PEG-RGD-t az érzékenyítésnél 100 µl, 250 µg/ml koncentrációjú oldatban vittük fel a mikrotiterlemezre 10 mM 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsavas (HEPES) pufferben (pH 7,4), majd egy órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az ECM fehérjékkel való érzékenyítés során a vitronektin 0,5 µg/ml, a fibrinogén pedig 20 µg/ml koncentrációban került a mikrotiterlemezre, mindkét esetben karbonátpufferben (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). Az inkubáció egy éjszakán keresztül történt 4°C-on. Az S-fehérje érzékenyítőként 5,72 µg/ml koncentrációban került a mikrotiterlemezre foszfátpufferes sóoldatban (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, pH 7,4), majd négy napig inkubáltuk 4°C-on. Egyórás inkubációs időtartamot meghaladó időigénylő érzékenyítés során a mikrotiterlemezeket mindig parafilmmel vontuk be a párolgás megelőzése érdekében. Az érzékenyítés után a mosás minden esetben 0,1% Tween20 tartalmú PBS pufferrel történt három ismétlésben, üregenként 250 µl oldattal. A mérési folyamat során a további lépések közötti mosás ugyanígy zajlott. A mosási lépés után a mikrotiterlemez felületén esetlegesen szabadon maradt kötőhelyeket üregenként 150 µl 1 %-os BSA-oldattal blokkoltuk Tris pufferben (TrisB, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 7,5) egyórás inkubációval, szobahőmérsékleten. Az újabb mosást követő lépésben ment végbe a kompetíció, ahol az adott integrin vagy az oldatban felvitt aktuálisan vizsgált gátlószerhez, vagy a felszínhez rögzített érzékenyítőfehérjéhez kötődött. Itt először a TrisB pufferben oldott gátlószer 44, 22, 11, 2,2 és 0,275 mM koncentrációban (2. táblázat) vagy a pozitív kontrollt (100 nM koncentrációjú echistatin) adtuk a rendszerhez 50 µl térfogatban, majd 50 µl integrint (αVβ3 1 µg/ml PLL-PEG-RGD-vel és vitronektinnel érzékenyített mikrotiterlemez esetén, 2 µg/ml S-fehérjével történt érzékenyítésnél, α5β1 1,25 µg/ml PLL-PEG-RGD-vel, míg αIIbβ3 2,5 µg/ml fibrinogénnel történt érzékenyítésnél).

2. táblázat: A receptorgátlási vizsgálatokban gátlószerként alkalmazott vegyületek vizsgált koncentrációi

	A gátlószer vizsgált koncentrációja (mg/ml)					
	mM	22,0	11,0	5,50	1,10	0,138
<i>glyphosate</i>		3,72	1,86	0,93	0,18	0,02
<i>glyphosate</i> izopropil-ammónium-só		5,02	2,51	1,26	0,25	0,03
amino-metil-foszfonsav (AMPA)		2,44	1,22	0,61	0,12	0,02
glicin		1,65	0,83	0,41	0,08	0,01
szarkozin		1,96	0,98	0,49	0,10	0,01
N-acetil-glicin		2,58	1,29	0,64	0,13	0,02
N-acetil- <i>glyphosate</i>		4,64	2,32	1,16	0,23	0,03
imino-diecetsav		2,93	1,46	0,73	0,15	0,02

Az egyórás, szobahőmérsékleten történő inkubációt követő mosás során kikerültek a rendszerből azon integrinmolekulák, melyek az oldatban jelen levő gátlószerhez kötődtek. A következő lépésben az első antitesteket vittük fel a mikrotiterlemezre 100 µl/üreg TrisB pufferben. Az αVβ3-integrin specifikus antitestjét (CD51/61) a PLL-PEG-RGD- és vitronektinalapú tesztekben 2 µg/ml, az S-fehérje-alapú tesztben 5 µg/ml, az α5β1-specifikus antitestet (CD49e) 1 µg/ml, az αIIbβ3-specifikus antitestet (CD41b) pedig 4 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk, majd inkubáltuk őket további egy órán át szobahőmérsékleten. A háromszori mosás után minden üregbe 1 µg/ml koncentrációban adtuk a második antitestként alkalmazott anti-egér IgG–HRP-t 100 µl TrisB pufferben, és ezt is egy órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A mosási lépés után a rendszerhez 1,2 mM koncentrációban hidrogén-peroxidot (a HRP szubsztrátuma) és kromofórként 1,2 mM TMB-t adtunk 0,5 mM koncentrációjú citrátpufferben (pH 5,0). A színfejlődést eredményező enzimátikus reakciót a megfelelő színerősségnél üregeként 50 µl 4 N kénsavval állítottuk le. A mikrotiterlemezeket 492 nm hullámhosszon mértük SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, Amerikai Egyesült Államok) eszközzel végpont módban.

### 3.10. Az elvégzett vizsgálatok statisztikai értékelése

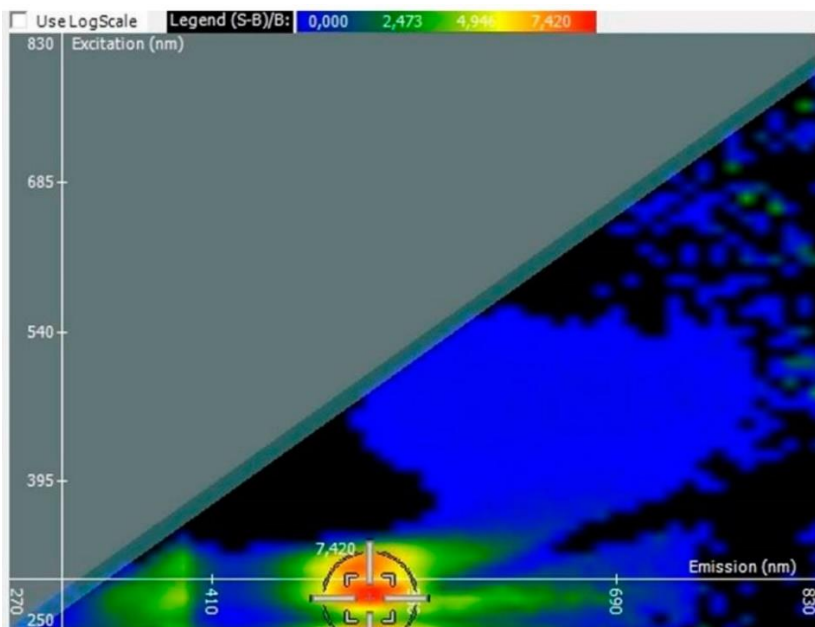
Az eredmények statisztikai elemzését R 4.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) szoftverrel végeztük. Az adatok normalitását és a varianciák homogenitását minden teszt esetében Shapiro–Wilk-, valamint Levene-tesztekkel ellenőriztük 5%-os szignifikanciaszinten, amikor  $p > 0,05$  esetben az adatok normális eloszlásúnak, a varianciák pedig homogénnek tekinthetők. A különböző koncentrációk hatását egytényezős varianciaanalízis-tesztekkel (ANOVA) értékeltük, melyeket követően *post-hoc* Tukey-tesztet végeztünk el a csoportok közötti szignifikáns eltérések meghatározására. Az  $IC_{50}$  értékeket féllogaritmikus grafikonon ábrázoltuk, számításuk nem lineáris regresszióval történt a Rodbard által leírt logisztikus (négyparaméteres, lásd 3.3.) szigmoid dózis–válasz-egyenlet alapján. A féllogaritmikus görbék ábrázolásához OriginLab OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Amerikai Egyesült Államok) szoftvert használtunk.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 4.1. Zearalenonmeghatározási vizsgálatok

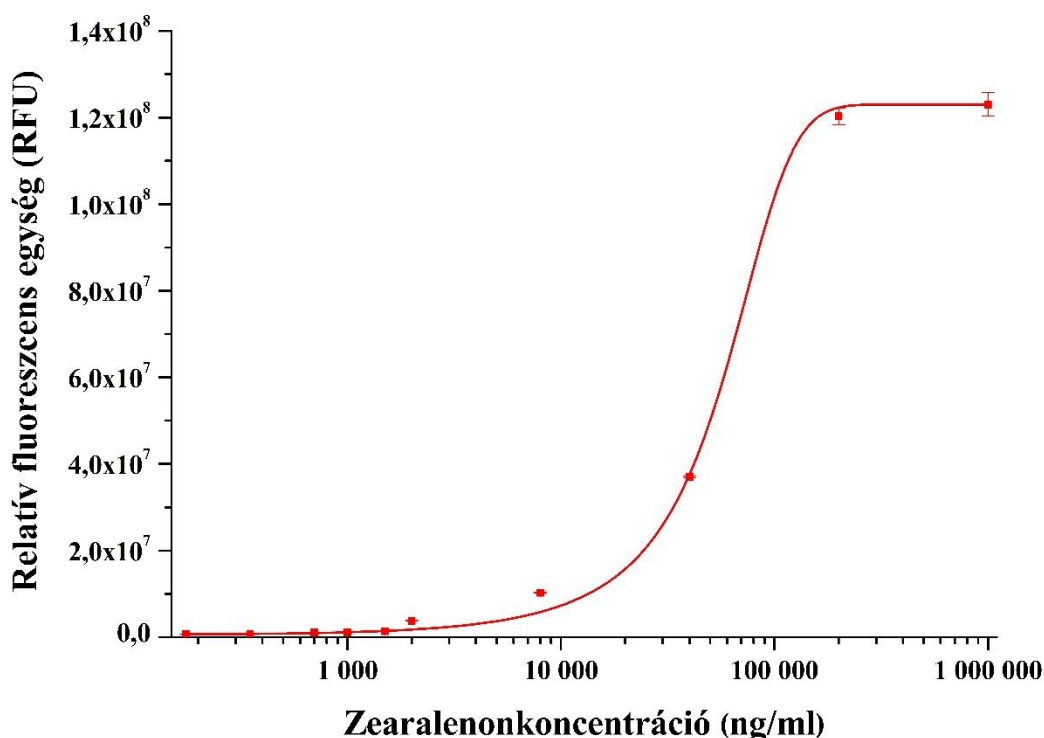
#### 4.1.1. Zearalenon (ZON) meghatározása autofluoreszcencia mérésével

A ZON-tartalom meghatározásának lehetőségét saját, indukált fluoreszcenciájának detektálásával is vizsgáltuk vizes mintában. Azon koncentrációtartományban, ahol a mikotoxin saját gerjesztett fluoreszcenciája jól mérhető optikai jelet szolgáltat, ott ez lehetőséget teremt a vegyület mennyiségi kimutatására. Az autofluoreszcencia jelensége során a fluoreszcens fényt a ZON mint célvegyület optikailag gerjesztett elektronjai bocsátják ki, miközben visszatérnek alapállapotukba. Mivel a rezgési energia egy része törvényszerűen elveszik, a kibocsátás spektruma a gerjesztésnél nagyobb hullámhosszú tartományba tolódik (Stokes-féle eltolódás). Az optimális gerjesztési hullámhossz meghatározásához szkenneléses mérést alkalmaztunk a 250–830 nm tartományban, mely során az emisszió intenzitásának változását a 270–830 nm tartományban a 8. ábrán látható, kéktől pirosig terjedő színskála adja meg.



8. ábra: Fluoreszcens spektrumtérkép foszfátpufferes sóoldatban (PBS) mikrotiterlemezre vitt 2000 ng/ml koncentrációjú zearalenon (ZON) esetén, ahol a piros folt adja meg az optimális gerjesztési (y tengely) és emissziós (x tengely) hullámhosszt.

A mérés eredménye alapján ZON-tartalom autofluoreszcenciás meghatározására 280 nm gerjesztési, valamint 520 nm detektálási hullámhossz bizonyult a legalkalmasabbnak. Ilyen paraméterek mellett vizes minták esetén az emittált fény intenzitása a ZON-koncentrációjának függvényében szigmoid (logisztikus) lefutást mutatott (9. ábra). Az illesztett szigmoid görbe alapján autofluoreszcencia mérése esetén a LOD értékét 11,5 µg/ml-ben határoztuk meg.

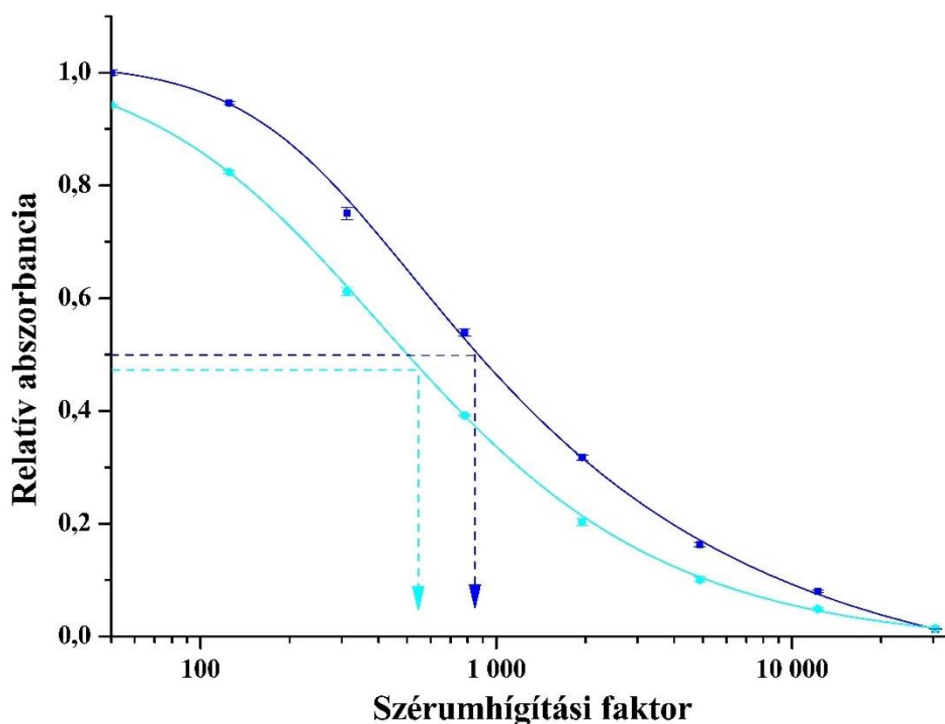


9. ábra: A zearalenon (ZON) kalibrációs görbéje 175 és 1000000 ng/ml közötti tartományban autofluoreszcencia detektálása esetén. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

#### 4.1.2. A zearalenon (ZON) elleni szérum titrálási és gátlási vizsgálata

Az immunizálás eredményességének ellenőrzése a két, nyúlból származó anti-(ZON-CONA) szérum (nyúl1, nyúl2) titrálásával történt 1:50 és 1:12200 hígítási arányok között, ahol az antigén ZON a mikrotiterlemez felszínére BSA-konjugált hapténje formájában (ZON-BSA) került érzékenyítőpufferben, 5 µg/ml koncentrációban. A szérumtiter meghatározása során (az a hígítás, mely az antigén 50%-át megköti az adott körülmények között) a két antiszérum között csak enyhe különbség volt: a titerérték nyúl1 esetében 1:828, míg nyúl2-nél 1:448 (10. ábra).

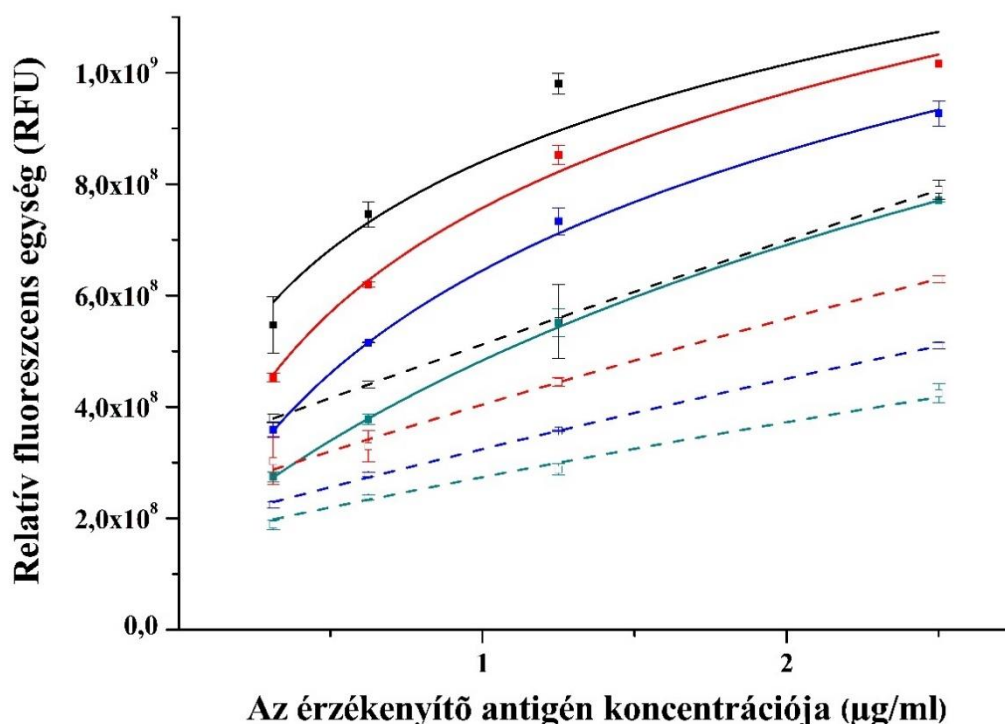




10. ábra: A háromhónapos, új-zélandi fehér fajtájú nőstény nyulakból származó antiszérumok analitikai jellemzése. A nyúl1 (■) és nyúl2 (■) antiszérum titergörbéje 1:50-1:12200 hígítási tartományban, 5 µg/ml ZON-6'-karboxi-metil-oxim-BSA-konjugátummal való érzékenyítéssel és 1% foszfátpufferes sóoldatban oldott zselatinnal való blokkolással. Az abszcisszán a szérumhígítás logaritmikus léptékben feltüntetve szerepel.

A további vizsgálatokban a nyúl1 antiszérum került alkalmazásra, mely az antigénhez való kötődésre valamivel magasabb affinitást mutatott. A pontosság, valamint a mérések reprodukálhatósága érdekében az ELFIA tesztekben az antiszérumot 1:1000 hígítási faktorialkalmaztuk. A túltelítődés, vagy a túl alacsony detektálható jelszint elkerülése érdekében az érzékenyítő antigénkoncentrációjának és a szérum hígítási faktorának optimalizálása kétdimenziós (*checkboard*) titrálás elvégzésével történt. A ZON-BSA, mint érzékenyítő antigén vízszintes irányban 0,313 µg/ml-től 2,50 µg/ml-ig növekvő koncentrációkban került a mikrotiterlemezre, melyhez az antiszérumot 1:3375 és 1:1000 közötti, függőleges irányban csökkenő hígítási faktorokban adtuk. Minden lehetséges kombináció gátolatlan és 3,2 ng/ml ZON hozzáadásával gátolt formában is vizsgálatra került. Az érzékenyítő koncentrációja, és az antiszérum hígítási faktora is egyenletes mértékben befolyásolta az analitikai paramétereket (11. ábra). Az RFU analitikai jel az érzékenyítő koncentrációjának növelésével nőtt, míg a szérum hígítási faktorának

növelésével csökkent. A 3,2 ng/ml koncentrációjú ZON a jel mintegy 40,0% ± 0,1%-os csökkenését okozta.



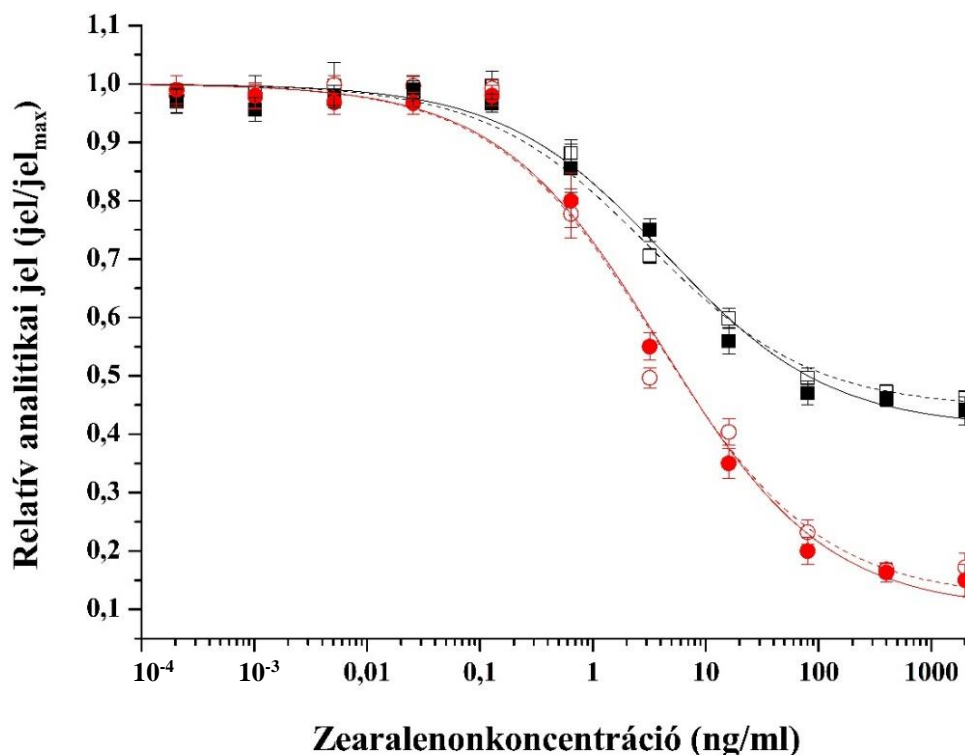
11. ábra: A háromhónapos, új-zélandi fehér fajtájú nőstény nyulakból származó antiszérumok analitikai jellemzése. A nyúl antiszérum kétdimenziós titrálása az érzékenyítő antigén 0,313–2,50 µg/ml koncentrációtartományában. Az antiszérum hígítási faktorai (kitöltött jelek, folyamatos vonal): 1:1000 (■), 1:1500 (■), 1:2250 (■), 1:3375 (■). A titrálás eredménye azonos körülmények között, 3,2 ng/ml zearalenon gátlóként való hozzáadásával a különböző hígítási faktorok esetén (kitöltetlen jelek, szaggatott vonal): 1:1000 (□), 1:1500 (□), 1:2250 (□), és 1:3375 (□).

#### 4.1.3. Zearalenon (ZON) meghatározása abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával

Indirekt versengő ELISA vizsgálatokat végeztünk ZON kalibrációs görbék, valamint a LOD meghatározásához. A mérési tartományt pufferben oldott, 0,004 pg/ml – 2 µg/ml ZON-koncentrációjú hígítási sorral vizsgáltuk. 2 µg/ml és afeletti koncentrációk alkalmazásánál a ZON teljes mértékben gátolta a ZON-specifikus első antitestek felszínhez való kikötődését, ami azt jelenti, hogy az oldatban levő antitestek összes kötőhelyét telítette, így lehetetlenné téve azok immunkompleképzését a felszínhez rögzített ZON–BSA-konjugátummal.

A mátrixhatás (lásd 2.3.2. fejezet) meghatározásához pufferben, valamint felszínivízmintában felvett hígítási sorok hét kalibrációs pontja alapján felvett kalibrációs görbéket hasonlítottuk össze,

melyek között statisztikailag szignifikáns eltérést nem találtunk ( $p > 0,05$ ). Ez alapján felszínivízminták esetében a ZON mennyiségének meghatározása a minta-előkészítési folyamat nélkül elvégezhető. A kalibrációs görbék és a LOD meghatározása abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával is megtörtént (12. ábra). A két módszer eredményeinek összehasonlíthatósága érdekében a detektált jelek relatív értéként kerültek megjelenítésre (a jel aránya az adott detektálási módszer maximális jeléhez viszonyítva).



12. ábra: A ZON indirekt versengő rendszerben felvett kalibrációs görbéi pufferes (kitöltetlen jelek, szaggatott vonal) és dunai vízmintás (kitöltött jelek, folyamatos vonal) abszorbancia (■, □) és fluoreszcencia (●, ○) detektálásával, 576 illetve 593 nm detektálási hullámhosszon. A normalizált ( $\text{jel}/\text{jel}_{\text{max}}$ ) adatokat átlag  $\pm$  szórás formában jelentettük meg. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

A szigmoid görbe felső platójának szintjét a gátolatlan szérum által szolgáltatott jeltől számított átlagos relatív analitikai jel adta meg, míg az alsó platót a teljesen gátolt szérumhoz tartozó átlagos relatív analitikai jel. Az abszorbancia méréséhez tartozó kalibrációs görbe paramétereit a 3. táblázat tartalmazza. Abszorbancia detektálása esetén a módszer LOD értéke 0,25 ng/ml volt, mely a hasonló, kromofórként 1,2-fenilén-diamin-hidrokloridot (OPD) alkalmazó kolorimetriás ELISA LOD értékénél (0,85 ng/ml) 3,4-szer alacsonyabb.

A fluoreszcencia méréséhez tartozó kalibrációs görbe paramétereit a 4. táblázat tartalmazza. A vizsgálat végén az enzimreakció végtermékeként létrejövő rezorufin fluoreszcenciájának detektálása esetén a módszer LOD értéke 0,09 ng/ml. A fluoreszcens detektálás értékei által megadott görbe valamivel meredekebb dinamikus tartománnyal rendelkezik (12. ábra), így az ELFIA módszer mintegy 2,8-szor érzékenyebbnek bizonyult a rezorufin abszorbanciáját detektáló klasszikus ELISA módszernél. A módszer dinamikus mérési tartományának felső határa abszorbancia és fluoreszcencia detektálása esetén is 400 ng/ml.

3. táblázat: A zearalenon (ZON) abszorbanciás detektálásának értékeire Rodbard-egyenlet<sup>1</sup> alapján illesztett görbe paramétere

A görbeillesztéshez használt matematikai egyenlet:		
$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (\frac{x}{x_0})^p} + A_2$		
$R^2: 0,990$		
	Paraméter	Érték ± szórás
Abszorbancia	A <sub>1</sub>	0,977 ± 0,022
	A <sub>2</sub>	0,451 ± 0,013
	x <sub>0</sub>	2,860 ± 0,381
	p	0,791 ± 0,122

<sup>1</sup> Négyparaméteres Rodbard-egyenlet. Az ötparaméteres Rodbard-egyenlet ötödik paramétere szimmetrikus görbe esetén 1.

4. táblázat: A zearalenon (ZON) fluoreszcenciás detektálásának értékeire Rodbard-egyenlet<sup>1</sup> alapján illesztett görbe paraméterei

A görbeillesztéshez használt matematikai egyenlet:		
$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$		
R <sup>2</sup> : 0,988		
	Paraméter	Érték ± szórás
Fluoreszcencia	A <sub>1</sub>	0,910 ± 0,015
	A <sub>2</sub>	0,164 ± 0,031
	x <sub>0</sub>	2,415 ± 0,271
	p	0,835 ± 0,194

<sup>1</sup> Négyparaméteres Rodbard-egyenlet. Az ötparaméteres Rodbard-egyenlet ötödik paramétere szimmetrikus görbe esetén 1.

#### 4.1.4. A fényintenzitás változtatásának hatása

A kalibrációs görbéket különböző fényintenzitású gerjesztés mellett is meghatároztuk. A LED fényforrás 256 nem egyenlő eltérésű fényerősségre állítható be 532 nm hullámhossznál 0,001 µW és 4,63 mW között. A rendszert úgy hangoltuk, hogy a legalacsonyabb detektálható érték 20 és 30 RFU közé essen, míg a legmagasabb 4095 RFU legyen (mely a műszer által mérhető legmagasabb jel). A LED fényintenzitását 1,1 és 314 µW között változtattuk. A méréseket 1,1, 100,2, 169,4, 256 és 314 µW beállításával végeztük el. Háttérként 2000 ng/ml ZON-koncentrációt alkalmaztunk, mely az antiszérum felszíni kikötődésének teljes gátlását okozta.

1,1 µW esetén a ZON különböző koncentrációi nem eredményeztek eltérő RFU értéket (p > 0,05), míg 314 µW beállításakor az RFU érték a 0,64 ng/ml ZON-koncentrációnál érte el a maximumot. A fényerő mérésre gyakorolt hatását 100,2, 169,4 és 256 µW fényintenzitásnál határoztuk meg, ahol sorrendben 24,7 ± 1,1, 27,9 ± 0,8 és 43,7 ± 1,0 RFU háttérjeleket, valamint 1447, 2303 és 3131 RFU maximális (gátolatlan) jeleket kaptunk. Az adatok értékelése során az értékeket a háttérrel korigáltuk. Az IC<sub>50</sub> értékeket a 0,0256–2000 ng/ml ZON-koncentrációtartomány kalibrációs görbéi alapján határoztuk meg, melyek 100,2, 169,4 és 256 µW fényerősség esetén

2,52 ± 0,24, 3,04 ± 0,31 és 3,68 ± 0,29 ng/ml voltak. A LOD értéket a fényforrás fényerőssége szignifikánsan nem befolyásolta ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.5. A zearalenonspecifikus antiszérum keresztreaktivitási vizsgálata a ZON bomlástermékeivel

Az optimalizált rendszerben a ZON bomlástermékeinek és szerkezeti analógjainak nyúl anti-(ZON-CONA) szérumra gyakorolt potenciális gátló hatását is megvizsgáltuk. Mivel a ZON főleg hidrolízis útján metabolizálódik, melynek eredménye emlősökben (juh)  $\alpha$ - és mikroorganizmusban (élesztő)  $\beta$ -zearalenol (MILES et al. 1996, MEGHARAJ et al. 1997), a keresztreakciók vizsgálatába e kettőt, valamint redukált származékaikat ( $\alpha$ - és  $\beta$ -zearalanol, zearalanon) vontuk be. Abszorbancia és fluoreszcencia mérésének alkalmazásával is meghatároztuk az  $IC_{50}$  értékeket, valamint megállapítottuk a relatív keresztreaktivitást (CR%), ahol a ZON általi gátlást tekintettük 100%-nak (5. táblázat). Mindkét detektálási módszernél a legmagasabb keresztreaktivitást a zearalanon esetében mértük (abszorbanciánál  $25,7 \pm 3,6$ , fluoreszcenciánál  $26,7 \pm 3,4$  CR%-ot), melytől nem sokkal maradt el a  $\beta$ -zearalenol. A legalacsonyabb relatív keresztreaktivitást a  $\beta$ -zearalanol eredményezte (abszorbanciánál  $1,1 \pm 0,2$ , fluoreszcenciánál  $0,9 \pm 0,1$  CR%-ot).

5. táblázat: A zearalenon (ZON) rokonvegyületei által kiváltott keresztreakciók (CR%)

Mikotoxin	Detektálási módszer			
	Fluoreszcencia		Abszorbancia	
	$IC_{50}$ (ng/ml)	CR%	$IC_{50}$ (ng/ml)	CR%
zearalenon	$2,20 \pm 0,31$	100	$2,73 \pm 0,35$	100
$\alpha$ -zearalenol	$10,42 \pm 0,24$	$21,1 \pm 3,0$	$10,49 \pm 1,28$	$20,1 \pm 2,6$
$\beta$ -zearalenol	$8,74 \pm 0,90$	$25,2 \pm 3,6$	$8,65 \pm 0,84$	$25,4 \pm 3,3$
zearalanon	$9,56 \pm 0,74$	$25,7 \pm 3,6$	$8,24 \pm 0,82$	$26,7 \pm 3,4$
$\alpha$ -zearalanol	$35,36 \pm 2,86$	$6,2 \pm 0,9$	$35,63 \pm 3,05$	$6,2 \pm 0,8$
$\beta$ -zearalanol	$200,7 \pm 12,32$	$1,1 \pm 0,2$	$250,02 \pm 21,68$	$0,9 \pm 0,1$

Az eredmények alapján az látható, hogy az antitestek érzékenységét növeli, ha telítetlen kötés található a rezorcilakton-szerkezetben, illetve affinitásuk a hidroxiszármazék metabolitokhoz

alacsonyabb. A hidroxilcsoport térállása ugyancsak befolyásolhatja az antigénfelismerési folyamatot.

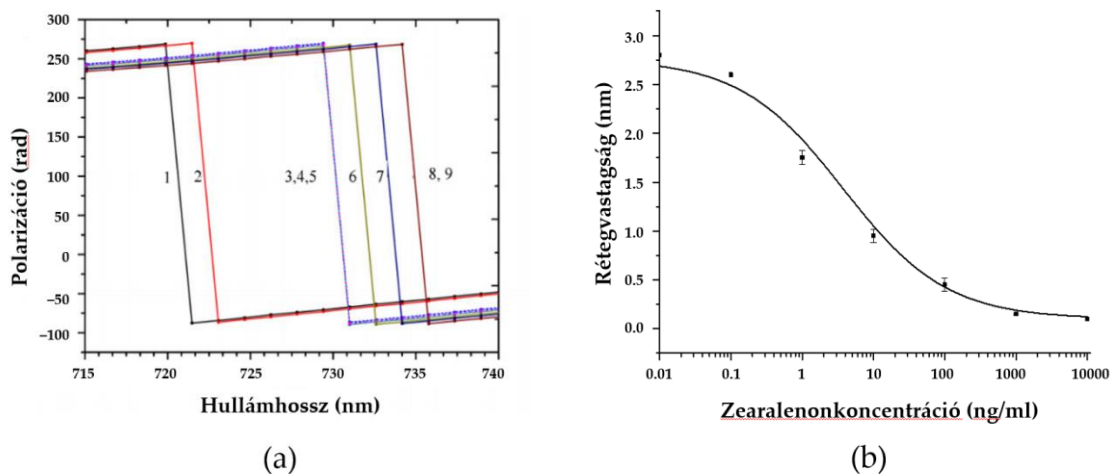
#### **4.1.6. A fejlesztett módszer összehasonlítása más immunanalitikai módszerekkel**

A kifejlesztett ELFIA módszer LOD értékét összehasonlítottuk további, a szakirodalomban fellelhető immunanalitikai módszerekkel (például *immunoassay*, immunszenzor). Általánosságban elmondható, hogy a ZON meghatározására alkalmas immunanalitikai módszereket legtöbbször a célvegyület mezőgazdasági terményekből (kukorica, búza, árpa, rizs) történő kimutatására fejlesztették, így a LOD értéküket általában a termény egységnyi tömegének ZON-tartalmaként adták meg (például  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Az összehasonlíthatóság érdekében az általunk megvizsgált módszereknél ezért ezt a paramétert átszámítottuk a mintakivonatok módszerleírása szerinti végső hígítására. A legtöbb esetben ugyanis a minták szerves oldószeres kivonatait használták (általában vizes acetonitrilben vagy metanolban), mely oldószerek koncentrációja azonban általában legalább 0,1%-ig vagy az alá csökkent, amikor az adott módszer során alkalmazott pufferoldattal a mintát annak ZON-tartalmának a mérési tartományba eséséig hígították. A LOD és a mérési tartomány szélessége tekintetében viszonylag nagy eltéréseket találtunk a kapcsolódó szakirodalomban. ELISA-vizsgálatok esetében volt olyan módszer, melynek LOD értéke 0,002 ng/ml (LIU et al. 2015), míg egy másiké 10 ng/ml (PICHLER et al. 1998), ami két nagyságrendbeli eltérést jelent. A talált adatokat áttekintve elmondható, hogy az alacsonyabb LOD értékű (0,01 ng/ml és azalatti tartomány) módszerek legtöbbje az immunszenzorok csoportjába tartozik, például Tang és munkatársai az indirekt versengő ELISA immunaffinitási oszloppal való összekötésével 0,002 ng/ml-t tudtak elérni (TANG et al. 2014), de létezik olyan felszíni plazmonrezonancián alapuló szenzoros módszer, ahol a LOD érték 0,56 ng/ml (HOSSAIN és MARAGOS, 2018). A legalacsonyabb és a legmagasabb LOD között számos technikát találtunk, az ELISA formátum mellett beleértve például a *radioimmunoassay*-t, az elektrokémiai immunszenzort, vagy a planáris hullámvezetőre alapozott immunszenzort (THOUVENOT és MORFIN 1983, GOUD et al. 2019, NABOK et al. 2021). Az átnézett módszerek adatai alapján az általunk fejlesztett ELFIA a maga 0,09 ng/ml LOD-értékével a középső tartományban helyezkedik el, mely az antitestek specifitásának növelésével tovább csökkenthető. Az indukált fluoreszcencia mérésén alapuló vízminőség-vizsgálat előnye azonban nem elsősorban az érzékenység, hanem a módszer együttes alkalmazhatósága *in situ* körülmények között olyan vízminőségi paraméterek meghatározására, mint a teljes szerves széntartalom, az algasűrűség vagy szerves mikroszennyezők (ZON, *glyphosate* növényvédőszer hatóanyag és *carbamazepin* gyógyszerhatóanyag) jelenléte. Az immunfluoreszcenciás modul mérési

lehetőségei mellett kiterjeszthetők további célvegyületekre is, amennyiben megfelelő antitest beszerezhető.

#### 4.1.7. Zearalenon (ZON) meghatározása teljes belső visszaverődéses ellipszometria módszerrel

Az *immunoassay* módszert teljes belső visszaverődéses ellipszometriás (TIRE) szenzoros detektálással is alkalmazták. Az eljárásban a polarizált fény  $\Psi$  és  $\Delta$  paramétereit, vagyis a fény p- és s- komponenseinek fáziseltolódását mérik, melyek az szenzorfelületen adszorbeált réteg vastagságától és a refraktív index változásaitól egyaránt függenek (NABOK és TSARGORODSKAYA 2008). Mivel a  $\Delta$  paraméter változásai egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyultak a  $\Psi$  változásainál, szenzorválaszként a  $\Delta(\lambda)$  spektrumot alkalmazták a TIRE módszerben. A versengő ZON-*immunoassay* során a  $\Delta(\lambda)$  spektrum alakulása és a TIRE vizsgálat során kapott kalibrációs görbe (a ZON koncentrációja arányában az adszorbeált réteg vastagságának változása) a 13. ábrán láthatók. A szenzorválasz a 12. ábrához hasonló, ahol a legmagasabb ZON-koncentráció eredményezte a legalacsonyabb jelet, ami versengő *immunoassay* esetében tipikus. A sztenderd kalibrációs görbe alapján a módszer megállapított LOD értéke ZON esetében 0,01 ng/ml.

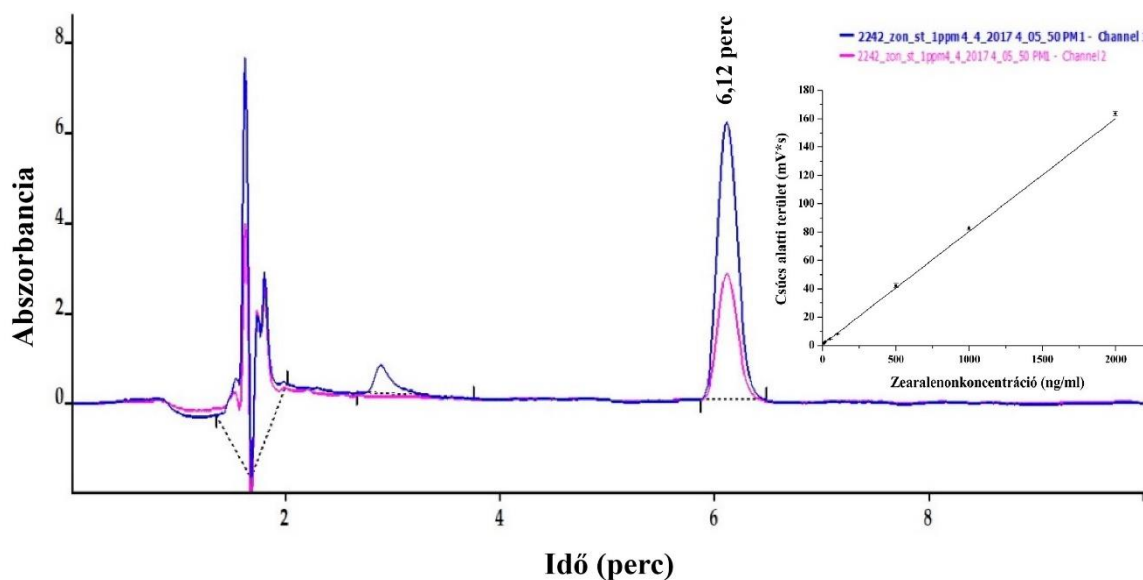


13. ábra: Versengő immunszenzor zearalenon (ZON) meghatározására teljes belső visszaverődéses ellipszometriás (TIRE) detektálási módszerrel. (a) A  $\Delta(\lambda)$  spektrum tipikus sorozatai aranyfelületen (1), poliallilamin-hidrokloridon (2), ZON-szarvasmarhaszérumalbumin-konjugátumon (3), szarvasmarha-szérumalbuminon (4), antitest-ZON komplexen előinkubált elegyből, melynek ZON-tartalma: 100 (5), 10 (6), 1 (7), 0,1 (8) és 0,01 (9) ng/ml. (b) Az adszorbeált réteg vastagságának változása a ZON koncentrációja függvényében (az előinkubált elegyben) a TIRE mérések adatainak illesztése alapján. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.



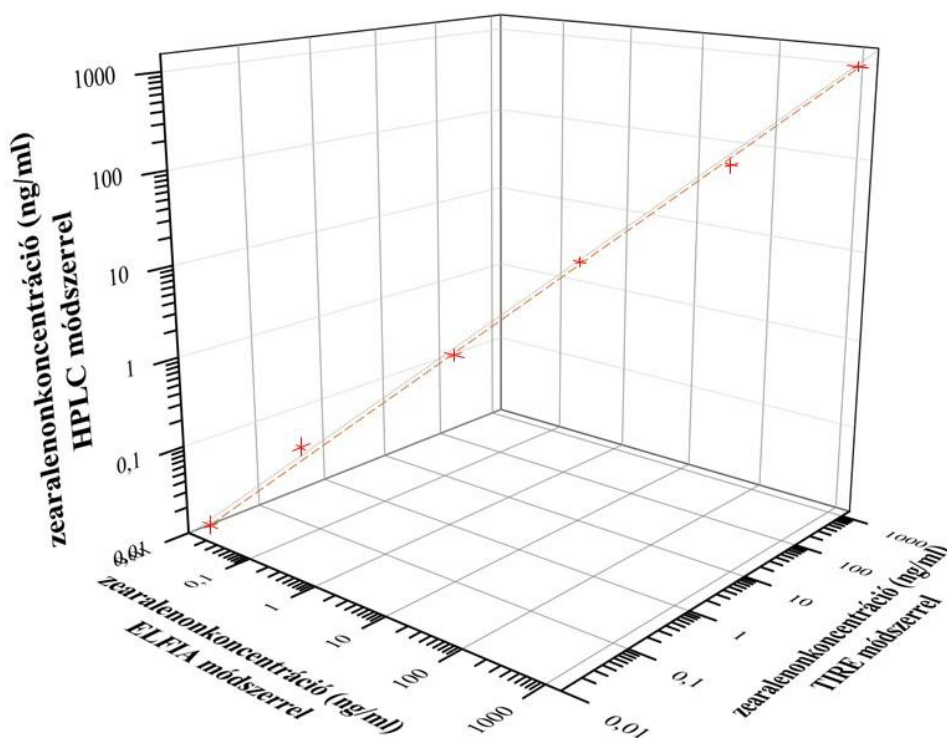
#### 4.1.8. Zearalenon (ZON) meghatározása nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel

A ZON-koncentrációkat HPLC műszeres analízissel is meghatározták a kromatogramok megfelelő retenciós időhöz (6,12 perc) tartozó csúcsai alatti területek alapján három párhuzamos mérésben. A 236 nm hullámhosszon meghatározott, 10 és 2000 ng/ml közötti ZON-koncentrációkhoz tartozó csúcsok alatti területeket lineáris regresszióval vizsgálták, ahol a koncentrációfüggés determinációs együtthatója ( $R^2$ ) minden mérésnél 0,999 volt. A sztenderd oldatokban felvett kalibrációs görbéket is vizsgálták metanol és víz 7:3 arányú, valamint abszolút metanol és 0,1 M koncentrációjú foszfátpufferes sóoldat (PBS) 1:1 arányú keveréke esetén, ahol a lineáris regresszió meredekségi együtthatója metanol és víz esetén  $26,90 \pm 0,06$ , metanol és PBS esetén pedig  $25,92 \pm 0,06$  volt. A kromatográfiás csúcsoknak a háttérjelhez való viszonyát a 236 nm és 274 nm hullámhosszokon felvett jelintenzitások (csúcsterületek) arányával vizsgálták. Az érték a sztenderd oldatok esetében 2,15 volt. A relatív szórások a különböző koncentrációszinteknél a három párhuzamos injektálás esetén 0,65% és 1,76% között voltak. A módszer LOD értékét ZON esetében 10 ng/ml koncentrációban határozták meg. A kromatogram és a lineáris kalibráció (átlagos csúcs alatti területek és szórásaik a három párhuzamos mérés alapján) a 14. ábrán láthatók.



14. ábra: A zearalenon (ZON) nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) készült kromatogramja 1 µg/ml koncentrációban metanol:foszfátpufferes sóoldat 1:1 arányú elegyében oldva. Az insetben látható diagram: A ZON lineáris kalibrációja (átlagos csúcs alatti terület a három párhuzamos mérésből szórásokkal) a 10-2000 ng/ml koncentrációtartományban 236 nm hullámhosszon UV detektálással csatolt nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával meghatározva.

A fentiekben ismertetett módszerekben (ELFIA, TIRE, HPLC) végzett koncentrációmérések összehasonlításával megállapítottuk, hogy milyen mértékű egyezést mutattak az egyes módszerekben meghatározott ZON-koncentrációk a 0,01 – 1000 ng/ml koncentrációtartományban (15. ábra). Jól látható, hogy a háromdimenziós diagramban, melyben az egyes tengelyeken az adott mintában az adott módszerrel mért ZON-koncentrációk szerepelnek, a három koncentrációérték egymáshoz való viszonyát mutató diagrampontok pontosan a három módszer által meghatározott paramétertér (esetünkben kocka) testátlóján haladó egyenesre esnek. Ez nem meglepő, hiszen a nominális és mért koncentrációértékek közötti meredekség mindhárom módszer esetében 1-hez közeli érték ( $1,030 \pm 0,053$ ), a determinációs együtthatók ( $R^2$ ) értéke pedig 0,999 fölötti volt ( $R^2_{\text{ELFIA}}: 0,9999$ ,  $R^2_{\text{TIRE}}: 0,9992$ ,  $R^2_{\text{HPLC}}: 0,9999$ ).



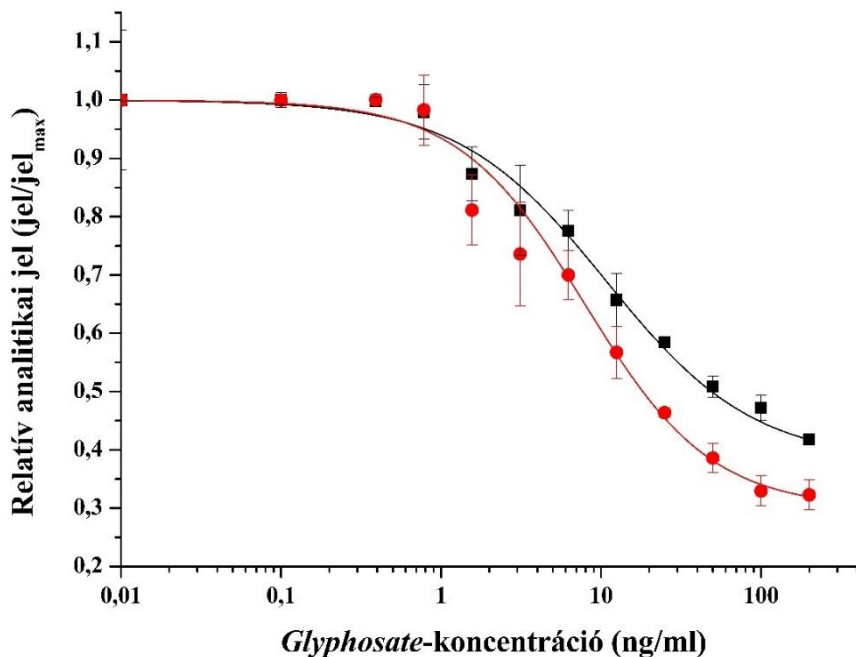
15. ábra: A zearalenon (ZON) háromféle eljárással, így enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA), teljes belső visszaverődéses ellipszometriás (TIRE) szenzoros, valamint nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel detektált koncentrációinak összevetése háromdimenziós koordinátatérben, a 0,01–1000 ng/ml koncentrációtartományban. A detektált koncentrációk kiváló korrelációját mutatja, hogy a mérési pontokra illesztett egyenes (szaggatott piros vonal) pontos illeszkedéssel a paramétertér testátlóján (pontosított szürke vonal) halad. A koordinátatengelyeken a ZON-koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

## 4.2. *Glyphosate*-meghatározási vizsgálatok

*Glyphosate*-tartalom meghatározásához olyan heterogén fázisú, versengő *immunoassay* módszert dolgoztunk ki, mely mind abszorbancia, mind fluoreszcencia detektálásával alkalmazható. A vizsgálat során a mikrotiterlemez üregeinek felszínén rögzített, humán szérumalbuminnal (HSA) konjugált *glyphosate*-analóg lép reakcióba a *glyphosate*-specifikus antitesttel, mely immunkomplex létrejöttét a mintában jelen levő *glyphosate* kompetitíven gátolja. Az immunogén fehérjekonjugátum előállítása során a *glyphosate* hapténmolekulájában a glicinrész nitrogénatomján helyezték el azt a kapcsolóreagenst (karboxi-metil-csoportot) amelyet azután hordozófehérjéjéhez (HSA) konjugáltak, így az antiszérum a *glyphosate* nitrogénatomjának módosításával létrehozott hapténhez mutat erős affinitást (és nem *glyphosate*-hoz), ezért az antitestek eredményes alkalmazhatósága érdekében a vizsgálat során a mérni kívánt *glyphosate*-molekulákat a hapténmolekulához hasonló szerkezetre szükséges alakítani. Ehhez a minta-előkészítési művelet sor elejére beiktattunk egy származékképzési lépést, amely nitrogénatomról eltávolítja a disszociábilis hidrogénatomot. Ez az átalakítás egyetlen N-acilezési lépésben megvalósítható és az antitest szelektivitása szempontjából is megfelelőnek bizonyult. A módszert optimalizáltuk *glyphosate* meghatározására felszínivízmintákban, talajmintákban és növényi szövetmintákban is.

### 4.2.1. *Glyphosate*-tartalom meghatározása abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával

Az előállított *glyphosate*-specifikus immunreagensek felhasználásával indirekt versengő ELFIA rendszerben vizsgálatokat végeztünk a *glyphosate* kalibrációs görbéi, valamint a LOD meghatározásához. A tesztekben 0 és 100 ng/ml közötti koncentrációban alkalmaztunk pufferben oldott *glyphosate* analitikai sztenderdet, ahol a Rodbard-egyenlet (RODBARD és HUTT 1973) alapján illesztett görbét felvettük, és a LOD értéket is megállapítottuk, mind abszorbancia, mind fluoreszcencia detektálása esetén. A két módszer összehasonlíthatósága érdekében a kapott jeleket relatív értéként jelenítettük meg, arányítva azokat az adott detektálási módszerrel kapott maximális (gátolatlan) jelszinthez (16. ábra).



16. ábra: Versengő indirekt kalibrációs görbék *glyphosate* meghatározására abszorbancia (fekete) és fluoreszcencia (piros) detektálásával 576 és 593 nm-en, 0,5 µg/ml *glyphosate*-analóg-hordozófehérje-konjugátummal érzékenyített lemez és 0,4 µg/ml koncentrációjú *glyphosate*-analógra specifikus antitest alkalmazása esetén. A normalizált (jel/jel<sub>max</sub>) adatokat átlag ± szórás formában jelenítettük meg. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

Abszorbancia detektálása esetén a jelet 576 nm hullámhosszon mértük. Az abszorbancia detektálásával kapott értékekre illesztett görbe paramétereit a 6. táblázat tartalmazza. A kifejlesztett módszer LOD értéke abszorbancia detektálása esetén 0,22 ng/ml, melyet a negatív kontroll (0 ng/ml *glyphosate*) 576 nm hullámhosszon mért optikai sűrűsége alapján számítottunk ki (háttér), melyből a háttér szórásának háromszorosát kivontuk.

A fejlesztett módszer esetében fluoreszcencia detektálása esetén a jelet 593 nm hullámhosszon mértük. A fluoreszcencia detektálásával kapott értékekre illesztett görbe paramétereit a 7. táblázat tartalmazza. Fluoreszcencia mérésével a LOD értéke 0,09 ng/ml, melyet a negatív kontroll által adott jel alapján számítottunk (0 ng/ml koncentrációjú *glyphosate* sztenderd), kivonva belőle a háttér szórásának háromszorosát. Amellett, hogy az indukált fluoreszcencia detektálásával 2,4-szer alacsonyabb LOD értéket tudtunk elérni, a dinamikus mérési tartomány valamelyest meredekebb, mint abszorbancia mérése esetén (16. ábra), hasonlóan a ZON-tartalom meghatározására fejlesztett rendszer esetéhez.

6. táblázat: A *glyphosate* abszorbanCIAS detektálásának értékeire Rodbard-egyenlet<sup>1</sup> alapján illesztett görbe paramétere

A görbeillesztéshez használt matematikai egyenlet:		
$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$		
R <sup>2</sup> : 0,986		
	Paraméter	Érték ± szórás
AbszorbanCIA	A <sub>1</sub>	1,005 ± 0,005
	A <sub>2</sub>	0,384 ± 0,010
	x <sub>0</sub>	10,752 ± 1,071
	p	0,944 ± 0,111

<sup>1</sup> Négyparaméteres Rodbard-egyenlet. Az ötparaméteres Rodbard-egyenlet ötödik paramétere szimmetrikus görbe esetén 1.

7. táblázat: A *glyphosate* fluoreszcenciás detektálásának értékeire Rodbard-egyenlet<sup>1</sup> alapján illesztett görbe paramétere

A görbeillesztéshez használt matematikai egyenlet:		
$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$		
R <sup>2</sup> : 0,990		
	Paraméter	Érték ± szórás
Fluoreszcencia	A <sub>1</sub>	1,014 ± 0,002
	A <sub>2</sub>	0,254 ± 0,022
	x <sub>0</sub>	7,939 ± 0,952
	p	1,054 ± 0,120

<sup>1</sup> Négyparaméteres Rodbard-egyenlet. Az ötparaméteres Rodbard-egyenlet ötödik paramétere szimmetrikus görbe esetén 1.

Az Aquafluosense projekt keretén belül fejlesztett módszerünk egy járműbe szerelt mobil laboratóriumi műszercsalád részét képezi. Így a *glyphosate* meghatározása *in situ* körülmények között is lehetséges. A teljes mérési folyamat, mely során 25 minta egyidejű mérése lehetséges három párhuzamosban, körülbelül három órát vesz igénybe: húsz perc a származékképzés, két óra a minta és az első antitest közös inkubációja, 30 perc a második antitest inkubációja, majd 2–10 perc a jelifejlődés. A vizsgálat során fontos a mikrotálcát parafilmmel lefedni a párolgás megelőzése érdekében. A humán szérumalbumin adszorpciója a mikrotiterlemezhez alacsony pH mellett visszafordítható, így újabb érzékenyítés lehetséges ugyanazon a felszínen, de a mikrotiterlemezek újrahasznosítása ELISA/ELFIA vizsgálatokban nem megszokott.

#### 4.2.2. Az immunoassay optimalizálása

Az egyes *immunoassay*-teszteken belüli (*intra-immunoassay*) és tesztek közötti (*inter-immunoassay*) statisztikai vizsgálat elvégzéséhez pufferoldatban oldott, egy származékképzési folyamatból származó mintákat nyolc koncentráción, tíz ismétlésben, valamint tíz különböző mérési folyamat mintáit két ismétlésben vizsgáltunk, és az adott *glyphosate*-koncentrációjú mintákhoz tartozó mért koncentrációértékeket a teszteken belül és a tesztek között átlagoltuk. Az eredmények alátámasztották azt az általánosan elfogadott nézetet, mely szerint a mérés megbízhatósága, pontossága és ismételhetősége a szigmoid görbe alsó platója környékén nem optimális. Az analitikai kimutatási határ közelében a mérések szórása magasabb, mint a sztenderd görbe inflexiós pontjánál ( $IC_{50}$ ), mely rontja a *glyphosate*-tartalom meghatározásának pontosságát (8. táblázat). Alacsonyabb (0,28–0,45 ng/ml) koncentrációk esetén a relatív szórás (CV%) teszten belül 25,1% és tesztek között 15,0% mértékűnek mutatkozott, míg az  $IC_{50}$  érték ( $10,75 \pm 9,07$  ng/ml) környékén teszten belül 8,7%, tesztek között pedig 7,7% volt.

8. táblázat: A módszer teszten belüli és tesztek közötti pontossága *glyphosate* meghatározására pufferoldatban

Teszten belüli ( <i>intra-assay</i> )		Tesztek közötti ( <i>inter-assay</i> )	
átlagos detektált <i>glyphosate</i> -koncentráció (ng/ml)	CV%	átlagos detektált <i>glyphosate</i> -koncentráció (ng/ml)	CV%
$0,28 \pm 0,07$	25,1	$0,45 \pm 0,07$	15,0
$1,04 \pm 0,15$	14,4	$1,43 \pm 0,13$	9,2
$3,74 \pm 0,30$	8,0	$4,27 \pm 0,29$	6,9
$11,84 \pm 1,03$	8,7	$12,14 \pm 0,93$	7,7

CV%: relatív szórás

#### 4.2.3. A glyphosate-specifikus antitestek keresztreaktivitásának vizsgálata

A csirkéből nyert *glyphosate*-specifikus antitestek specifitását különböző, szerkezetileg *glyphosate*-hoz hasonló vegyületekkel való keresztreaktivitásuk alapján ellenőriztük. A keresztreaktivitási vizsgálatokba bevontuk a *glyphosate* fő bomlástermékeként számontartott AMPA-t, valamint a hasonló szerkezetű N-(foszfono-metil)-imino-diecetsavat (PMIDA), az imino-diecetsavat, a glicint, az N-acetil-glicint és a szarkozint (9. táblázat). Az eredmények alapján a szerkezetileg hasonló vegyületek csak olyan extrém magas koncentrációban befolyásolták a méréseket, melyek környezeti szempontból nem minősülnek relevánsnak. A legmagasabb gátlási értéket elérő PMIDA 6701 és 1650 ng/ml-es nominális koncentrációjánál a mindössze 0,89, illetve 0,31 ng/ml koncentrációt detektáltunk, mely az antitestek 0,013, valamint 0,018%-os gátlását jelenti.

9. táblázat: A *glyphosate* és rokonvegyületei által kiváltott keresztreakciók (CR%)

Vegyület	Névleges koncentráció (ng/ml)	Detektált koncentráció (ng/ml)	Detektált/névleges koncentráció (CR%)
<i>glyphosate</i>	100	99,3 ± 0,8	100
	50	50,4 ± 1,1	100
AMPA (amino-metil-foszfonsav)	6700	< 0,1	< 0,0015
	100	< 0,1	< 0,01
PMIDA (N-(foszfono-metil)- imino-diecetsav)	6700	0,89	0,013
	1650	0,31	0,018
imino-diecetsav	100	< 0,1	< 0,01
szarkozin	100	< 0,1	0,01
glicin	6700	< 0,1	< 0,0015
	100	< 0,1	< 0,01
N-acetil-glicin	100	< 0,1	< 0,01

A keresztreakció vizsgálatát foszfáttal is elvégeztük, mivel a *glyphosate* meghatározását felszíni vízből, talajból, élelmiszerből vagy növényi szövetekből megzavarhatja a mintában való jelenlétével. Az eredmények azt mutatták, hogy a keresztreaktivitás nagyon alacsony (10. táblázat). Ennek ellenére előfordulhatnak olyan esetek, melyekben szükséges számolni vele.

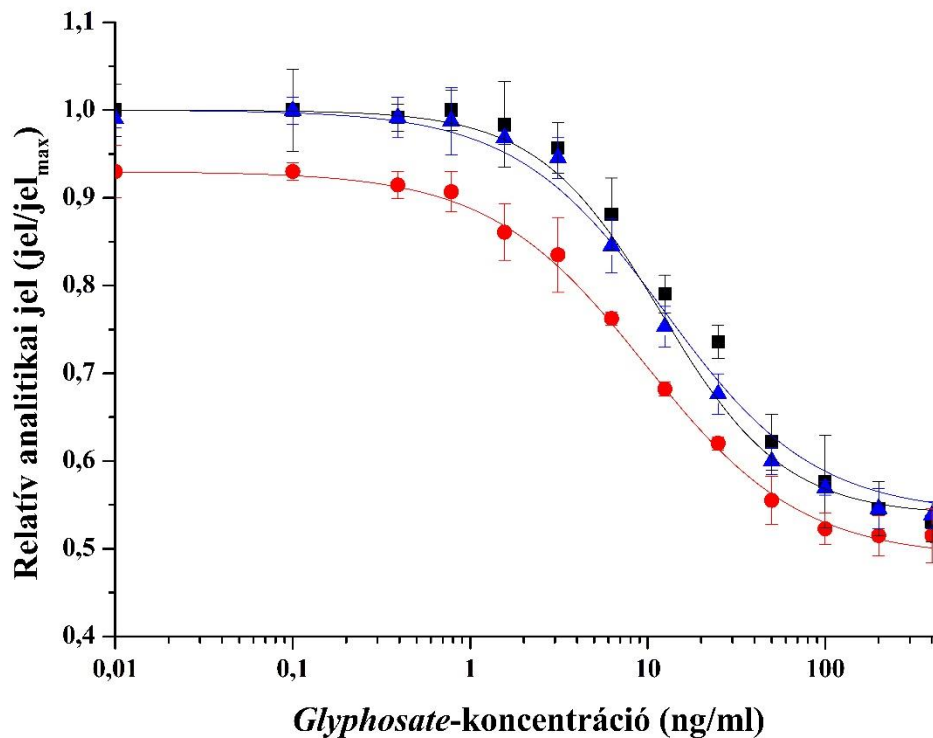
10. táblázat: A foszfátion (mint potenciális zavaró komponens felszíni vizekben) által kiváltott keresztreakciók (CR%)

Névleges foszfátkoncentráció (mM)	Detektált <i>glyphosate</i> - koncentráció (ng/ml)	Detektált/névleges koncentráció (CR%)
175,0	17,6	< 0,0015 ( $6,0 \times 10^{-5}$ )
87,5	8,40	< 0,0015 ( $5,7 \times 10^{-5}$ )
43,8	4,10	< 0,0015 ( $5,5 \times 10^{-5}$ )
21,9	2,26	< 0,0015 ( $6,1 \times 10^{-5}$ )
	átlag	< 0,0015 ( $5,8 \times 10^{-5}$ )

#### 4.2.4. A módszer alkalmazása környezeti és biológiai mintákon

A mátrixhatás-vizsgálatot, melyben a minta célvegyülettől eltérő összetevője által okozott eredményt befolyásoló hatásokat vizsgáltuk (lásd 2.3.2. fejezet) felszíni víz esetében hat, különböző helyről származó minta alkalmazásával végeztük el, melyek közül kettő a Velencei-tóból származott Agárd és Pákozd környékéről, egy a visegrádi Pisztrángos tavakból, egy az azokat tápláló forrásból, egy a Duna budapesti szakaszáról, valamint egy a Balatonból Tihany környékéről. A vizsgálatot talajminta és növényi szövetminták (gyökér és levél) esetében is elvégeztük. A kompetitív ELFIA módszerhez tartozó kalibrációs görbék felvételéhez a hígítatlan vízmintákban és 1:10 arányban hígított talajmintában 0 és 400 ng/ml közti *glyphosate*-koncentrációkat alkalmaztunk (17. ábra).





17. ábra: Az ELFIA tesztek kalibrációs görbéi a *glyphosate* 0-400 ng/ml koncentrációjú tartományában puffer (fekete), dunai vízminta (kék) és talajminta (piros) vizsgálata esetén, fluoreszcencia 593 nm-en történő detektálásával, 0,5 µg/ml *glyphosate*-analóg-hordozófehérje-konjugátummal érzékenyített lemezen 0,4 µg/ml koncentrációjú *glyphosate*-analógra specifikus antitest alkalmazásával. A normalizált (jel/jel<sub>max</sub>) adatokat átlag ± szórás formában jelenítettük meg. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

A mátrixhatás meghatározásához statisztikailag összehasonlítottuk a mintákban végzett vizsgálatok görbéihez tartozó IC<sub>50</sub> értékeket a pufferben végzett tesztek görbéinek IC<sub>50</sub> értékével (11. táblázat). A pufferben végzett teszt IC<sub>50</sub> értéke 12,5 ± 0,4 ng/ml volt, míg a vízminták esetében ez az érték 11,9 és 12,3 ng/ml közé esett 0,3 és 0,6 ng/ml közötti szórásokkal. Az értékek között felszínivízminták esetében statisztikai eltérést nem igazoltunk ( $p > 0,05$ ), ezért az ábrán csak egy vízmintát jelenítettünk meg (17. ábra).

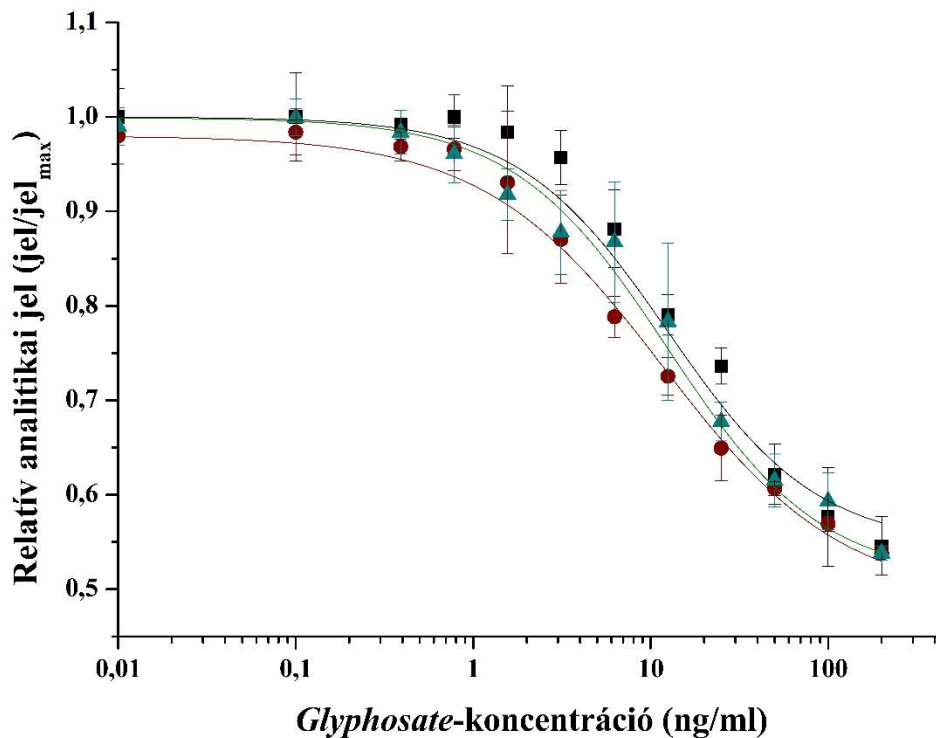
Tekintve, hogy a módszer LOD értéke fluoreszcens detektálás esetén 0,09 ng/ml, és hígítatlan felszínivízminták esetében mátrixhatás nem lépett fel, a módszer alkalmas a *glyphosate* 0,1 ng/ml koncentráció alatti mennyiségének kimutatására is, mely az Európai Unióban növényvédőszer-hatóanyagokra a hivatalos MRL ivóvízben (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2020).

11. táblázat: A mátrixhatás meghatározásához összehasonlított felszínivízminták görbéinek IC<sub>50</sub> értékei és szórásuk

Felszínivíz minta (GPS koordinátákkal)	IC <sub>50</sub> érték (ng/ml)	Szórás (ng/ml)
puffer	12,5	0,4
Velencei-tó Agárdnál (47,190938, 18584617)	12,1	0,5
Velencei-tó Pákozdnál (47,213213, 18,577223)	12,0	0,4
visegrádi Pisztrángos tó (47,774661, 18,986223)	12,1	0,3
visegrádi Pisztrángos tó, tápláló forrás (47,773565, 18 985176)	12,3	0,3
Duna Budapestnél (47,518549, 19,046216)	11,9	0,6
Balaton Tihanynál (46,913958, 17,893470)	12,0	0,4

A talajminta mérése során kismértékű mátrixhatást határoztunk meg 1:10 arányú hígítás esetén (IC<sub>50</sub> érték 9,7 ± 0,4 ng/ml) a pufferes vizsgálat eredményéhez viszonyítva (IC<sub>50</sub> érték 12,5 ± 0,4 ng/ml), ez a statisztikailag szignifikáns eltérés azonban 1:100 arányú hígításnál már nem mutatkozott (p > 0,05).

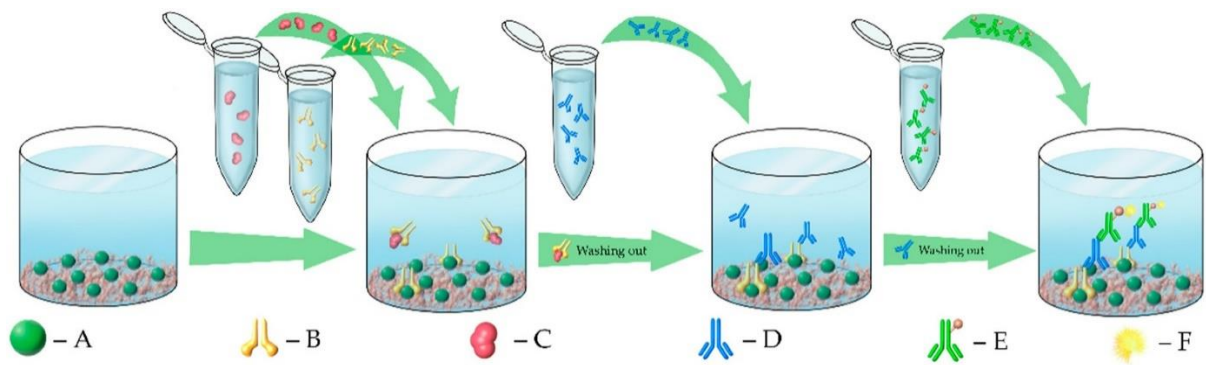
Napraforgóból nyert növényi szövetminták esetében a foszfátpufferes kivonatban a mátrixhatás meghatározáshoz a levél- és gyökérvonatban vettük fel a felszínivízminták és a talajminta esetében is alkalmazott 0 és 400 ng/ml közötti koncentrációkban *glyphosate*-ot, majd az illesztett kalibrációs görbék IC<sub>50</sub> értékét hasonlítottuk az ugyanezen koncentrációkban pufferben felvett *glyphosate* görbéjének IC<sub>50</sub> értékével (18. ábra). Számottevő mátrixhatás különösen a gyökérextraktumban mutatkozott. Amennyiben a foszfátpufferes kivonatokat foszfátpufferrel 1:10 arányban hígítottuk mátrixhatás nem mutatkozott, és IC<sub>50</sub> értéként az alábbiakat kaptuk: pufferben 12,5 ± 0,4 ng/ml, levél kivonatában 12,5 ± 0,3 ng/ml, gyökér kivonatában 11,8 ± 0,3 ng/ml. Az értékek statisztikailag nem tértek el egymástól (p > 0,05).



18. ábra: Az ELFIA tesztek kalibrációs görbéi a *glyphosate* 0-400 ng/ml koncentrációjú tartományában puffer (fekete), levélkivonat (zöld) és gyökérkivonat (barna) vizsgálata esetén, fluoreszcencia 593 nm-en történő detektálásával, 0,5 µg/ml *glyphosate*-analóg-hordozófehérje-konjugátummal való érzékenyítés és 0,4 µg/ml koncentrációjú *glyphosate*-analógra specifikus antitest alkalmazásával. A normalizált (jel/jel<sub>max</sub>) adatokat átlag ± szórás formában jelenítettük meg. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

#### 4.3. A *glyphosate* gátló hatásának vizsgálata egyes RGD-specifikus integrinek RGD-szekvenciához vagy saját ECM fehérjéhez való kötődésére

Vizsgálatunk célja az volt, hogy kiderítsük, hogy a *glyphosate* gátló hatása fellép-e más integrinek esetében is, továbbá, hogy kizárólag a hatóanyag gyakorolja-e, vagy valamelyik származéka (bomlásterméke vagy technikai szennyezője) is. Szintén kérdés volt, hogy mely molekuláris tulajdonságok eredményezik a *glyphosate* ezt az általunk a közelmúltban, de e tanulmányt megelőzően felismert hatását, melyhez a szerkezetileg hasonló vegyületek vizsgálatát vettük igénybe. Vizsgálatainkat az  $\alpha V\beta 3$ - mellett az  $\alpha 5\beta 1$ - és az  $\alpha 11\beta 3$ -integrinen is lefolytattuk. A kötődési képesség meghatározásához heterogén fázisú affinitási-kötődési *immunoassay*-t alkalmaztunk (19. ábra).



19. ábra: Az enzimmel jelölt immunszorbens assay (ELISA) sematikus ábrája. A mikrotiterlemez üregeinek falát az adott integrinhez nagy affinitással kötődő makromolekulákkal (RGD-oligoszekvenciát tartalmazó szintetikus polimer, vagy ECM-fehérje, például vitronektin, fibrinogén vagy SARS-CoV-2 tüskefehérje receptorkötő doménje) érzékenyítettük, a fennmaradó kötőhelyeket szarvasmarha-szérumalbuminnal blokkoltuk (A). Az adott integrin (B) kölcsönhatásba lépett a felszínhez rögzített makromolekulával a ligandumként (C) alkalmazott (*glyphosate* és rokon vegyületei) hiányában, illetve 0–22 mM koncentrációban való jelenlétében a koncentrációtól függően. A felszíni makromolekulákhoz rögzült integrinmolekulákat egérben termelt integrinspecifikus antitestekkel (D) azonosítottuk, majd egy jelölőenzimmel (HRP) konjugált egérspecifikus második antitesttel (E) jelöltük. A HRP kolorimetriás reakciójához szubsztrátként hidrogén-peroxidot használtunk, a kromofór pedig 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin volt (F). Ha a ligandum gátolta az integrin kötődését a felszínhez rögzített makromolekulákhoz, az ELISA további lépései nem mentek végbe, ezért színjel nem jött létre.

A vizsgált ligandumok köre (1. ábra) magába foglalta a célvegyület *glyphosate*-ot izopropilammóniumsója formájában, mely számos *glyphosate*-alapú gyomirtószer-készítményben fordul elő, például a Roundup Classic-ban, valamint gyakoribb vagy kevésbé gyakori bomlástermékeit és technikai szennyezőit (1. táblázat). Az AMPA a *glyphosate* bomlásterméke, mely annak mikrobiális és fotodegradációs lebomlása útján képződik vízben és talajban (GRANDCOIN et al. 2017), míg az N-acetil-*glyphosate* a géntechnológiai úton módosított, N-acetiltranszferáz enzimet kifejező *glyphosate*-toleráns növényekben a legnagyobb mennyiségben képződő bomlástermék (SIEHL et al. 2007). A további vizsgált vegyületek kisebb mértékben képződő bomlástermékek vagy technikai szennyezők. Fizikai-kémiai tulajdonságaik szerint mindegyik vízdékony, közöttük a *glyphosate* vízdoldhatósága a legnagyobb, mely szokatlan tulajdonság növényvédőszer-hatóanyag esetében. Ezek a tulajdonságok megmutatkoznak a vegyületek lipofilitásában is (oktanol-víz megoszlási hányados), mely az 1. táblázatban látható.

A módszert minden esetben a szakirodalomban leírt (KAPP et al. 2017), illetve korábban fejlesztett vizsgálatunk (SZÉKÁCS et al. 2018) alapján állítottuk össze. Utóbbiban a *glyphosate* 11 mM (1,86 mg/ml) koncentrációnál az  $\alpha\beta 3$ -integrin RGD-kötő képességét csaknem teljes mértékben ( $96,3 \pm 3,2\%$ ) gátolta (SZÉKÁCS et al. 2018). A vizsgált anyagok koncentrációtartományának alját a korábbi vizsgálatban gátló hatást még el nem érő *glyphosate*-

koncentrációhoz igazítottuk (137,5  $\mu$ M, 0,0232 mg/ml *glyphosate*), míg a tartomány felső határa a teljes gátlást elérő 22 mM, mely 3,72 g/l *glyphosate* vagy 5,02 g/l *glyphosate* izopropilammónium-só. Ez a koncentráció Roundup Classic herbicid gyártó által kijuttatásra ajánlott, 1:100 arányú hígítású oldatában mérhető *glyphosate*-koncentrációnak felel meg. A vizsgált koncentrációk a tesztekben 22, 11, 5,5, 1,1, 0,138 mM voltak (2. táblázat). A koncentrációk gátló hatását mind a hét vegyület esetében meghatároztuk (1)  $\alpha\beta$ 3 kötődésére az ECM fehérje vitronektinhez, (2)  $\alpha\beta$ 3 kötődésére RGD-szekvenciához, (3)  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 kötődésére RGD-szekvenciához és (4)  $\alpha$ 11 $\beta$ 3 kötődésére az ECM fehérje fibrinogénhez. A *glyphosate* és szerkezeti analógjai által kifejtett gátlás mértéke minden vizsgálati rendszerben az 12. táblázatban látható. A *glyphosate* gátló hatását meghatároztuk  $\alpha\beta$ 3 kötődésére a SARS-CoV-2 tüskefehérje (S-fehérje) receptorkötő doménjéhez is, melynek eredménye alapján az S-fehérjét a további vizsgálatokba nem vontuk be.

12. táblázat: A vizsgált ligandumok (*glyphosate* és szerkezeti analógjai) IC<sub>50</sub> értéke, és az általuk elért legmagasabb gátlás integrineken

ELISA	IC <sub>50</sub> érték (mg/ml és mM) <sup>1</sup> (elért maximális gátlás %)			
	αVβ3 RGD	αVβ3 vitronektin	α5β1 RGD	αIIbβ3 fibrinogén
Gátlószer				
<i>glyphosate</i>	<b>0,46 ± 0,08</b> 2,7 ± 0,5 (100,0 ± 3,9%)	> 3,72 > 22 (44,8 ± 3,6%)	<b>1,64 ± 0,54</b> 9,7 ± 3,2 (85,7 ± 2,1%)	> 3,72 > 22 (40,2 ± 2,6%)
amino-metil- foszfonsav (AMPA)	<b>0,14 ± 0,02</b> 1,3 ± 0,2 (95,9 ± 2,2%)	<b>0,17 ± 0,04</b> 1,5 ± 0,4 (75,3 ± 2,1%)	> 2,44 > 22 (44,8 ± 2,6%)	> 2,44 > 22 (aktiváció) <sup>2</sup>
N-acetil- <i>glyphosate</i>	> 4,64 > 22 (40,6 ± 2,2%)	> 4,64 > 22 (47,5 ± 1,2%)	> 4,64 > 22 (15,0 ± 2,0%)	> 4,64 > 22 (n. d.) <sup>3</sup>
glicin	> 1,65 > 22 (39,5 ± 6,6%)	> 1,65 > 22 (39,5 ± 2,4%)	> 1,65 > 22 (22,1 ± 3,3%)	> 1,65 > 22 (n.d.)
N-acetil-glicin	> 2,58 > 22 (46,8 ± 3,7%)	<b>1,08 ± 0,12</b> 9,2 ± 1,0 (58,5 ± 0,8%)	<b>0,68 ± 0,11</b> 5,8 ± 0,9 (98,9 ± 2,3%)	> 2,58 > 22 (aktiváció)
szarkozin	> 1,96 > 22 (35,0 ± 1,2%)	> 1,96 > 22 (37,9 ± 2,3%)	> 1,96 > 22 (13,4 ± 2,1%)	> 1,96 > 22 (n.d.)
imino-diecetsav	> 2,93 > 22 (24,6 ± 7,9%)	<b>1,53 ± 0,20</b> 11,5 ± 1,5 (52,4 ± 4,2%)	> 2,93 > 22 (8,0 ± 2,0%)	> 2,93 > 22 (n.d.)

<sup>1</sup>Az IC<sub>50</sub> érték az a koncentráció, ahol a vizsgált anyag elérte teljes gátlási hatásának 50%-át.

<sup>2</sup>Aktiváció esetén gátlás helyett erősítő hatást találtunk, mely a negatív kontrollnál magasabb abszorbanciajelben mutatkozott meg. <sup>3</sup>Nem detektáltunk hatást.

#### 4.3.1. Gátló hatás αVβ3-ra RGD szekvenciát tartalmazó biopolimerrel való érzékenyítés esetén

A *glyphosate* és szerkezeti analógjai αVβ3-integrinre gyakorolt gátló hatása a gátló vegyülettől és a felszínre rögzített érzékenyítőtől függően ~25–100% között változott. Az RGD szekvenciát tartalmazó biopolimerre alapozott rendszerben a *glyphosate* és az AMPA teljes, illetve csaknem teljes gátlást ért el, míg ECM fehérjével való érzékenyítés esetén gátló hatásuk csökkent. Ezzel ellentétben a szerkezeti analógok esetén az ECM fehérjealapú rendszerben a gátló hatás erősebbnek bizonyult. A legalacsonyabb gátló hatást a *glyphosate* az integrin S-fehérjéhez való kötődésére gyakorolta.

Az RGD szekvenciát tartalmazó biopolimer alkalmazása biztosította, hogy a mikrotiterlemez felszínén kizárólag ez a kötőhely álljon rendelkezésre az integrin számára. Ilyen körülmények között 22 mM koncentrációnál a *glyphosate* és az AMPA (3,72 és 2,44 mg/ml) teljes, illetve közel teljes gátlást ( $100,0 \pm 3,9\%$  és  $95,9 \pm 2,2\%$ ) ért el, valamint  $IC_{50}$  értékeik sem tértek el nagymértékben egymástól ( $2,7 \pm 0,5$  mM és  $1,3 \pm 0,2$  mM,  $0,46 \pm 0,08$  és  $0,14 \pm 0,02$  mg/ml). A szerkezeti analógok ugyancsak fejtettek ki gátló hatást, de a közülük legerősebb N-acetil-glicin sem érte el az 50%-ot a legmagasabb alkalmazott koncentrációnál. 22 mM koncentrációban az integrin kötődését az N-acetil-glicin (2,58 mg/ml)  $46,8 \pm 3,7\%$ -ban, az N-acetil-*glyphosate* (4,64 mg/ml)  $40,6 \pm 2,2\%$ -ban, a glicin (1,65 mg/ml)  $39,5 \pm 6,6\%$ -ban, a szarkozin (1,96 mg/ml)  $35,0 \pm 1,2\%$ -ban, míg az imino-diecetsav (2,93 mg/ml) mindössze  $24,6 \pm 7,9\%$ -ban gátolta.

#### **4.3.2. Gátló hatás $\alpha V\beta 3$ -ra vitronektinnel való érzékenyítés esetén**

Az  $\alpha V\beta 3$ -integrin ECM fehérjealapú rendszerében a mikrotiterlemez felszínének érzékenyítése vitronektinnel történt. A tesztek során mind a *glyphosate*, mind az AMPA gyengébb gátlást okozott, mint az RGD szekvenciára alapozott tesztek esetén, a legmagasabb (22 mM) koncentrációnál (3,72 mg/ml *glyphosate* és 2,44 mg/ml AMPA)  $44,8 \pm 3,6\%$ , valamint  $75,3 \pm 2,1\%$ -os gátlást eredményezve. Ebben a rendszerben az AMPA gátló hatásának  $IC_{50}$  értéke  $1,5 \pm 0,4$  mM ( $0,17 \pm 0,04$  mg/ml). A további gátlószerek közül az N-acetil-*glyphosate* (4,64 mg/ml), az N-acetil-glicin (2,58 mg/ml), valamint az imino-diecetsav (2,93 mg/ml) hatása az RGD-alapú rendszerhez viszonyítva erősebbnek bizonyult ( $47,5 \pm 1,2\%$ ,  $58,5 \pm 0,8\%$  és  $52,4 \pm 4,2\%$ ). Az N-acetil-glicin  $IC_{50}$  értéke  $9,2 \pm 1,0$  mM ( $1,08 \pm 0,12$  mg/ml), az imino-diecetsavé pedig  $11,5 \pm 1,5$  mM ( $1,53 \pm 0,20$  mg/ml) volt. Glicin (1,65 mg/ml) és szarkozin (1,96 mg/ml) esetében az RGD-vel, illetve ECM fehérjével érzékenyített mikrotiterlemezen végzett tesztek eredményei közt szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk ( $p > 0,05$ ). ECM fehérjével való érzékenyítés esetén a maximális gátlás  $39,5 \pm 2,4\%$ , illetve  $37,9 \pm 2,3\%$  volt.

#### **4.3.3. Gátló hatás $\alpha V\beta 3$ -ra SARS-CoV-2 tüskefehérje receptorkötő doménjével való érzékenyítés esetén**

Mivel a SARS-CoV-2 vírus tüskefehérjéje (S-fehérje) tartalmazza az RGD motívumot, a *glyphosate*  $\alpha V\beta 3$ -integrin kötődését gátló hatását egy erre alapozott rendszerben is megvizsgáltuk, ahol 22 mM (3,72 mg/ml) koncentrációnál mindössze  $35,6 \pm 4,4\%$ -os gátló hatást ért el. Ez az eredmény közvetetten arra mutat, hogy a vírus tüskefehérjéje egyéb biokémiai útvonalak mellett az RGD kötőhely segítségével is ki tudja fejteni hatását. Mivel a *glyphosate* a legerősebb hatást az

$\alpha V\beta 3$ -integrinre gyakorolta, és az egyéb ligandumok között messze a legerősebb gátlónak bizonyult, az S-fehérjét a további rendszerekbe nem vontuk be.

#### **4.3.4. Gátló hatás $\alpha 5\beta 1$ -re RGD szekvenciát tartalmazó biopolimerrel való érzékenyítés esetén**

Bár az összes vizsgált vegyület gyakorolt valamilyen szintű gátló hatást az  $\alpha 5\beta 1$  RGD motívumhoz való kötődésére, teljes gátlást csak az N-acetil-glicin ért el 22 mM (2,58 mg/ml) koncentrációnál ( $98,9 \pm 2,3\%$ ),  $IC_{50}$  értéke pedig  $5,8 \pm 0,9$  mM ( $0,68 \pm 0,11$  mg/ml) volt. Az RGD-alapú ELISA rendszerben a *glyphosate* hatása 3,7-szer, míg az AMPA hatása 17,5-ször bizonyult alacsonyabbnak  $\alpha 5\beta 1$ -integrinre nézve, mint  $\alpha V\beta 3$ -ra. A *glyphosate* 22 mM (3,72 mg/ml) esetén  $85,7 \pm 2,1\%$ -os gátlást eredményezett,  $IC_{50}$  értéke pedig  $9,7 \pm 3,2$  mM ( $1,64 \pm 0,54$  mg/ml) volt, míg az AMPA a legmagasabb koncentrációnál (22 mM, 2,44 mg/ml) 50% alatti, mindössze  $44,8 \pm 2,6\%$ -os gátlást ért el. A további gátlószerek közül a glicin hatása volt a legerősebb ( $22,1 \pm 3,3\%$  a legmagasabb koncentrációnál), míg ugyanezen koncentráción az N-acetil-*glyphosate*, a szarkozin és az imino-diecetsav hatása ennél alacsonyabbnak bizonyult  $15,0 \pm 2,0\%$ ,  $13,4 \pm 2,1\%$  és  $8,0 \pm 2,0\%$ -os gátlást elérve.

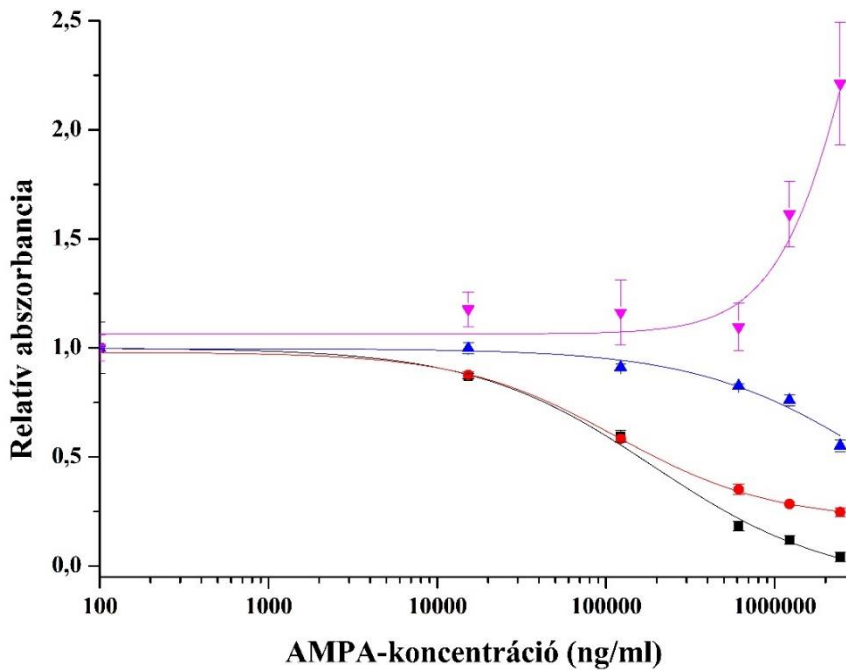
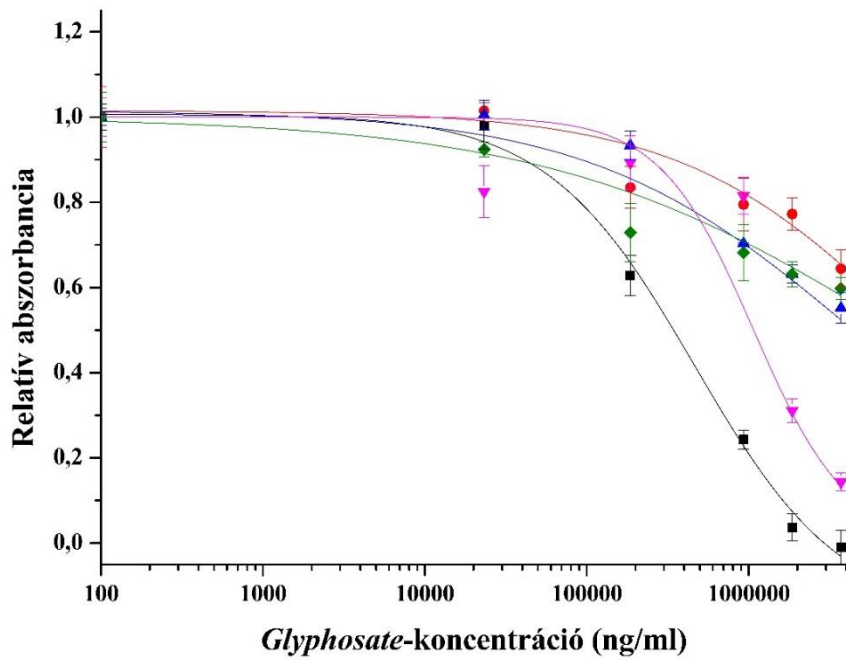
#### **4.3.5. Gátló hatás $\alpha IIb\beta 3$ -ra fibrinogénnel való érzékenyítés esetén**

Az összes vizsgált vegyület közül kizárólag a *glyphosate* gátolta az integrin fibrinogénhez való kötődését, 22 mM (3,72 mg/ml) koncentrációnál  $40,2 \pm 2,6\%$  gátlást okozva. Amellett, hogy az N-acetil-*glyphosate*, a glicin, a szarkozin és az imino-diecetsav esetében gátló hatás nem volt megfigyelhető, az AMPA és az N-acetil-glicin az integrin kötődésére aktiváló hatást gyakorolt, mely a mérés során a kötődés gátlásával járó jelcsökkenéssel szemben a negatív kontrollnál, tehát a szabad kötődés jelszintjénél magasabb értéket adott (AMPA esetében a negatív kontroll jelének több, mint a kétszeresét). Ebben a rendszerben a mérés háttérének jelszintje a többi rendszeréhez viszonyítva magasabb volt, de a vizsgálatok során kapott jelek is többszörösen meghaladták a más érzékenyítőre alapozott vizsgálatokét.

#### **4.3.6. A környezeti szempontból legfontosabb *glyphosate* és AMPA gátló hatása**

A *glyphosate* és az AMPA, mint a két környezeti szempontból legfontosabb vegyület hatását mind a négy vizsgálati rendszerben – valamint *glyphosate* esetében az  $\alpha V\beta 3$ -integrin S fehérjéhez való kötődésére is – a 20. ábra foglalja össze.



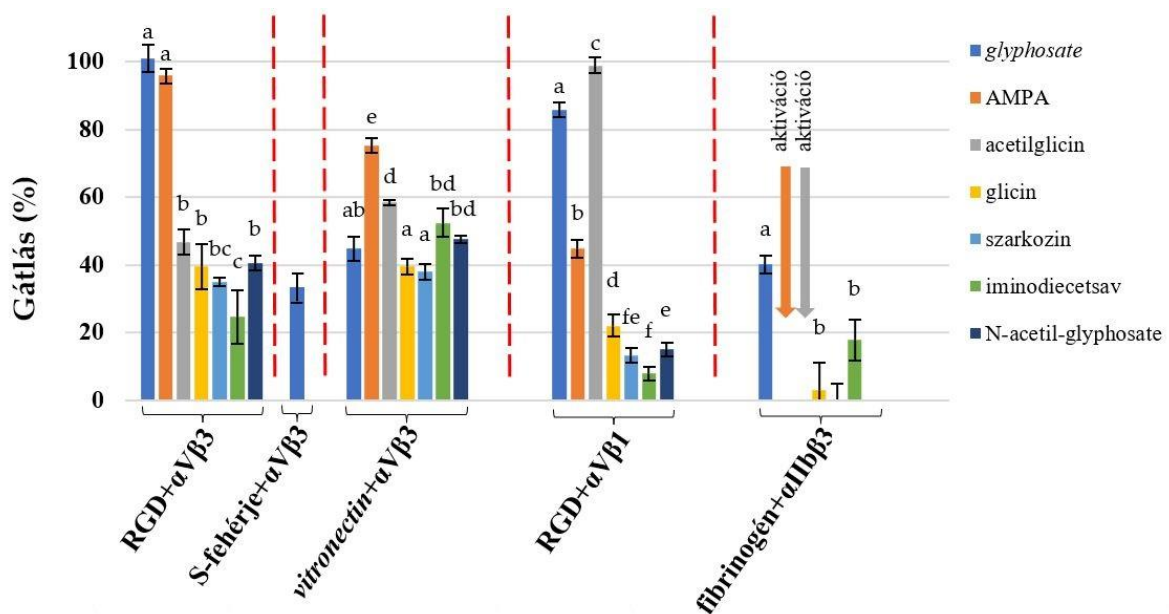


20. ábra: Fent: A *glyphosate* koncentrációfüggő gátló hatása  $\alpha V\beta 3$  kötődésére RGD-hez (fekete), vitronektinhez (kék) és S-fehérjéhez (piros),  $\alpha 5\beta 1$  kötődésére RGD-hez (rózsaszín) és  $\alpha II\beta 3$  kötődésére fibrinogénhez (zöld). Lent: Az AMPA koncentrációfüggő gátló hatása  $\alpha V\beta 3$  kötődésére RGD-hez (fekete), vitronektinhez (piros),  $\alpha 5\beta 1$  kötődésére RGD-hez (kék) és  $\alpha II\beta 3$  kötődésére fibrinogénhez (rózsaszín). Az abszorbancia mérése 492 nm detektálási hullámhosszon történt, az adatokat a három párhuzamos mérés átlag  $\pm$  szórásának formájában jelenítettük meg. Az abszcisszán a koncentrációértékek logaritmikus léptékben feltüntetve szerepelnek.

Az aktív hatóanyag *glyphosate* esetében megállapítható, hogy gátolja az integrinek RGD-szekvenciát felismerő kötőhelyét. Az RGD motívumot hordozó biopolimerrel érzékenyített felszínen végzett vizsgálataink során az  $\alpha V\beta 3$ - és  $\alpha 5\beta 1$ -integrinre  $100,0 \pm 3,9\%$ , illetve  $85,7 \pm 2,1\%$ -os gátlást gyakorolt. ECM és S-fehérje érzékenyítésű vizsgálatok során, ahol az RGD motívum mellett a fehérjék egyéb kötőhelyei is rendelkezésre álltak az integrinek számára, a legerősebb,  $44,8 \pm 3,6\%$ -os gátlást az  $\alpha V\beta 3$  vitronektinhez való kötődésére gyakorolta. A *glyphosate* erős affinitása az integrinek RGD-szekvenciát felismerő kötőhelyéhez abból is világosan látszik, hogy kizárólag a *glyphosate* gátolta az  $\alpha 11\beta 3$  és ECM fehérjéje, a vitronektin között. Az integrinek szerkezete tartalmaz egy olyan kettős kötődési kötőhelyet, mely az RGD kötőhely közelében vagy azon belül található, és az integrin–ligandum-kapcsolat létrejöttéhez szükséges. Feltételezésünk szerint a *glyphosate* karboxiterminálisa az RGD-motívumban található aszparaginsavhoz hasonlóan viselkedik, így a *glyphosate*-molekula és az integrin között kationcsere tud végbemenni, és a *glyphosate* az integrinmolekulával hidrofób kötést tud kialakítani (RUOSLAHTI 1996, SZEKACS et al. 2018). Vizsgálataink során a glicin *glyphosate*-nál alacsonyabb gátló hatást ért el RGD-szekvenciát tartalmazó biopolimerekre alapozott rendszerekben, ami azt mutatja, hogy a *glyphosate*-nál megfigyelt gátláshoz a glicin- és foszfonil-részekre egyaránt szükség van.

Vizsgálatainkban a fő metabolit AMPA ugyancsak erős affinitást mutatott az integrinek RGD-szekvenciát felismerő kötőhelyéhez, bár ez alacsonyabb volt, mint a *glyphosate* esetében. Az  $\alpha 11\beta 3$ -integrin fibrinogénhez való kötődése esetében aktivációs hatást állapítottunk meg. Az  $\alpha V\beta 3$  esetében 22 mM (2,44 mg/ml) koncentrációnál  $95,9 \pm 2,2\%$ -os mértékben gátolta a kötődést RGD-szekvenciához, míg vitronektinhez  $75,3 \pm 2,1\%$ -ban.

Bár teljes gátlást bizonyos integrinek esetében csak a *glyphosate*, az AMPA és az N-acetil-glicin ért el, a legmagasabb koncentrációként alkalmazott 22 mM koncentrációnál kapott eredmények (21. ábra) hasznos információval szolgálhatnak a vizsgált vegyületek adott integrinhez való kötődési affinitása tekintetében.



21. ábra: A *glyphosate* és rokon vegyületei gátlási potenciálja 22 mM koncentrációnál. A piros szaggatott vonal a különböző ELISA rendszerek eredményeit választja el. Az adatokat átlag ± szórás formában jelentettük meg. Az oszlopok feletti betűk a különböző ELISA rendszerek közötti statisztikai eltéréseket ábrázolják ( $p < 0,05$ ).

Érdekes megfigyelés, hogy az AMPA és az N-acetil-glicin az  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  integrin-kötődési aktivitását a vizsgálatok során erősítette. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján az integrinek (például az  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) alacsony affinitású állapotát az ún. „csavart csavar” (*coiled-coil*) szerkezeti motívum ciszteinjei közötti diszulfidhidak stabilizálják. Ezekkel a diszulfidhidakkal az integrint aktiválni képes kismolekulájú reagensek (például a redukáló ágens ditiotreitól) kölcsönhatásba léphetnek (YAN és SMITH 2001, KIM és GINSBERG 2011). Az N-acetil-glicin azonban nem redukáló ágens, így hatása feltételezhetően nem ennek az ismert, diszulfidhidakon keresztül kifejtett aktiváló hatásnak köszönhető.

#### 4.3.7. Biokémiai és lehetséges egyézségügyi vonatkozások

Korábbi vizsgálatunk (SZÉKÁCS et al. 2018) a szakirodalomban elsőként állapította meg a *glyphosate* sejtadhéziós folyamatokban részt vevő  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -integrinre gyakorolt gátló hatását. A bioszenzoros mérések eredményei egyértelműen kimutatták, hogy a *glyphosate* koncentrációtól függően szignifikánsan gátolta a preoszteoblaszt sejt kultúra sejtjeinek letapadását az RGD-motívummal érzékenyített felületre az RGD-szekvenciát felismerő integrinek blokkolása által. Ez azt jelzi, hogy a *glyphosate* 8,7%-os koncentráció fölött megzavarhat minden olyan folyamatot, melynek a sejtadhézió része. Ezen transzmembrán receptorok gátlása vagy aktivációja fontosságának kiemelése érdekében megemlítek néhány olyan élettani folyamatot, melyben az

integrinek fontos szerepet játszanak. Az  $\alpha\beta3$  nagy mennyiségben fejeződik ki aktivált endotéliumsejteken, az újonnan fejlődött érfalban és bizonyos tumorsejteken, melyeknél a véredényképződés folyamatában részt vesz (például tumorfejlődés során). Szabályozza a tumorsejtek letapadását és vándorlását és ezen keresztül a metasztázis kialakulásának folyamatát (TANG et al. 2020). Nyugalmi állapotú endotéliumsejteken és a legtöbb egészséges szervrendszerben nem aktív, ezért célzott anti-angiogén terápia esetén megfelelő választás lehet (LIU et al. 2008). A SARS-CoV-2 tüskefehérje receptorkötő doménje kapcsolatba tud lépni az  $\alpha\beta3$ -integrinnel az RGD-motívumon keresztül, mely az érfal áteresztőképességének növekedésével járhat. Ez magyarázhatja az endotéliumsejtek bizonyos működési rendellenességeit például COVID-19-fertőzés során (NADER és KERRIGAN 2022).

A *glyphosate* hatékony gátló RGD-szekvencia megkötése esetén. Ha más felismerőhelyek is hozzájárulnak a kötődés kialakulásához, a hatása gyengül, mely azt jelzi, hogy a SARS-CoV-2 tüskefehérje nem csak az  $\alpha\beta3$ -hoz kötődik az RGD-motívumon keresztül. Az  $\alpha\beta3$  adhézions receptor szabályozza a makrofágok differenciációját, valamint válaszukat a külső jelekre, így aktivációja krónikus gyulladási folyamatokat eredményezhet (ANTONOV et al. 2011).

Az  $\alpha5\beta1$  működése endotéliumsejteken kifejeződő integrinként ugyancsak elengedhetetlen az érfejlődés során. Az  $\alpha5$ -alegységgel rendelkező integrinek kritikus szereppel bírnak az embriogenezis alatti érfejlődésben és a teljes érhálózat kialakításában (FRANCIS et al. 2002). Géncsendesítéssel elért hiánya halálos kimenetelű szív- és érrendszeri elváltozásokat okozott (LI et al. 2009). Mindezek mellett az  $\alpha5\beta1$  differenciálatlan egérembrionális őssejteken az egyik legnagyobb mennyiségben kifejeződő integrin, kifejeződése és funkciói az őssejt differenciációja szempontjából kritikus szereppel bírnak (PIMTON et al. 2011).

Az  $\alpha\text{IIb}\beta3$  nagy mennyiségben fejeződik ki a vérlemezkéken és progenitorsejtjein, így központi szerepe van a vérlemezkék funkciójának szabályozásában, a hemosztázis fenntartásában és például arteriális trombózis kialakulása során (HUANG et al. 2019). Aktivációja elősegíti a trombinformálódást és a vér koagulációját (HUANG et al. 2019), ezért célzott trombózis elleni terápiákba gyakran bevonják. Bizonyos RGD-motívumot tartalmazó  $\alpha\text{IIb}\beta3$ -gátlókat kifejezetten trombózis megelőzésére fejlesztettek, mégis az előfordulás esélyének növekedését eredményezték integrinaktiválási képességük miatt (BLUE et al. 2009).

Mind a három integrin megköti az echistatint (GAN et al. 1988, PFAFF et al. 1994), míg a *tirofiban*-t és az *epifibatide*-ot csak az  $\alpha\text{IIb}\beta3$  (HARTMAN et al. 1992, SCARBOROUGH et al. 1993). A SARS-CoV-2 tüskefehérje vizsgálata bizonyítja az integrinek szerepét fertőző patogének esetében is, mely a szakirodalomban is megjelenik (CLAES et al. 2017, VOSS et al. 2013, NADER et al. 2020, TAI et al. 2020, SIGRIST et al. 2020).

A *glyphosate* gátlási potenciáljának specifikus élettani következményei ebben a fázisban nehezen megjósolhatók. A konkrét feltételezések nagyrészt feltételezéseken alapulnának, melyeket lehetséges egészségügyi hatások feltérképezésére végzett vizsgálatok eredményei egyelőre nem támasztanak alá, bár a tudományos társadalom már jelezte szükségességüket (MESNAGE és ANTONIOU 2017). Egészségügyi hatások vizsgálatára vonatkozóan legalább állati modellszervezetek bevonására lenne szükség. Eredményeink hozzájárulhatnak nagyobb specifitású integrinligandumok fejlesztéséhez, illetve sejtadhéziós vizsgálatokban speciális felszínek kialakításához.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 5.1. A zearalenontartalom meghatározására fejlesztett módszer következtetései

Az Aquafluosense projekt keretein belül sikeresen fejlesztésre került egy moduláris műszerrendszer, mely bizonyos vízminőségi paraméterek fluoreszcenciaalapú meghatározására alkalmas. Az analitikai jel fluoreszcenciás meghatározása az enzimhez kötött *immunoassay*-t követően a módszer érzékenységének növekedését eredményezte, így 2,8-szor alacsonyabb LOD értéket tudunk elérni, mint kolorimetriás meghatározással. A LOD fluoreszcencia detektálása esetén 0,09 ng/ml, a hagyományos kolorimetriás ELISA esetén pedig 0,25 ng/ml volt. A rezorufin kolorimetriás alapú meghatározása a klasszikus, OPD-t alkalmazó módszerénél is alacsonyabb LOD értéket eredményezett ( $LOD_{OPD} = 0,85$  ng/ml). A mezőgazdasági szennyezők alacsonyabb mennyiségben való meghatározása a felszíni vizekben hatékonyabb monitorozási vizsgálatokat eredményez. Mérési eredményeinket nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) műszeres analitikai módszerrel és teljes belső visszaverődéses ellipszometriás (TIRE) immunszenzorral is validáltuk. Bár a szenzortechnológia egy nagyságrenddel alacsonyabb LOD értéket adott fejlesztett immunfluoreszcenciás módszerünknel, az utóbbi nagy előnye az *in situ* körülmények közötti mérés lehetősége, valamint a 96-lyukú mikrotiterlemez használata a mérések során, melynek alkalmazása egyszerre 25 minta három párhuzamos mérésben történő meghatározását teszi lehetővé hét pontra illesztett kalibrációs görbéhez viszonyítva. A ZON meghatározására fejlesztett *in situ* alkalmazható mérőmodul-prototípus dinamikus mérési tartománya 0-400 ng/ml. Mind az immunfluoreszcenciás módszer, mind a műszerprototípus az Aquafluosense vízminőségi paraméterek és szennyezők meghatározására alkalmas moduláris műszercsalád részét képezik.

### 5.2. A glyphosate-tartalom meghatározására fejlesztett módszer következtetései

A munkánk során fejlesztett versengő, enzimjelzéses ELFIA szintén az Aquafluosense projekt keretein belül fejlesztett módszer- és műszercsalád alkalmazási lehetőségét képviseli. Az elért LOD (0,09 ng/ml) 2,4-szer alacsonyabb, mint kolorimetriás detektálás esetén (0,22 ng/ml). A tesztekben használt *glyphosate*-specifikus antitestek kötődését nem gátolta sem az AMPA (a *glyphosate* fő bomlásterméke), sem más, a célvegyülethez hasonló szerkezetű vegyület. A fluoreszcens detektálás által elért LOD lehetővé teszi a *glyphosate* 0,1 ng/ml koncentrációjának

meghatározását, mely az egyedi növényvédőszer-maradékokra a legmagasabb engedélyezett szint. A fejlesztett *immunoassay* lehetővé teszi a hatékonyabb monitorozási vizsgálatok lefolytatását *in situ* körülmények között, költséghatékony módon, alacsony LOD értékkel és nagy érzékenységgel. Alkalmazható higítatlan vízmintákban, valamint növényi szövet- és talajmintákban 1:10 és 1:100 arányú hígítás esetén.

A 96-lyukú mikrotiterlemez alkalmazása a ZON mérésére fejlesztett *immunoassay*-hez hasonlóan egyszerre 15 minta párhuzamos mérését teszi lehetővé. A kifejlesztett új moduláris műszerrendszer és ELFIA módszereink legnagyobb előnye az, hogy ezek révén több vízszennyező egyidejű meghatározása is lehetséges.

### 5.3. A receptorgátlási vizsgálatok eredményeinek következtetései

A tesztek során a gyomirtószer-hatóanyag *glyphosate* általunk korábban megállapított (SZÉKÁCS et al. 2018),  $\alpha\beta3$ -integrinre gyakorolt gátló hatását vizsgáltuk kiszélesített körben, melyhez két további RGD-szekvenciát felismerő integrint, és a hatóanyag rokon vegyületeit és bomlástermékeit vontuk be. A heterogén fázisú receptorkötési *immunoassay* formátumban elvégzett gátlási tesztek eredményei alapján levont következtetéseink: a korábban meghatározott teljes gátláshoz, tehát az  $\alpha\beta3$ -integrin érzékenyítő makromolekulához való kötődésének *glyphosate* általi teljes mértékű blokkolásához hasonló mértékű hatást csak bizonyos esetekben figyeltünk meg. A *glyphosate* mellett az AMPA is teljes mértékben gátolta az  $\alpha\beta3$  kötődését az RGD-szekvenciához, valamint az N-acetil-glicin szintén teljes mértékben gátolta az  $\alpha5\beta1$  kötődését az RGD-tartalmú szintetikus polimerhez. A *glyphosate* gátló hatása specifikusnak tűnik  $\alpha\beta3$ -integrinre nézve, melynek kulcsszerepe van a véredényképződés folyamatának szabályozásában, például tumornövekedés során. Néhány *glyphosate* bomlástermék csak részleges gátlást okozott (8,0–58,5%), míg a többi vegyület gátlási képessége elhanyagolhatónak bizonyult. Az AMPA az  $\alpha\beta3$  RGD-hez való kötődésének teljes gátlása ( $95,9 \pm 2,2\%$ ), valamint az  $\alpha\beta3$  vitronektinhez való kötődésének erős gátlása ( $75,3 \pm 2,1\%$ ) mellett az  $\alpha\text{IIb}\beta3$  kötődését az ECM fehérje fibrinogénhez erősítette, melynek magyarázata lehet a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő képesség. Ugyanezt a jelenséget figyeltük meg N-acetil-glicin esetében is. Bár az  $\alpha\beta3$  RGD-szekvenciához való kötődését  $46,8 \pm 3,7\%$ -ban, vitronektinhez való kötődését  $58,5 \pm 0,8\%$ -ban, az  $\alpha5\beta1$  RGD-szekvenciához való kötődését pedig  $98,9 \pm 2,3\%$ -ban gátolta, az  $\alpha\text{IIb}\beta3$  kötődésére erős aktiváló hatást gyakorolt.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Új enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) módszer került kifejlesztésre zearalenon mikotoxin kimutatására és mennyiségi meghatározására. A poliklonális anti-ZON–CONA nyúlszérum alkalmazásával kialakított módszerben az analitikai jel koncentrációfüggése szigmoid lefutást követett, melynek  $IC_{50}$  értéke  $2,20 \pm 0,31$  ng/ml, kimutatási határa (LOD) pedig 0,09 ng/ml. A mérési tartomány felső határa 400 ng/ml. Keresztreaktivitási vizsgálatokat  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zearalanon,  $\alpha$ -zearalanol és  $\beta$ -zearalanol származékokon végeztünk, melyek közül a legalacsonyabb keresztreaktivitást a  $\beta$ -zearalanol ( $1,1 \pm 0,2$  CR%), legmagasabbat pedig a zearalanon ( $26,7 \pm 3,4$  CR%) mutatta a vizsgálatban alkalmazott anti-(ZON–CONA) nyúlszérummal. Felszínivízminták esetében mátrixhatást nem detektáltunk, a módszer minta-előkészítés nélkül alkalmas felszínivízminták zearalenontartalmának meghatározására.

2. Új enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) módszer került kifejlesztésre *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyag kimutatására és mennyiségi meghatározására. A poliklonális anti-*glyphosate*-analóg–HSA nyúlszérum alkalmazásával kialakított módszerben az analitikai jel koncentrációfüggése szigmoid lefutást követett, melynek  $IC_{50}$  értéke  $12,5 \pm 0,4$  ng/ml, kimutatási határa (LOD) pedig 0,09 ng/ml. A mérési tartomány felső határa 100 ng/ml. Keresztreaktivitási vizsgálatokat amino-metil-foszfonsav (AMPA), N-(foszfono-metil)-imino-diecetsav (PMIDA), imino-diecetsav, szarkozin, glicin és N-acetil-glicin vegyületekkel végeztünk, melyek közül a legmagasabb keresztreaktivitást az anti-(*glyphosate* analóg-HSA) csirke antitestekkel a PMIDA mutatta (6700 és 1650 ng/ml esetében 0,013, valamint 0,018 CR%). Felszínivízminták esetében mátrixhatást nem detektáltunk. Növényi szövet- és talajminták mérése során kismértékű mátrixhatást határoztunk meg, mely előbbi esetében 1:10, utóbbi esetében pedig 1:100 arányú hígítás esetén már nem mutatkozott. A módszer alkalmas felszínivíz-, talaj- és növényi szövetminták *glyphosate*-tartalmának meghatározására.

3. Az integrinek ligandumkötő képességének vizsgálatára alkalmas enzimjelzéses *immunoassay* rendszerben teszteltük a *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyag és rokon vegyületei gátló hatását  $\alpha v\beta 3$ -,  $\alpha 5\beta 1$ - és  $\alpha II\beta 3$ -integrinen. Kémiai szerkezetükben analóg rokon vegyületek vizsgálatával kimutattuk, hogy az  $\alpha v\beta 3$ -integrin RGD szekvenciához való kötődésére gyakorolt gátló hatáshoz a foszfono-metil-csoport jelenléte elengedhetetlen. Ebben az esetben *glyphosate* és az amino-metil-foszfonsav (AMPA) gátló hatása hasonló mértékű volt. Az integrin vitronektinhez való



kötődése esetén a *glyphosate* gátló hatása csökkent, az AMPA hatása nem változott számottevően, míg az N-acetil-glicin és az imino-diecetsav hatása erősödött. RGD szekvenciához kötődésre a *glyphosate* hatása az AMPA-hoz viszonyítva specifikusabbnak bizonyult  $\alpha 5\beta 1$ -integrin esetén, az N-acetil-glicin pedig teljes gátlást ért el. Az  $\alpha IIb\beta 3$ -integrin fibrinogénhez való kötődésére kizárólag a *glyphosate* gyakorolt gátló hatást, míg az AMPA és az N-acetil-glicin esetében aktivációt detektáltunk.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatómunka során, amelyről beszámolok, a zearalenon (ZON) mikotoxin és a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) módszert fejlesztettünk ki, valamint vizsgáltuk a *glyphosate* lehetséges gátló hatását az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) oligoszekvenciát felismerő integrinek ligandumkötési képességére.

Mivel a mezőgazdasági tevékenységek túlnyomórészt nyílt technológiák, a környezettel állandóan fennálló kapcsolat révén a különböző kémiai anyagok bejuthatnak a rendszerbe, vagy a rendszerből kijutva megjelenhetnek a környezetben szennyezőanyagként. A mezőgazdasági technológiákból származó két legjelentősebb szerves mikroszennyező-típus a növényvédő szerek (és maradékaik), valamint a bizonyos növénypatogén gombák által termelt mikotoxinok.

Napjainkban mikotoxinok közül a *Fusarium*-fajok által termelt zearalenon (ZON) nemcsak korábban feltárt hormonmoduláns hatása miatt kap kiemelt figyelmet, hanem viszonylag újonnan felfedezett felszínvízszennyező tulajdonsága miatt is, melyre (az általánosan ismert mezőgazdasági terményeket szennyező tulajdonsága mellett) nagyjából az elmúlt két évtizedben figyeltek fel. A *glyphosate* ezzel szemben ubikviter környezeti vízszennyezővé vált, elsősorban a forgalomba kerülése óta töretlenül növekvő, hatalmas felhasználási mennyisége miatt. Mindkét vegyület kimutatására számos analitikai módszer létezik, melyek közül a műszeres analitikai módszerek közös jellemzője, hogy a minta-előkészítés és a műszerigény miatt általában idő- és költségigényes eljárások, melyek szakképzett munkaerőt igényelnek. A műszeres analitikai módszerek költséghatékony alternatívái e célvegyületek meghatározására a specifikus antigén-antitest-kapcsolaton alapuló immunanalitikai eljárások, melyek révén a műszeres analitikai módszerekéhez hasonló kimutatási határt (*limit of detection, LOD*) sikerült elérni.

A *glyphosate* hatóanyag integrinfehérjékre gyakorolt gátló hatását kutatócsoportunk írta le elsőként. Az integrinek olyan sejtmembránba ágyazott,  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységből álló heterodimer kétirányú jelzőreceptorok, melyeknek megfelelő működése elengedhetetlen mind az egyedfejlődés, mind a kifejlett szervezet megfelelő működése szempontjából. Szabályozó funkcióik kiterjednek a sejt-sejt, és a sejt-extracelluláris mátrix (ECM) közötti kapcsolatokra, de szerepük van patológiai folyamatok során is. Adhéziós receptorként a nem megfelelő működés különféle megbetegedéseket okozhat, beleértve gyulladással és rákos elváltozásokat is. Az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) oligoszekvenciát felismerő integrinek a 24 ismert humán integrin legnagyobb csoportját képezik, felismerő motívumuk esetenként a humán patogének sejtbe

kerülési útvonalának része lehet. Mivel a *glyphosate* egy korábbi vizsgálatunkban gátolta az  $\alpha\beta 3$ -integrin e motívumhoz való kötődését, vizsgálatunkat kiterjesztettük több RGD-specifikus integrinre, valamint a növényvédőszer-hatóanyag rokon vegyületeire.

A jelen dolgozatban ismertetett fejlesztések között új ELFIA eljárásokat dolgoztunk ki az általunk az Aquafluosense projekt keretében korábban kifejlesztett moduláris műszercsalád alkalmazásával. Az ELFIA eljárások célvegyületei részint a ZON mikotoxin, részint a *glyphosate* hatóanyag voltak.

A ZON fluoreszcencia alapján történő kimutatását a mikotoxin önálló fluoreszcenciájának vizsgálatával kíséreltük meg. E módszerrel a LOD értékét 11,5  $\mu\text{g/ml}$ -ben határoztuk meg, így ez a megoldás nem bizonyult elég érzékenynek. Az indirekt versengő ELISA vizsgálatok továbbfejlesztése során az alkalmazott *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztsomag lehetővé tette a rendszer válaszának detektálását mind abszorbancia, mind fluoreszcencia mérésével. A módszerben felvettük a ZON kalibrációs görbéit, melyben a LOD értéke abszorbancia detektálása esetén a 0,25  $\text{ng/ml}$ , mely 3,4-szer alacsonyabb a hasonló, 1,2-fenilén-diamin-hidrokloridot (OPD) alkalmazó kolorimetriás ELISA LOD értékénél (0,85  $\text{ng/ml}$ ). A végtermék rezorufin fluoreszcenciájának detektálásával a módszer LOD értéke 0,09  $\text{ng/ml}$ , így fluoreszcencia detektálása (ELFIA) további 2,8-szoros javulást eredményezett a módszer érzékenységében. A lehetséges mátrixhatás meghatározásához pufferben és felszínvízmintában felvett hígítási sorok hét koncentrációra illesztett kalibrációs görbéit hasonlítottuk össze, ahol statisztikailag szignifikáns eltérést nem találtunk ( $p > 0,05$ ), mely alapján felszínvízminták esetében a ZON mennyiségének meghatározása minta-előkészítési folyamat nélkül elvégezhető. A rokon vegyületekkel végzett keresztreaktivitási vizsgálatok során mind abszorbancia, mind fluoreszcencia detektálása esetén a zearalanon mutatta a legmagasabb relatív keresztreaktivitási értéket ( $25,7 \pm 3,6$  és  $26,7 \pm 3,4$  CR%), míg a legalacsonyabbat a  $\beta$ -zearalanol eredményezte (abszorbanciánál  $1,1 \pm 0,2$ , fluoreszcenciánál  $0,9 \pm 0,1$  CR%-ot).

Hasonló indirekt versengő ELFIA rendszert a *glyphosate* hatóanyag kimutatására is kifejlesztettünk. Ebben a módszerben egy egylépéses minta-előkészítési lépésre is szükség volt, mely során N-acilezéssel a célvegyületből származékot képeztünk. Itt is a *QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit* tesztsomagot alkalmaztuk, így a képződött végtermék abszorbanciájának és fluoreszcenciájának mérésére is lehetőségünk volt. Abszorbancia detektálásával a módszer LOD értéke 0,22  $\text{ng/ml}$ , míg fluoreszcencia detektálása esetén 0,09  $\text{ng/ml}$ , így ebben az esetben a módszer 2,5-szer érzékenyebb, valamint a dinamikus mérési tartomány szélesebb, és valamivel meredekebb, mint abszorbancia detektálása esetén. A

keresztreaktivitási vizsgálatokat a *glyphosate*-hoz szerkezetileg hasonló vegyületekkel végeztük, és a rendszer kifejezetten specifikusnak bizonyult a *glyphosate* hatóanyagra nézve, hiszen a legmagasabb CR% értékű N-foszfono-metil-imino-diecetsav keresztreaktivitása is csak 0,013–0,018% volt (6700 ng/ml és 1650 ng/ml nominális koncentrációknál). A lehetséges mátrixhatást vizsgáltuk növényi szövetminta, valamint felszínivíz- és talajminta esetében is. Növényi szövetminta (levél és gyökér foszfátpufferes kivonata) esetében a hígítatlan kivonatokban enyhe mátrixhatást tapasztaltunk a foszfátpufferben felvett kalibrációs görbéhez képest, ám 1:10 arányú hígításnál mátrixhatás nem mutatkozott, IC<sub>50</sub> értéként az alábbiakat kaptuk: pufferben 12,5 ± 0,4 ng/ml, 1:10 hígított levélkivonatban 12,5 ± 0,3 ng/ml, 1:10 hígított gyökérkivonatban 11,8 ± 0,3 ng/ml, mely értékek statisztikailag nem tértek el egymástól (p > 0,05). Talajmintánál 1:10 arányú hígítás esetén is még kismértékű mátrixhatás mutatkozott, mely 1:100 arányú hígítással kiküszöbölhetőek bizonyult. Hígítatlan felszínivízminták esetében mátrixhatás nem lépett fel, és mivel a LOD érték fluoreszcens detektálás esetén 0,09 ng/ml, a módszer alkalmas az Európai Unióban növényvédőszer-hatóanyagokra hivatalos MRL (0,1 ng/ml) alatti *glyphosate*-koncentráció kimutatására ivóvízben. LOD értékeket tekintve mindkét ELFIA módszer a középmezőnyben helyezkedik el a többi ismert eljárásához képest, legnagyobb előnyüknek költséghatékonyságuk és nagy érzékenységük mellett a fejlesztett fluoriméter műszerrel kombinálva *in situ* körülmények között lefolytatható monitorozási vizsgálatokban való alkalmazhatóságuk bizonyul, mely mellé társul a 96-lyukú mikrotiterlemez által biztosított lehetőség egyszerre akár 15 minta párhuzamos mérésére.

A *glyphosate* (izopropilammóniumsója), az AMPA, az N-acetil-*glyphosate*, a glicin, az N-acetil-glicin, a szarkozin és az imino-diecetsav integrinreceptorok ligandumkötési képességére gyakorolt hatásának vizsgálatát  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 és  $\alpha$ 11 $\beta$ 3 integrineken vizsgáltuk módosított (receptorgátlási) ELISA alkalmazásával. A kialakított rendszerek segítségével vizsgálni tudtuk e vegyületek gátló hatását (a)  $\alpha$ V $\beta$ 3 kötődésére RGD oligoszekvenciához, (b)  $\alpha$ V $\beta$ 3 kötődésére vitronektin ECM-fehérjéhez, (c)  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 kötődésére RGD oligoszekvenciához, valamint (d)  $\alpha$ 11 $\beta$ 3 kötődésére fibrinogén ECM-fehérjéhez. Az általunk alkalmazott maximális koncentrációig (22 mM) teljes gátlást mindössze három esetben állapítottunk meg: a *glyphosate* (3,72 mg/ml, IC<sub>50</sub> érték 2,7 ± 0,5 mM, 0,46 ± 0,08 mg/ml) és az AMPA (2,44 mg/ml, IC<sub>50</sub> érték 1,3 ± 0,2 mM, 0,14 ± 0,02 mg/ml) esetében  $\alpha$ V $\beta$ 3 kötődésére RGD-szekvenciához, valamint az N-acetil-glicin (2,58 mg/ml, IC<sub>50</sub> érték 5,8 ± 0,9 mM, 0,68 ± 0,11 mg/ml)  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 kötődésére szintén RGD-motívumhoz. A további rendszerekben néhány bomlástermék csak részleges gátlást eredményezett (8,0-58,5%), a többi vegyület gátlási képessége elhanyagolhatóan bizonyult, mely alapján a *glyphosate* és a

bomlástermék AMPA gátló hatása specifikusnak tűnik  $\alpha\beta3$ -integrinre nézve. Eredményeink felhasználhatók nagyobb specifitású integrinligandumok, valamint sejtadhéziós vizsgálatokhoz alkalmas speciális felszínek fejlesztése során. A gátló hatás élettani következményei e korai fázisban nehezen megjósolhatók, de közülük a programozott sejthalál (apoptózis) természetes lefutásának megzavarása sem kizárható.

## 8. SUMMARY

During the research reported here, we developed an enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFIA) method capable of detecting and quantifying the mycotoxin zearalenone (ZON) and herbicide active ingredient glyphosate, and investigated the possible inhibitory effect of glyphosate on the ligand-binding capacity of integrins recognizing the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) oligosequence.

As agricultural activities are mostly open technologies of constant contact with the environment, they can be exposed to various chemical substances from the environment or vice versa can produce substances that occur as environmental pollutants. The two most significant types of organic micropollutants originating from agricultural technologies are pesticides (and their residues) and mycotoxins produced by certain phytopathogenic fungi.

Among mycotoxins, zearalenone (ZON), produced by *Fusarium* species, receives particular current attention not only due to its demonstrated hormone-modulating effect but also due to its relatively newly discovered surface water pollutant property, which has been indicated in the past two decades alongside its well-known property of contaminating agricultural crops. In contrast, glyphosate has become a ubiquitous environmental water pollutant, primarily due to its continuously increasing, massive usage since its introduction to the market. There are numerous analytical methods available for the detection of both compounds, among which instrumental analytical methods typically require time and cost-intensive procedures due to their sample preparation and equipment requirements that require skilled labor. Cost-effective alternatives to instrumental analytical methods for determining these target compounds are immunological analytical methods based on specific antigen-antibody interactions, which have achieved comparable limits of detection (LODs).

Our research group was the first to describe the inhibitory effect of glyphosate on integrin proteins. Integrins are transmembrane,  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit heterodimeric bidirectional signaling receptors essential for both individual development and the proper functioning of living organisms. Their regulatory functions extend to cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions, but they also play a role in pathological processes. As adhesion receptors, their improper functioning can cause various diseases, including inflammatory and neoplastic conditions. Integrins recognizing the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) oligosequence represent the largest group of the 28 known human integrins, and their recognition motif may sometimes be part of the cellular entry pathway of human pathogens. Since glyphosate in a previous study of ours inhibited the binding

of  $\alpha\beta3$  integrin to this motif, we expanded our investigations to include several RGD-specific integrins, as well as compounds structurally related to glyphosate.

Among the developments presented in this thesis, we have developed new ELFIA procedures using the modular instrument family developed by us within the Aquafluosense project. The target compounds of these ELFIA procedures were ZON and glyphosate.

We attempted the detection of ZON by measuring fluorescence using the intrinsic fluorescence of this mycotoxin. In this method we established an LOD value of 11.5  $\mu\text{g/ml}$ , thus this solution did not prove to be sufficiently sensitive. During further development of the indirect competitive ELISA assays, application of the QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit allowed signal detection in the system both by absorbance and fluorescence measurements. We established ZON calibration curves in which the LOD value for absorbance detection was found to be 0.25 ng/ml, 3.4 times lower than the corresponding LOD value of the colorimetric ELISA using 1,2-phenylenediamine hydrochloride (OPD) (0.85 ng/ml). With the detection of the fluorescence of the final product resorufin, the LOD value was found to be 0.09 ng/ml, allowing an additional 2.8-fold improvement in method sensitivity. To determine possible matrix effects, we compared dilution series taken in buffer and surface water, fitting calibration curves to seven concentrations, where no statistically significant differences were found ( $p > 0.05$ ), indicating that the determination of ZON quantity in surface water samples can be carried out without sample preparation. Cross-reactivity tests with structurally related compounds resulted in zearalanone showing the highest relative cross-reactivity values ( $25.7 \pm 3.6$  and  $26.7 \pm 3.4$  CR%) for both absorbance and fluorescence detection, while  $\beta$ -zearalanol yielded the lowest ( $1.1 \pm 0.2$  for absorbance and  $0.9 \pm 0.1$  CR% for fluorescence).

A similar indirect competitive ELFIA system was developed also for the detection of glyphosate. In this method, a sample preparation step of derivatization by N-acylation of the target compound was required. Here, too, we used the QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate Kit, allowing detection of the formed final product both by absorbance and fluorescence. The LOD value of the method was 0.22 ng/ml and 0.09 ng/ml for absorbance and fluorescence detection, respectively, indicating a 2.5-fold improvement in method sensitivity by fluorescence detection. Cross-reactivity tests were performed with compounds structurally similar to glyphosate, indicating that the method is explicitly *glyphosate*-specific as the highest CR% obtained by N-phosphonomethyliminodiacetic acid was found to be 0.013-0.018% (at nominal concentrations of 6700 ng/ml and 1650 ng/ml, respectively). Matrix effects were examined in plant tissues, surface water, and soil samples. In the case of plant tissue samples (leaf and root phosphate buffer

extracts), slight matrix effects were observed in undiluted extracts compared to the calibration curve in phosphate buffer, but no matrix effects at a dilution ratio of 1:10. IC<sub>50</sub> values obtained were as follows: 12.5 ± 0.4 ng/ml in buffer, 12.5 ± 0.3 ng/ml in 1:10 diluted leaf extract, and 11.8 ± 0.3 ng/ml in 1:10 diluted root extract, with no statistically significant difference between them. In the case of soil samples, a slight matrix effect was observed even at a dilution ratio of 1:10, which could be eliminated with a 1:100 dilution. No matrix effect occurred in undiluted surface water samples, and since the LOD value for fluorescence detection was 0.09 ng/ml, the method is suitable for the detection of glyphosate concentrations below the official MRL (0.1 ng/ml) for plant protection products in drinking water in the European Union. In terms of LOD values, both ELFIA methods are in the middle range relative to other known methods, and in addition to their cost-effectiveness and high sensitivity, their greatest advantage in monitoring studies is their in situ applicability with the developed fluorimeter instrument, along with the possibility for parallel measurement of up to 15 samples provided by the 96-well microplate format.

We investigated the effect of glyphosate (isopropylamine salt), AMPA, N-acetyl-glyphosate, glycine, acetyl-glycine, sarcosine, and iminodiacetic acid on the ligand-binding ability of integrin receptors  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 using modified (receptor-blocking) ELISAs. With the developed systems, we were able to assess the inhibitory effect of these compounds on (i)  $\alpha$ V $\beta$ 3 binding to RGD oligosequences, (ii)  $\alpha$ V $\beta$ 3 binding to vitronectin ECM protein, (iii)  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 binding to RGD oligosequences, and (iv)  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 binding to fibrinogen ECM protein. Up to the maximum concentration we applied (22 mM), we observed complete inhibition only in three cases: glyphosate (3.72 mg/ml, IC<sub>50</sub> value 2.7 ± 0.5 mM, 0.46 ± 0.08 mg/ml) and AMPA (2.44 mg/ml, IC<sub>50</sub> value 1.3 ± 0.2 mM, 0.14 ± 0.02 mg/ml) for  $\alpha$ V $\beta$ 3 binding to RGD sequences, and acetyl-glycine (2.58 mg/ml, IC<sub>50</sub> value 5.8 ± 0.9 mM, 0.68 ± 0.11 mg/ml) for  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 binding also to the RGD motif. In the other systems, some degradation products resulted in only partial inhibition (8.0-58.5%), while the inhibitory capacity of the other compounds was negligible, suggesting that the inhibitory effect of glyphosate appears to be specific to  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin. Our findings could be used in the development of surfaces suitable for higher specificity integrin ligands and cell adhesion studies. The physiological consequences of the inhibitory effect are difficult to predict at this early stage, but do not exclude the possibility of disruption of natural programmed cell death (apoptosis) processes.



# M1. IRODALOMJEGYZÉK

- Agrárminisztérium (2020). Nemzeti Növényvédelmi Cselekvési Terv. <https://kormany.hu/dokumentumtar/nemzeti-novenyvedelmi-cselekvesi-terv>  
Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Albers, C.N., Banta, G.T., Hansen, P.E., Jacobsen, O.S. (2009). The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil—Comparing different soils and humic substances. *Environ. Pollut.*, **157**, 2865–2870.
- Al-Gabr, H.M., Zheng, T., Yu, X. (2013). Fungi contamination of drinking water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **228**, 121–139.
- Alonso, L.L., Demetrio, P.M., Etchegoyen, P.A., Marino, D.J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci. Total Environ.*, **645**, 89-96.
- Álvarez Bayona, M.A., Maturana Córdoba, A., Gallardo Amaya, R.J., Muñoz Acevedo, A. (2022). Occurrence of glyphosate in surface and drinking water sources in Cúcuta, Norte de Santander, and its removal using membrane technology. *Environ. Toxicol. Chem.* **36** (12), 3206-3216.
- Anton, A., Fekete, G., Darvas, B., Székács, A. (2014). Environmental risk of chemical agriculture. 93-112. p. In: Gruiz, K., Meggyes, T. Fenyvesi, E. (Szerk.): *Engineering tools for environmental risk management. Vol. 1*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press. 478 p.
- Antonov, A.S., Antonova, G.N., Munn, D.H., Mivechi, N., Lucas, R., Catravas, J.D., Verin, A.D. (2011).  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF- $\kappa$ B activation. *J. Cell. Physiol.*, **226**, 469–476.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, **93** (9), 1866-1873.
- Aquafluosense. Komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris, érzékelő- és műszercsalád kifejlesztése, továbbá az alkalmazási területek kutatása. <http://aquafluosense.hu>. Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Babič, M.N., Gunde-Cimerman, N., Vargha, M., Tischner, Z., Magyar, D., Verissimo, C., Sabino, R., Viegas, C., Meyer, W., Brandão, J. (2017). Fungal contaminants in drinking water regulation? A tale of ecology, exposure, purification and clinical relevance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **14** (6): 636.
- Bahmberg, C.G., Fagerholm, S.C., Nurmi, S.M., Chavakis, T., Marchesan, S., Grönholm, M. (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 431-444.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.*, **339**, 269–280.
- Barker, T. (2019). Applied Immunology and Biochemistry, Waltham Abbey, ED-Tech Press. 344 p.
- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., Dietze, J.E. (2014). Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *JAWRA*, **50**, 275–290.
- Bernardes, M.F.F., Pazin, M., Pereira, L.C., Dorta, D.J. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. 195-233. p. In: Andreatza, A.C., Scola, G. (Szerk.): *Toxicology Studies — Cells, Drugs and Environment*. London, UK, IntechOpen. 244. p.
- Bhatt, P., Bhandari, G., Bilal, M. (2022). Occurrence, toxicity impacts and mitigation of emerging micropollutants in the aquatic environments: Recent tendencies and perspectives. *J. Environ. Chem. Eng.*, **10**: 107598.

- Bledzka, K., Smyth, S. S., Plow, E. F. (2013). Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ. Res.* **112** (8), 1189-1200.
- Blue, R., Kowalska, A.M., Hirsch, J., Murcia, M., Janczak, C.A., Harrington, A., Jirouskova, M., Li, J., Fuentes, R., Thornton, M.A., Filizola, M., Ponz, M., Collier, B.S. (2009). Structural and therapeutics insights from the species specificity and in vivo antithrombotic activity of a novel alpha IIb-specific alpha IIb beta 3 antagonist. *Blood*, **114**: 195.
- Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Hartmann, N., Erbs, M., Vogelgsang, S., Forrer, H.-R., Schwarzenbach, R.P. (2008). Fusarium mycotoxins: Overlooked aquatic micropollutants? *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1029–1034.
- Caglayan, M.O., Şahin, S., Üstündağ, Z. (2020): Detection strategies of zearalenone for food safety: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **67**, 1–20.
- Campanale, C., Massarelli, C., Losacco, D., Bisaccia, D., Triozzi, M., Uricchio, V.F. (2021). The monitoring of pesticides in water matrices and the analytical criticalities: A review. *Trends Anal. Chem.*, **144**: 116423.
- Campbell, I. D., Humphries, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. perspect. biol.*, **3** (3): a004994.
- Carles, L., Gardon, H., Joseph, L., Sanchís, J., Farré, M., Artigas, J. (2019). Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. *Environ. Int.*, **124**, 284–293.
- Carson R. (1962). *Silent Spring*. Boston, Houghton Mifflin. 368 p.
- Chastney, M. R., Conway, J. R., Ivaska, J. (2021). Integrin adhesion complexes. *Curr. Biol.*, **31** (10), R536-R542.
- Chen, D., Huang, H., Huang, Y., Yang, W., Shan, W., Hao, G., Wu, J., Song, B. (2023). Toxicity tests for chemical pesticide registration: Requirement differences among the United States, the European Union, Japan, and China? *J. Agric. Food Chem.*, **71** (19), 7192-7200.
- Cheng, Y., Ji, Y. (2019). RGD-modified polymer and liposome nanovehicles: Recent research progress for drug delivery in cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **128**, 8–17.
- Chun, H.S., Choi, E.H., Chang, H.-J., Choi, S.-W., Eremin, S.A. (2009). A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn. *Anal. Chim. Acta*, **639**, 83–89.
- Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., Manyes, L. (2020). Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food Chem. Toxicol.*, **137**: 111161.
- Claes, J., Liesenborghs, L., Peetermans, M., Veloso, T.R., Missiakas, D., Schneewind, O., Mancini, S., Entenza, J.M., Hoylaerts, M.F., Heying, R., Verhamme, P., Vanassche, T. (2017). Clumping factor A, vonWillebrand factor-binding protein and vonWillebrand factor anchor Staphylococcus aureus to the vessel wall. *J. Thromb. Haemost.*, **15**, 1009–1019.
- Coupe, R. H., Kalkhoff, S. J., Capel, P. D., Gregoire, C. (2012). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest manag. sci.*, **68** (1), 16-30.
- Criado, M.V., Pinto, V.E.F., Badessari, A., Cabral, D. (2005). Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. *Int. J. Food Microbiol.*, **99**, 343–349.
- Csősz, D., Lenk, S., Barócsi, A., Csőke, T.L., Klátyik, S., Lázár, D., Berki, M., Adányi, N., Csákányi, A., Domján, L., Szarvas, G., Kocsányi, L., Székács, A. (2019). Sensitive fluorescence instrumentation for water quality assessment. In Proceedings of the Optical Sensors and Sensing Congress (ES, FTS, HISE, Sensors), San Jose, CA, USA, 25–27 June 2019; OSA: Washington, DC, USA, 2019.
- Dänicke, S., Winkler, J. (2015). Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food Chem. Toxicol.*, **84**, 225–249.
- Darvas, B., Székács, A. (2016). A század glyphosate-háborúja. *bioKontroll*, **7** (2), 11-20.

- Darvas, B., Székács, A. (2022). A Magyarországon alkalmazott gyomirtó szerek összehasonlító elemzése. *Ökotoxikológia*, **4** (2), 15-25.)
- Darwish, I. A. (2006). Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. *International journal of biomedical science: IJBS*, **2** (3): 217.
- Davis, A. M., Thorburn, P. J., Lewis, S. E., Bainbridge, Z. T., Attard, S. J., Milla, R., Brodie, J. E. (2013). Environmental impacts of irrigated sugarcane production: Herbicide run-off dynamics from farms and associated drainage systems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **180**, 123-135.
- Davis, F. R. (2014). Banned: a history of pesticides and the science of toxicology. New Haven, Yale University Press. 288 p.
- De Santis, B., Debegnach, F., Gregori, E., Russo, S., Marchegiani, F., Moracci, G., Brera, C. (2017). Development of a LC-MS/MS Method for the multi-mycotoxin determination in composite cereal-based samples. *Toxins*, **9** (5): 169.
- Dill, G. M. (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, **61** (3), 219-224.
- Dinis-Oliveira, R. J. (2014). Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis. *Bioanalysis*, **6** (21), 2877-2896.
- Dobolyi, C. S., Sebők, F., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N., Szécsi, Á., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Szoboszlai, S., Krifaton, Cs., Kukolya, J. (2013). Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Alimentaria*, **42** (3), 451-459.
- Dong, G., Pan, Y., Wang, Y., Ahmed, S., Liu, Z., Peng, D., Yuan, Z. (2018). Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Chem.*, **247**, 8–15.
- Donley, N. (2019). The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environ. Health*, **18**: 44.
- Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest manag. sci.*, **74** (5), 1027-1034.
- Durán-Merás, I., Díaz, T.G., Franco, M.A. (2005). Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*, **65**, 7–14.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2014). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal*, **12** (12): 3916.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2017). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, **15**: e04851.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2011). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, **9** (6): 2197.
- Emídio, E.S., Calisto, V., de Marchi, M.R.R., Esteves, V.I. (2017). Photochemical transformation of zearalenone in aqueous solutions under simulated solar irradiation: Kinetics and influence of water constituents. *Chemosphere*, **169**, 146-154.
- Emídio, E.S., Da Silva, C.P., De Marchi, M.R.R. (2020). Estrogenic mycotoxins in surface waters of the Rico Stream micro-basin, São Paulo, Brazil: Occurrence and potential estrogenic contribution. *Eclética Química J.*, **45**, 23–32.
- Európai Parlament és Tanács (2009). Az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EK rendelete (2009. október 21.) a növényvédő szerek forgalomba hozataláról valamint a 79/117/EGK és a 91/414/EGK tanácsi irányelvek hatályon kívül helyezéséről. Az Európai Unió Hivatalos Lapja, **L 309**, 1-50.

- European Commission (1998). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union*, **L 330** (5.12.1998), 32-54.
- European Commission (2005). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union*, **L 70** (16.3.2005), 1-16.
- European Commission (2023). Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. *Off. J. Eur. Union*, **L 119** (5.5.2023), 103-157.
- European Parliament and Council (2020). Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption (recast). *Off. J. Eur. Union*, **L 435** (23.12.2020), 1-62.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2024a). Plant Production and Protection. <https://www.fao.org/plant-production-protection/about>. Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2024b). Food and agriculture data. Pesticide use. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., Elsner, M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*, **341** (6147), 752-758.
- Francis, S.E., Goh, K.L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B.L., Stark, M., Davidson, D., Hynes, R.O. (2002). Central roles of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 927–933.
- Freuze, I., Jadas-Hecart, A., Royer, A., Communal, P.Y. (2007). Communal, Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. *J. Chromatogr. A*, **1175**, 197–206.
- Gan, Z.R., Gould, R.J., Jacobs, J.W., Friedman, P.A., Polokoff, M.A. (1988). Echistatin—A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 19827–19832.
- Glass, R.L. (1981). Colorimetric determination of glyphosate in water after oxidation to orthophosphate. *Anal. Chem.*, **53**, 921–923.
- Gomarasca, S., Stefani, F., Fasola, E., La Porta, C.A.M., Bocchi, S. (2024). Regional evaluation of glyphosate pollution in the minor irrigation network. *Chemosphere*, in press. doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.141679
- Goud, Y.K., Kumar, S.V., Hayat, K., Gobi, V.K., Song, H., Kim, K.-H., Marty, J.L. (2019). A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearalenone using screen-printed disposable electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **832**, 336–342.
- Grandcoin, A., Piel, S., Baurès, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Res.*, **117**, 187–197.
- Grau, D., Grau, N., Gascuel, Q., Paroissin, C., Stratonovitch, C., Lairon, D., Devault, D.A., Di Cristofaro, J. (2022). Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with higher values in men, in younger people, and in farmers. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **29**, 32882–32893.
- Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Goliński, P., Świetlik, J. (2009). Occurrence of estrogenic mycotoxin—Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res.*, **43**, 1051–1059.
- Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Goliński, P., Świetlik, J., Bocianowski, J. (2012). Dissolved organic carbon as an indicator of the presence of zearalenone in the aquatic environment. *World Mycotoxin J.*, **5** (4), 357-364.

- Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Świetlik, J., Bocianowski, J., Goliński, P. (2015a). The role of wastewater treatment in reducing pollution of surface waters with zearalenone. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **66**, 159-164.
- Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Świetlik, J., Bocianowski, J., Goliński, P. (2015b). Possible way of zearalenone migration in the agricultural environment. *Plant Soil Environ.*, **61** (8), 358-363.
- Haas, T.A., Plow, E.F. (1994). Integrin-ligand interactions: A year in review. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 656–662.
- Hanke, I., Wittmer, I., Bischofberger, S., Stamm, C., Singer, H. (2010). Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, **81** (3), 422-429.
- Hao, K., Suryoprabowo, S., Song, S., Liu, L., Kuang, H. (2017). Rapid detection of zearalenone and its metabolite in corn flour with the immunochromatographic test strip. *Food Agric. Immunol.*, **29**, 498–510.
- Hartman, G.D., Egbertson, M.S., Halczenko, W., Laswell, W.L., Duggan, M.E., Smith, R.L., Naylor, A.M., Manno, P.D., Lynch, R.J., Zhang, G., Chang, C.T.C., Gould, R.J. (1992). Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J. Med. Chem.*, **35**, 4640–4642.
- Hartmann, N., Erbs, M., Forrer, H.-R., Vogelgsang, S., Wettstein, F.E., Schwarzenbach, R.P., Bucheli, T.D. (2008). Occurrence of Zearalenone on *Fusarium graminearum* infected wheat and maize fields in crop organs, soil, and drainage water. *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 5455–5460.
- Hartmann, N., Erbs, M., Wettstein, F.E., Schwarzenbach, R.P., Bucheli, T.D. (2007). Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *J. Chromatogr. A*, **1138**, 132–140.
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., Madiraju, C. (2023). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and applications. 1-17. p. In: Matson, R.S. (Szerk.): *ELISA. Methods in Molecular Biology, vol. 2612.*, New York, NY, Humana. 244 p.
- Heap, I., Duke, S.O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag. Sci.*, **74** (5), 1040-1049.
- Heckmann, D., Kessler, H. (2007). Design and synthesis of integrin ligands. *Methods Enzymol.*, **426**, 463–503.
- Hossain, M.Z., Maragos, C.M. (2018). Gold nanoparticle-enhanced multiplexed imaging surface plasmon resonance (iSPR) detection of *Fusarium* mycotoxins in wheat. *Biosens. Bioelectron.*, **101**, 245–252.
- Hou, J., Yan, D., Liu, Y., Huang, P., Cui, H. (2020). The roles of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in human cancer. *OncoTargets Ther.*, **13**, 13329-13344.
- Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., Huang, X., Wang, H., Li, L., Deng, H., Zhou, Y., Mao, J., Long, Z., Ma, Z., Ye, W., Pan, J., Xi, X. (2019). Platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$ : Signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J. Hematol. Oncol.*, **12**: 26.
- Huveneers, S., Truong, H., Danen, E. H. (2007). Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, **83** (11-12), 743-751.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56. Lyon, International Agency for Research on Cancer. 599 p.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Chemical Agents and Related Occupations. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100F. Lyon, International Agency for Research on Cancer. 599 p.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2017). Some organophosphate insecticides and herbicides. IARC Monographs on the Evaluation of

- Carcinogenic Risks to Humans, No. 112. Lyon, International Agency for Research on Cancer. 462 p.
- Ibáñez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Hernández, F. (2006). Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1134**, 51–55.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Glyphosate-Isopropylamine (Ref: MON 0139). <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/2395.htm> Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Ishikawa, E. (1999). Introduction: classification of immunoassays. 1-3. p. In: van der Vliet, P. C. (Szerk.): *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 27*. Amsterdam, Elsevier B.V. 333 p.
- Jan, R., Shah, J., Muhammad, M., Ara, B. (2009). Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *J. Hazard. Mater.*, **169**, 742–745.
- Jarošová, B., Javurek, J., Adamovský, O., Hilscherová, K. (2015). Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters—Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. *Environ. Int.*, **81**, 26–44.
- Jodlbauer, J., Zöllner, P., Lindner, W. (2000). Determination of zeranol, taleranol, zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **51**, 681-687.
- Johannsson, A. (1991). Heterogeneous enzyme immunoassay. 295-325. p. In: Price, C.P., Newman, D.J. (Szerk.): *Principles and Practice of Immunoassay*. London, Palgrave Macmillan. 650 p.
- Johnson, M. S., Lu, N., Denessiouk, K., Heino, J., Gullberg, D. (2009). Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1788** (4), 779-789.
- Kalita, A. J., Sarma, J., Hazarika, A., Bardhan, S., Hazarika, N., Borppujari, P., Kalita, D., Rajkhowa, S. (2024). Organic Micropollutants in Environment: Origin and Occurrence. 3-23. p. In: Bhadouria, R., Tripathi, S., Singh, P., Singh, R., Singh, H. P. (Szerk.): *Organic Micropollutants in Aquatic and Terrestrial Environments*. Cham, Springer Nature. 357 p.
- Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., Alferez, F. (2019). Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants*, **8** (11): 499.
- Kapp, T.G., Rechenmacher, F., Neubauer, S., Maltsev, O.V., Cavalcanti-Adam, E.A., Zarka, R., Reuning, U., Notni, J., Wester, H.J., Mas-Moruno, C., Spatz, J., Geiger, B., Kessler, H. (2017). A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci. Rep.*, **7** (1): 39805.
- Kataoka, H., Ryu, S., Sakiyama, N., Makita, M. (1996). Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A*, **726**, 253–258.
- Kelley, J., Paterson, R.R.M. (2003). Comparisons of ergosterol to other methods for determination of *Fusarium graminearum* biomass in water as a model system. In Proceedings of the 22nd European Culture Collections' Organization Meeting, Braga, Portugal, 17–19 September 2003; Lia, N., Smith, D. (Szerk.): *Micoteca da Universidade do Minho: Braga, Portugal*; pp. 235–239.
- [https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/55312/1/document\\_3404\\_1.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/55312/1/document_3404_1.pdf)  
Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Khaneghah, A.M., Fakhri, Y., Gahrue, H.H., Niakousari, M., Sant'Ana, A.S. (2019). Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review. *Trends Food Sci. Technol.*, **91**, 95–105.



- Khanna, P. (1991). Homogeneous enzyme immunoassay. 326–364. p. In: Price, C.P., Newman, D.J. (Szerk.): *Principles and Practice of Immunoassay*. London, Palgrave Macmillan. 650 p.
- Khezri, A., Herranz-Jusado, J.G., Ropstad, E., Fraser, T.W. (2018). Mycotoxins induce developmental toxicity and behavioural aberrations in zebrafish larvae. *Environ. Pollut.*, **242**, 500–506.
- Kim, C., Ye, F., Ginsberg, M. H. (2011). Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 321-345.
- Kisvarga, Sz., Hamar-Farkas, D., Horotán, K., Inotai, K., Mörtl, M., Neményi, A., Székács, A., Orlóci, L. (2023). Morphological, histological and glyphosate residue analysis of *Helianthus annuus* L. plants treated with glyphosate. *Agriculture*, **13** (5): 1014.
- Klátyik, Sz., Simon, G., Oláh, M., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J.G., Székács, A. (2023). Terrestrial ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010-2023. *Environ. Sci. Eur.*, **35** (1): 51.
- Klátyik, Sz., Simon, G., Oláh, M., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J.G., Székács, A. (2024a). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environ. Sci. Eur.*, **36** (1): 22.
- Klátyik, Sz., Takács, E., Barócsi, A., Lenk, S., Kocsányi, L., Darvas, B., Székács, A. (2024b). Hormesis, the Individual and Combined phytotoxicity of the components of glyphosate-based formulations on algal growth and photosynthetic activity. *Toxics*, **12** (4), 257.
- Kodama, S., Ito, Y., Taga, A., Nomura, Y., Yamamoto, A., Chinaka, S., Suzuki, K., Yamashita, T., Kemmei, T., Hayakawa, K. (2008). A fast and simple analysis of glyphosate in tea beverages by capillary electrophoresis with on-line copper(II)-Glyphosate complex formation. *J. Health Sci.*, **54**, 602–606.
- Kolpin, D.W., Hoerger, C.C., Meyer, M.T., Wettstein, F.E., Hubbard, L.E., Bucheli, T.D. (2010). Phytoestrogens and Mycotoxins in Iowa Streams: An examination of underinvestigated compounds in agricultural basins. *J. Environ. Qual.*, **39**, 2089–2099.
- Kolpin, D.W., Schenzel, J., Meyer, M.T., Phillips, P.J., Hubbard, L.E., Scott, T.-M., Bucheli, T.D. (2014). Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. *Sci. Total. Environ.*, **470**, 669–676.
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **48**, 141-149.
- Krska, R., Molinelli, A. (2006). Mycotoxin analysis: State-of-the-art and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 145–148.
- Krüger, M., Schrödl, W., Neuhaus, J., Shehata, A.A. (2013). Field investigations of glyphosate in urine of Danish dairy cows. *J. Environ. Anal. Toxicol.*, **3** (5): 100186.
- KSH (Központi Statisztikai Hivatal). Növényvédőszer-felhasználás, 2019. <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/stattukor/novenyvedoszer/2019>. Keresőprogram: Google. Elérés dátuma: 2024.04.25.
- La Porta, C., Fumagalli, M., Gomarasca, S., Lionetti, M., Zapperi, S., Bocchi, S. (2021). Synergistic effects of contaminants in Lombardy waters. *Sci. Rep.*, **11**: 13888.
- Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A. (2004). Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **501**, 79–88.
- Laranjeiro, C.S., Da Silva, L.J.G., Pereira, A.M., Pena, A., Lino, C.M. (2017). The mycoestrogen zearalenone in Portuguese flowing waters and its potential environmental impact. *Mycotoxin Res.*, **34**, 77–83.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1987). Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs Supplement 7. Lyon, International Agency for Research on Cancer. 440 p.

- Larionova, D.A., Goryacheva, I.Y., Van Peteghem, C., De Saeger, S. (2011). Thin-layer chromatography of aflatoxins and zearalenones with  $\beta$ -cyclodextrins as mobile phase additives. *World Mycotoxin J.*, **4**, 113–117.
- Li, R., Maminishkis, A., Zahn, G., Vossmeier, D., Miller, S.S. (2009). Integrin  $\alpha 5\beta 1$  mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium: Relevance for proliferative retinal disease. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 5988–5996.
- Li, W., Wang, Z., Wang, X., Cui, L., Huang, W., Zhu, Z., Liu, Z. (2023). Highly efficient detection of deoxynivalenol and zearalenone in the aqueous environment based on nanoenzyme-mediated lateral flow immunoassay combined with smartphone. *J. Environ. Chem. Engin.*, **11**: 110494.
- Lima, I.B., Boëchat, I.G., Fernandes, M.D., Monteiro, J.A.F., Rivaroli, L., Gücker, B. (2023). Glyphosate pollution of surface runoff, stream water, and drinking water resources in Southeast Brazil. *Environ. Sci. Poll. Res.*, **30**, 27030-27040.
- Lin, A.V. (2015). Indirect ELISA. 51-59. p. In: Hnasko, R. (Szerk.): *ELISA. Methods in Molecular Biology, vol 1318*. New York, NY, Humana Press, 216 p.
- Linthorst, J. A. (2010). An overview: origins and development of green chemistry. *Foundations of Chemistry*, **12**, 55-68.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, **46** (3), 258-268.
- Liu, M.T., Ram, B.P., Hart, L.P., Pestka, J.J. (1985). Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 332–336.
- Liu, N., Nie, D., Zhao, Z., Meng, X., Wu, A. (2015). Ultrasensitive immunoassays based on biotin–streptavidin amplified system for quantitative determination of family zearalenones. *Food Control.*, **57**, 202–209.
- Liu, Z., Wang, F., Chen, X. (2008). Integrin  $\alpha V\beta 3$  targeted cancer therapy. *Drug Dev. Res.*, **69**, 329–339.
- Lundqvist, J., von Brömssen, C., Rosenmai, A.K., Ohlsson, Å., Le Godec, T., Jonsson, O., Kreuger, J., Oskarsson, A. (2019). Assessment of pesticides in surface water samples from Swedish agricultural areas by integrated bioanalysis and chemical analysis. *Environ. Sci. Eur.*, **31**: 53.
- Luo, B.H., Carman, C.V., Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 619–647.
- Lutri, V.F., Matteoda, E., Blarasin, M., Aparicio, V., Giacobone, D., Maldonado, L., Becher Quinodoz, F., Cabrera, A., Giuliano Albo, J. (2020). Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina. *Sci. Total Environ.*, **711**: 134557.
- Maggi, F., Tang, F.H.M., Tubiello, F.N. (2023). Agricultural pesticide land budget and river discharge to oceans. *Nature*, **620**, 1013-1017.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. 253-269. p. In: Hakeem, K.R., Akhtar, M.S., Abdullah, S.N.A. (Szerk): *Plant, soil and microbes: volume 1: Implications in crop science*. Cham, Svájc, Springer International Publishing. 366. p.
- Majerus, P., Graf, N., Krämer, M. (2009). Rapid determination of zearalenone in edible oils by HPLC with fluorescence detection. *Mycotoxin Res.*, **25**, 117–121.
- Maragos, C.M. (2012). Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. *Food Addit. Contam. Part B*, **5**, 55–64.
- Maragos, C.M., Kim, E.-K. (2004). Detection of zearalenone and related metabolites by fluorescence polarization immunoassay. *J. Food Prot.*, **67**, 1039–1043.



- Mashishi, T., Gray, C. M. (2002). The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **40** (9), 903–910.
- Mata, A., Ferreira, J., Oliveira, B., Batoréu, M., Crespo, M.B., Pereira, V., Bronze, M. (2015). Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. *Food Chem.*, **176**, 455–464.
- MATE (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem). Az agrár- és élelmiszergazdaság létfontosságú rendszerelemei és kritikus infrastruktúrái megerősítésének kutatása - különös tekintettel a vízbázis védelem, a különleges élelmiszertermékek, az adatalapú működés, a monitoringrendszer fejlesztésére és a honvédelmi kritikus infrastruktúrák működtetésének körforgásos gazdasági szemléletű fejlesztésére. <https://palyazatok.uni-mate.hu/tkp2021-nva-22>. Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Matthews, G.A. (2018). *A history of pesticides*. Oxfordshire, UK. 366. p.
- Medalie, L., Baker, N.T., Shoda, M.E., Stone, W.W., Meyer, M.T., Stets, E.G., Wilson, M. (2020). Influence of land use and region on glyphosate and aminomethylphosphonic acid in streams in the USA. *Sci. Total Environ.*, **707**: 136008.
- Megharaj, M., Garthwaite, I., Thiele, J.H. (1997). Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**, 329–333.
- Mesnage, R., Antoniou, M. (2017). Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Front. Public Health*, **5**: 316.
- Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A. (2010). Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J.*, **3** (4), 385-401.
- Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr. Res.*, **89**, 1619–1626.
- Miles, C.O., Erasmuson, A.F., Wilkins, A.L., Towers, N.R., Smith, B.L., Garthwaite, I., Scahill, B.G., Hansen, R.P. (1996). Ovine metabolism of zearalenone to  $\alpha$ -zearalanol (Zeranol). *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3244–3250.
- Miller, W.H., Keenan, R.M., Willette, R.N., Lark, M.W. (2000). Identification and in vivo efficacy of small-molecule antagonists of integrin  $\alpha v \beta 3$  (the vitronectin receptor). *Drug Discov. Today*, **5**, 397–408.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., Visconti, A. (2005). Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol. Lett.*, **159** (3), 272-283.
- Miranti, C.K., Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.*, **4**, E83–E90.
- Miyai, K. (1991). Classification of immunoassay. 246-264. p. In: Price, C.P., Newman, D.J. (Szerk.): *Principles and Practice of Immunoassay*. London, Palgrave Macmillan. 650 p.
- Morse, E.M., Brahme, N.N., Calderwood, D.A. (2014). Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*, **53**, 810–820.
- Mörzl, M., Németh, G., Juracek, J., Darvas, B., Kamp, L., Rubio, F., Székács, A. (2013). Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchem. J.*, **107**, 143-151.
- Nabok, A., Al-Jawdah, A., Gémes, B., Takács, E., Székács, A. (2021). An optical planar waveguide-based immunosensors for determination of Fusarium mycotoxin zearalenone. *Toxins*, **13**: 89.
- Nabok, A., Tsargorodskaya, A. (2008). The method of total internal reflection ellipsometry for thin film characterisation and sensing. *Thin Solid Film.*, **516**, 8993–9001.
- Nader, D., Curley, G.F., Kerrigan, S.W. (2020). A new perspective in sepsis treatment: Could RGD-dependent integrins be novel targets? *Drug Discov. Today*, **25**, 2317–2325.
- Nader, D., Kerrigan, S. (2022). Vascular dysregulation following SARS-CoV-2 infection involves integrin signalling through a VECadherin mediated pathway. *bioRxiv*.

- <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.03.15.484274v1> Keresőprogram: Google.  
Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Nagarajan, S.R., Meyer, J.M., Miyashiro, J.M., Engleman, V.W., Freeman, S.K., Griggs, D.W., Klover, J.A., Nickols, G.A. (2006): Discovery of Diphenylmethanepropionic and Dihydrostilbeneacetic Acids as Antagonists of the Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . *Chem. Biol. Drug. Des.*, **67**, 177–181.
- Nistor, C., Emnéus, J. (2005). Immunoassay: potentials and limitations. *Compr. Anal. Chem.*, **44**, 375-427.
- Niu, G., Chen, X. (2011). Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics*, **1**, 30-47.
- Nunes, M.G.P., Pizzutti, I.R., Brackmann, A., Reichert, B., Fontana, M.E.Z., dos Santos, M.D., Kopp Cuti, L., Jänisch, B.D., Pelizzaro Panciera, M., Vagner, L., Dickow Cardoso, C. (2021). Multimycotoxin determination in grains: A comprehensive study on method validation and assessment of effectiveness of controlled atmosphere storage in preventing mycotoxin contamination. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 11440-11450.
- Okada, E., Allinson, M., Barral, M.P., Clarke, B., Allinson, G. (2020). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia. *Water Res.*, **168**: 115139.
- Oliveira, B.R., Mata, A.T., Ferreira, J.P., Barreto Crespo, M.T., Pereira, V.J., Bronze, M.R. (2018). Production of mycotoxins by filamentous fungi in untreated surface water. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 17519–17528.
- Oliveira, H.M.B., Santos, C., Paterson, R.R.M., Gusmão, N.B., Lima, N. (2016). Fungi from a groundwater-fed drinking water supply system in Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**: 304.
- Omicinski, C.J., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., Peters, J.M. (2011). Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.*, **120** (Suppl. 1), 49–75.
- Ozinskas, A.J. (2002). Principles of Fluorescence Immunoassay. 449-496. p. In: Lakowicz, J.R. (Szerk.): *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Topics in Fluorescence Spectroscopy, vol 4*. Boston, MA, Springer. 502 p.
- Pace, E., Maschio, G., Capolupo, M., De Corso, S., Giulianelli, E. (2022). Rapporto Nazionale Pesticidi nelle Acque. Rapporti 371/2022. Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma, Italy. [https://www.isprambiente.gov.it/files2022/pubblicazioni/rapporti/rapporto\\_371\\_2022.pdf](https://www.isprambiente.gov.it/files2022/pubblicazioni/rapporti/rapporto_371_2022.pdf).  
Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Paterson, R.R.M., Kelley, J., Gallagher, M. (1997). Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus* flaws (Link) in water. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25** (6), 435-436.
- Pelkonen, O., Abass, K., Parra Morte, J.M., Panzarea, M., Testai, E., Rudaz, S., Louise, J., Gundert-Remy, U., Wolterink, G., Jean-Lou, C.M.D., Coecke, S., Bernasconi, C. (2023). Metabolites in the regulatory risk assessment of pesticides in the EU. *Front. Toxicol.*, **5**: 1304885.
- Pereira, V., Fernandes, D., Carvalho, G., Benoiel, M., Romão, M.S., Crespo, M.B. (2010). Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Res.*, **44**, 4850–4859.
- Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., Costa, J. L. (2017). Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.*, **36** (12), 3206-3216.
- Pérez-Lucas, G., Vela, N., El Aatik, A., Navarro, S. (2019). Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. 1-28. p. In: Larramendy, M. L., Soloneski, S. (Szerk.): *Pesticides-use and misuse and their impact in the environment*. London, IntechOpen. 136 p.

- Pestka, J.J., Abouzied, M.N. (1995). Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technol.*, **49**, 120–128.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.*, **72**, 3–27.
- Pfaff, M., McLane, M.A., Beviglia, L., Niewiarowski, S., Timpl, R. (1994): Comparison of Disintegrins with limited variation in the RGD Loop in their binding to purified integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and in cell adhesion inhibition. *Cell Adhes. Commun.*, **2**, 491–501.
- Phillips McDougall (2019). Evolution of the Crop Protection Industry since 1960. Phillips McDougall, Pathead, Scotland, UK, pp. 1-17.
- Picardo, M., Filatova, D., Nuñez, O., Farré, M. (2019). Recent advances in the detection of natural toxins in freshwater environments. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **112**, 75–86.
- Pichler, H., Krska, R., Szekacs, A., Grasserbauer, M. (1998). An enzyme-immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies. *Anal. Bioanal. Chem.*, **362**, 176–177.
- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**, 30–33.
- Pietsch, C. (2017). Zearalenone (ZEN) and its influence on regulation of gene expression in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver tissue. *Toxins*, **9** (9): 283.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J. Agric. Environ. Ethics*, **8**, 17-29.
- Pimton, P., Sarkar, S., Sheth, N., Perets, A., Marcinkiewicz, C., Lazarovici, P., Lelkes, P.I. (2011). Fibronectin-mediated upregulation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin and cell adhesion during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Adhes. Migr.*, **5**, 73–82.
- Pires, N.L., de Araújo, E.P., Oliveira-Filho, E.C., Caldas, E.D. (2023). An ultrasensitive LC-MS/MS method for the determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in water – analysis of surface and groundwater from a hydrographic basin in the Midwestern region of Brazil. *Sci. Total Environ.*, **875**: 1624.
- Porstmann, T., Kiessig, S. T. (1992). Enzyme immunoassay techniques an overview. *J. Immunol. Methods*, **150** (1-2), 5-21.
- PubChem. Open chemistry database of the National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Qian, K., Tang, T., Shi, T., Wang, F., Li, J., Cao, Y. (2009). Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal. Chim. Acta*, **635**, 222–226.
- Radová, Z., Hajšlová, J., Králová, J., Papoušková, L., Sýkorová, S. (2001). Analysis of Zearalenone in wheat using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and/or enzyme-linked immunosorbent assay. *Cereal Res. Commun.*, **29**, 435–442.
- Renaud, J.B., Miller, J.D., Sumarah, M.W. (2019). Mycotoxin testing paradigm: Challenges and opportunities for the future. *J. AOAC Int.*, **102**, 1681–1688.
- Rendón-von Osten, J., Dzul-Caamal, R. (2017). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: a survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **14** (6): 595.
- Rodbard, D., Hutt, D.M. (1973). Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labeled antibody) assays: A generalized, weighted, iterative, least-squares method for logistic curve fitting. In Proceedings of the Symposium on RIA and Related Procedures in Medicine, International Atomic Energy Agency, Istanbul, Turkey, 10 September 1973; Volume 1, pp. 165–189.

- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicol*, **162**, 46-56.
- Rösch, A., Wettstein, F.E., Wächter, D., Reininger, V., Meuli, R.G., Bucheli, T.D. (2023). A multi-residue method for trace analysis of pesticides in soils with special emphasis on rigorous quality control. *Anal. Bioanal. Chem.*, **415**, 6009-6025.
- Rubert, J., Soriano, J.M., Mañes, J., Soler, C. (2011). Rapid mycotoxin analysis in human urine: A pilot study. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 2299–2304.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 697–715.
- Russell, R., Paterson, M. (2007). Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*. *Mycol. Prog.*, **6**, 109-113.
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J. Nat. Med.*, **72**, 32-42.
- Samsidar, A., Siddiquee, S., Shaarani, S. M. (2018). A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends Food Sci. Technol.*, **71**, 188-201.
- Sánchez-Bayo, F., Hyne, R.V., Deseile, K.L. (2010). An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. *Anal. Chim. Acta*, **675**, 125–131.
- Scarborough, R.M., Naughton, M.A., Teng, W., Rose, J.W., Phillips, D.R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A.M., Charo, I.F. (1993). Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1066–1073.
- Schaffner, P., Dard, M.M. (2003). Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 119–132.
- Scott, P.M., Lawrence, J.W., van Walbeek, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. *App. Environ. Microbiol.*, **20**, 839–842.
- Sebaei, A.S., Gomaa, A.M., Mohamed, G.G., El-Di, F.N. (2012). Simple validated method for determination of deoxynivalenol and zearalenone in some cereals using high performance liquid chromatography. *Am. J. Food Technol.*, **7**, 668–678.
- Shimaoka, M., Salas, A., Yang, W., Weitz-Schmidt, G., Springer, T.A. (2003). Small Molecule Integrin Antagonists that Bind to the  $\beta 2$  Subunit I-like Domain and Activate Signals in One Direction and Block Them in the Other. *Immunity*, **19**, 391–402.
- Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Keenan, R.J. (2007). The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11446–11455.
- Sigrist, C.J., Bridge, A., LeMercier, P. (2020). A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2. *Antivir. Res.*, **177**: 104759.
- Silva-Madera, R. J., Salazar-Flores, J., Peregrina-Lucano, A. A., Mendoza-Michel, J., Ceja-Gálvez, H. R., Rojas-Bravo, D., Reyna-Villela, M.Z., Torres-Sánchez, E. D. (2021). Pesticide contamination in drinking and surface water in the Cienega, Jalisco, México. *Water Air Soil Pollut.*, **232**, 1-13.
- Smalheer, J.M., Weigelt, C.A., Woerner, F.J., Wells, J.S., Daneker, W.F., Mousa, S.A., Wexler, R.R., Jadhav, P.K. (2004). Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 383–387.
- Soares, D., Silva, L., Duarte, S., Pena, A., Pereira, A. (2021). Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. *Foods*, **10** (11): 2785.

- Soares, L. M. V. (1992). Multi-toxin TLC methods for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in foods. 227-238. p. In: Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Szerk.): *Plant Toxin Analysis. Modern Methods of Plant Analysis, vol. 13*. Berlin, Heidelberg, Springer. 390 p.
- Songa, E.A., Arotiba, O.A., Owino, J.H.O., Jahed, N., Baker, P.G.L., Iwuoha, E.I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry*, **75**, 117–123.
- Stadel, J.M., Nichols, A.J., Bertolini, D.R., Samanen, J.M. (1994). Therapeutic Potential of Integrin Antagonists. 237–271. p. In: Cheresch, D.A., Mecham, R.M. (Szerk.): *Integrins: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix*. Cambridge, MA, Academic Press. 278 p.
- Stalikas, C.D., Konidari, C.N. (2001). Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A*, **907**, 1–19.
- Statista Inc. (2024). Leading countries in agricultural consumption of pesticides worldwide in 2021. <https://www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country>. Keresőprogram: Google. Elérés dátuma: 2024.04.25.
- Steffens, K., Jarvis, N., Lewan, E., Lindström, B., Kreuger, J., Kjellström, E., Moeys, J. (2015). Direct and indirect effects of climate change on herbicide leaching—A regional scale assessment in Sweden. *Sci. Total Environ.*, **514**, 239-249.
- Suri, C. R., Boro, R., Nangia, Y., Gandhi, S., Sharma, P., Wangoo, N., Rajesh, K., Shekhawat, G. S. (2009). Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **28** (1), 29-39.
- Szász, Á. Petró, E. (1997). Környezetvédelem és a mezőgazdasági repülés összefüggései. Környezetgazdálkodási Intézet, Budapest. 58 p.
- Székács, A. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the *Fusarium* toxin zearalenone. *Food Technol. Biotechnol.*, **36**, 105-110.
- Székács, A. (2021). Herbicide Mode of Action. 41-86. p. In: Mesnage, R., Zaller, J. G. (Szerk.): *Herbicides. Chemistry, Efficacy, Toxicology and Environmental Impacts*. Amsterdam, Hollandia, Elsevier. 366. p.
- Székács, A. (2024). Overcoming the barriers to adoption of microbial bioherbicides *Pest Manag. Sci.*, **80** (1), 8-9.
- Székács, A., Darvas, B. (2012). Forty years with glyphosate. 247–284. p. In: Hasaneen, M.N.A.E.-G. (Szerk.): *Herbicides—Properties, Synthesis and Control of Weeds*. Rijeka, IntechOpen. 504. pp.
- Székács, A., Darvas, B. (2018). Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.*, **6**: 78.
- Székács, A., Mörtl, M., Darvas, B. (2015). Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary—Surveys in 1990–2015. *J. Chem.*, **2015**: 717948.
- Székács, I., Adányi, N., Szendrő, I., Székács, A. (2021). Direct and Competitive optical grating immunosensors for determination of *Fusarium* mycotoxin zearalenone. *Toxins*, **13**: 43.
- Szekacs, I., Farkas, E., Gemes, B. L., Takacs, E., Szekacs, A., Horvath, R. (2018). Integrin targeting of glyphosate and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical biosensing. *Sci. Rep.*, **8**: 17401.
- Tai, W., He, L., Zhang, X., Pu, J., Voronin, D., Jiang, S., Zhou, Y., Du, L. (2020). Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: Implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell. Mol. Immunol.*, **17**, 613–620.
- Takada, Y., Ye, X., Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.*, **8**: 215.
- Takagi, J. (2004). Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem. Soc. Trans.*, **32**, 403–406.
- Tang, F. H., Lenzen, M., McBratney, A., Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, **14** (4), 206-210.



- Tang, L., Xu, M., Zhang, L., Qu, L., Liu, X. (2020). Role of  $\alpha V\beta 3$  in prostate cancer: Metastasis initiator and important therapeutic target. *Onco Targets Ther.*, **13**, 7411–7422.
- Tang, X., Li, X., Li, P., Zhang, Q., Li, R., Zhang, W., Ding, X., Lei, J., Zhang, Z. (2014). Development and application of an immuno-affinity column enzyme immunoassay for mycotoxin zearalenone in complicated samples. *PLoS ONE*, **9**: e85606.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **97**, 4-27.
- Thermo Fisher Scientific Inc. Instructions. QuantaRed™ Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate; Thermo Fisher Scientific Inc.: Rockford, IL, USA, 2008; pp. 1–3. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011632\\_QuantaRed\\_Enhanced\\_ChemiFluorescent\\_HRP\\_Substrate\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011632_QuantaRed_Enhanced_ChemiFluorescent_HRP_Substrate_UG.pdf) Keresőprogram: Google. Lekérdezés időpontja: 2024.04.25.
- Thinn, A. M. M., Wang, Z., Zhu, J. (2018). The membrane-distal regions of integrin  $\alpha$  cytoplasmic domains contribute differently to integrin inside-out activation. *Sci. Rep.*, **8** (1): 5067.
- Thongrussamee, T., Kuzmina, N., Shim, W.-B., Jiratpong, T., Eremin, S., Intrasook, J., Chung, D.-H. (2008). Monoclonal-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals. *Food Addit. Contam. Part A*, **25**, 997–1006.
- Thouvenot, D., Morfin, R. (1979). Quantitation of zearalenone by gas-liquid chromatography on capillary glass columns. *J. Chromatogr. A*, **170**, 165–173.
- Thouvenot, D., Morfin, R. F. (1983). Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum: production, properties, and use of porcine antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45** (1), 16-23.
- Tijssen, P. (1985). Practice and theory of enzyme immunoassays. [Amsterdam, Elsevier B.V.] 504 p. (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol 15.)
- Tóth, G., Háhn, J., Szoboszlai, S., Harkai, P., Farkas, M., Radó, J., Göbölös, B., Kaszab, E., Szabó, I., Urbányi, B., Kriszt, B. (2022). Spatiotemporal analysis of multi-pesticide residues in the largest Central European shallow lake, Lake Balaton, and its sub-catchment area. *Environ. Sci. Eur.*, **34** (1): 50.
- Tseng, S.H., Lo, Y.W., Chang, P.C., Chou, S.S., Chang, H.M. (2004). Simultaneous quantification of glyphosate, glufosinate, and their major metabolites in rice and soybean sprouts by gas chromatography with pulsed flame photometric detector. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4057–4063.
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, **18** (3): 1112.
- Turner, G.V., Phillips, T.D., Heidelbaugh, N.D., Russell, L.H. (1983). High Pressure liquid chromatographic determination of zearalenone in chicken tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 102–104.
- Urraca, J.L., Benito-Peña, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., Pestka, J.J. (2005). Analysis of zearalenone in cereal and swine feed samples using an automated flow-through immunosensor. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3338–3344.
- Valencia-Quintana, R., Milić, M., Jakšić, D., Šegvić Klarić, M., Tenorio-Arvide, M.G., Pérez-Flores, G.A., Bonassi, S., Sánchez-Alarcón, J. (2020). Environment changes, aflatoxins, and health issues, a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **17**: 7850.
- Valle, A. L., Mello, F. C. C., Alves-Balvedi, R. P., Rodrigues, L. P., Goulart, L. R. (2019). Glyphosate detection: methods, needs and challenges. *Environ. Chem. Lett.*, **17**, 291-317.
- Valverde-Bogantes, E., Bianchini, A., Herr, J.R., Rose, D.J., Wegulo, S.N., Hallen-Adams, H.E. (2020). Recent population changes of Fusarium head blight pathogens: Drivers and implications. *Can. J. Plant Pathol.*, **42**, 315–329.

- Van Bruggen, A. H., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., Morris Jr, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.*, **616**, 255-268.
- Van Der Fels-Klerx, H., De Rijk, T., Booij, C., Goedhart, P., Boers, E., Zhao, C., Waalwijk, C., Mol, H., Van Der Lee, T. (2012). Occurrence of Fusarium head blight species and Fusarium mycotoxins in winter wheat in the Netherlands in 2009. *Food Addit. Contam. Part A*, **29**, 1716–1726.
- Van Der Gaag, B., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., Van Osenbruggen, T., Koopal, K. (2003). Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control.*, **14**, 251–254.
- Vashist, S. K., Luong, J. H. (2018). Immunoassays: an overview. 1-18. p. In: Vashist, S. K., Luong, J. H. (Szerk): *Handbook of Immunoassay Technologies. Approaches, Performances, and Applications*. Elsevier. 490 p.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of the glyphosate: A review. *Pest. Manag. Sci.*, **61**, 1139–1151.
- Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Sagar, R. (2014). Pesticide relevance and their microbial degradation: a state-of-art. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **13**, 429-466.
- Vicini, J. L., Jensen, P. K., Young, B. M., Swarthout, J. T. (2021). Residues of glyphosate in food and dietary exposure. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20** (5), 5226-5257.
- Voss, S., Hallström, T., Saleh, M., Burchhardt, G., Pribyl, T., Singh, B., Riesbeck, K., Zipfel, P.F., Hammerschmidt, S. (2013). The cholinebinding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **288**, 15614–15627.
- Vreeken, R.J., Speksnijader, P., Bobeldijk-Pastorova, I., Noij, T.H.M. (1998). Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by online solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **794**, 187–199.
- Waiman, C.V., Avena, M.J., Garrido, M., Band, B.F., Zanini, G.P. (2012). A simple and rapid spectrophotometric method to quantify the herbicide glyphosate in aqueous media. Application to adsorption isotherms on soils and goethite. *Geoderma*, **170**, 154–158.
- Wang, Y., Liu, Z., Li, T., Chen, L., Lyu, J., Li, C., Lin, Y., Hao, N., Zhou, M., Zhong, Z. (2019). Enhanced therapeutic effect of RGD-modified polymeric micelles loaded with low-dose methotrexate and nimesulide on rheumatoid arthritis. *Theranostics*, **9**, 708–720.
- Waśkiewicz, A., Gromadzka, K., Bocianowski, J., Pluta, P., Goliński, P. (2012). Zearalenone Contamination of the aquatic environment as a result of its presence in crops/Pojava mikotoksina u vodenom okolišu zbog njihove prisutnosti u usjevima. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, **63**, 429–435.
- Wilkinson, A.L., John, A.E., Barrett, J.W., Gower, E., Morrison, V.S., Man, Y., TaoPun, K., Roper, J.A., Lockett, J.C., Borthwick, L.A., Barksby, B.S., Burgoyne, R.A., Barnes, R., Fisher, A.J., Procopiou, P.A., Hatley, R.J.D., Barrett, T.N., Marshall, R.P., Macdonald, S.J.F., Jenkins, R.G., Slack, R.J. (2021). Pharmacological characterisation of GSK3335103, an oral  $\alpha\beta6$  integrin small molecule RGD-mimetic inhibitor for the treatment of fibrotic disease. *Eur. J. Pharmacol.*, **913**: 174618.
- Włodarczyk-Makuła, M. (2024). Selected organic micropollutants in the aquatic environment. *Desalin. Water Treat.*, **317**: 100061.
- Wu, L., Li, G., Xu, X., Zhu, L., Huang, R., Chen, X. (2019). Application of nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **113**, 140-156.
- Yan, B., Smith, J. W. (2001). Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction. *Biochemistry*, **40** (30), 8861-8867.

- Yan, Z., Wang, L., Wang, J., Tan, Y., Yu, D., Chang, X., Fan, Y., Zhao, D., Wang, C., De Boevre, M., De Saeger, S., Sun, C., Wu, A. (2018). A QuEChERS-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine zearalenone-like mycotoxins in pigs. *Toxins*, **10** (3): 129.
- Yazar, S., Omurtag, G. Z. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.*, **9** (11), 2062-2090.
- Zhang, L., Li, Z., Ye, X., Chen, Z., Chen, Z.S. (2021). Mechanisms of thrombosis and research progress on targeted antithrombotic drugs. *Drug Discov. Today*, **26**, 2282–2302.
- Zheng, W., Feng, N., Wang, Y., Noll, L., Xu, S., Liu, X., Lu, N., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zhu, G., Bian, J., Bai, J., Liu, Z. (2019). Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: A review. *Food Chem. Toxicol.*, **126**, 262–276.
- Ziylan-Yavas, A., Santos, D., Flores, E.M.M., Ince, N.H. (2022). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): Environmental and public health risks. *Environ. Prog. Sustain. Energy*, **41**: e13821.
- Zoller, O., Rhy, P., Zarn, J.A., Dudler, V. (2020). Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **228**: 113526.



# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Prof. Székács Andrásnak** az évek során nyújtott szakmai irányításáért, tanításáért és támogatásáért, melyek nélkül e munka nem jöhetett volna létre. Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Takács Eszternek, Dr. Klátyik Szendrának és Dr. Mörzl Máriának mindazért a segítségért, amit a vizsgálatok lefolytatása és az értekezés elkészítése során nyújtottak. Köszönöm a MATE KÖTI AKK Környezetanalitikai és Ökotoxikológiai Osztály minden jelenlegi és volt dolgozójának, hogy munkámat egy összetartó, egymást feltétlenül támogató közösségben végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki a HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont Nanobioszenzorikai Laboratórium munkatársainak, Dr. Székács Innának és Dr. Horváth Róbertnek a vizsgált integrálgátlási folyamatok *in vivo* körülmények közötti igazolásáért EPIC bioszenzoros módszerrel, valamint az integrálgátlási *immunoassay* összeállításához nyújtott tanácsaikért. Hálás vagyok a BME Atomfizika Tanszék munkatársainak, elsősorban Dr. Kocsányi Lászlónak, Dr. Barócsi Attilának és Dr. Lenk Sándornak, valamint az Optimal Optik Kft. munkatársainak, elsősorban Dr. Domján Lászlónak és Dr. Szarvas Gábornak a vizsgálataimban használt fluorimétermodul-prototípus műszaki kifejlesztéséért, valamint az Izotóp Intézet Kft. munkatársainak, elsősorban Dr. Keszei Csabának és Dr. Szemenyei Erzsébetnek a *glyphosate*-specifikus immunreagensek elkészítéséért. Köszönettel tartozom továbbá Prof. Alexei Naboknak a Sheffield Hallam Egyetemen a teljes belső visszaverődéses ellipszometriás vizsgálatok elvégzéséért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani türelmükért és lelki támogatásukért családomnak és barátaimnak, akik egyetemi hallgatói pályafutásom alatt mindvégig mellettem álltak.

Vizsgálataim az alábbi pályázatokhoz kapcsolódtak: „Komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris, érzékelő- és műszercsalád kifejlesztése, továbbá az alkalmazási területek kutatása” (Aquafluosense, NVKP\_16-1-2016-0049), Kooperatív Doktori Program 2020 (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs hivatal, KDP-2020), „Az agrár- és élelmiszergazdaság létfontosságú rendszerelemei és kritikus infrastruktúrái megerősítésének kutatása - különös tekintettel a vízbázisvédelem, a különleges élelmiszertermékek, az adatalapú működés, a monitoringrendszer fejlesztésére és a honvédelmi kritikus infrastruktúrák működtetésének körforgásos gazdasági szemléletű fejlesztésére” (TKP2021-NVA-22; MATE 2024).