

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Gémes Borbála Letícia

Gödöllő

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK.....	5
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	9
3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	14
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	18
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	21
6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK.....	24

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A mezőgazdaság növénytermesztési ágazatának nagy része nyílt rendszerű technológiákon alapul. Ezek a rendszerek az őket körülvevő környezettel állandóan fennálló kapcsolatban állnak, mely lehetővé teszi, hogy mind a technológia során alkalmazott, mind a növénytermesztési területen belül termelődött anyagok a környezet elemeibe szennyezőként kikerüljenek.

Az iparszerű mezőgazdasági technológiák során a kártevők elleni védekezés leggyakoribb formája a kémiai növényvédelem, ahol a védekezés növényvédő szerek kijuttatásával történik, mely környezeti szempontból szennyezőforrásnak tekinthető. A mezőgazdasági technológiákból származó két legjelentősebb szerves mikroszennyező-típus a haszonnövények kártevői ellen alkalmazott növényvédő szerek, valamint a bizonyos növénypatogén gombák által termelt mikotoxinok, melyek a rendszeren belül termelődő vegyületek példái. Ezek a szerves mikroszennyezők a kijuttatást követően terjedhetnek a környezetben sodródás, felszíni lefolyás vagy bemosódás révén, melynek eredményeként a szennyezők és bomlástermékeik elérhetik a felszíni és felszín alatti vizeket, elszennyezve ezzel a vízi szervezetek élőhelyeit és más élőlények – köztük az ember – vízforrásait.

A mikotoxinok olyan másodlagos anyagcseretermékek, melyeket egyes patogén mikroszkopikus gombák választanak ki. Előfordulnak terményekben, élelmiszerekben és takarmányban is, élő szervezetre gyakorolt hatásuk pedig lehet genotoxikus, citotoxikus, mutagén, teratogén vagy akár rákkeltő is (CIMBALO et al. 2020). Mikotoxinok közül célvegyületnek a zearalenont (ZON) választottuk, melyet az Amerika, Ázsia és Európa területén is elterjedt *Fusarium* nemzetség fajtái termelnek. Legismertebb hatása a hormonmoduláns hatás, ezért mikoösztrogénnek is nevezik. Az elmúlt években kimutatták, hogy (más mikotoxinokkal együtt) felszínvíz-szennyező tulajdonságot is mutat, melynek forrása beoldódás, de esetenként a mikotoxinok vízben történő bioszintézise is lehet (RUSSELL és PATERSON 2003). Bár a ZON vízoldhatósága alacsony, kimutatták különböző vízmintákból Európa, Brazília és az USA területén is.

Az általunk vizsgált *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag mind a mai napig a legnagyobb forgalmú növényvédő szer (SZÉKÁCS és DARVAS 2018). Több, mint 150 gyomfaj irtására alkalmazzák a monokultúras mezőgazdasági tevékenységek mellett erdészetekben, városi környezetben és vízi kultúrákban

is (KANISSERY et al. 2019). Vízoldhatósága a növényvédőszer-hatóanyagok között kiemelkedően magas, mely hozzájárul felszínivíz-szennyezőként való megjelenéséhez. Hatásmechanizmusa az aromás aminosavak bioszintézisében a sikiminsav-útvonal működésében kulcsfontosságú enzim gátlásán alapszik, mely növényekben, baktériumokban és gombákban található, ezért állati szervezetekre a hatóanyag várható akut toxicitása alacsony (APARICIO et al. 2013). Ennek ellenére amellet, hogy ökotoxikológiai hatásait szárazföldi és vízi szervezeteken is kimutatták, egyes kutatások szerint a hatóanyag és elsődleges bomlásterméke (amino-metil-foszfonsav, AMPA) környezeti megjelenése összefüggésben lehet az alacsony dózisú kitettséggel kapcsolatba hozott lehetséges humán egészségügyi hatásokkal (VAN BRUGGEN et al. 2018).

A mezőgazdasági eredetű 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. A növényvédőszer-maradékok, de főleg a mikotoxinok esetében ez kiemelten fontos, mert toxikus hatásukat nagyon kis dózis esetén is képesek kifejteni, ezért hatóságilag megengedett szintjük (élelmiszer-egészségügyi határérték) is alacsony (ivóvízben növényvédőszer-maradékokra 0,1 µg/l, élelmiszerben és takarmányban mikotoxinokra 0,002–0,50 mg/kg, növényvédőszer-maradékokra 0,01–0,20 mg/kg).

Glyphosate és ZON meghatározására a műszeres analitikai eljárások közül leggyakrabban a kromatográfiás módszereket alkalmazzák, melyek azonban költségesek, időigényesek és a legtöbbször minta-előkészítési lépést is igényelnek. Az ilyen módszereknek jó alternatívái lehetnek az immunanalitikai eljárások, melyek szelektivitását a célvegyületet specifikusan felismerő antitestek segítségével biztosítjuk.

Az immunanalitikai módszerek legelterjedtebb formája a klasszikus enzimjelzéses immunszorbens vizsgálat (ELISA), melyet mindkét célvegyület (*glyphosate* és ZON) mennyiségi meghatározására alkalmaznak. ELISA esetén a felismerő antitest és a célvegyület kapcsolódását jelölőenzimmel jelölik, mely a szubsztrátuma hozzáadása után mérésre alkalmas színreakciót katalizál. Színreagens (kromofór) helyett alkalmazható például luminofór vagy fluorofór is, melyeknél az enzimreakció végterméke lumineszcencia vagy fluoreszcencia mérésével detektálható. Ezen érzékenyebb detektálási

módszerek alkalmazása csökkentheti ugyanazon immunanalitikai mérési folyamat kimutatási határát.

A fentebb jellemzett *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyagról elsőként mutattuk ki, hogy gátló hatást gyakorol az $\alpha\beta3$ -integrin kötődésére annak RGD felismerőszekvenciájához (SZEKACS et al. 2018). Mivel a hatóanyag a környezetben általánosan előforduló szennyező, mely újabb kitettségi (expozíciós) útvonalat jelenthet az élő szervezetek számára, a munkám során módosított receptorgátlási ELISA tesztet alkalmazva vizsgáltuk ezt az újonnan felismert hatást az integrinfehérjék és a lehetséges gátlószerek (*glyphosate*-hoz szerkezetileg hasonló vegyületek) szélesebb körében.

Az integrinek a gerincesekben általánosan előforduló transzmembrán, α - és β -alegységekből felépülő, kétirányú jelző- és adhéziós receptorfehérjék. Elsődleges feladatuk a kapcsolat fenntartása kötőszöveti sejteket körülvevő nem sejtes makromolekuláris rendszerrel (extracelluláris mátrix, ECM). Az integrinek a sejten kívüli szakaszukon található specifikus kötőhelyek révén azonosítani tudják az ECM egyes fehérjéit (receptor–ligandum-kapcsolat), és a kapcsolat (kötődés vagy letapadás) létrejöttével információkat továbbítanak a sejt és környezete között (MORSE et al. 2014). E tevékenységükkel szabályozó funkciót látnak el sejtéletteni folyamatokban (pl. sejtszaporodás, sejt-vándorlás, differenciáció), sejt–sejt-kapcsolatokban, az egyedfejlődés során, valamint bizonyos patológiai folyamatokban is. Az emberi szervezetben található 24 integrin négy csoportja a leukocita-, a kollagén-, a laminin- és az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav) szekvenciát felismerők. Az RGD-specifikus integrinek szerepe széles palettát fed le a sejtadhézió, a sejtszaporodás, a sejt-vándorlás és a véredényképzés során, ezért gyakori célcsoportot jelentenek orvosdiagnosztika, képalkotás és kísérleti gyógyszeres kezelések területén, valamint RGD-szekvenciát tartalmazó ligandumokat a rákkutatásban is vizsgálják, mert bizonyos integrinek nagyobb mértékű kifejeződését figyelték meg több típusú rákos megbetegedésnél (CHENG és YI 2019). A vizsgálatunk során alkalmazott RGD-specifikus integrinek közül az $\alpha\beta3$ és az $\alpha5\beta1$ a vitronektin és a fibronektin fehérjék receptorai, melyek általánosan fejeződnek ki a szervezetben (például endotéliumsejteken, limfocitákon, makrofágokon). Az $\alpha11\beta3$ csontvelő-óriássejtek és bizonyos tumorsejtek mellett elsősorban a vérlemezkéken fejeződik ki (SCHAFFNER és DARD 2003), ahol a fibrinogén receptoraként fontos szerepet játszik a vérárvadás folyamatában. Az integrinek számos olyan folyamatban is részt vesznek, melyeknek megzavarása betegségek kialakulásához vezethet. Itt

olyan súlyos betegségek is említhetők, amelyek a programozott sejthalál (apoptózis) egyensúlyának felborulásával, így akár malignus karcinogén elváltozásokkal is járhatnak.

Munkám során kutatóhelyem az Aquafluosense projekt (NVKP_16-1-2016-0049) konzorciumvezetője volt, melyen belül egy komplex vízminősítést *in situ* megvalósító, gerjesztéses közvetlen és immunfluoreszcencián, valamint optikai és lézeres plazma-színképelemzésen alapuló, moduláris érzékelő- és műszercsalád került kifejlesztésre. E projekttel összhangban célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. Enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) kialakítása, mely a projektben fejlesztett fluorimétermodul-prototípussal alkalmas vízmintákban a zearalenon (ZON) hatósági előírásoknak megfelelő érzékenységgű kimutatására és mennyiségi meghatározására *in situ* körülmények között. A munka magába foglalta egyebek között a célvegyület önálló fluoreszcenciájának vizsgálatát, a fejlesztett ELFIA módszer alkalmazhatóságának vizsgálatát felszínivízmintákon, valamint az esetleges mátrixhatás és keresztreakciók meghatározását.
2. ELFIA módszer kialakítása vízminták *glyphosate*-tartalmának kimutatására és meghatározására, beleértve ebbe a módszer analitikai paramétereit, alkalmazhatóságának vizsgálatát egyéb környezeti és biológiai mintákon (talaj és növényi szövet), valamint az esetleges mátrixhatás és keresztreakciók vizsgálatát.
3. Módosított enzimjelzéses *immunoassay* módszer alkalmazása a *glyphosate*, valamint bomlástermékei és egyéb rokon vegyületei arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) oligoszekvenciát felismerő és más integrinek (receptorok) ligandumkötő képességére gyakorolt lehetséges gátló hatásának vizsgálatára, beleértve egyebek között az integringátlás koncentrációfüggésének leírását.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

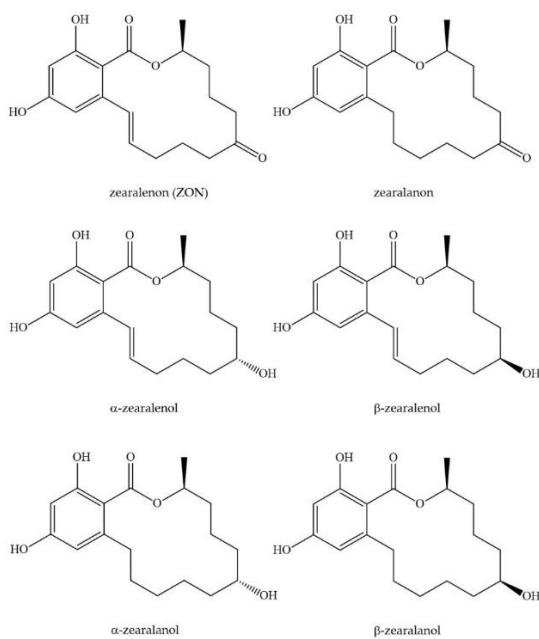
Az enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) vizsgálatok fejlesztése során a zearalenon (ZON) mikotoxin és a *glyphosate* növényvédőszer hatóanyag mennyiségi meghatározására fejlesztett módszer alapelve megegyezett. Az ilyen, heterológ kötődési fázisú kompetitív *immunoassay* módszereknél a felismerő antitest célvegyületre specifikus kötőhelyeiért folyik a versengés a célvegyület felszínhez rögzített, illetve oldatban levő formái között. Ezért a vizsgálatokat az adott célvegyülethez a lehető legjobban hasonló kémiai szerkezetű vegyülettel (analóggal) érzékenyített mikrotiterlemezekon végeztük. A kisebb szerkezeti módosításokra azért volt szükség, hogy a ZON- vagy *glyphosate*-analógot a mikrotiterlemez érzékenyítése során a felszínhez egy hordozófehérje segítségével rögzíteni lehessen. A versengési (kompetíciós) lépés után a felszínhez nem rögzült antitesteket a rendszerből kimostuk, majd a felszínhez kötődött célvegyületspecifikus antitesteket egy jelölőenzimmel konjugált második antitesttel jelöltük meg. A szubsztrátum és a kromofór (mely esetünkben fluorofór tulajdonsággal is rendelkezett) hozzáadása után végbemenő enzimatis reakció abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával is mérhető analitikai jelet eredményezett.

A ZON ELFIA fejlesztési munkálatait megelőzően megvizsgáltuk a mennyiségi kimutatáshoz a célvegyület saját indukált fluoreszcenciájának (autofluoreszcencia) detektálási lehetőségét. Ehhez rögzítettük a ZON önálló fluoreszcenciájának spektrumát a 250–830 nm gerjesztési, valamint 270–830 nm emissziós hullámhossztartományban. A spektrumtérkép által meghatározott optimális gerjesztési és detektálási hullámhosszpárt alkalmaztuk a ZON autofluoreszcenciájának kalibrációs görbéje meghatározásánál a 0,6–2000 ng/ml koncentrációtartományban, valamint a kimutatási határ megállapításához. A kalibrációs görbe pontjaihoz tartozó ZON koncentrációkat foszfátpufferes sóoldatban vettük fel.

Ezt követően az ELFIA módszer optimalizálása érdekében statikus titrálást végeztünk két antiszérummal a célvegyületre érzékenyebb kiválasztása érdekében. Itt a mikrotiterlemezeket 5 µg/ml koncentrációjú ZON–BSA-val érzékenyítettük, a szérumokat pedig 1:50 és 1:12200 közötti hígításokban alkalmaztuk. Ezután keresztitrálással beállítottuk az érzékenyítő és a célvegyületre érzékenyebb szérum megfelelő koncentráció-hígítás párosát.

Az optimalizált rendszerrel a korábban ismertett lépések szerint meghatároztuk a pufferoldatban felvett ZON kalibrációs görbe pontjait a 0,004 pg/ml – 2 µg/ml koncentrációtartományban, ahol az enzimreakció termékét (rezorufin) abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával is rögzítettük. Az abszorbancia detektálása 576 nm hullámhosszon, a fluoreszcencia detektálása pedig 593 nm hullámhosszon történt.

A keresztreakciók vizsgálatát a célvegyület ZON szerkezetileg hasonló rokon vegyületeivel végeztük el. A vizsgált vegyületek az α -zearalenol, a β -zearalenol, a zearalanon, az α -zearalanol és a β -zearalanol voltak (1. ábra).



1 ábra: A zearalenon mennyiségi meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens *immunoassay* (ELFIA) keresztreakciós vizsgálataiba bevont vegyületek szerkezete.

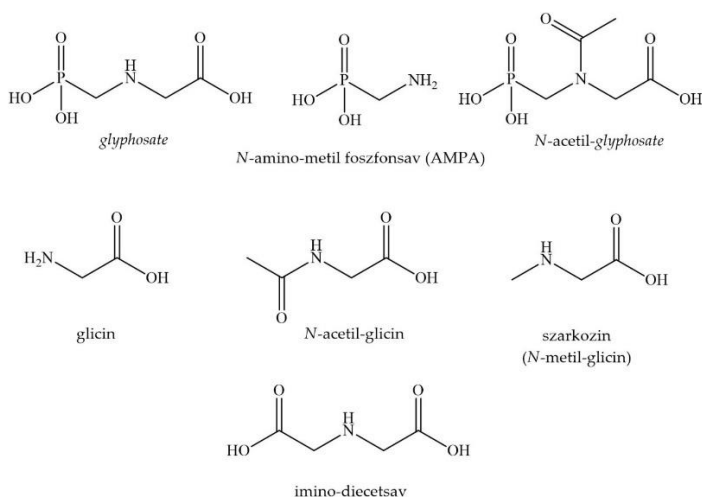
A mátrixhatás meghatározásához a pufferoldatban felvett kalibrációs görbe pontjait felvettük három felszínivízmintában is, melyek a Velencei-tóból, a Balatonból, valamint a Duna budapesti szakaszáról származtak, majd a kalibrációs görbék IC_{50} értékeit a pufferoldatban felvett kalibrációs görbe IC_{50} értékével összehasonlítottuk.

A *glyphosate* ELFIA mérési folyamata előtt szükség volt egy egy lépéses minta-előkészítésre. Ennek során a pufferoldatban, illetve a mátrixhatás meghatározása során a környezeti mintákban levő *glyphosate*-molekulákat N-

acilezéssel a lemez érzékenyítőjével azonos szerkezetűre alakítottuk (származékképzés).

Ezt követően a fejezet elején ismertetett lépések szerint felvettük a célvegyület kalibrációs görbéjének pontjait pufferoldatban 0 és 400 ng/ml között, majd a mérés végén az eredményeket abszorbancia és fluoreszcencia detektálásával is rögzítettük. A detektálási hullámhosszok a ZON ELFIA módszeréhez hasonlóan 576 nm és 593 nm voltak abszorbancia és fluoreszcencia esetén.

Glyphosate esetében a keresztreakciók vizsgálatát a szerkezetileg hasonló AMPA, glicin, imino-diecetsav, N-(foszfono-metil)-imino-diecetsav, N-acetil-glicin és szarkozin vegyületekkel végeztük el (2. ábra), valamint ebben az esetben foszfáttal is.



2. ábra: A *glyphosate* mennyiségi meghatározására fejlesztett enzimjelzéses fluoreszcens immunoassay (ELFIA) keresztreakciós vizsgálataiba bevont vegyületek szerkezete.

A mátrixhatásvizsgálatot hat különböző felszínivízmintával, valamint ebben az esetben talajmintával, továbbá napraforgóból (*Helianthus annuus*) származó levél- és gyökérmintával is elvégeztük. A talaj- és növényi szövetmintákat 40 mg liofilizált minta 1 ml pufferoldattal történő homogenizálásával, centrifugálásával, majd a folyadékfázis leemelésével készítettük elő. Az így előállított mintakivonatokban, valamint a felszínivízmintákban felvettük a pufferoldatban is felvett kalibrációs görbe pontjait, és az IC₅₀ értékeket összehasonlítottuk. Szükség esetén a mintákat pufferoldattal hígítottuk 1:10, vagy 1:100 arányban.

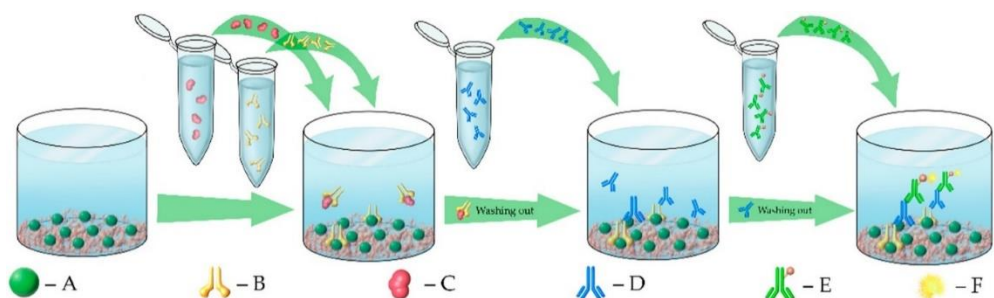
A *glyphosate* és szerkezeti analógjainak integrinekre gyakorolt gátló hatásának vizsgálatába a növényvédőszer-hatóanyagon (izopropilammónium-sója formájában) kívül bevontuk az elsődleges bomlástermék AMPA-t, valamint a glicint, a szarkozint, az N-acetil-glicint, az N-acetil-*glyphosate*-ot és az imino-diecetsavat. A módosított receptorgátlási ELISA rendszerben vizsgált koncentrációk minden esetben 0,138, 1,1, 5,5, 11 és 22 mM voltak.

A munka során négy különböző integrinkötődési receptor-*immunoassay* rendszert építettünk fel, részben saját korábbi eredményeink (SZEKACS et al. 2018), részben a szakirodalom (KAPP et al. 2017) alapján. Az kialakított rendszerekben lehetőségünk volt az integrin és liganduma (teljes ECM-fehérje, vagy RGD felismerőszekvencia) közötti kapcsolatra gyakorolt gátló hatás meghatározására az alábbi esetekben:

- $\alpha V\beta 3$ kötődése RGD szekvenciához,
- $\alpha V\beta 3$ kötődése vitronektinhez (ECM-fehérje),
- $\alpha 5\beta 1$ kötődése RGD szekvenciához,
- $\alpha 11\beta 3$ kötődése fibrinogénhez (ECM-fehérje).

Kiegészítő vizsgálatként meghatároztuk a *glyphosate* gátló hatását az $\alpha V\beta 3$ -SARS-CoV-2 tüskefehérje kapcsolat kialakulására is.

A rendszer sematikus felépítése a 3. ábrán látható.



3. ábra. A *glyphosate* és szerkezeti analógjai gátló hatásának vizsgálatára alkalmazott módosított enzimjelzéses immunszorbens vizsgálat sematikus folyamatábrája. 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 RGD szekvenciával vagy ECM-fehérjével a gátlószerként (C) alkalmazott *glyphosate* vagy rokon vegyülete hiányában, illetve 0–22 mM koncentrációban való jelenlétében a koncentrációtól függően. A felszínre rögzült integrinmolekulákat egérben termelt integrinspecifikus antitestekkel (D) azonosítottuk, majd tormaperoxidáz enzimmel konjugált egérspecifikus második antitesttel (E) jelöltük. Ezt követően hozzáadtuk az enzim szubsztrátumát, valamint a színfejlődést eredményező kromofórt (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 mikrotiterlemezek érzékenyítését RGD felismerőszekvenciát tartalmazó szintetikus biopolimerrel vagy ECM-fehérjével végeztük, majd az esetlegesen szabadon maradt kötőhelyeket szarvasmarha szérumalbuminnal blokkoltuk. A következő lépésben az adott integrin a rendszerben jelenlévő gátlószer koncentrációjától függően lépett kölcsönhatásba a felszínre rögzített ligandumával. A lekötődött integrinmolekulákat egérben termelt integrinspecifikus antitestekkel azonosítottuk, majd egérspecifikus, tormaperoxidáz enzimmel jelölt második antitestekkel jelöltük. Amennyiben a *glyphosate* vagy rokon vegyülete az integrin felszíni makromolekulához (RGD-tartalmú szintetikus biopolimer vagy ECM-fehérje) való kötődését gátolta, a rendszer további lépései sem mentek végbe, ezért színjel nem formálódott. Az enzim szubsztrátuma és a kromofór hozzáadása után az enzimreakciót kénsavval leállítottuk a megfelelő színfejlődést követően, majd a jel detektálását abszorbancia mérésével végeztük 492 nm hullámhosszon.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A zearalenon (ZON) saját gerjesztett fluoreszcenciájának szkenneléses mérésével felvett spektrumtérképét felvéve az optimális gerjesztési és detektálási hullámhosszpárt 280 nm (gerjesztés) és 520 nm (emisszó) értékűnek találtuk. Az ezen hullámhosszok alkalmazásával vizes ZON-oldatminták gerjesztéses fluoreszcenciavizsgálata során az emittált fény intenzitása a ZON-koncentrációjának függvényében szigmoid (logisztikus) lefutást mutatott. Az illesztett szigmoid görbe alapján autofluoreszcencia mérése esetén a kimutatási határt 11,5 µg/ml-ben állapítottuk meg. Ez a mikotoxin mérésének gyakorlati alkalmazásához túl magas érték, ezért volt szükség az ELFIA rendszer fejlesztésére.

A statikus szérumtitrálások eredménye alapján kiválasztott érzékenyebb szérum keresztitralásának eredményei alapján az érzékenyítő ZON-analóg-hordozófehérje-konjugátumot 1 µg/ml koncentrációban, a célvegyületre specifikus szérumot pedig 1:1000 hígítási faktorialkalmaztuk a további mérések során. A pufferoldatban felvett, 0,004 pg/ml – 2 µg/ml közötti ZON-koncentrációjú kalibrációs pontokra illesztett görbe alapján abszorbancia detektálása esetén a módszer kimutatási határa 0,25 ng/ml, mely a hasonló, kromofórként 1,2-fenilén-diamin-hidrokloridot alkalmazó kolorimetriás ELISA kimutatási határánál 3,4-szer alacsonyabb. Ugyanezen mérés kimutatási határa fluoreszcencia detektálása esetén 0,09 ng/ml, így fluoreszcencia detektálása esetén a módszer 2,8-szor érzékenyebbnek bizonyult.

A keresztreaktivitási vizsgálatokba bevont rokon szerkezetű vegyületek (α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanon, α -zearalanol és β -zearalanol) közül a legmagasabb relatív keresztreaktivitást (CR%) mindkét detektálási módszernél a zearalanon esetében mértük (abszorbanciánál $25,7 \pm 3,6$, fluoreszcenciánál $26,7 \pm 3,4$ CR%-ot), melytől nem sokkal maradt el a β -zearalenol. A legalacsonyabb relatív keresztreaktivitást a β -zearalanol eredményezte (abszorbanciánál $1,1 \pm 0,2$, fluoreszcenciánál $0,9 \pm 0,1$ CR%-ot). Az eredmények alapján az antitestek érzékenységét növeli, ha telítetlen kötés található a rezorcilakton-szerkezetben, a hidroxilcsoport térállása befolyásolhatja az antigénfelismerési folyamatot, valamint az antitestek affinitása a hidroxiszármazék metabolitokhoz alacsonyabb.

A mátrixhatásvizsgálatokhoz felszínivízmintában felvett kalibrációs pontokra illesztett görbék IC_{50} értékei és a pufferben felvett görbe IC_{50} értéke között statisztikai eltérést nem találtunk ($p > 0,05$).

A *glyphosate* mennyiségi meghatározására fejlesztett ELFIA módszerünk során a specifikus antitestek a lemez felszínén rögzített, hordozófehérjéhez kapcsolt módosított szerkezetű molekulához (*glyphosate*-haptén) mutatnak erős affinitást, ezért a mérni kívánt *glyphosate*-molekulákat a hapténmolekulához hasonló szerkezetre alakítottuk a mérést megelőző egylépéses (N-acilezés) származékképzés során. A módszer az antitestek szelektivitása szempontjából megfelelőnek bizonyult.

A pufferoldatban felvett, 0–400 ng/ml közötti *glyphosate*-koncentrációjú pontokra illesztett görbe alapján a fejlesztett módszer kimutatási határa abszorbancia detektálása esetén 0,22 ng/ml. Ugyanezen mérés kimutatási határa fluoreszcencia detektálása esetén 0,09 ng/ml, így a módszerrel fluoreszcencia detektálása esetén 2,4-szer alacsonyabb kimutatási határt tudunk elérni.

A keresztreaktivitási vizsgálatokba bevont AMPA, N-(foszfono-metil)-imino-diecetsav, imino-diecetsav, glicin, N-acetil-glicin és szarkozin közül a legmagasabb értéket az N-(foszfono-metil)-imino-diecetsav érte el, melynél a rendszer 1650 ng/ml névleges koncentráció esetén 0,89 ng/ml-t mutatott ki, így a kiváltott keresztreakció értéke 0,018 CR%. Az eredmények alapján a szerkezetileg hasonló vegyületek csak olyan extrém magas koncentrációban befolyásolták a méréseket, melyek környezeti szempontból nem minősülnek relevánsnak. A foszfátion megzavarhatja a *glyphosate* meghatározását felszíni vízből, talajból, élelmiszerből vagy növényi szövetekből. Eredményeink alapján a módszerben a keresztreaktivitás nagyon alacsony, de előfordulhatnak olyan esetek, amikor szükséges számolni vele.

A mátrixhatásvizsgálatot felszínivízmintákon, valamint talaj- és növényi szövetmintákon is elvégeztük. A különböző mintákban felvett kalibrációs görbék IC_{50} értékeit a ZON ELFIA módszeréhez (lásd fent) hasonlóan az azonos koncentrációkban pufferoldatban felvett kalibrációs görbe IC_{50} értékéhez hasonlítottuk. A pufferben végzett teszt IC_{50} értéke $12,5 \pm 0,4$ 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 ($p > 0,05$).

Talajminta mérésénél kismértékű mátrixhatást tapasztaltunk, azonban a statisztikailag szignifikáns eltérés 1:100 arányú hígítás esetén már nem mutatkozott ($p > 0,05$). Növényi szövetminták esetében a mátrixhatás 1:10 arányú hígítással kiküszöbölhető volt, ebben az esetben a levélkivonat és a gyökérkivonat IC_{50} értéke $12,5 \pm 0,3$ ng/ml és $11,8 \pm 0,3$ ng/ml volt, melyek a pufferben felvett kalibrációs görbe IC_{50} értékétől ($12,5 \pm 0,4$ ng/ml) statisztikailag nem tértek el ($p > 0,05$).

Módosított receptorgátlási ELISA rendszereinkben a *glyphosate* által az $\alpha V\beta 3$ integrin–RGD szekvencia kötődésre gyakorolt teljes gátlást az AMPA is elérte, IC_{50} értéke pedig alacsonyabb volt ($0,46 \pm 0,08$ és $0,14 \pm 0,02$ mg/ml). Ezen a rendszeren a szerkezeti analógok mindegyike fejtett ki gátló hatást, de a legerősebb N-acetil-glicin sem érte el az 50%-ot 22 mM koncentrációig. Az $\alpha V\beta 3$ -integrin–vitronektin-kötődésre a *glyphosate* gátló hatása nagyobb mértékben, míg az AMPA hatása csak kisebb mértékben gyengült az RGD szekvencián tapasztalt gátláshoz képest: 22 mM (2,44 mg/ml) koncentrációnál $44,8 \pm 3,6\%$, valamint $75,3 \pm 2,1\%$ 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) volt. A további gátlószerek közül az N-acetil-*glyphosate*, az N-acetil-glicin, valamint az imino-diecetsav hatása az RGD-alapú rendszerhez viszonyítva erősödött.

A $\alpha V\beta 3$ -ra nézve legerősebb gátló hatású *glyphosate* az $\alpha V\beta 3$ –SARS-CoV-2 tüskefehérje kötődésre a legmagasabb koncentrációnál is csak $35,6 \pm 4,4\%$ -os gátló hatást ért el, ezért a tüskefehérjét más rendszerekben nem alkalmaztuk érzékenyítőként.

Az $\alpha 5\beta 1$ –RGD szekvencia kötődésre a szerkezeti analógok mindegyike fejtett ki bizonyos mértékű gátló hatást, az N-acetil-glicin pedig teljes gátlást ért el 22 mM (2,58 mg/ml) koncentrációnál, IC_{50} értéke $5,8 \pm 0,9$ mM ($0,68 \pm 0,11$) mg/ml volt. A *glyphosate* hatása 3,7-szer, az AMPA hatása pedig 17,5-ször volt alacsonyabb az $\alpha 5\beta 1$ –RGD szekvencia kötődésre, mint az $\alpha V\beta 3$ –RGD kötődésre.

A vizsgált vegyületek közül kizárólag a *glyphosate* gyakorolt gátló hatást az $\alpha IIb\beta 3$ fibrinogénhez való kötődésére, a legmagasabb koncentrációnál 22 mM (3,72 mg/ml) mindössze $40,2 \pm 2,6\%$ -os gátlást eredményezve. A további vegyületek egyike sem gyakorolt gátló hatást a rendszerre, emellett az AMPA és az N-acetil-glicin aktivációs hatást fejtett ki.

A vizsgálatok részletes eredményei az 1. táblázatban találhatóak.

1. táblázat: A vizsgált vegyületek (*glyphosate* és szerkezeti analógjai) IC₅₀ értéke, és az általuk elért legmagasabb gátlás integrineken

ELISA	IC ₅₀ érték (mg/ml és mM) ¹ (elért maximális gátlás %)			
Integrin Felszínre kötött reagens	αVβ3 RGD	αVβ3 vitronektin	α5β1 RGD	αIIbβ3 fibrinogén
Gátlószer				
<i>glyphosate</i>	0,46±0,08 2,7±0,5 (100,0±3,9%)	>3,72 >22 (44,8±3,6%)	1,64±0,54 9,7±3,2 (85,7±2,1%)	>3,72 >22 (40,2±2,6%)
amino-metil-foszfonsav (AMPA)	0,14±0,02 1,3±0,2 (95,9±2,2%)	0,17±0,04 1,5±0,4 (75,3±2,1%)	>2,44 >22 (44,8±2,6%)	>2,44 >22 (aktiváció) ²
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.) ³
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%)	1,08±0,12 9,2±1,0 (58,5±0,8%)	0,68±0,11 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%)	1,53±0,20 11,5±1,5 (52,4±4,2%)	>2,93 >22 (8,0±2,0%)	>2,93 >22 (n.d.)

¹Az IC₅₀ érték az a koncentráció, ahol a vizsgált anyag elérte teljes gátlási hatásának 50%-át. ²Aktiváció esetén gátlás helyett erősítő hatást találtunk, mely a negatív kontrollnál magasabb abszorbanciajelben mutatkozott meg.

³Nem detektáltunk hatást.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. ELFIA módszerfejlesztés ZON mikotoxin mennyiségi meghatározására. Az Aquafluosense projekt keretein belül sikeresen fejlesztésre került egy moduláris műszerrendszer, mely bizonyos vízminőségi paraméterek fluoreszcenciaalapú meghatározására alkalmas. A kifejlesztett, immobilizált ZON-analóg antigéneken alapuló, versengő ELFIA módszerrel a ZON mennyiségi meghatározása során az analitikai jel fluoreszcenciás mérése a módszer érzékenységének növekedését eredményezte, így 2,8-szor alacsonyabb kimutatási határt tudtunk elérni, mint kolorimetriás meghatározással. A kimutatási határ 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 kimutatási határt 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) immunszenzoros eljárással is validáltuk. Bár a szenzortechnológia egy nagyságrenddel alacsonyabb kimutatási határt adott fejlesztett immunfluoreszcenciás módszerünkénél, az utóbbi nagy előnye az *in situ* körülmények közötti mérés lehetősége a fejlesztett mérőmodul-prototípus segítségével, valamint a 96-lyukű mikrotiterlemez használata a mérések során, melynek alkalmazása egyszerre 25 minta három párhuzamos mérésben történő meghatározását teszi lehetővé hét pontra illesztett kalibrációs görbéhez viszonyítva. A mátrixhatásvizsgálatok eredményei alapján a fejlesztett módszer alkalmas hígíthatlan felszínivízminták ZON-tartalmának mennyiségi meghatározására 0–400 ng/ml koncentrációtartományban.

2. ELFIA módszerfejlesztés *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyag mennyiségi meghatározására. A munkánk során kifejlesztett, immobilizált *glyphosate*-analóg antigéneken alapuló, versengő ELFIA szintén az Aquafluosense projekt keretein belül fejlesztett módszer- és műszercsalád alkalmazási lehetőségét képviseli. A módszerben az analitikai jel fluoreszcenciás mérése révén elért kimutatási határ (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 fluoreszcencia detektálása által elért kimutatási határ lehetővé teszi a *glyphosate* 0,1 ng/ml koncentrációjának meghatározását, mely ivóvízben az egyedi növényvédőszer-maradékokra a legmagasabb engedélyezett szint az Európai Unió területén. A fejlesztett *immunoassay* a célvegyület *in situ* körülmények melletti, költséghatékony kimutatását teszi lehetővé, alacsony kimutatási határral és nagy érzékenységgel. A 96-lyukú mikrotiterlemez alkalmazása a ZON mérésére fejlesztett *immunoassay*-hez hasonlóan egyszerre 25 minta párhuzamos mérését teszi lehetővé. A fejlesztett módszer alkalmas hígítatlan felszínivízminták *glyphosate*-tartalmának mennyiségi meghatározására 0–100 ng/ml koncentrációtartományban hígítatlan vízmintákban, valamint növényi szövet- és talajmintákban 1:10 és 1:100 arányú hígítás esetén. A kifejlesztett új moduláris műszerrendszer és két ELFIA módszerünk legnagyobb előnye az, hogy ezek révén több vízszennyező egyidejű meghatározása is lehetséges.

3. Módosított receptorgátlási ELISA. A receptorgátlási tesztek során a gyomirtószer-hatóanyag *glyphosate* általunk elsőként megállapított, $\alpha\beta 3$ -integrinre gyakorolt gátló hatását vizsgáltuk kiszélesített körben, melyhez két további RGD-szekvenciát felismerő integrint, illetve a hatóanyag rokon vegyületeit és bomlástermékeit vontuk be. A heterológ fázisú receptorkötési *immunoassay* formátumban elvégzett gátlási tesztek eredményei alapján levont következtetéseink: a korábban meghatározott teljes gátláshoz, tehát az $\alpha\beta 3$ -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 $\alpha\beta 3$ kötődését az RGD-szekvenciához, valamint az N-acetil-glicin szintén teljes mértékben gátolta az $\alpha 5\beta 1$ kötődését az RGD-tartalmú szintetikus polimerhez. A *glyphosate* néhány bomlásterméke csak részleges gátlást okozott (8,0–58,5%), míg a többi vegyület gátlási képessége elhanyagolhatóan bizonyult. Az AMPA az $\alpha\beta 3$ RGD-hez való kötődésének teljes gátlása ($95,9 \pm 2,2\%$), valamint az $\alpha\beta 3$ vitronektinhez való kötődésének erős gátlása ($75,3 \pm 2,1\%$) mellett az $\alpha I I \beta 3$ kötődését az ECM-fehérje fibrinogénhez egyenesen erősítette, melynek magyarázata lehet a 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, ugyanakkor az $\alpha\text{IIb}\beta3$ kötődésére erős aktiváló hatást gyakorolt. A *glyphosate* és az elsődleges bomlástermék AMPA gátló hatása tehát specifikusnak tűnik $\alpha\beta3$ -integrinre nézve, melynek kulcsszerepe van a véredényképződés folyamatának szabályozásában, például tumornövekedés során. A gátláshoz feltételezhetően szükség van a foszfono-metil-csoport jelenlétére.

5. 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 pedig 0,09 ng/ml. A mérési tartomány felső határa 400 ng/ml. Keresztreaktivitási vizsgálatokat α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanon, α -zearalanol és β -zearalanol származékokon végeztünk, melyek közül a legalacsonyabb keresztreaktivitást a β -zearalanol ($1,1 \pm 0,2$ CR%), legmagasabbat pedig a zearalanon ($26,7 \pm 3,4$ CR%) mutatta a vizsgálatban alkalmazott célvegyületspecifikus 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 határértéke 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 a célvegyületspecifikus 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 $\alpha\beta3$ -, $\alpha5\beta1$ - és

α I**II** β 3-integrinen. Kémiai szerkezetükben analóg rokon vegyületek vizsgálatával kimutattuk, hogy az α v **β** 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 α 5 **β** 1-integrin esetén, az N-acetil-glicin pedig teljes gátlást ért el. Az α I**II** β 3-integrin fibrinogénhez való kötődésére kizárólag a *glyphosate* gyakorolt gátló hatást, míg az AMPA és az N-acetil-glicin esetében aktivációt detektáltunk.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Morse, E.M., Brahme, N.N., Calderwood, D.A. (2014). Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*, **53**, 810–820.
- Russell, R., Paterson, M. (2007). Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*. *Mycol. Prog.*, **6**, 109-113.
- Schaffner, P., Dard, M.M. (2003). Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 119–132.
- Székács, A., Darvas, B. (2018). Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.*, **6**: 78.
- 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.
- 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.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Folyóiratcikkek

a) Szakcikkek hatástényezővel (IF) rendelkező folyóiratokban

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. Reports*, **8**: 17401. (D1: IF 4.525, doi: 10.1038/s41598-018-36081-0)

Nabok, A., Al-Jawdah, A. M., **Gemes, B.**, Takács, E., Székács, A. (2021) An optical planar waveguide-based immunosensors for determination of *Fusarium* mycotoxin zearalenone. *Toxins*, **13** (2): 89. (Q1, IF: 5.071, doi: 10.3390/toxins13020089)

Gemes, B., Takács, E., Gádoros, P., Barócsi, A., Kocsányi, L., Lenk, S., Csákányi, A., Kautny, Sz., Domján, L., Szarvas, G., Adányi, N., Nabok, A., Mörtl, M., Székács, A. (2021) Development of an immunofluorescence assay module for determination of the mycotoxin zearalenone in water. *Toxins*, **13** (3), 182. (Q1, IF: 5.071, doi: 10.3390/toxins13030182)

Takács, E., **Gemes, B.**, Szendrei, F., Keszei, Cs., Barócsi, A., Lenk, S., Domján, L., Mörtl, M., Székács, A. (2022) Utilization of a novel immunofluorescence instrument prototype for the determination of the herbicide glyphosate. *Molecules*, **27** (19): 6514. (Q1, IF 4.710, doi: 10.3390/molecules27196514)

Gemes, B., Takács, E., Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2022) Comparative assessment of the inhibitory potential of the herbicide glyphosate and its structural analogs on RGD-specific integrins using enzyme-linked immunosorbent assays. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (20): 12425. (D1, IF 5.600, doi: 10.3390/ijms232012425)

b) Szakcikkek hatástényezővel (IF) nem rendelkező (lektorált) folyóiratokban

Takács, E., **Gemes, B.**, Szendrei, F., Keszei, Cs., Barócsi, A., Lenk, S., Domján, L., Mörtl, M., Klátyik, Sz., Székács, A. (2022). Enzimjelzéses fluoreszcens immunanalitikai módszer a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag kimutatására felszíni vízben. *Ökotoxikológia*, **4** (3-4), 48-53.

Gemes, B., Takács, E., Székács, I., Farkas, E., Horváth, R., Klátyik, Sz., Székács, A. (2022). A *glyphosate* és szerkezeti analógjai antagonist hatásainak vizsgálata RGD-specifikus integrinokkal. *Ökotoxikológia*, **4** (3-4), 61-66.

Gemes, B., Klátyik, Sz., Oláh, M., Takács, E., Gyurcsó, G., Krifaton, Cs., Székács, A. (2022). Összegző áttekintés a *glyphosate* biokémiai és ökotoxikológiai hatásainak kimutatására végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatainkról. *Ökotoxikológia*, **4** (3-4), 67-74.

c) *Egyéb szakmai (nem lektorált) folyóiratcikkek*

2. Konferenciakiadványok

a) *Magyar nyelvű (teljes)*

b) *Magyar nyelvű (absztrakt)*

Gémes, B., Takács, E., Barócsi, A., Kocsányi, L., Domján, L., Szarvas, G., Nabok, A., Székács, A. (2020). Felszíni vizek zearalenone-tartalmának meghatározása immunfluoreszcencia és teljes belső visszaverődéses ellipszometria alapú módszerekkel. *Ökotoxikológia*, **2** (2), p. 12.

Gémes, B., Takács, E., Székács, I., Horváth, R., Székács, A. (2023). A glyphosate és szerkezeti analógjai gátló hatásának vizsgálata RGD-specifikus integrineken ELISA módszer alkalmazásával. *Ökotoxikológia*, **5** (3-4), pp. 60-61.

c) *Idegen nyelvű (teljes)*

Gémes, B., Takács, E., Barócsi, A., Kocsányi, L., Domján, L., Szarvas, G., Nabok, A., Székács, A. (2020). Determination of the mycotoxin zearalenone in water by immunofluorescence and total internal reflection ellipsometry methods. In: Alapi, T., Berkecz, R., Ilisz, I. (Szerk.): *Proceedings of the 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. 142-146. pp.

Gémes, B., Takács, E., Nabok, A., Mörtl, M., Székács, A. (2021). Development of an Immunofluorescence Assay Module for Determination of several agricultural pollutants in water. In: Jakab, G., Csengeri, E. (Szerk.): *Minden csepp számít: IV. Víz tudományi nemzetközi konferencia = Every drop counts: IVth International Conference on Water Science*. 4-9. pp.

Gémes, B., Takács, E., Székács, I., Farkas, E., Horváth, R., Klátyik, Sz., Székács, A. (2022). A newly identified specific biological activity of glyphosate – inhibition of RGD-binding integrins. In: Alapi, T., Berkecz, R., Ilisz, I. (Szerk.): *Proceedings of the 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. 147-151. pp.

Gémes, B., Klátyik, Sz., Oláh, M., Takács, E., Krifaton, Cs., Székács, A. (2022). *In vivo* and *in vitro* tests for the detection of biochemical and ecotoxicological effects of the herbicide active ingredient glyphosate. In: Alapi, T., Berkecz, R., Ilisz, I. (Szerk.): *Proceedings of the 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. 152-156. pp.

Takács, E., **Gémes, B.**, Szendrei, F., Keszei, Cs., Barócsi, A., Lenk, S., Domján, L., Mörtl, M., Klátyik, Sz., Székács, A (2022). Enzyme-linked fluorescent immunoassay for monitoring the herbicide active ingredient glyphosate in water. In: Alapi, T., Berkecz, R., Ilisz, I. (Szerk.): *Proceedings of the 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*. 350-354. pp.

d) *Idegen nyelvű (absztrakt)*

Adányi, N., Berki, M., Kónya, É., Klátyik, Sz., Lázár, D., **Gémes, B.**, Csősz, D., Lenk, S., Barócsi, A., Csőke, L. T., Csákányi, A., Domján, L., Szarvas, G., Kocsányi, L., Székács, A. (2019) Fluorescence instrumentation for rapid, in situ water quality assessment. *11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2019)* (Athens, Greece, Sep 26-29, 2019) OP30, p. 151.

Gémes, B., Takács, E., Nabok, A., Mörtl, M., Székács, A. (2021). Development of an Immunofluorescence Assay Module for Determination of several agricultural pollutants in water. In: Jakab, G., Csengeri, E. (Szerk.): *Minden csepp számít: IV. Víz tudományi nemzetközi konferencia*. = *Every drop counts: IVth International Conference on Water Science*. Abstract volume/Absztrakt kötet. 5. p.