

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésmérnöki Kar**

**ENZIMJELZÉSES IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK
FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA FENOXIKARB ÉS
ATRAZIN NÖVÉNYVÉDŐSZER-HATÓANYAGOK
KIMUTATÁSÁRA**

Doktori értekezés tézisei

Le Thi My Hong

Témavezető: Dr. Székács András
az MTA doktora

Konzulens: Prof. László Elemér
az MTA doktora

**Magyar Tudományos Akadémia
Növényvédelmi Kutatóintézete**

Budapest

2003

BEVEZETÉS

Doktori kutatómunkám alapvetően két fő irányba különíthető el: részint új, *de novo* enzimjelzéses immunoassay (ELISA) módszerek fejlesztése és jellemzése, részint pedig már kifejlesztett, a kereskedelmi forgalomból vagy máshonnan elérhető ELISA rendszerek alkalmazása különböző vizsgálatokban. Bár klasszikus értelemben az előbbi irány nevezhető módszerfejlesztésnek, analitikai fejlesztési feladatokat – ha az előbbinél kisebb mértékben is – a forgalmazott ELISA rendszerek alkalmazása is hozott.

Az első irányban új immunanalitikai módszer fejlesztésében a PhD munkám részét képező vizsgálatok egyrészt a fenoxikarb nevű rovar-növekedésszabályozó rovarellenes (inszekticid) hatóanyag kimutatására szolgáló ELISA rendszer fejlesztése, részint pedig a – doktori dolgozatomban nem ismertetett – poliaromás szénhidrogén vegyületcsalád, azon belül is elsősorban a pirén kimutatására szolgáló ELISA rendszer fejlesztése voltak. Mindkét fejlesztés jelentős részben külföldi együttműködésben zajlott, így a fenoxikarb kimutatására szolgáló ELISA rendszer kifejlesztését a Kaliforniai Egyetem Rovartani Tanszékével (*Department of Entomology, University of California*), míg a pirén kimutatására kidolgozott ELISA rendszer fejlesztését a Münchener Műszaki Egyetem Vízkémiai és Kémiai Balneológiai Intézetével (*Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Technische Universität München*) közösen, együttműködésben végeztük.

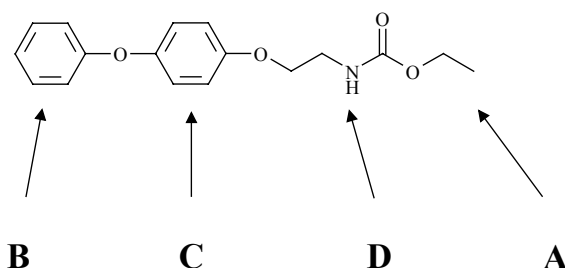
Munkám másik nagyobb részében mások által kidolgozott ELISA rendszereket alkalmaztam. Ennek elsődleges és legjelentősebb része a triazin típusú gyomirtó szerek (herbicidek), elsősorban is az atrazin kimutatására szolgáló kereskedelmi ELISA rendszer (ImmunoSystems – Millipore) alkalmazása volt magyarországi talaj- illetve vízminták atrazintartalmának meghatározására, de ide tartozott a kaptán gombaölő szer (fungicid) kimutatására szolgáló mágneses részecsekehordozós ELISA rendszer – doktori dolgozatomban szintén nem ismertetett – alkalmazása is.

A doktori kutatómunka során foglalkoztam más, korábban fejlesztett ELISA rendszerek alkalmazásával is, így összehasonlító vizsgálatokat végeztem bizonyos triazol fungicidek kimutatására fejlesztett ELISA módszerek, pl. a miklobutanil kimutatására az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében, valamint más triazol fungicidek (tetrakonazol, penkonazol) kimutatására az Milánói Tudományegyetem (*Università degli Studi di Milano*) kutatócsoportja által fejlesztett ELISA módszerek felhasználásával. A doktori disszertációval szemben támasztott tartalmi és terjedelmi követelményekre való tekintettel a dolgozatban csak a két fent említett részterületre, s ezeken belül is a fenoxikarb és az atrazin növényvédő szer hatóanyagok kimutatására szolgáló ELISA rendszerek fejlesztésére, illetve alkalmazására térek ki.

1. ELISA rendszer fejlesztése a fenoxikarb rovar-növekedésszabályozó kimutatására

A célvegyület: A korszerű rovarellenes szerek csoportjának tagjai a rovar-növekedésszabályozó vegyületek, melyek a rovarok normális egyedfejlődését (tehát "növekedését") befolyásolják, elsősorban is a teljes átalakulást irányító hormonok működésének megzavarásával. E szelektív hatóanyagok egyike a fenoxikarb, amely a rovar juvenilhormonokhoz hasonló kémiai szerkezetű, így megzavarja a rovarok specifikus metamorfotikus folyamatait, és 5-10 g hatóanyag/ha dózisban alkalmazva több Lepidoptera és araszoló rovar ellen hatékony. A hatóanyag hormonhatásával gátolja a rovar átalakulását felnőtt (imágó) fázisba, a korai lárvastádiumokban zavarja a vedlést, és megakadályozza hogy a rovar a petéből kikeljen. Részben a hormonális hatások, részben fiziko-kémiai tulajdonságai miatt behatóan tanulmányozták a fenoxikarb szerepét az ökoszisztémákban, valamint a nem célzott szervezetekre gyakorolt hatásait. Bár a fenoxikarb a hagyományos növényvédő szereknél lényegesen szelektívebb, és a mezőgazdasági gyakorlatra engedélyezett dózisokban alkalmazva bizonyítottan nem okoz kártékony hatást pl. kérődzőkön, bizonyos hasznos és nem célzott rovarokra mérgező. Példa erre a selyemhernyó (*Bombyx mori*), ahol kimutatták, hogy ún. "szövésgátló" (*nonspinning*) szindrómát és ennek következtében gazdasági veszteségeket okoz, de a hatóanyag toxikus vízi ökoszisztémákra, vízi gerinctelen élőlényekre és a halakra is. Emiatt, valamint lassú lebomlása – tehát potenciális környezeti perzisztenciája – miatt egyes alkalmazásaival kapcsolatban ökotoxikológiai gondok merültek fel, ami miatt szükséges, hogy a hatóanyag kimutatására és monitorozására hatékony (pl. immunanalitikai) módszerekkel rendelkezünk.

Hapténszintézis és -konjugálás: A fenoxikarb molekula alapszerkezetében alapvetően négyféle stratégia szerinti módosításokkal hapténmolekulák (1. ábra) készültek az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében és a Kaliforniai Egyetem Rovartani Tanszékén. Ezen hapténmolekulákból fehérjekonjugátumokat állítottunk elő, melyeket részint szérumból kinyerésére immunogénként használtunk, részint érzékenyítő antigénként alkalmaztam ELISA rendszerekben.



1. ábra A fenoxikarb rovar-növekedésszabályozó hapténszármazékainak szintézisstratégiái: A: a karbamátrész *O*-etil-csoportjának karboxi-alkil-csoporttal való helyettesítése, B, C: a molekulavégi és a középső benzolgyűrűn nitrálással és redukcióval kialakított anilincsoport, D: karboxi-alkil-csoporttal való helyettesítés a karbamátrész *N*-atomján.

Az anilin típusú hapténmolekulák a fehérjekonjugátumokba azokötéssel kapcsolódnak, amit az azovegyületek jellegzetes UV-spektrális tulajdonságai révén

ellenőrizhetünk. Hogy megállapíthassuk, hogy a fenti anilin haptének milyen mértékben épülnek be a fehérjekonjugátumokba, a konjugálást három – a hapténekhez hasonló kémiai szerkezetű – kromofór anilin valamint a 4-krezol között is elvégeztem, az anilin hapténekből nyert diazóniumsók és a fehérjék tirozincsoportjai közötti azokapcsolás modellezése érdekében. A kapott azovegyületek maximális elnyelési hullámhosszait, valamint az ezekhez tartozó moláris extinkciós koefficienseket kimértem, majd a fenoxikarb haptén–fehérje konjugátumokban az azorésznek tulajdonítható erős UV-VIS abszorbanciákat használtam fel arra, hogy e konjugátumokban becsüljem a haptén/fehérje arányokat. A hapténkonjugátumok maximális elnyelési UV-hullámhosszain az elnyelés intenzitásából a modellvegyületekre meghatározott ϵ értékek segítségével kiszámítottam a haptének konjugátumbeli moláris koncentrációját, majd ezt az adatot összevettem a hordozófehérje oldatbeli koncentrációjával.

Immunizálás, ELISA optimalizálás: A fenti hapténkonjugátumok ellen nyert antiszérum felhasználásával immobilizált antigén-alapú, versengő gátlási ELISA rendszert alakítottunk ki, s e rendszert analitikai paramétereire (elsősorban a gátlási középértékre (IC_{50}) és a kimutatási határra (LOD) nézve) optimalizáltam. Ezen belül az antiszérumokat titráltam, a gátlási középértékeket különböző módszerparaméterek mellett kimértem, vizsgáltam a közeg pH és egyes szerves oldószerek, valamint különféle blokkolóreagensek hatását a módszer kivitelezhetőségére. Az optimalizált ELISA rendszerben megvizsgáltam 42, a fenoxikarbhoz hasonló vagy vele együtt előforduló vegyület keresztreaktivitását, és a módszert a fenoxikarbra specifikusnak találtam: csak a fenoxikarb közeli szerkezeti analógjai adtak számottevő keresztreakciót.

Gyakorlati alkalmazás: A kidolgozott ELISA módszert számos környezeti és biológiai mintán alkalmaztam a lehetséges mátrixhatások kimutatása céljából. A környezeti minták felszíni vizek és ivóvíz, valamint talajminták, a biológiai minták gyümölcsle és -homogenizátum (alma, körte és szőlő), rovarszövetminták, halmájminták, valamint marha vizelet és vér voltak.

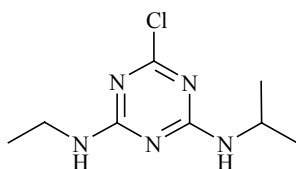
Új tudományos eredmények:

(A) *De novo* ELISA rendszert dolgoztam ki a fenoxikarb rovar-növekedésszabályozó immunanalitikai kimutatására. Ezen belül:

- 1.1. A fenoxikarb haptén intermedierjeit különböző hordozófehérjékhez kapcsoltam. Az anilin típusú haptének kapcsolási reakciójában a hatékonyság igazolására fenoxi-anilin és krezol azokapcsolási reakciójában modellvegyületeket állítottam elő, melyek segítségével igazoltam, hogy a hapténbeépülés jelentősen függ a hordozófehérjétől. A haptén/10 kDa fehérje arány (HD 10kDa) a különböző hordozófehérjékre (BSA, CONA, KLH és OVA) nézve 0,8 – 4,2 tartományban mozgott, a legnagyobb értéket a BSA- és a CONA-konjugátumok mutatták.
- 1.2. A fenoxikarb immunogénként alkalmazott hapténkonjugátjai ellen nyert antiszérumokat rögzített antigén alapú ELISA rendszerben alkalmazva jellemeztem. Megállapítottam, hogy a kidolgozott ELISA rendszerben mérhető szérum-titerértékek 200 és 8000 között mozogtak, és az optimalizált ELISA rendszerben a fenoxikarbbal elérhető gátlási középérték (IC_{50}) $2,7 \pm 1,6$ ng/ml és $1,1 \pm 0,6$ ng/ml különböző konjugátumok alkalmazásával, a kimutatási határ (LOD) pedig 0,2 – 4,6 ng/ml a hapténhomológ rendszerekben, míg a hapténheterológ rendszerekben 0,11 – 0,2 ng/ml értékű volt.
- 1.3. A fenoxikarb kimutatására kidolgozott ELISA rendszerben vizsgáltam 42 lehetséges társzennyező keresztreaktivitását, és megállapítottam, hogy az ELISA rendszer a fenoxikarbra nézve specifikus. Az ELISA rendszert a főbb módszerparaméterekre nézve optimalizáltam. Így pH = 7,4, 0,5%-os (v/v) metanolos pufferben, marhabőr-zselatinnal blokkolva működik a rendszer a legjobban.
- 1.4. A fenoxikarb kimutatására optimalizált ELISA rendszer alkalmazhatóságát megvizsgáltam különféle környezeti és biológiai mintákban. Így a rendszer alkalmazható különböző vizekben (csapvíz, Dunavíz), míg talajminták elemzésére az ELISA rendszer a jelenlegi paramétereivel további előzetes mintatisztítás szükséges. Az optimalizált rendszert sikeresen alkalmaztam rovar-nyiroknedvben (míg zsírtestben és teljestest-homogenizátumban erős mátrixhatást tapasztaltam), állati vizeletben, valamint halmájmintákban, ahol kezelt állatokban a kezelési dózistól függő, emelkedő fenoxikarbtartalmat mutattam ki. Az optimalizált ELISA módszert víz- és gyümölcslemlé minták felhasználásával műszeres (GC-MS) analitikai módszerrel hasonlítottam össze.

2. Kereskedelmi ELISA rendszer alkalmazása atrazin gyomirtó szer kimutatására

A célvegyület: A gyomirtó szerek két legjelentősebb osztálya a fotoszintézis II. fényszakaszának gátlásán alapuló karbamidszármazékok és a szimmetrikus triazinok. E vegyületcsaládok közös tulajdonsága, hogy a kloroplasztiszokban akadályozzák a fotoszintetikus elektronáramlást. A szimmetrikus triazin herbicidek a 2,4-diamino-1,3,5-triazin származékai, melyek viszonylag merev alapvázon (az 1,3,5-triazinvázon) különféle szubsztituensek elhelyezésével nagyszámú származékot ölelnek fel. A 2. helyzetben klórszubsztituált sz-triazinok legnagyobb forgalmú tagja az atrazin (2. ábra), a kukorica szelektív gyomirtó szere, és más, mélyen gyökerező kultúrnövényekben alkalmazható herbicid. (A magyarországi kereskedelemben Aktinit PK néven ismeretes.) Az atrazin talajban – elsősorban anaerob körülmények között – rendkívül lassan lebomló herbicid, amely lassan kioldódva perzisztens vízszennyezőként jelenik meg a környezetben, emiatt Németországban betiltották. Emellett endokrin (hormonális) zavaró hatásai is indokolták, hogy ELISA rendszert (az ImmunoSystems–Millipore EnviroGuard[®] ELISA kitjét) alkalmazzunk e hatóanyag kimutatására.



2. ábra A sz-triazinszármazék atrazin gyomirtó szer hatóanyag kémiai szerkezete. A merev 1,3,5-triazinvázon különféle szubsztituenseket tartalmazó vegyületcsalád számos rokon származékot foglal magában.

Keresztreakció, a módszer alkalmazhatósága: A kereskedelmi ELISA eljárást vizsgáltam atrazin, cianazin és prometrin hatóanyagok kimutatására, és a módszert az atrazin hatóanyagra jelentős mértékben specifikusnak találtam: a rendszer az atrazint a 0,2 – 5 ng/ml tartományban detektálja, de a kimutatási tartomány prometrinre és cianazinra magasabb (2 – 20 ng/ml). Emellett az ELISA módszer felhasználásával vizsgáltam az atrazin lebomlását vízben és talajban. Utóbbi vizsgálathoz a talajminták ELISA vizsgálatát megelőző szerves oldószeres mintaelőkészítését is optimalizáltam, és megállapítottam, hogy a mintaelőkészítéshez a – módszertani és gazdaságossági szempontokból – legkedvezőbb oldószer a metanol.

Gyakorlati alkalmazás: Az ELISA rendszert alkalmaztam felszíni vízminták és szabadföldi talajminták atrazintartalmának vizsgálatához, s e vizsgálatok mindkét mintatípus esetében rámutattak a célvegyület atrazin környezeti perzisztens tulajdonságára.

Új tudományos eredmények:

(B) Kereskedelmi ELISA rendszert alkalmaztam az atrazin gyomirtó szer hatóanyag immunanalitikai kimutatására. Ezen belül:

- 2.1. Igazoltam a triazin herbicidek kimutatására kidolgozott ELISA rendszer alkalmazhatóságát környezeti mintákban. A talajminták mintaelőkészítését optimalizáltam az ELISA vizsgálathoz, optimális extrahálószernek a metanolt találtam. ELISA módszerrel laboratóriumi körülmények között vizsgáltam az atrazin lebomlását vízben és talajban, és azt tapasztaltam, hogy vízben szobahőmérsékleten gyors kezdeti lebomlás (1 µg/ml hatóanyagszint 12 nap alatt az egyötödére csökkent) nem csökken tovább, míg talajban az 1 µg/g kezdeti dózis mind homok- mind csernozjomtalajban 0,35 µg/g szinten állandósul. A vizsgálatok igazolták az atrazin perzisztens jellegét mind vízben, mind talajban.
- 2.2. Intenzív mezőgazdasági művelés alatti (Békés megye) és természetes üdülőövezeti (Fejér megye) területről begyűjtött felszíni víz- és talajmintákban vizsgáltam a kimutatható atrazin mennyiségét. Megállapítottam, hogy a vízmintákban az atrazintartalom mezőgazdasági területen 0,31-0,40 ng/ml, természeti területen 0,08-0,30 ng/ml között mozog. A kísérleti úton kezelt szabadföldi talajmintákban kimutattam, hogy az előző idénybeli atrazinmennyiség – kijuttatási dózistól függően – ijesztően magas hányada (31-64%) megmarad, és mezőgazdasági területekről begyűjtött szabadföldi talajmintákban az előző évi atrazinos kezelés szermaradéka minden esetben kimutatható volt.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ELISA –

enzimjelzések immunassay

IC₅₀ – gátlási középérték (a maximális jelintenzitás 50%-os csökkenését okozó gátlószer-koncentráció)

LOD – kimutatási határ

HD – hapténsűrűség

-tömegspektrometria

BSA – marha szérum albumin

CONA – konalbumin

KLH – hemocianin (kürtöscsigából)

OVA – ovalbumin

GC-MS – gázkromatográfia

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a Varga József Alapítványnak, ezen belül is Prof. Gál Sándornak, hogy számomra doktori ösztöndíjat biztosított.

Köszönöm a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Mezőgazdasági Kémia és Technológiai Tanszékén Prof. László Elemérnek konzulensemnek, hogy doktori iskolájukba felvettek.

Köszönöm a témavezetőmnek, Dr. Székács Andrásnak, az MTA doktorának, aki szakmai irányítással, bátorítással és türelemmel támogatott a PhD. munkám folyamán.

Köszönetet szeretnék mondani valamennyi magyarországi és külföldi kutatóhelyen dolgozó kollegáimnak, akikkel módomból volt együttműködni.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **H.M. Le**; A. Székács; G. Tőkés and B.S. Ferguson (1995) Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical (ELISA) method. *J. Environ. Sci. Health, part B*, **30**, 459-464.
2. F. Szurdoki, A. Székács, **H.M. Le** and B.D. Hammock (2002) Synthesis of haptens and protein conjugates and development of immunoassays for the insect growth regulator fenoxycarb. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 29-40.
3. **H.T.M. Le**; F. Szurdoki and A. Székács (2003) Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples. *Pest Manag. Sci.*, **59**, 410-416.
4. A. Székács; **H.T.M. Le**; F. Szurdoki and B.D. Hammock (2003) Optimization and validation of an enzyme immunoassay for the insect growth regulator fenoxycarb. *Anal. Chim. Acta*, közlésre elfogadva

A PÁLYÁZÓ TELJES PUBLIKÁCIÓS LISTÁJA

Szaccikkék tudományos folyóiratokban:

1. **H.M. Le**; A. Székács; G. Tőkés and B.S. Ferguson (1995) Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical (ELISA) method. *J. Environ. Sci. Health, part B*, **30**, 459-464. (I.F. 1,128)
2. A. Székács; S. Cairoli; **H.M. Le** and S. Pagani (1996) Comparative studies on enzyme-immunoassays (ELISA) for the triazole fungicides tetraconazole and myclobutanil. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, **31**, 293-301. (I.F. 0,050)
3. **H.M. Le**; Gy. Hegedűs and A. Székács (1998) Differential detection of *N*-heterocyclic compounds and their *N*-methylated derivatives by immunoanalysis. *Acta Biologica Hungarica*, **49**, 455-462. (I.F. 0,136)
4. A. Székács; **H.M. Le**; D. Knopp and R. Niessner (1999) A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta*, **399**, 127-134. (I.F. 1,894)
5. F. Szurdoki, A. Székács, **H.M. Le** and B.D. Hammock (2002) Synthesis of haptens and protein conjugates and development of immunoassays for the insect growth regulator fenoxycarb. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 29-40. (I.F. 1,576)
6. V. Krikunova, Gy. Hegedűs, **H.M. Le**, L. Jouravleva, S. Eremin, M. Natangelo, E. Benfenati and A. Székács (2002) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide propanil. *Int. J. Envir. Anal. Chem.*, **82**, nyomtatás alatt. (I.F. 0,797)
7. **H.T.M. Le**; F. Szurdoki and A. Székács (2003) Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples. *Pest Manag. Sci.*, **59**, 410-416. (I.F. 0,642)
8. A. Székács; **H.T.M. Le**; F. Szurdoki and B.D. Hammock (2003) Optimization and validation of an enzyme immunoassay for the insect growth regulator fenoxycarb. *Anal. Chim. Acta*, közlésre elfogadva (I.F. 2,073)

[Σ IF 8,36]

Konferenciaelőadások és poszterek:

1. **H.M. Le**, A. Székács, G. Tőkés and B.S. Ferguson (1995) Detection of atrazine in Hungary by immunoanalytical method. Poster presented at the *5th European Conference on Chemistry and the Environment - "Pesticide Chemistry for Sustainable Agriculture" Outlook fore the 21st Century* (Budapest, Hungary, May 15-18, 1995)
2. **H.M. Le**, G. Tőkés, B.S. Ferguson and A. Székács (1995) Application of an enzyme-immunoassay for environmental monitoring of triazine herbicide residues. Poster presented at the *2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society* (Szeged, Hungary, Aug 21-23, 1995)
3. A. Székács, S. Cairoli, **H.M. Le** and S. Pagani (1995) Comparative studies on enzyme-immunoassays for triazole fungicides, tetraconazole and myclobutanil. Poster presented at the *5th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides* (Paris, France, Sep 6-8, 1995)
4. **H.M. Le**, Gy. Hegedűs and A. Székács (1998) Immunodetection of *N*-heterocyclic compounds. Poster presented at the *4th International Conference on the Role of Formaldehyde in Biological Systems - Methylation and Demethylation Processes* (Budapest, Hungary, Jul 1-4, 1998)
5. A. Székács, **H.M. Le**, D. Knopp and R. Niessner (1998) A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons. Poster presented at *The Immunochemistry Summit VII and the 3rd Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis* (Las Vegas, Dec 1-3, 1998)
6. Gy. Hegedűs, **H.M. Le**, A. Székács, A. Krasnova, S. Eremin, M.-C. Hennion, M. Natangelo and E. Benfenati (1999) Inter-laboratory trials of GC-MS versus immunoanalytical detection of environmental pollutants. Poster presented at *The 9th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography* (Porto, Portugal, Oct 10-13, 1999)
7. Gy. Hegedűs, A. Székács, **H.M. Le**, V. Krikunova, S. Eremin, M. Natangelo and E. Benfenati (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide propanil. Poster presented at *The 4th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry* (Visegrád, Hungary, Sep 14-19, 2000)
8. **H.M. Le**, A. Székács, F. Szurdoki, B.D. Hammock (2002) Optimization and validation of an enzyme immunoassay for the insect growth regulator fenoxycarb. Poster presented at *5th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Techniques in Environmental Analysis*, IAEAC (Ithaca, USA, May 30 - June 4, 2002)