

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΑΠΟ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ:

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΥΤΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

Ε. Χρονοπούλου¹, Αναστάσιος Παπαγεωργίου², Αναστάσιος Μαρκόγλου³, Ν. Λάμπρου¹

¹ Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

² Turku Centre for Biotechnology, University of Turku and Åbo Akademi University, Turku 20521, Finland

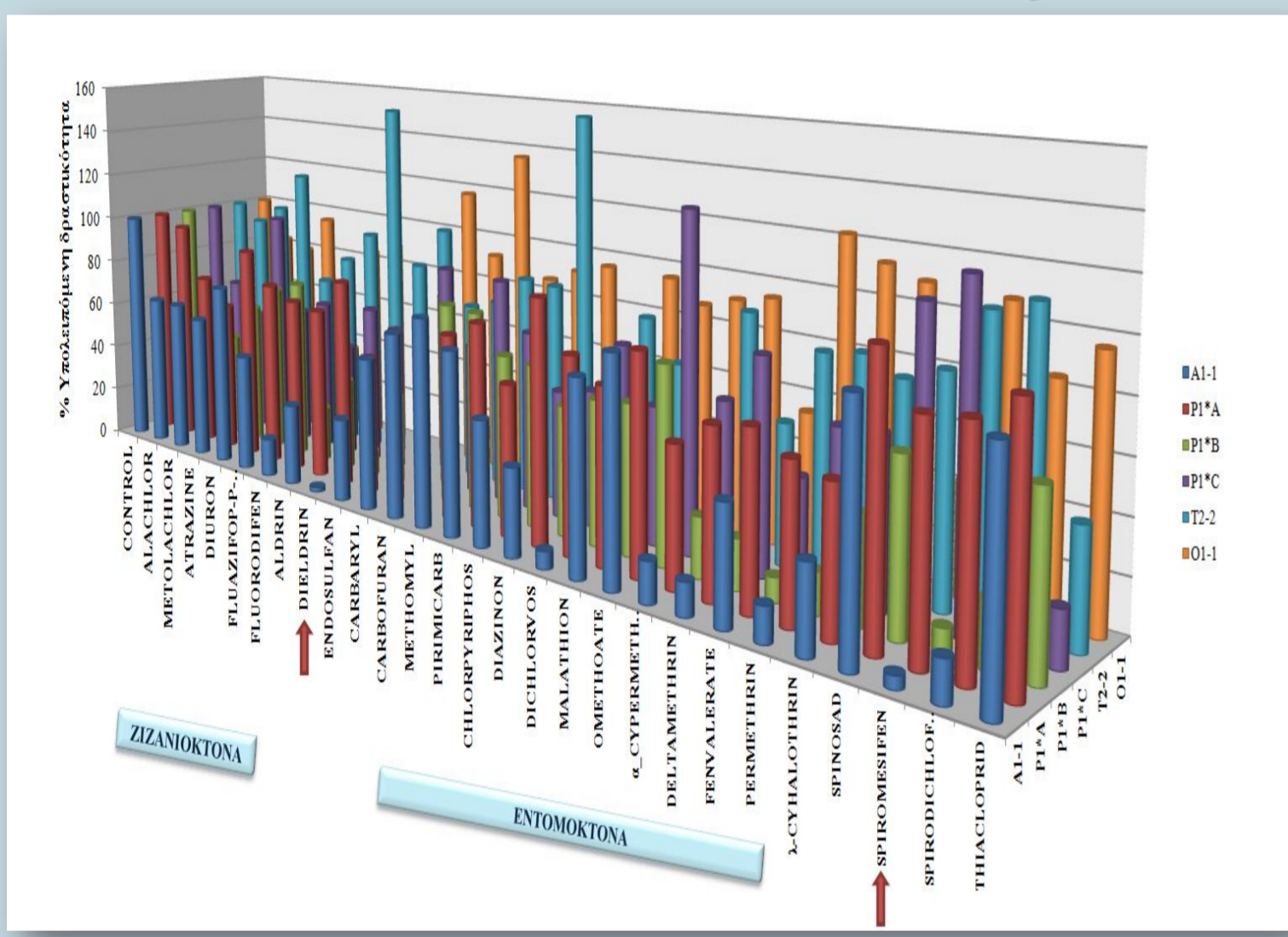
³ Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταφορές της γλουταθειόνης (GSTs, EC 2.5.1.18) εμπλέκονται στη Φάση II της κυτταρικής αποτοξίνωσης από ηλεκτρονιόφιλες υδρόφοβες τοξικές ενώσεις, όπως τα φυτοπροστατευτικά. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται είτε καταλύοντας την χημική συμπύκνωση των ενώσεων αυτών με τη γλουταθειόνη είτε μη-καταλυτικά, δεσμεύοντας τις ενώσεις αυτές με υψηλή συγγένεια με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της καταλυτικής τους δράσης. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη απλής αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα νερού, βασιζόμενη στη χρήση GSTs. Συνεπώς μελετήθηκε η ενζυμική αναστολή ισοενζύμων GSTs από άνθρωπο διαφορετικών κλάσεων [alpha(hGSTA1-1), ρι [hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C]] theta (hGSTT2-2) και omega (hGSTO1-1)], έναντι 27 διαφορετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ισοένζυμα GST από άνθρωπο που ανήκουν στις τάξεις, alpha, theta, omega και ρι κλωνοποιήθηκαν, εκφράστηκαν ετερόλογα σε *E. coli*, και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας. Προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ποσοστιαία (%) αναστολή της καταλυτικής τους δράσης από φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα). Πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση και προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές αναστολής (K_i) και IC_{50} για το ένζυμο hGSTA1-1, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH. *In silico* μοριακή μοντελοποίηση και μοριακός ελλειμενισμός προσδιόρισαν σε μοριακό επίπεδο τη θέση σύνδεσης συγκεκριμένων ενώσεων με το ένζυμο. Επίσης σχεδιάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς και επαναληψιμότητας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών σε δείγματα νερού.



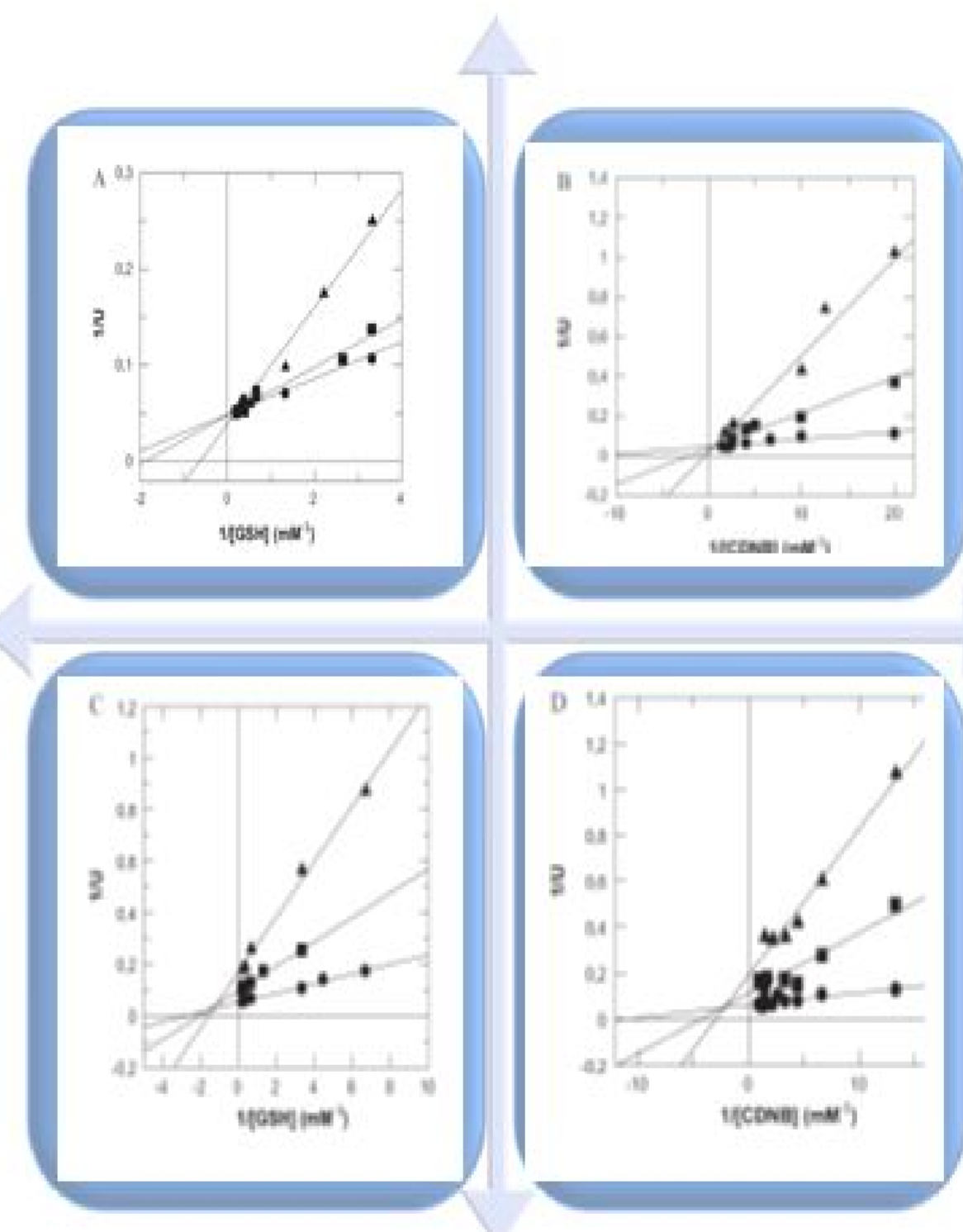
Εικ.1. Φωτομετρικός προσδιορισμός της ποσοστιαίας (%) αναστολής της καταλυτικής δράσης των hGSTA1-1, hGSTP1*A, hGSTP1*B, hGSTP1*C, hGSTT2-2 και hGSTO1-1 έναντι 27 διαφορετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (100 μΜ). Οι μετρήσεις έγιναν με το σύστημα CDNB-GSH.

Το hGSTA1-1 αναστέλλεται περισσότερο ενώ το hGSTO1-1 λιγότερο. Η μεγαλύτερη αναστολή της δραστηριότητας (>95%) σημειώθηκε με τα εντομοκτόνα dieldrin και spiromesifen στο ένζυμο hGSTA1-1, ενώ οι μικρότερες τιμές IC_{50} παρατηρήθηκαν στους 37°C και σε pH 6,5, οι οποίες ήταν 17,9 ± 1,7 μΜ και 12,1 ± 3,4 μΜ αντίστοιχα.

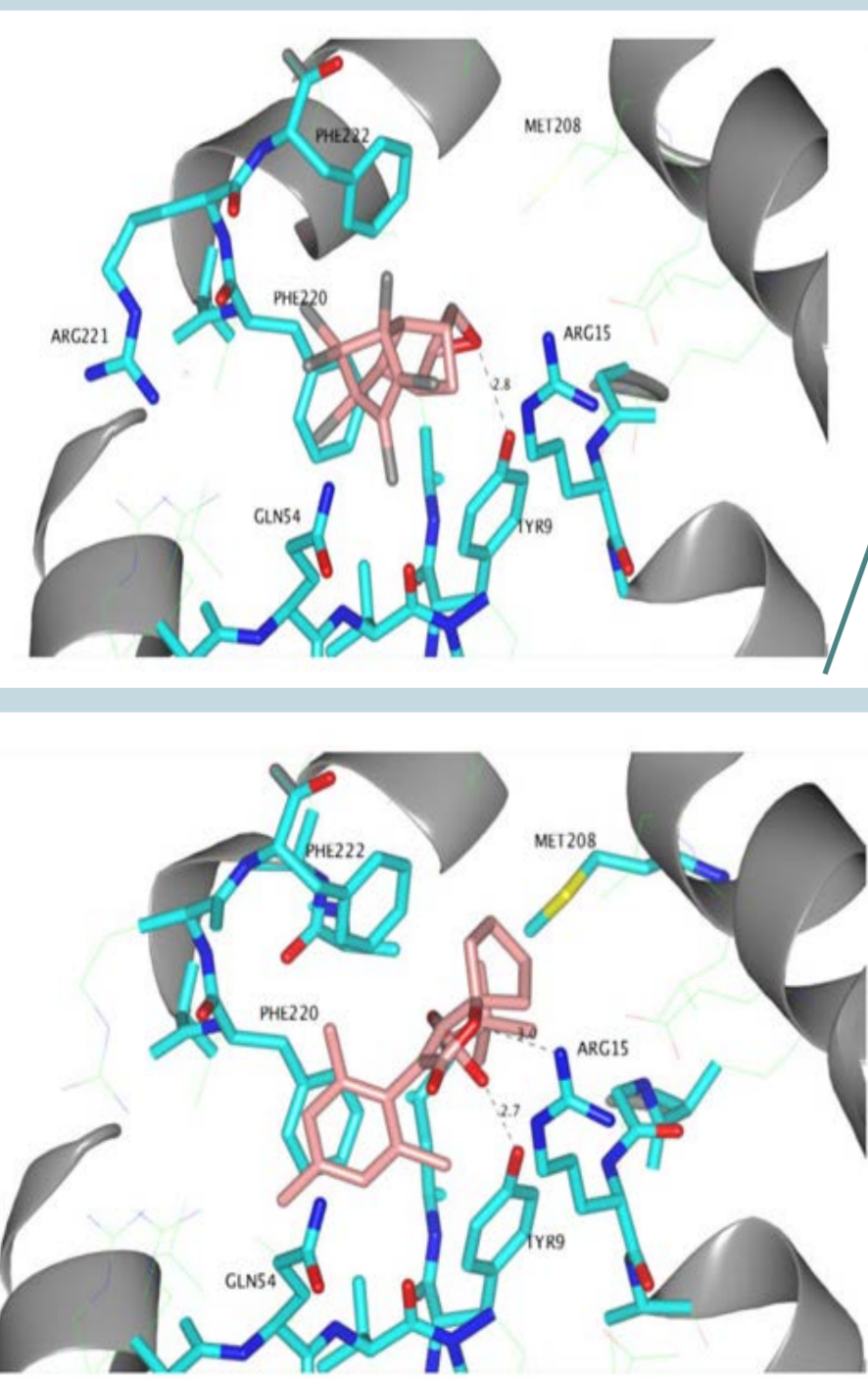
Φυτοπρ/κά προϊόντα	$IC_{50} \pm S.E.M$ at pH 6.5		
	37 °C	25 °C	20 °C
Dieldrin	17.9 ± 1.7 μΜ	34.5 ± 4.5 μΜ	98.3 ± 45.8 μΜ
Spiromesifen	12.1 ± 3.4 μΜ	79.5 ± 9.7 μΜ	24.2 ± 0.9 μΜ

	$IC_{50} \pm S.E.M$ at 37°		
	pH=6,5	pH=7	pH=7,5
Dieldrin	17.9 ± 1.7 μΜ	47.2 ± 3.3 μΜ	50.4 ± 18.1 μΜ
Spiromesifen	12.1 ± 3.4 μΜ	62 ± 12.9 μΜ	29.5 ± 4.3 μΜ

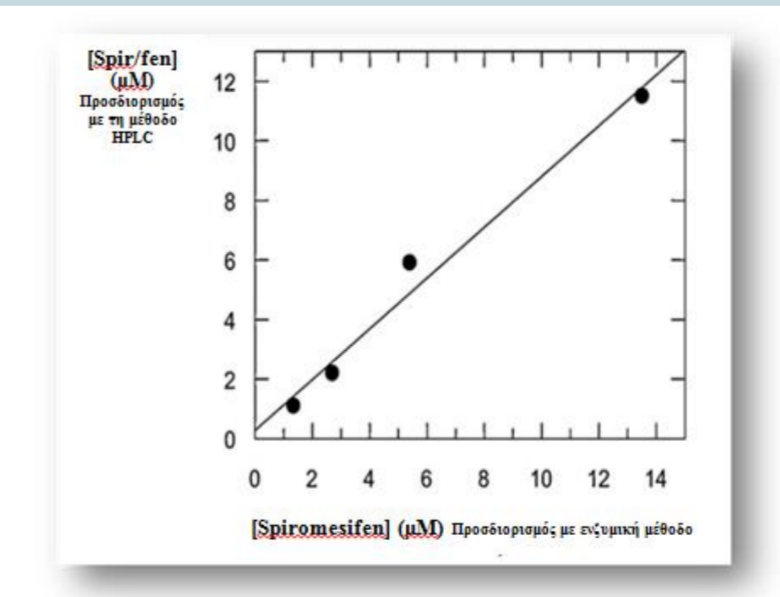
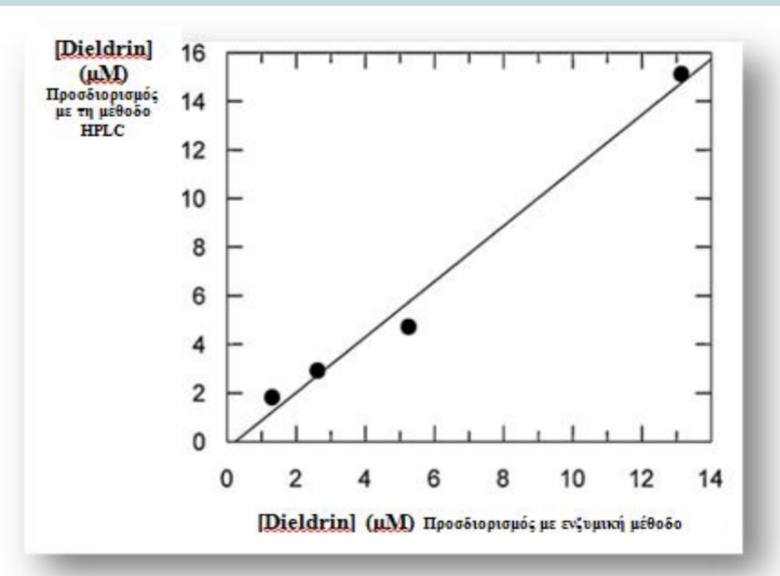
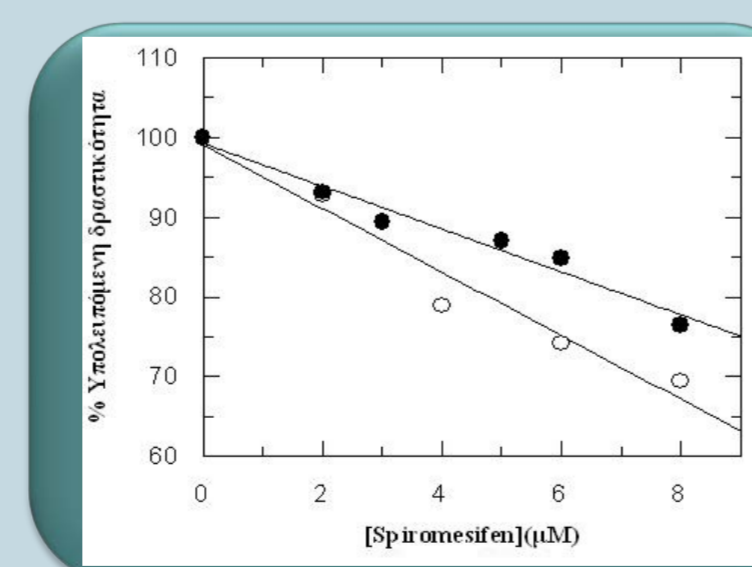
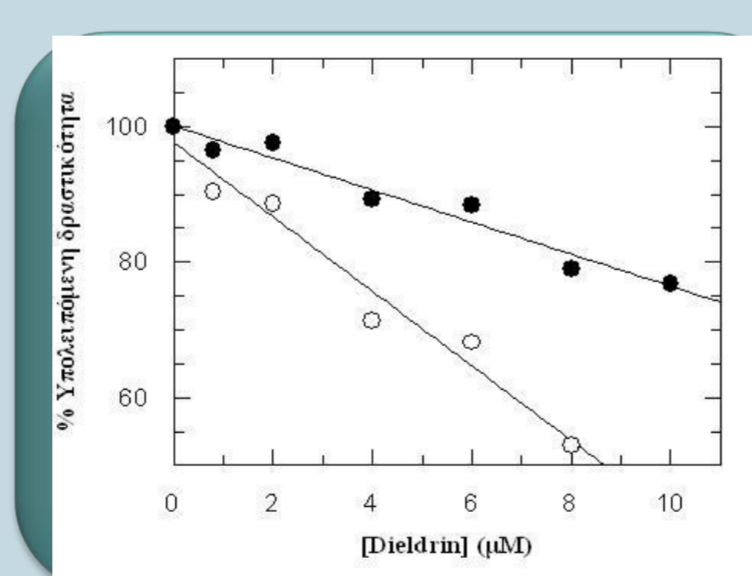
Μικτού τύπου αναστολή



Εικ.2. Κινητική μελέτη αναστολής. (Α) Σχεδιάγραμμα Lineweaver-Burk για την αναστολή του hGSTA1-1 από το dieldrin σε διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH. Control (●), 2 μΜ dieldrin (■), 5 μΜ dieldrin (▲). (Β) Αναστολή του hGSTA1-1 από το dieldrin σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CDNB. Control (●), 2 μΜ dieldrin (■), 4 μΜ dieldrin (▲). (Γ) Αναστολή του hGSTA1-1 από το spiromesifen σε διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH. Control (●), 10 μΜ spiromesifen (■), 15 μΜ spiromesifen (▲). (Δ) Αναστολή του hGSTA1-1 από το spiromesifen σε διαφορετικές συγκεντρώσεις CDNB. Control (●), 10 μΜ spiromesifen (■), 15 μΜ spiromesifen (▲).



Εικ.3. Προβλεπόμενος τρόπος αλληλεπίδρασης του hGSTA1-1 με το dieldrin (πάνω) και το spiromesifen (κάτω).



Εικ. 4. Πρότυπες καμπύλες συγκεντρώσεων του dieldrin και του spiromesifen σε πόσιμο (○) και εμφιαλωμένο νερό (●). Σύγκριση του προσδιορισμού της συγκέντρωσης του dieldrin και του spiromesifen με την μέθοδο της HPLC και της ενζυμικής με το hGSTA1-1.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η μακροχρόνια χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων κρίνει αναγκαίο τον προσδιορισμό της υπολειμματικότητας τους, για την προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι το ισοένζυμο hGSTA1-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων απλών μεθόδων αναλυτικού προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών με ικανοποιητική ακρίβεια, συνδυάζοντας χαμηλό κόστος και ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Τέτοιες μέθοδοι κρίνονται απαραίτητες για τον εύκολο και άμεσο προσδιορισμό υπολειμματικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- E. G. Chronopoulou A.C. Papageorgiou, A. Markoglou, N.E. Labrou, Mol Cat 81: (2012) 43-51.
- J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Lowsey, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45 (2005) 51-88.
- Y. Sayed, J.A. Hornby, M. Lopez, H. Dirr, Biochemistry 363 (2002) 341-346.
- K. Banerjee, J. AOAC Int. 93 (2010) 353-354.



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.