

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Σχολή Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Ανάπτυξης  
Τμήμα Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας



# ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΕ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

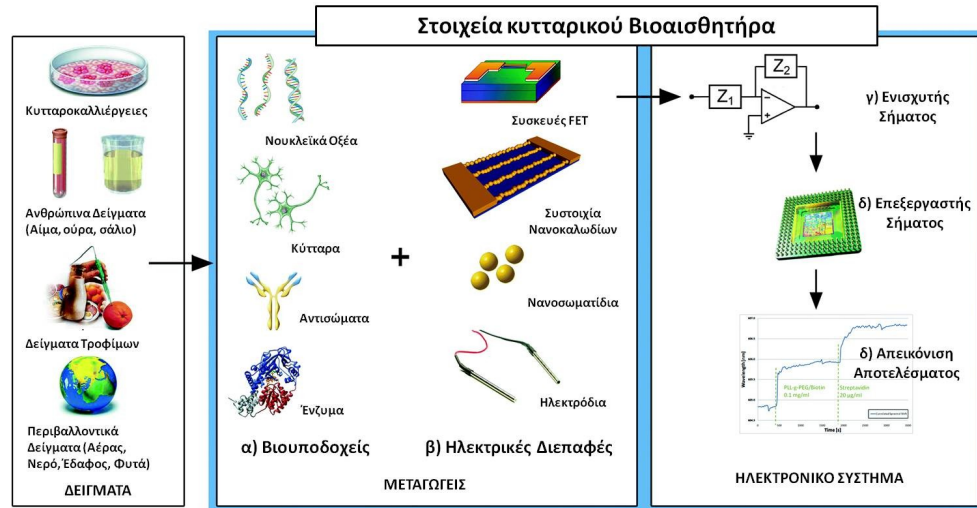
Σοφία Μαυρίκου

Αθήνα 2014

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

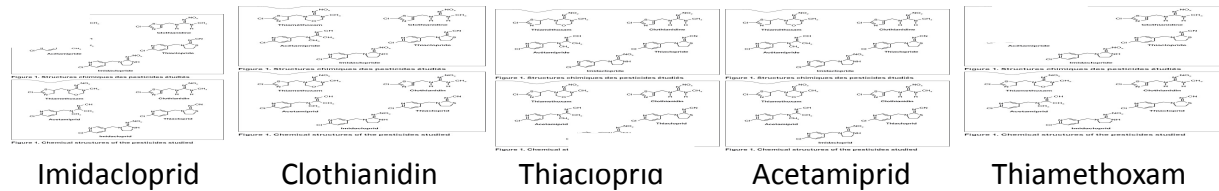
- Βιοισθητήρες**

Κύτταρα: N2a (+/- db-cAMP)  
Vero



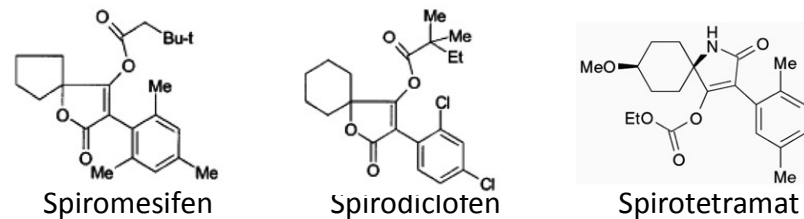
- Νεονικοτινοειδή**

Δέσμευση των μετασυναπτικών nAChRs



- Αμίδια του τετραονικού οξέος**

Παρεμπόδιση της ACCase



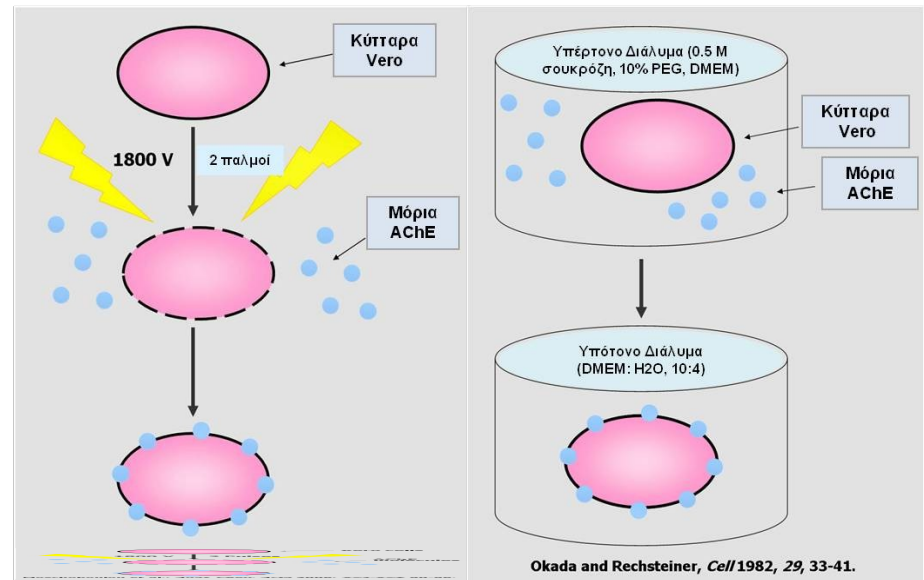
# ΜΕΘΟΔΟΙ (ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ)

## N2a

- Βιωσιμότητα (MTT, NR)/  
Κυτταροτοξικότητα (PI)
- Κυτταρική Διαφοροποίηση  
(Coomassie Brilliant Blue)
- Μembranικό Δυναμικό (DiSC3(5))
- Ενδοκυτταρικό  $[Ca^{2+}]$  (Fluo-3)
- GSH/GSSG (2-vp)
- Υπεροξειδωση Λιπιδίων (TBA)
- GSTs (Habig et al. 1974)
- SOD (NBT)
- AChE (Ellman et al., 1961)

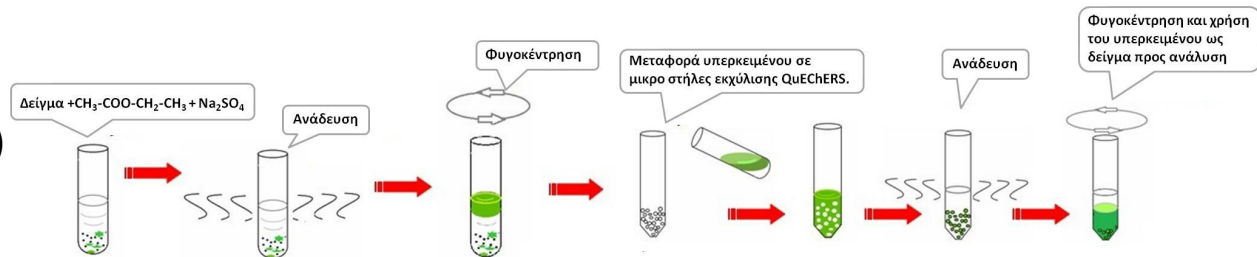
## Vero

- Μembranική τροποποίηση Vero με AChE  
Ηλεκτροπόρωση      Οσμωτική Ένθεση

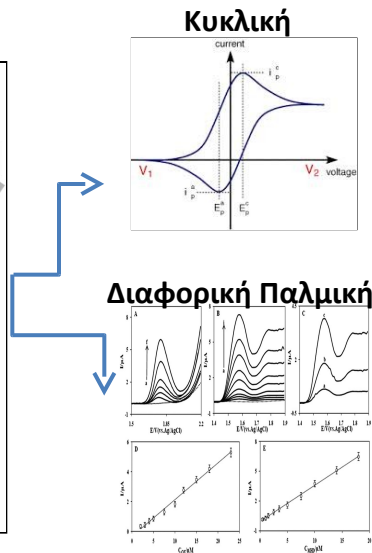
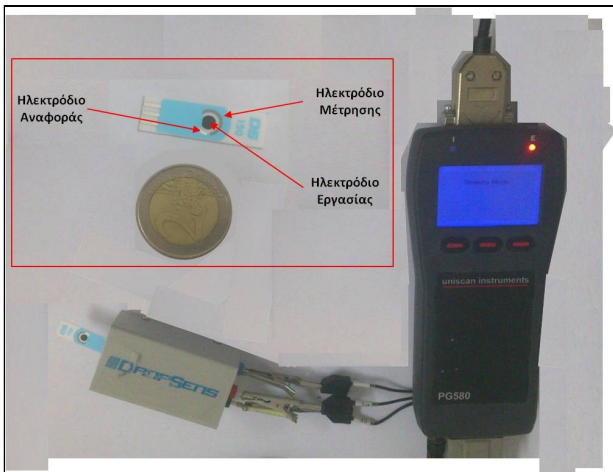


# ΜΕΘΟΔΟΙ (ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ)

- **Εκχύλιση QuEChERS**  
(Υποστρώματα Αγγούρι-Τομάτα)

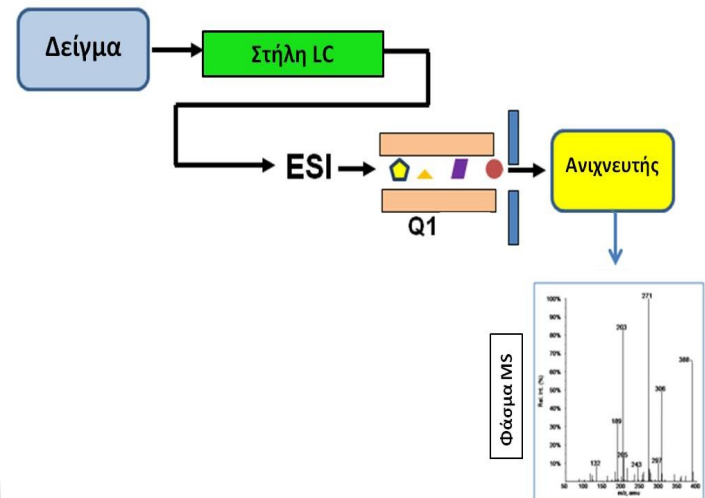


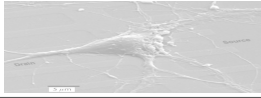
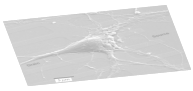
- **Βολταμετρία (+/- N2a)**



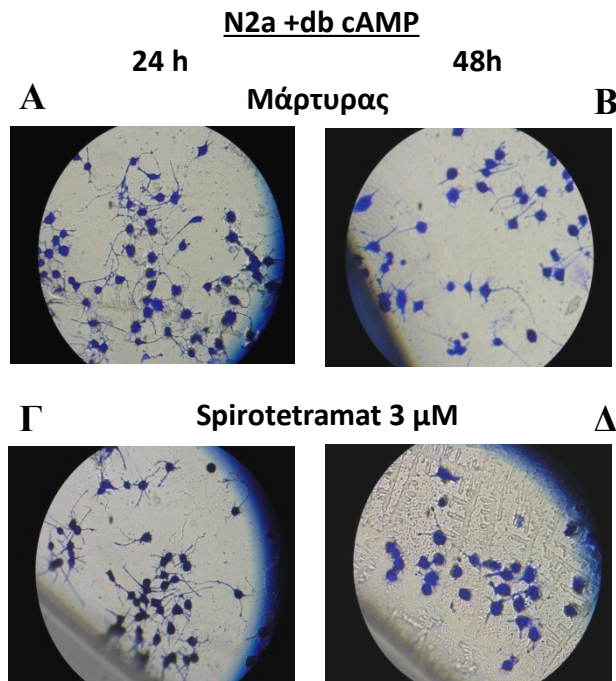
- 

## LC-MS ±ESI



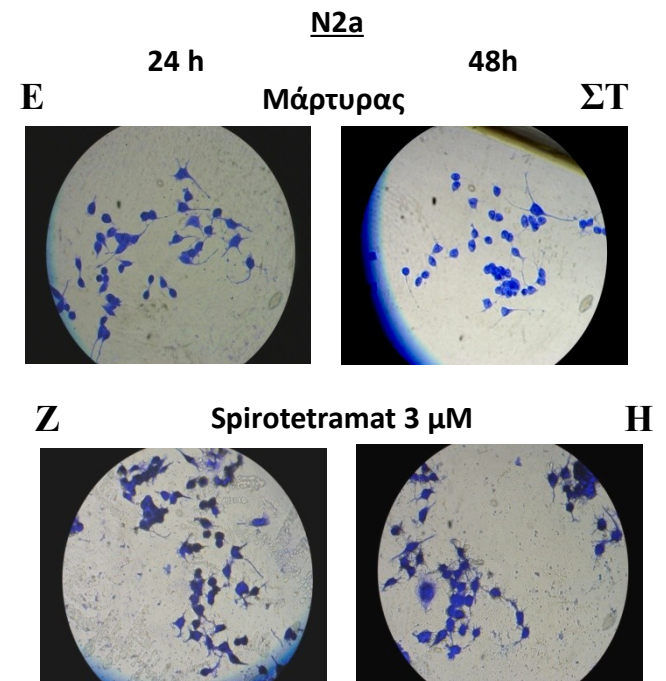


# Επίδραση των εντομοκτόνων στην κυτταρική διαφοροποίηση.



% μεταβολή νευρώνων σε N2a +db cAMP

T(h)	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24	73.5 - 109.6	57.2 - 108	25.5 - 52.5	17 - 39.3
48	67.1 - 103.8	25.5 - 76.4	23 - 74.7	16.8 - 58.5



% μεταβολή νευρώνων σε N2a

T(h)	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24	57.9 - 97	53.1 - 81	48.8 - 66.2	33.1-59
48	57.4 - 92.2	40.8 - 77.6	34.1 - 75.5	25.4-61.6

# Φθορισμομετρικός προσδιορισμός μεμβρανικού δυναμικού και ενδοκυτταρικού ασβεστίου των κυττάρων N2a.

- Αποπόλωση κυτταρικής μεμβράνης  
(N2a + db-cAMP: 23-68.4 %, N2a: 1.6-37.4 %)

% Μεταβολή Μεμβρανικού Δυναμικού				
	MeOH	VAL	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
N2a +db-cAMP	24 - 26	211.5	29.9 - 46.7	37.7 - 68.4
N2a	(-7.8) - 9.9	129.3	1 - 34.4	14.1 - 37.3

- Εισροή [Ca+2]  
(N2a + db-cAMP: 23-68.4 %, N2a: 1.6-37.4 %)

% Μεταβολή Ενδοκυτταρικού [Ca+2]				
	MeOH	IONO	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
N2a +db-cAMP	33 - (-2.2)	189.7	6.7 - 49	58.9 - 122.6
N2a	2.1 - 1	174.7	2.7 - 59.3	21.6 - 90.3

# Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην αναλογία GSH/GSSG σε διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα N2a.

- N2a +db-cAMP: Πτώση GSH/GSSG με την αύξηση των C. (acetamiprid έως 6.6, thiacloprid >4.19, spiromesifen γραμμική πτώση)

Δείκτης GSH/GSSG σε κύτταρα N2a +db-cAMP					
	Μάρτυρας	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
24 h	4.92	4.67 - 4.76	4.72 - 3.35	4.71 - 3.1	3.78 - 1.85
48 h	3.66	4.64 - 3.19	3.72-3.95	2.58 - 3.9	3.68 - 1.57

- N2a: Πτώση GSH/GSSG μέχρι τα 30 μM. (clothianidin & spiromesifen σχεδόν γραμμική πτώση)

Δείκτης GSH/GSSG σε κύτταρα N2a					
	Μάρτυρας	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
24 h	3.63	3.45 - 2.93	4.23 - 3.04	3.47 - 2.04	3.93 - 2.18
48 h	3.88	3.54 - 2.22	3.7 - 2.82	3.43 - 2.03	3.81 - 2.12



# Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στην υπεροξείδωση των λιπιδίων κυττάρων N2a με τη μέθοδο του TBA.

- N2a +db-cAMP: Αύξηση της MDA σε σχέση με το μάρτυρα.  
(thiacloprid απότομη αύξηση στις 24 h στα 100 μM 24% & στις 48 h στα 30 μM 33%, spiromesifen γραμμική αύξηση)

% μεταβολή της MDA σε κύτταρα N2a +db-cAMP				
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
24 h	12.4 - 18.3	9.3 - 23.3	1.3 - 42.8	41.7 - 99.4
48 h	4.2 - 20.4	5.5 - 14.8	0.2 - 33.3	8.8 - 131.6

- N2a: Αύξηση της MDA μέχρι τα 30 μM.  
(spirodiclofen σχεδόν γραμμική αύξηση)

% μεταβολή της MDA σε κύτταρα N2a				
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
24 h	1.7 - 17.3	3.3 - 13.7	2.5 - 37.9	13.8 - 91.1
48 h	7.6 - 13.9	2.3 - 17.4	0.6 - 35.9	16.1 - 74.3

# Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου S μεταφοράση του γλουταθείου (GST) σε κύτταρα N2a.

- N2a +db-cAMP: Αύξηση της Ε.Δ. της GST σε σχέση με το μάρτυρα.  
Θεαματική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h στα 3 και 10 μM.  
Στις 48 h αύξηση στα αμίδια του τετρονικού οξέος αλλά το spirotetramat μείωση 55.3% στα 100 μM.

% μεταβολή της GST σε κύτταρα N2a +db-cAMP				
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min	106.4 - 49.5	226.2 - 194.6	304.3 - 122.5	349.5 - 127.2
24 h	(-3.4) - (- 45.9)	16.5 - 90.6	(- 42.4) - 7.3	(-32.6) - 93.7
48 h	80.7 - 134.6	60.6 - 12.1	(- 39.5) - 84.6	4.8 - 88.4

- N2a: Αύξηση της Ε.Δ. της GST σε σχέση με το μάρτυρα.  
Σημαντική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h αλλά το spirotetramat αύξηση 35.4% στα 100 μM.  
Αύξηση στις 48 h αλλά το imidacloprid μείωση από 93.9 – 83.7 %

% μεταβολή της GST σε κύτταρα N2a				
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min	(- 5.3) - (- 35.7)	55.5 - (-40.4)	188.1 - 35.1	222.3 - 16.4
24 h	(- 10.1) - 5.8	46.4 - 63.1	(- 56.7) - 10.1	(- 43.9) - 6.9
48 h	143 - 101.5	(- 89.7) - (-83.9)	(- 26.2) - 181.6	15.7 – 210.4

# Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) σε κύτταρα N2a.

- N2a +db-cAMP: Αύξηση της Ε.Δ. της SOD σε σχέση με το μάρτυρα.  
Θεαματική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h στα 3 και 10 μΜ.  
Στις 48 h αύξηση στα αμίδια του τετρονικού οξέος αλλά το spirotetramat μείωση 55.3% στα 100 μΜ.

% μεταβολή της SOD σε κύτταρα N2a +db-cAMP

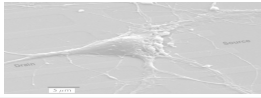
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min				
24 h				

- N2a: Αύξηση της Ε.Δ. της SOD σε σχέση με το μάρτυρα.  
Σημαντική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h αλλά το spirotetramat αύξηση 35.4% στα 100 μΜ.  
Αύξηση στις 48 h αλλά το imidacloprid μείωση από 93.9 – 83.7 %

% μεταβολή της SOD σε κύτταρα N2a

	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min				
24 h				
48 h				

# Προσδιορισμός της επίδρασης των εντομοκτόνων στη δραστικότητα του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) κυττάρων N2a.



- N2a +db-cAMP: Αύξηση της Ε.Δ. της AChE σε σχέση με το μάρτυρα.  
Θεαματική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h στα 3 και 10 μΜ.  
Στις 48 h αύξηση στα αμίδια του τετρονικού οξέος αλλά το spirotetramat μείωση 55.3% στα 100 μΜ.

% μεταβολή της SOD σε κύτταρα N2a +db-cAMP

	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min				
24 h				

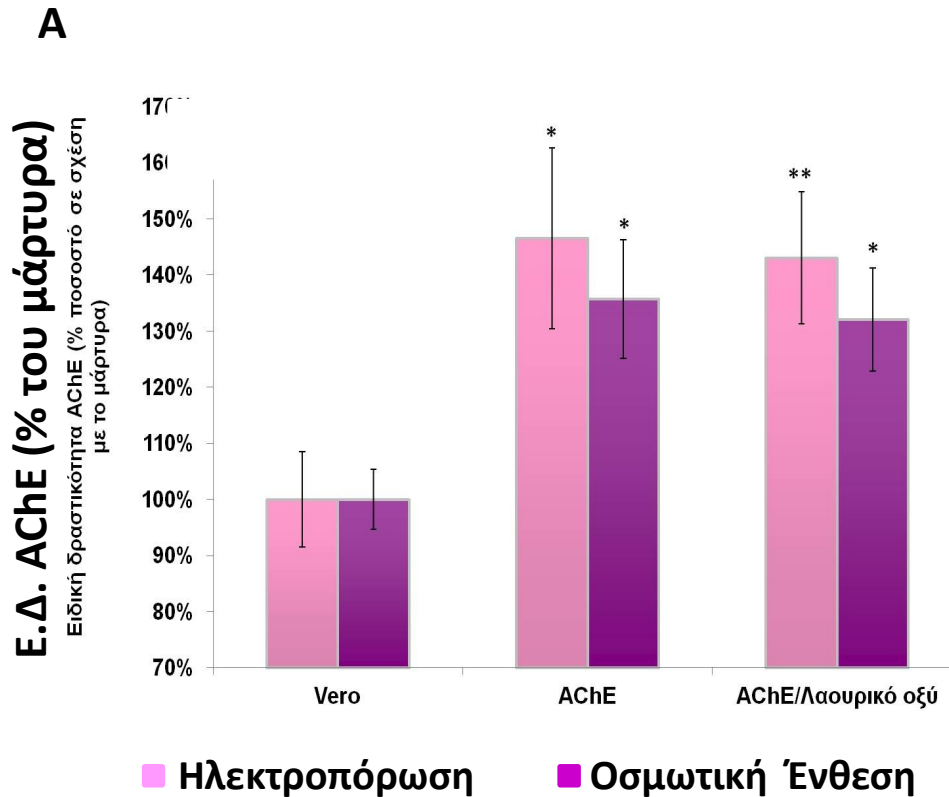
- N2a: Αύξηση της Ε.Δ. της AChE σε σχέση με το μάρτυρα.  
Σημαντική αύξηση στα 30 min.  
Σημαντική μείωση στις 24 h αλλά το spirotetramat αύξηση 35.4% στα 100 μΜ.  
Αύξηση στις 48 h αλλά το imidacloprid μείωση από 93.9 – 83.7 %

% μεταβολή της SOD σε κύτταρα N2a

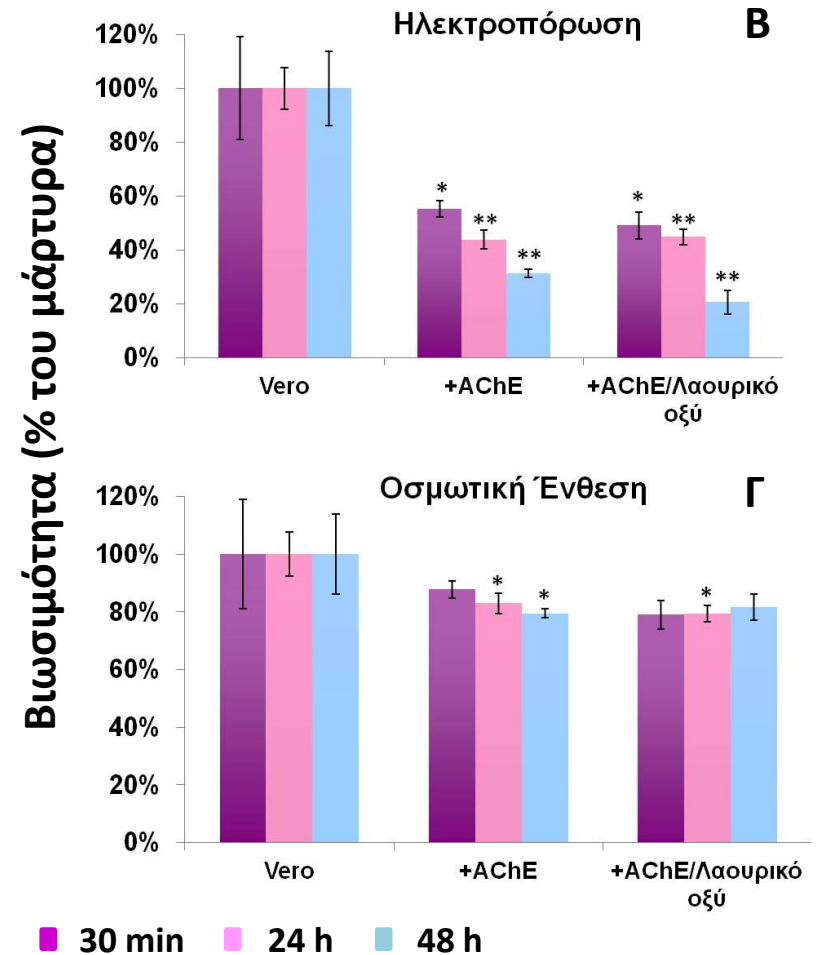
	MeOH	H2O2	Νεονικοτινοειδή	Αμίδια του Τετρονικού Οξέος
30 min				
24 h				
48 h				

# Μεμβρανική τροποποίηση κυττάρων Vero για την εισαγωγή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE).

## Ειδική Δραστικότητα AChE



## Βιωσιμότητα



# Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό νεονικοτινοειδών & αμιδίων του τετρονικού οξέος σε υποστρώματα αγγούρι και τομάτα με τη χρήση LC-MS.

## Εκχύλιση QuEChERS

Μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) με βάση τον κοινοτικό κανονισμό 396/2005 (EU Pesticide database) για το αγγούρι και την τομάτα.

Εντομοκτόνο	Αγγούρι (mg/kg)	Τομάτα (mg/kg)
Acetamiprid	0.3	0.2#
Clothianidin	0.02*	0.05*
Imidacloprid	1	0.5
Thiacloprid	0.3	0.5
Thiamethoxam	0.02	0.05
Spirodiclofen	0.3	1
Spiromesifen	0.1	0.5
Spirotetramat	0.2	2

\* Τα MRLs είναι πολύ χαμηλά και δεν είναι εφικτή η δεκαδική αραίωση.

# Το 1/10 του MRL είναι πολύ χαμηλό και έγινε αραίωση στο 1/5 του MRL.

## LC-MS

- Εσωτερικό Πρότυπο: Carbofuran (0.25 mg/kg)
- Ισοκρατικό /70 H<sub>2</sub>O: 30 ACN
- Ροή: 0,5 mL/min
- T: 35 min
- Inj. Vol.: 20 µL
- ESI +SIM

Εντομοκτόνο	Ιόν Ποσοτικοποίησης	Χρόνοι Κατακράτησης (min)
Acetamiprid	223	16
Clothianidin	250	15.1
Imidacloprid	256	14.9
Thiacloprid	253	17.1
Thiamethoxam	292	13.1
Spirodiclofen	313	21.7
Spiromesifen	273	32.5
Spirotetramat	374	23.3

# Γραμμικότητα-Ορθότητα-Πιστότητα Μεθόδου

## Ανακτήσεις

- **MRL**

R%: 71.86% – 116.35 %

SDR < 11,05%

- **1/10 MRL**

R%: 60,57 % – 94,34%

SDR < 14,88%

Ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ) των γραμμών παλινδρόμησης, τα όρια ανίχνευσης (**LOD**) και ποσοτικοποίησης (**LOQ**) των εντομοκτόνων στα υποστρώματα αγγουριού και τομάτας σε mg/L.

Εντομοκτόνα	Αγγούρι			Τομάτα		
	$r$	LOD	LOQ	$r$	LOD	LOQ
Acetamiprid	0.99983	0.09560	0.28969	0.99910	0.08485	0.25711
Clothianidin	0.99686	0.23540	0.35666	0.99897	0.18185	0.27553
Imidacloprid	0.99827	0.21281	0.64489	0.99869	0.10207	0.61861
Thiacloprid	0.99957	0.14884	0.45103	0.99967	0.04499	0.13634
Thiamethoxam	0.99991	0.07034	0.42632	0.99393	0.31407	0.95173
Spirodiclofen	0.99975	0.11326	0.34322	0.99909	0.34585	1.04802
Spiromesifen	0.99844	0.13064	0.39588	0.98947	0.07515	0.22774
Spirotetramat	0.99843	0.15899	0.48178	0.98829	0.35775	1.08408

# Προσδιορισμός των νεονικοτινοειδών και αμιδίων του τετρονικού οξέος σε υπόστρωμα αγγούρι με τη μέθοδο της διαφορικής παλμικής βολταμετρίας.

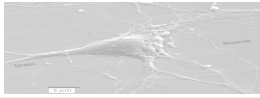
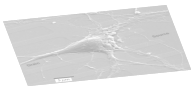
## Λειτουργικές Παράμετροι Διαφορικής παλμικής βολταμετρίας

- Ύψος παλμού (E): 50 mV      Διάρκεια παλμού (w): 50 ms
- Ρυθμός σάρωσης (vDPV): 25 mV s<sup>-1</sup>      • pH διαλυμάτων: 7.4      • Πυκνότητα N2a : 106/mL

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) των γραμμών παλινδρόμησης, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των σε διάλυμα Britton Robinson και PBS με κύτταρα N2a (mg/L)

Εντομοκτόνα	Δ/μα Britton Robinson			Δ/μα PBS + N2a		
	r	LOD	LOQ	r	LOD	LOQ
Acetamiprid	0.97881	0.76093	2.30587	0.90650	1.19114	3.60954
Clothianidin	0.95060	0.87823	2.66132	0.91456	1.14585	3.47230
Imidacloprid	0.97465	0.62275	1.88713	0.88631	1.00344	3.04073
Thiacloprid	0.96927	0.68267	2.06870	0.88349	1.14946	3.48324
Thiamethoxam	0.97896	0.66114	2.00347	0.89082	1.01992	3.09068
Spirodiclofen	0.97104	0.85747	2.59840	0.94350	0.89933	2.72526
Spiromesifen	0.97837	0.57957	1.75630	0.95741	0.79808	2.41154
Spirotetramat	0.98929	0.41103	1.24557	0.94343	0.08026	2.43235





- Sophie Mavrikou, Kelly Flampouri, Spyridon Kintzios, Costas Yalouris. «*Multiple cell array biosensors based on membrane engineered cells: A revolutionary technology for the detection of pesticide residues*». 1st Biosensing Technology Conference, 10-12 Νοεμβρίου 2009, Μπρίστολ.
- Σοφία Μαυρίκου, Ευαγγελία Φλαμπούρη, Σπυρίδων Κίντζιος. «*Επιδράσεις in vitro αμιδίων του τετρονικού οξέος και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων σε κυτταρική σειρά ποντικού N2a*». 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, 4-5 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα.
- Sophia Mavrikou, Evangelia Flampouri, Spiridon Kintzios. «*Effects of neonicotinoids and tetronic acid amides on membrane potential and intracellular calcium concentration in neuroblastoma N2a cell line*». 35ο Επιστημονικό Συνέδριο ΕΕΒΕ, 23-25 Μαΐου 2013, Ναύπλιο.
- Sophia Mavrikou, Evangelia Flampouri, Spiridon Kintzios. «*Comparative study of the electrochemical signal of neonicotinoids and tetronic acid amides on screen printed electrodes with and without the use of N2a cells*». 2nd Conference on Bio-Medical Instrumentation and related Engineering and Physical Sciences, 21-22 Ιουνίου 2013, Αθήνα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΧΗ  
ΣΑΣ!

