



Determination of Benserazide Based on Bioluminescence Inhibition of Aequorin

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rahmani H.¹ MSc,
H.Sajedi R.*¹ PhD

How to cite this article

Rahmani H, H.Sajedi R. Determination of Benserazide Based on Bioluminescence Inhibition of Aequorin. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):627-633.

ABSTRACT

Aims Aequorin as a bioluminescence protein due to ease of use, non-toxic, and high capability of detecting has long been the interest of researchers. The aim of this study was to design a method for accurate and simple detection of important therapeutic agents using a bioluminescence inhibition based assay by using aequorin.

Materials & Methods In this study, important drugs in therapeutic monitoring with structural similarity to Coelenterazine, were selected and their interaction with aequorin was investigated. Further, the conditions of the bioluminescence assay were optimized to achieve the lowest detection limit.

Findings Among the drugs whose effects have been tested on aequorin, the only benserazide resulted in inhibition of the bioluminescence activity. This analyte can significantly reduce the bioluminescence of aequorin in a concentration-dependent manner. The best dose-response curve was obtained and IC₅₀ of 0.26 μM was calculated. The linear calibration curve was obtained in a range of about 100 to 1500 nM with LOD and LOQ of 79 and 260 nM, respectively. Furthermore, we demonstrated the application of the approach in human serum samples with a recovery of 97%. Guddem-Schild graph was plotted to determine the mechanism of inhibition which indicated that the IC₅₀ of benserazide changed in the presence of different concentrations of Coelenterazine.

Conclusion The proposed method can be used for measuring benserazide which can easily be applicable for real samples. Also, the results show that benserazide inhibits the bioluminescence activity of aequorin by competitive inhibition.

Keywords Aequorin; Benserazide; Bioluminescence inhibition assay; Drug monitoring

CITATION LINKS

[1] Chemiluminescence and ... [2] Analytical bioluminescence and ... [3] The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å ... [4] Product monograph; PrPROLOPA®, levodopa and benserazide ... [5] Commonly used L-amino acid decarboxylase inhibitors block monoamine oxidase activity in the ... [6] Electrochemical behavior of levodopa at multi-wall carbon nanotubes-quantum dots ... [7] Rapid analysis of L-dopa in urine samples using gold nanoelectrode ... [8] Voltammetric determination of L-dopa using a carbon nanotubes-Nafion modified ... [9] Electrochemical behavior of catecholamines and related compounds at in situ surfactant ... [10] Chiral and non chiral determination of Dopa by capillary ... [11] Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbidopa, ... [12] Simultaneous spectrophotometric determination of levodopa and carbidopa in ... [13] Determination of levodopa by capillary electrophoresis with ... [14] A spectroscopic study on applicability of spectral analysis for ... [15] Simultaneous determination of levodopa and benserazide by ... [16] Determination of levodopa and benserazide hydrochloride in pharmaceutical ... [17] Chemiluminescence of luminol-potassium ferricyanide with benserazide and ... [18] Voltammetric determination of benserazide in pharmaceutical formulations using ... [19] Voltammetric study and direct analytical determination of the antiparkinson drug ... [20] Therapeutic fetal-globin inducers reduce transcriptional repression in ... [21] CdTe quantum dots with green fluorescence generated by bioluminescence ... [22] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein ... [23] Cleavage of structural proteins during the assembly of the head ... [24] Interference-free electrochemical detection of nanomolar dopamine using ... [25] Overview of therapeutic drug ... [26] Therapeutic drug monitoring (TDM): An ... [27] Genetically engineered aequorin for the development of novel ... [28] Bioluminescence inhibition assay for the detection of hydroxylated polychlorinated ... [29] Aequorin as a sensitive and selective reporter for detection of ...

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: -
Fax: -
sajedi_r@modares.ac.ir

Article History

Received: October 21, 2018
Accepted: May 18, 2019
ePublished: December 21, 2019

سنجش بنسرازید به روش مهار فعالیت بیولومینسانسی اکورین

حسین رحمانی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

رضا حسن‌ساجدی PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: به دلیل سهولت استفاده، غیرسمی بودن و قابلیت بالای فتوپروتئین اکورین در سیستم‌های ردیابی، محققین توجه خاصی به استفاده از این پروتئین بیولومینسانس داشته‌اند. هدف مطالعه حاضر طراحی روشی برای سنجش دقیق و آسان داروهای مهم در پایش درمانی از طریق روش مبتنی بر مهار فعالیت بیولومینسانسی اکورین است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر تعدادی از داروهای مهم در پایش دارویی و دارای شباهت ساختاری با کلنترازین، انتخاب و میانکنش آنها با اکورین بررسی و شرایط سنجش و واکنش بیولومینسانسی به منظور دستیابی به کمترین حد تشخیص بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: از میان داروهای بررسی‌شده، تنها بنسرازید منجر به مهار فعالیت بیولومینسانسی اکورین شد که این اثر مهار رفتار وابسته به غلظت داشت. بهترین نمودار دوز-پاسخ به دست آمد و IC_{50} ۲۶/۰ میکرومولار محاسبه شد. دامنه خطی برای بنسرازید ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومولار و حد تشخیص و حد کمی‌سازی روش به ترتیب ۷۹ و ۲۶ نانومولار به دست آمد. همچنین امکان استفاده از این روش برای سنجش آنالیت در نمونه سرم بررسی شد و نتایج میزان بازبازی ۹۷٪ را نشان داد. به منظور مشخص شدن مکانیسم مهار، نمودار دوز-پاسخ بنسرازید در حضور غلظت‌های مختلف کلنترازین رسم شد که نشان داد IC_{50} تغییر می‌یابد.

نتیجه‌گیری: روش طراحی‌شده می‌تواند برای سنجش بنسرازید استفاده شود و قابلیت استفاده در نمونه سرم را دارد. همچنین نتایج نشان می‌دهد بنسرازید با مهار رقابتی فعالیت بیولومینسانسی اکورین را مهار می‌کند.

کلیدواژه‌ها: اکورین، بنسرازید، سنجش مهار بیولومینسانسی، پایش دارو

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۸

* نویسنده مسئول: sajedir_r@modares.ac.ir

مقدمه

سنجش آنالیت‌ها در زمینه‌های مختلفی همچون پالایش‌های زیست‌محیطی، صنایع غذایی، ردیابی داروها در بدن و غیره اهمیت دارد. بسیاری از روش‌های رایج با استفاده از کروماتوگرافی مایع و گازی یا سایر روش‌هایی صورت می‌گیرد که اکثراً دشوار و هزینه‌بر هستند [1]. مواردی از قبیل نیاز به مراحل متعدد آماده‌سازی، تداخل نمونه‌ها، دشواری در تفسیر نتایج در برخی مواقع، استفاده از حلال‌هایی که می‌توانند برای سلامتی مضر باشند و نیاز به دستگاه‌ها و تجهیزات گران‌قیمت باعث می‌شوند همواره محققین در پی روش‌هایی بهتر و راحت‌تر برای سنجش آنالیت‌ها باشند. استفاده از فتوپروتئین‌ها به علت حساسیت فوق‌العاده زیاد برای کاربردهای آنالیتیک بسیار مناسب است. از طرفی سایر مزایا از قبیل سهولت کار، پایداری، عدم نیاز به تابش ورودی برای تهییج و در

نتیجه حذف پیش‌زمینه، فتوپروتئین‌ها را برای این کاربردها مناسب می‌نماید [2]. اکورین به عنوان یک فتوپروتئین شناخته شده که مطالعات گسترده‌ای روی آن صورت گرفته است، یکی از گزینه‌های ایده‌آل برای سنجش آنالیت‌ها است. سنجش بر مبنای مهار سنجش فتوپروتئین یک روش آسان و سریع است که قابلیت تبدیل شدن به روشی جایگزین با سایر روش‌های رایج را دارد [3]. با توجه به این که اساس سنجش رقابت بین کلنترازین و آنالیت مورد نظر است، فتوپروتئین بدون دست‌کاری می‌تواند به عنوان آشکارساز معرفی شود.

خصوصیات بیولومینسانسی اکورین به شدت به کونفورماسیون و پایداری سوسترای آن، یعنی کلنترازین، در پاکت اتصال پروتئین بستگی دارد [3]. تغییرات اندکی در پاکت اتصال و ریزمحیط اطراف کلنترازین، منجر به تغییر برهمکنش پروتئین و سوسترای شده و تاثیر عمده‌ای بر ویژگی‌های بیولومینسانسی پروتئین دارد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد کوچک‌ترین تغییرات در این محیط از جمله تغییر در باقی‌مانده‌هایی که مستقیم یا غیرمستقیم با کلنترازین در ارتباط هستند یا کوچک‌ترین تغییرات در گروه‌های عاملی کلنترازین، منجر به تغییر در خواص بیولومینسانسی اکورین می‌شود. این تغییرات به صورت تغییر در میزان یا طول موج نور نشرشده اتفاق می‌افتد [3]. از این خاصیت اکورین می‌توان به صورت مستقیم به منظور سنجش آنالیت‌ها استفاده کرد. به بیان دیگر اکورین می‌تواند مانند آنچه در مورد کلسیم اتفاق می‌افتد همزمان هر دو نقش گیرنده و گزارشگر را بازی نماید. با توجه به این ویژگی، در این مطالعه غربالگری تعدادی از داروهای مهم در پایش دارویی، که تا حدی دارای شباهت ساختاری با کلنترازین بوده‌اند، انجام شد. بنسرازید متعلق به گروه هیدروکسی‌فنیل‌آلکیل‌هیدرازین، از مهارکننده‌های دکربوکسیلاز ال-آمینواسیدهای آروماتیک است. از طرفی، بنسرازید سایر آنزیم‌های موجود در "محیط زنده" از جمله تریپتوفان‌هیدروکسیلاز، ترنس‌آمیناز آمینواسیدهای آروماتیک، مونوآمین‌اکسیداز، دی‌آمین‌اکسیداز، دوپامین بتاهیدروکسیلاز و کاتکول‌متیل‌ترانسفراز را مهار می‌کند. با این حال، بنسرازید برای دکربوکسیلاز اختصاصی‌تر است [4]. بنسرازید همراه با لوودوپا برای درمان بیماری پارکینسون استفاده می‌شود. از آنجایی که در این بیماران غلظت دوپامین در مغز کاهش محسوسی پیدا می‌کند، یکی از راه‌های درمان، تجویز لوودوپا به عنوان پیش‌ساز دوپامین است که پس از عبور از سد خونی مغزی با واکنش دوپادکربوکسیلاز به دوپامین تبدیل می‌شود. با توجه به این که آنزیم دوپادکربوکسیلاز در بافت‌های محیطی نیز وجود دارد، میزان زیادی از لوودوپا در خون به دوپامین تبدیل می‌شود که امکان عبور از سد خونی مغزی را ندارد و در نتیجه تاثیری در افزایش سطح دوپامین در بافت مغز بیمار نخواهد داشت. به همین دلیل بنسرازید به عنوان مهارکننده فعالیت دوپادکربوکسیلاز و با توجه به این که امکان عبور از سد خونی مغزی را ندارد در بافت‌های محیطی مانع از تبدیل لوودوپا به دوپامین می‌شود. در نتیجه بنسرازید در درمان ترکیبی با لوودوپا به

با pH برابر با ۷/۶ حاوی EDTA ۱۰ میلی‌مولار، سدیم کلرید ۱۵۰ میلی‌مولار، آمونیوم سولفات ۸/۰ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰% دیالیز شدند. همچنین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری [22] و SDS-PAGE با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲% در شرایط احیایی و براساس روش لاملی انجام شد [23].

آماده‌سازی اکورین نیمه‌سنتری و سنجش بیولومینسانس: آپواکورین، در غلظت نهایی ۱/۰ میکرومولار به همراه کلنترازین در غلظت نهایی بین ۱/۰ تا ۵/۰ میکرومولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۵ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۶ (بافر ۱) در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر و در دمای ۴°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۶ (بافر ۲) به ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق شدت لومینسانس اولیه با دستگاه بیولومینومتر به مدت یک ثانیه اندازه‌گیری شد.

غربالگری ترکیبات دارویی: به منظور بررسی اثر ترکیبات دارویی بر فعالیت لومینسانسی اکورین، غلظت ۱۰۰ میکرومولار از داروهای کوپنیدین، مایکوفنولیک اسید، لیدوکائین، پرایمیدون، فنوباریتال، دیسوپیرامید، اتوسوکسیمید و بنسرازید، با آپواکورین در غلظت ۱/۰ میکرومولار انکوبه و پس از یک ساعت انکوباسیون کلنترازین با غلظت ۵/۰ میکرومولار به مخلوط اضافه و برای ۱۶ ساعت در دمای ۴°C انکوبه شد. فعالیت بیولومینسانسی پروتئین با تزریق بافر ۲ توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد.

انتخابیت این روش برای بنسرازید با بررسی آزمون مهار با چندین دارو مهم در پایش دارودرمانی (TDM) مورد بررسی قرار گرفت. حد تشخیص (LOD)؛ کمترین غلظتی است که یک روش می‌تواند با درجه اطمینان مشخصی آن را تشخیص دهد) و حد کمی سازی (LOQ)؛ حدی است که در آن می‌توان به‌طور منطقی اختلاف بین دو مقدار مختلف را تشخیص داد) به شرح زیر محاسبه شد [24]:

$$\text{حد تشخیص} = 3 \times \text{انحراف معیار} / \text{شیب منحنی کالیبراسیون}$$

$$\text{حد کمی‌سازی} = 10 \times \text{انحراف معیار} / \text{شیب منحنی کالیبراسیون}$$

تعیین رفتار دوز- پاسخ اکورین در غلظت‌های مختلف بنسرازید: ۱۵۰ میکرولیتر از آپواکورین ۲/۰ میکرومولار در بافر ۱ به هر میکروتیوب اضافه شد و سپس از محلول اولیه ۳۰ میلی‌مولار بنسرازید، سری رقت تا ۳۰ نانومولار در آب مقطر تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به آپواکورین اضافه و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به مخلوط فوق کلنترازین در غلظت نهایی ۱/۰ میکرومولار اضافه و حجم نهایی مخلوط به ۳۰۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها در دمای ۴°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند و نشر نور به‌وسیله تزریق ۱۰۰ میکرولیتر بافر ۲ به مدت یک ثانیه به‌وسیله دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف‌پد پریمز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و EC₅₀ و IC₅₀ از طریق معادله دوز- پاسخ سیگموئیدی محاسبه شدند.

سنجش بنسرازید در نمونه زیستی: برای اندازه‌گیری محتوای بنسرازید در نمونه‌های سرم انسانی، از آزمون مهار، در دو نمونه سرم

میزان قابل ملاحظه‌ای میزان لوودوپای مورد نیاز برای بهینه‌سازی درمان را کاهش می‌دهد و واکنش زود هنگام به درمان را ایجاد می‌کند [5]. بنسرازید پس از تزریق خوراکی به سرعت جذب می‌شود و به تری‌هیدروکسی‌بنزیل‌هیدرازین متابولیزه می‌شود. به علاوه، بنسرازید هیدروکلراید به دلیل تاثیر بر بیان فعال ژن کدکننده هموگلوبین جنینی، در درمان بتا- تالاسمی به کار می‌رود. تولید پایدار هموگلوبین جنینی در افراد تحت درمان با بنسرازید، مشکلات ناشی از تغییرات هموگلوبین بالغ را که عامل بیماری بتا- تالاسمی است جبران کرده و نیاز به درمان از طریق تزریق خون را به حداقل می‌رساند. از طرفی بالا رفتن دوز بنسرازید در خون باعث کاهش اندک مونوآمین‌های اندوژن در بافت‌های مختلف محیطی، مانند نورآدرنالین در قلب می‌شود که می‌تواند برای بیمار مشکل‌ساز شود. در نتیجه پایش دقیق سطح بنسرازید در خون اهمیت دارد.

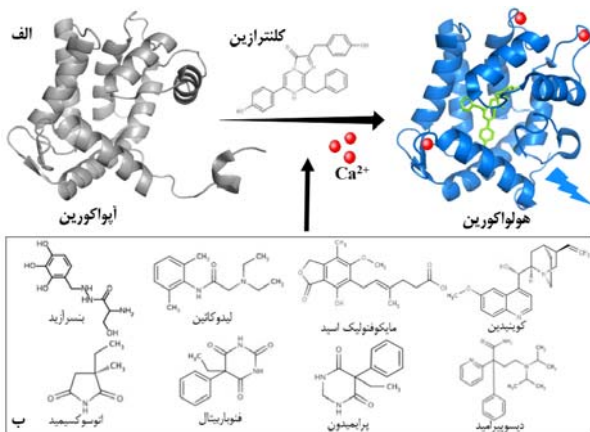
روش‌های متعددی برای تعیین بنسرازید در دسترس است که شامل الکتروفورز مویرگی [6-10] اسپکتروفتومتری [11-15] کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [16]، کمیلومینسانس [17, 18] و ولتامتری [19] است. با توجه به اهمیت سنجش بنسرازید در خون، در این مطالعه با استفاده از مهار بیولومینسانسی اکورین، یک روش سریع و دقیق برای سنجش آن برای اولین بار پیشنهاد شده است [20].

مواد و روش‌ها

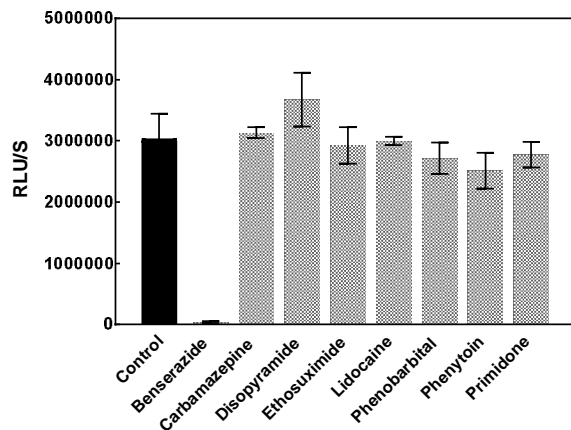
بیان و تخلیص آپواکورین: در پژوهش تجربی حاضر، پلاسمید pET-21a حامل ژن اکورین با روش شیمیایی به داخل باکتری‌های بیانی /شرشیا کلی سویه BL21(DE3) منتقل شد [21]. در شرایط استریل، یک کلنی از باکتری‌های حاوی پلاسمید بیانی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تلقیح شد و سپس محیط کشت برای ۱۲ ساعت در دمای ۳۷°C و با هوادهی مطلوب قرار گرفت. پس از این مدت، ۲/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری رشد کرده را به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتقال داده و تا افزایش OD₆₀₀ به حدود ۰/۷ در ۳۷°C انکوبه شد. سپس با افزودن IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار، محیط کشت برای ۴ ساعت در دمای ۲۵°C قرار داده شد. پس از آن، محیط کشت حاوی باکتری، برداشته شد و به‌منظور انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

پس از اتمام بیان، سوسپانسیون باکتری‌های القاشده به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به‌دست‌آمده با افزودن بافر لیزکننده (تریس ۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۵ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۳۰۰ میلی‌مولار در pH برابر با ۷/۸) به حالت سوسپانسیون درآمد و تحت سونیکاسیون قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ سول‌های لیز شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm، مایع رویی به‌منظور آنالیز بیان ژن روی ژل اکریل آمید برده شد و با توجه به وجود دنباله هیستیدینی، کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز برای تخلیص پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام آزمایش‌های بعدی نمونه‌ها در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار

غربالگری داروها: به طور معمول اتصال کلنترازین به اکورین منجر به تولید فرم هولو شده که در حضور یون کلسیم تولید نور می کند (شکل ۲- الف). در اینجا، آپو اکورین برای غربال کردن برخی از داروهای مهم که در TDM اهمیت دارند، استفاده شد. ترکیبات دارویی انتخاب شده با کلنترازین شباهت ساختاری داشته و ممکن بود در اتصال به اکورین با کلنترازین رقابت نشان دهند (شکل ۲- ب). جالب آن که در میان این ترکیبات، تنها بنسرآزید توانست فعالیت بیولومینسانس اکورین را مهار کند (نمودار ۱).



شکل ۲ (الف) نمایی شماتیک از بیولومینسانس در فتوپروتئین اکورین؛ (ب) ساختار داروهایی مشابه با کلنترازین که به طور بالقوه برای اتصال به پاکت آب گریز اکورین پیشنهاد می شوند.



نمودار ۱ اثر ترکیبات دارویی مختلف در غلظت 10^6 میلی مولار بر اکورین. تنها بنسرآزید در این غلظت توانست فعالیت بیولومینسانسی اکورین را تقریباً به صورت کامل مهار کند.

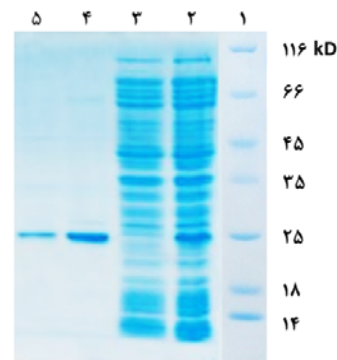
تعیین نمودار دوز- پاسخ: با توجه به مشاهده اثر مهارتی بنسرآزید در غلظت 10^6 میکرومولار، برای مشاهده رفتار اکورین در برابر این آنالیت در سایر غلظت ها، دامنه غلظتی از یک نانومولار تا 10^6 میلی مولار بر اکورین اثر داده شد (نمودار ۲). همان طور که مشخص است فعالیت بیولومینسانسی اکورین رفتار وابسته به غلظت نسبت به بنسرآزید را نشان می دهد. با استفاده از نمودار دوز- پاسخ، میزان IC_{50} برای بنسرآزید 260 میکرومولار محاسبه شده است (نمودار ۲).

زن و مرد استفاده شد. بدین صورت که بنسرآزید در سه غلظت 300 ، 600 و 1200 نانومولار به سرم اضافه شد. به منظور حذف تداخلات احتمالی موجود در سرم مانند آلبومین و غیره، نمونه های سرمی به مدت 2 دقیقه در آب جوش انکوبه و به مدت 10 دقیقه در $1300g$ سانتریفوژ شد. سپس نمونه های تحت آزمایش، در شرایط آزمایشگاهی بهینه ای که قبلاً شرح داده شد، مورد سنجش قرار گرفتند. با استفاده از معادله خطی مشتق شده از منحنی استاندارد، غلظت بنسرآزید در نمونه ها تعیین و با غلظت واقعی مقایسه و میزان بازیابی محاسبه شد.

آنالیز آماری: همه آزمایش ها در سه تکرار مستقل صورت پذیرفت. برای تعیین میانگین و انحراف معیار و رسم نمودارها از بسته های نرم افزاری اکسل و گراف پد پریمز استفاده شد.

یافته ها

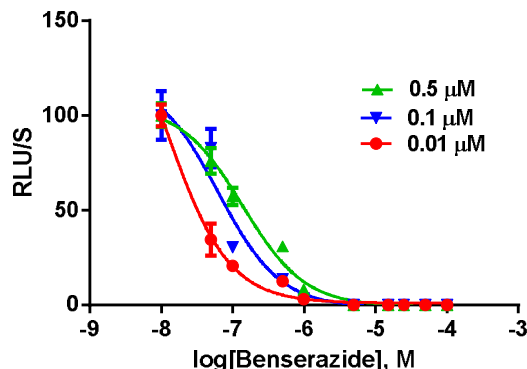
بیان و تخلص و تعیین فعالیت پروتئین: مقایسه الگوی پروتئینی عصاره باکتری در حالت القاشده و نشده، بیان پروتئین مورد نظر را به خوبی نشان می دهد (شکل ۱). حدود 50% بیان نیز در فرم نامحلول قرار داشت که به علت مشکلات تاخوردگی مجدد، مورد استفاده قرار نگرفت (نتایج نشان داده نشده است) و از پروتئین محلول برای ادامه مراحل استفاده شد. پس از اتمام مراحل خالص سازی، نمونه ها تعیین غلظت شدند و بعد از تعیین فعالیت و فعالیت ویژه برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت ویژه برای اکورین 4×10^3 RLU/mg به دست آمد.



شکل ۱ آنالیز SDS-PAGE بیان و تخلص پروتئین اکورین؛ مارکر اندازه مولکولی (۱) عصاره سلولی القاشده (۲)، عصاره سلولی القاشده (۳)، نمونه تخلص شده با ستون نیکل آگاروز (۴) و اکورین خالص شده کنترل (۵)

بهینه سازی شرایط سنجش: با توجه به حساسیت نشر بیولومینسانس اکورین به غلظت اکورین و کلنترازین، شرایط واکنش باید به گونه ای انتخاب شود که بیشترین حساسیت را نشان دهد به طوری که هم رقابت بین کلنترازین و آنالیت به خوبی مشاهده شود و هم کاهش آن به خوبی قابل اندازه گیری باشد. در نتیجه براساس آزمایشات انجام شده (نتایج نشان داده نشده است) غلظت اکورین $1/10^6$ و کلنترازین $1/10^6$ میکرومولار در نظر گرفته شد.

تعیین مکانیزم مهار: با توجه به فرض این مطالعه که رقابت بین آنالیت‌های با شباهت ساختاری به کلنترازین برای اتصال به اکورین است، روشن‌شدن نوع مهار صورت‌گرفته تا حدی مکانیزم مهار را مشخص می‌کند. به‌منظور تعیین مکانیزم مهار، منحنی‌های دوز-پاسخ بنسرازید در سه غلظت مختلف کلنترازین شامل ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومولار (که به آن نمودار گادم-اسکایلد اطلاق می‌شود) رسم شد (نمودار ۴). همان‌طور که در نمودار حاصل مشخص شد میزان IC_{50} با کاهش غلظت کلنترازین به‌ترتیب از ۱۳۸ به ۶۲/۵ و ۱۱/۹ نانومولار کاهش می‌یابد.

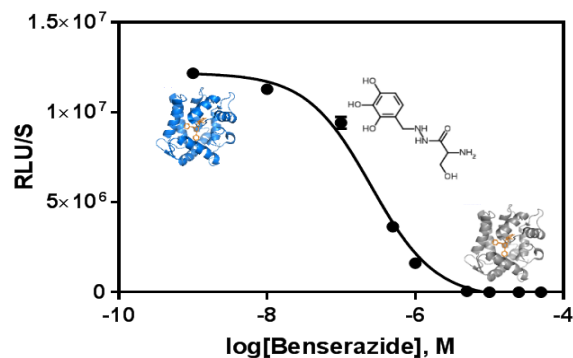


نمودار ۴) منحنی‌های دوز-پاسخ بنسرازید در حضور سه غلظت ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومولار کلنترازین؛ با کاهش غلظت کلنترازین میزان IC_{50} کاهش می‌یابد.

بحث

تحقیقات به‌منظور تشخیص حضور داروها و نیز سوءاستفاده‌های دارویی یا سموم در بیماران، چه در حالت اورژانسی و چه غربالگری امری ضروری است. سنجش سطح درمانی دارو، اندازه‌گیری پارامترهای آزمایشگاهی است که تفسیر مناسب آن، روش تجویز دارو را به‌طور مستقیم تحت تاثیر قرار می‌دهد. از آنجایی که بررسی اثرات درمانی داروها، تنها با آزمایش‌های بالینی یا دیگر آزمایش‌های پاراکلینیکی امکان‌پذیر نیست، سنجش آنالیت‌ها و پایش‌درمانی دارو در سال‌های اخیر افزایش یافته است. در مورد بسیاری از داروها غلظت سرمی، بهتر از دوز مصرف‌شده با اثرات دارو رابطه دارد. بدین‌ترتیب کاربرد TDM به‌ویژه در مورد داروهای با دامنه باریک درمانی، داروهای تغییرپذیر در فارماکوکینتیک، داروهایی که تعیین غلظتشان دشوار است و داروهای دارای اثر درمانی با اثرات جانبی مخرب، مهم است [25]. از این رو، استفاده از فتوپروتئین‌ها از جمله اکورین به‌علت حساسیت فوق‌العاده زیاد به‌منظور کاربردهای آنالیتیکال بسیار مناسب است [2, 26].

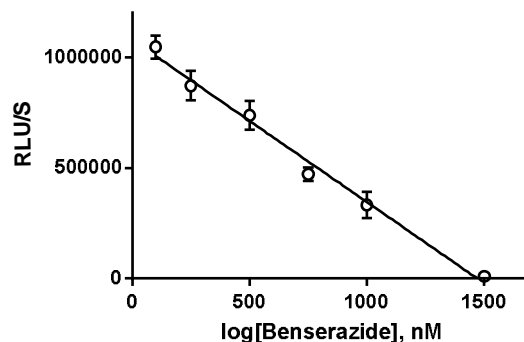
اکورین به‌عنوان یک فتوپروتئین شناخته‌شده که مطالعات گسترده‌ای روی آن صورت گرفته، یکی از گزینه‌های ایده‌آل برای سنجش آنالیت‌ها است. سنجش بر مبنای مهار فتوپروتئین یک روش آسان و سریع است که قابلیت تبدیل‌شدن به روشی جایگزین با سایر روش‌های رایج را دارد [1]. با توجه به اساس این سنجش که رقابت بین کلنترازین و آنالیت مورد نظر است، اکورین بدون



نمودار ۵) منحنی دوز-پاسخ فعالیت لومینسانسی اکورین در غلظت‌های مختلف بنسرازید؛ در غلظت‌های حدود ۱۰ میکرومولار فعالیت اکورین به‌طور کامل مهار می‌شود.

تعیین دامنه خطی اندازه‌گیری: سنجش مهار بیولومینسانس با استفاده از اکورین، یک نمودار خطی در غلظت‌های مختلف بنسرازید در محدوده ۱۰۰-۱۵۰۰ نانومولار ایجاد می‌کند (نمودار ۳). معادله رگرسیون خط $y = -733.4x + 107938$ است. حد تشخیص و حد کمی‌سازی بنسرازید به‌ترتیب ۷۹ و ۲۶۰ نانومولار محاسبه شد. مقایسه این روش و سایر روش‌ها نشان داد که LOD و LOQ محاسبه‌شده برای نمونه‌های بالینی قابل استفاده است.

سنجش بنسرازید در نمونه زیستی: به‌منظور ارزیابی قابلیت روش پیشنهادی، تعیین غلظت بنسرازید در نمونه‌های سرم انسان انجام شد. دقت این روش در این نمونه‌های بالینی نیز با تعیین میزان بازیابی بنسرازید با اضافه‌کردن مقدار معینی محلول استاندارد بنسرازید به نمونه‌های سرم مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازیابی در محدوده $100 \pm 3\%$ محاسبه شد (جدول ۱).



نمودار ۳) رابطه خطی بین فعالیت بیولومینسانس اکورین در دامنه غلظتی ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومولار بنسرازید

جدول ۱) سنجش بسرازید در غلظت‌های مختلف اضافه‌شده به سرم از طریق کاهش شدت بیولومینسانس اکورین

غلظت واقعی (نانومولار)	میانگین غلظت اندازه‌گیری‌شده (نانومولار)	بازیابی (%)	انحراف معیار نسبی (%)
۲۵۰	۲۴۲	۹۷	۹
۵۰۰	۵۰۲	۱۰۰	۳
۷۵۰	۷۳۴	۹۸	۲
۱۲۰۰	۱۲۲۶	۱۰۲	۳

کلنترازین و اکورین تداخل ایجاد نماید. در این مورد نیز احتمالاً بنس‌آزید از همین طریق موجب کاهش نشر بیولومینسانس اکورین می‌شود [29].

در این مطالعه، در روش اندازه‌گیری طراحی شده، اکورین به‌طور همزمان به‌عنوان گزارشگر و گیرنده نقش دارد و بنس‌آزید می‌تواند فعالیت اکورین را به‌صورت وابسته به غلظت مهار نماید. همچنین روش ارایه‌شده قابلیت استفاده برای سنجش بنس‌آزید در نمونه‌های زیستی را دارد. مهار اکورین توسط بنس‌آزید توسط مکانیزم مهار رقابتی صورت می‌گیرد و احتمالاً بنس‌آزید با باقی‌مانده‌های درگیر در واکنش با کلنترازین برهمکنش می‌دهد که منجر به خاموشی فعالیت بیولومینسانسی پروتئین می‌شود.

نتیجه‌گیری

روش طراحی شده می‌تواند برای سنجش بنس‌آزید استفاده شود و قابلیت استفاده در نمونه سرم را دارد. همچنین نتایج نشان می‌دهد بنس‌آزید با مهار رقابتی فعالیت بیولومینسانسی اکورین را مهار می‌کند.

تشکر و قدردانی: از حمایت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: حسین رحمانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ رضا حسن‌ساجدی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتر بوده و با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Kricka LJ. Chemiluminescence and bioluminescence. *Anal Chem.* 1995;67(12):499-502.
- 2- Mirasoli M, Michelini E. Analytical bioluminescence and chemiluminescence. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(23):5529-30.
- 3- Head JF, Inouye S, Teranishi K, Shimomura O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature.* 2000;405(6784):372-6.
- 4- Hoffmann-La Roche Limited. Product monograph; PrPROLOPA®, levodopa and benserazide capsules; 2018.
- 5- Treseder SA, Rose S, Summo L, Jenner P. Commonly used L-amino acid decarboxylase inhibitors block monoamine oxidase activity in the rat. *J Neural Transm.* 2003;110(3):229-38.
- 6- Tu Y, Xu Q, Zou QJ, Yin ZH, Sun YY, Zhao YD. Electrochemical behavior of levodopa at multi-wall carbon nanotubes-quantum dots modified glassy carbon electrodes. *Anal Sci.* 2007;23(11):1321-4.

هیچ‌گونه دستکاری می‌تواند به‌عنوان آشکارساز معرفی شود. به‌علت حد تشخیص بسیار پایین در هنگام استفاده از اکورین، سهولت استفاده و پایداری آن، می‌تواند از این فتوپروتئین در بسیاری از کاربردهای بیوآنالیتیکال از قبیل شاخص کلسیم در سلول‌های زنده، تصویربرداری در "محیط زنده"، گزارشگر در تست‌های هیبریداسیون DNA، ایمونواسی و به‌عنوان مولد سیگنال در سیستم‌های سنجش سوئیچ مولکولی استفاده کرد [27].

سنجش اثر مهار آلیت‌ها توسط فتوپروتئین و استفاده از آن در جهت تعیین غلظت آلیت، برای اولین بار توسط هامورسکی و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شد که در آن اثر مهار سم پلی‌هیدروکسی پلی‌کلروبی فنیل (OH-PCB) بر اکورین سنجش و یک روش سنجش مناسب ارایه شد. دامنه آشکارسازی در این روش در حد ۱۳۲ نانومولار گزارش شد [28]. از آنجایی که در یک سنجش معمول براساس مهار، اتصال لیگاند نشان‌دار در یک غلظت ثابت در حضور غلظت‌های مختلف لیگاند بدون نشان، اندازه‌گیری می‌شود، بنابراین در اینجا کلنترازین به‌عنوان لیگاند نشان‌دار و آلیت مهارکننده به‌عنوان لیگاند بدون نشان عمل می‌کنند، زیرا اتصال پروتئین منجر به تولید نور شده و رقابت احتمالی آلیت می‌تواند موجب خاموشی فعالیت شود. از آنجایی که نور نشی رابطه مستقیم با غلظت آپو اکورین دارد در نتیجه برای افزایش حساسیت سیستم، غلظت آن باید تا حد ممکن پایین باشد و در عین حال کاهش نور نشی بر اثر رقابت با آلیت‌ها به‌خوبی مشاهده شود.

در این مطالعه نیز با همین رویکرد، غربالگری داروهای دارای اهمیت در TDM و با شباهت ساختاری با کلنترازین، انجام شد و فقط داروی بنس‌آزید که به‌عنوان مکمل در کنار لوودوپا برای درمان پارکینسون کاربرد دارد موجب مهار فعالیت لومینسانسی اکورین شد. نتایج نشان داد که نشر بیولومینسانس اکورین با افزایش غلظت بنس‌آزید در محدوده ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومولار با حد تشخیص ۷۹ نانومولار کاهش می‌یابد. از آنجایی که دوز مصرفی و غلظت بنس‌آزید در خون بین دامنه ۳۲ تا ۳۵/۹ میکرومولار است، بنابراین کاملاً قابل مقایسه با دامنه نمودار کالیبراسیون بنس‌آزید است که نشان می‌دهد روش مذکور قابلیت استفاده بالینی را دارد. قابلیت این روش برای سنجش بنس‌آزید در سرم نیز ثابت شده و بیانگر این است که روش ارایه‌شده می‌تواند حتی در ماتریکس پیچیده سرم نیز برای تعیین بنس‌آزید استفاده شود. تعیین مستقیم بنس‌آزید در سرم خون بدون تیمار اولیه با بازیابی قابل قبول در محدوده ۱۰۰±۳ انجام شد که پتانسیل بالای روش را برای اهداف تشخیصی نشان می‌دهد. به علاوه، نمودار دوز- پاسخ در حضور غلظت‌های مختلف کلنترازین تغییر می‌کند که این نشانه رفتار رقابتی مهارکننده است. به بیان دیگر احتمالاً جایگاه اتصال بنس‌آزید مشابه کلنترازین بوده و بررسی مکانیزم مهار توسط بنس‌آزید نشان می‌دهد مهار از نوع رقابتی است. در مطالعه قبلی ما، شبیه‌سازی داکینگ به‌منظور بررسی باقی‌مانده‌های درگیر در اتصال به آلیت انجام شد. نتایج نشان داد آلیت می‌تواند با برهمکنش با تعدادی از باقی‌مانده‌های حاضر در حفره اکورین در برهمکنش

- application in analytical chemistry. *Chin Chem Lett.* 2006;17(9):1233-5.
- 18- Wabaidur SM, Alam SM, Khan MA. Voltammetric determination of benserazide in pharmaceutical formulations using polymer modified electrode. *Appl Chem.* 2008;12(1):85-8.
- 19- Pérez-Ortiz M, Bollo S, Zapata-Urzuá C, Yáñez C, Alvarez-Lueje A. Voltammetric study and direct analytical determination of the antiparkinson drug benserazide. *Anal Lett.* 2011;44(9):1683-98.
- 20- Dai Y, Sangerman J, Luo HY, Fucharoen S, Chui DHK, Faller DV, et al. Therapeutic fetal-globin inducers reduce transcriptional repression in hemoglobinopathy erythroid progenitors through distinct mechanisms. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;56(1):62-9.
- 21- Jalilian N, Sajedi RH, Shanehsaz M, Gharaat M. CdTe quantum dots with green fluorescence generated by bioluminescence resonance energy transfer from aequorin. *Microchim Acta.* 2017;184(3):753-62.
- 22- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
- 23- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- 24- Saha S, Sarkar P, Turner AP. Interference-free electrochemical detection of nanomolar dopamine using doped polypyrrole and silver nanoparticles. *Electroanalysis.* 2014;26(10):2197-206.
- 25- Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean J Intern Med.* 2009;24(1):1-10.
- 26- Siemens. Therapeutic drug monitoring (TDM): An educational guide [Internet]. Munich: Siemens; 2009 [cited 2019 May 20]. Available from: <https://bit.ly/2IUSjPr>
- 27- Hamorksy KT. Genetically engineered aequorin for the development of novel bioanalytical systems [Dissertation]. Lexington: University of Kentucky; 2011.
- 28- Teasley Hamorsky K, Ensor CM, Dikici E, Pasini P, Bachas L, Daunert S. Bioluminescence inhibition assay for the detection of hydroxylated polychlorinated biphenyls. *Anal Chem.* 2012;84(18):7648-55.
- 29- Rahmani H, Sajedi RH. Aequorin as a sensitive and selective reporter for detection of dopamine: A photoprotein inhibition assay approach. *Int J Biol Macromol.* 2019;122:677-83.
- 7- Viswanathan S, Liao WC, Huang CC, Hsu WL, Ho JA. Rapid analysis of L-dopa in urine samples using gold nanoelectrode ensembles. *Talanta.* 2007;74(2):229-34.
- 8- Xiang C, Zou Y, Xie J, Fei X. Voltammetric determination of L-dopa using a carbon nanotubes-Nafion modified glassy carbon electrode. *Anal Lett.* 2006;39(13):2569-79.
- 9- Blanco-López MC, Lobo-Castañón MJ, Miranda Ordieres AJ, Tuñón-Blanco P. Electrochemical behavior of catecholamines and related compounds at in situ surfactant modified carbon paste electrodes. *Electroanal Int J Devot Fundam Pract Asp Electroanal.* 2007;19(2-3):207-13.
- 10- Blanco M, Valverde I. Chiral and non chiral determination of Dopa by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;31(3):431-8.
- 11- Chamsaz M, Safavi A, Fadaee J. Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbidopa, levodopa and methyl-dopa in the presence of citrate with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks. *Anal Chim Acta.* 2007;603(2):140-6.
- 12- Madrakian T, Mohammadnejad M. Simultaneous spectrophotometric determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical formulations and water samples by using mean centering of ratio spectra and H-point standard addition methods. *Chem Pharm Bull.* 2007;55(6):865-70.
- 13- Zhao Sh, Bai W, Wang B, He M. Determination of levodopa by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Talanta.* 2007;73(1):142-6.
- 14- Karpińska J, Smyk J, Wołyniec E. A spectroscopic study on applicability of spectral analysis for simultaneous quantification of l-dopa, benserazide and ascorbic acid in batch and flow systems. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2005;62(1-3):213-20.
- 15- Pistonesi M, Centurión ME, Fernández Band BS, Damiani PC, Olivieri AC. Simultaneous determination of levodopa and benserazide by stopped-flow injection analysis and three-way multivariate calibration of kinetic-spectrophotometric data. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(3):541-7.
- 16- Wang J, Zhou Y, Liang J, He PG, Fang YZ. Determination of levodopa and benserazide hydrochloride in pharmaceutical formulations by CZE with amperometric detection. *Chromatographia.* 2005;61(5-6):265-70.
- 17- Lu JQ, He WW, Zhou XW. Chemiluminescence of luminol-potassium ferricyanide with benserazide and