Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Measurement of Glutamate Neurotransmitter in the Brain of Male Rat Using Glutamate Oxidase-Based Electrochemical Biosensor

Faezeh Faraji [1], Hassan Tavakoli [2*], Mahvash Jafari [3], Akram eidi [1], Adeleh Divsalar [4]

[1] Dept of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Radiation Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Dept of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 14 December 2022
Revised: 19 February 2023
Accepted: 05 March 2023
Published Online:30 May 2023

**** Correspondence to:***
Hassan Tavakoli
Radiation Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email:
Tavakoli@bmsu.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Glutamate oxidase (GluOx; EC 1.4.3.11), as an oxidoreductase enzyme, catalyzes the oxidation of glutamate to α-ketoglutarate, ammonia, and hydrogen peroxide (H_2O_2). In this reaction, the amount of H_2O_2 is proportional to the concentration of glutamate and its concentration can be measured by using an electrochemical biosensor. The same as other enzyme-based biosensors, glutamate oxidase is one of the key elements in the construction of glutamate biosensors. Such biosensors are fully capable of identifying biological analytes, such as glutamine, ammonia, and creatinine. In addition, glutamate oxidase-based biosensors have many applications in quantitative and qualitative measurements in analytical chemistry, determining the quality of food products, as well as early detection of heart and liver disorders in clinical biochemistry. Considering the importance of the glutamate neurotransmitter in various brain functions, this study investigated its measurement in the brain of male Wistar rats by using a glutamate oxidase-based biosensor.

Material & Methods: In order to measure glutamate, initially, a glutamate oxidase-based biosensor was made by simultaneously immobilizing the enzyme and chitosan on the platinum electrode surface. Then, the animals were sacrificed, and their brains were removed and placed in a phosphate buffer. Afterward, the contents of the brain were centrifuged to create a completely uniform mixture. Finally, the concentration of glutamate in the prepared brain samples was measured using the fabricated biosensor by the cyclic voltammetry technique.

Findings: The results of cyclic voltammetry experiments showed that the cathodic peak current of the fabricated biosensor was 0.812 µA. Moreover, the calibration curve indicated that the biosensor response was linear up to 1 mM and glutamate concentration in brain samples was also equal to 63.5 µM.

Discussion & Conclusion: The cyclic voltammetry experiments showed that the concentration of H2O2, which is produced during the catalytic activity of glutamate oxidase, is completely proportional to the concentration of glutamate oxidase. Furthermore, this study showed that, despite the very low concentration of glutamate neurotransmitters, the glutamate oxidase-based electrochemical biosensor can precisely identify it qualitatively and quantitatively in biological samples, such as brain samples.

Keywords: Chitosan, Cyclic voltammetry, Electrochemical biosensor, Glutamate oxidase, Glutamate

➢ **How to cite this paper**
Faraji F, Tavakoli H, Jafari M, Eidi A, Divsalar A. Measurement of Glutamate Neurotransmitter in the Brain of Male Rat Using Glutamate Oxidase-Based Electrochemical Biosensor. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(2): 65-75.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

اندازه‌گیری نوروترانسمیتر گلوتامات در مغز موش صحرایی نر با استفاده از زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز

فائزه فرجی[۱]، حسن توکلی[۲*]، مهوش جعفری[۳]، اکرم عیدی[۱]، عادله دیوسالار[۴]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

[۲] مرکز تحقیقات آسیب‌های تابشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

[۳] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

[۴] گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

نویسنده مسئول:

حسن توکلی

مرکز تحقیقات آسیب‌های تابشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

Email:

Tavakoli@bmsu.ac.ir

چکیده

مقدمه: گلوتامات اکسیداز (GluOx; EC 1.4.3.11)، به عنوان یک آنزیم اکسیدوردوکتاز، اکسیداسیون گلوتامات را به آلفا-کتوگلوتارات، آمونیاک و هیدروژن پراکساید (H_2O_2) کاتالیز می‌کند. در این واکنش مقدار H_2O_2 متناسب با غلظت گلوتامات بوده و به وسیله‌ی زیست حسگر الکتروشیمیایی قابل ردیابی است. مانند سایر زیست حسگرهای مبتنی بر آنزیم، گلوتامات اکسیداز یکی از عناصر کلیدی در ساخت زیست حسگرهای گلوتامات است. همچنین این حسگرهای زیستی توانایی شناسایی آنالیت‌های بیولوژیکی مانند گلوتامین، آمونیاک و کراتینین را دارا هستند. حسگرهای زیستی مبتنی بر گلوتامات اکسیداز در اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی در شیمی تجزیه، تعیین کیفیت محصولات غذایی و تشخیص زود هنگام اختلالات قلبی و کبدی در بیوشیمی بالینی نیز کاربردهای زیادی دارند. با توجه به اهمیت نوروترانسمیتر عصبی گلوتامات در عملکردهای مختلف مغز، در این مطالعه اندازه‌گیری آن در مغز موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با استفاده از حسگر زیستی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: برای اندازه‌گیری گلوتامات، ابتدا یک حسگر زیستی مبتنی بر گلوتامات اکسیداز با تثبیت همزمان آنزیم و چیتوسان بر روی سطح الکترود پلاتینی ساخته شد. سپس حیوانات قربانی و مغز آن‌ها خارج شده و در بافر فسفات قرار گرفت. سپس بافر فسفات محتوی مغز سانتریفوژ شده تا مخلوطی کاملاً یکنواخت ایجاد شود. در نهایت، غلظت گلوتامات در نمونه‌های مغز با استفاده از زیست حسگر ساخته شده با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای نشان داد که پیک جریان کاتدی زیست حسگر ساخته شده ۰/۸۱۲ µA بود. همچنین منحنی کالیبراسیون حاکی از آن بود که پاسخ حسگر زیستی تا ۱ mM خطی بوده و غلظت گلوتامات در نمونه‌های مغزی برابر با ۶۳/۵ µM بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری: آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای نشان داد که غلظت H2O2 تولید شده در طی فعالیت کاتالیتیکی گلوتامات اکسیداز، کاملاً متناسب با غلظت گلوتامات است. همچنین، این مطالعه نشان داد علی‌رغم غلظت بسیار ناچیز نوروترانسمیتر گلوتامات، زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر گلوتامات اکسیداز می‌تواند به طور دقیق آن را از نظر کیفی و کمی در نمونه‌های بیولوژیکی مانند مغز شناسایی کند.

واژه‌های کلیدی: گلوتامات، گلوتامات اکسیداز، زیست حسگر الکتروشیمیایی، ولتا متری چرخه‌ای، چیتوسان

استناد: فرجی، فائزه؛ توکلی، حسن؛ جعفری، مهوش؛ عیدی، اکرم؛ دیوسالار، عادله. اندازه‌گیری نوروترانسمیتر گلوتامات در مغز موش صحرایی نر با استفاده از زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۲؛۳۱(۲): ۷۵-۶۵.

مقدمه

گلوتامات یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای تحریکی در سیستم اعصاب مرکزی بوده که نقش مهمی در عملکردهای مختلف عصبی ایفا می‌کند. برای مثال گلوتامات در عملکردهای شناختی همچون یادگیری و حافظه نقش مهمی را ایفا می نماید و از این نظر یک آنالیت مهم در پزشکی محسوب می‌شود (۱-۳). مطالعات نشان داده است که سطح بالای گلوتامات خارج سلولی در طولانی‌مدت یک عامل سمی محسوب شده و در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود. تغییرات گلوتامات در بیماری صرع، در پیدایش و گسترش تشنج، بیماری‌های نورودژنراتیو همچون آلزایمر و پارکینسون نیز نقش مهمی را بر عهده دارد (۴-۷). به دلیل چنین نقش‌های مهم عملکردی گلوتامات در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، اندازه‌گیری دقیق آن در نمونه‌های بیولوژیکی از جمله مغز مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (۸, ۹).

تاکنون روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی، اسپکتروفوتومتری و فلورومتری برای اندازه‌گیری گلوتامات، توسعه پیدا کرده‌اند. هر یک از روش‌های مذکور، علاوه بر حساسیت پایین، دارای محدودیت‌های دیگری از جمله هزینه‌ی بالا، نیاز به نیروی انسانی متخصص و مجرب، تیمار نمونه‌های اندازه‌گیری قبل از آزمایش و صرف زمان زیاد نیز هستند (۱۰-۱۴). روش‌های الکتروشیمیایی به خاطر سادگی، سرعت بالای انجام روش، حساسیت و گزینش پذیری بالا، یکی از کارآمدترین روش‌های اندازه‌گیری گلوتامات می‌باشند (۱۵, ۱۶). همراه با پیشرفت در فناوری زیست حسگرها، استفاده از آن‌ها در اندازه‌گیری آنالیت‌های مختلف رواج پیدا کرد (۱۷, ۱۸). علاوه بر این در زمینه کاربرد زیست حسگرهای الکتروشیمیایی برای سنجش نمونه‌های بیولوژیک همچون نوروترانسمیترهای گلوتاماتی، روش‌های تثبیت آنزیم بر روی الکترود به منظور طراحی و بهینه کردن عملکرد زیست حسگرها، یکی از چالش‌های مهم استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی می‌باشد (۱۹). یکی از روش‌های مرسوم برای تثبیت آنزیم استفاده از پلیمرهایی همچون چیتوسان است که توانایی تشکیل شبکه بر سطح الکترود را دارا هستند. چیتوسان با ایجاد شبکه‌های گسترده و به دام انداختن آنزیم در درون این شبکه‌ها، به عامل مناسبی برای تثبیت آنزیم در ساختار زیست حسگر تبدیل شده است (۲۰).

آنزیم گلوتامات اکسیداز (GluOx; EC 1.4.3.11) یک پروتئین آنزیمی متعلق به خانواده اکسیدوردوکتازها می‌باشد که به طور ویژه و اختصاصی عمل اکسیداتیو د-آمیناسیون گلوتامات به عنوان سوبسترا در حضور آب و اکسیژن به آلفا-کتوگلوتارات، آمونیاک و H_2O_2 را کاتالیز می‌کند. H_2O_2 تولیدی الکترواکتیو بوده و می‌تواند به راحتی توسط روش‌های الکتروشیمیایی مورد شناسایی و تشخیص قرار گیرد (۲۱-۲۳).

با توجه به نقش حیاتی گلوتامات در عملکرد مغز و بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های نورودژنراتیو، اندازه‌گیری دقیق آن به لحاظ پاتوبیولوژیکی و کلینیکی ضروری است. در این مطالعه برای آماده‌سازی زیست حسگر الکتروشیمیایی به منظور اندازه‌گیری گلوتامات، آنزیم گلوتامات اکسیداز همراه با چیتوسان به روش لایه‌نشانی بر سطح الکترود پلاتینی تثبیت شد.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات :چیتوسان (با وزن مولکولی ۱۰۰۰KD و ۸۰٪ د-آستیل شده)، گلوتامات اکسیداز (۱۰Unit/mg)، ال-گلوتامات، از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی نوروترانسمیتر گلوتامات توسط روش ولتامتری چرخه‌ای و با استفاده از دستگاه پتانسیو استات/گالوانواستات (اتولب، مدل ۳۰۲ N، ساخت شرکت Autolab هلند) همراه با سیستم سه الکترودی، متشکل از سیم پلاتین به عنوان الکترود کمکی، الکترود نقره/نقره کلرید به عنوان الکترود مرجع و الکترود اصلاح شده پلاتینی به وسیله چیتوسان/گلوتامات اکسیداز به عنوان الکترود کار، انجام شد. آزمایش‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت (۲۱-۲۳). موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) رعایت و با کد اخلاق

IR.BMSU.BAQ.REC.1401.015 تایید شد. تمامی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد. نرم افزار به کار رفته SPSS نسخه ۲۲ بود و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

ساخت زیست حسگر: محلول ۰/۱ درصد وزنی حجمی چیتوسان با حل کردن پودر چیتوسان در هیدروکلریک اسید M ۰/۱ و دمای ۸۰ الی ۹۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. سپس محلول چیتوسان از صافی گذرانده و pH آن به ۴/۵ رسید. در ادامه مخلوطی متشکل از ۲۰µL محلول ۰/۱ درصد وزنی حجمی چیتوسان به همراه ۱۰µL آنزیم گلوتامات اکسیداز که در بافر فسفات پتاسیم M ۰/۱ و pH ۷/۴ آماده سازی شده، بر سطح صفحه الکترود پلاتینی قرار گرفت و اجازه داده شد تا به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق خشک شود. پس از گذشت ۲ ساعت از قرارگیری مخلوط چیتوسان و آنزیم گلوتامات اکسیداز بر سطح الکترود پلاتین رسوب ژلاتینی بر سطح الکترود نمایان شد (۱۹). این الکترود در واقع الکترود کار سیستم اندازه‌گیری الکتروشیمیایی را در دستگاه اتولب تشکیل می‌دهد. به منظور خارج کردن آنزیم‌های تثبیت نشده بر سطح الکترود کار، الکترود درون محلول بافر فسفات M ۰/۱ (pH ۷/۴) قرار گرفت. نگهداری الکترود کار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون بافر فسفات صورت می‌پذیرد. بدین صورت زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز طراحی و آماده شد.

بررسی صحت عملکرد زیست حسگر: برای ارزیابی پاسخ‌های زیست حسگر ساخته شده، ابتدا غلظت ۲۵۰µM H_2O_2 به بافر فسفات mM ۱۰۰ اضافه شد. سپس ولتامتری چرخه‌ای در محدوده‌ی ولتاژی بین ۰ تا 1 V+ با سرعت روبش ۱۰ mV/s، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴ انجام شد. برای ارزیابی حساسیت زیست حسگر به نوروترانسمیتر گلوتاماتی، در غیاب H_2O_2، گلوتامات با غلظت mM ۱ به عنوان سوبسترای آنزیم به درون بافر فسفات اضافه شده و با همان شرایط قبلی مجدداً ولتامتری چرخه‌ای انجام شد.

بررسی عملکرد زیست حسگر در غلظت‌های مختلف گلوتامات: برای بررسی عملکرد زیست حسگر ساخته شده، غلظت‌های مختلفی از گلوتامات بین µM ۶۳ تا mM ۱ تهیه شده و به‌وسیله‌ی سمپلر به درون سل الکترو شیمیایی محتوی بافر فسفات M ۰/۱ اضافه شد. با اضافه شدن گلوتامات و انجام واکنش آنزیمی، H_2O_2 تولید شده به روش ولتامتری چرخه‌ای اندازه گیری شد. ولتامتری چرخه‌ای نیز توسط دستگاه پتانسیو استات/گالوانو استات از پتانسیل ۰ تا V 1+، به همراه الکترود نقره/ نقره کلرید به عنوان الکترود مرجع و الکترود پلاتین به عنوان الکترود کمکی و الکترود پلاتین/چیتوسان/گلوتامات اکسیداز به عنوان الکترود کار در محدوده پتانسیلی ۰ تا 1 V+ همراه با سرعت روبش ۱۰ mV/s، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴ انجام شد.

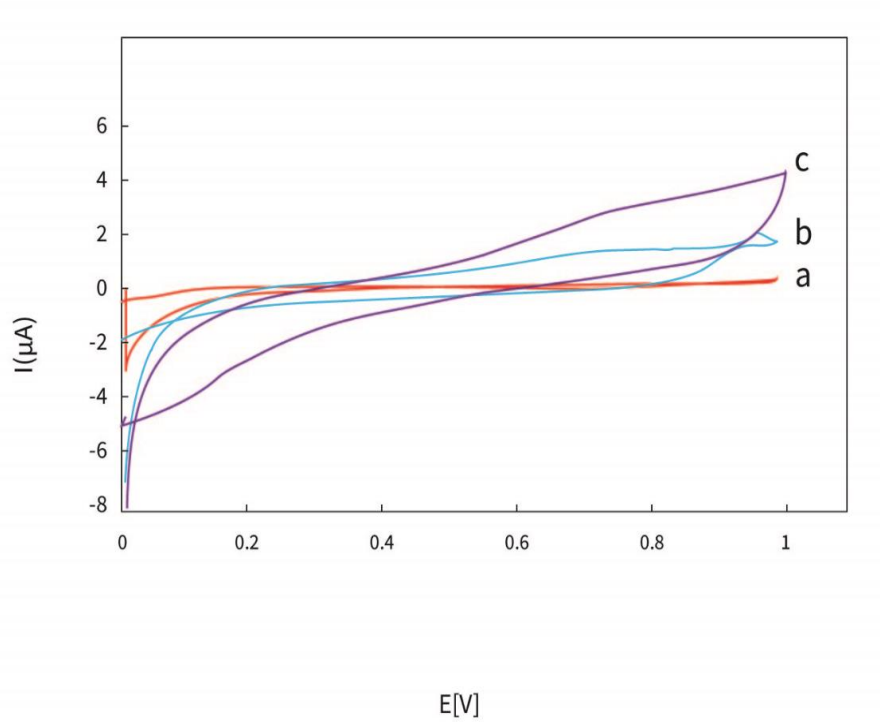
اندازه‌گیری گلوتامات در نمونه‌های مغز موش : برای اندازه‌گیری غلظت گلوتامات در مغز موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار، ابتدا به روش پرفیوژن ترانس کاردیالی حیوان کشته شده و سپس با جدا کردن سر و خارج کردن جمجمه و شکافت آن، مغز کامل حیوان خارج شد. سپس مغز در ml ۳ بافر فسفات M ۰/۱ قرار گرفته و با دور ۴۰۰۰ کاملاً هموژنیزه شد (شکل شماره ۱. تصویر الف و ب) (۲۴). سپس محلول هموژنیزه از درون صافی واتمن عبور کرده و محلول به‌دست آمده برای سنجش الکتروشیمیایی گلوتامات با استفاده از زیست حسگر ساخته شده، مورد استفاده قرار گرفت.

الف ب

شکل شماره ۱. الف) کشتن حیوان به روش پرفیوژن ترانس کاردیالی ب) مغز کامل خارج شده‌ی حیوان

یافته های پژوهش

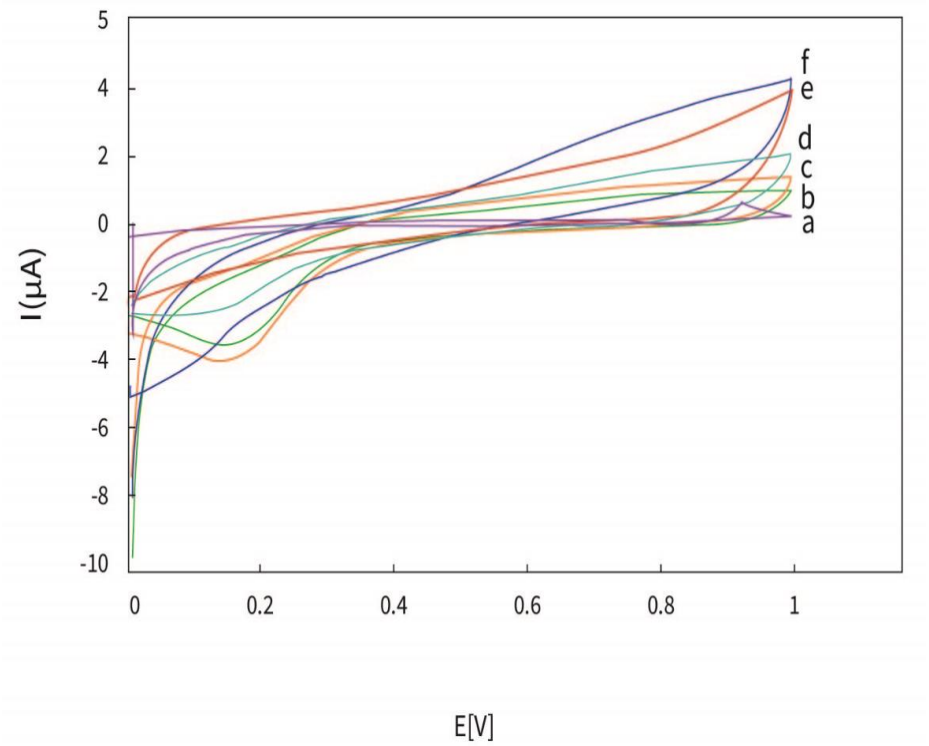
عملکرد زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز: پاسخ‌های زیست حسگر در حضور H2O2و گلوتامات هر یک به طور جداگانه در درون بافر فسفات ۱۰۰ mM به روش ولتامتری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۲). ولتاموگرام‌های به‌دست آمده به عنوان پاسخ‌های زیست حسگر(ولتاموگرام‌های 2 . bو2 . c) نشان داده شده است. همچنین در این شکل ولتاموگرام 2 . a به عنوان منحنی پایه در نظر گرفته شد .



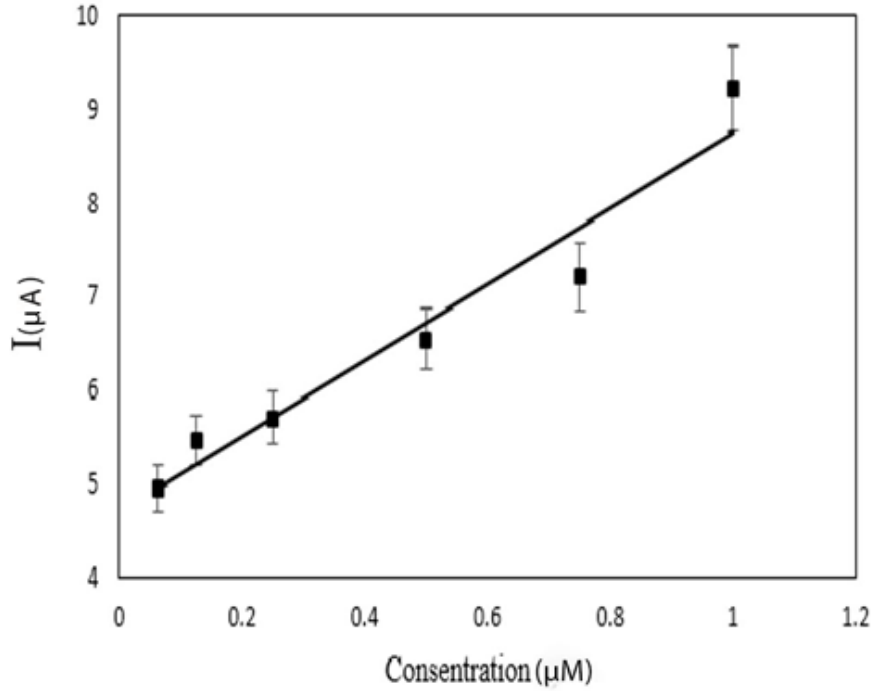
شکل شماره ۲. ولتاموگرام منحنی پایه (a)، ولتاموگرام زیست حسگر مبتنی بر گلوتامات اکسیداز در غلظت ۲۵۰ µM از (b) H_2O_2، ولتاموگرام زیست حسگر مبتنی بر گلوتامات اکسیداز در غلظت ۱ mM گلوتامات (c)، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴

منحنی کالیبراسیون: برای ترسیم منحنی کالیبراسیون، عملکرد زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز در غلظت‌های مختلف گلوتامات با استفاده از ولتامتری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفته و ولتاموگرام‌های به‌دست آمده به‌عنوان پاسخ‌های زیست حسگر در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. برای رسم

منحنی استاندارد برای افزایش دقت کار، از هر غلظت سه نمونه تهیه شد. از میانگین-های به‌دست آمده از پیک‌های کاتدی در هر سه نمونه‌ی مربوط به یک غلظت، برای ترسیم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (شکل شماره ۴)(۲۵).



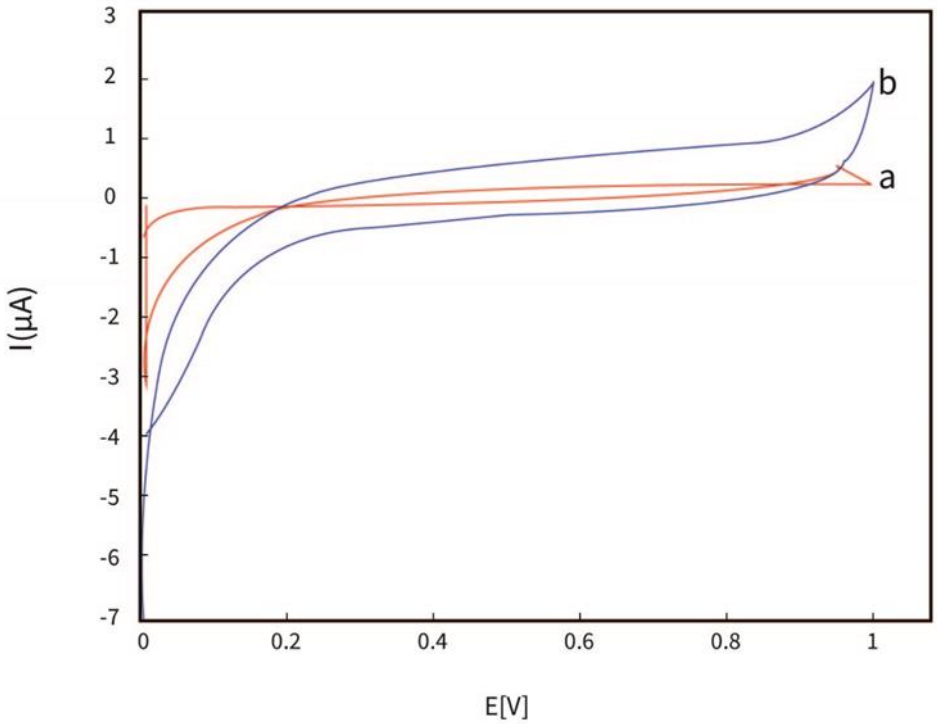
شکل شماره ۳ . ولتاموگرام‌های ثبت شده از زیست حسگر مبتنی بر گلوتامات اکسیداز در غلظت‌های مختلف گلوتامات، غلظت ۱ mM(f) ، ۷۵۰ µM(e)، ۵۰۰ µM(d)، ۲۵۰ µM(c)، ۱۲۵ µM(b)، ۶۳ µM(a) ، دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴



شکل شماره ٤. منحنی کالیبراسیون زیست حسگر مبتنی بر گلوتامات اکسیداز در غلظت‌های مختلف گلوتامات

اندازه‌گیری گلوتامات در نمونه‌ی مغزی : بررسی عملکرد زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم

گلوتامات اکسیداز در نمونه‌ی مغزی، با قرارگیری زیست حسگر در ml ۲ از نمونهی مغزی تازه، همراه با استفاده از تکنیک ولتامتری چرخه‌ای و جمع‌آوری ولتاموگرام‌های چرخه‌ای مربوطه در محدوده ۰ تا1 V+ با سرعت روبش ۱۰ mV/s انجام شد (شکل شماره ۵). جریان کاتدی به‌دست آمده در محدوده ۰ تا1 V+ به عنوان شاخص شناسایی گلوتامات در نظر گرفته شد. به منظور تعیین مقدار گلوتامات، این میزان جریان در معادله قرار داده شد (۲۵).



شکل شماره ۵. ولتاموگرام منحنی پایه (a)، ولتاموگرام‌های زیست حسگر مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز در نمونه‌ی مغز (b)، دما ۲۵ درجه سانتی-گراد و pH ۷/۴

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجایی که میزان رهایش نوروترانسمیترهایی همچون گلوتامات در بسیاری از حوزه‌های پژوهشی مانند علوم اعصاب، علوم شناختی، حافظه و یادگیری، صنایع غذایی، شیمی تجزیه و بیوشیمی بالینی از اهمیت بسزایی برخوردار است، استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی می‌تواند نتایج دقیقی در شناسایی کمی و کیفی نوروترانسمیترها ارائه نماید (۵, ۱۱). به دلیل مزیت‌های مهم زیست حسگرهای الکتروشیمیایی در مقایسه با سایر روش‌های اندازه‌گیری مانند کروماتوگرافی، اسپکتروفوتومتری و فلورومتری، در این پژوهش زیست حسگر مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز طراحی، ساخته و پارامترهای آنالیتیکی آن بررسی شد (۱۰-۱۴). نتایج تحقیقات انجام شده توسط چانگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ و همچنین مطالعات گانسانا و همکاران در سال ۲۰۱۹، تأیید کننده‌ی جایگزینی مناسب زیست حسگرهای مبتنی بر آنزیم با روش‌های اندازه‌گیری همچون کروماتوگرافی می‌باشد که با نتایج مطالعات ما همخوانی دارد (۱۵, ۱۹). الکترودهای آنزیمی نسل جدیدی از زیست حسگرها را بر اساس انتقال مستقیم الکترون بین آنزیم و الکترود ایجاد کردند. در میان این الکترودها، الکترود پلاتین با ایجاد سطح بیشتر و همچنین توانایی فوق‌العاده در انتقال الکترون در یک گستره‌ی وسیع از گونه‌های الکترواکتیو مانند H_2O_2، نسبت به سایر الکترودها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (۱۹, ۲۱).

در مطالعات چانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶، استفاده از بیوپلیمر چیتوسان برای تثبیت آنزیم گلوتامات اکسیداز بر سطح الکترودهای پلاتینی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش حاضر که نشان

دهنده‌ی یک تثبیت قوی غیر کووالان بین آنزیم گلوتامات اکسیداز و سطح الکترود پلاتینی توسط پلیمر چیتوسان می‌باشد با نتایج گزارشات قبلی مطابقت دارد (۱۹, ۲۰).

همچنین مطالعات انجام شده توسط تسنگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ که در آن زیست حسگر گلوتاماتی بر اساس تثبیت آنزیم گلوتامات اکسیداز با تکنیک جذب روی چیتوسان الکترودیپوزیشن تهیه شد، دارای زمان پاسخگویی سریع بوده که تأیید کننده و همسو با یافته‌های ما در پژوهش حاضر است (۲۱). بدین ترتیب اتصال پلیمر چیتوسان بر سطح الکترود پلاتینی اجازه طراحی و ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز را فراهم آورد.

در مطالعه‌ی حاضر، قربانی کردن حیوان به روش پرفیوژن ترانس کاردیالی و استخراج مغز موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار به ترتیب در شکل شماره ۱. الف و شماره ۱. ب نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل شماره ۱. ب مشاهده می‌شود مغز حیوان به طور کامل و بدون هیچ گونه اثری از لخته‌های خونی خارج شد که حاکی از موفقیت آمیز بودن استفاده از روش پرفیوژن ترانس کاردیالی برای استخراج مغز بوده است. در این پژوهش توجه به این به موضوع حائز اهمیت بود که وجود هرگونه لخته‌ی خونی ممکن است در اندازه‌گیری دقیق نوروترانسمیتر گلوتامات اختلال ایجاد نماید (۲۴).

پس از آن برای ارزیابی عملکرد زیست حسگر ساخته شده‌ی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز، ابتدا پاسخ زیست حسگر در بافر فسفات با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که در شکل شماره ۲ (ولتاموگرام a. 2) مشاهده می‌شود، در پاسخ به‌دست آمده هیچ گونه قله‌ی جریانی مشاهده نمی‌شود که به دلیل عدم وجود عامل الکترواکتیو کاملاً این پاسخ مورد انتظار بود. لازم به توضیح است که این منحنی به عنوان منحنی پایه یا مرجع در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. شکل شماره ۲ (ولتاموگرام b. 2)، پاسخ زیست حسگر در حضور H_2O_2 را نشان می‌دهد. افزایش جریانی که در ولتاژ ۱V اتفاق افتاده است به دلیل ویژگی الکترواکتیو بودن H_2O_2 می‌باشد که به‌خوبی در سطح زیست حسگر واکنش ردوکس را انجام داده است. نکته حائز اهمیت آن است که با اضافه نمودن گلوتامات و انجام واکنش آنزیمی که تولید H_2O_2 را به عنوان محصول واکنش به همراه دارد، پیک قابل توجهی در همین محدوده‌ی ولتاژی مشاهده شد (شکل شماره ۲، ولتاموگرام c. 2).

این موضوع تأییدی برای مکانیسم شناخته شده‌ی سنجش غلظت گلوتامات بر اساس تولید گونه‌ی الکترواکتیو H_2O_2 طی واکنش آنزیمی بین آنزیم گلوتامات اکسیداز موجود در سطح الکترود پلاتین و گلوتامات موجود در نمونه طبق واکنش آنزیمی زیر می‌باشد.

$$\mathrm{Glutamate} + \mathrm{O_2} + \mathrm{H_2O} \xrightarrow{\mathrm{GluOx}} \mathit{Ketoglutarate} + \mathrm{NH_3} + H_2O_2$$

بر اساس این واکنش، میزان تولید H_2O_2 متناسب با غلظت گلوتامات موجود در نمونه‌های مغزی است که توسط آنزیم گلوتامات اکسیداز مورد اکسیداسیون قرار می‌گیرد (۱۸, ۱۹). به این ترتیب زیست حسگر ساخته شده به‌خوبی توانایی شناسایی کمی و کیفی گلوتامات را دارا می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر با بسیاری از گزارش‌هایی که تاکنون در مورد شناسایی گلوتامات با استفاده از زیست حسگرهای الکتروشیمیایی منتشر شده‌اند، کاملاً همخوانی دارد (۱۹, ۲۱).

برای ترسیم منحنی کالیبراسیون زیست حسگر، ابتدا ولتاموگرام‌های حاصل از آزمایش ولتامتری چرخه‌ای در غلظت‌های مختلف گلوتامات اندازه‌گیری شد. در شکل شماره ۳ پاسخ زیست حسگر در غلظت‌های مختلف گلوتامات، بین ۶۳ µM تا ۱ mM نشان داده شده است. همان طور که در این شکل مشاهده می‌شود با افزایش غلظت گلوتامات در محلول بافر فسفات، میزان جریان کاتدی تولیدی نیز افزایش پیدا می‌کند. این امر به‌دلیل افزایش

اکسیداسیون گلوتامات اکسیداز موجود بر سطح الکترود پلاتین می‌باشد. بدین ترتیب هر چه مقدار گلوتامات در محلول بیشتر باشد، میزان جریان کاتدی نیز افزایش پیدا می‌کند. این نتایج با پژوهش‌های انجام شده در این زمینه، همچون مطالعات بوریسووا و همکاران در سال ۲۰۱۸، سیمسک و همکاران در سال ۲۰۱۶ و چانگ و همکاران در سال ۲۰۰۶، مطابقت دارد (۱۷, ۱۸, ۲۵).

با توجه به اطلاعات حاصل از ولتاموگرام‌های مربوط به عملکرد زیست حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر آنزیم گلوتامات اکسیداز در غلظت‌های مختلف گلوتامات، منحنی کالیبراسیون زیست حسگر به صورت تغییر جریان نسبت به تغییر غلظت گلوتامات ترسیم و در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که پاسخ‌های زیست حسگر تا غلظت ۱ mM گلوتامات، خطی می‌باشد. نقاط موجود در نمودار (شکل شماره ۴)، جریان قله‌های کاتدی به ازای غلظت‌های مختلف گلوتامات است. معادله خط تشکیل شده برابر است با:

$$I = ۴/۰۷۲\ C + ۴/۶۸۲$$

در این رابطه (I) همان جریان قله برحسب µA و (C) غلظت گلوتامات برحسب mM است. این معادلهی خط برای محاسبه‌ی غلظت گلوتامات در نمونه‌های مغزی نیز استفاده می‌شود. پس از ترسیم منحنی کالیبراسیون، زیست حسگر برای شناسایی کمی محتوای گلوتامات موجود در نمونه‌ی مغزی تهیه شده از موش نر ویستار مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، همان گونه که در شکل شماره ۵ نشان داده شده است، ابتدا منحنی پایه زیست حسگر در غیاب نمونه‌ی مغزی در درون بافر فسفات به تنهایی با استفاده از آزمایش ولتامتری چرخه ترسیم شد. پس از آن زیست حسگر در نمونه‌ی مغزی به‌دست آمده از موش نر نژاد ویستار قرار گرفت. جریان کاتدی به دست آمده در محدوده ۰ تا1 V+ به عنوان شاخص شناسایی گلوتامات در نظر گرفته شده و در معادله‌ی بالا قرار داده شد. بر این اساس، میزان غلظت گلوتامات در نمونه‌ی مغزی برابر ۶۳/۵ µM محاسبه گردید.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، این زیست حسگر به طور موفقیت آمیزی توانایی شناسایی و تشخیص نوروترانسمیتر گلوتامات و همچنین اندازه‌گیری آن در نمونه‌های بیولوژیکی و آنالیتیکی را دارا است. با توجه به محدودیت‌های موجود در سایر روش‌های اندازه‌گیری گلوتامات، در این مطالعه سعی شد با ساخت زیست حسگری ارزان قیمت، سریع و دقیق، امکان تشخیص و اندازه‌گیری گلوتامات در نمونه‌های بیولوژیکی فراهم گردد. به عبارت دیگر، استفاده از مواد ارزان و قابل دسترس، پارامترهای آنالیتیکی مناسب، آماده‌سازی در کمترین زمان ممکن، پایداری طولانی‌مدت زیست حسگر، امکان استفاده از آن در شرایط بیولوژیک و حتی بالینی، سبب شده است تا زیست حسگری که در این طرح پژوهشی طراحی و ساخته شده در مقایسه با سایر زیست حسگرهای مشابه از مزیت‌های بسیار عالی برخوردار باشد (۱۵-۲۱)

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از کار پژوهشی است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شده است. بدین وسیله پژوهشگران از تمام عزیزانی که در این کار همکاری داشتند، مراتب تقدیر و تشکر خود را اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق

موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) رعایت و با کد اخلاق IR.BMSU.BAQ.REC.1401.015 تایید شد.

References

1. Gasparini C, Smith R, Griffiths L. Biochemical studies of the neurotransmitter glutamate: A key player in migraine. Austin J Clin Neurol 2015; 2: 1079 1-8.
2. Nguyen TN, Nolan JK, Park H, Lam s, Fattah M, Page JC, et al. Facile fabrication of flexible glutamate biosensor using direct

writing of platinum nanoparticle-based nanocomposite ink. Biosens Bioeletron X 2019; 131: 257-66. doi:10.1016/j.bios.2019.01.051.
3. Meng L,Wu G, Chen G, Cai C, Sun Y , Yuan Z. Low potential detection of glutamate based on the electrocatalytic oxidation of NADH at thionine/single-walled carbon nanotubes composite modified electrode. Biosens Bioelectron X 2009; 24: 1751-56. doi:10.1016/j.bios.2008.09.001.
4. Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease. CNS drugs 2003; 17: 641-52. doi:10.2165/00023210-200317090-00004.
5. Lewerenz J, Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-what is the evidence? Front Neurosci 2015; 9: 469. doi:10.3389/fnins.2015.00469.
6. Paulose C, Amee K, Anu J. Neurotransmitters functional balance in neurodegenerative disease management: Recent Advances. Sci Soc 2006; 5: 23-30.
7. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch 2010; 460: 525-42. doi:10.1007/s00424-010-0809-1.
8. Black DW, Andreasen NC. Introductory textbook of psychiatry. American Psychiatric Pub 2011.
9. Batra B, Yadav M, Pundir CS. l-Glutamate biosensor based on l-glutamate oxidase immobilized onto ZnO nanorods/polypyrrole modified pencil graphite electrode. Biochem Eng J 2016; 105: 428-36. doi:10.1016/j.bej.2015.10.012.
10. Dorozhko E, Korotkova EI, Shabaeva AA, Mosolkov AY. Electrochemical determination of L-glutamate on a carbon-containing electrode modified with gold by voltammetry. Procedia Chem 2015; 15: 365-70. doi:10.1016/j.proche.2015.10.058.
11. Kucherenko DY, Kucherenko IS, Soldatkin OO, Soldatkin AP. Application of glutamate-sensitive biosensor for analysis of foodstuff. Biotechnol Acta 2018; 11: 57-67.doi: 10.15407/biotech11.04.057.
12. Dalkıran B, Erden PE, Kılıç E. Graphene and tricobalt tetraoxide nanoparticles based biosensor for electrochemical glutamate sensing. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2017; 45: 340-48. doi:10.3109/21691401.2016.1153482.
13. Monge-Acuña AA, Fornaguera-Trías J A. high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates. J Neurosci Methods 2009; 183: 176-81. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.06.042.
14. Buck K, Voehringer P, Ferger B. Rapid analysis of GABA and glutamate in microdialysis samples using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. J Neurosci Methods 2009; 182: 78-84. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.05.018.
15. Ganesana M, Trikantzopoulos E, Maniar Y, Lee ST, Venton BJ. Development of a novel micro biosensor for in vivo monitoring of glutamate release in the brain. Biosens Bioelectron X 2019; 130: 103-9. doi:10.1016/j.bios.2019.01.049.
16. Rocchitta G, Bacciu A, Arrigo P, Migheli R, Bazzu G, Serra PA. Propylene glycol stabilizes the linear response of glutamate biosensor: potential implications for in-vivo neurochemical monitoring. Chemosensors 2018; 6: 58. doi:10.20944/preprints201810.0630.v1.
17. Borisova T, Kucherenko D, Soldatkin O, Kucherenko I, Pastukhov A, Nazarova A, et al. An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma. Anal Chim Acta 2018; 1022: 113-23. doi:10.1016/j.aca.2018.03.015.
18. Soldatkina OV, Soldatkin OO, Kasap BO, Kucherenko DY, Kucherenko IS, Kurc BA, et al. A novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. Nanoscale Res Lett 2017; 12: 1-8. doi:10.1186/s11671-017-2026-8.
19. Zhang M, Mullens C, Gorski W. Amperometric glutamate biosensor based on chitosan enzyme film. Electrochim Acta 2006; 51: 4528-32. doi:10.1016/j.electacta.2006.01.010
20. Zhang M, Mullens C, Gorski W. Chitosan-glutamate oxidase gels: synthesis, characterization, and glutamate determination. Electroanalysis 2005; 17: 2114-20.doi:10.1002/elan.200503348.
21. Tseng TTC, Chang CF, Chan WC. Fabrication of implantable, enzyme-immobilized glutamate sensors for the monitoring of glutamate concentration changes in vitro and in vivo. Molecules 2014; 19: 7341-55. https://doi.org/10.3390/molecules19067341.
22. Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T, Kuninaka A, Yoshino H. Purification and properties of a new enzyme, l-glutamate oxidase, from Streptomyces sp. X-119-6 grown on wheat bran. Agric Biol Chem 1983; 47: 1323-28. doi:10.1080/00021369.1983.10866079.
23. Utsumi T, Arima J, Sakaguchi C, Tamura T, Sasaki C, Kusakabe H, et al. Arg305 of Streptomyces L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition.

Biochem Biophys Res Commun 2012; 417: 951-55. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.033.
24. Tao-Cheng JH, Gallant PE, Brightman MW, Dosemeci A, Reese TS. Structural changes at synapses after delayed perfusion fixation in different regions of the mouse brain. J Comp Neurol 2007; 501: 731-40. doi:10.1002/cne.21276.
25. Şimşek Ş, Aynacı E, Arslan F. An amperometric biosensor for L-glutamate determination prepared from L-glutamate oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2016; 44: 731-40. doi:10.1002/cne.21276.