

Fabrication and Characterization of an Electrochemical CD8⁺ T Cells Sensor Based on Polypyrrole/Reduced Graphene Oxide Composite

Maryam Amoo*, Hamidreza Salimi Jazi, Sheyda Labbaf and Fathallah Karimzadeh

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

* Corresponding author, Email: Amaryam12@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Detecting the CD8⁺ T cell biomarker—a key indicator of immunological diseases—is often slow with current methods. This research aims to develop a sensitive, accurate, and easy-to-use electrochemical biosensor, utilizing reduced graphene oxide and polypyrrole nanocomposite, for on-site, sensitive, accurate, and rapid detection of CD8⁺ T cells.

Materials and Methods: The polypyrrole/reduced graphene oxide composite was deposited onto the sensor's working electrode using cyclic voltammetry with 15, 20, and 25 cycles, corresponding to sample codes A15, A20, and A25. To prepare the sample containing the polypyrrole and graphene oxide composite with the selected number of cycles under a UV lamp (sample code B20), the same procedure was repeated, followed by characterization of the samples. Antibody immobilization was then performed on the developed electrode, and sensor performance was assessed using differential pulse voltammetry.

Results: FESEM imaging revealed that the sample A20 had a more uniform and porous surface morphology compared to the sample B20. According to the differential pulse voltammetry results, an increase in the concentration of CD8⁺ T cells led to a decrease in current intensity. Based on the calibration curve, the detection limit was determined to be seven cells.ml⁻¹, indicating the high sensitivity of the sensor in identifying CD8⁺ T cells.

Conclusion: Sample A20 was identified as the optimal structure for application in electrochemical biosensors based on Ppy-rGo composite to detect CD8⁺T cells.

Keywords: Polypyrrole, Reduced graphene oxide, Electrochemical sensor, CD8⁺ T Cells, Cyclic voltammetry, Differential pulse voltammetry.

ساخت و مشخصه‌یابی حسگر الکتروشیمیایی سلول‌های CD8⁺T مبتنی بر کامپوزیت پلی‌پیرول و اکسید گرافن کاهش‌یافته

مریم عمو*^{ID}، حمیدرضا سلیمی جزی^{ID}، شیدا لباف^{ID} و فتح‌اله کریم‌زاده^{ID}

دانشکده مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
*نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Amaryam12@yahoo.com

چکیده

مقدمه و اهداف: شناسایی نشانگر زیستی سلول‌های CD8⁺T، یک شاخص کلیدی بیماری‌های ایمنولوژی، با روش‌های فعلی زمان‌بر است. هدف از این پژوهش، توسعه یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی حساس، برپایه نانوکامپوزیت پلی‌پیرول و اکسید گرافن کاهش‌یافته جهت تشخیص سلول‌های CD8⁺T با قابلیت مراقبت در محل، دقت، حساسیت بسیار مناسب و ساده می باشد.

مواد و روش‌ها: فرایند رسوب‌دهی کامپوزیت پلی‌پیرول و اکسید گرافن کاهش‌یافته با تکنیک ولتامتری چرخه‌ای، با تعداد سیکل‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ (کد نمونه‌های A15، A20 و A25) روی الکترود کار حسگر انجام شد. برای تهیه نمونه با کامپوزیت پلی‌پیرول و اکسید گرافن با تعداد سیکل بهینه تحت لامپ فرابنفش (کد نمونه B20)، تکرار و نمونه‌ها مشخصه‌یابی شدند. آنتی‌بادی روی الکترود توسعه یافته ایموبلائز گردید و عملکرد حسگر با آزمون ولتامتری پالسی تفاضلی انجام شد.

یافته‌ها: تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی نشان داد که نمونه A20 در مقایسه با نمونه B20، دارای مورفولوژی سطحی یکنواخت‌تر و متخلخل‌تر است. براساس نتایج ولتامتری پالسی تفاضلی، افزایش غلظت سلول‌های CD8⁺T، منجر به کاهش شدت جریان شد. با توجه به منحنی کالبراسیون، حد تشخیص برابر با هفت سلول در میلی‌لیتر تعیین شد که نشان‌دهنده حساسیت بالای حسگر در شناسایی سلول‌های CD8⁺T است. **نتیجه‌گیری:** نمونه A20، به عنوان ساختار بهینه برای کاربرد در حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌پیرول، اکسید گرافن کاهش‌یافته، حسگر الکتروشیمیایی، سلول‌های CD8⁺T، الکتروشیمیایی چرخه‌ای، آزمون ولتامتری پالسی تفاضلی.

سلول‌های $CD8^+T$ همچنین در توسعه واکنش‌ها و مطالعات مرتبط با بیماری‌های خودایمنی نقش حیاتی دارند. در زمینه واکنش‌های، بررسی پاسخ ایمنی سلولی $CD8^+$ یکی از معیارهای کلیدی برای ارزیابی کارایی واکنش‌ها به‌ویژه در برابر ویروس‌ها است، چراکه ایجاد ایمنی پایدار در این موارد بسیار مهم است (۵)؛ بنابراین، پاسخ‌های سلول‌های $CD8^+T$ در بسیاری از مطالعات ایمنی‌زایی به‌عنوان شاخص عملکرد واکنش‌ها به‌شمار می‌رود.

از سوی دیگر، در بیماری‌های خودایمنی نظیر مالیتیل اسکروزیس^۵ و آرتریت روماتوئید^۶، اختلال در عملکرد سلول‌های $CD8^+T$ می‌تواند منجر به التهاب مزمن و برهم خوردن تعادل ایمنی شود. در نتیجه، $CD8$ به‌عنوان یک نشانگر کلیدی در پروفایل‌سازی سیستم ایمنی این بیماران، مورد بررسی قرار می‌گیرد و به شناسایی مکانیسم‌های آسیب‌شناسی و اهداف درمانی بالقوه کمک می‌کند (۶).

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های ایمنی‌شناسی، مانند فلوسایتومتری و ایمونوهیستوشیمی^۷، امکان اندازه‌گیری دقیق و تحلیل عمیق سلول‌های $CD8^+T$ در محیط‌های تحقیقاتی و بالینی را فراهم کرده است (۷). این ابزارها با فراهم آوردن امکان پروفایل‌سازی جامع ایمنی، درک ما را از دینامیک‌های سلول‌های $CD8^+T$ در بیماری‌های مختلف افزایش داده‌اند و زمینه را برای ورود این اطلاعات به حوزه پزشکی شخصی‌سازی شده فراهم کرده‌اند (۸).

اگرچه فلوسایتومتری یکی از روش‌های رایج و مؤثر برای ایمونوفنوتایپ‌سازی و شمارش سلول‌های $CD8^+T$ است، اما با محدودیت‌هایی همراه است. برای مثال، حساسیت این روش برای شناسایی سلول‌هایی با فراوانی پایین محدود است. همچنین وابستگی زیاد این روش به شدت فلورسانس، می‌تواند باعث ایجاد نوسان‌ها در داده‌ها، به‌علت تفاوت کالیبراسیون دستگاه‌ها بین آزمایشگاه‌های مختلف شود. علاوه‌براین، نیاز به آماده‌سازی گسترده نمونه و هزینه بالای مواد و تجهیزات، دسترسی به این

در سال‌های اخیر، نشانگر زیستی $CD8$ توجه زیادی را در حوزه‌های ایمونولوژی و انکولوژی به خود جلب کرده است. این نشانگر، به‌دلیل نقش کلیدی که در تنظیم پاسخ‌های ایمنی از طریق لنفوسیت‌های T سمی^۱ (رده سلولی $CD8^+T$) ایفا می‌کند، به‌عنوان یکی از مولفه‌های اساسی در تشخیص‌های بالینی و پایش درمانی شناخته می‌شود (۱). سلول‌های T دارای $CD8$ ، یکی از اجزای مرکزی سیستم ایمنی هستند که قادرند سلول‌های آلوده یا سرطانی را شناسایی و حذف کنند. $CD8$ به‌عنوان یک گلیکوپروتئین سطحی، با مجموعه سازگاری بافتی نوع I به سلول‌های هدف متصل می‌شوند و از این طریق، سبب شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن‌ها و آغاز فعالیت سمی توسط سلول‌های T می‌شود. این ویژگی، اهمیت اندازه‌گیری و بررسی کمی $CD8$ را در درک سازوکارهای ایمنی در بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان، عفونت‌های ویروسی و اختلالات خودایمنی، برجسته می‌سازد (۲).

تحلیل و بررسی سلول‌های $CD8^+T$ به‌ویژه در زمینه سرطان بسیار مهم است. مقدار این سلول‌ها در تومورها که با عنوان لنفوسیت‌های نفوذی تومور^۳ شناخته می‌شوند، معمولاً رابطه مستقیمی با نتایج درمانی بهتر در بیماران دارد و به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان نشانگرهای پیش‌بینی‌کننده پاسخ به درمان‌های ایمنی، به‌ویژه مهارکننده‌های نقاط کنترلی سیستم ایمنی^۴، استفاده می‌شوند (۳). نفوذ گسترده سلول‌های $CD8^+T$ به داخل بافت تومور، بیانگر یک پاسخ ایمنی فعال علیه سلول‌های سرطانی است و اغلب با پیش‌آگهی مطلوب همراه است. بر همین اساس، اندازه‌گیری $CD8$ نه‌تنها در ارزیابی پیش‌آگهی بیماری، بلکه در روند درمان نیز نقش مهمی ایفا می‌کند.

علاوه‌بر انکولوژی، سلول‌های $CD8^+T$ در ایمنی ضدویروسی نیز نقش کلیدی دارند. این سلول‌ها در کنترل و حذف عفونت‌های ویروسی مزمن، از جمله ایدز و هپاتیت C ، نقش ایفا می‌کنند. پایش سطح این سلول‌ها در چنین بیماری‌هایی، اطلاعات ارزشمندی درباره پیشرفت بیماری و وضعیت کلی سیستم ایمنی

روش را در مراکز با منابع محدود دشوار می‌سازد (۹).

روش‌های الکتروشیمیایی، به‌ویژه ولتامتری پالسی تفاضلی^۸، به‌عنوان جایگزین‌های نوین و مؤثری در تحلیل نشانگرهای زیستی، از جمله سلول‌های $CD8^+T$ ، مطرح شده‌اند. این روش‌ها از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار هستند و قابلیت شناسایی زیست‌نشانگرهای کم‌یاب با حجم نمونه اندک را دارند (۱۰). علاوه‌براین، آزمون DPV دارای مزایای قابل‌توجهی از نظر هزینه، سرعت و قابلیت مینیاتوری‌شدن برای استفاده در تست‌های بالینی نقطه‌ای است. در مقایسه با روش‌های مرسوم مانند الایزا^۹، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^{۱۰} و ایمنوئوستوشیمی، روش DPV برتری‌هایی را ارائه می‌دهد (۷ و ۱۱). به‌عنوان نمونه، الایزا برای تشخیص نشانگرهای نادر حساسیت کافی را ندارد، qPCR نیازمند آماده‌سازی پیچیده و تجهیزات گران‌قیمت است و ایمنوئوستوشیمی به‌شدت به کیفیت آنتی‌بادی‌ها و شرایط رنگ‌آمیزی وابسته است. در مقابل، DPV امکان اندازه‌گیری قابل‌اعتماد سلول‌های $CD8^+T$ حتی در ماتریس‌های زیستی پیچیده، با حداقل تداخل، را فراهم می‌کند (۱۲).

هدف این مطالعه، بررسی کارایی و توانایی روش DPV در تشخیص دقیق و حساس سلول‌های $CD8^+T$ است. با توجه به محدودیت‌های روش‌های سنتی مانند فلوسایتومتری و مزایای روش DPV، در این تحقیق تلاش شده است که راهکاری کارآمدتر و مقرون‌به‌صرفه‌تر برای بررسی این نشانگر زیستی نسبت به روش‌های پیشین ارائه شود. در این مطالعه، عملکرد دو زیرلایه برای شناسایی سلول‌های $CD8^+T$ مقایسه و ارزیابی می‌گردد. الکتروکد چاپ‌شده^{۱۱} مورد استفاده، با اکسید گرافن کاهش‌یافته^{۱۲} طراحی شده و طی فرآیند CV با پلی‌پیرول^{۱۳} جهت افزایش رسانایی و حساسیت حسگر اصلاح گردید (۱۳ و ۱۴). در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی مختلفی را برای شناسایی CD نشانگرها توسعه داده‌اند که هرکدام از روش‌شناسی متفاوتی بهره گرفته‌اند. برای مثال، کارینلی و همکاران (۱۵)، یک زیست‌حسگر مغناطیسی الکتروشیمیایی را برای شناسایی سلول‌های $CD4^+$ توسعه دادند

که حد تشخیص آن ۴۴ سلول در میکرولیتر بود. این حسگر با استفاده از جداسازی مغناطیسی ایمنی و مراحل برچسب‌گذاری عملکرد قابل‌قبولی دارد. اما علی‌رغم دقت بالا، از پیچیدگی‌های فنی و آماده‌سازی چند مرحله‌ای استفاده کرده است که برای کاربر راحت نبوده و قیمت بالایی پیدا می‌کند (۱۶).

در مطالعه‌ای دیگر، بیالاس و همکاران (۱۷)، یک زیست‌حسگر مبتنی بر امپدانس برای تشخیص سلول‌های $CD4^+$ را طراحی کردند که برای سلول‌های استخراج‌شده از خون، حد تشخیص $10^5 \times 1/41$ سلول در میلی‌لیتر داشت. مهمترین مزایای آن، روش تشخیص سنجش بدون برچسب‌گذاری، طراحی ساده و امکان استفاده در محل است اما نیاز به بهینه‌سازی برای استفاده بالینی دارد.

در پژوهش یدگری و همکاران (۱۸) نیز یک حسگر الکتروشیمیایی برای شناسایی فوق‌العاده حساس سلول‌های سرطانی پروستات Du-145 توسعه یافت که از ساختارهای نانوگرافن-طلا بهره می‌برد و توانست حد تشخیص ۲۰ سلول در میلی‌لیتر را ثبت کند. این دقت بالا ناشی از دو مکانیسم شناسایی آنتی‌بادی و تقویت سیگنال آنزیمی^{۱۴} بود. اما فرایند اصلاح الکتروکد نسبتاً پیچیده و زمان‌بر است و احتمال تداخل با سایر سلول‌ها در نمونه‌های واقعی وجود دارد که نیاز به مراحل کالیبراسیون دقیق دارد. مهمترین متغیر مورد نیاز برای حسگرهای الکتروشیمیایی، رسانایی بالا است که بتواند کمترین تغییرات در مقاومت را تشخیص دهد. از طرفی با سطحی دارای تخلخل مناسب، قدرت گیراندازی زیست‌نشانگر را به‌خوبی داشته باشد (۱۸).

لازم به ذکر است در بررسی بیماری‌های ایمنولوژی و آنکولوژی، زیست‌نشانگر سلول‌های $CD8^+T$ بسیار قابل اهمیت است. روش‌های مورد استفاده در حال حاضر، از جمله فلوسایتومتری، با چالش‌هایی مواجه هستند که روش الکتروشیمی مزایای قابل‌توجهی همچون سادگی نسبت به آن‌ها دارد. این پژوهش برآن است تا زیست‌حسگر الکتروشیمیایی را طراحی و مشخصه‌یابی کند و برای بررسی عملکرد و اندازه‌گیری

حد تشخیص آزمون‌های حسگری را انجام دهد. امید است این روش ساده و کم‌هزینه بتواند برای تولید انبوه مناسب باشد و در محیط‌های بالینی در دسترس شود (۱۹).

اهمیت اصلی پژوهش حاضر در مقایسه با پژوهش‌های پیشین، تشخیص زیست‌نشانه‌گر سلول‌های $CD8^+T$ در تهیه حسگری الکتروشیمیایی است که با تهیه زیرلایه رسانا و داشتن گروه‌های عاملی مورد نیاز، دقت و حساسیت بسیار مناسب، ساده و با قابلیت مراقبت در محل برخوردار باشد. از طرفی زیرلایه کامپوزیتی طراحی شده با برخورداری از تخلخل ویژه، قدرت گیراندازی سلول‌های $CD8^+T$ را دارد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده در پژوهش

الکتروود چاپ شده C110 شرکت Drop sense، پیرویل کد (S8135392) با خلوص ۹۸ درصد و جرم مولی $67/09$ گرم بر مول از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. پودرهای اکسید گرافن کاهش یافته و اکسید گرافن^{۱۵} با خلوص ۹۹ درصد و اندازه ذرات $3/4$ تا 7 نانومتر از شرکت American Elements با کد (C-GENEO-01-P.REDU) خریداری شد. همچنین، پتاسیم فری سیانید $[K_3[Fe(CN)_6]]$ و پتاسیم کلرید (KCl) با کد (7-45-7447)، از شرکت Merck آلمان تأمین شدند. آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد $CD8$ انسانی کد (SB-019972) از شرکت SINA BIOTECH ایران تهیه شد.

آنتی بادی مذکور در دمای $20^\circ C$ قابل نگهداری است و غلظت آن یک میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد. سلول حاوی $CD8$ انسانی نو ترکیب جدا شده از سرم انسانی زن از آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. طبق پروتکل آزمایشگاه مذکور، سلول تهیه شده تا یک هفته در دمای یخچال قابل نگهداری بود.

همچنین، قرص‌های بافر فسفات^{۱۶}، اتانول، EDC^{۱۷} با کد (S7663807) و ان-هیدروکسی سوکسینیمید^{۱۸} با کد (G5-130672) با خلوص ۹۸ درصد و آلبومین سرم گاوی^{۱۹} با کد

(A9418-5G) با خلوص بالای ۹۶ درصد، همگی از شرکت Sigma-Aldrich آلمان تهیه شدند. تمام محلول‌های آبی با آب دیونیزه تهیه گردید. جهت تحلیل سطح الکتروود پس از آماده‌سازی، نمونه‌هایی از آن خراشیده شده و به کمک طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه^{۲۰} بررسی شدند.

۲-۲- آماده‌سازی و فرایند پوشش دهی الکتروشیمیایی

غلظت‌های مورد استفاده برای آماده‌سازی الکتروود در فرایند پوشش دهی الکتروشیمیایی، عبارتند از: پتاسیم کلرید (KCl) دارای غلظت $1 M$ ، rGO با غلظت $0/33$ میلی گرم بر میلی لیتر، PBS با غلظت $0/05 M$ و پیرویل با غلظت $0/025 M$. ابتدا KCl در آب مقطر به مدت 10 دقیقه حل شد تا انحلال کامل حاصل شود. سپس، به ترتیب سایر ترکیبات شامل rGO، PBS و پیرویل به آن افزوده شدند. محلول نهایی به مدت 30 دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی هم زده شد تا ترکیبی همگن حاصل شود. بررسی‌ها و لایه‌نشانی الکتروشیمیایی با دستگاه Origalyze Systems در دمای محیط انجام شد. ابتدا فرایند لایه‌نشانی به روش الکتروشیمیایی چرخه‌ای^{۲۱} به تعداد سیکل‌های 15 ، 20 و 25 ، با چرخه‌های پتانسیلی در محدوده ولتاژ $0/5 V$ - تا $1 V$ و با نرخ روبش $50 mV.s^{-1}$ روی الکتروود چاپ شده انجام گردید و نمونه‌ها به ترتیب A15، A20 و A25 کدگذاری شدند. سپس نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و نمونه‌ای با ساختار بهینه انتخاب شد. در این مرحله، تعداد سیکل بهینه برای لایه‌نشانی روی الکتروود کار انتخاب شد. در مرحله بعد برای انتخاب ماده برتر با ثابت نگه داشتن مقادیر تمامی مواد اولیه، ماده GO جایگزین rGO شد. در فرایند استفاده از GO، از اتانول جهت پراکنده‌سازی ورق‌های GO بهره گرفته شد. همچنین، به منظور احیای GO روش‌های متفاوتی وجود دارد (۲۰). در این پژوهش از لامپ UV (TL 8W BLB)، طول موج 365 نانومتر) در حین فرایند لایه‌نشانی استفاده گردید. این تابش برای فعال‌سازی گروه‌های عاملی کربوکسیل در مرحله سنتز کامپوزیت، انجام گرفت. نمونه حاصل شده به کد B20 نام گذاری شد.

جدول ۱ - مقادیر مختلف غلظت CD8 در محلول PBS و کد

اختصاصی نمونه‌ها	
غلظت (cells.ml ⁻¹) CD8	کد نمونه
۰	0cell
۲۰	20cells
۸۰	80cells
۱۰۰۰	1000cells
۲۰۰۰۰	20000cells

مختلف CD8 و محاسبه حساسیت و حد تشخیص آن، از آزمون DPV استفاده شد. این آنالیز در محلول بافر فسفات‌ی حاوی mM ۵ فری سیانید و فروسیانید پتاسیم انجام شد. پس از آن، آزمون DPV در محدوده ولتاژ ۲۵۰ تا ۷۵۰ میلی‌ولت، با دامنه ۲۰۰ میلی‌ولت و نرخ روبش ۱۵ میلی‌ولت بر ثانیه انجام شد. برای فراهم کردن شرایط الکتروشیمیایی بهینه برای سنجش تغییرات جریان در حضور CD8 از محلول الکترولیتی شامل mM ۵ از $[Fe(CN)_6]^{4+} / [Fe(CN)_6]^{3+}$ و mM ۰/۱ پتاسیم کلرید استفاده شد.

برای محاسبه حد تشخیص^{۳۳} و حساسیت حسگر، مقدار مقاومت حاصل از آزمون DPV در هر غلظت CD8 به صورت نموداری برحسب غلظت CD8 رسم شد. سپس با استفاده از رابطه (۱)، میزان حد تشخیص حسگر طراحی شده محاسبه شد.

$$LOD = \frac{3S}{Sd} \quad (1)$$

که در آن Sd انحراف استاندارد نمونه در غلظت صفر CD8 را نشان می‌دهد و S شیب منحنی کالیبراسیون است. جهت ارزیابی تکرارپذیری حسگر، پاسخ آن در هر غلظت سه بار اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت انحراف استاندارد گزارش شد. لازم به ذکر است، با در نظر گرفتن یک آنالیت منفرد حساسیت عبارت است از تغییر در پاسخ در اثر یک واحد تغییر در کمیت آنالیت (شیب منحنی معیاربندی). برای انجام این محاسبه کافی است شیب قسمت خطی نمودار محاسبه شود (۲۲).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی ساختار شیمیایی کامپوزیت تشکیل شده با پلی پیرول و اکسید گرافن کاهش یافته

شکل (۱)، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مربوط به نمونه‌های A15، A20 و A25 را نشان می‌دهد. با بررسی دقیق طیف‌ها، مشاهده می‌شود که نمونه A20 دارای پیک‌های مشخص تری نسبت به دو نمونه دیگر است. این تفاوت‌ها بیانگر

۲-۳- مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی کامپوزیت لایه‌نشانی

برای شناسایی و ارزیابی کامپوزیت لایه‌نشانی شده، نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR, Tensor27, آلمان) در بازه طیفی cm^{-1} ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند تا تعداد سیکل برتر انتخاب شود. سپس مورفولوژی ترکیب تشکیل شده دو نمونه A20 و B20، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی^{۳۲} (PESEM, Quanta FEG 450) بررسی شد.

۲-۴- آماده‌سازی و لایه‌نشانی نهایی نمونه‌ها برای انجام

آزمون‌های حسگری

پس از لایه‌نشانی کامپوزیت و آماده‌سازی اولیه الکتروود، جهت آماده‌سازی نهایی، برای شناسایی سلول‌های CD8، مراحل زیر انجام شد: ابتدا محلول‌های EDC/NHS، آنتی‌بادی CD8 و BSA به ترتیب و به میزان دو میکرولیتر، روی سطح الکتروود ریخته شد و هرکدام به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از این مرحله، الکتروود آماده آنالیز با DPV گردید، آزمون از هر غلظت سه بار تکرار شد. کد و اطلاعات مربوط به نمونه‌های تهیه شده، در جدول (۱) ارائه شده است. غلظت‌های مختلف به روش سریالی تهیه شدند.

۲-۵- آزمون ولتامتری پالس تفاضلی

برای ارزیابی رفتار حسگر طراحی شده در برابر غلظت‌های

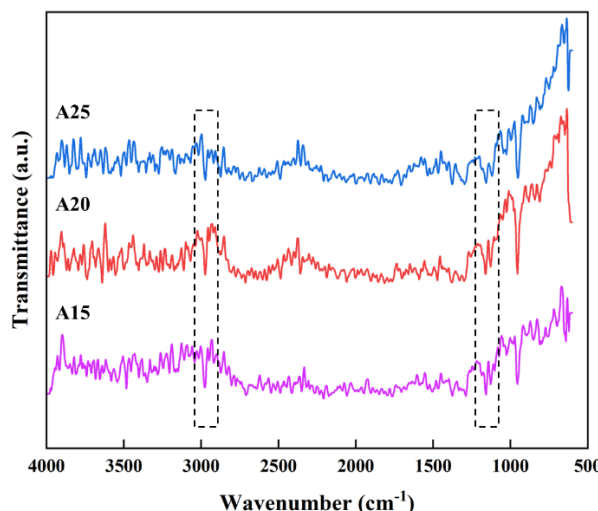
بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نسبت ترکیب به‌کار رفته در نمونه A20 شرایط بهینه‌ای را برای برهم‌کنش بین Ppy و rGO فراهم آورده است. این امر نه‌تنها منجر به مشاهده واضح‌تر پیک‌های طیف مادون قرمز تبدیل فوریه می‌شود بلکه احتمالاً تأثیر مثبتی بر خواص عملکردی و ساختاری کامپوزیت نیز خواهد داشت که در کاربردهای مرتبط با ذخیره‌سازی انرژی، حسگرها و سامانه‌های الکترونیکی حائز اهمیت است.

این یافته‌ها بیانگر آن است که در فرایند لایه‌نشانی الکتروشیمیایی به روش CV، تعداد ۲۰ سیکل، شرایط بهینه‌ای برای رشد ساختار کامپوزیتی ایجاد کرده است. برهمین اساس، در ادامه پژوهش و برای مقایسه عملکرد با توجه به مواد اولیه مورد استفاده، نمونه B20 تهیه‌شده با همان ۲۰ سیکل لایه‌نشانی برای بررسی‌های بیشتر مقایسه شد (۲۵).

۳-۲- بررسی نمونه‌های A20 و B20 با استفاده از میکروسکوپ

الکترونی روبشی گسیل میدانی

مقایسه تصاویر FESEM نمونه‌های A20 و B20، که به‌ترتیب با استفاده از rGO و GO تهیه شده‌اند، اطلاعات ارزشمندی در مورد تفاوت‌های ساختاری ناشی از نوع ماده اولیه ارائه می‌دهد (۲۶). شکل (۲)، تصاویر FESEM از نمونه A20 در بزرگنمایی‌های ۱ و ۵ میکرومتر ارائه شده است. در این تصاویر، ساختارهای گل‌کلمی شکل که به‌وضوح مشاهده می‌شوند، شاخص حضور پلی‌پیرول هستند و ساختارهای لایه‌مانند نیز به لایه‌های اکسید گرافن نسبت داده می‌شوند. این دو ویژگی، نشان‌دهنده تشکیل موفقیت‌آمیز یک ساختار یکپارچه هستند که ترکیب مطلوبی از Ppy و rGO را نشان می‌دهد (۲۷ و ۲۸). همچنین، در هر دو بزرگنمایی، منافذ سطحی و تخلخل‌های چندمرحله‌ای^{۲۴} مشاهده می‌شوند. چنین ویژگی‌هایی با افزایش سطح مؤثر و ایجاد نقاط فعال بیشتر برای تعاملات زیست‌مولکولی، به جذب مؤثرتر آنالیت، انتقال بار الکتریکی سریع‌تر و در نهایت بهبود حساسیت و عملکرد حسگر زیستی کمک می‌کنند. به‌عنوان نمونه، هو و همکاران (۲۸) گزارش داده‌اند که ساختار سه‌بعدی متخلخل

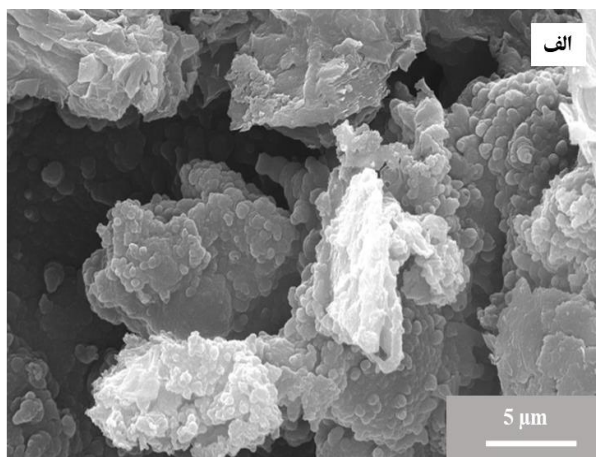
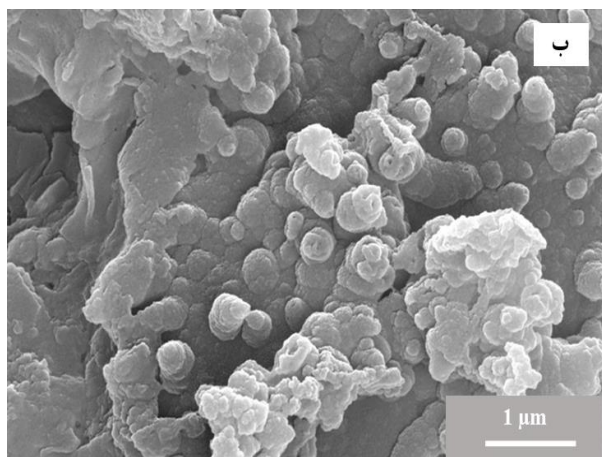


شکل ۱- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نمونه‌های A20، A25 و A15؛ شدت بالاتر پیک‌ها در A20 بیانگر تشکیل مؤثرتر کامپوزیت rGO/Ppy

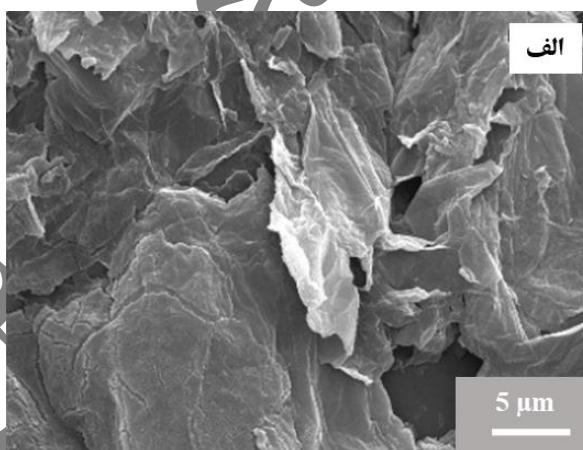
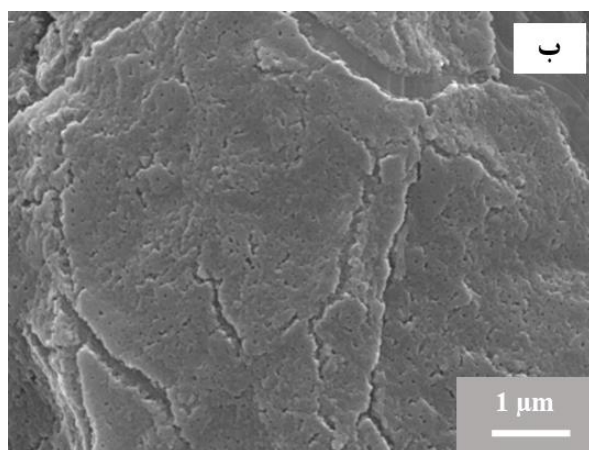
بهینه‌بودن نسبت ترکیب مواد اولیه در نمونه A20 و تشکیل ساختار کامپوزیتی یکنواخت‌تر و مؤثرتر می‌باشد.

نمونه A20 دارای دو پیک برجسته است: نخستین پیک در ناحیه 2976 cm^{-1} ظاهر می‌شود که مربوط به مد ارتعاشی نامتقارن حلقه پیرول بوده و ویژگی مشخص پلی‌پیرول به‌شمار می‌رود (۲۳)؛ پیک دوم در 1163 cm^{-1} قرار دارد و به ارتعاش کششی پیوند C-O-C مربوط می‌شود و از حضور ساختارهای اکسیدشده در چهارچوب ماده ناشی می‌شود. هر دوی این پیک‌ها در مطالعات پیشین نیز با جابه‌جایی جزئی به سمت مقادیر کمتر گزارش شده‌اند (۲۴).

در مقایسه با نمونه‌های A15 و A25، شدت این پیک‌ها در نمونه A20 بیشتر است؛ به‌ویژه در نمونه A15، کاهش شدت پیک‌ها نشان‌دهنده عدم تشکیل شبکه کامل پلیمری یا برهم‌کنش ضعیف‌تر میان Ppy و rGO می‌باشد. همچنین در نمونه A25، با وجود حضور اجزای مشابه، کاهش نسبی شدت پیک‌ها ممکن است ناشی از اشباع بیش از حد یکی از ترکیبات یا ناهم‌انگهی در نسبت اختلاط باشد که منجر به تضعیف ساختار کامپوزیتی می‌شود.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی از نمونه A20 در بزرگنمایی‌های پنچ (الف) و یک (ب) میکرومتر.

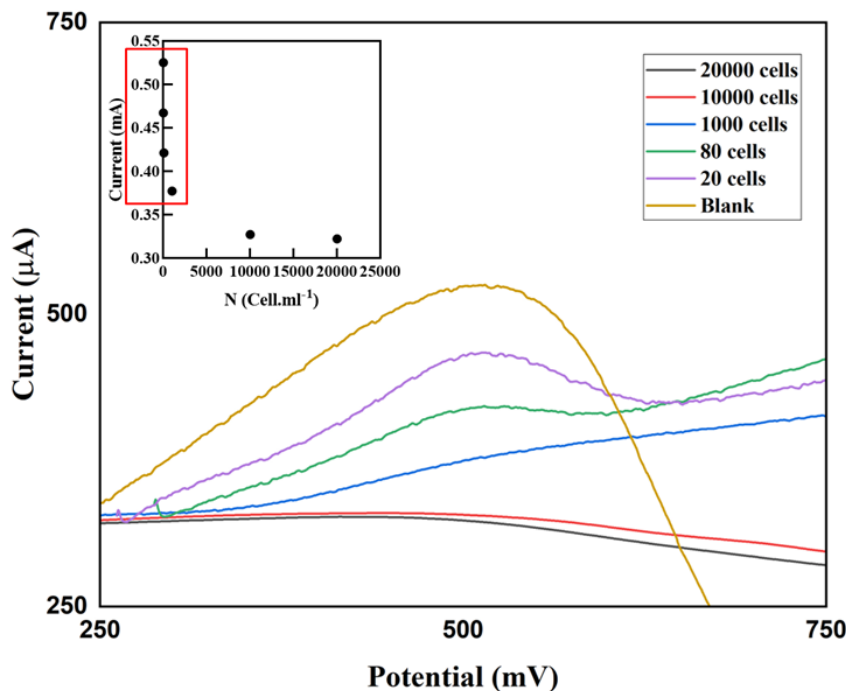


شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی گسیل میدانی از نمونه B20 در بزرگنمایی‌های پنچ (الف) و یک (ب) میکرومتر.

الکتریکی را مختل کرده و در نتیجه حساسیت و کارایی الکتروشیمیایی حسگر زیستی به‌طور جدی کاهش دهد (۲۹). براساس تصاویر FESEM، (شکل‌های ۲ و ۳) نمونه A20 دارای سطحی متخلخل تر و با پوشش یکنواخت‌تر نسبت به نمونه B20 است. چنین ویژگی‌هایی برای افزایش سطح تماس فعال، تسهیل تبادل الکترونی و بهبود حساسیت در کاربردهای حسگر زیستی بسیار مطلوب هستند؛ بنابراین، استفاده از FESEM نه تنها به‌عنوان ابزار مکمل در کنار روشی مانند FTIR مفید است، بلکه به‌طور مستقل نیز می‌تواند در انتخاب ساختار بهینه برای طراحی الکترودهای حسگر زیستی بر پایه نانوکامپوزیت‌ها نقش مهمی ایفا کند (۳۰).

rGO/PPy به‌دلیل بهینه‌سازی سطح فعال و بهبود انتقال الکترونی، سبب بهبود عملکرد در سنجش زیستی می‌شود. شکل (۳)، تصاویر حاصل از FESEM نمونه B20 را نشان می‌دهد که در آن ساختار لایه‌مانند rGO به‌خوبی قابل تشخیص است، اما نشانه‌ای از یکپارچگی مناسب با پلی‌پیرول مشاهده نمی‌شود. به‌نظر می‌رسد پلی‌پیرول در طی فرایند شستشو از سطح جدا شده و به‌دلیل چسبندگی یا ناپایداری، در ساختار نهایی باقی نمانده است (۱۳).

این عدم تشکیل ساختار منسجم، که در بزرگنمایی بیشتر نیز تأیید می‌شود، منجر به کاهش سطح فعال و نداشتن شبکه پلیمری یکنواخت می‌شود. عدم حضور پلی‌پیرول می‌تواند انتقال بار



شکل ۴- نمودار نتایج آزمون حسگری نمونه‌ها: نتایج آزمون DPV.

۳-۳- بررسی رفتار حسگر

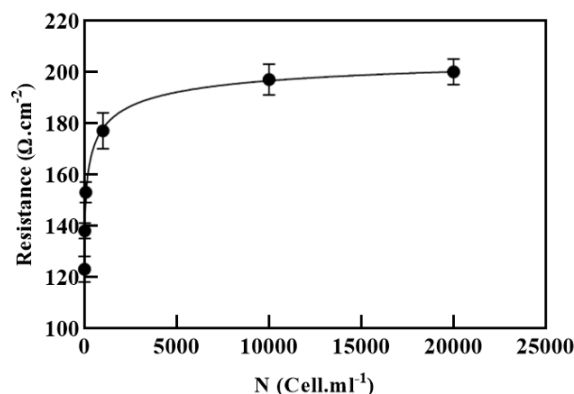
به منظور بررسی کارایی حسگر طراحی شده در شناسایی غلظت‌های مختلف سلول‌های $CD8^+ T$ ، آزمون DPV برای هر غلظت انجام شد. ارزیابی متغیرهای عملکردی نظیر حساسیت و LOD انجام شد. در این آزمون، دو میکرولیتر از محلول‌های حاوی سلول‌های $CD8^+ T$ با غلظت‌های مختلف، بر سطح الکترود کاری اصلاح شده با نانوکامپوزیت کاهش یافته اکسید گرافن/پلی پیرول (rGO/Ppy) چکانده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به منظور تثبیت تعاملات زیستی، الکترود در محلول بافر فسفات حاوی ۵ mM از جفت ردوکس $[Fe(CN)_6]^{4-} / [Fe(CN)_6]^{3-}$ قرار گرفت و آزمون DPV انجام شد. همان‌طور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت سلول‌های $CD8^+ T$ ، شدت جریان خروجی به صورت پیوسته کاهش می‌یابد. این پدیده ناشی از استقرار سلول‌ها در حفرات ساختار قالب زده شده پلیمری و مسدودسازی جزئی مسیرهای انتقال بار الکتریکی است. سلول‌های $CD8^+ T$ به دلیل ویژگی‌های غشایی، نقش موانع فیزیکی را ایفا کرده و موجب محدودیت در

انتقال الکترون و یون‌ها میان گونه‌های فری سیانید می‌شوند. این انسداد سطحی، نرخ واکنش‌های اکسایش-کاهش را در سطح الکترود کاهش می‌دهد و در نتیجه منجر به افت جریان اندازه‌گیری شده می‌شود (۳۱ و ۳۲). رابطه معکوس بین غلظت سلول‌ها و شدت پیک جریان، دلیلی بر عملکرد مهارگرانه حضور $CD8^+ T$ در انتقال بار سیستم است (۱۷). برای محاسبه متغیرهای کمی حسگر، منحنی کالیبراسیون مقاومت بر حسب غلظت سلول‌های $CD8^+ T$ ترسیم شد (شکل ۵). براساس داده‌های به دست آمده، شیب نمودار در محدوده غلظت صفر تا ۱۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر تقریباً خطی است و توسط نرم‌افزار GraphPad Prism برابر با ۰/۰۵۴ محاسبه گردید؛ بنابراین طبق رابطه (۱)، مقدار حد تشخیص حسگر برابر با $LOD = 305 \text{ cell.ml}^{-1}$ به دست آمد. این مقدار نشان دهنده حساسیت مناسب سیستم طراحی شده در شناسایی غلظت‌های پایین سلول‌های $CD8^+ T$ است و پتانسیل آن را برای کاربرد در سامانه‌های تشخیص زیستی هدفمند به خوبی تأیید می‌کند (۱۷ و ۳۳).

نتایج حاصل از این پژوهش، نشان داد که استفاده از زیرلایه بسیار رسانا با مقاومت $35.39 \Omega \cdot \text{cm}^2$ با ساختار کامپوزیتی متخلخل، علاوه بر افزایش انتقال الکترونی و حساسیت، ظرفیت گیراندازی سلول‌های $\text{CD8}^+\text{T}$ را به طور موثری افزایش می‌دهد. همچنین، تغییر جریان در آزمون DPV نشان می‌دهد که مکانیزم طراحی شده می‌تواند کوچکترین تغییرات مرتبط با حضور زیست‌نشانه‌گر سلولی را آشکار کند. در مجموع، یافته‌ها بیانگر آن است که این حسگر در مقایسه با روش‌های رایج مانند فلوسایتومتری از سادگی، هزینه کم و قابلیت استفاده در محل برخوردار است و می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای بالینی و تولید انبوه مورد توجه قرار گیرد.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، به منظور طراحی و ارزیابی یک نانوحسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر rGO/PPy، از مجموعه آزمون‌های ساختاری و عملکردی استفاده شد. نتایج FTIR نشان داد که نمونه A20، که با ۲۰ سیکل لایه‌نشانی الکتروشیمیایی تهیه شده بوده، در مقایسه با نمونه‌های A15 و A25، از کیفیت ساختاری بهینه‌تری برخوردار بوده و پیک‌های مشخصه پلی‌پیرول و گروه‌های عاملی به وضوح در آن مشاهده شد. این داده‌ها، انتخاب ۲۰ سیکل برای فرایند لایه‌نشانی را به عنوان بهترین شرایط، تأیید کردند. بررسی‌های میکروسکوپی با استفاده از FESEM نیز ساختار سطحی نمونه A20 را همگن‌تر، متخلخل‌تر و دارای پیوستگی بهتر بین لایه‌های پلیمر و rGO نسبت به نمونه B20 نشان داد. در مقابل، در نمونه B20، ساختار کامپوزیتی مناسب تشکیل نشده بود و عدم اتصال مؤثر بین اجزای کامپوزیت مشهود بود. این یافته‌ها، نقش تعیین‌کننده مورفولوژی سطحی در بهبود عملکرد الکتروود اصلاح‌شده را برجسته می‌سازد. در ادامه، عملکرد حسگری الکتروود A20 از طریق آزمون DPV در شناسایی سلول‌های $\text{CD8}^+\text{T}$ مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون‌ها نشان دادند که با افزایش غلظت سلول‌ها، شدت جریان به طور معناداری کاهش یافته و ارتباط مستقیمی با انسداد مسیرهای انتقال بار در



شکل ۵- نمودار جریان بر حسب غلظت حاصل از نتایج آزمون حسگری.

کلیه نتایج در آزمون کمی، به صورت میانگین نمونه‌ها (حداقل سه نمونه) به همراه انحراف معیار آن‌ها گزارش و در نمودار مشخص شد. نتایج با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism و با آنالیز آماری ANOVA بررسی گردید و به صورت معنادار ($P < 0.05$) گزارش شد.

به طو کلی، زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی متعددی برای شناسایی سلول‌ها و زیست‌نشانه‌های ایمنی توسعه داده شده‌اند که هر یک مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. حسگر مغناطیسی کارینلی و همکاران (۱۵)، برای CD4^+ با وجود حد تشخیص مناسب ۴۴ سلول بر میکرولیتر به دلیل مراحل متعدد جداسازی و برچسب‌گذاری، چندان کاربرپسند نبوده و در مقیاس بالینی هزینه‌بر است. همچنین، حسگر امیدانسی بیلاس و همکاران (۱۷)، مزیت عدم نیاز به برچسب‌گذاری را ارائه داد، اما بهینه‌سازی برای استفاده بالینی همچنان ضروری است. از سوی دیگر، در حسگر نانوگرافن-طلا ارائه‌شده توسط یدگری و همکاران (۱۸)، حد تشخیص قابل توجهی ۲۰ سلول بر میلی لیتر حاصل شد، اما به دلیل پیچیدگی اصلاح الکتروود و احتمال تداخل در نمونه‌های واقعی به کالیبراسیون دقیق، نیاز دارد. در مقایسه با این مطالعات، هدف پژوهش حاضر توسعه یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی برای تشخیص سلول‌های $\text{CD8}^+\text{T}$ بوده است، که تاکنون نسبت به سایر نشانه‌گرهای ایمونولوژی کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

تشکر و سپاسگزاری

این تحقیق حمایت خاصی از مؤسسات عمومی، صنعتی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منفعی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

سهم نویسندگان

مریم عمو: طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن مقاله، مدیریت منابع. حمیدرضا سلیمی جزی: طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، راهنمایی پروژه، اعتبارسنجی نتایج. شیدا لباف: راهنمایی پروژه، اعتبارسنجی نتایج. فتح‌اله کریم‌زاده: راهنمایی پروژه.

سطح الکتروود دارد. براساس منحنی کالبراسیون به‌دست‌آمده، حد تشخیص این نانوحسگر معادل ۳۰۵ سلول بر میلی‌لیتر محاسبه شد که نشان‌دهنده دقت و حساسیت بالای آن در شناسایی سلول‌های هدف است. درمجموع، نمونه A20 با توجه به نتایج FTIR، تصاویر FESEM و عملکرد دقیق در آزمون‌های الکتروشیمیایی، به‌عنوان ساختار بهینه برای ساخت الکتروود حسگر انتخاب شد. این ساختار با فراهم‌سازی بستر مناسب برای انتقال الکترون، تعامل زیستی مؤثر و پایداری ساختاری مطلوب، پتانسیل بالایی در توسعه حسگرهای زیستی هدفمند مبتنی بر سلول‌های ایمنی از جمله CD8⁺T دارد.

کد اخلاق

<https://ethics.research.ac.ir/IR.UIT.REC.1403.006>

واژه‌نامه

1. cytotoxic T cell
2. major histocompatibility complex I (MHC-I)
3. tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)
4. immune checkpoint inhibitors
5. multiple sclerosis (MS)
6. rheumatoid arthritis (RA)
7. immunohistochemistry (IHC)
8. differential pulse voltammetry (DPV)
9. enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)
10. quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
11. screen printed electrode (SPE)
12. reduced graphene oxide (rGO)
13. polypyrrole (Ppy)
14. horseradish peroxidase (HRP)
15. graphene oxide (GO)
16. phosphate buffered saline (PBS)
17. N-(3-Dimethylaminopropyl)- ethyl carbodiimide hydrochloride (EDC)
18. N-hydroxysuccinimide (NHS)
19. bovine serum albumin (BSA)
20. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
21. cyclic voltammetry (CV)
22. field emission scanning electron microscope (FESEM)
23. limit of detection (LOD)
24. hierarchical porosity

مراجع

1. Lin Y, Ruze R, Zhang R, Tueran T, Wang M, Tulahong A, et al. Immunometabolic targets in CD8⁺ T Cells within the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma. Liver Cancer 2024;14:474-496.<http://doi.org/10.1159/000542578>
2. Jia J, Li H, Huang Z, Yu J, Zheng Y, Cao B. Comprehensive immune landscape of lung-resident memory CD8⁺ T cells after influenza infection and reinfection in a mouse model. Front Microbiol. 2023;14:1184884.<http://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1184884>
3. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. Front Immunol. 2019;10(128):1-21.<http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00128>
4. Nasser Gholijani GD, Fatemeh Rezaei Kahmini. T cell-Intrinsic peripheral tolerance: A checkpoint target to treat autoimmunity. J Cell Immunol. 2024;6:87-97.<https://doi.org/10.33696/immunology.6.194>

5. van de Sandt CE, McQuilten HA, Aban M, Nguyen THO, Valkenburg SA, Grant EJ, et al. Gradual changes within long-lived influenza virus-specific CD8⁺T cells are associated with the loss of public TCR clonotypes in older adults. *EBioMedicine* 2025;115:105697.<http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2025.105697>
6. van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. CD8⁺ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer* 2020;20(4):218-32. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2022.894919>
7. Monsef R, Salavati-Niasari M. Electrochemical sensor based on a chitosan-molybdenum vanadate nanocomposite for detection of hydroxychloroquine in biological samples. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2022;613:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.01.039>
8. Lin Y, Song Y, Zhang Y, Li X, Kan L, Han S. New insights on anti-tumor immunity of CD8⁺T cells: Cancer stem cells, tumor immune microenvironment and immunotherapy. *J Transl Med*. 2025;23(1):341. <http://doi.org/10.1186/s12967-025-06291-y>
9. Dror Levinsky M, Brenner B, Yalon M, Levi Z, Livneh Z, Cohen Z, et al. A highly sensitive flow cytometric approach to detect rare antigen-specific T Cells: development and comparison to standard monitoring tools. *Cancers (Basel)* 2023;15(3):574. <http://doi.org/10.3390/cancers15030574>
10. Monsef R, Salavati-Niasari M. Hydrothermal architecture of Cu₅V₂O₁₀ nanostructures as new electro-sensing catalysts for voltammetric quantification of mefenamic acid in pharmaceuticals and biological samples. *Biosens Bioelectron*. 2021; 178:113017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113017>
11. Davtalab-Ghazimahalleh M, Hosseini-Golgoos SM, Zamani H. Manufacturing and characterization of a potentiometric sensor highly sensitive to NO₂ gas, based on K₂CO₃/Al₂O₃ composite material. *J Adv Mater Eng*. 2024;43(4):69-84. <https://doi.org/10.47176/jame.43.4.1087>
12. Bertolini M, Wong MS, Mendive-Tapia L, Vendrell M. Smart probes for optical imaging of T cells and screening of anti-cancer immunotherapies. *Chem Soc Rev*. 2023;52(16):535.2-72. <http://doi.org/10.1039/d2cs00928e>
13. Ravikiran YT, Chethan B, Prasad V, Raj Prakash HG, Prashantkumar M, Tiwari SK, et al. Polypyrrole/reduced graphene oxide composite as a low-cost novel sensing material for fast-response humidity sensor. *Mater Chem Phys*. 2023;303:127800. <http://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127800>
14. Goudarzi M, Salavati-Niasari M, Motaghedifard M, Hosseinpour-Mashkani SM. Semiconductive Ti₂O₃ nanoparticles: Facile synthesis in liquid phase, characterization and its applications as photocatalytic substrate and electrochemical sensor. *J Mol Liq*. 2016;219:720-7. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.04.007>
15. Carinelli S, Xufre Ballesteros C, Marti M, Alegret S, Pividori MI. Electrochemical magneto-actuated biosensor for CD4 count in AIDS diagnosis and monitoring. *Biosens Bioelectron*. 2015;74:974-80. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.053>
16. Baladi M, Teymourinia H, Dawi EA, Amiri M, Ramazani A, Salavati-Niasari M. Electrochemical determination of imatinib mesylate using TbFeO₃/g-C₃N₄ nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Arab J Chem*. 2023;16:104963. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104963>
17. Bialas K, Tay HM, Petchakup C, Salimian R, Ward SG, Lindsay MA, et al. Electrochemical microfluidic biosensor for the detection of CD4(+) T cells. *Microsyst Nanoeng*. 2025;11(63):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41378-025-00893-8>
18. Yadegari A, Omid M, Yazdian F, Zali H, Tayebi L. An electrochemical cytosensor for ultrasensitive detection of cancer cells using modified graphene-gold nanostructures. *RSC Adv*. 2017;7(4):2365-72. <http://doi.org/10.1039/c6ra25938c>
19. Ghasemi Z, Kharaziha M, Raeissi K, Karimzadeh F. Fabrication and characterization of a non-enzymatic electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for glucose monitoring in medical systems. *J Adv Mater Eng*. 2025;45(1):1-15. <https://doi.org/10.47176/jame.45.1.1110>
20. Hasani A, Baniadam M, Maghrebi M. Novel approach for electrochemical functionalization of graphene with surfactant. *J Adv Mater Eng*. 2022;35(4):27-38. <http://doi.org/10.18869/acadpub.jame.35.4.27>
21. Oleneva E, Khaydukova M, Ashina J, Yaroshenko I, Jahatspanian I, Legin A, et al. A Simple procedure to assess limit of detection for multisensor systems. *Sensors* 2019;19(6):1359. <http://doi.org/10.3390/s19061359>
22. Ganguly A, Ebrahimzadeh T, Zimmern PE, De Nisco NJ, Prasad S. Label free, lateral flow prostaglandin E2 electrochemical immunosensor for urinary tract infection diagnosis. *Chemosensors* 2021;9(9):271. <http://doi.org/10.3390/chemosensors9090271>
23. Parayangattil Jyothibasu J, Chen MZ, Lee RH. Polypyrrole/Carbon nanotube freestanding electrode with excellent electrochemical properties for high-performance all-solid-state supercapacitors. *ACS Omega* 2020;5(12):6441-51. <http://doi.org/10.1021/acsomega.9b04029>
24. Seema S, Prasad MVNA. Dielectric Spectroscopy of Nanostructured Polypyrrole-NiO Composites. *J Polym*. 2014;2014:1-5. <http://doi.org/10.1155/2014/950304>
25. Wang X, Yang C, Li H, Liu P. Synthesis and electrochemical performance of well-defined flake-shaped sulfonated graphene/polypyrrole composites via facile in situ doping polymerization. *Electrochimica Acta* 2013;111:729-37.

- <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.145>
26. Zine PC, Narwade VN, Patil SS, Qureshi MT, Tsai M-L, Hianik T, et al. Sensitive electrochemical sensor based on amino-functionalized graphene oxide/polypyrrole composite for detection of Pb^{2+} ions. *Chemosensors* 2025;13(2):34. <http://doi.org/10.3390/chemosensors13020034>
27. Yang Y, Yang X, Yang W, Li S, Xu J, Jiang Y. Porous conducting polymer and reduced graphene oxide nanocomposites for room temperature gas detection. *RSC Adv.* 2014;4(80):42546-53. <http://doi.org/10.1039/c4ra06560c>
28. Hu J, Li Y, Gao G, Xia S. A Mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous Graphene-Polypyrrole composite. *Sensors (Basel)* 2017;17(11):2594. <http://doi.org/10.3390/s17112594>
29. Wang M, Zhang D, Yang A, Wang D, Zong X. Fabrication of polypyrrole/graphene oxide hybrid nanocomposite for ultrasensitive humidity sensing with unprecedented sensitivity. *J Mater Sci.* 2019;30(5):4967-76. <http://doi.org/10.1007/s10854-019-00793-4>
30. Umar MF, Nasar A. Reduced graphene oxide/polypyrrole/nitrate reductase deposited glassy carbon electrode (GCE/RGO/PPy/NR): biosensor for the detection of nitrate in wastewater. *Appl Water Sci.* 2018;8(211). <http://doi.org/10.1007/s13201-018-0860-1>
31. Kiew LV, Chang CY, Huang SY, Wang PW, Heh CH, Liu CT, et al. Development of flexible electrochemical impedance spectroscopy-based biosensing platform for rapid screening of SARS-CoV-2 inhibitors. *Biosens Bioelectron.* 2021;183:113-213. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113213>
32. Myndrul V, Tamashevski A, Lipinska W, Siuzdak K, Iatsunskyi I. Highly sensitive electrochemical multimodal immunosensor for cluster of differentiation 5 (CD5) detection in human blood serum for early stage cancer detection based on laser-processed Ti/Au electrodes. *Talanta*. 2024;279: 126612. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126612>
33. Sanjayan CC, Gokavi L, Ravikumar CH, Balarkishna RG. Antibody-modified 2D MXene nanosheet probes for selective, picolevel detection of cancer biomarkers. *Biosens Bioelectron.* 2025;271:117028. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.117028>