

# طراحی و ساخت بیوسنسر الکتروشیمیایی ولتامتری بر پایه نانوگرافن برای ردیابی سروتونین در ماهی زبرا مبتلا به دیابت

کامیار خوشنویسان<sup>۱</sup>، سید محمود سجادی جزئی<sup>۲</sup>، فرنوش فریدبد<sup>۳</sup>، باقر لاریجانی<sup>۴</sup>، محمدرضا خرمی زاده<sup>۱\*</sup>

## چکیده

**مقدمه:** در این مطالعه، یک نانوکامپوزیت جدید شامل اکسیدگرافن احیاء شده (rGO)، ۱۸-کران-۶ (Cr.6) و نانوذرات طلا (GNPs) بر روی سطح یک الکتروود کربن شیشه‌ای (GCE) قرار گرفته و جهت بررسی و اندازه‌گیری الکتروشیمیایی بیومارکر سروتونین استفاده گردیده است.

**روش‌ها:** مورفولوژی نانوکامپوزیت ساخته شده با روش SEM مشخصه‌یابی شد. ماهی زبرا از طریق غذادهی با گلوکز دیابتی شد. سنجش بیومارکر سروتونین (5-HT)، در حضور موادی مانند دوپامین (DA)، اسید اسکوربیک (AA)، اوره، گلوکز و همچنین تریپتوفان (L-Trp) که به‌عنوان مداخله‌گرهای مرسوم موجود در محیط بیولوژیکی هستند، انجام گرفت.

**یافته‌ها:** سیستم طراحی شده، فعالیت کاتالیزوری الکتروشیمیایی رضایت‌بخشی را برای تعیین سروتونین با استفاده از روش ولتامتری موج مربع (SWV) نشان داد. رفتار الکتروشیمیایی سروتونین در نانوکامپوزیت ساخته شده جریان و پتانسیل اکسیداسیون قابل قبولی را نشان داد. پایین‌ترین حد تشخیص (LOD) برای سروتونین در نمونه‌های واقعی آماده شده برای گروه کنترل و دیابتی با استفاده از الکتروود اصلاح شده و روش HPLC به ترتیب حدود ۰/۳ و ۰/۱ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد. حسگر ساخته شده دارای انتخاب پذیری و حساسیت قابل توجه‌ای بوده و پایداری و قابلیت تکرار پذیری بالایی را برای سنجش سروتونین نشان داد. الکتروود اصلاح شده، بازیابی بسیار خوبی در حدود ۹۷٪ و خطای وابسته حدود ۳٪ را در مقایسه با روش استاندارد از خود نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که سروتونین می‌تواند به‌عنوان بیومارکر دیابت برای تشخیص زود هنگام در بیماران دیابتی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** سروتونین، بیومارکر، نانوکامپوزیت جدید، رفتارهای الکتروشیمیایی، ماهی زبرا دیابتی

۱- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده‌ی علوم سلولی-مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده‌ی علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلول درمانی و پزشکی بازساختی، پژوهشکده‌ی علوم سلولی-مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- گروه شیمی تجزیه، دانشکده‌ی شیمی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

\***تثانی:** تهران، بزرگراه شهید چمران، تقاطع جلال آل احمد، بعد از دانشگاه تربیت مدرس، پلاک ۱۰، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، کدپستی:

۱۴۱۱۷۱۳۱۱۹، تلفن: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۶۸، نمابر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: khoramza@tums.ac.ir

## مقدمه

دیابت از علل اصلی مرگ و میر و ناتوانی در سراسر جهان بوده که در بیماری‌های مختلفی از جمله نارسایی‌های قلبی، کلیوی و نابینایی تأثیرگذار است. طبق آمار فدراسیون جهانی دیابت (IDF)<sup>۱</sup> تا سال ۲۰۱۵ در سراسر جهان حدود ۴۱۵ میلیون نفر به دیابت مبتلا شده‌اند و پیش‌بینی می‌شود شیوع دیابت تا سال ۲۰۴۰ در جهان به ۶۴۲ میلیون نفر خواهد رسید که این آمار رشد ۵۴ درصدی این بیماری را نشان می‌دهد [۴-۱]. در ایران نیز که در منطقه خاورمیانه قرار دارد بیش از ۱۲٪ جمعیت بزرگسالان به دیابت مبتلا هستند [۶، ۵]. اندازه‌گیری و ارزیابی دقیق بیماری در تشخیص بالینی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. اگرچه روش‌های متعددی در این زمینه موجود و در حال استفاده هستند، اما همچنان فقدان روش‌های اندازه‌گیری و آنالیز مناسب، سریع، انتخابی و در عین حال مقرون به صرفه به چشم می‌خورد. حسگرهای الکتروشیمیایی ویژگی‌های تحلیلی جذاب زیادی را ارائه می‌دهند و گزینه‌های امیدوارکننده‌ای برای تشخیص بالینی در آینده هستند. با این حال، هنوز مسائل متعددی وجود دارد که باید قبل از استفاده از این روش‌ها برای تشخیص در محل<sup>۲</sup> مورد بررسی قرار گرفته و حل شوند. طراحی حسگرهای زیستی که قادر به نظارت مداوم بر نوروترانسمیترها در زمان واقعی هستند، نیاز به جمع‌آوری نمونه‌های مکرر را کاهش داده و این امر انجام آزمایشات را راحت‌تر و کاربردی‌تر می‌نماید [۸، ۷]. همچنین، طراحی سیستم‌های حسگری مبتنی بر مدل‌های نانومواد، مستلزم توسعه تکنیک‌هایی برای غلبه بر محدودیت انتقال جرم به‌وسیله تحریک حرکت سیال است. یکپارچه‌سازی حسگرهای الکتروشیمیایی با سیستم‌های کاملاً اتوماتیک که بتواند نتایج را بدون هیچ مداخله‌ی انسانی نمایش دهند، برای دستیابی به استفاده وسیع از آنها در وسایل مراقبتی کاملاً ضروری به‌نظر می‌رسد [۱۰، ۹].

طراحی و ساخت الکترودها یا بیوحسگرها با استفاده از نانومواد، پتانسیلی امیدبخش برای اندازه‌گیری سریع و زمان واقعی با وضوح بالا ایجاد کرده است. اخیراً چندین نانومواد مانند نانوغرافن، نانوذرات طلا و انواع مختلف نانو کامپوزیت‌های فلزی جهت بهره

برداری در این دستگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۱]. در میان این نانومواد، نانوغرافن به‌علت جذب بسیار بالا، حساسیت عالی، خواص بسیار خوب جذب سطحی، هدایت الکتریکی عالی، استحکام مکانیکی مناسب، زیست‌تخریب‌پذیری و عامل‌دار شدن آسان برای ساخت بیوحسگرهای الکتروشیمیایی گزینه‌ی بسیار مناسبی خواهند بود [۱۲]. انواع مختلفی از نانوذرات و نانو ساختارها (مانند نانومواد کربنی، فلزات، نانوذرات اکسید فلزی) و همچنین انواع پلیمرها و ترکیبات هیبریدی نانو ساختارهای آلی-غیرآلی برای ساخت غشاهایی با زیست‌سازگاری و ویژگی‌های ردوکس<sup>۳</sup> تقویت شده، استفاده شده است [۱۱، ۵]. علی‌رغم پیشرفت‌ها، پروب‌های الکتروشیمیایی هنوز عمدتاً برای اندازه‌گیری در شرایط استاندارد کاربرد محدودی داشته و مسائل و مشکلات متعددی در کارآمدی و به‌کارگیری این سیستم‌ها در شرایط درون‌تنی وجود دارد. در بین تعداد زیادی از پژوهش‌هایی که در مورد طراحی تعداد بیشماری از اشکال الکترودی برای تشخیص نوروترانسمیترها گزارش شده است، معدودی از مقالات به اندازه‌گیری درون‌تنی با الکترودهای وارد شده در بافت به‌عنوان پروب‌های تشخیصی یا پایش‌کننده‌ی حالت بیماری در ارگان‌های کامل، پرداخته‌اند [۷].

اخیراً استفاده از نانوپیت‌ها<sup>۴</sup> و تکنولوژی نانوحسگرها برای آشکارسازی بیومولکول‌ها در محیط‌های محصور شده همچون تک سلول‌ها و نرون‌ها گزارش شده است. این ابزارهای توانمند نانو، درهایی را برای بررسی بهنگام فرآیندهای فیزیولوژیکی در سطح تک سلول با رزولوشن فضایی بالا و کمترین آسیب بافتی گشوده است.

به‌طور کلی، پیشرفت روش‌های شناسایی آنالیزی برای آشکارسازی نوروترانسمیترها خاصی طراحی شده است و برای کاربرد و محیط بیولوژیکی ویژه‌ای تنظیم شده‌اند. ابزارهای اندازه‌گیری الکتروشیمیایی (مثل الکترودها با کمیت‌سازی الکتروشیمیایی) شیوه‌هایی ارزشمند برای آشکارسازی برون‌تنی و درون‌تنی نوروترانسمیترها هستند که می‌توانند به‌دلیل پایین بودن هزینه، طراحی نسبتاً ساده و توانایی اندازه‌گیری بهنگام با رزولوشن فضایی بالا مد نظر قرار گیرند. حسگرهای الکتروشیمیایی حساسیت و

<sup>۳</sup> Redox<sup>۴</sup> Nanopipettes<sup>۱</sup> International Diabetes Federation<sup>۲</sup> Diagnostic point-of-care

ولتامتری چرخه‌ای<sup>۱</sup> (CV) در محدوده‌ی پتانسیل از ۰/۰ تا ۱/۲ ولت با سرعت ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه برای یک چرخه‌ی مشخص به دست آمد. میزان اسکن و مقادیر pH مورد بررسی قرار گرفت و بهترین نتیجه‌ی به دست آمده برای استفاده انتخاب شدند [۱۳]. غلظت های مختلف GNP و rGO مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت، بهترین غلظت برای تهیه‌ی کامپوزیت انتخاب شد [۱۴]. برای تهیه‌ی rGO، ۳ میلی لیتر  $N_2H_4$  ۱ میلی مولار به ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون GO (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شد و تا دمای ۹۰ درجه‌ی سانتیگراد گرم شد، پس از آن، محلول تعلیق به مدت ۱ ساعت رفلاکس شد. محلول آماده شده قبل از خشک شدن در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتیگراد برای حدود ۲۴ ساعت چندین بار با اتانول و آب مقطر شسته شده و برای استفاده در دمای اتاق نگهداری شد.

#### مشخصه‌یابی بستر تهیه شده

جهت ارزیابی بستر تهیه شده موارد زیر به کار گرفته شد.

#### مطالعه‌ی سطح و مورفولوژی بستر (SEM)

از آنجا که مورفولوژی سطح و اندازه‌ی نانوگرافن در فرآیند تشخیص نقش دارند از تکنیک SEM جهت ارزیابی استفاده شد. آنالیز طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (EIS): ابتدا تمام الکترودها اعم از GCE و اصلاح شده در پروب کلرید پتاسیم ۵ میلی مولار و همچنین فروسیانید آهن  $Fe(CN)_6^{4-}$  ۲۵۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفت و سپس این الکترودها در محدوده فرکانسی ۱۰۰ کیلو هرتز تا ۰/۱ هرتز و پتانسیل مستقیم ۰/۳ ولت و پتانسیل متناوب ۱۰ میلی ولت در محلول بافر فسفات نمکی با pH برابر ۷/۴ که حاوی غلظت ۱۰۰ میکرومولار سرتونین بود، استفاده گردید. سپس نمودار نایکوئیست مربوط به هر سطح کشیده و ثبت گردید.

#### مدل ماهی زبرا مبتلا به دیابت و آماده‌سازی نمونه

##### شرایط نگهداری ماهی زبرا

سویه‌های ماهی وحشی زبرا (Danio rerio) از یک مرکز تکثیر و پرورش ویژه‌ی آن خریداری شده و درون مخازن قرنطینه به مدت یک هفته نگهداری شد. تمام ماهی‌ها به مدت حداقل یک هفته در آکواریوم‌های موجود در شرایط آزمایشگاهی (با شرایط ۱۴ ساعت

اختصاصیت را در داخل ابزار آنالیزی کوچکی امکان پذیر می‌کنند. در مقایسه با روش‌های آنالیزی مرسوم (مثل طیف سنجی، کروماتوگرافی) حسگرهای الکتروشیمیایی می‌توانند برای آنالیز نوروترانسمیترهای هدف اصلاح و سازگار شوند [۱۲].

هدف این پروژه ارائه‌ی یک روش شناسایی جدید در توسعه‌ی روش‌های الکتروشیمیایی برای پایش سروتونین با تمرکز بر روی انتقال الکترون در روش الکتروشیمیایی و با استفاده از الکتروده اصلاح شده و همچنین استفاده از روش HPLC به عنوان یک روش استاندارد جهت مقایسه با سیستم طراحی شده در شرایط کنترل شده (در محلول آماده شده از روده ماهی زبرا مبتلا به دیابت) با پایش بهنگام Ex-vivo بوده است. علاوه بر این اندازه‌گیری میزان سروتونین به عنوان بیومارکر دیابت در دو گروه کنترل و دیابتی انجام شده و مقایسه اختلاف میزان سروتونین این دو گروه مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش‌ها

این مطالعه در سه فاز طراحی و اجرا گردید. در فاز اول ساخت و ارزیابی نانو کامپوزیت با معیارهای استاندارد صورت پذیرفت. در فاز دوم مطالعه آماده‌سازی ماهی زبرا برای دیابتی و استخراج نمونه از ماهی زبرا برای دیابتی صورت گرفت و در فاز سوم مطالعه نیز، سنجش میزان سروتونین نمونه‌ی بافتی ماهی زبرا توسط نانو کامپوزیت طراحی شده در کنار HPLC به عنوان روش مرجع مورد ارزیابی قرار گرفت که جزئیات انجام هر یک از مراحل به شرح زیر است:

#### ساخت و ارزیابی نانو کامپوزیت با معیارهای استاندارد

##### ساخت و ارزیابی نانو کامپوزیت بر پایه‌ی گرافن احیا شده

در این مطالعه ابتدا گرافن احیا شده و نانوذرات طلا سنتز شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند، سپس نانو کامپوزیت که شامل گرافن احیا شده، نانوذرات طلا و ۱۸-کران اتر-۶ (Cr.6) بود ساخته شد. در ادامه نانو کامپوزیت آماده شده بر روی الکتروده گلسی کربن (الکتروده کار) قرار داده شد و جهت اندازه‌گیری سروتونین مورد استفاده قرار گرفت.

##### ساخت GCE اصلاح شده با نانو کامپوزیت ساخته شده

<sup>۱</sup> Cyclic voltammetry

پس از رسیدن به هر کدام از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و در نهایت ۲۰۰ میلی‌مولار، به مدت ۱۲ ساعت غذادهی انجام نشد و پس از آن، ۳ عدد ماهی از هر تکرار جهت سنجش میزان قند خون نمونه برداری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در آکواریوم با آب بدون گلوکز قرار داده شدند تا از آلودگی نوار گلوکومتر جلوگیری شود. بعد ماهی در محلول ازنول<sup>۱</sup> قرار داده شده و بعد از بی‌حسی کامل دم ماهی زبرا بریده شد و تست قند خون با قرار دادن نوار تست گلوکومتر به‌طور مستقیم بر روی دم ماهی صورت گرفت. قند خون بر اساس میلی‌گرم بر دسی‌لیتر محاسبه شد. در مرحله‌ی نمونه برداری ۳ عدد روده خارج شده از ماهی‌های زبرا کشته شده را در داخل یک میکروتیوب ریخته و سپس ۱ میلی‌لیتر متانول و ۳۰۰ میکرولیتر پرکلریک اسید به داخل همان میکروتیوب اضافه شد. پس از آن هر نمونه در حدود ۱۲۰ ثانیه در داخل دستگاه هموژنایزر قرار گرفت. در مرحله‌ی آخر جهت گرفتن سرباره<sup>۲</sup> نمونه‌های تهیه شده، میکروتیوب در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. نمونه‌های آماده شده در فریزر نگهداری شده و جهت انجام آزمون‌های مورد نیاز مورد استفاده قرار گرفت.

### تشخیص و ارزیابی سروتونین با استفاده از حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر گرافن احیاء شده بر روی الکتروکد

الکتروکد کار ساخته شده برای ردیابی سروتونین در مایعات بیولوژیکی ماهی زبرا مبتلا به دیابت مورد ارزیابی قرار گرفت. پروفایل‌های ولتامتریکی جهت آزمون‌های کیفی با روش CV انجام شده و سپس حسگر ساخته شده جهت آزمون‌های کمی تهیه منحنی استاندارد و کالیبر کردن سیستم و همچنین آزمون‌های مورد نیاز در مایعات بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته و سپس به روش SWV اندازه‌گیری شد. جهت تأیید سیستم طراحی شده و خوانش اولیه، نمونه سروتونین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به روش CV (در محدوده پتانسیل از ۰/۰ تا ۱/۲ ولت با سرعت ۰/۱ ولت بر ثانیه) و

نور، ۱۰ ساعت بدون نور، رژیم غذایی، آب ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد) قرار داشتند. ماهی‌ها دو بار در روز با Artemia تغذیه شدند. تمام ماهی‌های زبرا که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند، به‌طور تصادفی از ماهی‌های بالغ (حدود ۷ ماه) انتخاب شدند.

### مراحل آماده نمودن ماهی زبرا

برای ایجاد مدل دیابت یا التهاب هایپرگلیسمی، محلول گلوکز مورد استفاده قرار گرفت.

### گروه دیابتی (DM)

به ماهی‌هایی گفته می‌شود که در حالت هایپرگلیسمی (Hyperglycemia) در معرض گلوکز (۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) هستند و به مدت حداقل ۲ روز در این حالت بوده‌اند.

### گروه کنترل

ماهی‌های این گروه از لحاظ نگهداری و تغذیه مانند گروه DM بوده، ولی به جای گلوکز در محیط بافری (بافر فسفات) تیمار شدند. در دو گروه فوق تمام پارامترهای مورد نیاز مانند زمان، دما و تیمار به صورت یکسان صورت گرفت. سپس در هر گروه به ترتیب زیر آزمایش انجام گرفت.

۱. گروه DM به تعداد ۱۲ عدد جهت ۳ بار تکرار

۲. گروه کنترل به تعداد ۱۲ عدد با تعداد ۳ بار تکرار

### دیابتی کردن و آماده‌سازی نمونه‌ی روده از ماهی زبرا

علاوه بر این در نمونه‌های تهیه شده از روده‌ی ماهی زبرا، نمونه‌ی استاندارد به صورت Spike در تست حسگر و HPLC جهت مقایسه مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق برای افزایش میزان قند خون ماهیان، از روش افزودن گلوکز منو هیدرات به آب آکواریوم استفاده شد. غلظت گلوکز منو هیدرات در آب انکوباتورها طی مدت ۹ روز از صفر به ۷۲ گرم در لیتر رسانیده شد. به طوری که ماهیان به مدت ۳ روز در غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز منو هیدرات (۱۸ گرم در لیتر) و پس از آن به مدت ۳ روز دیگر هم در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (۳۶ گرم) و بعد در نهایت به مدت ۳ روز در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار (۷۲ گرم در لیتر) گلوکز منو هیدرات در دو لیتر آب قرارداده شدند. برای سنجش میزان قند خون ماهی‌ها در تیمارهای مختلف،

<sup>۱</sup>Supernatant

<sup>۱</sup> Eugenol

آمده بود به داخل سل شیشه‌ای الکتروشیمیایی جهت اندازه‌گیری اضافه شد. همچنین از پروتکل افزودن استاندارد<sup>۶</sup> برای اندازه‌گیری سروتونین در نمونه‌های آماده شده استفاده شد. برای هر نمونه‌ی آماده شده، چهار محلول با غلظت‌های مختلف سروتونین اضافه شده (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار) و یک محلول نیز بدون اضافه کردن محلول سروتونین تهیه شد. محلول‌های نهایی با استفاده از محلول PBS M ۰/۱ (pH ۷/۴) حدود ۲۰ برابر قبل از تجزیه و تحلیل رقیق شدند. در نهایت، از روش SWV برای ارزیابی آنالیت در دامنه بالقوه ۰/۰ ولت تا ۰/۶ ولت با دامنه ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه و فرکانس ۵ هرتز استفاده شد. سپس، منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های آماده شده از ماهی زبرا مبتلا به دیابت ترسیم شد. از منحنی کالیبراسیون خطی در مدل رگرسیونی برای محاسبه LOD و میزان سروتونین استفاده شد. LOD سیستم طراحی شده مانند روش HPLC محاسبه شد. میزان سروتونین بر اساس شدت جریان به دست آمده (پاسخ سیستم طراحی شده بر حسب میکروآمپر) از غلظت‌های مختلف سروتونین افزوده شده (بر حسب میکروگرم بر لیتر) به نمونه‌های آماده شده ماهی زبرا حاصل شد.

#### ملاحظات اخلاقی

تمام مراحل انجام شده بر اساس دستورالعمل‌ها و روش‌های تجربی توصیف شده در "اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی" (منتشر شده در شماره ۸۰-۲۳ موسسه ملی بهداشت، و تجدید نظر شده در سال ۱۹۹۶) و پروتکل مراقبت از حیوانات انجام شد.

#### آزمون‌های آماری

آزمون t-test جفت نشده<sup>۷</sup> (که همچنین به‌عنوان آزمون t-test مستقل شناخته می‌شود) جهت محاسبه و به‌دست آوردن اختلاف آماری بین نمونه‌های دو گروه کنترل و دیابتی آماده شده از ماهی زبرا مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism 8.0.1 آنالیز شد. سطح معنادار (P-Value) برای این آزمون کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

SWV (در محدوده‌ی پتانسیل از ۰/۰ تا ۰/۶ ولت با شدت<sup>۱</sup> ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه و فرکانس ۵ هرتز) برای اندازه‌گیری کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. انجام تست‌های مربوط به کنترل کیفی، تکرار پذیری و درستی این سیستم با تکرار سروتونین با غلظت مشخص ۱۰۰ میکرومولار مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

#### تهیه‌ی منحنی استاندارد و کالیبر کردن سیستم

غلظت‌های مختلف سروتونین از محدوده (۰/۰۱-۴) میکرومولار تهیه شده و جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد. تعیین حد پایین<sup>۲</sup> (LOD)، بررسی حساسیت و خطی بودن پاسخ سیستم نیز از طریق این منحنی محاسبه شد.

#### تعیین اختصاصیت، قابل اعتماد بودن (Reliability) و پایداری سیستم<sup>۳</sup>

بررسی اختصاصیت سیستم طراحی شده با محلول‌های مداخله‌گر جهت بررسی ویژگی سیستم از جهت اختصاصیت، با محلول‌های مداخله‌گر<sup>۴</sup> (شامل اسید اوریک، گلوکز، تریپتوفان، دوپامین و اسید اسکوربیک) و همچنین به‌منظور بررسی عدم تداخل محلول‌های ذکر شده با سروتونین، حسگر ساخته شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### Reliability نمونه‌های خوانش شده

مقایسه خوانش نمونه‌ها با سیستم طراحی شده و روش استاندارد اندازه‌گیری مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان سروتونین روده‌ی ماهی زبرا از طریق روش استاندارد HPLC و همچنین از طریق سیستم طراحی شده اندازه‌گیری شده و با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین پایداری نانوکامپوزیت ساخته شده در دمای اتاق بعد از گذشت ۲ ماه مورد بررسی قرار گرفت.

#### اندازه‌گیری سروتونین در نمونه‌های واقعی<sup>۵</sup> و اختلاف آماری بین دو گروه کنترل و دیابتی

برای اندازه‌گیری سروتونین در نمونه‌های آماده شده از روده‌ی ماهی زبرا از نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی GCE استفاده شد. سرباره به‌دست آمده که در مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه با دقت به‌دست

<sup>۵</sup> Real samples

<sup>۶</sup> Spiked standard addition

<sup>۷</sup> Unpaired t-test

<sup>۱</sup> Amplitude

<sup>۲</sup> Limit of detection

<sup>۳</sup> System stability

<sup>۴</sup> Interference

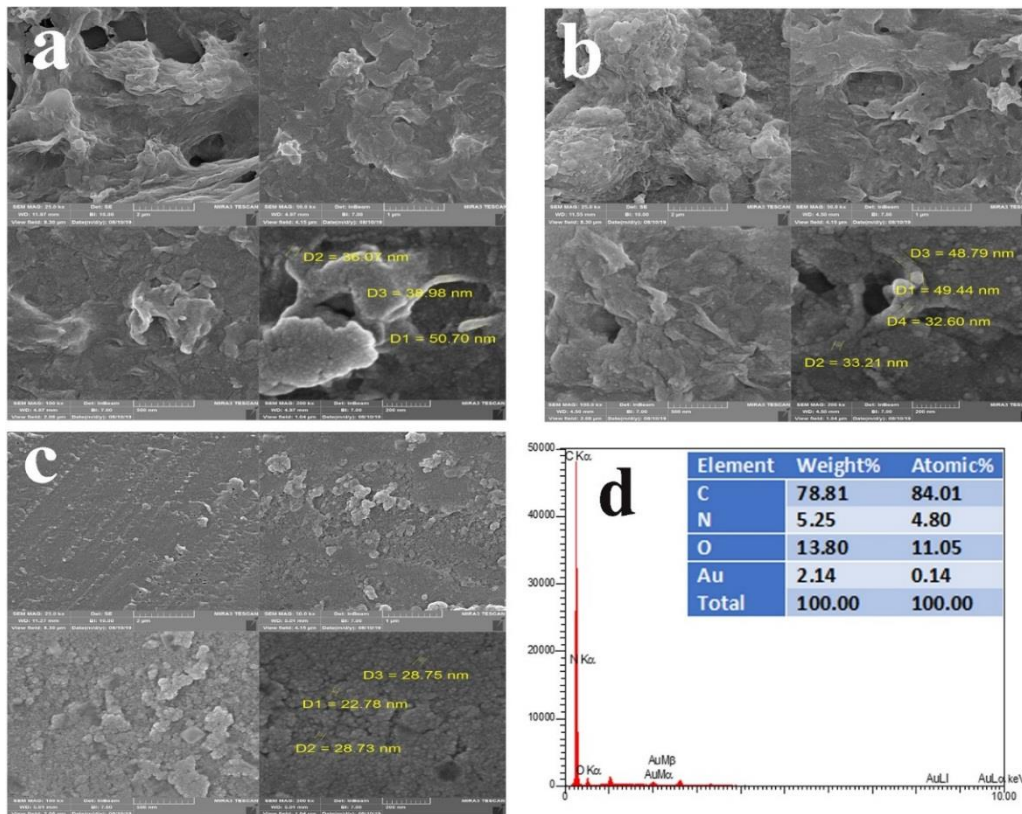
، b، c و d به ترتیب شرح داده شده است. همان طور که در شکل ۱ قسمت a و b، نمایش داده شده rGO و rGO-GNP برای تزئین سطح GCE استفاده شده است. در نانوکامپوزیت نهایی که در شکل ۱ قسمت c نشان داده شده Cr.6 با موفقیت به طور یکنواخت در سطح الکتروود پراکنده شده و باعث ایجاد سطحی با توزیع یکنواخت نانوکامپوزیت بر روی سطح الکتروود و تله اندازی<sup>۱</sup> سروتونین جهت تشخیص با حساسیت بالا این آنالیت نسبت به سطح های rGO و rGO-GNPs می شود. داده های EDX از نانوکامپوزیت ساخته شده در شکل ۱ قسمت d نشان می دهد که ۲/۱۴٪ وزنی نانوکامپوزیت بر روی سطح الکتروود شیشه ای کربن متشکل از نانوذرات طلا است.

## یافته ها

یافته های مطالعه حاضر بر اساس فازهای اجرایی مطالعه به شرح ذیل می باشد:

### مشخصه یابی بستر تهیه شده

بررسی مورفولوژی سطح GCE اصلاح شده: SEM برای مطالعه مورفولوژی سطوح مختلف GCE اصلاح شده استفاده شد. SEM از کامپوزیت های مختلف rGO/GCE، rGO-GNPs/GCE و rGO-GNPs-Cr.6/GCE و در مقیاس های مختلف شامل ۱ و ۲ میکرومتر و ۵۰۰ و ۲۰۰ نانومتر به دست آمده و داده های طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) کامپوزیت نهایی نیز در شکل ۱ قسمت a



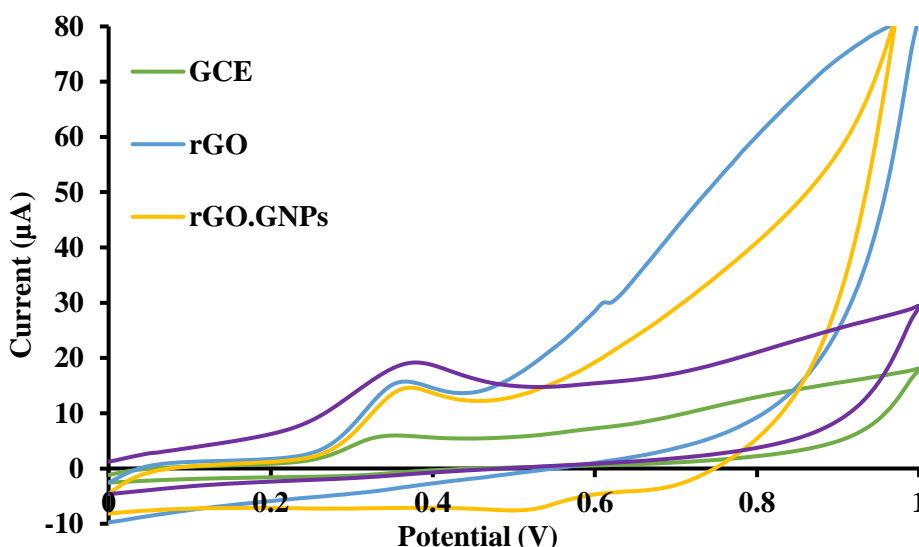
شکل ۱- تصاویر FE-SEM در ۴ مقیاس مختلف نمایانگر مورفولوژی سطح (a) rGO، (b) rGO-GNPs، (c) rGO-GNPs-Cr.6 و (d) داده های EDX که حضور عناصر در نانوکامپوزیت را توصیف می کند.

<sup>۱</sup> Trapping

### آنالیزهای الکتروشیمیایی به روش CV و SWV جهت ارزیابی کیفی سروتونین

عملکرد الکتروشیمیایی الکتروود اصلاح شده شامل GCE، rGO، Cr.6 و نانوکامپوزیت ساخته شده rGO-GNPs با استفاده از آنالیز الکتروشیمیایی CV در محلول ۱۰۰ میکرومولار آماده شده از سروتونین در (pH=۷/۴) PBS از لحاظ کیفی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). پیک‌های آندی مرتبط با الکترودهای GCE و rGO در کمترین پیک جریانی ظاهر شدند. پیک آندی زمانی که GNPs به rGO اضافه شده و باعث تشکیل کامپوزیت rGO-GNPs می‌شود کمی افزایش یافته است. این افزایش به دلیل رشد میزان انتقال الکترون بر روی الکتروود

حضور نانوذرات طلا است. افزودن Cr.6 به کامپوزیت rGO-GNPs باعث افزایش قابل توجه پیک آندی شده و پتانسیل اکسیداسیون در مقایسه با GCE نیز مقدار کمی مثبت‌تر شده است. با اضافه شدن Cr.6 علاوه بر تغییر در ساختار سطح ایجاد شده، Cr.6 باعث ایجاد پیوندهای واندروالسی و الکتروستاتیک بین عناصر موجود در نانوکامپوزیت می‌شود. پیک نانوکامپوزیت نهایی نسبت به الکتروود GCE افزایش حدود ۳ برابری را از خود نشان می‌دهد. در واقع جریان در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سروتونین با استفاده GCE پیک حدود ۵/۹ میکروآمپر را نشان داده با اینکه در همان شرایط با استفاده از نانوکامپوزیت پیک جریان عددی حدود ۱۹/۲ میکروآمپر را نشان داد.



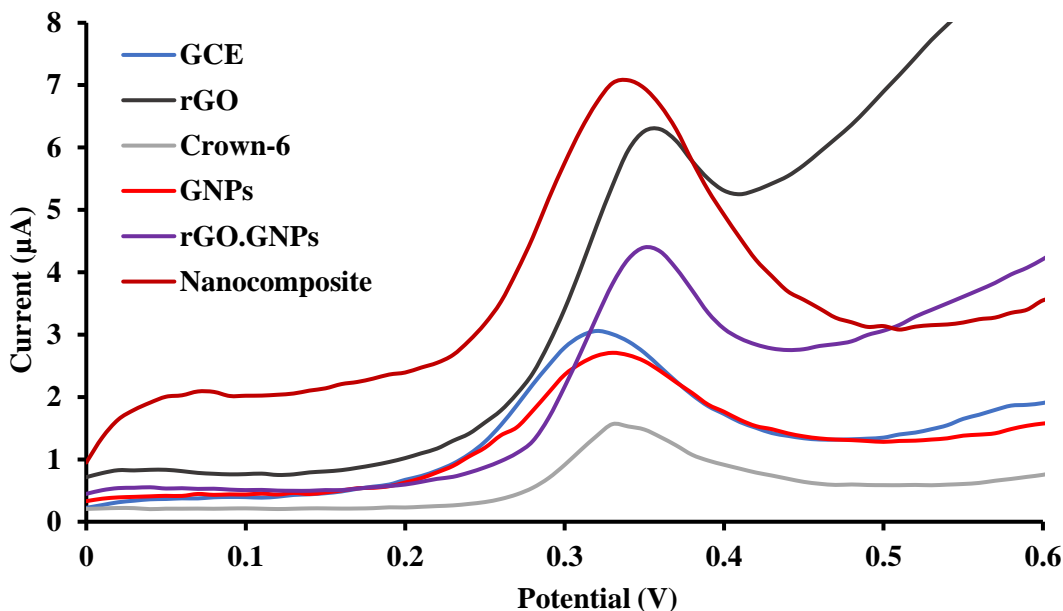
شکل ۲- بررسی مرحله به مرحله نانومواد مؤثر بر روی GCE شامل rGO، rGO-GNPs و نانوکامپوزیت ساخته شده جهت سنجش سروتونین (غلظت ۱۰۰ میکرومولار) جهت ارزیابی کیفی آن آنالیت به روش CV

در ترکیب با کامپوزیت rGO-GNPs حدود ۲/۵ برابر جریان را در مقایسه با GCE افزایش داده و پیک پتانسیل را به مقدار ناچیزی به سمت پتانسیل مثبت تغییر داد (۰/۳۲ ولت به ۰/۳۴). رفتار الکتروشیمیایی آنالیز SWV کلیه الکترودها (شکل ۳) نشان داد که الکتروود نانوکامپوزیت یک عامل الکتروشیمیایی مناسب برای تشخیص سروتونین است که ناشی از نرخ انتقال الکترون بالا به دلیل ترکیب Cr.6 با GNPs و rGO صورت می‌گیرد. شکل نشان می‌دهد که اضافه کردن نانوذرات طلا به تنهایی نمی‌تواند

منحنی‌های SWV از نانوذرات و نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی GCE در شکل ۳ نشان داده شده است، که با اضافه کردن محلول ۱۰۰ میکرومولار آماده شده از سروتونین به (pH=۷/۴) PBS در دامنه ۰/۰ تا ۰/۶ ولت با فرکانس ۵ هرتز مورد ارزیابی قرار گرفت. نانوذرات طلا بر روی سطح الکتروود نمی‌توانند بر روی پیک جریان و پتانسیل به طور قابل توجهی تأثیر بگذارد با اینکه rGO کمی بر روی پتانسیل اکسیداسیون تأثیرگذار بوده است. با استفاده از محلول ۰/۵۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از Cr.6

می‌دهد. در واقع جریان در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سروتونین با استفاده از GCE پیک می‌دهد. معادل ۲/۸ میکروآمپر را نشان داده در صورتی که با استفاده از نانوکامپوزیت نهایی در همان شرایط پیک جریان عددی حدود ۷/۱ میکروآمپر را از خود نشان داد.

حساسیت (میزان شدت جریان) سروتونین را تغییر دهد در حالی که افزودن Cr.6 به کامپوزیت rGO-GNPs این حساسیت را به طور قابل توجهی افزایش داد. پیک نانوکامپوزیت نهایی نسبت به الکتروود GCE افزایش حدود ۲/۵ برابری را از خود نشان



شکل ۳- بررسی مرحله به مرحله نانومواد موثر بر روی GCE شامل rGO, GNPs, Cr.6, rGO-GNPs و نانوکامپوزیت ساخته شده جهت سنجش سروتونین (غلظت ۱۰۰ میکرومولار) جهت ارزیابی کیفی آن آنالیت به روش SWV

را در واکنش اکسیداسیون سروتونین دارد. در شکل ۵ (b) نمودار نایکوئیست مربوط به اصلاح GCE با Cr.6 را نشان می‌دهد، این نمودار نشانگر کاهش مقاومت انتقال الکترون در اکسیداسیون سروتونین است. در شکل ۵ (c) نمودار نایکوئیست مربوط به اصلاح GCE با نانو ذرات طلا نشان داده شده است که مقاومت اکسیداسیون سروتونین به سبب تمایل بالای برهمکنش طلا به گروه‌های نیتروژن دار حاضر در سروتونین نسبت به GCE کاهش پیدا کرده است. در شکل ۵ (d) نمودار نایکوئیست مربوط به اصلاح GCE با گرافن اکسید کاهش یافته نشان داده شده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود این الکتروود مقاومت انتقال الکترون بسیار پایینی در مقابل اکسیداسیون سروتونین از خود نشان می‌دهد. سپس جهت به دست آوردن خاصیت برهمکنش خوب سروتونین با نانو ذرات طلا و مقاومت اکسیداسیون پایین سروتونین در حضور گرافن اکسید

### EIS جهت مشخصه‌یابی سطح الکتروود اصلاح شده

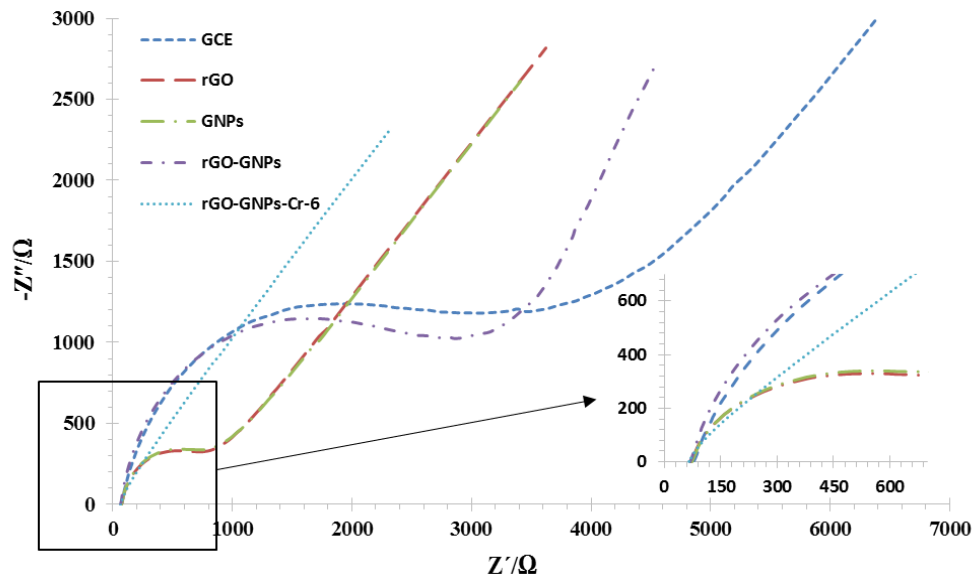
EIS جهت بررسی مقاومت سطح الکتروود در پروب کلرید پتاسیم ۵ میلی‌مولار و همچنین فروسیانید آهن  $Fe(CN)_6^{4-}$  ۲۵۰ میلی‌مولار جهت اطمینان از کاهش مقاومت سطح الکتروودهای اصلاح شده نسبت به GCE استفاده شد. نتایج حاصل از این الکتروودها در شکل نشان می‌دهد که میزان مقاومت سطح GCE اصلاح شده با نانوکامپوزیت به میزان  $R_{CT} = 105 \Omega$  است که نشان دهنده مقاومت پایین و نرخ انتقال بار بسیار خوب نسبت به سایر الکتروودهای اصلاح شده است (شکل ۴).

محدوده ۰/۳ ولت به علت فعالیت الکتروشیمیایی سروتونین به عنوان محدوده پتانسیلی انتخاب گردید. پس تمام نمودارهای نایکوئیست ثبت شده نشانگر مقاومت انتقال الکترون یا بار (R<sub>CT</sub>) در اکسیداسیون سروتونین هستند. در شکل ۵ (a) نمودار نایکوئیست مربوط به GCE نشان می‌دهد که بیشترین مقاومت

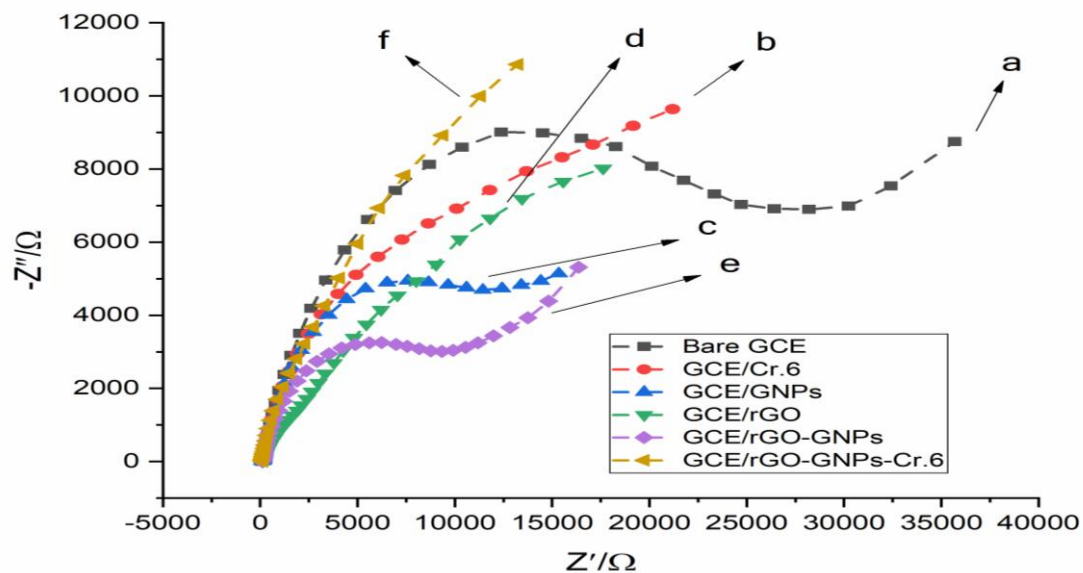


حدودی خواسته ما مرتفع گشته است. سپس کامپوزیتی از نانو ذرات طلا، گرافن اکسید کاهش یافته و Cr.6 ساخته شد و با آن سطح GCE اصلاح گردید و نمودار نایکوئیست آن که در شکل ۵ (f) مشاهده می‌کنید ثبت شد.

کاهش یافته، کامپوزیتی از این دو ماده ساخته شده و GCE اصلاح گردید که نمودار نایکوئیست مربوط به آن در شکل ۵ (e) نشان داده شده است و همان‌طور که مشاهده می‌شود مقاومت انتقال الکترون در اکسیداسیون سرتونین نسبت به الکتروود اصلاح شده با نانو ذرات طلا کاهش پیدا کرده و تا



شکل ۴- نمودار نایکوئیست ثبت شده در پروب کلرید پتاسیم ۵ میلی مولار و همچنین فروسیانید آهن  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  ۲۵۰ میلی مولار با استفاده از GCE، rGO/GCE، rGO-GNP/GCE و rGO-GNP-Cr.6/GCE (دامنه فرکانس از ۱ هرتز تا ۱۰۰ کیلوهرتز)



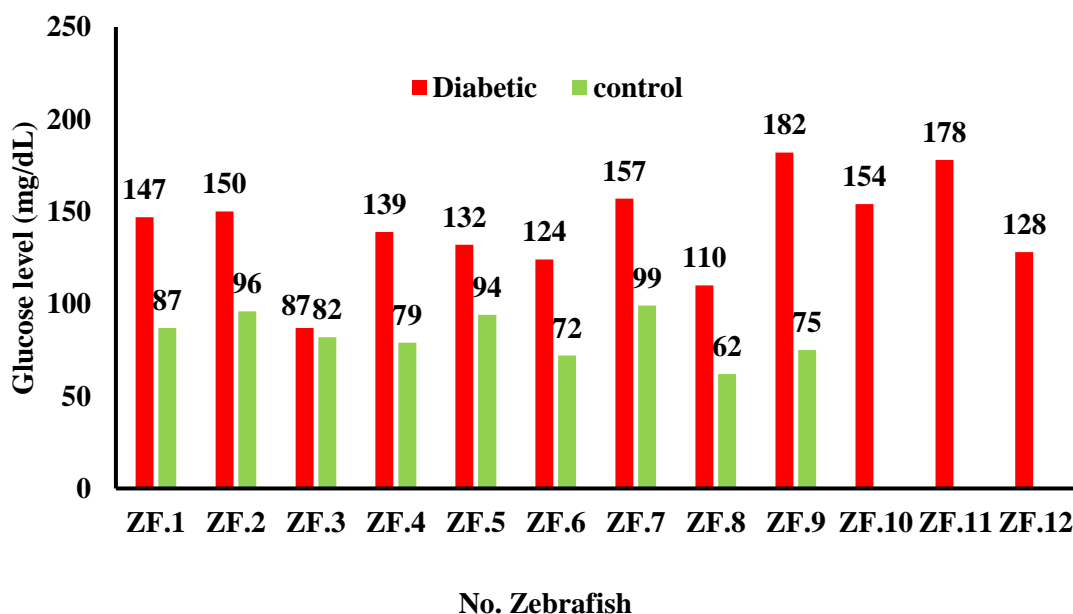
شکل ۵- نمودار نایکوئیست ثبت شده جهت اندازه‌گیری الکترودهای اصلاح شده و GCE در محلول حاوی سرتونین به روش طیف سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (دامنه فرکانس از ۱ هرتز تا ۱۰۰ کیلوهرتز)

ماهی زیرا مورد ارزیابی نهایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از ۱۲ ماهی مورد ارزیابی، ۹ ماهی با قند خون بالاتر از ۱۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر انتخاب شده (ماهی‌های زیرا دیابتی شده) که این ماهی‌ها برای آماده‌سازی و همچنین جهت اندازه‌گیری سروتونین توسط HPLC و حسگر ساخته شده مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۶).

مشخصه‌های بالینی ماهی زیرا مبتلا به دیابت

تعیین قندخون در ماهی زیرا سالم و دیابتی

از گروه کنترل شامل ۹ ماهی، سه نمونه جهت اطمینان از صحت سالم بودن این گروه مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان سروتونین آن نیز فقط با روش HPLC اندازه‌گیری شد. از گروه دیابتی ۱۲



شکل ۶- نمودار میله‌ای بررسی میزان قند خون ماهی‌های زیرا در دو گروه کنترل و دیابتی

از ۱۰ میکرومولار از سروتونین در حضور ۲ میلی‌مولار AA، ۰/۵ میلی‌مولار DA، ۲ میلی‌مولار گلوکز و ۱ میلی‌مولار اوره انجام شد که در واقع این میزان‌های ذکر شده به‌طور طبیعی در سیستم‌های بیولوژیکی ارائه می‌شود. خطاهای نسبی به‌دست آمده، فقط یک تداخل کم<sup>۱</sup> بین پیک اکسیداسیون سروتونین و مواد ذکر شده را نشان می‌دهد (جدول ۱).

#### پایداری سیستم

پایداری سیستم برای تعیین میزان سروتونین در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت. پایداری این نانوکامپوزیت از محاسبه سیگنال جریان به‌دست آمده از سنجش سروتونین بعد از مدت حدود ۲ ماه انجام شد. سیگنال الکتروشیمیایی سنجش سروتونین نسبت به سیگنال اولیه آن کاهش یافته بود، اما هنوز هم حدود

تعیین اختصاصیت، قابل اعتماد بودن (Reliability) و

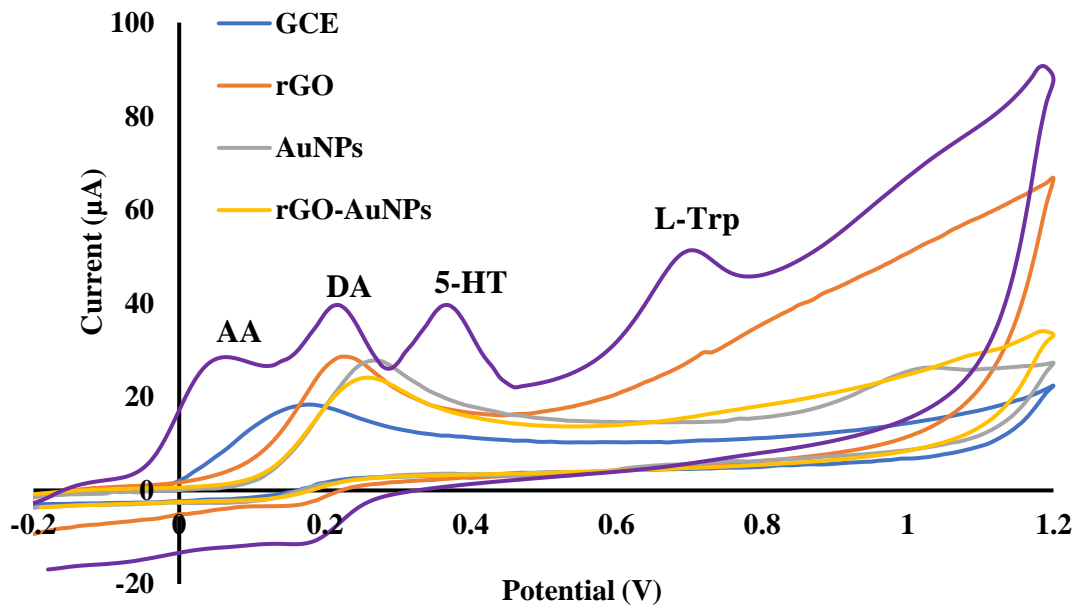
پایداری سیستم (System Stability)

تأثیر مواد مداخله‌گر در سنجش سروتونین: آنالیز SWV نیز در حضور مواد بیولوژیکی متداول و با استفاده از GCE اصلاح شده با نانوکامپوزیت مورد مطالعه‌ی کیفی قرار گرفت و انتخاب پذیری قابل قبول این الکتروود را نسبت به آنالیت سروتونین نشان داد. مطالعه‌ی رفتار نانوکامپوزیت بر روی الکتروود نمایانگر این واقعیت است که الکتروود اصلاح شده با نانوکامپوزیت نه تنها پتانسیل اکسیداسیون سروتونین (۰/۳۷ ولت) را نشان می‌دهد بلکه پیک‌های به‌خوبی تفکیک شده AA، DA و L-Trp را نیز به‌ترتیب در ۰/۰۵، ۰/۱۷ و ۰/۷۸ ولت نمایان می‌کند (شکل ۷). مطالعه و بررسی تداخل نانوکامپوزیت بر روی GCE با استفاده

<sup>۱</sup> Tad interferes

سروتونین با استفاده از رسم نمودار کالیبراسیون خطی در حدود  $0/046$  میکروگرم بر لیتر به دست آمد. در شکل ۸ منحنی استاندارد سروتونین، که در آن جریان بر حسب غلظت‌های متفاوت سروتونین آورده شده، نشان داده شده است. در این شکل منحنی غلظت از  $0/4$  تا  $10$  میکروگرم بر لیتر و جریان بر حسب میکروآمپر است. همچنین در این شکل نشان داده شده است که افزایش غلظت با رشد جریان رابطه‌ی خطی داشته است.

$85\%$  سیگنال اولیه از سنجش سروتونین باقی مانده بود. این نتایج به دست آمده نشان داد که پایداری خوبی از نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی GCE برای تعیین سروتونین حتی پس از دو ماه به دست آمد. تعیین سروتونین در محلول استاندارد از طریق سیستم طراحی شده در محلول استاندارد سروتونین، شیب خط و ضریب تعیین به ترتیب  $0/279$  و  $0/999$  به دست آمد. دامنه‌ی خطی برای محاسبه با استفاده از سیستم طراحی شده از  $10-0/4$  میکروگرم بر لیتر در نظر گرفته شد و LOD در محلول استاندارد



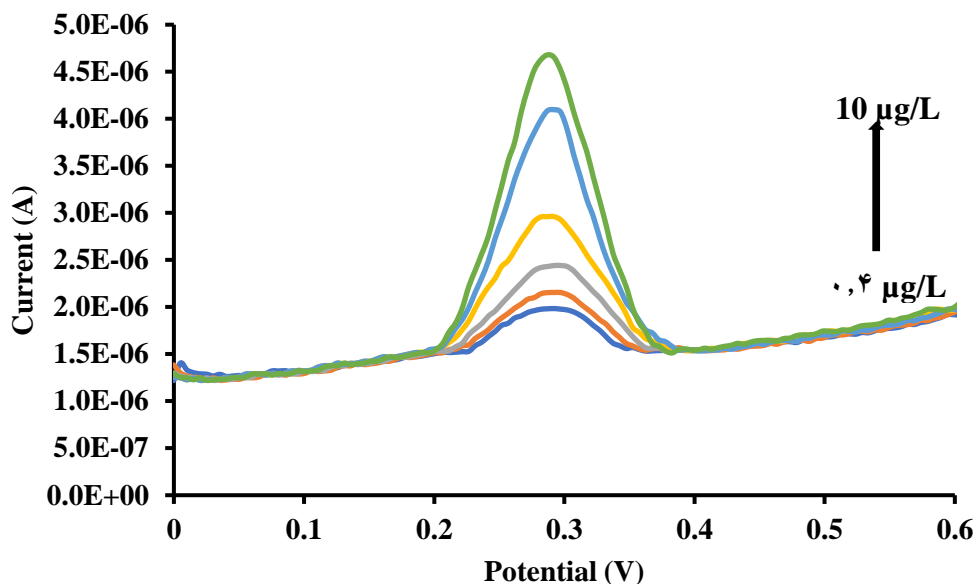
شکل ۷-سنجش سروتونین در حضور مواد مشابه جهت نمایش انتخاب‌پذیری سیستم با استفاده از الکترودها مختلف شامل GCE، rGO/GCE، GNP/GCE، rGO-GNPs/GCE و rGO-GNPs-Cr.6/GCE به روش CV

جدول ۱- تأثیر مواد مداخله‌گر در حضور سروتونین با غلظت  $0/1$  میلی‌مولار

عناصر موجود <sup>۱</sup>	غلظت (میلی مولار)	خطای نسبی <sup>۲</sup> (%)
AA	۲	۴/۰۸
گلوکز	۵	۱/۳۹
اوره	۱	۲/۱۵
DA	۰/۵	۴/۵۳
L-Trp	۰/۲	۷/۷۳

<sup>۲</sup> Relative error

<sup>۱</sup> Co-existing elements



شکل ۸- منحنی مربوط به استاندارد سروتونین به روش SWV در غلظت‌های متفاوت سروتونین

ارائه می‌دهد. نتایج اندازه‌گیری سروتونین با استفاده از روش HPLC و سیستم طراحی شده شامل میزان سروتونین، بازیابی<sup>۱</sup> و خطای وابسته<sup>۲</sup> در این مطالعه مورد ارزیابی قرار (جدول ۲ و ۳). سیستم طراحی شده دارای بازیابی حدود (۹۷٪) و خطای وابسته زیر ۵٪ بود. نتایج نشان داد که سیستم طراحی شده در مقایسه با HPLC دارای بازیابی قابل توجه و همچنین خطای وابسته بسیار کم است.

**بررسی اختلاف آماری میزان سروتونین در دو گروه دیابتی و کنترل**

بر اساس آزمون t-test مستقل، اختلاف معناداری در میزان سروتونین بین دو گروه دیابتی و کنترل یافت شد ( $P < 0.001$ ). به عبارتی سطح سروتونین در گروه کنترل نسبت به گروه مداخله به‌طور معناداری بیشتر بود. شکل ۱۰ میزان سروتونین را در گروه های مطالعه نشان می‌دهد.

**تعیین سروتونین در نمونه‌های واقعی از طریق سیستم طراحی شده**

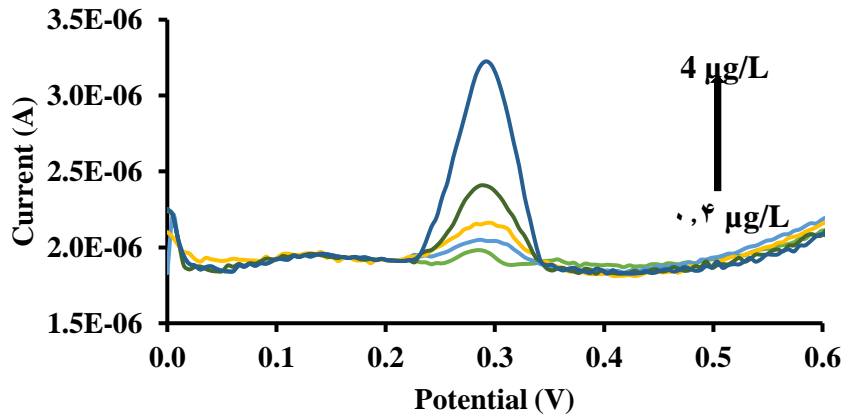
در این مطالعه از نمونه‌های آماده شده از روده ماهی زبرای گروه مبتلا به دیابت و گروه کنترل برای تعیین سروتونین با سیستم طراحی شده و از طریق روش افزودن استاندارد استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری سروتونین در این مرحله ۵ غلظت از محلول استاندارد (۰/۴، ۰/۸، ۱، ۲ و ۴ میکروگرم بر لیتر) به نمونه روده آماده شده اضافه شد و سپس نمودار کالیبراسیون خطی گروه دیابتی و کنترل و منحنی غلظت گروه مبتلا به دیابت رسم شد (شکل ۹).

**مقایسه نتایج اندازه‌گیری سروتونین در گروه دیابتی و کنترل با استفاده از HPLC و سیستم طراحی شده**

نتایج به‌دست آمده نشان داد که سیستم طراحی شده عملکرد بسیار خوبی را جهت تشخیص سروتونین در نمونه‌های واقعی

<sup>۱</sup> Recovery

<sup>۲</sup> Relative Error



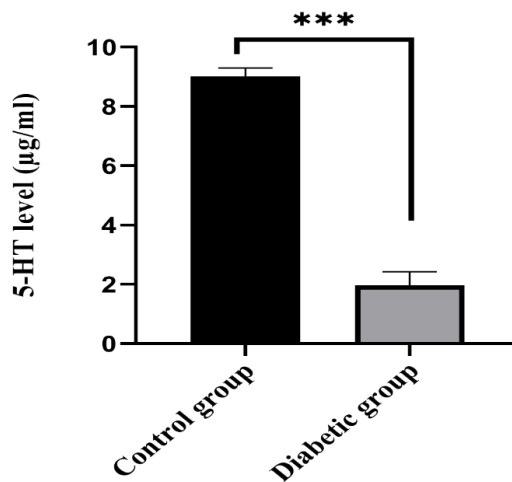
شکل ۹- منحنی مربوط به اندازه‌گیری سروتونین به روش SWV در غلظت‌های متفاوت اضافه شده محلول استاندارد

جدول ۲- نتایج تجزیه و تحلیل نمونه‌های واقعی در گروه کنترل و دیابتی با استفاده از سیستم طراحی شده

نوع گروه	شیب خط و ضریب تعیین	LOD (µg/L)	انحراف معیار	خطای استاندارد	میزان سروتونین (µg/L)
کنترل	۰/۹۹۸ و ۰/۱۵۳	۰/۳۰۵	$1/42 \times 10^{-8}$	$6/35 \times 10^{-9}$	۸/۷۰
دیابتی	۰/۹۹۸ و ۰/۳۴۵	۰/۳۳۹	$3/54 \times 10^{-8}$	$1/59 \times 10^{-8}$	۱/۹۳

جدول ۳- مقایسه نتایج تجزیه و تحلیل نمونه‌های واقعی در گروه کنترل و دیابتی از طریق حسگر ساخته شده و HPLC

سیستم	میزان سروتونین (µg/L) در گروه دیابتی و کنترل	بازایی در گروه دیابتی و کنترل	خطای وابسته (%)
حسگر ساخته شده	۸/۷۰ و ۱/۹۳	۹۶/۹ و	۲/۳۳
HPLC	۸/۹۶ و ۱/۹۹	۹۷/۱	۳/۱۵



شکل ۱۰- میزان سروتونین به دست آمده در دو گروه کنترل و دیابتی

## بحث

## انتخاب نانوذرات و نانوکامپوزیت ساخته شده

rGO در فعالیت الکتروشیمیایی بالا، مساحت سطح بالا، سایت‌های واکنش‌پذیر اضافی و همچنین حمل بار اضافی کارآمد برای فرآیند سنجش را فراهم می‌کند [۱۵]. بهبود سرعت انتقال الکترون و انتخاب‌پذیری الکتروود با استفاده از GNP و Cr.6 انجام شد. از GNP به دلیل نسبت سطح به حجم زیاد، خصوصیات فیزیکوشیمیایی پایدار و مؤثر و همچنین فعالیت بالای کاتالیزوری استفاده شده است [۱۶]. افزودن GNP به rGO منجر به افزایش حساسیت تحلیلی و افزایش میزان انتقال الکترون از GCE اصلاح شده می‌شود [۱۷]. همان‌طور که گفته شد Cr.6 می‌تواند اتم‌های اکسیژن بسیاری را بر روی سطح فراهم کند و این امر باعث می‌شود به‌طور انتخاب‌پذیری مولکول‌های مختلف به‌خصوص نوروترانسمیترها و آمینواسیدها توسط پیوندهای هیدروژنی موجود در حفره‌های خود ایجاد کند. از این‌رو نانوکامپوزیت ساخته شده دارای افزایش حساسیت پذیری و انتخاب پذیری الکتروود می‌شود.

**مشخصه‌یابی نانوذرات و نانوکامپوزیت ساخته شده:** براساس تجزیه و تحلیل طیف IR نشان داده شد که ارتعاش کششی باند (C-O-C) که مهم‌ترین Cr.6 باند کششی در (CNTs-ILC) هست به‌عنوان یک پیک قوی در  $1107/9 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شده است [۱۸]. وجود باند (O-C) در محدوده  $1114 \text{ cm}^{-1}$  قابل رویت در نانوکامپوزیت ساخته شده نشان‌دهنده‌ی حضور Cr.6 است که باعث بهبود سطح الکتروود اصلاح شده می‌شود.

اندازه‌گیری‌های SEM جهت بررسی مورفولوژی GCE و GCE اصلاح شده انجام می‌شود. در مطالعه‌ی Khan و همکاران پلی آرژنین (P-Arg) با ساختاری خالص و به‌هم پیوسته در روی GCE قرار داده شد و مورفولوژی سطح نشان داد که این فیلم با موفقیت به سطح الکتروود چسبیده است. بعد از کاهش رسوب/ الکتروشیمیایی GO، ورقه‌های تاخورد ErGO مشاهده شد این ورقه‌ها مانند ورقه‌های نازک تاشو به‌هم وصل شده و نزدیک هم چیده شده نشان داده شد. در پایان نیز، GNP با میانگین اندازه ۳۰ نانومتر به‌طور یکنواخت در سطح فیلم ErGO توسط روش الکترودیپوزسیون بر روی GCE قرار گرفت. سطح نهایی به‌وجود آمده دارای تخلخل بالا و یکنواختی مناسب

بود که برای سنجش هم‌زمان سروتونین، L-Trp و DA به‌کار رفت [۱۹]. مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت ساخته شده در مطالعه‌ی حال حاضر نیز دارای تخلخل و یکنواختی بالا بود که جهت سنجش سروتونین و L-Trp به‌کار گرفته شد.

### خصوصیات الکتروشیمیایی الکترودهای اصلاح شده جهت سنجش سروتونین

در مطالعه‌ی Fayemi و همکاران رفتار الکتروشیمیایی الکترودهای مختلف در حضور ۰/۱ میلی مولار سروتونین در محلول (pH ۷) که در ۱ MPBS / ۰/۱ بوده، و با روش CV با سرعت اسکن ۲۵ میلی‌ولت بر ثانیه مورد بررسی قرار گرفت. کلیه‌ی الکترودها به‌خوبی قله‌ی اکسیداسیون سروتونین را در پتانسیل تقریبی ۰/۳۵ ولت به روش CV نشان دادند، جریان اکسیداسیون سروتونین و پتانسیل اکسیداسیون ۴ میکروآمپر (۰/۳۸ ولت) برای GCE، ۸/۵ میکروآمپر (۰/۳۶ ولت) برای GCE/NiO، ۵ میکروآمپر (۰/۳۸ ولت) در GCE/ZnO و ۵ میکروآمپر (۰/۳۸ ولت) برای GCE/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> به‌دست آمد. نتایج حاصل از الکترودهای مذکور به وضوح نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در جریان اکسیداسیون سروتونین GCE در مقایسه با الکترودهای اصلاح شده وجود ندارد [۲۰].

### بررسی مقاومت سطح الکتروود اصلاح شده

اعتقاد بر این است که ترکیب rGO و GNP همراه با یک ترکیب پلیمری می‌تواند سبب افزایش میزان انتقال بار از سطح الکتروود اصلاح شده شود. ترکیب نانو ذرات طلا و گرافن اکسید کاهش یافته با Cr.6 یک اثر افزایشی داشت که موجب کاهش فوق‌العاده‌ی مقاومت انتقال الکترون در اکسیداسیون سروتونین شد. میزان مقاومت نانوکامپوزیت به میزان  $105 \Omega$  بود که نشان‌دهنده‌ی مقاومت پایین و نرخ انتقال بار بسیار خوب نسبت به سایر الکترودهای اصلاح شده است. به همین جهت GCE اصلاح شده با نانو ذرات طلا، گرافن اکسید کاهش یافته و GCE جهت شناسایی و اندازه‌گیری سروتونین در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت [۱۹].

### رفتار الکتروشیمیایی آنالیت هدف و مواد مداخله‌گر در الکترودهای مختلف

طبق نتایج ذکر شده در این پروژه، نانوکامپوزیت مورد استفاده دارای قدرت تفکیک بالا و تشخیص هم‌زمان AA، DA، و L-Trp به‌ترتیب

در نانوکامپوزیت مورد استفاده در این پروژه تکرارپذیری با تکرار ۱۰ بار انجام شد و RSD حدود ۲/۷۷ به دست آمد که نشان دهنده تکرارپذیری قابل قبول سیستم است. پایداری این سیستم بعد از حدود دو ماه در غلظت ۱۰ میکرومولار سروتونین صورت گرفت که با باقی ماندن ۸۳٪ جریان نسبت به جریان اولیه، نشان دهنده پایداری بالای سیستم بود.

#### بررسی و ارزیابی نمونه‌های واقعی

Khan و همکاران جهت کار بر روی نمونه واقعی به منظور بررسی کاربردی بودن سیستم (نانوکامپوزیت ساخته شده بر روی GCE، از الکتروود (GCE/P-Arg/ErGO/AuNP) برای تعیین DA، 5-HT و L-Trp از نمونه ادرار سالم انسان با استفاده از روش افزودن استاندارد استفاده کردند. نمونه ادرار انسان جهت سنجش آنالیت‌های ذکر شده حدود ۱۰۰ بار با استفاده از بافر ۰/۱ مولار (pH=۷) PB رقیق شد. دامنه‌ی خطی و LOD به ترتیب ۱۰-۱ میکرومولار و ۰/۰۳ میکرومولار گزارش شده است. همچنین، نتایج بازیابی سیستم طراحی شده بین ۹۸/۰ تا ۱۰۲/۶ استفاده از این حسگر را برای نمونه‌های بیولوژیکی واقعی امکان‌پذیر می‌سازد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده‌ی مقادیر بازیابی خوب برای این حسگر است. با این حال، عمده‌ترین محدودیت‌های این حسگر روش‌های اصلاح پیچیده و قابلیت‌های عملیاتی آن ذکر شده است. در ضمن، به نظر می‌رسد که این روش در تشخیص هم‌زمان چند آنالیت محدودیت‌هایی داشته و گاهی اوقات پاسخ ولتامتری آنالیت‌ها در یک محدوده‌ی پتانسیلی قرار گرفته و باعث ایجاد همپوشانی می‌شود [۱۹]. در اکثر مطالعات، الکتروود اصلاح شده فقط با نتایج به دست آمده از سیستم طراحی شده خود مقایسه شد و سیستم مرجعی از قبیل LC-Mass، HPLC جهت تأیید نتایج و مقایسه آنها مورد استفاده قرار نگرفته است [۱۶-۲۶]. نانوکامپوزیت ساخته شده در این پروژه که شامل rGO، GNP و Cr.6 بر روی GCE است به‌عنوان الکتروود اصلاح شده جهت سنجش سروتونین در نمونه‌های روده‌ی آماده شده از ماهی زبرای دیابتی مورد استفاده قرار گرفت. تشخیص سروتونین در هر دو نمونه‌ی واقعی (گروه کنترل و دیابتی) ارتباط خطی بین غلظت استاندارد اضافه شده و جریان به دست آمده را نشان می‌دهد (ضریب خطی بالای ۰/۹۹). بازیابی برای هر دو گروه حدود ۹۷ درصد به دست آمد، که نشان دهنده‌ی بازیابی بسیار خوب سیستم

در ۰/۰۵، ۰/۱۷ و ۰/۷۸ ولت و همچنین سروتونین در ۰/۳۷ ولت است. به نظر می‌رسد، این پدیده ناشی از انتخاب‌پذیری بالای نانوکامپوزیت که خود برگرفته از خواص فیزیکی و شیمیایی Cr.6 است، می‌باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که الکتروود اصلاح شده با نانوکامپوزیت را می‌توان برای تشخیص هم‌زمان AA، DA و L-Trp به کار برد.

در مطالعه‌ی Ma و همکاران تأثیر گونه‌های مختلف خارجی (مواد مداخله‌گر) در سنجش نوراپی‌نفری (NE) و سروتونین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقادیر اضافی از تداخلات، مانند ۲۰۰ میکرومولار گلوکز، ۲۰۰ میکرومولار کلسیم، ۲۰۰ میکرومولار منیزیم و ۲۰۰ میکرومولار اسید سیتریک، بر تعیین هم‌زمان NE و سروتونین تأثیر نمی‌گذارد. علاوه بر این، نشان داده شد که هیچ‌گونه تداخل آشکار برای تشخیص ۵ میکرومولار NE و ۰/۵ میکرومولار سروتونین در حضور ۲۰۰ میکرومولار AA وجود ندارد. همچنین نتایج تجربی نشان داد که AA در مقایسه با NE هیچ اوج اکسیداتیو ندارد [۲۱].

نانوکامپوزیت مورد استفاده برای اصلاح GCE در پروژه حال حاضر در مقابل غلظت‌های ۱۰ میکرومولار از سروتونین در حضور ۲ میلی مولار AA، ۰/۵ میلی مولار DA، ۲ میلی مولار گلوکز و ۱ میلی مولار اوره انجام شد که در واقع سیستم ایجاد شده در مقابل میزان ۰/۵ میلی مولار DA خطای نسبی حدود ۷٪ را نشان داد. این خطاهای نسبی به دست آمده گویای یک تداخل کم بین پیک اکسیداسیون سروتونین و مواد ذکر شده است.

#### تکرار پذیری و پایداری سیستم

تکرارپذیری و پایداری سیستم به وسیله مجموعه‌ای از اندازه‌گیری‌های ولتامتری جهت اندازه‌گیری در الکتروود اصلاح شده GCE/P-Arg/ErGO/AuNP و همچنین ارزیابی دقیق سیستم انجام شده است. RSD برای میزان ۱۰ میکرومولار DA، سروتونین و Trp (۱۰ بار تکرار) به ترتیب ۱/۲۷۲، ۱/۲۳ و ۲/۸۷٪ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی تکرارپذیری عالی سیستم است [۱۹]. در همین مطالعه ذکر شده برای آزمایش پایداری، الکتروود اصلاح شده به مدت ۲ هفته در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داشته شد که جریان اوج تغییری آشکار (پایین‌تر از ۵٪) برای همان غلظت ۱۰ میکرومولار محلول آنالیت نداشت، که این نشان دهنده‌ی پایداری خوب فیلم حسگر است [۱۹].

ی کاهش میزان این آنالیت در بیماران دیابتی را قوی تر می کند. بر طبق مطالعات انجام شده بر روی حیوان و انسان، سطح سروتونین در گروه های دیابتی به میزان قابل ذکری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است [۲۹، ۳۰]. جدول مقایسه ای جهت نشان دادن پارامترهای اندازه گیری شده در مطالعات گذشته و مطالعه ای حال حاضر آماده شد (جدول ۴)

طراحی شده بود. همچنین LOD به دست آمده برای هر دو گروه در حدود ۰/۳ میکروگرم بر لیتر برای سیستم طراحی شده و حدود ۰/۱ میکروگرم بر لیتر برای HPLC بود. این نتایج نشان داد که سیستم طراحی شده توانسته عملکرد قابل توجهی را در نمونه های واقعی از خود نشان دهد. نتایج به دست آمده از افت قابل توجه میزان سروتونین در گروه ماهی های زیر مبتلا به دیابت نسبت به گروه کنترل، فرضیه

جدول ۴- جدول LOD، محدوده ی خطی، انواع اصلاح کننده الکتروود و نمونه های به کار رفته برای سنجش سروتونین در مقایسه با مطالعه انجام شده حاضر

منابع	نمونه	روش	اصلاح کننده	محدوده خطی ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
(۳۱)	سرم	DPV <sup>۱</sup>	MWCNTs-CS-poly(p-ABSA)	۰/۱-۱۰۰	۰/۰۸
(۳۲)	سرم	DPV	NiO/CNT/PEDOT/GCE	۰/۳-۳۵	۰/۰۶
(۳۳)	سرم	DPV	3D-rGO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /HP- $\beta$ -CD/GCE	۰/۰۱-۲۵	۰/۰۳
(۲۱)	ادرار	DPV	P-Arg/ErGO/AuNP/GCE	۱-۱۰	۰/۰۳
(۳۴)	سرم	DPV	rGO-Ag <sub>2</sub> Se/GCE	۰/۱-۱۵	۰/۰۳
(۳۵)	سرم	DPV	rGO/C <sub>60</sub> O <sub>4</sub> /GCE	۰/۱-۵۱	۰/۰۵
(۳۶)	بافر	SWV	MnO <sub>2</sub> -graphene/GCE	۰/۱-۸۰۰	۰/۰۱
(۳۷)	بافر وادرار سنتزی	DPV	Graphite/self-adhesive paper	۶-۱۰۰	۰/۴
مطالعه ای حال حاضر	روده ماهی زبرا	SWV	rGO-AuNPs-18.Cr.6	۰/۴-۱۰	۰/۰۴

سروتونین در سرم انسانی نیز فراهم آورد. تجزیه و تحلیل نمونه های واقعی، پتانسیل استفاده از این الکتروود اصلاح شده را به عنوان یک روش سنجش الکتروشیمیایی برای تعیین میزان سروتونین در کاربردهای مختلف پزشکی نشان می دهد.

### سپاسگزاری

این تحقیق حاصل طرح پژوهشی به شماره ی ۲۲۴۹-۱۰۰-۰۱-۱۳۹۶ و در پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. همچنین این مطالعه، توسط مؤسسه ملی توسعه ی تحقیقات علوم پزشکی ایران به شماره طرح ۹۷۱۰۴۰ مورد حمایت قرار گرفته است.

### نتیجه گیری

در این پروژه نانوکامپوزیت جدید با استفاده از rGO تزئین شده، GNP و Cr.6 ساخته شده و این الکتروود اصلاح شده (rGO.GNPs.Cr.6/GCE) برای تشخیص و ارزیابی سروتونین مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که سیستم طراحی شده دارای حساسیت و انتخاب پذیری نسبتاً خوبی بوده و همچنین برای ساخت اجزاء و آماده سازی آن روش نسبتاً ساده ای به کار گرفته رفته است. افت قابل توجه میزان سروتونین در نمونه های دیابتی در مقایسه با نمونه های سالم، فرضیه بیومارکر بودن سروتونین را در بیماران دیابتی قوی تر می سازد. با وجود برخی از محدودیت های سیستم طراحی شده، ممکن است این سیستم بستر مناسبی را جهت تعیین میزان

<sup>1</sup>Differential potential voltammetry



## مآخذ

- Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: Facts and fallacies. Vol. 12, Nature Reviews Endocrinology. *Nature Publishing Group* 2016; p. 616–22.
- Dall TM, Yang W, Gillespie K, Mocarski M, Byrne E, Cintina I, et al. The Economic Burden of Elevated Blood Glucose Levels in 2017: Diagnosed and Undiagnosed Diabetes, Gestational Diabetes Mellitus, and Prediabetes. *Diabetes Care* 2019; 1;42(9):1661 LP – 1668.
- Chowdhury MZI, Yeasmin F, Rabi DM, Ronksley PE, Turin TC. Prognostic tools for cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of C-statistics. *J Diabetes Complications* 2019;33(1):98–111.
- Zeng P, Wang T, Zheng J, Zhou X. Causal association of type 2 diabetes with amyotrophic lateral sclerosis: New evidence from Mendelian randomization using GWAS summary statistics. *BMC Med* 2019;17(1):1–13.
- Özel RE, Hayat A, Andreescu S. Recent Developments in Electrochemical Sensors for the Detection of Neurotransmitters for Applications in Biomedicine. *Anal Lett* 2015;
- Yang C, Trikantopoulos E, Jacobs CB, Venton BJ. Evaluation of carbon nanotube fiber microelectrodes for neurotransmitter detection: Correlation of electrochemical performance and surface properties. *Anal Chim Acta*; 2017;
- Hill-Briggs F. 2018 Health Care & Education Presidential Address: The American Diabetes Association in the Era of Health Care Transformation. *Diabetes Care* 2019; 1;42(3):352 LP – 358.
- Valero-Elizondo J, Aneni EC, Osondu CU, Grandhi GR, Virani SS, Nasir K. Gaps in provider lifestyle counseling and its adherence among obese adults with prediabetes and diabetes in the United States. *Prev Med (Baltim)* 2019; 129:105815.
- Hasanzadeh M, Shadjou N, Guardia M de la. Current advancement in electrochemical analysis of neurotransmitters in biological fluids. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 2017.
- Tertiş M, Cernat A, Lacatiş D, Florea A, Bogdan D, Suci M, et al. Highly selective electrochemical detection of serotonin on polypyrrole and gold nanoparticles-based 3D architecture. *Electrochem commun* 2017;75:43–7.
- Bao J, Hou C, Huo D, Dong Q, Ma X, Sun X, et al. Sensitive and selective electrochemical biosensor based on ELP-OPH/BSA/TiO<sub>2</sub>NFs/AuNPs for determination of organophosphate pesticides with p-nitrophenyl substituent. *J Electrochem Soc* 2017; 164(2):G17–22.
- Ensafi AA, Noroozi R, Zandi—Atashbar N, Rezaei B. Cerium(IV) oxide decorated on reduced graphene oxide, a selective and sensitive electrochemical sensor for fenitrothion determination. *Sensors Actuators, B Chem* 2017; 245:980–7.
- Al-Ghaiti W, Yue Z, Foroughi J, Huang X-F, Wallace G, Baughman R, et al. Probe Sensor Using Nanostructured Multi-Walled Carbon Nanotube Yarn for Selective and Sensitive Detection of Dopamine. *Sensors* 2017;17(4).
- Ispas CR, Crivat G, Andreescu S. Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis. *Anal Lett.* 2012; 1;45(2–3):168–86.
- Rand E, Periyakaruppan A, Tanaka Z, Zhang DA, Marsh MP, Andrews RJ, et al. A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Biosens Bioelectron* 2013; 42(1):434–8.
- Chaniotakis NA. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378(1):89–95.
- Khoshnevisan K, Maleki H, Honarvarfard E, Baharifar H, Gholami M, Faridbod F, et al. Nanomaterial based electrochemical sensing of the biomarker serotonin: a comprehensive review. *Microchim Acta* 2019; 4;186(1):49.
- Zhang J, Lahtinen RM, Kontturi K, Unwin PR, Schiffrin DJ. Electron transfer reactions at gold nanoparticles. *Chem Commun* 2001; (18):1818–9.
- Jia X, Chen X, Han J, Ma J, Ma Z. Triple signal amplification using gold nanoparticles, bienzyme and platinum nanoparticles functionalized graphene as enhancers for simultaneous multiple electrochemical immunoassay. *Biosens Bioelectron* 2014;53:65–70.
- Atta NF, Ahmed YM, Galal A. Electrochemical Determination of Neurotransmitters at Crown Ether Modified Carbon Nanotube Composite: Application for Sub-nano-sensing of Serotonin in Human Serum. *Electroanalysis* 2019; 31(7):1204–14.
- Khan MZH, Liu X, Tang Y, Zhu J, Hu W, Liu X. A glassy carbon electrode modified with a composite consisting of gold nanoparticle, reduced graphene oxide and poly(L-arginine) for simultaneous voltammetric determination of dopamine, serotonin and L-tryptophan. *Microchim Acta* 2018; 185(9):3–12.
- Fayemi OE, Adekunle AS, Ebenso EE. Electrochemical determination of serotonin in urine samples based on metal oxide nanoparticles/MWCNT on modified glassy carbon electrode. *Sens Bio-Sensing Res* 2017;13:17–27.
- Ma X, Wang Z, Wang X, Xu L. Electrochemical determination of norepinephrine on the membrane of silver nanoparticles doped poly-glycine

- eliminating the interference of ascorbic acid. *J Solid State Electrochem* 2013;17(3):661–5.
24. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J Phys Chem B* 2006; 1;110(32):15700–7.
  25. Atta NF, Galal A, Ahmed YM. Highly Conductive Crown Ether/Ionic Liquid Crystal-Carbon Nanotubes Composite Based Electrochemical Sensor for Chiral Recognition of Tyrosine Enantiomers. *J Electrochem Soc* 2019 1; 166(8):B623–30.
  26. Muzzalupo R, Nicoletta FP, Trombino S, Cassano R, Iemma F, Picci N. A new crown ether as vesicular carrier for 5-fluorouracil: Synthesis, characterization and drug delivery evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2007; 58(2):197–202.
  27. Marcano DC, Kosynkin D V, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* 2010; 24;4(8):4806–14.
  28. Moon IK, Lee J, Ruoff RS, Lee H. Reduced graphene oxide by chemical graphitization. *Nat Commun* 2010; 1(6):1–6.
  29. Robinson R. Serotonin's role in the pancreas revealed at last. *PLoS Biology* 2009.
  30. Hara K, Hirowatari Y, Shimura Y, Takahashi H. Serotonin levels in platelet-poor plasma and whole blood in people with type 2 diabetes with chronic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; Nov 1 [cited 2019 Nov 10];94(2):167–71.
  31. Ran G, Chen C, Gu C. Serotonin sensor based on a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes, chitosan and poly(p-aminobenzenesulfonate). *Microchim Acta* 2015; 182(7–8):1323–8.
  32. Sun D, Li H, Li M, Li C, Dai H, Sun D, et al. Electrodeposition synthesis of a NiO/CNT/PEDOT composite for simultaneous detection of dopamine, serotonin, and tryptophan. *Sensors Actuators B Chem.* 2018; 15 [cited 2019 Jan 1];259:433–42.
  33. Liang W, Rong Y, Fan L, Zhang C, Dong W, Li J, et al. Simultaneous electrochemical sensing of serotonin, dopamine and ascorbic acid by using a nanocomposite prepared from reduced graphene oxide, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Microchim Acta* 2019;186(12).
  34. Panneer Selvam S, Yun K. A self-assembled silver chalcogenide electrochemical sensor based on rGO-Ag<sub>2</sub>Se for highly selective detection of serotonin. *Sensors Actuators, B Chem* 2020;302 (May 2019):127161.
  35. Dinesh B, Veeramani V, Chen S-M, Saraswathi R. In situ electrochemical synthesis of reduced graphene oxide-cobalt oxide nanocomposite modified electrode for selective sensing of depression biomarker in the presence of ascorbic acid and dopamine. *J Electroanal Chem* 2017; 786:169–76.
  36. Nehru L, Chinnathambi S, Fazio E, Neri F, Leonardi GS, Bonavita A, et al. *Electrochemical Sensing of Serotonin by a Modified MnO<sub>2</sub>-Graphene Electrode*. Vol. 10, Biosensors. 2020.
  37. Orzari LO, Cristina de Freitas R, Aparecida de Araujo Andreotti I, Gatti A, Janegitz BC. A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose. *Biosens Bioelectron* 2019; 138:111310.

## DESIGN AND FABRICATION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON NANO-GRAPHENE TO DETECT SEROTONIN IN DIABETIC ZEBRA FISH

Kamyar Khoshnevisan<sup>1</sup>, Sayed Mahmoud Sajjadi-Jazi<sup>2,3</sup>, Farnoush Faridbod<sup>4</sup>, Bagher Larijani<sup>2</sup>, Mohammad Reza Khorramizadeh<sup>1\*</sup>

1. Biosensor Research Center, Endocrinology & Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Cell Therapy and Regenerative Medicine Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran

4. School of Chemistry, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

### ABSTRACT

**Background:** A novel nanocomposite-modified electrode based on reduced graphene oxide (rGO) decorated with crown-ether and gold nanoparticles (GNPs) on the surface of a glassy carbon electrode (GCE) was fabricated to investigate 5-HT determination.

**Methods:** The morphology of nanocomposite was characterized by scanning electron microscopy (SEM). Diabetic zebrafish was obtained by overfeeding via glucose. 5-HT was successfully determined in the presence of dopamine (DA), ascorbic acid (AA), urea, glucose, and L-tryptophan (L-Trp) by using electrochemical methods.

**Results:** The nanocomposite exhibited satisfactory electrochemical catalytic activity for 5-HT determination using square-wave voltammetry (SWV). The electrochemical behavior of 5-HT at the nanocomposite/GCE displayed reasonable oxidation current and potential. The limit of detection (LOD) of 5-HT obtained from the real samples, containing the control and diabetic group by using the proposed system and HPLC method, was calculated to be about 0.3 and 0.1  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The proposed system also demonstrated high selectivity, reasonable sensitivity, and good stability and reproducibility for 5-HT sensing. The nanocomposite was applied for the determination of the biomarker 5-HT in the diabetic and control groups of zebrafish and displayed excellent recoveries about 93 and low relative error about 3% while compared with standard method.

**Conclusions:** It seems that the 5-HT level can be used for earlier diagnosis of diabetes.

**Keywords:** Serotonin, Biomarker, Novel Nanocomposite, Electrochemical Behaviour, Diabetic Zebrafish

\*Shariati Hospital, North Karegar Ave., Tehran, Iran. Postal code: 1411713137, Tel:+98-21-88220068, Fax:+98-21-88220052, Email:khoramza@tums.ac.ir