



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Moleküler Baskılanmış/Altın Nanoparçacık-Peptit Nanotüp ile Fonksiyonelleştirilmiş Tek kullanımlık Biyoçip ile IL-6 Tayini

 Yeşim Tuğçe YAMAN ^{a,*}  Serdar ABACI ^b

^a İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE

^b Kimya Bölümü, Fen Fakültesi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: tugce.yaman@hacettepe.edu.tr

DOI: 10.29130/dubited.1003867

ÖZ

Bu çalışmada, çeşitli hastalık türlerine sahip hastalarda miktarının arttığı tespit edilen ve kanser biyobelirteci olarak kabul edilmiş bir sitokin türü olan İnterlökin 6 (IL-6)'nın tayini için moleküler baskılanmış aşırı oksitlenmiş polipirol (MIP(o-ppy)) ve altın nanoparçacık-peptit nanotüp (GNP-PNT) ile fonksiyonelleştirilmiş tek kullanımlık elektrot sistemi geliştirildi. Hem modifiye edici ajan hem de elektrot yüzeyi çeşitli yöntemlerle karakterize edildi. Moleküler baskılanmış elektrotlar ile IL-6'nın nicel analizi redoks çiftinin elektrokimyasal davranışı değişimi üzerinden voltametrik olarak gerçekleştirildi. Diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak doğrusal çalışma aralığı 1-200 pg/mL ve gözlenebilme sınırı (LOD) ise 0,2 pg/mL olarak bulundu. Önerilen çalışma kapsamında, düşük maliyetli, uzmanlık gerektirmeyen, kullanımı kolay, yüksek hassasiyetle ölçüm ve analiz yapan, hızlı cevap süresine sahip moleküler baskılanmış tek kullanımlık elektrotlar ileride hasta başı ölçümlerine uyarlanabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Sitokin, İnterlökin 6, Moleküler baskılama, Peptit nanotüp, Tek kullanımlık elektrot

Detection of IL-6 with a Functionalized with Gold Nanoparticle- Peptide Nanotube Molecularly Imprinted Single-used Biochip

ABSTRACT

In this study, molecularly imprinted over oxidized polypyrrole (MIP(o-ppy)) and functionalized with gold nanoparticle-peptide nanotube (GNP-PNT) single-used electrode system was developed for detection of Interleukin 6 (IL-6) which is a type of cytokine that has been found to be increased in patients with various disease types and has been accepted as a cancer biomarker. Both the modifying agent and the electrode surface were characterized by various methods. Quantitative analysis of IL-6 with molecularly imprinted electrodes was performed voltammetrically over the change in the electrochemical behavior of the redox couple. By using the differential pulse voltammetry (DPV) technique, the linear working range was achieved as 1-200 pg/mL and the limit of detection (LOD) was found as 0.2 pg/mL. Within the scope of the proposed study, molecularly imprinted disposable electrodes that do not require expertise, are easy to use, measure and analyze with high sensitivity, and have a fast response time have the potential to be adapted to point of care measurements in the future.

Keywords: Cytokine, Interleukin 6, Molecular imprinting, Peptide nanotube, Disposable electrode

I. GİRİŞ

184 amino asitten oluşan ve 26 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoprotein türü olan İnterlökin-6 (IL-6) kanser hücrelerinin aktivitesini etkileyen çok işlevli bir sitokindir [1]. Dolaşımında yer almakla birlikte sağlıklı bireylerin plazmasında 6 pg/mL gibi çok düşük bir miktarda bulunmaktadır [2]. IL-6'nın aşırı ekspresyonu, tümör oluşumunda, büyümesinde ve habis farklılaşmasında, tümör mikro çevresinde, immünomodülasyon ve metabolizmada yer alan hemen hemen tüm tümör tiplerinde bildirilmiştir [3]. Artan IL-6 seviyeleri, gelişmiş neo-anjiyogenez, kanser hücresi apoptozunun inhibisyonu ve mikro-ortamdaki kontrol mekanizmalarının serbest bırakılmasından sorumludur. Ayrıca kansere bağlı kaşeksi bulunan hastalarda miktarının çok olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle kanser biyobelirteci olarak kabul edilmiştir [1,3]. IL-6 dâhil olmak üzere biyobelirteç olarak belirlenen proteinlerin hassas, hızlı ve doğru tespiti, özellikle hücre dışı ortama salınan derişimlerinin çok düşük olması nedeniyle oldukça zordur. Ancak, IL-6'nın tayini, birçok hastalığın ilerlemesini teşhis etmek ve belirli tedavilere verilen yanıtı değerlendirmek açısından oldukça önem taşımaktadır. Literatür incelendiğinde IL-6'nın teşhis ve tayini geleneksel olarak immünolojik test yöntemleri ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Enzim bağılı immünosorbent testi (ELISA), kemilüminesans immünoassay (CLIA), antikor dizi analizleri, boncuk temelli analizler, enzime bağılı immünosorbent spot (ELISPOT) testi, floresan mikrodizilim, iletkenlik temelli immünosensör ve floresan temelli fiber optik biyosensörler IL-6'nın tayini için geliştirilen sistemlere örnek olarak verilebilir [4–11]. Ayrıca nanoplazmonik biyosensör mikrodizileri [12] ve yüzey plazmon rezonansı [13] yöntemlerini esas alan çalışmalarda literatürde yerini almıştır. Bununla birlikte, hem ELISA hem de CLIA yöntemleri analiz süresi, çoğullama, numune hacmi ve hatta bazı belirli analitlerin duyarlılığı açısından çeşitli sınırlamalara sahiptir [9,14]. Ayrıca belirtilen yöntemlerin tümünde kalifiye eleman gerekliliği ve uzun süren etiketleme süreçleri mevcuttur. Tüm bu yöntemlere alternatif olarak IL-6'nın teşhisi için geliştirilmiş elektrokimyasal temelli biyosensör [7,15] çalışmaları da literatürde yerini almıştır. Elektrokimyasal yöntemler yukarıda belirtilen diğer yöntemlere göre nispeten basit ve maliyetsiz cihazların geliştirilmesi için oldukça uygundur [16]. Ancak, IL-6'nın elektrokimyasal tayininde geliştirilen sensör sistemleri genelde yüzeyde antijen-antikor ilişkisini inceleyen ve aptamer/IL-6 ilişkisini temel alan sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır [10,11,17–21]. IL-6'nın antijen-antikor ilişkisine dayanan elektrokimyasal tayin çalışmalarında çalışma elektrodunun modifikasyonu oldukça karmaşık ve uzun deneysel süreçleri içermektedir. Bu yöntemeye dayalı çalışmalarda elektrodun kararlılığı da kısa olduğundan bu da önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca sensör yüzeyinde oluşturulan her bir yeni modifikasyon ek maliyeti de beraberinde getirmektedir. Antikor ve aptamerlerin kullanımına alternatif olarak, biyomimetik materyaller ve moleküler baskılama teknolojisi ile hazırlanan elektrotlar, immünosensörler ve aptasensörlere alternatif olarak oldukça umut vaat etmektedir.

Moleküler baskılı polimer (MIP) matrisler, genellikle şablon molekül varlığında bir monomerin polimerizasyonu yoluyla üretilirler. Polimerizasyon işlemi tamamlandığında, şablon molekül matristen uzaklaştırılır ve şablona özgü boşluklar geride kalır [22]. MIP'ların, düşük maliyetli, kolay sentezlenebilmeleri ve birçok çözücüde iyi fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahip olmaları dâhil olmak üzere sahip olduğu özellikler sayesinde biyolojik muadillerine göre birçok avantajları vardır. Hem klasik kimyasal polimerizasyon reaksiyonları (örneğin, radikal, anyonik, katyonik) hem de elektrokimyasal polimerizasyon dâhil olmak üzere moleküler baskılı matrisler üretmek için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Elektrokimyasal polimerizasyonun en önemli avantajı, polimer filmin biriktirildiği potansiyeli tam olarak kontrol etme yeteneğidir [23]. Bu yöntem ile moleküllerin hiçbir işlevselliğe sahip olmadığı durumlarda bile, analit seçimi için kısıtlama olmaksızın elektrot yüzeyinde analite karşı yüksek seçiciliği olan bir tanıma filmi oluşturulabilir. Moleküler baskılama ve elektrokimyasal sensörü birleştiren moleküler baskılanmış elektrokimyasal sensörler (MIECS), hedef molekül için özel tanıma elemanı olarak MIP'ları kullanan yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip sistemlerdir. MIECS'ler düşük maliyetli, hızlı ve güvenilir sistemler olup karmaşık matris ortamlarında bile rahatlıkla kullanılabilirler [24]. Tek kullanımlık elektrot çeşitlerinden olan perde baskılı elektrotlar (SPEs) çalışma elektrodu olarak elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında oldukça dikkat çekmektedir. Son yıllarda özellikle nanomalzemelerle modifiye edilerek (sinyal/gürültü oranı düşürülerek) daha duyarlı ve seçici hale getirilebilmektedirler. Rutin olarak elektrokimyasal olarak sentezlenen bir polimer olan

polipirol (ppy), hazırlama kolaylığı, yüksek kararlılık ve sahip olduğu geniş uygulama alanları nedeniyle yaygın olarak elektrokimya çalışmalarında uygulanmaktadır. Çapraz bağlayıcı bir ko-monomer kullanmak zorunda kalmadan kısmen çapraz bağlanan ppy, çeşitli taban malzemeleri üzerinde kolaylıkla polimerleştirilebilir bir malzemedir [23,25–27]. İyi biyouyumluluk, yüksek kararlılık ve oda sıcaklığında üretim gibi avantajlara sahip olan moleküler baskılanmış polipirol (MIP-ppy) katmanları üretmek için en basit yöntem, hem pirol (veya başka bir pirol temelli monomer) hem de istenen şablonu içeren bir çözeltiliye uygulanan elektrokimyasal yöntemlerle çalışma elektrodu üzerinde elektrokimyasal polimerizasyon ile üretimin gerçekleştirilmesidir [23,25–27]. Potansiyon-dinamik yöntemlerde, yüksek pozitif potansiyeller uygulandığında ppy aşırı oksidasyona uğramakta (o-ppy) ve moleküler baskılamada başarılı bir ppy türevi olarak karşımıza çıkmaktadır [28,29]. MIP(o-ppy) üretiminde konjüge bağ sisteminin kısmi bozunması nedeniyle yapının iletkenliğini bir dereceye kadar kaybetmesine neden olur. Ancak, o-ppy'nin azalan iletkenliği, elektrot yüzeyi iletkenliği arttırabilecek farklı nano malzemelerle dekore edilerek iletkenlik bir dereceye kadar arttırılabilir ve bu sayede sensörün hassasiyeti de arttırılabilir [30]. Literatürde yayınlanan çalışmalar incelendiğinde, karbon nanotüpler, nanoparçacıklar (manyetik, metal vb.) ve grafen oksit gibi nano malzemelerle modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde hazırlanan MIP(o-ppy) sistemlerinin yüksek hassasiyet ve seçicilikle farklı analitlerin nicel tayininde başarıyla uygulandığı belirlenmiştir [31–34].

Peptit nanotüpler (PNT) kendiliğinden düzenlenebilen yapıları, küçük boyutları, yüksek en-boy oranları ve ayarlanabilir yüzey karakteristikleri ile önemli biyomalzemeler arasında yer alırlar [35–38]. Karbon nanotüpler veya silikon nanoteller gibi nano malzemelere göre, kendinden düzenlenen protein yapıları uygun koşullarda daha hızlı, daha az maliyetli ve temiz oda gerektirmeden üretilebilirler. Elektrokimyasal yönden avantajları ise, yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olmaları ve mikroskobik yüzey alanında artışa neden olmaları olarak sıralanabilir [39–42]. Bunun yanında PNT'ler farklı türde malzemelerle kompozit yapımında kullanıldığında çalışma elektrodunun seçicilik ve hassasiyetini arttırabilirler. Bu nedenle önerilen çalışmada, PNT ve altın nanoparçacıkların (GNP) eş zamanlı olarak sentezi gerçekleştirilmiş ve yüzey modifiye ajanı olarak kullanılmıştır. GNP'ler iyi biyouyumluluk gösterirler ve etkin yüzey alanını arttıran yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip malzemeler olmalarından ve PNT'lerle beraber sinerjik etki yaratmasından dolayı tercih edilmiştir [43]. Eş zamanlı üretilebilen GNP-PNT nanokompozitinin elektrokimyasal alanda uygulamasının yer aldığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır [44,45]. Ayrıca gerçekleştirilen literatür taramasında GNP-PNT ile yüzey modifikasyonu sonrası MIP(o-ppy) üretiminin gerçekleştirildiği bir sensör sisteminin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Özetle bu çalışmada, IL-6'nın yüksek hassasiyetli tayini için MIP(o-ppy)/GNP-PNT modifiye elektrotları ilk kez üretildi ve uygulaması araştırıldı. Çalışma kapsamında üretilen moleküler baskılanmış elektrot yüzeyleri elektrokimyasal, mikroskobik ve spektrometrik yöntemlerle karakterize edildi ve moleküler baskılamının başarısı ortaya konuldu. Redoks çiftinin elektrokimyasal yükseltgenme özelliğinden yararlanılarak IL-6'nın voltametrik olarak nicel analizi gerçekleştirildi. En uygun deneysel şartlar belirlenerek, bu koşullar altında sensörün doğrusal çalışma aralığı pg/mL seviyesinde elde edildi. Girişim etkisi gösterebilecek türlere karşı seçicilik çalışması gerçekleştirildi ve önerilen biyoçipin IL-6'ya karşı yüksek seçicilik gösterdiği belirlendi. Böylece ileride hasta başı bakım analizlerinde kullanılacak yüksek hassasiyete sahip tek kullanımlık biyoçipler başarıyla üretildi. Ayrıca gelecekte önerilen sensör sistemi farklı hedef moleküllere göre uyarlanabilir ve nicel analiz sistemleri geliştirilebilir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER

Pirol monomeri, altın (III) klorür trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), fosfat tampon tuzu (PBS) ve 1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-propanol (HFIP) Sigma Aldrich (Almanya)'den satın alındı. Potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ve potasyum ferrosiyanür ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ise sırasıyla Fisher (USA) ve Analar

(İngiltere) üreticilerinden temin edildi. Difenilalanin (FF) Bachem (İsviçre) firmasından satın alındı. IL-6 ve IL-8 ise, eBioscience (USA)'tan temin edildi. Perde baskılı altın elektrotlar (Au-SPEs) ve kablo bağlantısı ise Metrohm (Türkiye)'dan satın alındı.

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirildiği redoks çifti çözeltisi 5,0 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ ve $K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) olacak şekilde 0,1 M KCl içerisinde hazırlandı.

IL-6'nın stok çözeltisi 0,1 M KCl içeren pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde hazırlandı.

Hedef molekülün (IL-6) polimer yüzeyinden uzaklaştırılması amacıyla kullanılan yıkama çözeltisi etanol:su (2:1 v/v) + 0,25 mol L⁻¹ NaOH olacak şekilde hazırlandı.

Seçicilik çalışması için kullanılan girişim yapabilecek türlerin stok çözeltileri ve seyreltmeleri de pH 7,4 PBS içerisinde hazırlandı.

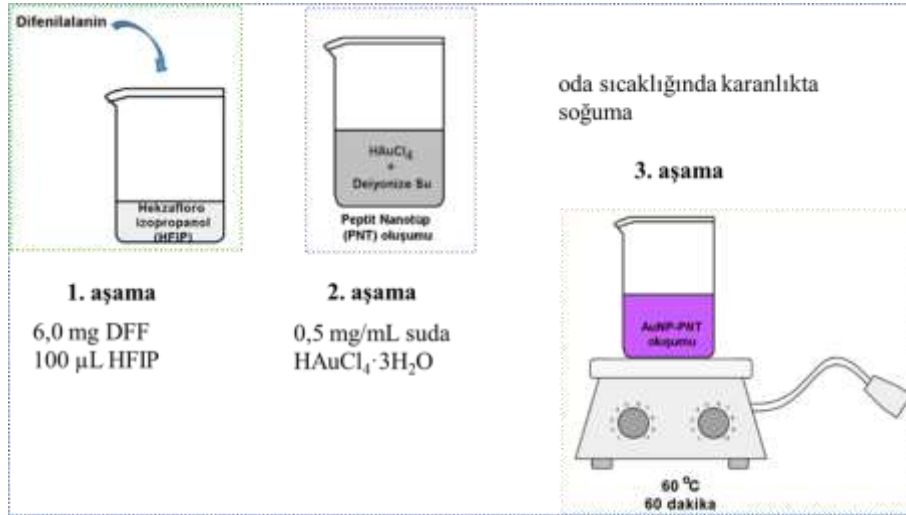
B. CİHAZLAR

Elektrokimyasal ölçümlerin tümü CHI600 model potansiyostat/galvanostat kullanılarak gerçekleştirildi. Au-SPE'ler, Au çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu ve Ag karşıt elektrodun yer aldığı 3'lü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Elektrotların bağlantıları gümüş elektrik kontaklarla sağlanmaktadır. Çalışma elektrodunun çapı 4 mm'dir. Au-SPE'nin elektrik kontakları ile potansiyostat/galvanostatın elektrik bağlantıları arasında ara yüz oluşturacak şekilde uygun bir anahtar kutusuna yerleştirilerek ölçümler kaydedildi.

Sentezlenen GNP-PNT ile moleküler baskılanmış elektrot yüzeylerinin morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Tescan GAIA 3 FIB-SEM/Czech Republic), molekül yapısındaki bağların tanımlanması amacıyla spektrokimyasal karakterizasyonu zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (ATR-FTIR ATR-FTIR, Thermo Fisher Scientific/USA) ile gerçekleştirildi. Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis, Shimadzu/Japan) absorpsiyon spektroskopisi ise GNP-PNT yapısının absorpsiyon bantlarının araştırılmasında kullanıldı.

C. GNP-PNT SENTEZİ

Şema 1'de gösterilen GNP-PNT sentezi için 6,0 mg DFF tartılarak 100 µL HFIP içerisinde çözdürüldü ve 0,5 mg/mL suda hazırlanan $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ çözeltisinde dağıtıldı. Elde edilen karışım 60 °C'de 1 sa inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında karanlıkta soğumaya bırakıldı. GNP-PNT karışımının renginin sarıdan koyu mora dönmesi ile nanokompozit yapının başarıyla sentezlendiği gözlemlendi.



Şekil 1. GNP-PNT nano yapıların sentezlenmesinin şematik gösterimi.

D. MOLEKÜLER BASKILANMIŞ ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI

Elektrot yüzeyinin fonksiyonelleştirilmesi amacıyla öncelikle GNP-PNT modifikasyonu gerçekleştirildi. GNP-PNT nanokompozit yapısı elektrot yüzeyine damlat-kurut yöntemiyle modifiye edildi. Bu amaçla hazırlanan nanokompozitten 5 µL hacminde alındı ve çalışma elektrodu yüzeyi üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

MIP çözeltisini hazırlamak için 0,1 M KCl içeren pH 7,4 PBS içinde 1 µg/mL IL-6 ve 10 mM pirol monomeri karışımı, monomer-hedef molekül arası etkileşimin tamamlanması için 24 sa boyunca 4 °C'de bekletildi. GNP-PNT üzerine IL-6 baskılanmış MIP(o-ppy) oluşturmak için, GNP-PNT modifiye SPE üzerine 20 µL MIP çözeltisi damlatıldı. Daha sonra bir elektropolimerizasyon tekniği olan dönüşümlü voltametri (CV) ile 50 mVs⁻¹ tarama hızında, -0,6 V ile 1,0 V gerilim aralığında (Ag/AgCl'ye karşı) 5 döngü tarandı ve elde edilen elektrotlar MIP(o-ppy)/GNP-PNT olarak adlandırıldı. Hazırlanan elektrotlar saf suya daldırıp çıkarıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kontrol grubu olarak aynı basamaklar izlenerek IL-6 içermeyen çözeltide elektrot modifikasyonu gerçekleştirildi ve elektrotlar NIP(o-ppy)/GNP-PNT olarak isimlendirildi.

Moleküler olarak baskılanmış IL-6 şablon moleküllerinin elektrot yüzeyinden uzaklaştırılması amacıyla yıkama çözeltisi olarak etanol:su (2:1 v/v) + 0,25 mol L⁻¹ NaOH kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan desorpsiyon çözeltisine daldırılan elektrotlar 3 sa (optimum süre) bekletilerek polimer filmde IL-6 molekülleri uzaklaştırıldı ve ardından PBS ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra yüzeyde oluşturulan ve IL-6'ya özgü olan bu boşluklara IL-6'nın yeniden adsorpsiyonu için MIP(o-ppy)/GNP-PNT üzerine farklı derişimlerde hazırlanan IL-6 çözeltisinden (5 µL) damlatıldı ve kurutuldu (oda sıcaklığında 30 dk).

E. ELEKTROKİMYASAL ANALİZLER

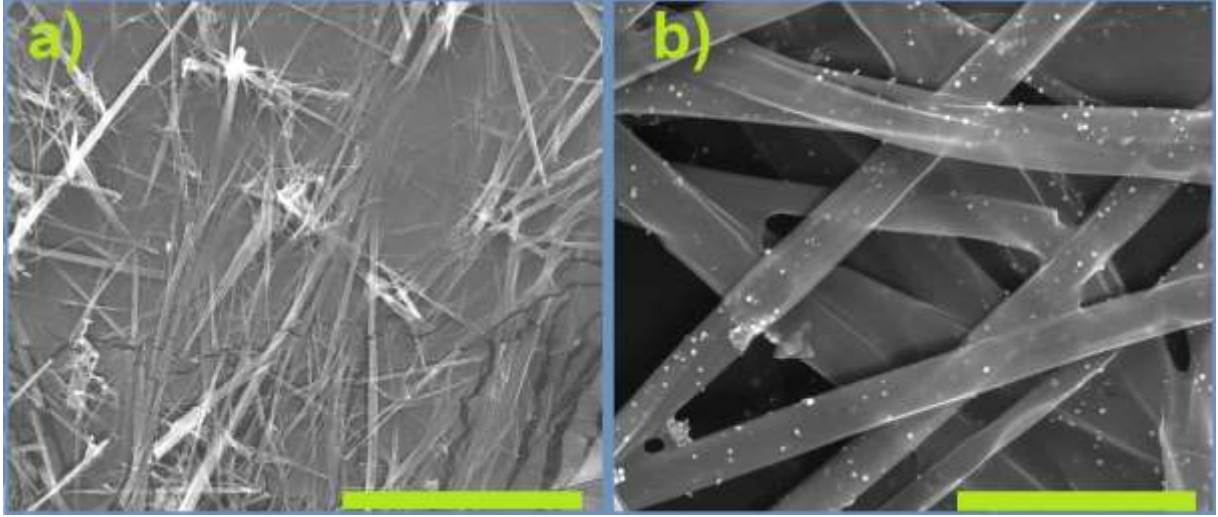
Moleküler baskılama işlemi elektropolimerizasyon tekniği olan CV ile 50 mVs⁻¹ tarama hızı kullanılarak -0,6 V ile 1,0 V arasında (Ag/AgCl'ye karşı) 5 döngü taranarak gerçekleştirildi.

MIP(o-PPy)/GNP-PNT'nin polimer film yapısına yerleşen IL-6 molekülleri için elektrokimyasal cevabı 0,1 M KCl içeren pH 7,4 PBS içinde hazırlanan 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çifti çözeltisinde -0,2 V ile 0,5 V (Ag/AgCl'ye karşı) arasında kaydedilen diferansiyel puls voltamogramları (DPV) ile incelendi.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

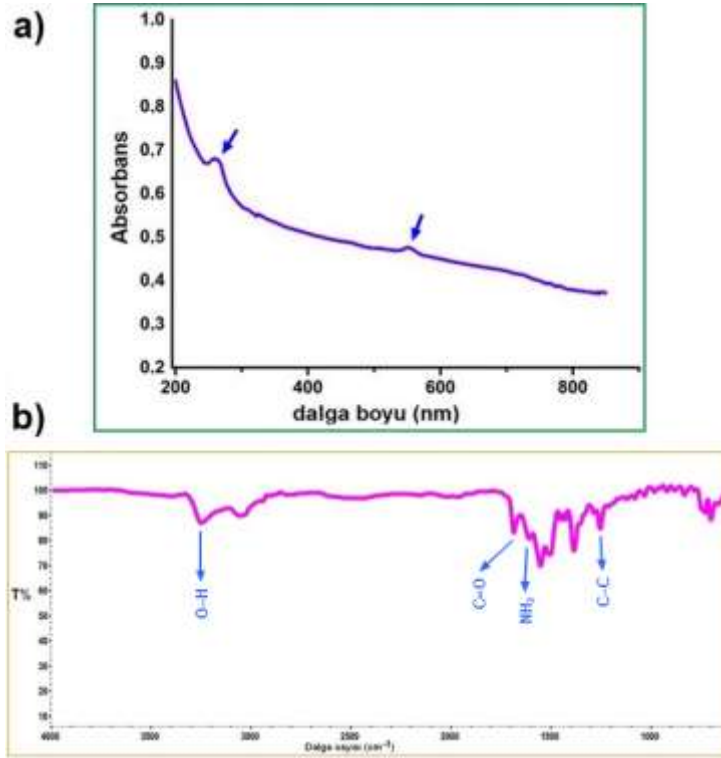
A.GNP-PNT NANOKOMPOZİTİNİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Önerilen çalışma kapsamında, öncelikle elektrot yüzeyinin fonksiyonelleştirilmesinde kullanılmak üzere kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile sentezlenen GNP-PNT yapılarının sentez başarısını ortaya koymak amacıyla çeşitli yöntemler kullanılarak karakterizasyon çalışmaları tamamlandı. Karakterizasyon çalışmalarında ilk olarak morfolojik yapının araştırılması SEM ile gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 1’de gösterildi.



Şekil 1. GNP-PNT nanoyapılarının SEM görüntüsü ölçek çubuğu (a) 100 µm ve (b) 2 µm.

Yapılan morfolojik karakterizasyon sonucunda Şekil 1’de verildiği üzere, PNT’lerin tübüler şekle sahip olduğu ve GNP’lerin ise küresel yapıda sentezlendiği belirlendi. Ayrıca üretilen GNP’lerin yaklaşık 25 nm çapında ve PNT’lerin yüzeyinde olduğu gözlemlendi. Karakterizasyon çalışmalarının devamında sulu çözeltideki GNP-PNT’lerin UV-vis spektrumu kaydedildi (Şekil 2 (a)). Şekil 2 (a)’da oklarla gösterildiği üzere 260 nm’de PNT ve 545 nm’de GNP’ye ait absorpsiyon piklerinin varlığı ortaya koyuldu. Elde edilen bu bulguların literatür ile de uyumlu olduğu tespit edildi [46], [47].

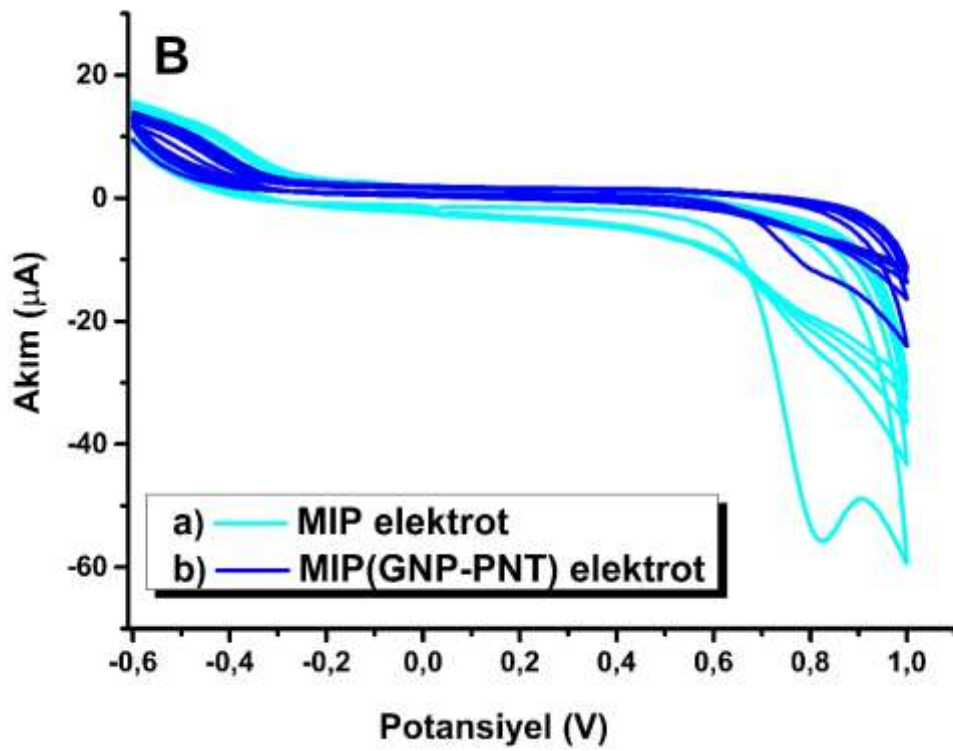
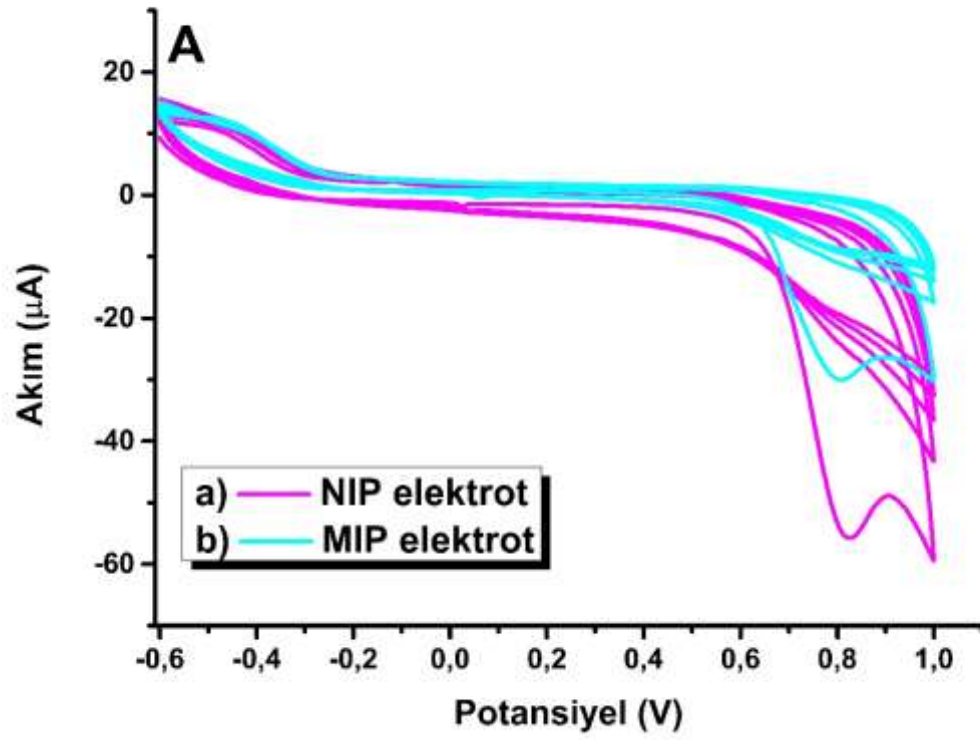


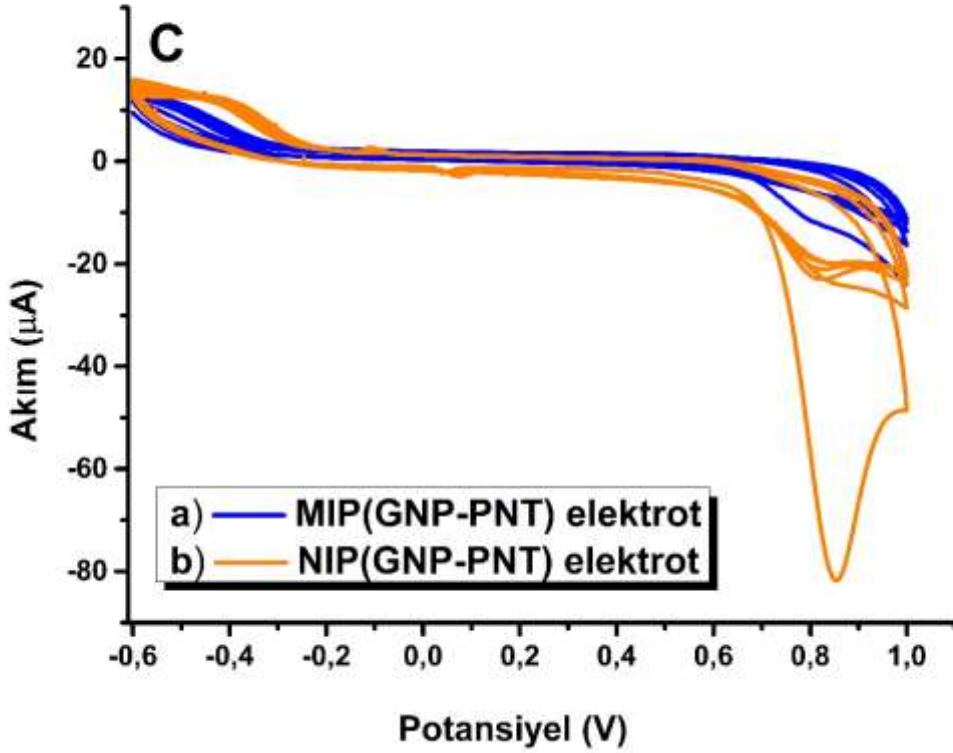
Şekil 2. Sentezlenen GNP-PNT'lerin (a) UV-Vis ve (b) ATR-FTIR spektrumu.

Nanoyapıların fizikokimyasal karakterizasyonu için ise, ATR-FTIR analizi gerçekleştirildi ve ilgili sonuç Şekil 2(b)'de verildi. Şekil 2 (b)'de elde edilen spektrumdan gözlemlendiği üzere GNP'ye ait karakteristik absorpsiyon bantları sırasıyla 1218 cm^{-1} 'deki aromatik C-C ve 3308 cm^{-1} 'de simetrik O-H gerilmesidir [48]. Ayrıca PNT yapısındaki amid C=O gerilmesi ve NH₂ bükülmesi sırası ile 1687 cm^{-1} ve 1611 cm^{-1} 'de gözlemlendi [49]. Elde edilen spektrumdan sentezlenen nanokompozit yapıda hem altın hem de peptit varlığı gösterildi. Gerçekleştirilen farklı karakterizasyon çalışmaları neticesinde GNP-PNT nanokompozit yapısının başarılı bir şekilde sentezlendiği belirlendi. Sonraki basamakta ise, IL-6'nın nicel analizinde kullanılmak üzere elektrotlar GNP-PNT ile fiziksel adsorpsiyon yöntemi kullanılarak modifiye edildi ve MIP(o-ppy) temelli biyoçipler hazırlandı.

B. MOLEKÜLER BASKILANMIŞ ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI

Çalışmanın ikinci kısmında, GNP-PNT nanokompozit yapısının elektrot yüzeyine modifiye edilmesi ile geliştirilen sensörün etkinliği arasındaki ilişki araştırıldı. Bu amaçla öncelikle herhangi bir malzeme ile modifiye edilmemiş (çıplak) SPE'ler üzerine MIP ve NIP'lar elektropolimerizasyon yöntemi ile hazırlandı (Şekil 3 (a)). Moleküler baskılama çalışmalarında en yaygın kullanılan polimerlerden biri olan ve çeşitli moleküllere karşı etkinliği kanıtlanmış pirol monomerinin o-ppy oluşturmak üzere elektro-polimerizasyonu CV yöntemiyle gerçekleştirildi. Yapılan literatür taramasında aşırı oksidasyona uğramış polipirol temelli moleküler baskılanmış yüzeylerin hazırlandığı ve farklı hedef moleküllerin analizinde başarıyla kullanıldığı gözlemlendi [28]. Bu nedenle pirol monomeri kullanılarak MIP'lar sentezlendi. Hem pirol monomerinin hem de IL-6 biyomolekülünün suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle herhangi bir organik çözücü veya yardımcı çözücüye ihtiyaç duyulmadan PBS tamponunda elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirildi. Şekil 3(a)'da sadece pirol monomeri içeren ortamda gerçekleştirilen elektro-polimerizasyona ait voltamogramlar gösterildi.





Şekil 3. (A) Modifiye edilmemiş SPE yüzeylerinde kaydedilen (a) IL-6 içermeyen (NIP) yalnızca 10 mM pirol monomeri içeren, (b) 1 µg/mL IL-6 ve 10 mM pirol monomeri içeren (MIP), (B) (a) modifiye edilmemiş SPE ve (b) GNP-PNT modifiye SPE üzerinde (C) GNP-PNT modifiye SPE yüzeylerinde kaydedilen (a) IL-6 içermeyen (NIP) yalnızca 10 mM pirol monomeri içeren ve (b) 1 µg/mL IL-6 ve 10 mM pirol monomeri içeren (MIP) pH 7,4 PBS içinde -0,6 V ile 1,0 V arasında (Ag/AgCl'ye karşı) 5 döngü kaydedilen voltamogramlar.

Şekil 3'ten görüldüğü üzere voltamogramlar anodik yönde -0,6 V'den başlanarak 1,0 V'ye (Ag/AgCl'ye karşı) kadar tarandı ve yaklaşık 0,82 V (Ag/AgCl'ye karşı) geriliminde pirolün aşırı oksidasyonuna neden olan tersinmez yükseltgenme piki ilk döngüde belirgin bir şekilde gözlemlendi. Pirolün sulu ortamdaki bu davranışının literatürde daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla uyum içinde olduğu gözlemlendi [29,50,51]. Pirol monomerinin tersinmez yükseltgenmesine ait pik akım değeri ise, döngü sayısı ile ters orantılı olarak değişim gösterdi ve ilk döngüdeki değere göre oldukça azalma eğilimi gösterdi (Şekil 3 (a)). Böylece 5 döngünün sonunda kısmen çapraz bağlanmış, kararlı ve fonksiyonel ince polimer filmleri elektrokimyasal olarak tampon ortamında SPE yüzeyinde (NIP/SPE) başarıyla sentezlendi [52]. Daha sonra ise, IL-6'ya özgü karakteristik tanıma bölgeleri oluşturmak üzere monomer çözeltisine hedef molekül eklendi (IL-6) ve MIP/SPE'nin üretimi gerçekleştirildi (Şekil 3 (b)). Böylece polimerizasyon işlemi yer alan kalıp moleküle özgü boşlukların oluşturulması hedeflendi. Şekil 3(b)'den görüldüğü üzere pirole ait yükseltgenme pik akımında anlamlı bir azalış olduğu ve pik geriliminin pozitif yönde kayma eğilimi olduğu gözlemlendi. Bu davranış, elektroaktif pirol monomerinin elektrot yüzeyine daha fazla ulaşmasını engelleyen aşırı oksitlenmiş polimerik filmlerin oluşumuna bağlandı. Polimerizasyon ortamında yer alan IL-6'nın katkısıyla pik akımındaki azalış beklenen bir durumdur. Bu sonuç IL-6'nın pirol ile birlikte polimerik yapıya katıldığını gösterdi. Böylece polimerik yapı içerisinde IL-6'ya karşı seçimli olan ve IL-6'yı şekil, boyut ve fonksiyonel olarak tanıyabilecek boşluklar başarıyla oluşturuldu.

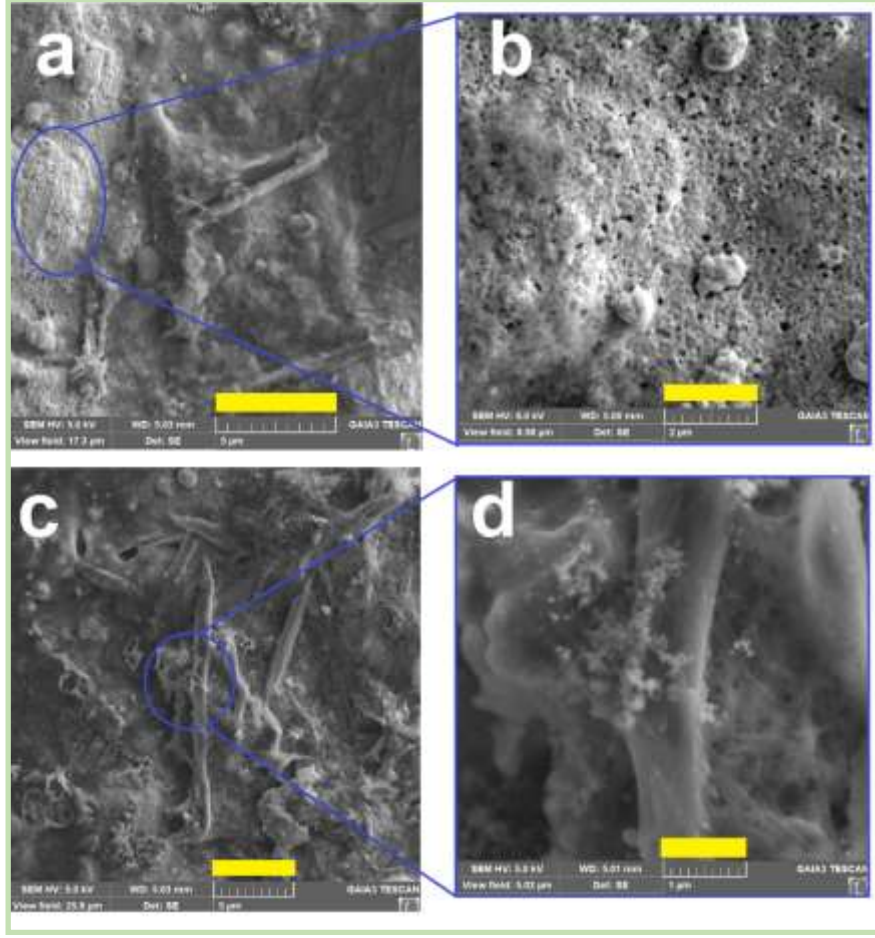
MIP temelli hazırlanan sensör sistemleri analite özgü yüksek seçicilik, kararlılık ve afinite göstermeleri ve düşük maliyetli sistemler olarak tanımlanmalarına rağmen elektrokatalitik etkilerinin bazen düşük olması bu sistemlerin en önemli dezavantajlarından birisidir. Bu nedenle belirtilen dezavantajı ortadan kaldırmanın en etkili yolu elektrot yüzeyinin nano malzemeler ile modifiye edilmesidir. Böylece düşük

kütle transfer direnci yaratılmakta ve analitin elektrot alanından desorpsiyonu/adsorpsiyonu gibi önemli parametrelerde iyileştirme sağlanmaktadır [30]. Literatürde farklı türde nanoyapılar (nanopartiküller, tübüler yapılar, grafen ve türleri vb.) MIP temelli sensörlerin analitik performansının artırılmasında kullanılmıştır [24]. Önerilen çalışmada ise, daha önce MIP temelli bir sensör çalışmasında destek nanomalzeme olarak kullanılmamış bir nanokompozit yapı olan GNP-PNT'lerin kullanımı araştırıldı. Bu nedenle elektrot yüzeyleri öncelikle GNP-PNT nanokompoziti ile damlat-kurut tekniği ile modifiye edildi ve polimerizasyon tekrarlanarak MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE'ler üretildi (Şekil 3 (B)).

Şekil 3 (C)'de nanokompozit modifikasyonu öncesi ve sonrası MIP'ların elektrosentezine ait voltamogramlar verildi. GNP-PNT modifikasyonundan sonra iki malzemenin sinerjik etkisinden dolayı pirolün yükseltgenme pik akımında azalış olduğu ve elektrot yüzeyinin değişiminden etkilendiği belirlendi. Böylece elektrot yüzeyinin GNP-PNT nanokompoziti ile kaplanmasıyla çıplak elektroda göre geniş elektroaktif yüzey alanı sağlaması ve yüksek elektron transfer yeteneği sayesinde daha iyi hassasiyet ve seçiciliğe sahip MIP'lar hazırlandı [53,54]. Şekil 3 (C)'den görüldüğü üzere MIP sentezinde pirolün yükseltgenme pik akımı azaldı ve bu beklenen bir sonuçtur. Ayrıca GNP-PNT/SPE'lerle hem MIP hem de NIP sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

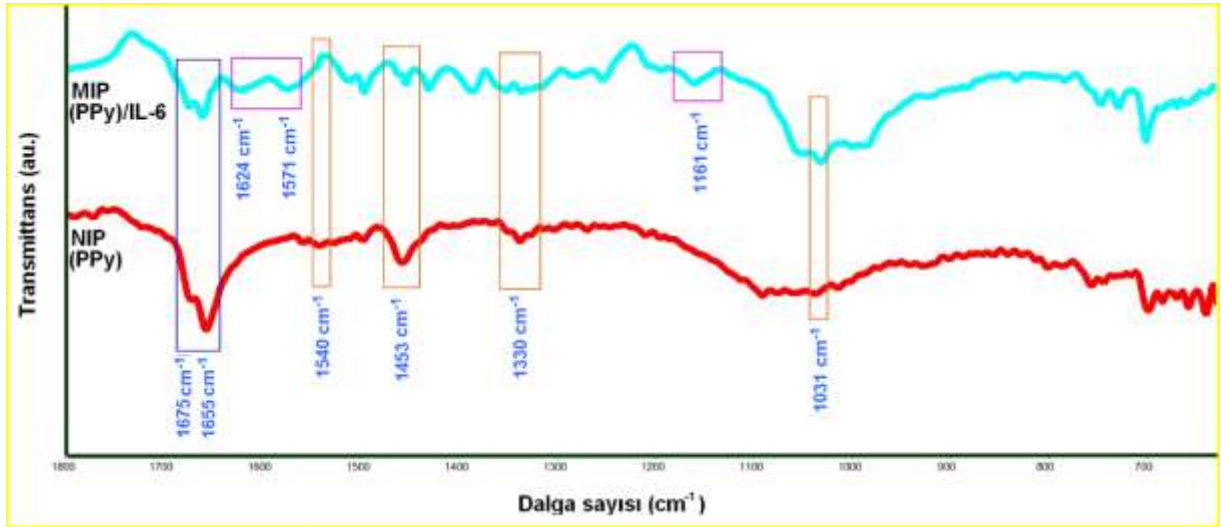
C. ELEKTROT SİSTEMİ İÇİN KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Önerilen sensör sisteminin karakterizasyonu farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle geliştirilen sensör yüzeyinin morfolojik özellikleri SEM ile araştırıldı ve ilgili sonuçlar Şekil 4'te verildi. Hazırlanan elektrot yüzeyinde farklı bileşenler bulunduğundan farklı büyütmelerde görüntüler kaydedildi. Elektro-polimerizasyon işlemi sonrasında, Şekil 4 (a-b)'de görüldüğü üzere GNP-PNT ile modifiye edilmiş SPE yüzeyinin pürüzlü yapıdaki MIP(o-ppy) polimer tabakası ile tamamen kaplandığı gözlemlendi [51,55]. Ayrıca, hem efektif yüzey alanını arttırması hem de IL-6 ile etkileşimi arttırarak MIP oluşturmak üzere uygun bir platform sağlaması amacıyla kullanılan GNP-PNT'lerin elektrot yüzeyinde varlığı da gösterildi. GNP-PNT'lerin MIP(o-ppy) tabakası oluştuktan sonra da tübüler yapısını koruduğu ve küresel formda GNP'leri içerdiği de anlaşıldı (Şekil 4 (c-d)).



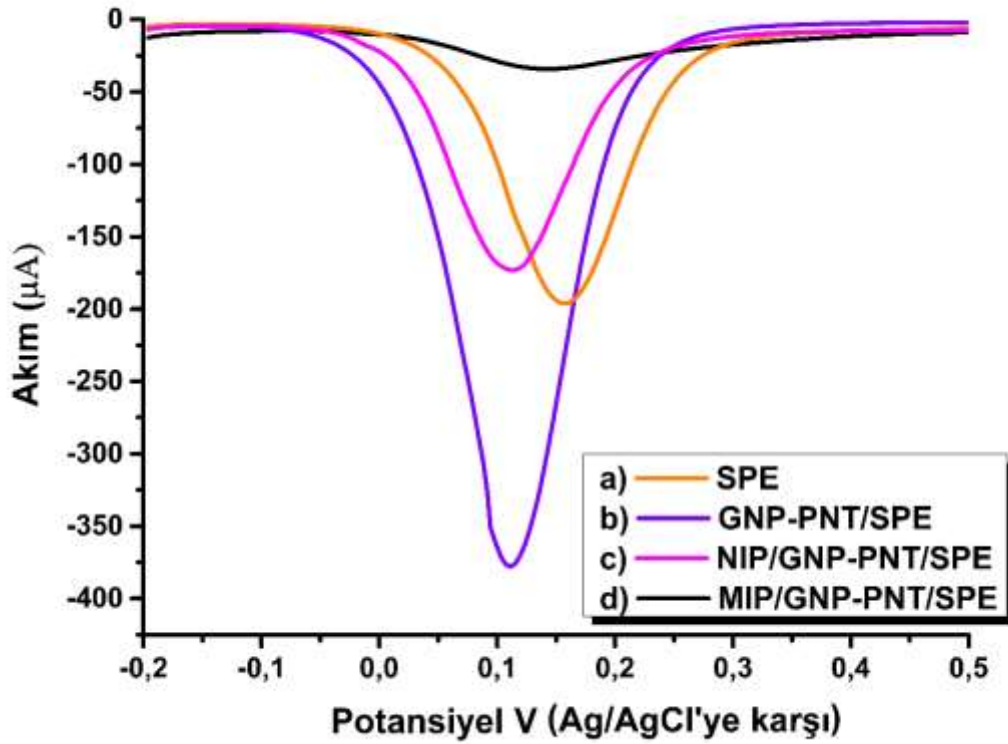
Şekil 4. MIP(o-ppy)-GNP-PNT SPE yüzeyinden kaydedilen farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri (a) 12 kx, (b) 23 kx, (c) 8 kx ve (d) 41,4 kx.

Morfolojik karakterizasyonun ardından NIP(o-ppy) ve MIP(o-ppy) modifiye edilmiş elektrot sistemlerinin yüzeylerinin bu bileşenleri içerdiğini ve yüzeyin kaplandığını ortaya koymak amacı ile ATR-FTIR spektrumları kaydedildi (Şekil 5). Bunun için elektrot yüzeyi önce GNP-PNT yapılarla modifiye edildi ardından modifiye elektrot yüzeyleri pirolün elektropolimerizasyonu sonucunda o-ppy ile kaplandı. Şekil 5'te verilen spektrumlarda hem NIP hemde MIP yapısında 1453 cm^{-1} ve 1540 cm^{-1} 'de gözlemlenen absorpsiyon pikleri ppy halkasının simetrik ve asimetrik gerilim titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1031 cm^{-1} 'deki pik C-H düzlem içi deformasyon titreşimlerini gösterirken 1300 cm^{-1} civarındaki pikler C-N ve C=N bağ gerilimlerini ifade etmektedir. Bunun yanı sıra, yine her iki spektrumda da gözlemlenen 1655 cm^{-1} ve 1675 cm^{-1} deki absorpsiyon pikleri PNT yapısında yer alan amid bantlarına ait sırasıyla C=O gerilme ve NH_2 bükülmesini ifade etmektedir. Öte yandan NIP'tan farklı olarak 1624 cm^{-1} ve 1571 cm^{-1} de gözlemlenen pikler MIP yapısındaki IL-6'ya ait amid I ve II yi ifade ederken; 1161 cm^{-1} de gözlemlenen pik ise yine IL-6'ya ait C-N gerilimini ifade etmektedir. Bu analizden yola çıkarak NIP ve MIP yapıların başarılı bir şekilde geliştirildiği ortaya koyuldu [45,56–59].



Şekil 5. MIP(PPy)-GNP-PNT SPE'ye ve NIP(PPy)-GNP-PNT SPE'ye ait ATR-FTIR spektrumu.

Son olarak yapılan modifikasyonların redoks çiftinin elektrokimyasal davranışı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla diferansiyel puls voltamogramları kaydedildi. Şekil 6 (b)'de kaydedilen voltamogramdan görüldüğü üzere elektrot yüzeyi GNP-PNT ile modifiye edildiğinde Şekil 6 (a)'da gösterilen SPE'ye ait voltamograma göre redoks çiftine ait yükseltgenme pik akımında anlamlı bir artış gözlemlendi [60].

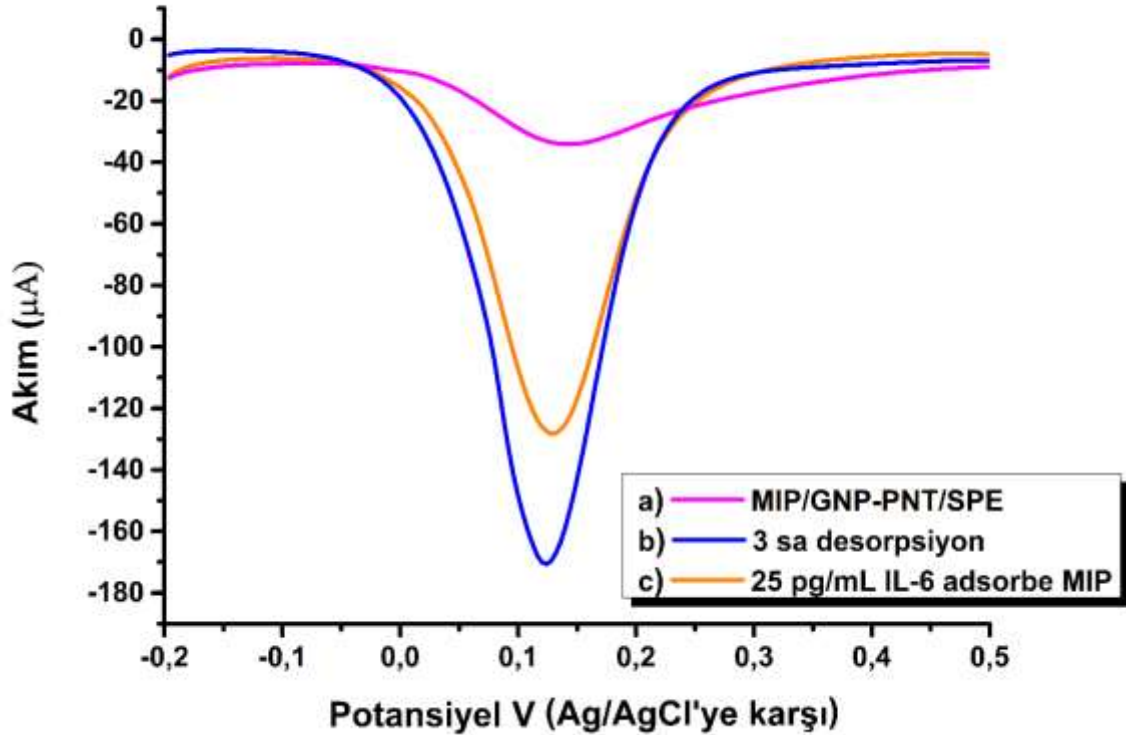


Şekil 6. (a) SPE, (b) GNP-PNT modifiye SPE, (c) NIP/GNP-PNT/SPE ve (d) MIP/GNP-PNT/SPE ile 0,1 M KCl içeren pH 7,4 PBS içinde hazırlanan 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinde -0,2 V ile 0,5 V (Ag/AgCl'e karşı) arası kaydedilen diferansiyel puls voltamogramları.

Bu davranış GNP-PNT ile modifiye edilmiş SPE'nin gelişmiş elektron transfer kabiliyetini ve geniş yüzey alanını tanımlamaktadır. GNP-PNT modifikasyonu sonrası sağlanan geniş yüzey alanı sayesinde polimerizasyonun gerçekleşeceği alan da arttı. Bu sayede eş zamanlı olarak elektrot yüzeyine daha fazla IL-6'nın baskılanmasına olanak sağlandı. Şekil 6 (c)'de gösterilen voltamogramda NIP(o-ppy) üretiminin ardından elektrot yüzeyinde o-ppy polimerinin varlığı ile redoks çiftine ait pik akımının GNP-PNT yüzeyine göre azaldığı tespit edildi ve bu beklenen bir durumdur. Daha sonra GNP-PNT yüzey üzerinde sentezlenen MIP(o-ppy) varlığı ile pik akımının neredeyse sıfıra yaklaştığı gözlemlendi (Şekil 6 (d)). MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE yüzeyinde iletken olmayan bir tür olan IL-6 ve aşırı oksidasyonla sentezlenen polipirol varlığıyla birlikte redoks çiftinin pik akımı beklendiği üzere en düşük değere ulaştığı gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar, redoks çifti davranışına göre modifikasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini gösterdi. Ayrıca DPV yöntemi nicel analizler için yüksek duyarlık, kısa sürede analiz gibi avantajlar sağladığından ve elektrokimyasal tayin çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntem olduğundan IL-6'nın nicel analizi için uygun bir yöntem olduğu gözlemlendi. Bu nedenle bir sonraki basamakta IL-6'nın nicel analizinde DPV'nin kullanımı araştırıldı.

D. MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE İLE IL-6 ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

IL-6 hedef molekülünün MIP polimerik film yapısından desorpsiyonu ve daha sonra yeniden bağlama basamağı üzerindeki etkileşimi redoks çiftinin yükseltgenme pik akımından yararlanılarak araştırıldı (Şekil 7). Moleküler olarak baskılanmış IL-6 moleküllerinin elektrot yüzeyinden uzaklaştırılması amacıyla literatürden yararlanılarak etanol:su (2:1 v/v) + 0,25 mol L⁻¹ NaOH karışımı yıkama çözeltisi olarak kullanıldı [61]. Bu amaçla hazırlanan yıkama çözeltisine daldırılan elektrotlar 3 sa bekletilerek IL-6 moleküllerinin polimerik yüzeyden uzaklaştırılması hedeflendi. Desorpsiyon sonrası kaydedilen voltamogram Şekil 7 (b)'de verildi.



Şekil 7. (a) MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE, (b) 3 sa desorpsiyon sonrası ve (c) 15 dk 25 pg/mL IL-6 adsorpsiyonu sonrası 0,1 M KCl içeren pH 7,4 PBS içinde hazırlanan 5,0 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çifti çözeltisinde -0,2 V ile 0,5 V (Ag/AgCl'ye karşı) arası kaydedilen diferansiyel puls voltamogramları.

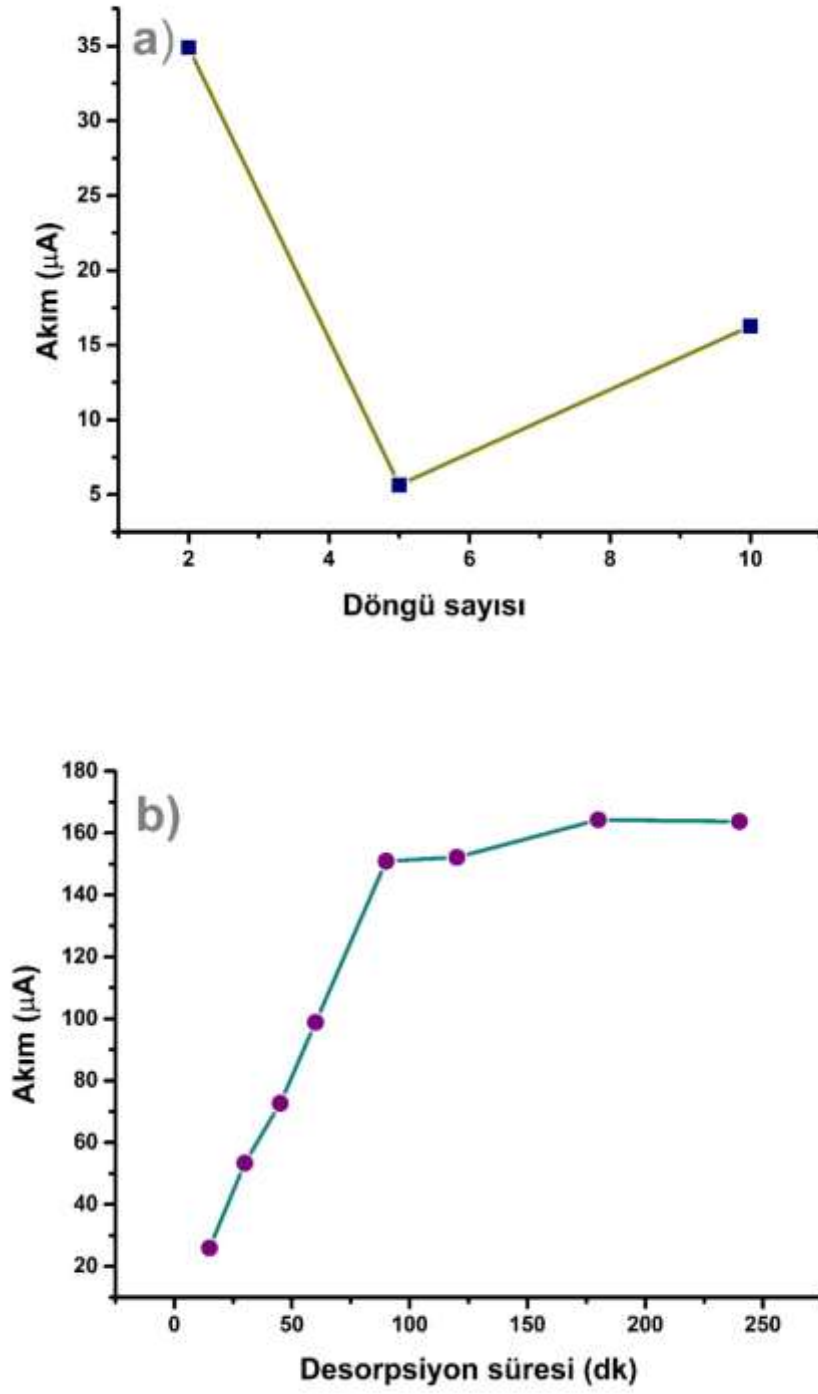
Şekil 7 (a)'da yıkama öncesi MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE ile kaydedilen voltammogramdan elde edilen yükseltgenme pik akımı oldukça düşük olarak elde edildi. Desorpsiyonun başarımı ise, Şekil 7 (b)'den

elde edilen pik akımının artan yoğunluğu gösterdi. IL-6 molekülleri yüzeyden uzaklaştırıldığında elektrodun yüzeyinde oluşan boşluklar sayesinde redoks çiftinin elektron aktarım hızı arttı böylece yüzeye daha fazla redoks çifti ulaştığından yüksek pik akımı kaydedildi. Daha sonra bu boşluklara 25 pg/mL IL-6'nın yeniden adsorpsiyonu (15 dk) sağlandı ve polimer film yapısına yerleşen IL-6 molekülleri, elektrot çözelti ara yüzeyinde bir direnç oluşturdu. Böylece $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çiftinin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi engellendi ve desorpsiyon sonrasına göre daha düşük bir pik akımı kaydedildi (Şekil 7 (c)). Gerçekleştirilen etkileşim çalışmasıyla IL-6'nın MIP yapısından başarıyla uzaklaştırılabildiği ve polimer filmi içerisine tekrar bağlanabildiğini gösterildi. Deneyle devamında sensörün hassasiyet ve seçiciliği üzerine etkisi olan bazı deneysel koşullar optimize edildi.

E. OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Geliştirilen sensörün analitik performansının geliştirilmesi amacıyla bazı deneysel koşulların optimizasyonu gerçekleştirildi. MIP tabanlı sensörün hassasiyetinin, sensör yüzeyindeki baskı boşluklarının miktarı ile ilgili olduğu iyi bilinmektedir, bu da baskı yapılan bölgelerin ve polimer film kalınlığının doğru orantılı olarak değiştiği anlamına gelmektedir. Bu amaçla, öncelikle farklı döngü sayılarında polimerizasyon gerçekleştirildi ve analiz sonuçları yorumlandı. Döngü sayısı 2, 5 ve 10 olacak şekilde elektrot yüzeyinde farklı kalınlıklarda polimerik filmler sentezlenmesi sağlandı. Elde edilen akım değerlerinden en uygun döngü sayısının 5 olduğu gözlemlendi (Şekil 8 (a)). 2 döngüden sonra elde edilen polimerik yapıda yeterli sayıda tanıma boşlukları elde edilememiş olabileceğinden yüksek akım sinyalleri kaydedildi. Ayrıca artan film kalınlığı, analitin boşluklara difüzyonunu yavaşlatmış olabilir ve ayrıca yüzey üzerinde bulunan tanıma boşlukları arasında yetersiz etkileşime yol açabileceğinden 10 döngüde de 5 döngüye göre daha yüksek pik akım değerleri elde edildi. Bu nedenle polimerizasyonda en uygun döngü sayısı 5 olarak kabul edildi.

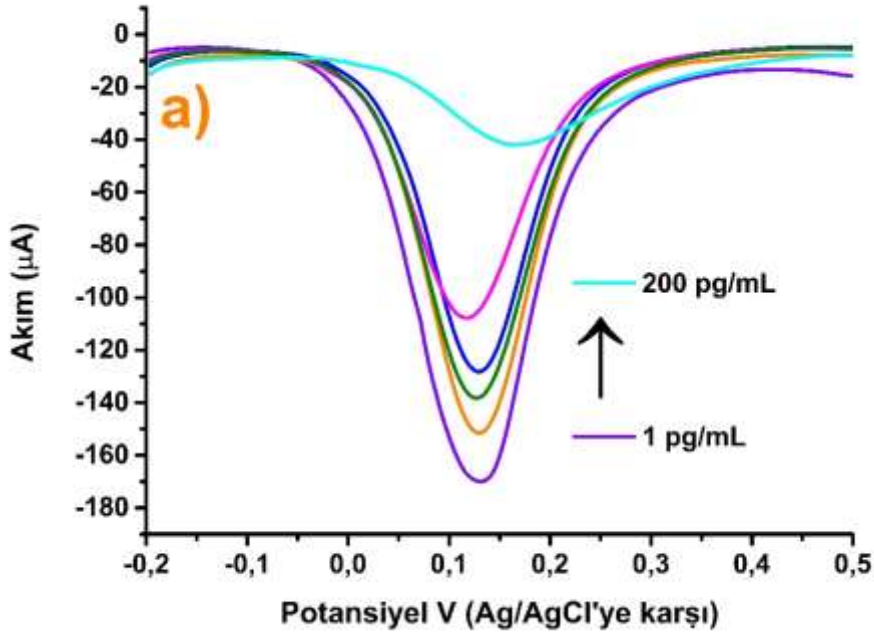
Daha sonra ise, moleküler baskılanan IL-6 moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılma süresi araştırıldı. Baskılı polimerin oluşturulmasının ardından hedef moleküllerin polimere yeniden seçici olarak bağlanması için şablon moleküllerin polimerik yüzeyden tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla MIP(o-ppy)-GNP-PNT/SPE yüzeyleri yıkama çözeltileri ile farklı sürelerde muamele edildi. 15 dk'dan başlanarak 4 saate kadar farklı sürelerde elektrot yüzeyleri yıkandı ve sonrasında elektrotlar oda sıcaklığında kurutuldu (Şekil 8 (b)). Desorbe edilen yüzeylerden redoks çifti çözeltisinde diferansiyel puls voltamogramları kaydedildi ve kendi aralarında kıyaslama yapıldı. 180 dk bekletme süresine kadar MIP yüzeyinde boşlukların artması ve elektron transferinin kolaylaşması nedeniyle pik akımları artmış, ardından sensör cevabı neredeyse hiç değişmemiştir. Böylece polimer yüzeyinden 180 dk sonunda hedef moleküllerinin neredeyse tamamının uzaklaştığı sonucuna varıldı. Bu nedenle etanol:su (2:1 v/v) + 0,25 mol L⁻¹ NaOH içerisinde en uygun desorpsiyon süresi 180 dk olarak belirlendi. Sonraki basamakta belirlenen uygun şartlar altında sensörün analitik performansı araştırıldı.

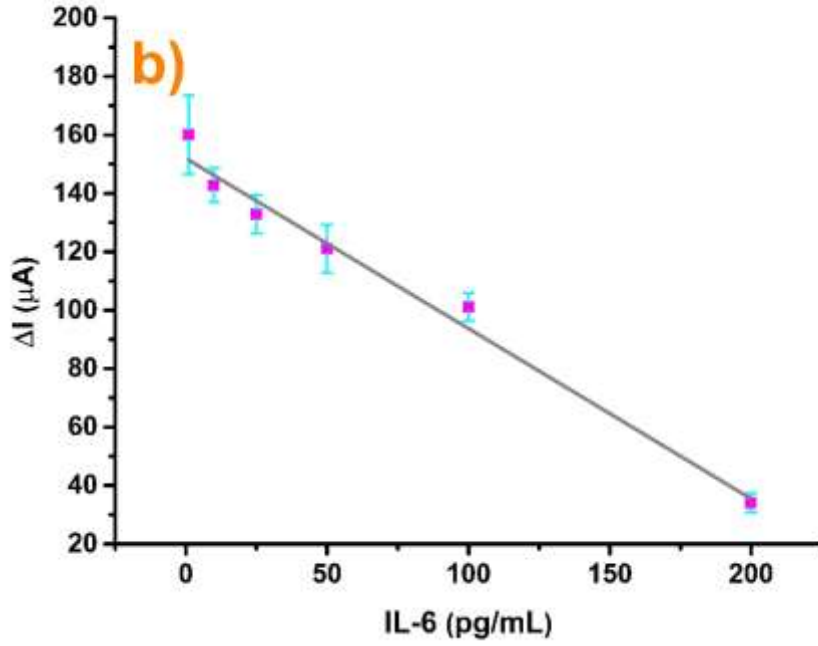


Şekil 8. MIP(o-ppy)/GNP-PNT/SPE ile (a) döngü sayısı ve (b) yıkama süresinin etkisinin optimizasyon çalışmaları.

E. ELEKTROT SİSTEMİNİN ANALİTİK PERFORMANSININ ARAŞTIRILMASI

Geliştirilen MIP sensörün doğrusal çalışma aralığı belirlenirken literatürde yer alan bilgilerden yararlanıldı. Çünkü önerilen tayin yöntemiyle IL-6'nın gerçek örneklerle uygulanabilir olması gerekmektedir. Literatürde, baş-boyun kanseri olan hastaların serum örneklerinde IL-6'nın miktarının ≥ 20 pg/mL olduğu sağlıklı insanlarda ise bu miktarın ≤ 6 pg/mL olduğu belirtilmiştir [62]. Kolorektal kanserli tüm hastalarda serumdaki IL-6 seviyesi $5,49 \pm 2,49$ pg/mL ve 1., 2., 3., 4. evre kolorektal kanserli hastalarda sırasıyla $2,75 \pm 0,2$; $4,14 \pm 0,51$; $5,86 \pm 1,68$ ve $9,56 \pm 0,99$ pg/mL olarak tespit edilmiştir [63]. Bu bilgilerden yola çıkarak IL-6'nın nicel analizinde hem 6 pg/mL'nin altı hem de ≥ 20 pg/mL'nin üstündeki derişimlerde çalışıldı. Doğrusal çalışma aralığı 1 pg/mL ile 200 pg/mL olarak elde edildi. Belirlenen derişimlerde elde edilen voltamogramlar Şekil 9 (a)'da ve pik akım değerleri ise Şekil 9 (b)'de verildi.





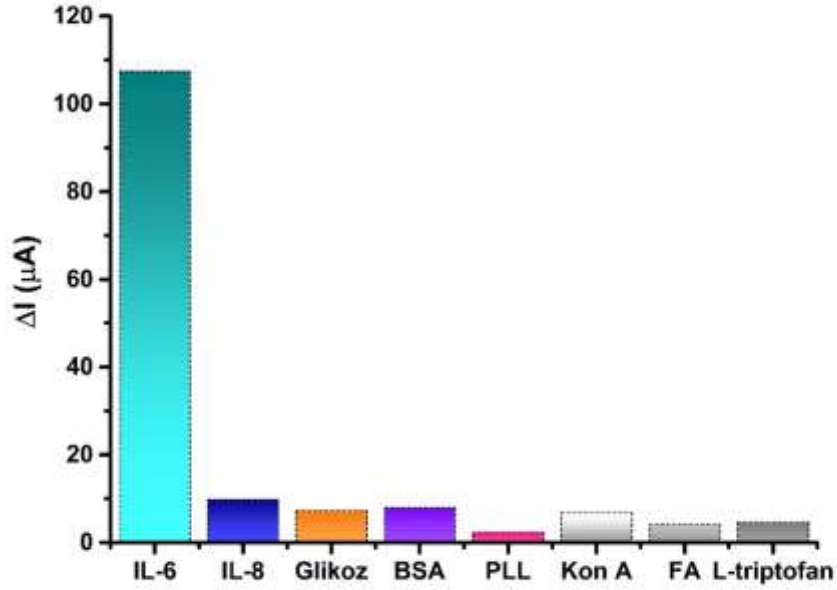
Şekil 9. (a) 1-200 pg/mL derişim aralığında elde edilen voltamogramlar ve (b) doğrusal kalibrasyon grafiğı.

Şekil 9 (b)'deki verilerden elde edilen doğrusal grafik Eş.1'de verildi;

$$Akım (\mu A) = -0,5856 IL-6 \left(\frac{pg}{mL} \right) + 152,98 \quad R^2 = 0,9834 \quad (1)$$

Buradan gözlenebilme sınırı (LOD) 0,2 pg/mL olarak hesaplandı.

Tekrar üretilebilirlik özellikle klinik uygulamalarda sensörlerin kullanımı için oldukça önemli bir özelliktir. Geliştirilen sensörlerin tekrarlanabilir ölçümler kaydedebildiğini göstermek için, 25 pg/mL IL-6 tespiti için altı elektrot hazırlandı. Altı elektrot için yapılan ölçümlerin bağıl standart sapması (% RSD) % 4,3 olarak hesaplandı ve bu sonuç ölçümlerin güvenilir olduğunu gösterdi. Daha sonra ise geliştirilen sensör üzerine farklı türlerin girişim etkisi araştırıldı ve ilgili sonuçlar Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. MIP(o-ppy)/GNP-PNT elektrodunun seçicilik çalışması.

Seçicilik çalışmasında IL-8, glikoz, konkovalin A (Kon A), polilislin (PLL), L-triptofan, folik asit (FA), sığır serum albumin (BSA) ve IL-6 arasındaki etkileşim derecesi %10'un altında olduğu belirlendi ve bu da geliştirilen sensörün IL-6'ya karşı seçiciliğinin kabul edilebilir olduğunu gösterdi.

IV. SONUÇ

Özetle bu çalışmada, IL-6'nın nicel analizinin gerçekleştirilebileceği moleküler baskılanmış elektrotların geliştirilmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda seçicilik ve moleküler baskılama üzerine sinerjik etki yaratan GNP-PNT nanokompozitinin sentezi ve çeşitli yöntemlerle karakterizasyonu gerçekleştirildi. Sentezlenen GNP-PNT'nin fiziksel adsorpsiyon ile çalışma elektrodu yüzeyine modifikasyonu başarıyla gerçekleştirildi. Nanokompozit modifiye yüzeyler üzerinde tek basamakta başlatıcı, enzim veya çapraz bağlayıcı gibi yapılara ihtiyaç duymadan pirol monomerinden yola çıkılarak elektro-sentez ile MIP(o-ppy)/GNP-PNT'ler üretildi. Elektrokimyasal polimerizasyonda CV yöntemi ile çoklu döngü gerçekleştirilerek elektrot yüzeyinde doğrudan MIP'ların sentezi başarıyla gerçekleştirildi. Elektrot yüzeyinde GNP-PNT varlığının MIP sentezi üzerine etkisi araştırıldı ve MIP oluşumuna olumlu katkı sağladığı belirlendi. Ayrıca oluşturulan baskılanmış polimerden IL-6'nın başarıyla uzaklaştırılabildiği (desorpsiyonu) ve oluşan boşluklara IL-6'nın yeniden başarıyla adsorplanabildiği gösterildi. Önerilen sensör sistemi ile doğrusal çalışma aralığı 1 pg/mL ile 200 pg/mL olarak elde edildi ve LOD değeri 0,2 pg/mL olarak hesaplandı. Geliştirilen sensörün % 4,3 RSD değeri ile tekrar üretilebilir sonuçlar sergilediği belirlendi. Ayrıca girişim yapabilecek farklı türlere karşı ölçümler tekrarlandı ve diğer türlerin girişim etkisinin %10'un altında olduğu belirlendi. Bu sonuç sensörün IL-6'ya karşı iyi seçicilik özelliği gösterdiğini kanıtladı. Tüm bu sonuçlar yığın polimerizasyon ile geliştirilen sistemin IL-6'nın nicel analizinde başarıyla kullanılabileceğini gösterdi.

TEŞEKKÜR: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (FÇP-2019-18214) desteklenmiştir. Yazar ayrıca, faydalı yorumları için Dr. Gülçin Bolat ve Dr. Öznur Akbal Vural'a teşekkür eder.

V. KAYNAKÇA

- [1] P. Zarogoulidis, L. Yarmus, K. Darwiche, R. Walter, H. Huang, Z. Li, B. Zaric, K. Tsakiridis and K. Zarogoulidis, "Interleukin-6 cytokine: A multifunctional glycoprotein for cancer," *Immunome Research*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [2] J. Scheller and S. Rose-John, "Interleukin-6 and its receptor: From bench to bedside," *Medical Microbiology Immunology*, vol. 195, pp. 173–183, 2006.
- [3] Y. Guo, F. Xu, T. Lu, Z. Duan and Z. Zhang, "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 38, no. 7, pp. 904–910, 2012.
- [4] T. Li and M. Yang, "Electrochemical sensor utilizing ferrocene loaded porous polyelectrolyte nanoparticles as label for the detection of protein biomarker IL-6," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 158, no. 1, pp. 361–365, 2011.
- [5] J. Peng, L.-N. Feng, Z.-J. Ren, L.-P. Jiang and J.-J. Zhu, "Synthesis of silver nanoparticle-hollow titanium phosphate sphere hybrid as a label for ultrasensitive electrochemical detection of human interleukin-6," *Small*, vol. 7, no. 20, pp. 2921–2928, 2011.
- [6] G. Cizza, A.H. Marques, F. Eskandari, I.C. Christie, S. Torvik, M.N. Silverman, T.M. Phillips and E.M. Sternberg, "Elevated neuroimmune biomarkers in sweat patches and plasma of premenopausal women with major depressive disorder in remission: the POWER study," *Biological Psychiatry*, vol. 64, no. 10, pp. 907–911, 2008.
- [7] M. Tertiş, B. Ciui, M. Suciu, R. Săndulescu, and C. Cristea, "Label-free electrochemical aptasensor based on gold and polypyrrole nanoparticles for interleukin 6 detection," *Electrochimical Acta*, vol. 258, pp. 1208–1218, 2017.
- [8] H. Wu, Q. Huo, S. Varnum, J. Wang, G. Liu, Z. Nie, J. Liu and Y. Lin, "Dye-doped silica nanoparticle labels/protein microarray for detection of protein biomarkers," *Analyst*, vol. 133, pp. 1550–1555, 2008.
- [9] S.M. Hanash, S.J. Pitteri and V.M. Faca, "Mining the plasma proteome for cancer biomarkers," *Nature*, vol. 452, no. 3, pp. 571–579, 2008.
- [10] R. Malhotra, V. Patel, J. P. Vaque, J.S. Gutkind and J. F. Rusling "Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 3118–3123, 2010.
- [11] Y. Lou, T. He, F. Jiang, J.J. Shi and J.J. Zhu, "A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels," *Talanta*, vol. 122, pp. 135–139, 2014.
- [12] P. Chen, M.T. Chung, W. McHugh, R. Nidetz, Y. Li, J. Fu, T.T. Cornell, T.P. Shanley and K. Kurabayashi, "Multiplex serum cytokine immunoassay using nanoplasmonic biosensor microarrays," *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 4173–418, 2015.
- [13] M. Toma and K. Tawa, "Polydopamine thin films as protein linker layer for sensitive detection of Interleukin-6 by surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 8, pp. 22032–22038, 2016.
- [14] A.M. Hawkrigde and D.C. Muddiman, "Mass spectrometry-based biomarker discovery: toward

a global proteome index of individuality, ” *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 2, no.1, pp. 265–277, 2009.

[15] L.S.S. Kumar, X. Wang, J. Hagen, R. Naik, I. Papautsky and J. Heikenfeld, “Label free nano-aptasensor for interleukin-6 in protein-dilute bio fluids such as sweat, ” *Analytical Methods*, vol. 8, pp. 3440–3444, 2016.

[16] J.J. Shi, T.T. He, F. Jiang, E.S. Abdel-Halim and J.J. Zhu, “Ultrasensitive multi-analyte electrochemical immunoassay based on GNR-modified heated screen-printed carbon electrodes and PS@PDA-metal labels for rapid detection of MMP-9 and IL-6, ” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 55, pp. 51–56, 2014.

[17] C. Russell, A.C. Ward, V. Vezza, P. Hoskisson, D. Alcorn, D.P. Steenson and D.K. Corrigan, “Development of a needle shaped microelectrode for electrochemical detection of the sepsis biomarker interleukin-6 (IL-6) in real time, ” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 126, pp. 806–814, 2019.

[18] I. Ojeda, M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J.M. Pingarrón, “Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification, ” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 406, pp. 6363–6370, 2014.

[19] J. Peng, L.N. Feng, Z.J. Ren, L.P. Jiang and J.J. Zhu, “Synthesis of silver nanoparticle-hollow titanium phosphate sphere hybrid as a label for ultrasensitive electrochemical detection of human interleukin-6, ” *Small*, vol. 7, no. 20, pp. 2921–2928, 2011.

[20] T. Li and M. Yang, “Electrochemical sensor utilizing ferrocene loaded porous polyelectrolyte nanoparticles as label for the detection of protein biomarker IL-6, ” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 158, no.1, pp. 361–365, 2011.

[21] M. Tertis, P.I. Leva, D. Bogdan, M. Suci, F. Graur and C. Cristea, “Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening, ” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 137, pp. 123–132, 2019.

[22] G. Bolat, Y.T. Yaman and S. Abaci, “Molecularly imprinted electrochemical impedance sensor for sensitive dibutyl phthalate (DBP) determination, ” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 299, pp. 127000, 2019.

[23] L. Özcan and Y. Şahin, “Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode, ” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 127, pp. 362–369, 2007.

[24] A.A. Lahcen and A. Amine, “Recent Advances in electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers and nanomaterials, ” *Electroanalysis*, vol. 31, pp. 188–201, 2019.

[25] F. Tan, L. Cong, X. Li, Q. Zhao, H. Zhao, X. Quan and J. Chen, “An electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole/graphene quantum dots composite for detection of bisphenol A in water samples, ” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 233, pp. 599–606, 2016.

[26] A. Nezhadali, L. Mehri and R. Shadmehri, “Determination of methimazole based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor, ” *Materials Science and Engineering C*, vol. 85, pp. 225–232, 2018.

[27] J. Xu, Y. Zhang, K. Wu, L. Zhang, S. Ge and J. Yu, “A molecularly imprinted polypyrrole for ultrasensitive voltammetric determination of glyphosate, ” *Microchimica Acta*, vol. 184, pp. 1959–1967, 2017.

- [28] H. Shiigi, H. Yakabe, M. Kishimoto, D. Kijima, Y. Zhang, U. Sree, B.A. Deore and T. Nagaoka, "Molecularly imprinted overoxidized polypyrrole colloids: Promising materials for molecular recognition," *Microchimica Acta*, vol. 143, pp. 155–162, 2003.
- [29] E. Mathieu-Scheers, S. Bouden, C. Grillot, J. Nicolle, F. Warmont, V. Bertagna, B. Cagnon and C. Vautrin-Ul, "Trace anthracene electrochemical detection based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified glassy carbon electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 848, pp. 113253, 2019.
- [30] X.F. Zhao, F.F. Duan, P.P. Cui, Y.Z. Yang, X.G. Liu and X.L. Hou, "A molecularly-imprinted polymer decorated on graphene oxide for the selective recognition of quercetin," *New Carbon Materials*, vol. 33, no.6, pp. 529–543, 2018.
- [31] S. Sun, M. Zhang, Y. Li and X. He, "A molecularly imprinted polymer with incorporated Graphene oxide for electrochemical determination of quercetin," *Sensors*, vol. 13, no.5, pp. 5493–5506, 2013.
- [32] F. Wang, L. Zhu and J. Zhang, "Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole-graphene-gold nanoparticles modified electrode," *Sensors and Actuators: B Chemical*, vol. 192 pp. 42–647, 2014.
- [33] L. Devkota, L.T. Nguyen, T.T. Vu and B. Piro, "Electrochemical determination of tetracycline using AuNP-coated molecularly imprinted overoxidized polypyrrole sensing interface," *Electrochimica Acta*, vol. 270 pp. 535–542, 2018.
- [34] A. Turco, S. Corvaglia, P.P. Pompa and C. Malitesta, "An innovative and simple all electrochemical approach to functionalize electrodes with a carbon nanotubes/polypyrrole molecularly imprinted nanocomposite and its application for sulfamethoxazole analysis," *Journal of Colloid Interface Science*, vol. 599, pp. 676–685, 2021.
- [35] G. Chen, G. Wu, L. Wang, S. Zhang and Z. Su, "Layer-by-layer assembly of single-charged ions with a rigid polyampholyte," *Chemical Communications*, pp. 1741–3, 2008.
- [36] A. Vakurov, C.E. Simpson, C.L. Daly, T.D. Gibson and P.A. Millner, "Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection. II. Immobilization and stabilization of acetylcholinesterase," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2324–9, 2005.
- [37] A. Lakshmanan, S. Zhang and C.A.E. Hauser, "Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices," *Trends Biotechnology*, vol. 30, pp. 155–165, 2012.
- [38] J. Castillo-león, K.B. Andersen and W.E. Svendsen, "Self – Assembled peptide nanostructures for biomedical applications : Advantages and challenges", in *Biomaterials Science and Engineering*, Chapter 5, InTech, 2011 pp. 115-138.
- [39] J.J. Castillo, W.E. Svendsen, N. Rozlosnik, P. Escobar, F. Martínez and J. Castillo-León, "Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode," *Analyst*, vol. 138, pp. 1026–1031, 2013.
- [40] M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon and E. Gazit, "Novel electrochemical biosensing platform using self-assembled peptide nanotubes," *Nano Letters*, vol. 5, pp. 183–186, 2005.
- [41] M. Yemini, M. Reches, E. Gazit, J. Rishpon and T. Aviv, "Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme - biosensor applications," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 5155–5159, 2005.

- [42] E. Chan, J. Choi, M. Lee and K. Koo, "Fabrication of an electrochemical immunosensor with self-assembled peptide nanotubes," *Colloids Surfaces A*, vol. 314, pp. 95–99, 2008.
- [43] G. Jiang, L. Wang and W. Chen, "Studies on the preparation and characterization of gold nanoparticles protected by dendrons," *Materials Letters*, vol. 61, no.1, pp. 278–283, 2007.
- [44] T. Vural, Y.T. Yaman, S. Ozturk, S. Abaci and E.B. Denkbaz, "Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 510, pp. 318–326, 2018.
- [45] Y.T. Yaman, O.A. Vural, G. Bolat and S. Abaci, "One-pot synthesized gold nanoparticle-peptide nanotube modified disposable sensor for impedimetric recognition of miRNA 410," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 320, pp. 128343, 2020.
- [46] S. Almohammed, S. Fedele, B.J. Rodriguez and J.H. Rice, "Aligned diphenylalanine nanotube–silver nanoparticle templates for high-sensitivity surface-enhanced Raman scattering," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 48, no.12, pp. 1799–1807, 2017.
- [47] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard and D.G. Fernig, "Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 4215–4221, 2007.
- [48] S.M. Acuña, M.C. Veloso and P.G. Toledo, "Self-Assembly of Diphenylalanine-Based Nanostructures in Water and Electrolyte Solutions," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2018, pp. 1–7, 2018.
- [49] G.R. Dhanasekar, Naresh Niranjana Rahul, G. Kannan, Badri Narayanan Raman, and N. Sakthivel, "Green Chemistry Approach for the Synthesis of Gold Nanoparticles Using the Fungus *Alternaria* sp.," *Journal of Microbiological Biotechnology*, vol. 25, pp. 1129–1135, 2015.
- [50] N. Ermiş and N. Tinkiliç, "Preparation of molecularly imprinted polypyrrole modified gold electrode for determination of tyrosine in biological samples," *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 13, pp. 2286–2298, 2018.
- [51] Z.O. Uygun and Y. Dilgin, "A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos," *Sensors Actuators B: Chemical*, vol. 188, pp. 78–84, 2013.
- [52] C. Johne, R. Fritsch and A. Ignaszak, "Three-Dimensionally Ordered Polypyrrole Electrode: Electrochemical Study on Capacity and Degradation Process," *Electroanalysis*, vol. 26 pp. 1560–1572, 2014.
- [53] S. Dadkhah, E. Ziaei, A. Mehdinia, T. Baradaran Kayyal and A. Jabbari, "A glassy carbon electrode modified with amino-functionalized graphene oxide and molecularly imprinted polymer for electrochemical sensing of bisphenol A," *Microchimica Acta*, vol. 183, pp. 1933–1941, 2016.
- [54] X. Wei, X. Xu, W. Qi, Y. Wu and L. Wang, "Molecularly imprinted polymer/graphene oxide modified glassy carbon electrode for selective detection of sulfanilamide," *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 27, pp. 374–379, 2017.
- [55] D. Tonelli, B. Ballarin, L. Guadagnini, A. Mignani and E. Scavetta, "A novel potentiometric sensor for l-ascorbic acid based on molecularly imprinted polypyrrole," *Electrochimica Acta*, vol. 56, pp. 7149–7154, 2011.
- [56] G. Zandomenighi, M.R.H. Krebs, M.G. McCammon and M. Fändrich, "FTIR reveals structural

differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils,” *Protein Science*, vol. 13, pp. 3314–3321, 2009.

[57] N. Su, “Improving electrical conductivity, thermal stability, and solubility of polyaniline-polypyrrole nanocomposite by doping with anionic spherical polyelectrolyte brushes,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 10, pp. 4–12, 2015.

[58] N. Su, H.B. Li, S.J. Yuan, S.P. Yi and E.Q. Yin, “Synthesis and characterization of polypyrrole doped with anionic spherical polyelectrolyte brushes,” *Express Polymer Letters*, vol. 6, no. 9, pp. 697–705, 2012.

[59] R.D. Munje, S. Muthukumar, B. Jagannath and S. Prasad, “A new paradigm in sweat based wearable diagnostics biosensors using Room Temperature Ionic Liquids (RTILs),” *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 1–12, 2017.

[60] Z. Sepehri, H. Bagheri, E. Ranjbari, M. Amiri-Aref, S. Amidi, M.R. Rouini and Y.H. Ardakani, “Simultaneous electrochemical determination of isoniazid and ethambutol using poly-melamine/electrodeposited gold nanoparticles modified pre-anodized glassy carbon electrode,” *Ionics*, vol. 24, pp. 1253–1263, 2018.

[61] N. Karimian, M. Vagin, M.H.A. Zavar, M. Chamsaz, A.P.F. Turner and A. Tiwari, “An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 50, pp. 492–498, 2013.

[62] R. Malhotra, V. Patel, J.P. Vaqu e, J.S. Gutkind and J.F. Rusling, “Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 3118–3123, 2010.

[63] F. Esfandi, S. Mohammadzadeh Ghobadloo and G. Basati, “Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer,” *Cancer Letters*, vol. 244 pp. 76–78, 2006.

[64] J. Gong, X. Miao, H. Wan and D. Song, “Facile synthesis of zirconia nanoparticles-decorated graphene hybrid nanosheets for an enzymeless methyl parathion sensor,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 162 pp. 341–347, 2012.

[65] J.N. Nirmala, A. Kumaravel and M. Chandrasekaran, “Stearic acid modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of parathion and methyl parathion,” *Journal of Applied Electrochemistry*, vol. 40, pp.1571–1574, 2010.

[66] H.L. Tcheumi, I.K. Tonle, E. Ngameni and A. Walcarius, “Electrochemical analysis of methylparathion pesticide by a gemini surfactant-intercalated clay-modified electrode,” *Talanta*, vol. 81 pp. 972–979, 2010.

[67] X. Tian, L. Liu, Y. Li, C. Yang, Z. Zhou, Y. Nie and Y. Wang, “Nonenzymatic electrochemical sensor based on CuO-TiO₂ for sensitive and selective detection of methyl parathion pesticide in ground water,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 256, pp. 135–142, 2018.

[68] L. Zhao, F. Zhao and B. Zeng, “Electrochemical determination of methyl parathion using a molecularly imprinted polymer-ionic liquid-graphene composite film coated electrode,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 176, pp. 818–824, 2013.

[69] N. Gao, C. He, M. Ma, Z. Cai, Y. Zhou, G. Chang, X. Wang and Y. He, “Electrochemical co-deposition synthesis of Au-ZrO₂-graphene nanocomposite for a nonenzymatic methyl parathion sensor,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 1072, pp. 25–34, 2019.

- [70] Z. Wang, B. Ma, C. Shen and L.Z. Cheong, "Direct, selective and ultrasensitive electrochemical biosensing of methyl parathion in vegetables using Burkholderia cepacia lipase@MOF nanofibers-based biosensor," *Talanta*, vol. 197, pp. 356–362, 2019.
- [71] G.H.S. Rodrigues, C.M. Miyazaki, R.J.G. Rubira, C.J.L. Constantino and M. Ferreira, "Layer-by-layer films of graphene nanoplatelets and gold nanoparticles for methyl parathion sensing," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 2, pp. 1082–1091, 2019.
- [72] J. Gong, L. Wang and L. Zhang, "Electrochemical biosensing of methyl parathion pesticide based on acetylcholinesterase immobilized onto Au-polypyrrole interlaced network-like nanocomposite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 2285–2288, 2009.
- [73] T.H.V. Kumar and A.K. Sundramoorthy, "Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites," *Analytica Chimica Acta*, vol. 74, pp. 131–141, 2019.
- [74] R. Xue, T.F. Kang, L.P. Lu and S.Y. Cheng, "Immobilization of acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides," *Applied Surface Science*, vol. 258, pp. 6040–6045, 2012.