

# ELEKTROCHEMICZNA DETEKcja INTERLEUKINY-6 NA PODŁOŻU NANOTUBULARNYM DITLENKU TYTANU

KATARZYNA ARKUSZ\*, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK\*

ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
UNIwersYTET ZIELONOGÓRSKI,  
UL. LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GÓRA  
\* E-MAIL: K.ARKUSZ@IBEM.UZ.ZGORA.PL,  
E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

## Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie elektrochemicznych biosensorów do wykrywania obecności prozapalnej cytokiny, interleukiny 6 (IL-6), w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (phosphate buffered saline PBS). Do tego celu wykorzystano nowe, modyfikowane powierzchniowo warstwy nanorurek ditlenku tytanu (TNT - titania nanotubes) wytworzone w procesie anodowania folii tytanu w roztworze glikolu etylenowego. Warstwy TNT poddano obróbce termicznej poprzez wyżarzanie w atmosferze argonu i funkcjonalizowano przez bezpośrednią immobilizację przeciwciał cytokiny IL-6 na ich powierzchni metodą nakrapiania. Oznaczenie stężenia IL-6 w roztworze PBS badano za pomocą dwóch typów biosensorów elektrochemicznych: impedancyjnego i amperometrycznego, wykorzystując oddziaływanie pomiędzy ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IL-6 i antygenem IL-6. Działanie biosensora impedancyjnego polegało na określeniu zmian wartości pojemności elektrycznej warstwy powierzchniowej (a równocześnie kąta przesunięcia fazowego jej charakterystyki impedancyjnej) na skutek powstawania kompleksu antygen-przeciwciało IL-6. Do wykrywania antygenu IL-6 w biosensorze amperometrycznym zastosowano natomiast przeciwciało IL-6 skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP). Limity detekcji IL-6 opracowanych biosensorów wynoszące 5 pg/ml są znacznie niższe od limitu detekcji w obecnie stosowanych testach immunoenzymatycznych ELISA (25 pg/ml). Zarówno korzystne właściwości adsorpcyjne i dobre przewodnictwo elektryczne materiału podłoża biosensorów, umożliwiające zastosowanie bezpośredniej immobilizacji substancji biologicznych, jak i stosowane dwie metody elektrochemiczne: impedancyjna oraz amperometryczna sprawiają, że opracowana metoda detekcji cytokin jest szybka, tania, selektywna i czuła.

**Słowa kluczowe:** nanorurki ditlenku tytanu, IL-6, biosensor elektrochemiczny

[Inżynieria Biomateriałów 125 (2014) 21-29]

# ELECTROCHEMICAL DETECTION METHOD FOR INTERLEUKIN-6 ON TITANIA NANOTUBE PLATFORMS

KATARZYNA ARKUSZ\*, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK\*

BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION,  
UNIVERSITY OF ZIELONA GORA,  
LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GORA, POLAND  
\* E-MAIL: K.ARKUSZ@IBEM.UZ.ZGORA.PL,  
E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

## Abstract

Sensitive electrochemical biosensors for determination of proinflammatory cytokine Interleukin-6 are elaborated. They are based on novel and surface modified layers of titania nanotubes (TNT) formed by anodization of titanium foil in ethylene glycol solution. The TNT layers were thermally improved by annealing in argon and functionalized for biosensing by direct immobilization of biological reagents on their surfaces with the simple drop technique. Strong antibody-antigen interaction was used in two types of electrochemical biosensors: the impedimetric and the amperometric to detect the IL-6 concentrations in phosphate buffered solutions (PBS). The impedimetric biosensor determines changes of capacitance values due to the formation of IL-6 antibody-antigen complex on biosensor platform. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibodies are used to detect IL-6 antigen in the amperometric biosensor. Two novel electrochemical methods allow to detect 5 pg/ml of IL-6 in PBS solution, which is below detection limit 25 pg/ml in currently used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. The favorable adsorption and electrical conductance properties of the platform material, which allow the direct immobilization of biological substances on its surface and give the possibility to apply two electrochemical techniques: the impedimetric and the amperometric one, ensure the elaborated cytokine detection methods to be fast, inexpensive, selective and sensitive.

**Keywords:** titania nanotubes, IL-6, electrochemical biosensor

[Engineering of Biomaterials 125 (2014) 21-29]

Poszukiwanie nowych sposobów immobilizacji oraz materiałów matryc ma kluczowe znaczenie dla rozwoju nowych typów biosensorów. Badania biosensorów stosowanych w technologii żywności, inżynierii genetycznej i ochronie środowiska [1-3] wskazują, że oddziaływanie pomiędzy warstwą a elementem biologicznym czujnika wpływa szczególnie na jego najbardziej pożądane cechy - selektywność i czułość. Detekcja jest zazwyczaj oparta na interakcji: przeciwciało-antygen, lektyna-glikoproteina i hormon-receptor. Jeżeli takim oddziaływaniu towarzyszy obecność centrum redoks, to jego występowanie może być odzwierciedlone ilościowo poprzez zmianę prądu elektrycznego w reakcji elektrochemicznej [4,5].

W prezentowanych badaniach wykorzystanie elektrody z warstwą nanorurek tlenku tytanu umożliwiło opracowanie czulego i jednocześnie prostego immunobiosensora, łatwego w użyciu w ośrodkach diagnostyki medycznej.

Liczne prace badawcze [6-8] wskazują na zwiększoną ekspresję interleukiny 6 (IL-6) i/lub jej receptorów krwiotwórczych w metabolizmie kości, chorobach zapalnych, patogenezie i progresji nowotworu. W szczególności, wzrost jej stężenia obserwuje się w przypadkach nowotworu macicy, płuc, okrężnicy, nerek, piersi i jajników. Zwykle jej poziom jest skorelowany z wielkością guza i jego rozmieszczeniem [7-8]. To sugeruje, że IL-6 może funkcjonować jako ważny czynnik regulujący w obrębie mikrośrodowiska stanu zapalnego. W związku z powyższym, ekspresja IL-6 koreluje z angiogenezą, podczas szoku septycznego i przerzutów nowotworów.

Obecne metody wykrywania IL-6 są oparte na teście ELISA. W ostatnim czasie, badacze [9-13] zaproponowali nowe metody wykrywania IL-6 z zastosowaniem biosensorów opartych na różnych podłożach (np. powierzchnia ZnO/SiO<sub>2</sub>/Si, 3-aminopropylomodyfikowane szkło porowate, wielofunkcyjne nanopory). Chociaż osiągnięto szeroki zakres wykrywania IL-6 (0,01 fg/ml ÷ 1000 pg/ml), to przy modyfikacji platform tych czujników biologicznych stosowano skomplikowane procesy unieruchomienia przeciwciała. Ponadto, wszystkie proponowane biosensory oparto na kosztownych metodach detekcji: optycznej i akustycznej, a w tych przypadkach samo przygotowanie próbki jest czasochłonne.

Warstwy TNT utworzone na folii tytanu po modyfikacji termicznej wykazują dostateczną przewodność elektryczną i odpowiednie właściwości adsorpcyjne wobec różnych cząsteczek biologicznych, dzięki czemu stanowią odpowiednie podłoże bioczuJNIKA. Właściwości nanorurek tlenku tytanu: duża powierzchnia właściwa, wysoka bioaktywność in vitro [14], zdolność do kolonizacji bakterii [15] oraz immobilizowania enzymów i przeciwciał [16-19] czynią je szczególnie użytecznymi platformami do detekcji elektrochemicznej. Ponadto, wytwarzanie TNT przez anodowanie w roztworze kwasu ortofosforowego eliminuje tendencję biocząsteczek do rozwarstwiania, co często występuje na powierzchni materiałów aktywnych biologicznie. Poza tym ich ujemny potencjał stacjonarny w roztworze PBS (roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami) i SBF (sztuczny płyn fizjologiczny) umożliwiają bezpośrednie unieruchomienie kationowych składników biologicznych w wyniku zakłóceń elektrostatycznych. Nanorurki tlenku tytanu nie dezaktywują białek immobilizowanych na ich powierzchni [14], a właściwości warstwy mogą być modyfikowane poprzez wyżarzanie w kontrolowanej atmosferze, która polepsza przewodność i zwilżalność matrycy [20,21]. Niektórzy badacze [22-24] wykorzystujący Ti/TNT jako platformy biosensora uzyskują bardzo obiecujące rezultaty.

The investigation of new methods of immobilization and application of novel materials are crucial in the development of new biosensors. Studies on new biosensors applied in food technology, biotechnology, genetic engineering and environmental control [1-3] revealed that the connection between the layer and the biological element of the sensor influences significantly its selectivity and sensitivity. Detection is usually based on antibody-antigen, lectin-glycoprotein or receptor-hormone interaction. If such interaction is accompanied by the presence of the redox center, its occurrence can be reflected quantitatively by a change of an electric current in an electrochemical reaction, being called shortly the electrochemical detection [4,5].

In present studies, we have developed a sensitive, and simple immunosensor to detect IL-6 cytokine using titanium dioxide nanotube-based nanoelectrode for easy use in point-of-care diagnostics.

Several works [6-8] showed recently the increased expression of interleukin 6 (IL-6) and/or its receptors in hematopoiesis, bone metabolism, inflammatory responses, pathogenesis and cancer progression. Particularly, the increased level of IL-6 is observed in uterus, lung, colon, kidney, breast and ovarian cancers. Usually its level is correlated with the tumor size and staging [7-8]. It suggests that IL-6 may function as a significant regulatory factor within the inflammatory microenvironment. Accordingly, IL-6 expression correlates with the angiogenesis, the course of septic shock and metastasis of tumors.

Current methods for detection of IL-6 are based on the ELISA tests. Recently, some authors [9-13] have proposed the detection of IL-6 with the use of biosensors based on different substrates (i.e. ZnO/SiO<sub>2</sub>/Si surface, 3-aminopropylmodified controlled-pore glass, multifunctional nanoparticles). Although, the wide range of detection IL-6 (0.01 fg/ml ÷ 1000 pg/ml) was reached, the platforms of these biosensors were modified by difficult processes to immobilize antibodies. Moreover, all proposed biosensors were based on expensive detection methods: acoustic, optical, also time-consuming with regard to samples preparation.

TNT layers formed on titanium foil after thermal modification show sufficient electrical conductivity and appropriate adsorptive properties towards different biomolecules, making them ready Ti/TNT analytical systems for many types of biosensing. Properties of titania nanotubes: the high surface-to-volume ratio and bioactivity in vitro [14], the ability to colonize bacteria [15] and immobilize enzymes and antibodies [16-19], make them particularly useful platforms for electrochemical detection. Moreover, the fabrication of TNT by anodizing in phosphate solutions eliminates the tendency of biomolecules delamination that occurs prevalently in the bioactive coating of inorganic material. Their negative stationary potential in the PBS (phosphate buffered saline) and the SBF (simulated body fluid) solutions enable direct immobilization of cationic biological components due to electrostatic interference. Titania nanotubes do not inactivate proteins immobilized on their surface [14] and properties can be modified by annealing in controlled atmosphere, which improves conductivity and wettability [20,21]. Some works [22-24] on using Ti/TNT as the biosensor platforms are very promising.

Celem badań było opracowanie elektrochemicznej metody oznaczania prozapalnej cytokiny – Interleukiny 6 wykorzystując do tego modyfikowaną warstwę nanorurek tlenku tytanu, formowanych metodą anodowania na folii tytanowej. Warstwę TNT poddano modyfikacji cieplnej polegającej na wyżarzaniu w atmosferze argonu oraz funkcjonalizacji przez bezpośrednią immobilizację substancji biologicznych w celu uzyskania impedancyjnego i amperometrycznego sygnału odpowiedzi na obecność IL-6 o różnych stężeniach w roztworze PBS. W pracy podjęto próbę opracowania dwóch nowych, elektrochemicznych metod detekcji IL-6, charakteryzujących się niższym limitem detekcji niż stosowane obecnie testy ELISA oraz stanowiących prostą i tanią metodę analityczną.

## Materiały i metody

Folia tytanowa (grubość 0,5 mm, czystość 99,99%), glikol etylenowy ( $C_2H_6O_2$ , czystość 99,8%), chlorek amonu ( $NH_4F$ , 99,5%), bufor fosforanowy (PBS, 0,01 M, pH 7,4) i peroksydaza chrzanowa (HRP, nr kat. 77332) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (UK). Zestawy ELISA Kit IL-6 (ELH-IL6-001) nabyto w firmie RayBiotech (USA) i przechowywano w temperaturze 4°C w celu zabezpieczenia ich przed denaturacją. Do przygotowania matrycy biosensorów zastosowano przeciwciała monoklonalne (MAb) interleukiny IL-6, w przypadku biosensora amperometrycznego także przeciwciała monoklonalne skoniugowane z HRP [25-27].

Wszystkie pomiary elektrochemiczne: anodowanie folii tytanowej, pomiar potencjału stacjonarnego (OCP), elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS), voltamperometria cykliczna (CV) prowadzono przy użyciu potencjostatu/galwanostatu AutoLab PGSTAT 302N (Eco Chemie, Utrecht, Holandia), wyposażonego w wzmacniacz napięcia (30V), w standardowym układzie trójelektrodowym, w którym elektrodę roboczą stanowiła próbka tytanu pokryta warstwą nanorurek Ti/TNT, elektrodę odniesienia - standardowa elektroda chlorosrebrowa  $Ag/AgCl$  ( $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V), a elektrodę pomocniczą - folia platyny. Badania prowadzono w temperaturze  $25 \pm 2^\circ C$ .

### Przygotowanie warstw TNT

Warstwy TNT formowano poprzez anodowanie folii tytanowej w 85% roztworze glikolu etylenowego (50 ml), z dodatkiem 0,6% wag.  $NH_4F$ . Roztwory sporządzono z odczynników: glikol etylenowy,  $NH_4F$  i wody dejonizowanej, charakteryzujących się wysoką czystością. Parametry anodowania wyznaczono stosując model matematyczny [28] opracowany przez autorów, umożliwiający wytworzenie warstwy TNT o grubości  $1000 \pm 50$  nm i średnicy  $50 \pm 5$  nm. Uzyskane warstwy wyżarzano w atmosferze argonu w temperaturze  $550^\circ C$  przez 2 godziny z szybkością narastania temperatury  $30^\circ C/min$ .

### Pomiar potencjału stacjonarnego w obwodzie otwartym (OCP) Ti/TNT

Wyżarzane i niewyżarzane próbki Ti/TNT zanurzone w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) oraz wartości OPC mierzone w czasie 1800 sekund.

### Funkcjonalizacja przygotowanej matrycy biosensora

Do immobilizacji przeciwciał L-6 na matrycy biosensora wykorzystano prostą metodę nakraplania. Modyfikowane termicznie próbki Ti/TNT inkubowano w 10  $\mu l$  roztworu przeciwciał anti-IL-6 w czasie 30 minut, a następnie zanurzano w 10  $\mu l$  roztworach antygenu IL-6 o różnych stężeniach, w zakresie od 0 do 2500 pg/ml. Pomiędzy etapami inkubacji próbki dokładnie przepłukiwano roztworem buforowym (3 $\times$ 100  $\mu l$ ) w celu usunięcia niezwiązanych lub związanych nieswoiście cząsteczek biologicznych.

In this work authors aimed at elaboration of the electrochemical method of determination the proinflammatory cytokine Interleukin-6 on surface modified layers of titania nanotubes (TNT) formed by anodization of titanium foil. Thermal improvement by annealing in argon and functionalization by simple immobilization of biological reagents have been applied to obtain the impedimetric and the amperometric response in order to evaluate the IL-6 concentrations in PBS solutions. Two novel electrochemical methods have been aimed at elaborating the electrochemical method to detect lower concentration of IL-6 than being obtained in currently used ELISA tests, by simple and cheap diagnostic method.

## Materials and Methods

Titanium foil (thickness 0.5 mm, 99.99% trace metal basis), ethylene glycol ( $C_2H_6O_2$ , 99.8%), ammonium chloride ( $NH_4F$ , 99.5%), phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4) and horseradish peroxidase (HRP, no. 77332) were purchased from Sigma-Aldrich (UK). The ELISA kits for human IL-6 (ELH-IL6-001) protein were purchased from RayBiotech (USA) and stored at 4°C to eliminate any potential denaturation of the protein structures. The monoclonal (MAb) antibodies that make up the sandwich assay pair in the human Interleukin-6 (IL-6) were used in the detection scheme for impedimetric biosensor, whereas the monoclonal (MAb) IL-6 antibodies conjugated with HRP [25-27] were used in detection scheme for amperometric biosensor.

All electrochemical processes and measurements: the anodizing of titanium foil, the open circuit potential (OCP), recording and the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) scans as well as the cyclic voltammetry (CV) tests were performed the AutoLab PGSTAT 302N potentiostat/galvanostat (Eco Chemie, Utrecht, the Netherlands), equipped with voltage multiplier (30 V) in the standard three-electrode configuration with titanium and Ti/TNT electrode as the working electrode, the standard  $Ag/AgCl$  silver chloride electrode ( $E_{Ag/AgCl} = 0.222$  V) as the reference electrode, and a platinum foil as the auxiliary electrode at  $25 \pm 2^\circ C$ .

### Preparation of the TNT layers

TNT layers were formed by anodizing titanium foil in ethylene glycol solution with the addition of  $NH_4F$ . The foil was polarized up to 17 V and then kept at that potential in the same electrolyte for further 3750 s. Anodizing parameters were determined using the mathematical meta-model [28] elaborated by authors to obtain the TNT layer with thickness of  $1000 \pm 50$  nm and TNTs diameter of  $50 \pm 5$  nm. The obtained layers were annealed in argon at  $550^\circ C$  for 2 h with the heating rate of  $30^\circ C/min$  to the desired annealing temperature.

### Evaluation of the open circuit potential (OCP) of Ti/TNT

The annealed and non-annealed the Ti/TNT samples were immersed in PBS solution (0.01 M, 50 ml, pH 7.4) and the OPC values were recorded for 1800 s.

### Functionalization of TNT layers with IL-6

Simple drop coating method was used to immobilize the IL-6 cytokine on biosensor platform. Thermally modified Ti/TNT samples were incubated with 10  $\mu l$  of anti-IL-6 standard solution for 30 min and then treated with 10  $\mu l$  of IL-6 antigen solutions of various concentration ranging from 0 to 2500 pg/ml. Between incubation steps the samples were carefully washed-up with a buffer solution (3 $\times$ 100  $\mu l$ ) to remove unbound or non-specifically bound biomolecules. The whole immobilization procedure was carried at room temperature.

Skuteczność immobilizacji oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Całą procedurę immobilizacji przeprowadzono w temperaturze  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### Analiza mikroskopowa warstw Ti/TNT

Analizę mikroskopową próbek wyżarzonych i nie modyfikowanych termicznie przeprowadzono przy użyciu Skaningowego Mikroskopu Elektronowego z Emisją Polową JEOL JSM 7600F.

### Charakterystyka i pomiary elektrochemiczne

Odpowiedź opracowanego biosensora amperometrycznego sprawdzono metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze PBS (0.01 M, 10 ml, pH 7,4) w zakresie potencjału  $-0,8 \pm 0,2$  V vs. Ag/AgCl z szybkością skanowania 0,05 V/s. Odpowiedź biosensora impedancyjnego sprawdzono metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Elektrochemiczną analizę impedancyjną przeprowadzono w zakresie częstotliwości od 100 kHz do 0,1 Hz (10 punktów/dekadę), z zerowym potencjałem DC, amplitudą sygnału AC 10 mV oraz czasem zdwojenia 10 s.

## Wyniki i dyskusja

### Analiza mikroskopowa matrycy Ti/TNT

Na RYS. 1a przedstawiono warstwę nanorurek z ditlenku tytanu otrzymaną metodą anodowania zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Warstwę o grubości  $1000 \text{ nm} \pm 100 \text{ nm}$  tworzą jednorodne nanorurki o średnicy  $50 \pm 5 \text{ nm}$ . Obrazy SEM przedstawiają otwarte od góry, zamknięte od dołu, zorientowane pionowo nanorurki o budowie jednorodnej, pokrywające całą powierzchnię folii tytanu. Nie zaobserwowano uszkodzeń warstwy TNT po procesie wyżarzania (RYS. 1b).

### Potencjał stacjonarny Ti/TNT

Krzywe OCP (RYS. 2) obrazują stabilne wartości potencjału zarejestrowane w czasie 1800 sekund. Nieznaczne oscylacje prądowe widoczne na krzywych OCP mogą świadczyć o przebiegających reakcjach utleniania i redukcji warstw ditlenku tytanu w roztworze. Wyżarzanie w atmosferze argonu powoduje podwyższenie wartości  $E_{\text{cor}}$  w porównaniu z wartościami  $E_{\text{cor}}$  próbek nie poddanych modyfikacji termicznej. Przesunięcie potencjału korozyjnego w kierunku wartości dodatnich jest korzystne dla immobilizacji substancji biologicznych na powierzchni matrycy biosensora, gdyż większość protein i białek, reszty aminokwasowe (np. w HRP) i ludzkie przeciwciała w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) wykazują ładunki ujemne.

### Microscopy analysis of Ti/TNT platforms

The morphologies of annealed and non-annealed samples were examined with a Field Emission Scanning Electron Microscope JEOL JSM 7600F.

### Electrochemical characterization and tests

Cyclic voltammetry tests (CV) for prepared amperometric immunosensor were carried out in PBS (0.01 M, 10 ml, pH 7.4) for potential ranging from  $-0.8 \pm 0.2$  V vs. Ag/AgCl with scan rate 0.05 V/s. The response of impedimetric immunosensor was characterized using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) method. Electrochemical impedance analysis was carried out over a frequency range from 100 kHz to 0.1 Hz (10 points per decade), at zero DC potential, with an AC amplitude of 10 mV and the integration time of 10 s.

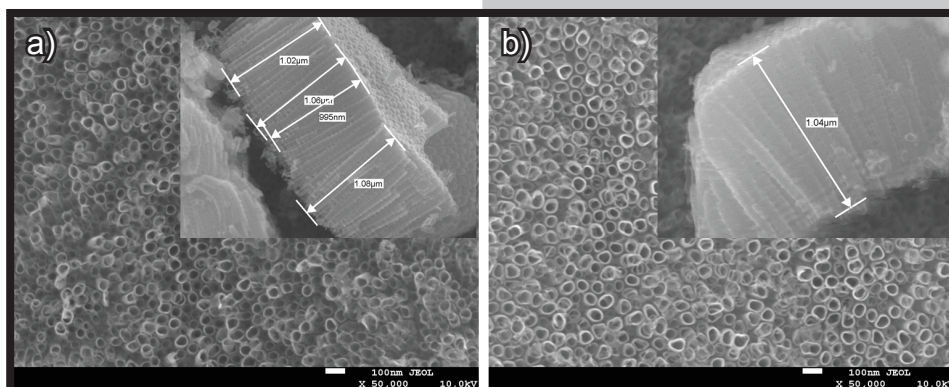
## Results and Discussions

### Microscopy analysis of Ti/TNT platforms

As it can be seen in FIG. 1 the TNT obtained by anodizing according to the applied parameters (described in “Materials and Methods”) formed a uniform  $1000 \pm 100 \text{ nm}$  thick layer of vertically aligned nanotubes (FIG. 1a) with diameter about  $50 \pm 5 \text{ nm}$ . SEM images show arrays of opened from the top, closed at the bottom and vertically oriented, regular nanotubes covering the titanium foil completely. No damage was observed on TNT layer after annealing (FIG. 1b).

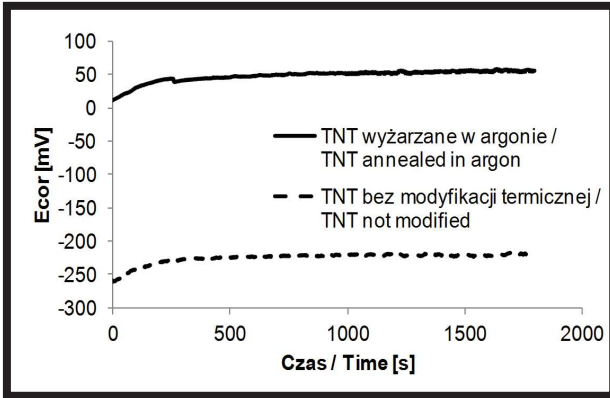
### Evaluation of open circuit potential of Ti/TNT

The OCP (Open Circuit Potential) curves (FIG. 2) show stable values of potential recorded during 1800 s. Small current oscillations seen on OPC curves for TNT formed in ethylene glycol electrolyte may suggest ongoing oxidation and metastable nature of nanotubular oxide layers. Annealing in argon causes the increase of the OCP value ( $E_{\text{cor}} = 55.1 \text{ mV}$ ) for Ti/TNT layers comparing to the OCP value for non-annealed samples ( $E_{\text{cor}} = -220.1 \text{ mV}$ ). Shift of the *corrosion potentials* to more *positive values is favorable for the immobilization of biomolecules* on the biosensor platform, because the amino acid residues (e.g. HRP) and human antibodies exhibit negative charges in PBS (0.01 M, 50 ml, pH 7.4). The negatively charged protein molecules are easily pulled to the positive matrix of biosensor by direct physical adsorption, which results from weak electrostatic or van der Waals interaction [25].



RYS. 1. Obrazy SEM warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego (a), po modyfikacji termicznej w argonie (b).

FIG. 1. SEM top-view and cross-sectional images of TNT formed in ethylene glycol (a) and thermally modified in argon (b).



**RYS. 2.** Wykres przebiegu zmian potencjału korozyjnego ( $E_{cor}$ ) warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego (linia przerywana), wyżarzonych w atmosferze argonu (linia ciągła) rejestrowane w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) w czasie 1800 s.

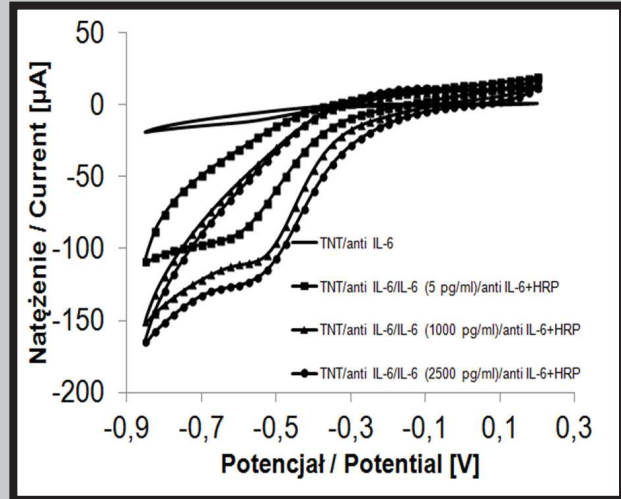
**FIG. 2.** Corrosion potential values ( $E_{cor}$ ) of TNT formed in ethylene glycol (dotted line) and annealed in argon (solid line) measured in PBS (0.01 M, 50 ml, pH 7.4) for 1800 s.

Ujemnie naładowane cząsteczki białkowe są z łatwością elektrostatycznie związane przez dodatnio naładowaną matrycę biosensora w procesie adsorpcji fizycznej na skutek słabych oddziaływań elektrostatycznych lub sił van der Waalsa [25].

### Elektrochemiczna charakterystyka amperometrycznego biosensora IL-6

Do wykrywania cytokiny IL-6 w roztworze PBS wykorzystano jedno z najsilniejszych i najbardziej specyficznych wiązań biologicznych pomiędzy przeciwciałem i antygenem. W celu detekcji amperometrycznej interleukiny IL-6, modyfikowane termicznie próbki Ti/TNT inkubowano w 10  $\mu$ l roztworze przeciwciała anti-IL-6 w czasie 1800 sekund, zanurzono w 10  $\mu$ l objętości roztworów zawierających antygeny IL-6 o stężeniach w zakresie od 0 do 2500 pg/ml, a następnie poddawano inkubacji wtórnej w roztworze przeciwciała IL-6 skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP). Pomiar metodą woltamperometrii cyklicznej przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Otrzymane woltamogramy (RYS. 3) ilustrują typowe piki odpowiadające przeniesieniu elektronu w reakcji redoks jonów żelaza peroksydazy chrzanowej HRP.

Przedstawione na RYS. 3 piki katodowe pojawiają się przy potencjalne -0,55 V (vs. Ag/AgCl), charakterystycznym dla redukcji żelaza w grupie hemowej enzymu HRP, w której transport elektronów zachodzi przez redukcję Fe (III) do Fe (II). Często centrum redoks enzymu ukryte jest wewnątrz dużych cząsteczek białka, z dala od powierzchni elektrody. Biorąc pod uwagę niskie wartości współczynnika dyfuzji i prawdopodobieństwo denaturacji kompleksu enzym/białko zaadsorbowanego na powierzchni elektrody, odpowiednie połączenie centrów redoks z powierzchnią elektrody jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za czułość i prawidłowe działanie biosensorycznych enzymatycznych. Pokrywające tytan nanorurki posiadają szczególną właściwość adsorbowania białek, a przez to zapewniają dobry kontakt elektryczny, co zostało udowodnione w niniejszych badaniach.



**RYS. 3.** Krzywe woltamperometryczne dla warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego, wyżarzonych w atmosferze argonu, rejestrowane w roztworze 0.01 M PBS (linia ciągła) z dodatkiem ludzkiej IL-6 o różnych stężeniach (5÷2500 pg/ml) w zakresie -0,8÷0,2 V (vs.  $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V), z szybkością skanowania 0.05 V/s.

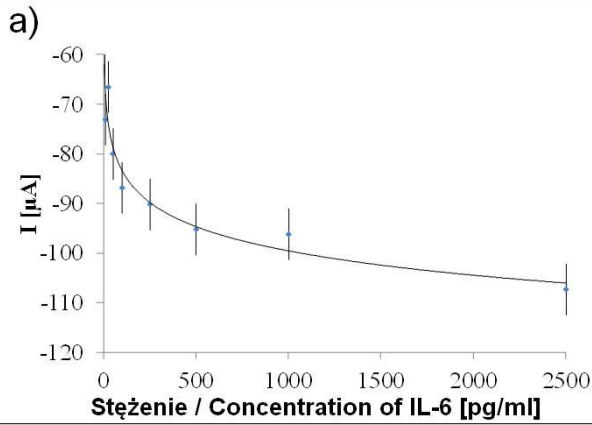
**FIG. 3.** Cyclic voltammograms of TNT formed in ethylene glycol and annealed in argon recorded in 0.01 M PBS (solid line) containing human IL-6 of various concentration (5÷2500 pg/ml) in potential range -0.8÷0.2 V (vs.  $E_{Ag/AgCl} = 0.222$  V), with scan rate 0.05 V/s.

### Electrochemical characteristics of the IL-6 amperometric biosensor

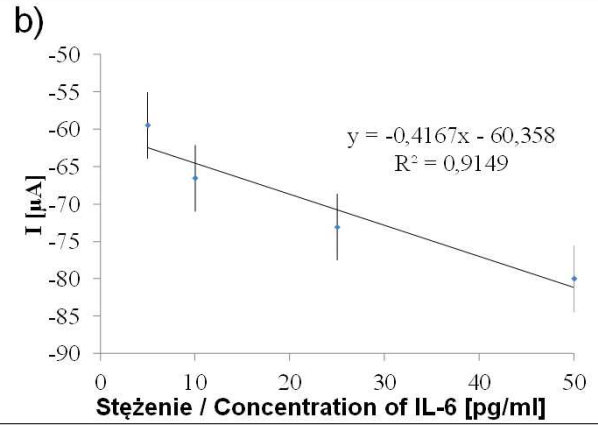
To detect the IL-6 cytokine in PBS solution, the antibody-antigen interaction, one of the strongest and the most specific biological binding was used in the elaboration of the analytical procedures and the preparation of biosensors platforms. For the purpose of amperometric detection of IL-6 thermally modified Ti/TNT samples were incubated with 10  $\mu$ l of anti-IL-6 standard solution for 1800 s and then treated with 10  $\mu$ l solutions containing IL-6 antigen of various concentration ranging from 0 to 2500 pg/ml, followed by the incubation of secondary IL-6 antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP). Cyclic voltammetry tests (CV) were performed according to the applied parameters (1.5). The obtained peaks (FIG. 3) correspond to the typical electron transfer achieved through the Fe(III) to Fe(II) redox reaction [1].

The reduction peaks appear at -0.55 V (vs. Ag/AgCl). Very often the metal redox center, i.e. the iron heme group in HRP enzyme in which the electron transfer can be achieved through the Fe(III) to Fe(II) redox reaction, are hidden inside large molecules of protein and located far away from the electrode surface. Considering the low values of diffusion coefficient and possible denaturation of enzyme/protein complex adsorbed on the electrode surface, the electrical communication of the metal redox centers with electrode surface is a key factor in the elaboration of enzymatic biosensors. The metal/semiconductor nanotubes systems own this special feature of the effective electrical contact and electron-transfer reaction with electrodes, as has been proved in our investigation.

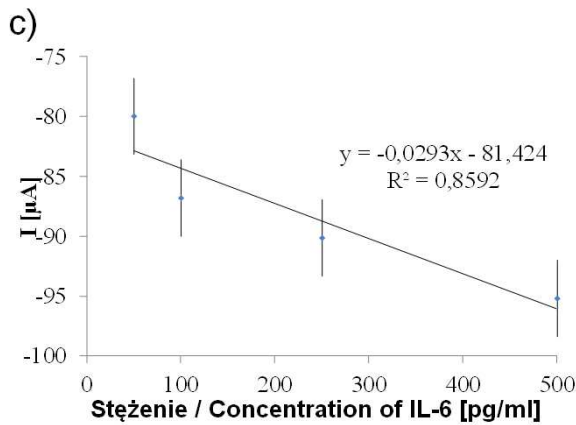
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷2500 pg/ml



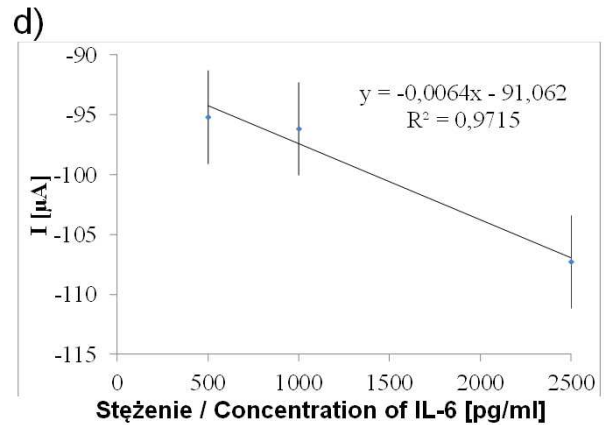
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷50 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 50÷500 pg/ml

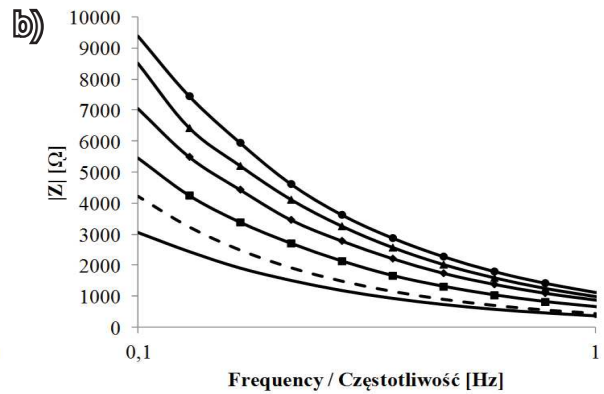
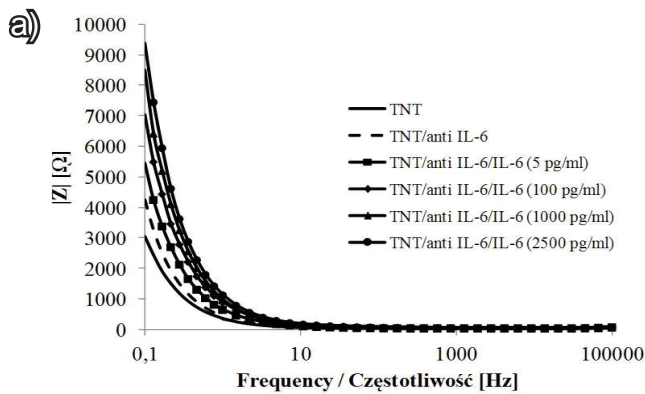


Zakres stężeń / Concentration range: 500÷2500 pg/ml



RYS. 4. Krzywe kalibracyjne biosensora amperometrycznego opartego na sfunkcjonalizowanej przeciwciałami IL-6 warstwie TNT, modyfikowanej termicznie w atmosferze argonu. Wartości prądu katodowego dla wartości potencjału  $-0,55$  V rejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, pH 7,4) względem elektrody chlorosrebrowej ( $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V) z szybkością skanowania 0,05 V/s.

FIG. 4. IL-6 calibration curves obtained by the amperometric biosensor-based anti-IL-6 immobilized onto TNT. Cathodic current values were measured at  $-0,55$  V in PBS solution (0.01 M, pH 7.4) vs.  $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V with scan rate 0.05 V/s.



RYS. 5. Wykresy Bode rejestrowane dla różnych stężeń IL-6 zarejestrowane przy użyciu biosensora impedancyjnego opartego na matrycy TNT na którą immobilizowano przeciwciała IL-6. Widma zarejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) w zakresie częstotliwości 0.1 –  $10^5$  Hz (a) i 0.1 – 1 Hz (b), z amplitudą 10 mV względem elektrody chlorosrebrowej ( $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V).

FIG. 5. Bode plot of various concentration of IL-6 measured using the impedimetric biosensor based on anti-IL-6 immobilized onto TNT. Spectra were recorded in the PBS solution (0.01 M, 10 ml, pH 7.4) over the frequency range 0.1 –  $10^5$  Hz (a), and 0.1 – 1 Hz (b) with amplitude 10 mV vs.  $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V.

Zależność natężenia prądu od stężenia IL-6 przedstawiono na RYS. 4 w postaci dwóch krzywych kalibracyjnych. Ze względu na szeroki zakres stężeń (5÷2500 pg/ml IL-6) krzywe kalibracyjne na RYS. 4a charakteryzują się nieliniowym przebiegiem. W celu uzyskania krzywych o charakterze liniowym cały zakres został podzielony na mniejsze części na podstawie istotnych klinicznie stężeń IL-6. Krzywe kalibracyjne (RYS. 4b,c,d) wskazują, że przygotowane platformy charakteryzują się wysoką czułością z limitem detekcji IL-6 wynoszącym 5 pg/ml.

### **Elektrochemiczne charakterystyka biosensora impedancyjnego IL-6**

Warstwy TNT sfunkcjonalizowane przeciwciałami IL-6 poddano badaniom metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Odpowiedź impedancyjnego biosensora można przedstawić za pomocą dwóch metod: wykresów Bode lub wykresu Nyquista. Więcej informacji widocznych jest w ujęciu częstotliwościowym, dlatego też autorzy zdecydowali przedstawić wyniki przeprowadzonych pomiarów w reprezentacji Bode. RYS. 5a przedstawia krzywe kalibracyjne dla biosensora impedancyjnego, dla stężenia ludzkiej IL-6 cytokiny w zakresie od 0 do 2500 pg/ml w reprezentacji Bode, ilustrującej zależność modułu impedancji  $|Z|$  w funkcji częstotliwości. Najniższą wartość modułu impedancji  $|Z|$  ( $\sim 3 \times 10^3 \Omega$ ) odnotowano dla warstwy TNT (średnica 50 nm, grubość 1000 nm) wyżarzanej w argonie. Wraz ze wzrostem stężenia IL-6 wzrasta wartość modułu impedancji, co jest wynikiem formowania kompleksów antygen-przeciwciała. Zdolność do wiązania przeciwciał anti-IL-6 na TNT i powstawanie kompleksu antygen-przeciwciała zweryfikowano przez technikę EIS.

Uzyskane krzywe kalibracyjne (RYS. 6) są zależne od oddziaływań zachodzących pomiędzy antygenem IL-6 i ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IL-6 z badaną powierzchnią. Limit detekcji uzyskany dzięki pomiarom impedancyjnym wynosi 5 pg/ml. Dla porównania, wyniki testu IL-6 ELISA wykazują limit detekcji na poziomie 25 pg/ml, czyli 5 razy większy, niż uzyskany w niniejszej pracy.

Dotychczas opracowano wiele metod detekcji IL-6, np. za pomocą takich jak: metoda biosensora akustycznego [9], metoda amperometrycznego testu immunologicznego [10], metoda impedancyjnego testu immunologicznego [11], metoda testu immunoenymatycznego (ELISA) [29], technologia powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana [30]. Pomimo licznych zalet powyższych metod, wiele z nich cechuje się skomplikowaną preparatyką i warunkami pomiaru, koniecznością użycia zaawansowanego sprzętu, ograniczoną czułością, czasochłonnością i kosztownością. Do tej pory nie podjęto próby zastosowania nanorurek tlenku tytanu w roli platformy immunosensora służącego detekcji ludzkiej IL-6 opartego na bezpośredniej immobilizacji substancji biologicznych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że matryca Ti/TNT może być platformą biosensora impedancyjnego. Krzywe kalibracyjne dla tego biosensora obejmują stężenia antygenu IL-6 o limicie detekcji wynoszącym 5 pg/ml, co jest odpowiednikiem poziomu fizjologicznego w ludzkiej krwi (poniżej 5 pg/ml) i 2500 pg/ml, co odpowiada stanom patologicznym.

The dependence of current on the concentration of human IL-6 is presented in FIG. 4 by two calibration curves. Due to the wide concentration range (5÷2500 pg/ml of IL-6) the calibration curve in FIG. 4a shows a non-linear character. To obtain a linear calibration curve the whole range was divided into smaller sections based on the clinically important concentrations of IL-6. The calibration curves (FIG. 4b,c,d) presented by a linear regression indicate that the prepared platforms were sensitive to the presence of IL-6 in PBS solution with a detection limit of 5 pg/ml. Good reproducibility was observed during detection of IL-6 with the developed biosensor based on TNT layer as a platform.

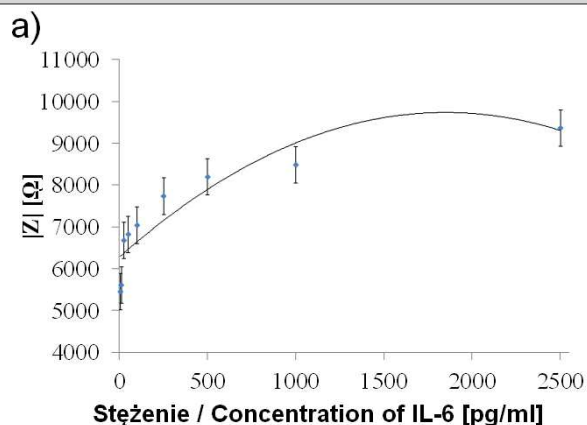
### **Electrochemical characteristics of the IL-6 impedimetric biosensor**

The sequential immobilization of the TNT electrodes with the anti-IL-6 and human-IL-6 antigen was used to detect the IL-6 cytokine with the electrochemical impedance spectroscopy method according to the applied parameters (described in “Materials and Methods”). The response of an impedimetric biosensor can be viewed two different ways: via the Bode plot or via the Nyquist diagram. More information is available on plotting the frequency response, so the authors have decided to present the results of measurement on Bode plots. FIG. 5a shows the impedimetric responses of the biosensor electrode for various concentrations (0÷2500 pg/ml) of human IL-6 cytokine in the Bode representation, where the logarithm of the absolute impedance  $|Z|$  is plotted against the logarithm of the excitation frequency. In FIG. 5b the lowest value of the absolute impedance  $|Z|$  ( $\sim 3 \times 10^3 \Omega$ ) was recorded for TNT layer (diameter of 50 nm, thickness of 1000 nm) annealed in argon. The absolute impedance  $|Z|$  increases gradually with the increase of IL-6 concentration due to the formation of antigen-antibody complexes. Here, the binding ability of anti-IL-6 onto TNT, and formation of antibody-antigen complex were verified through the EIS technique.

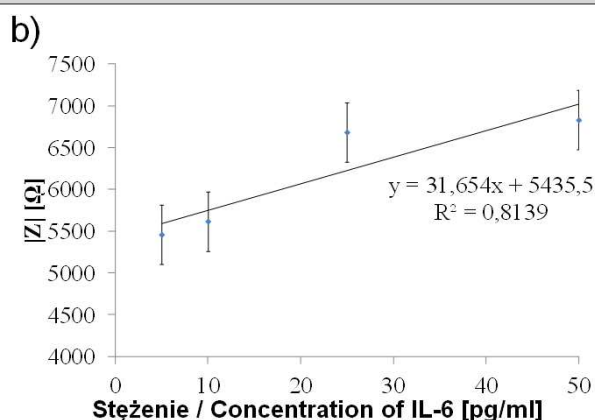
The obtained calibration curves (FIG. 6), prepared similarly as the calibration curves for amperometric detection of IL-6, prove the quantitative interaction between anti-IL-6 and human-IL-6 antigen on the applied sensing surface. The evaluated limit of detection obtained in the impedimetric measurements is 5 pg/ml. For comparison, results from the IL-6 ELISA kit show a detection limit of 25 pg/ml, which is about 5 times higher than the one obtained by our direct detection method.

Several methods have been developed for the detection of IL-6, such as: acoustic wave biosensor [9], amperometric immunoassay [10], impedimetric immunoassay [11], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [29], surface enhanced Raman scattering technology [30]. Despite many advantages of these methods, some of them have drawbacks such as complicated preparing and performing the measurements, complicated equipment, limited sensitivity, impractical time and expense. No attempt, to date, was made to use titania nanotubes as a platform for electrochemical immunosensor to detect the human IL-6 based on direct immobilization of biomolecules. Performed research confirms that Ti/TNT matrix can be used as a platform for impedimetric biosensor. The presented results include the concentrations of IL-6 antigen between the detection limit of 5 pg/ml, which is equivalent to the physiological level in human blood (less than 5 pg/ml) and 2500 pg/ml corresponding to pathological states.

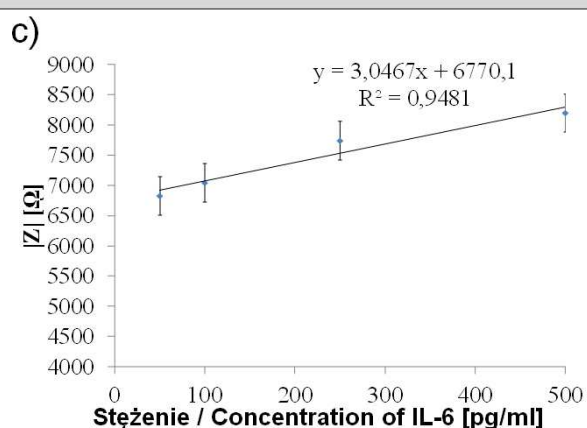
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷2500 pg/ml



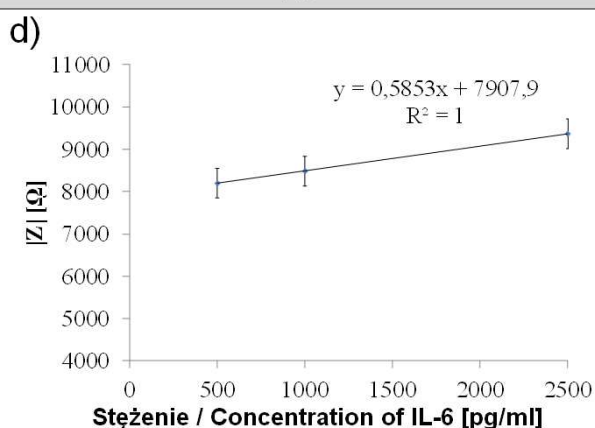
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷50 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 50÷500 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 500÷2500 pg/ml



RYS. 6. Krzywe kalibracyjne biosensora impedancyjnego opartego na sfunkcjonalizowanej przeciwciałami IL-6 warstwie TNT, modyfikowanej termicznie w atmosferze argonu. Wartości modułu impedancji dla częstotliwości 0,1 Hz rejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, pH 7,4) względem elektrody chlorosrebrowej ( $E_{Ag/AgCl} = 0,222$  V).  
 FIG. 6. IL-6 calibration curves obtained by the impedimetric biosensor-based anti-IL-6 immobilized onto TNT. Impedance modulus were measured at 0.1 Hz in PBS solution (0.01 M, pH 7.4) vs.  $E_{Ag/AgCl} = 0.222$  V.

## Wnioski

Badania dotyczące warstw nanorurek tytanowych wytworzonych w roztworze glikolu etylenowego (85% glikolu etylenowego + 0,6% wag.  $NH_4F$ ), wyżarzanych w atmosferze argonu, a następnie wykorzystanych jako platforma biosensorów do oznaczania stężenia cytokiny IL-6 w roztworze PBS, potwierdzają skuteczną immobilizację przeciwciał i antygenów IL-6 w obszarach powierzchniowych. Warstwy te wykorzystano w detekcji IL-6 metodami elektrochemicznymi. Wyniki badań wykazały, że opracowane biosensory: amperometryczny i impedancyjny są czułe na obecność IL-6, a limit detekcji w roztworze PBS wynosi 5 pg/ml.

## Podziękowania

Katarzyna Arkusz dziękuje Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wsparcie uzyskane w ramach projektu Diamentowy Grant: „Opracowanie elektrochemicznego biosensora do wykrywania wybranych cytokin na podłożu  $Ti/TiO_2$ ”, 2011-2013.

## Conclusions

Studies on titania nanotubes formed in ethylene glycol solution (85% ethylene glycol + 0.6% wt.  $NH_4F$ ) and annealed in argon and used as biosensor for the IL-6 cytokine confirmed the effective immobilization of anti-IL-6 and human IL-6 antigen on their surface. The results of this study showed that the developed two biosensors: the amperometric and the impedimetric were sensitive to detect the presence of the IL-6 in the PBS solution with the detection limit of 5 pg/ml.

## Acknowledgments

Katarzyna Arkusz acknowledges the support by the Ministry of Science and Higher Education in the Diamond Grant project “Electrochemical biosensor based on  $Ti/TiO_2$  platform for detection of selected cytokines”, 2011-2013.



## Piśmiennictwo

- [1] Sassolas A., Prieto-Simón B., Marty J.L.: Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American Journal of Analytical Chemistry* 3 (2012) 210-232.
- [2] Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., John Quinn J., Chakraborty T., O'Kennedy R.: Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, Review, *Enzyme and Microbial Techn* 32 (2003) 3-13.
- [3] Brian Bohunicky B., Shaker A Mousa S., Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, Review, *Nanotechnology, Science and Applications* 4 (2011) 1-10.
- [4] Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I.: Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Analytica Chimica Acta* 400, 1-3 (1999) 91-108.
- [5] Freire R.S., Pessoa C.A., Mello L.D., Kubota L.T.: Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *J. Braz. Chem. Soc* 14 (2003) 230-43.
- [6] Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.: The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (2011) 878-888.
- [7] Heikkila K., Ebrahimb S., Lawlor D.A.: Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *European Journal of Cancer* 44 (2008) 937-945.
- [8] Guo Y., Xu F., Lu T.J., Duan Z., Zhang Z.: Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews* 38 (2012) 904-910.
- [9] Krishnamoorthy S., Iliadis A.A., Beic T., Chrousos G.P.: An interleukin-6 ZnO/SiO<sub>2</sub>/Si surface acoustic wave biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 313-318.
- [10] Kapoor R., Wang C.W.: Highly specific detection of interleukin-6 (IL-6) protein using combination tapered fiber-optic biosensor dip-probe. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 2696-2701.
- [11] Wang G., Huang H., Zhang G., Zhang X., Fang B., Wang L.: Dual Amplification Strategy for the Fabrication of Highly Sensitive Interleukin-6 Amperometric Immunosensor Based on Poly-Dopamine. *Langmuir* 27, 3 (2011) 1224-1231.
- [12] Joo J., Kwon D., Yim C., Jeon S.: Highly Sensitive Diagnostic Assay for the Detection of Protein Biomarkers Using Microresonators and Multifunctional Nanoparticles. *Acsnano* 6, 5 (2012) 4375-4381.
- [13] Yanga T., Wanga S., Jin H., Baoa W., Huang S., Wang J.: An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. *Sensors and Actuators B* 178 (2013) 310-315.
- [14] Xiao P., Zhang Y., Garcia B.B., Sepehri S., Liu D., Cao G.: Nanostructured Electrode with Titania Nanotube Arrays: Fabrication, Electrochemical Properties, and Applications for Biosensing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2008) 1-11.
- [15] Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G.: Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 8 (2008) 2043-2081.

## References

- [16] Guo C.X., Hu F.P., Li C.M., Shen P.K.: Direct electrochemistry of hemoglobin on carbonized titania nanotubes and its application in a sensitive reagentless hydrogen peroxide biosensor. *Biosens Bioelectron* 24 (2008) 819.
- [17] Mubarak A., Muhammad N.T., Zuzanna S., Reinhard N., Wolfgang T., Ensinger W.: Hydrogen peroxide sensing with horseradish peroxidase-modified polymer single conical nanochannels. *Anal Chem* 83 (2011) 1673.
- [18] Zhang J.D., Oyama M.: A hydrogen peroxide sensor based on the peroxidase activity of hemoglobin immobilized on gold nanoparticles-modified ITO electrode. *Electrochim Acta* 50 (2004) 85.
- [19] Degani R., Heller A.: Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-aminooxidase. *J Am Chem Soc* 110 (1998) 2615.
- [20] Yang B., Ng C.K., Fung M.K., Ling C.C., Djuric A.B., Fung S.: Annealing study of titanium oxide nanotube arrays. *Materials Chemistry and Physics* 130 (2011) 1227-1231.
- [21] Xiao P., Liu D., Garcia B.B., Sepehri S., Zhang Y., Cao G.: Electrochemical and photoelectrical properties of titania nanotube arrays annealed in different gases. *Sensors and Actuators B* 134 (2008) 367-372.
- [22] Wang J.: Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130 (2005) 421-426.
- [23] Valentini F., Palleschi G.: Nanomaterials and analytical chemistry. *Analytical Letters* 41 (2008) 479-520.
- [24] Viticoli M., Curulli A., Cusma A., Kaciulis S., Nunziante S., Pandolfi L., Valentini F., G. Padeletti G.: Third-generation biosensors based on TiO<sub>2</sub> nanostructured films. *Materials Science and Engineering C* 5-7 (2006) 947-951.
- [25] Ruzgasa T., Csöregib E., Emnéusb J., Gorton L.: Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta* 330, 2-3 (1996) 123-138.
- [26] Ferapontova E., Dominguez E.: Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: effect of surface charges. *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 127-130.
- [27] Wang L., Wang E.K.: A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode. *Electrochem Commun* 6 (2004) 225.
- [28] Krasicka-Cydzik E., Arkusz K., Kaczmarek A.: A mathematical model for selection of formation parameters of TiO<sub>2</sub> nanotube by anodizing. *Engineering of Biomaterials* 15, 114 (2012) 34-40.
- [29] Turner C.K., Blieden T.M., Smith T.J., Feldon S.E., Foster D.C., Sime P.J., Phipps R.P.: A novel ELISpot method for adherent cells. *J. Immunol. Methods* 291 (2004) 63-70.
- [30] Wang Y.L., Salehi M., Schutz M., Rudi K., Schlucker S.: Determination of Multiresidual Fungicides in Environmental Water Samples by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analyst*, 138 (2013) 1764-1771.