

طراحی زیست حسگر برای شناسایی IL-6 به عنوان نشانگر التهابی با استفاده از سطوح همه‌گریز

سید امیرحسین جوادی^۱، سید خلیل پسته‌ای^۲، صادق بیژنی‌شریف^۳، سپیده خداپرست^۴*

۱- گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ضایعات مغزی و نخاعی، پژوهشکده بازتوانی عصبی، مجتمع

بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه بیهوشی، دانشکده پزشکی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- پژوهشکده علوم اعصاب، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- مرکز تحقیقات ضایعات مغزی و نخاعی، پژوهشکده علوم اعصاب، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*صندوق پستی: ۱۴۱۹۷۳۳۱۴۱، تهران، ایران

sh.arab@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹

چکیده

اینترلوکین-۶ (IL-6) یکی از سایتوکین‌های کلیدی با نقش دوگانه در فرایندهای التهابی و ضدالتهابی است که در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، تمایز سلولی و آسیب‌های بافتی نقش مهمی دارد. افزایش سطح IL-6 در سرم می‌تواند شاخص بروز اختلالاتی نظیر عفونت‌های مزمن، سرطان، بیماری‌های خودایمنی و آلزایمر باشد. با وجود پیشرفت در آزمون‌های مبتنی بر ELISA، این روش‌ها همچنان پرهزینه، زمان‌بر و نیازمند حجم بالای نمونه‌های زیستی هستند. در این پژوهش، یک زیست‌حسگر نوین مبتنی بر سطوح همه‌گریز (Omniphobic) با الهام از ساختارهای زیستی طراحی شد که در آن آنتی‌بادی ضد IL-6 به صورت یکنواخت با استفاده از چاپ افشان‌های بر روی لایه‌ای از پلی‌متیل متاکریلات (PMMA) پوشش داده شده با فلئوروسیلان تثبیت شد. برای بهبود پایداری و کاهش جذب غیراختصاصی، لایه‌ای از مایع لغزنده زیست‌سازگار به سطح افزوده شد. نتایج نشان داد که حسگر طراحی شده قادر به شناسایی IL-6 در غلظت‌های بسیار پایین (حد تشخیص ۲/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) حتی در خون کامل انسان است.

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

ویژگی اختصاصی بالا، پاسخ خطی گسترده و تکرارپذیری مناسب، این سامانه را به گزینه‌ای مؤثر برای تشخیص سریع و حساس عوامل التهابی تبدیل می‌کند.

کلید واژگان: اینترلوکین-۶، سطوح همه‌گریز، پلی متیل متاکریلات، فلئوروسیلان، چاپ افشانه‌ای، زیست‌حسگر

۱-مقدمه

فرایند التهاب از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر آسیب‌های سلولی و عفونت‌ها است. یکی از شاخص‌ترین مولکول‌های تنظیم‌کننده در این فرایند، اینترلوکین-۶ (IL-6) است که هم به‌عنوان سایتوکین پیش‌التهابی و هم ضدالتهابی عمل می‌کند [۴-۱]. سطح IL-6 در سرم بیماران مبتلا به سپسیس، سرطان، بیماری‌های خودایمنی و اختلالات عصبی، افزایش قابل توجهی دارد [۵ و ۶]. بنابراین، پایش غلظت IL-6 می‌تواند ابزار تشخیصی و پیش‌آگهی مهمی در تعیین شدت و مرحله بیماری‌های التهابی محسوب شود.

روش‌های متداول سنجش IL-6 عمدتاً مبتنی بر آزمون‌های ایمنونوسوربنت آنزیمی (ELISA) هستند. با وجود دقت بالا، این آزمون‌ها به زمان طولانی، حجم زیاد نمونه و تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته نیاز دارند [۷ و ۸]. در سال‌های اخیر، توسعه‌ی زیست‌حسگرها به‌عنوان جایگزینی سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر برای روش‌های سنتی مورد توجه قرار گرفته است. در میان انواع زیست‌حسگرها، استفاده از سطوح الهام‌گرفته از طبیعت با ویژگی‌های آب‌گریزی و همه‌گریزی^۱ موجب افزایش انتخاب‌پذیری، کاهش آلودگی سطحی و بهبود پایداری عملکرد حسگر شده است [۹-۱۱].

پلی متیل متاکریلات^۲ (PMMA) به‌دلیل شفافیت نوری، زیست‌سازگاری و قابلیت اصلاح سطحی، یکی از

بسترهای مناسب برای طراحی حسگرهای زیستی به‌شمار می‌رود [۱۲]. در این پژوهش، از PMMA پوشش‌داده شده با فلئوروسیلان به‌عنوان بستر اصلی و از چاپ افشانه‌ای آنتی‌بادی ضد IL-6 به‌منظور ایجاد الگوی دقیق اتصال استفاده شد. پس از تثبیت آنتی‌بادی، لایه‌ای از مایع لغزنده زیست‌سازگار^۳ بر روی سطح قرار گرفت تا از جذب غیراختصاصی پروتئین‌های سرمی جلوگیری شود و حساسیت حسگر افزایش یابد.

هدف از این مطالعه، طراحی و ارزیابی یک پلتفرم زیست‌حسگر همه‌گریز با کارایی بالا برای شناسایی IL-6 در نمونه‌های خون انسان است که بتواند به‌عنوان روشی سریع، دقیق و قابل توسعه در کاربردهای تشخیصی استفاده شود.

با توجه به مأموریت تخصصی مرکز تحقیقات ضایعات مغزی و نخاعی در زمینه مطالعه و درمان آسیب‌های سیستم عصبی، شناسایی زودهنگام و دقیق نشانگرهای التهابی مانند، IL-6 از اهمیت بالایی برخوردار است. افزایش سطح این سایتوکین در بیماران مبتلا به آسیب‌های نخاعی و سکت‌های مغزی با تشدید التهاب عصبی و پیش‌آگهی ضعیف‌تر همراه است. بنابراین، توسعه حسگرهای سریع و حساس برای پایش IL-6 نه تنها در تشخیص، بلکه در مدیریت درمان و پیگیری پاسخ به مداخلات درمانی در این مرکز می‌تواند نقش کلیدی ایفا کند.

^۱Omniphobic Surfaces

^۲ Poly(methyl methacrylate)

^۳ Perfluoropolyether

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد و تجهیزات

در این پژوهش از پلی متیل متاکریلات (PMMA, Sigma-) به عنوان بستر پلیمری استفاده شد. فلئوئوروسیلان پرفلوئورو دسیل تری اتوکسی سیلان^۱ (Aldrich, USA) به عنوان بستر پلیمری استفاده شد. فلئوئوروسیلان پرفلوئورو دسیل تری اتوکسی سیلان^۱ (Sigma-Aldrich) برای ایجاد خاصیت همه‌گیزی و افزایش پایداری سطح استفاده شد. آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IL-6 (Human Anti-IL-6, Abcam, Cat# ab6672) و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با بیوتین (Abcam, Cat# ab97218) در غلظت‌های مشخص شده در ادامه‌ی کار استفاده شد. مایع لغزنده‌ی زیست‌سازگار از نوع پرفلوئورپلی‌اتر^۲ (PFPE, Solvay, Italy) با ویسکوزیته ۶۰ سانتی‌پویز انتخاب شد. تجهیزات اصلی شامل دستگاه چاپ افشانه‌ای (Dimatix DMP-2850, Fujifilm, Japan)، سیستم پلاسم (Diener Zepto, Germany) و میکروسکوپ فلورسانس (Olympus BX53, Japan) استفاده شد.

۲-۲ آماده‌سازی بستر پلیمری

صفحات PMMA به ابعاد ۷۵×۲۵ میلی‌متر برش داده شدند و با اتانول ۷۰ در صد به مدت ۵ دقیقه شسته و در جریان هوای فیلتر شده خشک شدند. سپس، به مدت ۹۰ ثانیه تحت تیمار پلاسم با گاز دی‌اکسیدکربن (CO₂) در فشار ۰/۳ تور و توان ۵۰ وات قرار گرفتند تا گروه‌های عاملی فعال (کربوکسیل و هیدروکسیل) روی سطح ایجاد شود.

سپس، سطوح تیمار شده در محلول ۲ درصد فلئوئوروسیلان در هگزان غوطه‌ور و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه واکنش داده شدند. صفحات پس از شست‌وشو با هگزان و خشک کردن در آن ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، به عنوان سطح پایه برای چاپ آنتی‌بادی آماده شدند.

۲-۳ چاپ و تثبیت آنتی‌بادی ضد IL-6

آنتی‌بادی ضد IL-6 در بافر فسفات (PBS, pH=7.4) با غلظت نهایی ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. فرایند چاپ با استفاده از چاپگر افشانه‌ای Dimatix در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵ در صد انجام شد. فاصله بین نقاط چاپی ۱۰۰ میکرومتر و حجم هر قطره ۱۰ پیکولیتتر تنظیم شد.

پس از چاپ، صفحات در محیط مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند تا اتصال فیزیکی و جزئی کووالانسی بین گروه‌های فعال سطح و آنتی‌بادی برقرار شود. سپس، نمونه‌ها با PBS شسته و در دمای اتاق خشک شدند.

۲-۴ افزودن لایه لغزنده

برای کاهش جذب غیراختصاصی پروتئین‌های سرمی، سطح چاپ شده با ۸۰ میکرولیتر از مایع لغزنده PFPE پوشانده شد. پس از ۵ دقیقه، مایع اضافی با پیت برداشته و سطح در دمای اتاق خشک شد. این فرایند منجر به ایجاد لایه‌ای پایدار از روان‌کننده بین سطح و محیط نمونه شد که مانع چسبندگی غیراختصاصی می‌شود.

۲-۵ آزمون شناسایی آنتی‌ژن IL-6

برای آزمون عملکرد حسگر، محلول‌های استاندارد IL-6 با غلظت‌های ۲/۵ تا ۲۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS حاوی یک دهم درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد به سطح چاپ شده افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد.

پس از دو مرحله شست‌وشو با بافر شست‌وشوی WB1 و یک بار با WB2، آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیل (۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول افزوده و به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد، مولکول استرپتاویدین کونژوگه با فلوروفور (Streptavidin-EGFP) افزوده شد و پس از

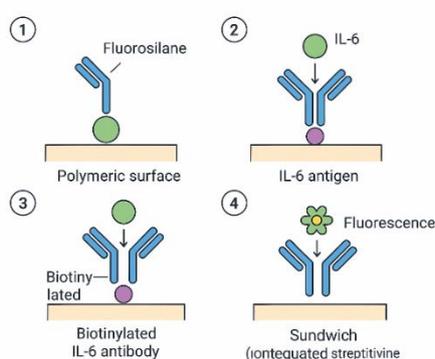
^۱ Perfluoropolyether^۲ 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltriethoxysilane

برای ارزیابی پایداری زیست-حسگر، نمونه‌ها پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۱۴ روز مورد آزمون قرار گرفتند. شدت سیگنال فلورسانس نسبت به روز صفر اندازه‌گیری و درصد کاهش آن محاسبه شد (جدول ۱ و ۲)، (شکل ۱ و ۲).

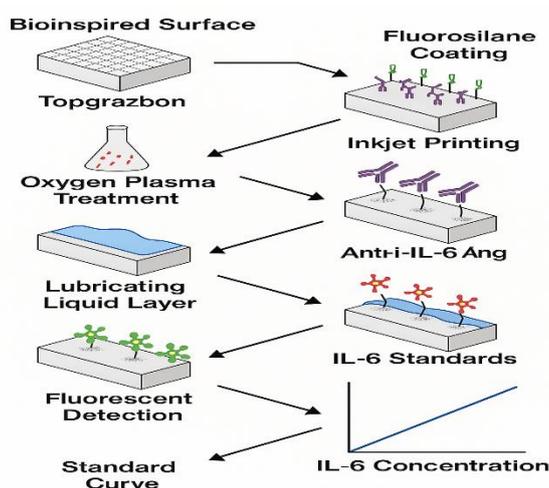
انکو باسیون ۳۰ دقیقه‌ای، سیگنال فلورسانس با میکروسکوپ در طول موج ۵۰۵ نانومتر ثبت شد.

۲-۶ ارزیابی ویژگی اختصاصی و پایداری

برای بررسی ویژگی اختصاصی (Specificity)، آزمون مشابهی در حضور سیتوکین‌های $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ با غلظت مشابه $IL-6$ انجام شد. پاسخ سیگنال در هر مورد اندازه‌گیری و با آزمون آماری t مقایسه شد.



شکل ۱ مراحل تولید نور فلورسنت در آزمون ایمنی ساندویچی برای شناسایی $IL-6$. ۱) آماده‌سازی و پوشش‌دهی سطح پلیمری با فلوروسیلان و تثبیت ضدبادی ضد $IL-6$. ۲) اتصال اختصاصی آنتی‌ژن $IL-6$ به آنتی‌بادی تثبیت شده است. ۳) افزودن آنتی‌بادی دوم بیوتینیل‌ه و تشکیل کمپلکس ساندویچی. ۴) اتصال مولکول فلورسنت به بیوتین و ارائه دهنده نوری برای شناسایی و اندازه‌گیری



شکل ۲ نمودار شماتیک فرایند تثبیت آنتی‌بادی ضد $IL-6$ و شناسایی آن روی سطح پلیمری تیمار شده. ابتدا سطح پلیمری با فلوروسیلان پوشش داده و با پلاسما (اکسیژن یا CO_2) تیمار شد. سپس، آنتی‌بادی به روش چاپ افشان‌های روی سطح تثبیت شد. پس از افزودن لایه لغزنده، نمونه‌های استاندارد $IL-6$ اضافه شده و اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی انجام شد. با استفاده از آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیل‌ه و آشکار ساز فلورسنت، واکنش نهایی ثبت و شدت فلورسنت برای رسم منحنی استاندارد و تخمین حد تشخیص اندازه‌گیری شد.

جدول ۱ مراحل آماده‌سازی و تثبیت آنتی‌بادی ضد IL-6 روی سطح پلیمری

مرحله	توضیحات فنی	مواد/شرایط
۱	تهیه صفحات پلیمری با ساختار زیستی	صفحات PMMA
۲	پوشش دهی با فلوروسیلان	داخل دکانتور، واکنش سطحی
۳	تیمار با گاز	پلازما اکسیژن/CO ₂
۴	انتقال به چاپگر افشانه‌ای	دستگاه چاپ دقیق
۵	چاپ آنتی‌بادی ضد IL-6	۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در PBS
۶	انکوباسیون شبانه	در محفظه مرطوب
۷	قرار گرفتن در مجاورت آنتی‌ژن کوئزوگه	بررسی اتصال اختصاصی
۸	شست‌وشو و افزودن رنگ	بافر TBS، در چند مرحله

جدول ۲ مراحل سنجش و تهیه منحنی استاندارد IL-6

مرحله	فعالیت	شرایط/ملاحظات
۱	رقیق‌سازی ذخیره IL-6	۲۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر (S1)
۲	تهیه رقت‌های سری	S8-S2 با PBS + BSA ۰/۰۱
۳	افزودن مایع لغزنده	۵۰-۱۰۰ ماکرولیتر، حذف با پیت
۴	افزودن استاندارد	۱۰۰ ماکرولیتر، انکوباسیون ۱ ساعته
۵	شست‌وشو	۲ بار با WB1 و ۱ بار با WB2
۶	افزودن آنتی‌بادی بیوتین‌بسته	۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱ ساعت
۷	افزودن نشانگر فلورسنت	انکوباسیون ۳۰ دقیقه
۸	خوانش فلورسنت	کانال EGFP، ۱۰ ms
۹	رسم منحنی استاندارد	LOD = S8 + ۲×SD میانگین

۷-۲ تکرارپذیری و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism 9 تحلیل شدند و میانگین \pm انحراف معیار (SD) گزارش شد. منحنی استاندارد بر اساس رابطه‌ی شدت فلورسانس در برابر غلظت IL-6 ترسیم شد و ضریب همبستگی (R^2) محاسبه شد. حد تشخیص^۱ (LOD) با فرمول میانگین سیگنال شاهد به‌علاوه دو برابر انحراف معیار آن تعیین شد.

۳-نتایج

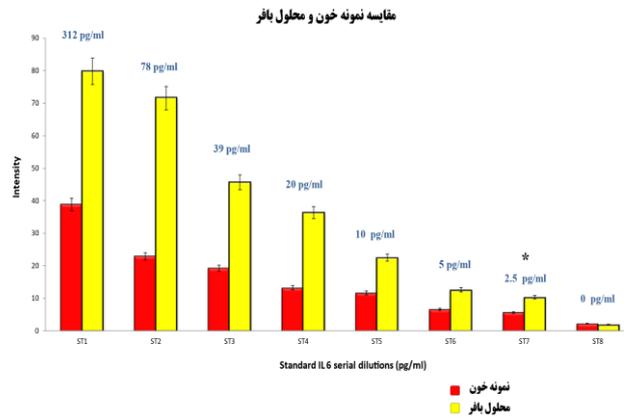
۳-۱ بررسی عملکرد حسگر زیستی در غلظت‌های

مختلف IL-6

برای ارزیابی پاسخ حسگر در محدوده‌ی وسیع غلظتی، نمونه‌های استاندارد IL-6 در بازه‌ی ۲/۵ تا ۲۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر مورد آزمون قرار گرفتند. افزایش تدریجی شدت فلورسانس متناسب با افزایش غلظت IL-6 مشاهده شد. این روند نشان‌دهنده‌ی وابستگی خطی پاسخ حسگر به غلظت آنتی‌ژن است. منحنی استاندارد بر اساس میانگین شدت فلورسانس سه تکرار مستقل ترسیم شد و ضریب همبستگی ($R^2 = 0.993$) نشان‌دهنده‌ی دقت و یکنواختی عملکرد حسگر است (نمودار ۱).

^۱ Limit of Detection

۲-۳ حد تشخیص (LOD)



نمودار ۱ حداقل غلظت به دست آمده مقدار ۲/۵ پیکوگرم در میلی لیتر

جدول ۳ جدول مقایسه‌ای روش حاضر با دیگر مطالعات

منبع	روش	حد تشخیص (pg/mL)	نوع بستر	ویژگی اختصاصی
-	پژوهش حاضر	۲/۵	PMMA فلئوروسیلان شده با لایه لغزنده	بالا
[۱۳]	ELISA کلاسیک	۵-۱۰	پلی استایرن	بالا
[۱۴]	نوار جانبی نقره‌ای	۵	نیتروسولوز	متوسط
[۱۵]	نوار فلورسانس کوانتومی	۲/۶۵	غشا QD-LFA	بالا

نیست ($p > 0.05$). این امر بیانگر پایداری و قابلیت اطمینان عملکرد حسگر در ماتریس‌های زیستی پیچیده است. در نمونه‌های خون کامل، کاهش اندک شدت سیگنال ناشی از اثرات ماتریسی خون (جذب غیراختصاصی پروتئین‌ها و فلئورسانس زمینه‌ای) بود که با استفاده از لایه‌ی لغزنده PFPE تا حد زیادی کاهش یافت (نمودار ۲).

۴-۳ ارزیابی ویژگی اختصاصی (Specificity)

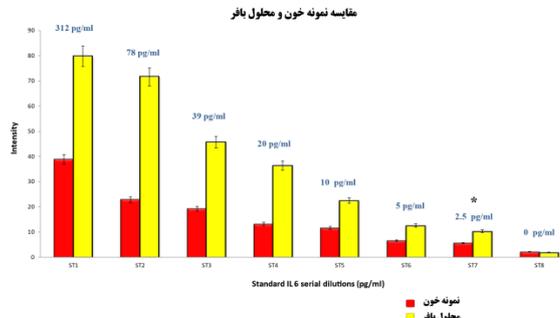
برای بررسی اختصاصی بودن عملکرد حسگر، پاسخ سیستم در حضور سیتوکین‌های $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ در غلظت‌های مشابه (۱۰۰ پیکوگرم بر میلی لیتر) بررسی شد. شدت سیگنال ثبت شده در حضور این مولکول‌ها به ترتیب ۹ در صد و ۱۲ در صد از سیگنال حاصل از $IL-6$ بود که

بر اساس داده‌های کنترل منفی و غلظت‌های پایین استاندارد، حد تشخیص با استفاده از میانگین سیگنال نمونه‌ی صفر به علاوه دو برابر انحراف معیار آن محاسبه شد. مقدار LOD برابر با ۲/۵ پیکوگرم بر میلی لیتر به دست آمد که نسبت به بسیاری از روش‌های مرجع (از جمله ELISA کلاسیک) با LOD حدود ۵ پیکوگرم بر میلی لیتر بهبود چشمگیری نشان می‌دهد (جدول ۳).

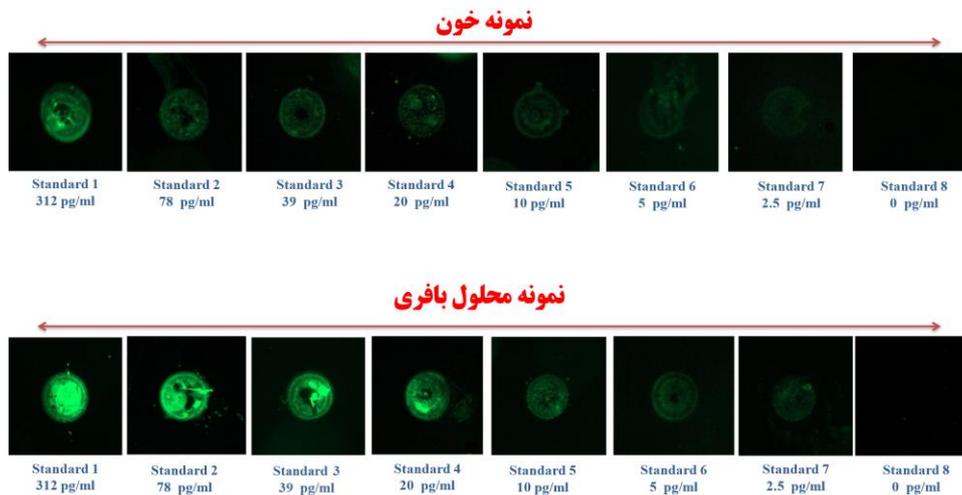
۳-۳ مقایسه عملکرد حسگر در خون کامل و نمونه بافر

برای بررسی کارایی حسگر در محیط‌های زیستی واقعی، آزمون در دو نوع نمونه شامل خون کامل انسان و محلول بافری حاوی $IL-6$ انجام شد. نتایج نشان داد که اگرچه شدت فلورسانس در نمونه‌های خون کامل اندکی کمتر از نمونه‌های بافری بود، تفاوت آن از نظر آماری معنی‌دار

تفاوت معنی دار آماری ($p < 0.01$) را نشان داد. این نتایج حاکی از اختصاصیت بالای آنتی بادی تثبیت شده روی سطح حسگر نسبت به IL-6 و نبود واکنش متقاطع قابل توجه با سایر سایتوکین ها است (شکل ۳).



نمودار ۲ حداقل غلظت به دست آمده مقدار ۲/۵ پیکوگرم در میلی لیتر



شکل ۳ مقایسه مقدار آنتی بادی در دو نمونه خون کامل و نمونه محلول بافری حاوی آنتی بادی

نشانه دهنده یکنواختی عملکرد و قابلیت بازتولید بالای سامانه است.

۳-۶ مقایسه عددی با مطالعات مشابه

جدول ۱ مقایسه ای از نتایج این پژوهش با سایر روش های گزارش شده در منابع علمی را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، حد تشخیص حسگر حاضر نسبت به برخی روش های موجود از جمله آزمون نوار جانبی نقره ای (۵ پیکوگرم بر میلی لیتر) و نوار فلورسانس کوانتومی

۳-۵ ارزیابی پایداری و تکرارپذیری

برای بررسی پایداری عملکرد حسگر، نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پاسخ فلورسانس در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ اندازه گیری شد. کاهش سیگنال در پایان روز چهاردهم کمتر از ۸ درصد بود که نشان دهنده ی پایداری مطلوب و عدم تخریب آنتی بادی در طول زمان است. تکرارپذیری آزمایش ها در سه سری مستقل انجام شد و ضریب تغییرات (CV) کمتر از ۶ درصد محاسبه شد که

تثبیت بیورسپتور (پروپ) اختصاصی مانند آنتی بادی یا آپتامر، برای شناسایی عامل التهابی، انتقال و خوانش سیگنال با استفاده از تکنیک‌هایی مانند فلورسانس یا الکتروشیمی است. مرحله‌ی آخر، کالیبراسیون، بهینه‌سازی و اعتبارسنجی با نمونه‌های بالینی برای اطمینان از دقت و قابلیت اطمینان در شرایط واقعی است [۲۱-۱۶]. مزیت اصلی این حسگر، پایداری و دوام بالای سطح اصلاح شده به دلیل پوشش کووالانسی فلئوروسیلان و همچنین تثبیت کووالانسی بیورسپتورها است.

۵- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با بهره‌گیری از فناوری‌های نوین الهمام گرفته از زیست، شامل سطوح فوق‌آب‌گریز مبتنی بر پوشش فلئوروسیلان، تثبیت کووالانسی آنتی بادی ضد IL-6 و استفاده از مایع لغزنده به‌عنوان لایه‌ی حفاظتی، یک سامانه‌ی حسگر زیستی طراحی شد که توانایی تشخیص IL-6 را در غلظت‌های بسیار پایین و در محیط‌های پیچیده‌ی نظیر خون کامل انسان دارد.

استفاده از پلی متیل متاکریلات (PMMA) به‌عنوان بستر، به دلیل خواص زیست‌سازگاری، پایداری مکانیکی، شفافیت نوری و قابلیت اصلاح سطح، گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای زیست‌تحلیلی فراهم ساخت. ترکیب چاپ دقیق آنتی بادی، طراحی میکروالگو شده سطح و حضور لایه لغزنده، موجب کاهش چسبندگی غیراختصاصی، بهبود نسبت سیگنال به پارازیت و افزایش چشمگیر حساسیت سامانه شد.

علاوه بر این، استفاده از جوهر زیستی حاوی اپوکسی در فرایند تثبیت، الگوبرداری یکنواخت و ماندگاری عملکرد حسگر را تضمین کرد. این طراحی، قابلیت پاسخ‌گویی به نیازهای بالینی در زمینه شناسایی سریع و دقیق عوامل التهابی نظیر IL-6 را فراهم می‌کند؛ عاملی که نقش مهمی در طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های

(۶۵/۲) پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بهبود یافته و در محدوده‌ی عملکرد کیت‌های ELISA تجاری قرار دارد.

۳-۷ تصاویر میکروسکوپی و تحلیل سطح

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلورسانس نشان دادند که نقاط چاپ شده‌ی آنتی بادی به صورت منظم و با شدت نور یکنواخت در سطح توزیع شده‌اند. در نمونه‌های بدون اصلاح سطح، سیگنال فلورسانس بسیار ضعیف‌تر بود که بیانگر نقش کلیدی تیمار پلاسما و پوشش فلئوروسیلان در افزایش بازده تثبیت آنتی بادی است (شکل ۳).

۴- بحث

پژوهش حاضر به طراحی یک حسگر زیستی با استفاده از سطوح همه‌گریز برای تشخیص فاکتور التهابی IL-6 در پلاسما و خون کامل، با حد تشخیص کمتر از پیکوگرم، پرداخته است. بستر اصلی حسگر از پلیمر PMMA ساخته شده که با فلئوروسیلان (FS) اصلاح شده تا خصوصیات همه‌گریزی و دافعه پایداری ایجاد کند. این ویژگی مانع از اتصال غیراختصاصی اجزای مزاحم نمونه (مانند پروتئین‌ها) به سطح حسگر شده و در نتیجه حساسیت و ویژگی آن را افزایش می‌دهد [۱۶].

تثبیت آنتی بادی‌های تشخیص دهنده بر روی بستر FS-PMMA عمدتاً از طریق چاپ افشانه‌ای و با استفاده از یک «جوهر زیستی» حاوی کمپلکس‌های سیلان-ضد IL-6 مبتنی بر اپوکسی انجام شده است. این جوهر، امکان اتصال کووالانسی آنتی بادی‌ها را فراهم می‌کند که منجر به تثبیت پایدارتر و بازده بالاتر در مقایسه با اتصال فیزیکی می‌شود [۱۷]. روش ساخت ارائه شده برای تولید انبوه مناسب است و قابلیت گسترش برای تشخیص سایر نشانگرهای بیماری را دارد.

مکانیسم کلی حسگر شامل چند مرحله کلیدی است. مرحله اول، اصلاح سطح با پوشش همه‌گریز برای دفع مایعات و کاهش اتصال غیراختصاصی است. مرحله دوم

- [1] Al-Qahtani A.A., Alhamlan F.S., Al-Qahtani A.A. (2024) Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Interleukins in Infectious Diseases: A Comprehensive Review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 9(1):13.
- [2] Thorsted A, Nielsen EI, Friberg LE. (2020). Pharmacodynamics of immune response biomarkers of interest for evaluation of treatment effects in bacterial infections. *International journal of antimicrobial agents*.56:106059.
- [3] Zhou Y-Q, Liu Z, Liu Z-H, Chen S-P, Li M, Shahveranov A, et al. (2016). Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *Journal of neuroinflammation*.13:1-9.
- [4] Cifaldi L, Prencipe G, Caiello I, Bracaglia C, Locatelli F, De Benedetti F, et al.(2015). Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-6: implications for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. *Arthritis & rheumatology*.67:3037-46.
- [5] Lausten-Thomsen U, Olsen M, Greisen G, Schmiegelow K. (2014). Inflammatory markers in umbilical cord blood from small-for-gestational-age newborns. *Fetal and pediatric pathology*.33:114-8.
- [6] Jones SA, Fraser DJ, Fielding CA, Jones GW. (2015). Interleukin-6 in renal disease and therapy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 30:564-74.
- [7] Mackiewicz A, Kushner I, Baumann H. (2020). Acute phase proteins molecular biology, biochemistry, and clinical applications: *CRC Press*.
- [8] Hirano T, Taga T, Matsuda T, Hibi M, Suematsu S, Tang B, et al. (1990). Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *The International Journal of Cell Cloning*. 8:155-67.
- [9] Moppert J, Pawłowska M, Domagalski K, Szwed-Kowalska A. (2023). The concentration of IL-6, TNF- α , s-ICAM-1, and EBV DNA load—predictive factors of hepatological complications in children with infectious mononucleosis. A pilot study. *Pediatrics Polska-Polish Journal of Paediatrics*.98:43-51.
- [10] Rose-John S.(2021). Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling. *Cytokine*.144:155577.
- [11] Liu T, Zhang J, Yang Y, Ma H, Li Z, Zhang J, et al. (2019). The potential role of IL-6 in

خودایمنی، عفونت‌های سیستمیک و اختلالات تخریب‌کننده عصبی دارد.

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهند که حسگر پیشنهادی، به‌عنوان یک پلتفرم قابل توسعه برای کاربرد های تشخیصی، تحقیقاتی و پایش وضعیت بیماران، از پتانسیل استفاده در آزمون‌های تشخیصی اولیه برخوردار بوده و مسیر مناسبی برای پیشرفت‌های آتی در حوزه حسگرهای زیستی با دقت بالا فراهم می‌سازد.

محدودیت‌ها و پیشنهادات

اگرچه زیست‌حسگر طراحی شده از حساسیت و ویژگی مطلوبی برخوردار است، این مطالعه با محدودیت‌هایی نیز همراه بوده است. از جمله می‌توان به ارزیابی عملکرد حسگر تنها در محیط آزمایشگاهی و بر روی نمونه‌های محدود خون کامل اشاره کرد که برای تعیین قابلیت اطمینان کامل در کاربردهای بالینی واقعی کافی نیست. همچنین، پایداری بلندمدت حسگر در شرایط نگهداری مختلف نیاز به بررسی گسترده‌تری دارد. در مطالعات آینده، اعتبارسنجی بالینی این سامانه با استفاده از تعداد نمونه‌های بالینی بیشتر از بیماران مبتلا به اختلالات التهابی مختلف توصیه می‌شود. علاوه بر این، ادغام این حسگر در یک پلتفرم قابل حمل^۱ برای اندازه‌گیری کمی و سریع، و توسعه آن برای شناسایی همزمان چند نشانگر^۲ می‌تواند گام بعدی ارزشمندی در مسیر تجاری‌سازی و کاربرد عملی این فناوری باشد.

بیانیه کد اخلاق پژوهش

این مطالعه مطابق با اصول اخلاقی مندرج در بیانیه هلسینکی و دستورالعمل‌های کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی انجام شده است. پروتکل پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران بررسی و تأیید شده است (کد اخلاق IR.TUMS.BLC.1402.085).

۶-منابع

^۱ Multiplexing

^۲ Point-of-Care

- bactericidal surfaces. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 34:100741.
- [18] Vu C-A, Chen W-Y. (2019). Field-effect transistor biosensors for biomedical applications: recent advances and future prospects. *Sensors*. 19:4214.
- [19] Yang X, Zhang W, Qin X, Cui M, Guo Y, Wang T, et al. (2022). Recent progress on bioinspired antibacterial surfaces for biomedical application. *Biomimetics*. 7:88.
- [20] Badillo-Ramírez I, Carreón YJ, Rodríguez-Almazán C, Medina-Durán CM, Islas SR, Saniger JM. (2022). Graphene-based biosensors for molecular chronic inflammatory disease biomarker detection. *Biosensors*. 12:244.
- [21] Wang P, Zhang D, Sun S, Li T, Sun Y. (2017). Fabrication of slippery lubricant-infused porous surface with high underwater transparency for the control of marine biofouling. *ACS applied materials & interfaces*. 9:972-82.
- monitoring severe case of coronavirus disease. *MedRxiv*. 03. 01.20029769.
- [12] Lopes LC, Santos A, Bueno PR. (2022). An outlook on electrochemical approaches for molecular diagnostics assays and discussions on the limitations of miniaturized technologies for point-of-care devices. *Sensors and Actuators Reports*. 4:100087.
- [13] Rahbar M, Wu Y, Subramony JA, Liu G. (2021). Sensitive colorimetric detection of interleukin-6 via lateral flow assay incorporated silver amplification method. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9:778269.
- [14] Zhong T, Li J, Zhang S, Pan H. (2023). Point-of-Care Detection of Interleukin-6 using Quantum Dot-based Immunochromatographic Test Strips. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 59:946-58.
- [15] ILO, CELL CI. HUMAN IL-6 ELISA KIT.
- [16] ASGHARI SM, KHAJEH K. Optimization of chitosan nanoparticles synthesis. 2014.
- [17] Patil D, Overland M, Stoller M, Chatterjee K. (2021). Bioinspired nanostructured

Title: Biosensor Design for Detection of IL-6 as an Inflammatory Marker Using Omniphobic Surfaces

Seyed Amir Hossein Javadi^{1,2}, Seyed Khalil Pestehei³, Sadegh Bizhani Sharif⁴, Sepideh Khodaparast^{1,4*}

1. Brain and spinal cord injury research Centre, Neurosciences institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Neurosurgery, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Anesthesiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Neurosciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Receipt: 2024/10/30

Accepted: 2025/12/03

Abstract

Interleukin-6 (IL-6) is a key cytokine with dual pro- and anti-inflammatory roles, critically involved in immune regulation, cell differentiation, and tissue injury. Elevated serum levels of IL-6 serve as an indicator of various pathological conditions, including chronic infections, cancer, autoimmune diseases, and Alzheimer's disease. Despite advances in ELISA-based assays, these methods remain costly, time-consuming, and require relatively large sample volumes. In this study, a novel omniphobic biosensor inspired by biological structures was developed for the sensitive detection of IL-6. Anti-IL-6 antibodies were uniformly immobilized using spray-coating onto a fluorosilane-treated polymethyl methacrylate (PMMA) substrate. To enhance stability and minimize nonspecific adsorption, a layer of biocompatible lubricating liquid was introduced onto the sensor surface.

The fabricated biosensor demonstrated exceptional sensitivity, detecting IL-6 at concentrations as low as 2.5 pg/mL, even in human whole blood samples. Its high specificity, wide linear response range, and excellent reproducibility make this platform a promising candidate for rapid and sensitive detection of inflammatory biomarkers.

Keywords: Interleukin-6, omniphobic surfaces, polymethyl methacrylate (PMMA), fluorosilane, spray coating, biosensor