

İŐIK NESLİŞAH KORKUT

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĐ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İN VİTRO SEPSİS MODELİNDE
BİYONANOSENSÖRLERLE SİTOKİN TAYİNİ

İŞİK NESLİŞAH KORKUT

DANIŞMAN
PROF DR. İLHAN YAYLIM

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Bu çalışmayı tek amacı çocuklarına daha iyi bir hayat yaratmak olan canım babama ve yokluğunda küçülen ama gücünden ödün vermeyen çekirdek aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmanın her aşamasında yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Serap Kuruca ve Prof. Dr. İlhan Yaylım'a, çalışma esnasında hem zihnimi açan önerileri hem de çalışmaya olan katkılarından dolayı İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fiziksel Kimya Anabilim Dalı'ndan hocam Doç. Dr. Selcan Karakuş ve ekibine, her öğrencisinin her sorununu çözebilme yeteneğine sahip hocam Tolgahan Hakan'a, yüksek lisans eğitimim boyunca hem sevgi dolu kapleri hem de bilgelikleriyle yolumu aydınlatan, bana tam anlamıyla akademik çalışma yapmayı öğreten ekip arkadaşlarım Güneş Özen Eroğlu, Gökçe Erdemir, Ferdane Danışman, Dilşad Özerkan, Mediha Süleymanoğlu, Ayşe Erol, Nilgün Okşak ve Agil Balakishiyev'e, motivasyon kaynağım Yudum'a, en yakın arkadaşım anneme, aylardır hasret olduğum kardeşime ve çalışmayı tamamlamama günler kala kaybettiğim güvenli limanım babama hayatıma kattıkları bütün değerler ve çalışmayı tamamlamama olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:38318

İÇİNDEKİLER

ITHAF.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar LISTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LISTESİ	VIIIVIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ.....	IX
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Sepsisin Tanımı.....	5
2.2. Sepsis Modelleri.....	11
2.2.1. Damar İçi Enjeksiyon Modeli.....	12
2.2.2. Lokal Enfeksiyon Modelleri.....	14
2.2.3. Sepsis Hayvan Modeli.....	15
2.2.4. İn Vitro Sepsis Modeli.....	16
2.2.5. İn Vitro Tam Kan Sepsis Modeli.....	16
2.3. Sepsis Patofizyolojisi.....	17
2.3.1. Endotoksin.....	17
2.3.2. İnflamatuar Yanıtın Oluşması.....	19
2.3.2.1. İnflamatuar Yanıtta IL-6'nın Rolü.....	20
2.3.2.2. IL-6.....	22
2.3.2.3. IL-6'nın Moleküler Yapısı.....	23
2.4. Nanoteknoloji.....	23
2.5. Nanoyapılar.....	24
2.6. Nanoyapılarda Sensör Uygulamaları.....	25
2.7. Nanoyapıların Sınıflandırılması.....	26
2.7.1. Nanoparçacıklar.....	27
2.7.1.1. Metal Nanoparçacıklar.....	28
2.8. Gümüş Esaslı Nanoyapıların Sensör Uygulamaları.....	30

2.8.1. Gümüş Esaslı Nanoyapıların Sepsis Teşhisinde Kullanılması.....	31
2.8.1.1. Sonokimyasal Yöntemle Üretilmiş Biyomatris İçerisinde Gümüş Nanoparçacıklar.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	333
3.1 GEREÇLER.....	33
3.2. YÖNTEMLER.....	33
3.2.1. Nanoparçacık Sentezlenmesi.....	33
3.2.2. Nanoparçacık Karakterizasyonu.....	34
3.2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemesi.....	34
3.2.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemesi.....	34
3.2.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) İncelemesi.....	34
3.2.2.4. Elektrotun AgNP ile Kaplanması.....	35
3.2.2.5. Biyonanosensörün Kalibrasyonu.....	35
3.2.3. İn Vitro Deneyler	35
3.2.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması	36
3.2.3.2. İn Vitro Tam Kan Sepsis Modelinin Geliştirilmesi.....	36
3.2.3.3. Sitokin Ölçülecek Serumların Toplanması.....	37
3.2.4. Biyonanosensör İle Sitokin Ölçümü Yapılması.....	37
3.2.4.1. İn Vitro Modelinden Elde Edilen Serumlar İle Sitokin Ölçümü Yapılması.....	38
3.2.5. IL-6 ELISA Kiti İle Biyonanosensör Etkinliğinin Kontrol Edilmesi	39
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Nanoyapılara Ait Bulgular.....	40
4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	40
4.1.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi.....	40
4.1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi	41
4.2. Biyonanosensör Kalibrasyonuna Ait Bulgular.....	42
4.3. İn Vitro Deneylere Ait Bulgular	43
4.3.1. İn Vitro Tam Kan Sepsis Modeli Analizi.....	43
4.4. Biyonanosensör Ölçümüne Ait Bulgular.....	43
4.4.1. Kan Serumlarında Sitokin Ölçümüne Ait Sonuçlar	43
4.5. İnsan IL-6 ELISA Kit Kontrolüne Ait Bulgular.....	48
4.5.1. İnsan IL-6 ELISA Kit İle Ölçülmüş Kan Serumlarına Ait Sonuçlar.....	48

4.6. İstatistiksel Analiz.....	49
5. TARTIŞMA.....	53
KAYNAKLAR	59
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	70



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Sepsis ile ilgili Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi (SOFA) (Vincent ve ark., 2016).....	8
Tablo 2: Örneklerdeki Gerilim Değeri ve IL-6 Miktarı Arasındaki İlişki.....	48
Tablo 3: ELISA Sonuçlarına Ait Absorbans ve IL-6 Değerleri.....	48
Tablo 4: Biyonanosensör ve ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması.....	49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: (A) Lipopolisakkaritlerin Kimyasal Yapısı (B) LPS: <i>Salmonella minnesota</i> (Garidel ve Brandenburg, 2009).....	18
Şekil 2: Nanoyapıların Sınıflandırılması (Singh ve ark., 2017).....	27
Şekil 3: MNP'lerin Manyetik ve Elektrik Alandaki Hareketi(Singh ve ark., 2017).....	29
Şekil 4: Biyonanosensör Hazırlanması ve Ölçüm Alınması (Karakuş ve ark., 2022)...	34
Şekil 5: Elektrotun Nanoyapı ile Kaplanması.....	35
Şekil 6: Kan Örneklerine LPS'li Medyum Eklenmesi.....	37
Şekil 7: Kan Örneklerinden Serum Toplanması.....	37
Şekil 8: Devirli Voltmetri Cihazı Ve EBTRO Potansiyostat Programı.....	38
Şekil 9: a) Maca kökü (10.000×) b) Maca AgNp (10.000×).....	40
Şekil 10: AgNP'lere ait TEM görüntüleri.....	41
Şekil 11: AgNP'lere ait FTIR grafiği.....	42
Şekil 12: Biyonanosensör Kalibrasyon Grafiği.....	43
Şekil 13: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	44
Şekil 14: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	44
Şekil 15: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	45
Şekil 16: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	45
Şekil 17: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	46
Şekil 18: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	46
Şekil 19: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	47
Şekil 20: Biyonanosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği.....	47

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- (DSÖ) Dünya Sağlık Örgütü
- (IL) İnterlökinler
- (TNF) Tümör Nekroz Faktör
- (LPS) Lipopolisakkarit
- (ELISA) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- (AgNP) Gümüş Nanoparçacıklar
- (SIRS) Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu-Systemic Inflammatory Response Syndrome
- (SOFA) Sepsis ile ilgili Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi
- (FiO₂) Alınan havanın oksijen yüzdesi
- (PaO₂) Arteriyel oksijen basıncı
- (MAP) Ortalama arteriyel basınç
- (SCCM) Yoğun Bakım Tıbbi Topluluğu
- (ESICM) Avrupa Yoğun Bakım Tıbbi Topluluğu
- (LODS) Lojistik Organ Bozukluğu Sistemi
- (qSOFA) Hızlı SOFA
- (CLP) Bağırsak Ligasyonu ve Delinmesi
- (CASP) Kolon Yukarısı Karın Zarı İltihabı
- (TLR) Toll-like Reseptör
- (NF-kB) Nuclear Factor-kB
- (TNFR) TNF reseptörü
- (PAMP'ler) Patojen İlişkili Moleküler Modeller
- (DAMP'ler) Zarar İlişkili Moleküler Modeller
- (APC'ler) Antijen Sunan Hücreler
- (AP-1) Aktivasyon Proteini-1
- (IFN- γ) İnterferon Gamma
- (LBP) LPS Bağlayıcı Protein

- (IKK) İκB Kinaz Kompleksi
- (IL-6R) IL-6 Reseptor
- (JAK)Janus Kinaz
- (NNI) Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
- (0D) Sıfır Boyutlu
- (1D) Bir Boyutlu
- (2D) İki Boyutlu
- (NP'ler) Nanoparçacıklar
- (NR'ler) Nanoçubuklar
- (NT'ler) Nanotüpler
- (NW'ler) Nanoteller
- (MNP'ler) Metal NP'ler
- (AuNP'ler) Altın NP'ler
- (Pt) Platin
- (Pd) Paladyum
- (Cu) Bakır
- (LSPR) Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans
- (NMNP'ler) Soy Metal NP'ler
- (CRP) C Reaktif Protein
- (PCT) Prokalsitonin
- (NaOH) Sodyum Hidroksit
- (AgNO₃) Gümüş Nitrat
- (RPMI-1640) Roswell Park Memorial Institute Medyumu
- (FBS) Fetal Bovine Serum
- (NaHCO₃) Sodyum Bikarbonat
- (SEM) Scanning Electron Microscope-Taramalı Elektron Mikroskobu
- (TEM) Transmission Electron Microscope-Transmisyon Elektron Mikroskobu
- (FTIR) Fouirer Transform Infrared Spectroscopy-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
- (EDTA) Etilendiamintetraasetik Asit

ÖZET

Korkut, I.N. (2023). *In Vitro* Sepsis Modelinde Biyonosensörlerle Sitokin Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışma kapsamında, *in vitro* sepsis modeliyle insan kanında salgılanan sitokinler biyonosensörler ile tayin edilmiştir. *In vitro* sepsis modeli için sağlıklı ve gönüllülerden alınan kan LPS ile muamele edilir. LPS, tam kan modelinde sitokin salgısını arttırmıştır. Çalışmamızın amacı, birçok hastalığın sebebi veya sonucu olarak vücutta salgılanan sitokinlerin klinikte tespitini çok daha hassas ölçümlerle yapabilecek bir biyosensör geliştirerek *in vitro* sepsis modelinde hassasiyetini test etmektir. Maca kökü temelli gümüş nanoyapılar hazırlanmıştır. Hazırlanan Ag nanoyapılar ile elektrotlar kaplanır ve *in vitro* sepsis ile hazırlanan kan-serum örneklerinin sitokin düzeyi ölçülmüştür. Biyonosensör ölçümünün, ELISA ölçümleri ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı ve hassas bir ölçüm yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Önümüzdeki çalışmalarda biyosensörlerin, ölümcül bir enfeksiyon hastalığı olan sepsisi klinik çalışmalarda da hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmesini sağlamak hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler : Sepsis, IL-6, Sitokin, Biyonosensör, gümüş nanoparçacıklar

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38318

ABSTRACT

Korkut, I.N. (2023). Cytokine Detection with Bionanosensors in an *In Vitro* Sepsis Model, İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Within the scope of the study, secreted cytokines in human blood were determined by bionanosensors with in vitro sepsis model. For the in vitro model of sepsis, blood from health and volunteers is treated with LPS. LPS increased cytokine secretion in the whole blood model. The aim of our study is to develop a biosensor that enables the clinical detection of cytokines secreted by organisms as a cause or consequence of many diseases, with much more sensitive measurements, and maintains its sensitivity in the in vitro sepsis model. Maca-based silver nanostructures were prepared. Electrodes are coated with prepared Ag nanostructures and cytokine levels of the blood-serum samples were measured. It has been determined that the bionanosensor measurement is a much faster and more sensitive measurement method used against ELISA measurements. It is aimed to enable future biosensors to rapidly and sensitively detect sepsis, a leading infectious disease, in the clinic.

Key Words: Sepsis, IL-6, Cytokine, Bionanosensor, silver nanoparticles

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 38318

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, epidemiyolojik tahmini zor bir hastalık olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, 2017 yılında tahmini olarak 49 milyon insanın etkilendiği ve 11 milyon insanın da ölümüne neden olan bir hastalıktır (WHO, Ağustos 2020). Sepsisin bu kadar öngörülemeyen olmasının altında yatan asıl neden, tedaviye cevapsız bulaşıcı hastalıkların hızla ölüme götüren sonuçları nedeniyledir. Vücudun enfeksiyona verdiği tepkinin kendi doku ve organlarına zarar vermeye başladığı zamanı hemen tespit edebilmek çok önemlidir. Sepsisin tanı sürecinde klinikteki birçok değeri içeren bir skorlama yöntemi kullanılsa da daha verimli ve çabuk sonuç veren bir yöntemi hala gelişme aşamasındadır.

T hücreleri ve diğer immün kompetan hücreler, antijen ile karşılaştıklarında, cevap olarak birçok immünolojik aktif madde üretir ve salgırlar. Bu maddelere sitokin ismi verilmektedir. Sitokinlerin hücre metabolizması üzerinde parakrin veya otokrin etkileri bulunmaktadır. Sitokinler, sitokin ağı olarak adlandırdığımız çoklu ve birbirleri ile ilişkili biyolojik aktiviteye sahiptirler ve hem kendileri hem de diğer sitokinler ile ilgili reseptörlerin yapımı ve ekspresyonunu sağlarlar. Sitokinler; hücre gelişimini, olgunlaşmasını veya fonksiyonlarını etkileyen proteinlerdir. İnterlökinler (IL) sitokinlerin bir alt grubu olarak sınıflandırılan immünolojik aktif maddelerdir. Bir veya daha fazla sayıda spesifik hücre yüzey molekülüne bağlanarak etki gösterirler. Sitokinler kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerin gelişimini uyarır. IL-6 hücrelerini aktive eder. Bu nedenle, sepsis tanısının erken döneminde interlökin düzeylerinin artışı büyük önem kazanmaktadır (Santana ve ark., 2003).

Endotoksinler kanda tümör nekroz faktör (TNF) salınımını sağlar. TNF ise IL-1, IL-6 ve IL-8 salınımını uyarır. IL-6 genini uyaran en kuvvetli uyarıcılar;

lipopolisakkarit (LPS) ve forbol esteridir(Uchino ve ark., 1992). IL-6, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar bir sitokindir ve başışıklıkta önemli rol oynar, büyüme ve farklılaşmayı teşvik eder. Buna ek olarak, enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar ve onların ürünlerine karşı konak savunmasında yer alan hücreler ve hasar gören dokular tarafından salgılanır. Sepsis tanısında IL-6'nın spesifitesi %80, sensitivitesi %61 olup, IL-6 ve IL-8'in sirkülasyondan temizlenme hızı 6-24 saat olduğu için, sepsisin erken döneminde önemli bir tanı değeri vardır(Yıldırım ve Deveciođlu, 2022).

Vücut sıvılarındaki sitokin konsantrasyonu düşüklüğü nedeniyle IL-6'nın oldukça hassas bir şekilde tespit edilmesi çok kolay değildir, normal olarak pM aralığındadır ve heterofilik antikolar, romatoid faktörler ve spesifik veya spesifik olmayan sitokin bağlayıcı proteinlerden etkilenebilir(Santana ve ark., 2003).

“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA), hastalarda sitokin fırtınasının klinik teşhisi için kullanılan en yaygın sitokin ölçüm aracı olmakla beraber uzun bir inkübasyon süresi gerektirir. Birkaç saat sürmesi ve karmaşık örnek etiketleme süreci buradaki en önemli sorunlardandır. Ayrıca, algılama için örnek miktarının fazla olması gerekmektedir. ELISA testlerinin dışında immünokromatografik kart testleri oldukça pratik ve düşük maliyetli olmalarına rağmen IL-6 gibi kandaki konsantrasyonu oldukça düşük olan interlökinlerin kantitatif analizi için uygun değildir.

Biyonosensörler, biyolojinin moleküler temellerini fizikokimyasal metotlarla aydınlatmamıza yarayan ve son yıllarda tıbbi alanda büyük sıçramalara yol açan teknolojik gelişmelerdir. Son yıllardaki sensör çalışmaları vücut sıvıları içinde özelleşmiş biyolojik molekülleri tayin etme üzerine yoğunlaşmaktadır. Nanoteknolojinin bilgi desteği ve disiplinlerarası çalışmalarla geliştirilecek olan biyosensörler ile hemodinamik değışikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu

ve organ yetmezliğine kadar giden ölümcül bir enfeksiyon hastalığı olan sepsisi hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmesi hedeflenmektedir. Sepsis ve septik şokta, erken başlanmış ve doğru seçilmiş antibiyotik tedavisinin mortaliteyi azalttığı kanıtlanmıştır (Jarczak ve ark., 2021). Bu nedenlerle ağır sepsis ve septik şokta erken ve hızlı tanı ile tedaviye erken başlanması hayati önemdedir.

Çalışmamızın amacı, birçok hastalığın sebebi veya sonucu olarak vücutta salgılanan sitokinlerin klinikte tespitini çok daha hassas ölçümlerle yapabilecek bir biyosensör geliştirerek in vitro sepsis modelinde hassasiyetini test etmektir. Daha önce de sitokin tayini için yapılan biyosensör çalışmalarında, bu metodun diğer metotlara göre daha hassas ölçüm yapabildiği, tekrarlanabilir olduğu, stabilitesinin yüksek olduğu ve daha az maliyetli olduğu gösterilmiştir(Alfinito ve ark., 2020). Bağışıklık hücrelerinden salgılanan sitokinlerin kapsamlı karakterizasyonu ve kantitatif analizi için basit, hassas ve hızlı analiz platformlarının geliştirilmesi artık bir zorunluluk haline gelmiştir.

Elektrokimyasal olarak hazırlanan biyosensörler sayesinde, sitokin ölçümünün diğer yöntemlere kıyasla çok daha hassas, kısa sürede, daha az materyal kullanılarak ve daha az maliyetle yapılması mümkündür. Çalışma kapsamında, elektrokimyasal sensörlerin kolay kullanımına, hızına, hassasiyetine ve seçiciliğine sahip nanoteknolojik biyosensörler tasarlanmıştır.

Biyonosensör, sitokin bağlanmasını sağlamak amacıyla nanoparçacıklarla yapılır ve sitokine ait reseptörü ile sitokin yakalanır(C. Chen ve ark., 2021). Gümüş nanoparçacıklar (AgNP) ile dizayn edilen nanomalzemelerin hem in vitro hem de in vivo nasıl davrandığına dair temel araştırmalara bu alanda önemli bir katkılarda bulunmuştur ve bulunmaya devam etmektedir. Küçük boyutları, işlevselleştirme

kolaylığı ve benzersiz şekilde ayarlanabilen optik özellikleri nedeniyle, gümüş nanoparçacıklar algılama, hücresel görüntüleme, ilaç salımı ve kanser tedavisinde biyomedikal kullanım için oldukça elverişlidir. Bu uygulamalar, gümüş nanoparçacıklarının boyut, şekil, yüzey kimyası ve agregasyon durumunu dikkate alarak gerçekleştirilebilir. Biyosensör platformunun hassasiyeti ve kararlılığı, ağ veya matrislerde gümüş nanoparçacıkların homojen dağılımına ve şekline bağlıdır. Genel olarak, elektrokimyasal biyosensörler biyokimyasal reaksiyonlar sırasında elektron alışverişi ile gerçekleşen akım potansiyelini temel alarak çalışır. Kandan veya vücut sıvılarından alınan örneklerden sitokin tayini biyosensörler sayesinde diğer yöntemlere kıyasla çok daha hassas ve daha az maliyetli yapılabilmektedir. Gümüş nanomalzemelerin biyogörüntüleme ve biyosensörler gibi çeşitli tekniklerde kullanımı birçok hastalığın teşhisi açısından klinikte büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli bakterilere ve virüslere bağlı enfeksiyonlarda, ciddi yanık hasarı sonucu sepsis gelişerek yoğun bakımda yatan hastalarda sitokin düzeyini gerçek zamanlı, hızlı ve hassas olarak takip edebilmek için biyonanosensörlerin geliştirilmesidir. Çalışmada, geliştirilen biyonanosensörler ile IL-6 tayini hassas bir şekilde yapılmıştır. Bu biyonanosensörler IL-6'nın kantitatif tayininde seçiciliği ve görece doğruluğu ile öne çıkmaktadır. Çalışma kapsamında, birçok hastalığın sebebi veya sonucu olarak vücutta salgılanan sitokinlerin klinikte tespitini çok daha hassas ölçümlerle yapabilecek bir biyonanosensör geliştirerek in vitro sepsis modeli ile elde edilen örneklerde biyonanosensörün hassasiyeti test edilmiştir. Ayrıca in vitro tam kan sepsis modelinin, sepsis çalışmalarında yeni yaklaşımlar için literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsisin Tanımı

Sepsis terimi, Yunanca'da çürüme anlamına gelen sipsi kelimesinden gelmektedir. İlk kez Hipokrat tarafından tehlikeli, kokulu, bedenin biyolojik bozulması anlamında kullanılmıştır(Funk ve ark., 2009).

Sepsis, enfeksiyona karşı sistemik inflamatuvar konak yanıtı olarak tanımlanır. İlerleyen süreçte, çoklu organ yetmezliğinden ölüme sebep olmaktadır. Vücudun bir enfeksiyona karşı aşırı tepkisi olarak da açıklanan heterojen bir sendromdur (Singer ve ark., 2016). Enfeksiyon kaynaklı ölümlerin başlıca sebebi olarak gösterilebilir. İnsidansı yılda yaklaşık 20 milyon vakadır ve mortalitesi yaklaşık %26'dır ve potansiyel olarak her yıl 5 milyondan fazla ölümden sorumludur(Fleischmann ve ark., 2016).

Yıllar boyunca sepsis, yüksek morbidite ve mortalite ile çoklu organ ve sistemlerin bozulmasını içeren klinik belirtilere yol açan enfeksiyonun sistemik bir yayılımı olarak kabul edildi. Septisemi, bu durumu tanımlayan terimlerden biridir(Salomão ve ark., 2019). Enfeksiyonun sistemik belirtilerinin mikroorganizma yayılımına gerek kalmadan inflamatuvar mediatörler aracılığıyla ortaya çıkabileceğinin anlaşılması, modern sepsis kavramının doğmasına yol açmıştır(Bone, 1991).

1990'ların başında sürdürülen uluslararası çalışmalar ölüm oranlarını azaltmayı hedeflemekteydi. Uluslararası uzmanlar tarafından oluşturulmuş konsorsiyumun amacı, farkındalığı arttırıp tanıya kadar geçen süreyi iyileştirme programları ve uygun tedavilerin geliştirilmesini içeren belirli bir gündem aracılığıyla sepsis mortalitesini dörtte bir oranında azaltmaktı (Purcarea ve Sovaila, 2020). Bu program ilk olarak 2004 yılında Surviving Sepsis Kampanyası tarafından başlatılmıştır (Dellinger ve ark., 2004) SIRS (Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu-Systemic Inflammatory Response

Syndrome), sepsis ve septik şok gibi terimlerin laboratuvar ve klinik parametrelere dayalı tanımları bu konferansta yapıldı. 1992'de varılmış olan konsensüse dayanarak sepsis, en az 2 SIRS kriterinin ve şüpheli bir enfeksiyon bölgesinin varlığı olarak tanımlandı (Bone ve ark., 1992). Bu tanımlar; uluslararası bilim topluluğu tarafından kabul edildi ve yaygın olarak kullanıldı. SIRS, enfeksiyon varlığından bağımsız olarak gelişen inflamatuvar süreç olarak ifade edildi. Aşağıdaki kriterlerden iki veya daha fazlasının varlığı SIRS kanıtı olarak gösterildi:

- Vücut sıcaklığının 38°C'den fazla veya 36°C'den az olması
- Dakikada 90 atımdan fazla kalp atış hızı
- Solunum hızının dakikada 20 nefesten fazla olması
- PaCO₂ 32 mmHg'den az olması
- Anormal beyaz kan hücresi sayısı (>12x10³/mL, <4.0x10³/mL> olgunlaşmamış formların %10'u) (Esposito ve ark., 2017)

Daha sonra sepsis hastanın durumunun ağırlığına göre; sepsis, ağır sepsis ve septik şok olarak sınıflandırıldı (Purcarea ve Sovaila, 2020). Sepsisin SIRS başlangıcına yol açan enfeksiyon olarak değerlendirilmesi, esasında sepsisi enfeksiyona karşı normal bir tepki olarak nitelendiriyordu. Ağır sepsis; organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon (laktik asidoz, oligüri ve mental durumdaki akut değişiklik dahil) ile ilişkili sepsis olarak tanımlandı. Sepsis kaynaklı hipotansiyon, sistolik kan basıncının <90 mmHg olması veya başka bir hipotansiyon nedeni yokluğunda başlangıca göre 40 mmHg azalma durumuydu. Septik şok, yeterli intravenöz sıvı uygulamasına rağmen sepsis kaynaklı kalıcı hipotansiyon olarak tanımlandı (Bone ve ark., 1992).

1992 yılında American College of Chest Physicians/Critical Care Medicine Derneği Konsensüs Konferans Komitesi, enfeksiyonu, mikroorganizmaların varlığına veya organizmaların normalde steril olan konak dokuya invazyonuna karşı inflamatuvar bir

yanıt ile karakterize edilen mikrobiyal bir fenomen olarak tanımlamıştır(Burgelman ve ark., 2021). Enfeksiyona karşı yanıt, doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından yürütülen çok karmaşık ama özgünleşmiş bir süreçtir. Bakterinin hücreye girişi üzerine, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, TLR yapılarını da içeren patojen tanıma reseptörleri aracılığıyla istilacının patojenle ilişkili moleküler yapıları olarak bilinen evrimsel olarak korunmuş yapılarını tanır (Tosi, 2005; Mogensen, 2009). Moleküler yapının reseptörler tarafından tanınması pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını tetikler ve bu da endotel hücrelerinin ve adezyon moleküllerinin ifadesini sağlar. Tüm bu faktörler, lökositlerin enfeksiyon bölgesine çekilmesi ve göç etmesi, sonuçta fagositoz yoluyla bakteriyel temizliğe yol açar. Kontrollü ve lokalize bir immün reaksiyon sağlamak için proinflamatuar sinyallerin salınımı sıkı bir şekilde düzenlenir ve anti-inflamatuar sitokin salınımı ile denge içindedir (Cicchese ve ark., 2018).

Patojen yapısının anlaşılması ve sepsis mekanizmasına etkisi için yapılan çalışmalar, inflammatuar ve anti-inflamatuar yanıtların enfeksiyon başlangıcı ile tetiklendiğinin anlaşılması, hücresel ve organik işlev bozukluklarında diğer mekanizmaların katılımı, inflammatuar yanıtı hedefleyen müdahale stratejilerinin başarısızlığı ve kavramın çok hassas olduğu ancak özgünlükten yoksun olduğu endişesi, kavramın yeniden gözden geçirilmesine yol açmıştır (Purcarea ve Sovaila, 2020).

2001 yılında, birkaç Avrupa ve Kuzey Amerika'daki çeşitli tıbbi yoğun bakım toplulukları bu tanımları tekrar gözden geçirmek için ikinci bir konsensüs konferansında toplandı. Tanı kriterleri listesini genişlettiler, buna ek olarak mevcut sepsis, ağır sepsis ve septik şok kavramları revize edildi ve sonraki yıllarda klinik uygulama ile sepsis araştırmalarının temeli olarak kaldılar. 2001 konferansı, tanımları ve tanı kriterleri listesini genişletti, ama destekleyici kanıt eksikliği nedeniyle alternatifler sunmadı.

Aslında, sepsis ve septik şok tanımları 20 yıldan fazla bir süredir değişmeden kalmıştı (Strassl ve ark., 2010).

2014 Avrupa Yoğun Bakım Tıbbi Derneği ve Yoğun Bakım Tıbbi Derneği, sepsis ve septik şok tanımlarını güncellemek için 19 uzmandan oluşan yeni bir panel topladı. Kavramlarla ilgili en önemli değişiklikler, gereksiz olarak kabul edilen şiddetli sepsis teriminin ortadan kaldırılması ve birkaç bulaşıcı olmayan hastalığa uygun bir konak yanıtını yansıtabilen SIRS kavramının silinmesiydi (Singer ve ark., 2016).

Konferans, aşağıdaki koşulları tanımlamaya izin verdi: Organ disfonksiyonu, Sepsis ile ilgili Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi (SOFA) skorunda 2 veya daha fazla puan artışı ile temsil edildi (Tablo 1).

Tablo 1: Sepsis ile ilgili Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirmesi (SOFA) (Vincent ve ark., 2016)

		Skor				
Sistem	0	1	2	3	4	
Solunum						
PaO₂/FiO₂, mmHg(kPa)	≥400(53.3)	<400(53.3)	<300(40)	<200(26.7)	<100(13.3)	solunum desteğiyle solunum desteğiyle
Koagülasyon						
Trombositler, 10³/ul	≥150	<150	<100	<50	<20	
Karaciğer						
Bilirubin, mg/dL(umol/ L)	<1.2(20)	1.2-1.9(20-32)	2.0-5.9(33- 101)	6.0-11.9(102- 204)	>12.0(204)	

Kardiyovasküler

Tansiyon	MAP \geq 70mm Hg	MAP<70mmHg	Dopamin<5veya Dobutamin her dozu	Dopamin 5.1-15 veya efinefrin>0.1 veya norepinefrin>0.1	Dopamin>15 veya epinefrin \leq 0.1 veya norepinefrin \leq 0.1

Merkezi Sinir Sistemi

Glasgow Skalası Skoru	15	13-14	10-12	6-9	<6
Koma					

Renal

Kreatinin, mg/dL (umol/L)	<1.2(110)	1.2-1.9(110-170)	2.0-3.4(171-299)	3.5-4.9(300-440)	>5.0(440)
İdrar, ml/d				<500	<200

Kısaltmalar FiO₂: Alınan havanın oksijen yüzdesi; PaO₂: Arteriyel oksijen basıncı; MAP: Ortalama arteriyel basınç

Yoğun Bakım Tıbbı Topluluğu (SCCM) ve Avrupa Yoğun Bakım Tıbbı Topluluğu (ESICM) dahil olmak üzere ulusal dernekler tarafından düzenlenen 2016 konferansı, Sepsis-3 olarak adlandırılan yeni bir sepsis tanımı önerdi. Yeni önerme, sepsisi, enfeksiyona karşı düzensiz bir konak yanıtının neden olduğu yaşamı tehdit eden organ işlev bozukluğu olarak tanımlar (Seymour ve ark., 2016). Çalışmada, septik şok teşhisi için kriterlerin değerlendirilmesinin bir parçası olarak hastalarda, Lojistik Organ Bozukluğu Sistemi (LODS) ve SOFA puanlaması dahil olmak üzere geleneksel SIRS

kriterlerini diğer yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Bu analize dayanarak yazarlar, potansiyel olarak septik bir hastanın organ disfonksiyonunu tanımlamak için SOFA puanlamasının kullanılmasını önermektedir (Taeb ve ark., 2017).

Yeni çalışmada, sepsis, dolaşım ve hücrel/metabolik anormalliklerin mortaliteyi önemli ölçüde artırmak için yeterince derin olan, enfeksiyona ve septik şoka karşı düzensiz bir konak yanıtının neden olduğu ciddi, potansiyel olarak ölümcül, organik bir işlev bozukluğu olarak tanımlanmıştır (Singer ve ark., 2016). Septik şok, dolaşımsal, hücrel veya metabolik anormalliklerin arttığı ölüm riski ile ilişkili olan bir sepsis alt kümesi olarak tanımlanır. Septik şoklu hastaları tanımlamak için klinik parametreler şunlardır: Sıvı oranı aşırı düştüğünde vazopresör ihtiyacını sürdürmek için ortalama arteriyel basıncı 65 mmHg veya daha yüksek olmalı ve serum laktat düzeyi 2 mmol/L (>18 mg/dL) üzerinde olmalıdır (Gotts ve Matthay, 2016). 2014 yılında yapılan konferansın sonuçları 2016 yılında yayınlanmıştır.

Aynı uzman grubu, SOFA puanının basitleştirilmiş bir versiyonunu, 100 mmHg veya daha düşük sistolik kan basıncını, dakikada 22 veya daha yüksek solunum hızını içeren hızlı SOFA Skorunu (hızlı SOFA veya qSOFA) detaylandırdı. qSOFA skoru klinik kriterlere dayalıdır ancak laboratuvar testleri gerektirmez. Bu nedenle enfeksiyondan şüphelenilen ve kötü sonuçlara sahip olma olasılığı daha yüksek olan hastaların basit ve hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar (Esposito ve ark., 2017; Salomão ve ark., 2019).

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, acil servislere başvuranlar arasında ölüm riski daha yüksek olan hastaların belirlenmesi için bu tür skorların önceki SIRS kriterlerinden daha büyük bir prognostik değere sahip olduğunu gösteren SOFA ve qSOFA sınıflandırmalarının kullanımını desteklemektedir. Birkaç yazar, enfeksiyon şüphesi olan hastalarda yoğun bakım ünitesine kabulü ve hastane içi mortaliteyi tahmin etmede

qSOFA puanının yararlılığını desteklese de, düşük duyarlılığı nedeniyle önceki erken uyarı puanlarını qSOFA ile değiştirmenin yeterliliği konusunda hala şüpheler vardır (Wang ve ark., 2016; Donnelly ve ark., 2017; Freund ve ark., 2017). Enfeksiyon şüphesi olan hastalarda erken risk değerlendirmesi, bu nedenle bu yeni skorun tarama kapasitesini daha iyi tanımlamak için daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır (Giamarellos-Bourboulis ve ark., 2017). Bilimsel topluluklar tarafından yeni kriterlerin eğitim süreçlerine ve müdahale stratejilerine etkileri tartışılmaktadır (Machado ve ark., 2016; Rello ve Leblebicioglu, 2016).

Yapılan araştırmalar klinikte halihazırda kullanılmakta olan bir sepsis tanı testinin olmadığını söylemektedir. Erken tanı sonucu ölüm oranı hayli düşen sepsis hala çeşitli skorlama yöntemleriyle teşhis edilmeye çalışılmaktadır. Bu durum klinikte kullanılmak üzere tasarlanmış bir sepsis tanı testine ihtiyaç duyulduğunu net bir şekilde göstermektedir.

2.2. Sepsis Modelleri

Sepsis, insanlarda ve hayvanlarda tüm yaşamsal fonksiyonları kademeli olarak etkileyen sistemik bir sorundur. Birçok sistemi etkileme kapasitesi ve immün sistemin özgünlüğü nedeniyle laboratuvar çalışmalarında tamamen tekrarlanması neredeyse imkansız olan bir senaryo yaratır. Sepsisin insan fizyolojisini nasıl bozduğuna dair bilgimiz, bu durumda meydana gelen enfeksiyon veya inflamatuvar sürecin en azından bir kısmını yeniden üretmeye çalışan yaklaşımların ışığı altında oluşturulmuştur.

Sepsisin klinik öncesi çalışmaları birkaç farklı modelde incelenebilir. Sepsise neden olan ajanları model organizmaya uygulamak için endotoksin veya canlı bakterilerin damar içine enjeksiyon, ‘‘Bağırsak Ligasyonu ve Delinmesi’’(CLP), ‘‘Kolon Yukarısı Karın Zarı İltihabı’’(CASP), bakteriyel peritonit ve pnömoni modeli dahil olmak birçok çeşitli yaklaşım bulunmaktadır. Model organizmalar hayvan veya hücre kültürü

kaynaklı olabilir. Sıçanlar, fareler, tavşanlar, kobaylar, köpekler, domuzlar, koyunlar ve insan olmayan primatlar gibi her biri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahip farklı hayvan türleri de kullanılmaktadır.

2.2.1. Damar İçi Enjeksiyon Modeli

Sepsisi taklit etmenin en yaygın ve basit aracı, hayvanların saf veya karışık mikrobiyal flora ile aşılmasıdır. Gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler bu çalışmalarda kullanılmaktadır. Hayvanlarda büyük dozlarda yapılan bakteri enjeksiyon modelleri, kardiyovasküler fonksiyonda ve kalp debisinde hızlı ve derin bir düşüşe neden olur, dolayısıyla hayvanlar saatler içinde ölür. Toplam yükleme dozunu azaltarak, enjeksiyon süresini artırarak sağkalımı uzatabilir ve hipodinamik kardiyovasküler yanıt hiperdinamik kardiyovasküler duruma dönüştürülebilir (Fink ve Heard, 1990). Bu modelin kullanılabilirliğini sınırlayan tek sebep bu değildir. *Escherichia coli* gibi bu modellerde kullanılan bakterilerin çoğu, *in vivo* çoğalamadığından yüksek miktarda bakteri gereklidir. Konak savunmasını bastırmak için büyük miktarlarda enjekte edilmelidir. Bununla birlikte çoğu septik hasta, bakterilerin sürekli olarak yayıldığı bulaşıcı bir odağa sahiptir bu odak enjeksiyon uygulamasında olmadığı için bu model klinik hastalıkla ilişkili değildir (Marshall ve ark., 2005). Hayatta kalma süresi kısadır ve bu nedenle hastalığın ilerlemesi için sınırlı bir zaman vardır (Fink ve Heard, 1990) ve serum sitokin tepkileri geçicidir.

Sepsis model, oluşturmak için damar içine enjekte edilebilecek bir diğer madde bakteriyel lipopolisakarittir. LPS, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda yaygın kullanılmaktadır. LPS, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi, bozulmuş metabolizma veya kas kontraktilesi, hipotansiyon ve düşük kan perfüzyonu gibi hücrelerde, dokularda ve tüm organizmada bulunan inflamasyonla ilişkili yanıtların çoğunu yeniden

üretebilir (Luísa da Silveira Hahmeyer ve Eduardo da Silva-Santos, 2021). LPS enjeksiyonu kullanımının bakteri enjeksiyonu kullanımına göre iki avantajı vardır.

- LPS stabildir ve kolayca saklanabilir, bu nedenle tekrarlanabilir bir şekilde doğru LPS dozları sürekli enjeksiyon olarak uygulanabilir.
- LPS enjeksiyonunun miktarı kolaylıkla değiştirilebilir(Strassl ve ark., 2010).

Hayvanlardaki LPS enjeksiyonuna benzer şekilde, sağlıklı insanlarda düşük doz LPS'nin damar içi enjeksiyonu, inflamatuvar kaskadların aktivasyonuna katkıda bulunan mekanizmaları incelemek ve farklı inflamatuvar sistemler arasındaki etkileşimleri çözmek için bir model olarak kullanılabilir. LPS'nin damar içi enjeksiyonuna yanıt olarak sitokin ağının ve diğer inflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açan erken olaylara ilişkin bilgilerimizin çoğu, insan endotoksemi modelinden türetilmiştir (Schultz ve van der Poll, 2002).

Damar içi LPS uygulamasında ortaya çıkan bulgular, çalışma denekleri arasında önemli ölçüde farklılık gösterir. Bazı gönüllüler sadece hafif yan etkiler yaşarlar. Deneklerin çoğu, bazen bulantı ve kusmanın eşlik ettiği baş ağrısı, genel halsizlik ve kas ağrısından şikayet eder. Titreme, ateş ve vücut sıcaklığı $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar değişebilir. Tüm belirtiler, LPS enjeksiyonundan 60-90 dakika sonra ortaya çıkmaya başlar. 2-3 saat sonra belirginleşir ve daha sonra 4 saat içinde kaybolur(Van der Poll ve Van Deventer, 1999). LPS enjeksiyonu, dolaşımda bir dizi pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinin saptanmasına sebep olur. İnsan endotoksemisinde görülen toplam lökosit sayısındaki değişiklikler, büyük ölçüde dolaşımdaki nötrofil sayısında da değişikliklere sebep olur. LPS uygulaması ayrıca sürekli bir lenfositopeni ve daha geçici bir monositopeniyi tetikler. Damar içi LPS sadece lökosit sayılarını değil, aynı zamanda beyaz kan hücrelerinin aktivasyon durumunu da etkiler. Ayrıca, normal deneklere LPS uygulaması, sepsisli hastalarda yaygın olarak bulunan endokrin, metabolik ve

prokoagülan değişikliklerle benzerlik göstermektedir. Bu modeller, gerçek bir enfeksiyon yerine bir çeşit zehirlenme modelleridir (Buras ve ark., 2005). Ancak basitlikleri araştırmalarda sıklıkla kullanılmasına yol açmaktadır.

2.2.2. Lokal Enfeksiyon Modelleri

Lokal enfeksiyon, pnömoni veya peritonit gibi bakterilerin enfeksiyon odağından sürekli olarak yayıldığı hastalıkların modellenmesiyle sağlanmaktadır. Bu modeller, septik bir hastanın tipik durumunu taklit etmeye çalışır. Enfeksiyon odağı yaygın olarak akciğer veya karın boşluğunda yer alır ve zatürre veya peritonite neden olur (Schultz ve van der Poll, 2002). Deneysel pnömoni genellikle *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından bakterilerin hayvanın burnuna veya trakeasına doğrudan enjeksiyonu ile indüklenir (Sordi ve ark., 2013).

Peritonit modelleri ise CLP ve CASP olarak ikiye ayrılabilir. Bir başka peritonit modeli ise fekal pelet peritonit modelidir, burada bir fibrin pıhtısı ile fekal pelet, sepsisi indüklemek için karın içine enjekte edilir (Rittirsch ve ark., 2007).

CLP, cerrahi prosedür olarak perforate apandisit veya divertikülit semptomlarını taklit eder. Polimikrobiyal sepsis oluşturan, çekumda kontrollü bir yaralanmadan oluşan CLP modeli, insanlarda septik şokta meydana gelen zamansal seyir ve organ disfonksiyonuna benzerlik açısından ‘‘altın model’’ olarak tanımlanmıştır (Rittirsch ve ark., 2009; Osuchowski ve ark., 2018) Klinik uygulamada gözlemlenenlere benzer sitokin yanıtına sahiptir (Rao ve ark., 2015). Model, kolay tekrarlanabilir, ucuz ve insan sepsisine benzerdir.

CASP modeli, CLP modelinden uyarlanmıştır. Bağırsak bakterileri ile enfeksiyon, peritondaki fekal içeriği sızdıran yükselen kolona implante edilen bir stent tarafından indüklenir (Buras ve ark., 2005). CLP modelinin karın içi apse oluşturduğu ve CASP

modelinin ise yaygın peritonit oluşturduğu gerçeği göz önüne alındığında, CASP ve CLP'nin farklı sepsis çeşitlerini kapsadığı söylenebilir

2.2.3. Sepsis Hayvan Modeli

Hayvan modelleri ve insanlar arasındaki bazı farklılıklar, hayvan çalışmalarından hastaya doğrudan ekstrapolasyon yapılmasını engellese de potansiyel terapötik ajanları ve nasıl çalıştıklarını anlamak için gerekli bir çerçeveyi sağladığından hayvan çalışmaları gereklidir. Hayvan modellerinin genel olarak çoğunluğu genç ve sağlıklı hayvanlarda gerçekleştirilmektedir. Klinikte ise farklı yaşlarda ve farklı hastalık geçmişine sahip birçok hasta bulunmaktadır (Munford ve Pugin, 2001). Ek olarak, hayvan modellerinde sepsisin taklit edilememesi için başka nedenlerden de bahsedilebilir. Septik çalışma hayvanı, sendromun en başında girişimsel ilaçlar alırken, bu septik hasta için genellikle mümkün değildir. Çoğu hasta, ilk septik ataktan günler ile haftalar sonra gelişen çoklu organ yetmezliğinden ölür. Bu nedenle, ilk 6-12 saatte önemli ölüm oranına sahip bir hayvan modelinden elde edilen sonuçların uygunluğu sorgulanabilir (Poli-de-Figueiredo ve ark., 2008). Hayvanın cinsiyeti, yaşı ve beslenme durumu klinikteki hasta durumlarından farklı olduğu için deneysel uygulamayı da etkileyebilir (Esmon, 2004).

Kemirgenler, bakımı nispeten ucuz olduğu ve patojen içermeyen bir ortamda tutulabildikleri için popüler bir test organizmasıdır. Ancak sınırlı bir kan hacmine ek olarak, kemirgenler, insanlara kıyasla oldukça dirençli oldukları için endotoksine tepkileri de farklılık gösterir. İnsan olmayan primatlar ile domuzlar, endotoksin duyarlılıkları ve doku antijenisleri insanlara benzer olduğu için son yıllarda yapılan araştırmalarda popülerlik kazanmıştır (Strassl ve ark., 2010).

Primatlar, özellikle babunlar, diğer hayvan modellerine göre çeşitli avantajlar sunar. İnsanlarda bulunan hemen hemen tüm fizyolojik ve immünolojik özellikler primatlarda

da gözlemlenebilir. Ayrıca, insan diagnostik ve terapötik ajanlarla çapraz reaktivite, klinik uygulamaya benzer koşullara izin verir. Hayvan, yoğun bakım ünitesinde tedavi edilir (Redl ve Bahrami, 2005).

Sonuç olarak hayvan modellerini kullanan deneyler, sepsisin farmakolojik tedavisi için yeni ajanların geliştirilmesinde kritik bir öneme sahip olmaya devam edecektir. Ancak, bu klinik öncesi çalışmalardan elde edilen sonuçlar hiçbir zaman doğrudan insanlarda oluşan enfeksiyon kaynaklı sepsis ile eşleştirilememektedir.

2.2.4. *In Vitro* Sepsis Modeli

Lökosit döngüsü ve damar yapısındaki geçirgenlik, doku hasarının inflamatuvar yanıtının gelişiminde kritik bir role sahiptirler. Sepsiste lökosit düzensizliği ve lökosit endotel hücre etkileşimlerini incelemek için yerleşik hücre kültürü modelleri kullanılmaktadır. Bu modelin kullanılmasındaki en önemli etken, hücre yapışması ve göçünde tür farklılıkları olup olmadığını belirlemektir. Mikroakışkan ve organoid sistemler, inflamatuvar yanıtı daha iyi anlamak ve ilaçları taramak için güçlü sistemler sağlamaktadır. Ayrıca endotel hücrelerinin yapısal farklılığının inflamatuvar yanıtı değiştirmesi, sepsis patofizyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılmalarına sebep olmuştur (Xu ve ark., 2021).

Hücre kültürü, son yıllarda özellikle sepsis tanı testleri geliştirme çalışmalarında sıkça kullanılan bir yöntemdir. Biyosensör yapılarının hassasiyetinin artarak çeşitlenmesi, sepsis tanı testlerinin gelişiminde önemli rol oynamıştır (Oeschger ve ark., 2019). Biyosensör çalışmalarında LPS indüklenmiş hücrelerin tercih edilmesi, kolay, tekrarlanabilir ve klinik çalışmalara uyarlanabilir olmaları nedeniyledir.

2.2.5. *In Vitro* Tam Kan Sepsis Modeli

Sepsis ortamında, sistemik inflamasyonun patofizyolojisindeki rolünü anlamak için vücut sıvılarında yapılan çalışmalar çok değerlidir. Kan örnekleri başta olmak üzere

vücut sıvılarında yapılan çalışmalar klinik çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir. Tam kanın patojenle ilişkili moleküllere maruz kalmasıyla erken sepsis sırasında sistemik inflamasyonu taklit edebilen yöntemler geliştirilmiştir (Messerer ve ark., 2020). Bu model, insan tam kanındaki doğuştan gelen bağışıklığı incelemek için uygun, ekonomik ve güvenilirdir. Aynı zamanda klinik açıdan önemli bilgiler sağlayabilir.

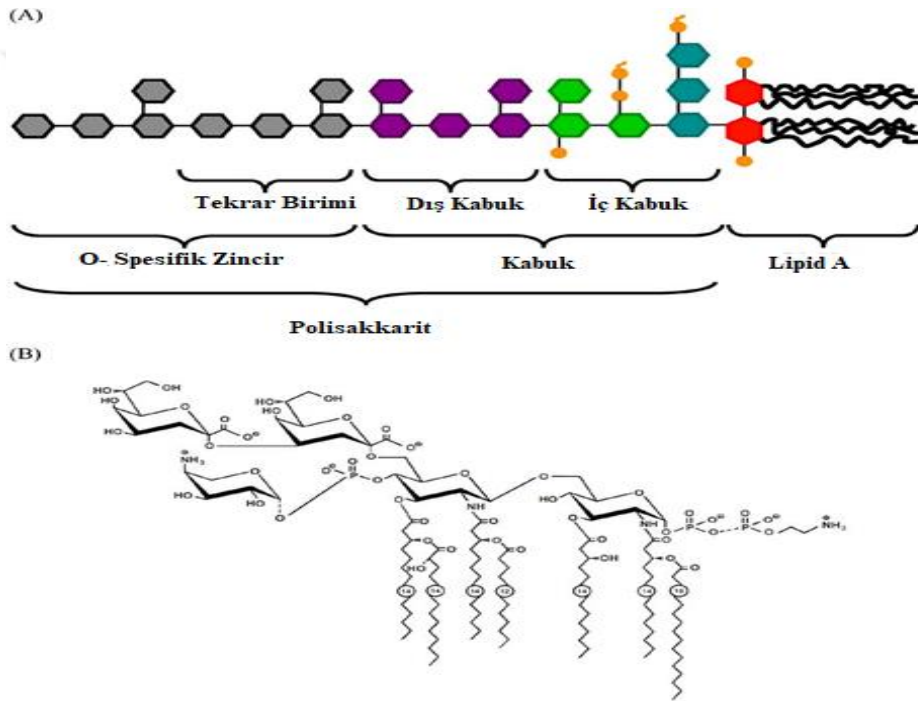
Model, sağlıklı gönüllülerden alınan tam kan örneklerinde, *in vitro* ortamda, sepsis biyobelirteçlerinin salgılanmasını temel almaktadır. Sepsisin karmaşık sistemik inflamatuvar yanıtının taklit edilmesinin zorluğu belirtilmiştir. Bu model, daha önceki modellerde bahsettiğimiz bu sorunu çözüme kavuşturmakla beraber gelecekte yapılacak sepsis tanı ve tedavi çalışmalarına da bugünden ışık tutmaktadır.

2.3. Sepsis Patofizyolojisi

Sepsis durumunun şiddetinden, patojenlerden daha çok konağın patojenlere verdiği yanıtın sorumlu olduğu bilinmektedir. Karmaşık sinyal yollarının katılımı ve düzensiz konak yanıtı, sepsisi hafif enfeksiyondan farklı, yaşamsal faaliyetleri tehdit eden heterojen bir sendrom yapar. Lokalize bir enfeksiyonun aksine sepsis, inflamasyon ve anti-inflamasyon dengesinin çok yönlü bozulmasıdır. Pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yolların yukarı düzenlenmesi sistem çapında sitokinlerin, mediatörlerin ve patojenle ilgili moleküllerin salınımına yol açarak pıhtılaşma ve kompleman kaskadlarının aktivasyonu ile sonuçlanır (Chousterman ve ark., 2017). Sepsisin patogenezi, enfekte eden mikroorganizmalar ile konakçı arasındaki etkileşiminin farklı yönlerini aynı anda içermektedir. Patojenlerin tanınması ve sonuçta ortaya çıkan hücresel aktivasyon, enfeksiyon kontrolü için esastır. Paradoksal olarak konak inflamatuvar yanıtı sepsisteki patofizyolojik değişikliklerin başlıca sebebidir (Rubio ve ark., 2019).

2.3.1. Endotoksin

Endotoksin terimi, gram-negatif bakterilerin dış zarının ana bileşeni olarak LPS terimi ile sıklıkla birbirinin yerine kullanılır. Gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında septik sendromun başlamasında rol oynayan bakteriyel bileşendir (Bosshart ve Heinzelmann, 2007). LPS, lipit A olarak adlandırılan bir lipit bölümü ile bir polisakkarit zincirden oluşur. Lipit A, LPS'nin toksik etkisinden sorumludur. Polisakkarit grubu bakteriler arasında farklılık göstermektedir (Şekil 1). Gram-pozitif bakteriler endotoksin içermezler, ancak yüzey reseptörlerine de bağlanabilen peptidoglikan (PGN) içerirler.



Şekil 1: (A) Lipopolisakkaritlerin Kimyasal Yapısı (B) LPS: *Salmonella minnesota* (Garidel ve Brandenburg, 2009)

LPS, makrofajların hücresel membranında eksprese edilen toll-like reseptör 4 (TLR4)'e bağlanır ve güçlü bir temsili proinflamatuvar sitokin olan TNF üretmek için 'Nuclear Factor-kB' (NF-kB)'ye bağlı inflamatuvar kaskadı uyarır. LPS'nin uyarımıyla aşırı TNF üretimi, tipik olarak endotel hasarına, çoklu organ işlev bozukluklarına ve septik şoka neden olmaktadır. TNF, sinyallerini çeşitli memeli hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen TNF reseptörü (TNFR) 1 ve 2 aracılığıyla hücrelere iletir. TNFR1, bu

molekölü eksprese eden hücrelerin hücre ölümünü indükleyen sitoplazmik bir “ölüm alanı” içerir (Brenner ve ark., 2015). Böylece, LPS kaynaklı artan TNF üretimi büyük endotoksin/LPS şokuna neden olur. Gerçekten de septik şoklu hastalar plazmada yüksek TNF seviyeleri gösterirler (Kinoshita ve ark., 2019).

2.3.2. İnflamatuar Yanıtın Oluşması

Sepsisteki başlatıcı olay, patojenin “Patojen İlişkili Moleküler Modeller” (PAMP'ler) veya “Zarar İlişkili Moleküler Modeller” (DAMP'ler) ile konak tarafından tanınmasıdır. Bu tanıma, hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. PAMP'ler ve DAMP'ler; mikrobiyal ürünler, konakçı glikoproteinler, lipoproteinler ve nükleik asitlerden oluşur. Karşılıklı olarak, DAMP'ler ve PAMP'ler, TLR'ye C tipi lektin domain 7 ailesi üyesi A (dektin 1) ve C tipi lektin domain 6 ailesi üyesi A (dektin 2) ile bağlanır ve bunlarla etkileşime girer. PAMP'ler ve DAMP'ler, “Antijen Sunan Hücreler” (APC'ler) ve monositlerin yüzeyindeki TLR'leri aktive eder, böylece inflamasyon, hücre metabolizması ve adaptif immünite ile ilgili genlerin transkripsiyonuyla sepsisi başlatır (Rubio ve ark., 2019). Genlerin aktivasyonu sonrasında sinyal yolları, NF- κ B'nin hücre çekirdeğine doğru yer değiştirmesine neden olur. NF- κ B ve “Aktivasyon Proteini-1” (AP-1) sinyali, çeşitli pro-inflamatuar IL, örneğin IL-1, IL-12, IL-18, TNF- α dahil olmak üzere inflamatuvar genlerin erken aktivasyonu ve endotel hücre yüzeyi moleküllerini kodlayan genlerin aktivasyonundan sorumludur (Jarczak ve ark., 2021). Bunlar daha sonra, interferon gamma (IFN- γ), IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin aktivasyonuna, pıhtılaşma sinyallerinin ve negatif geri bildirim ile adaptif bağışıklık sisteminin bileşenlerinin aşağı doğru düzenlenmesine neden olur (Hotchkiss ve ark., 2016). Pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanması sırasında, karşıt bir anti-inflamatuar yanıt gelişir. Bu yanıt, temel pro-inflamatuar sitokinler TNF- α ve IL-

l'in üretimini aşağı düzenleyebilen IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini içerir.

Bağışıklık hücreleri, sepsis sırasında istilacı patojenlerin ortadan kaldırılması ve hücre homeostazının sağlanması için, doğuştan gelen bağışıklık tepkisini gösterip karmaşık hücre içi sinyalizasyon sistemine yanıt verebilir ve etkileşime girebilir. Bu durumda, konak sinyal yollarından bazıları aşırı sistemik inflamasyon ve immün baskılama için fazla sitokin salınımına neden olur (Zhang ve Ning, 2021). Doğal olarak bu iki tepki, istilacı enfeksiyonu yenmek için dengelenir ve koordine edilir. Dengesiz veya kontrolsüz düzenleyici mekanizmalar, doku hasarına ve diğer konakçı hasar süreçlerine neden olur. Hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar yollar artarken, ortaya çıkan inflamasyon doku hasarına yol açar ve sonunda çoklu organ yetmezliğine neden olur. Bu süreçler septik hastalığın erken evrelerinde hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar sitokinlerde artış ile gözlemlenebilir (Andaluz-Ojeda ve ark., 2012; Chaudhry ve ark., 2013).

TLR4, LPS'nin tanınmasında temel bir reseptör olduğu için sepsiste yer alır. Bakteri hücre duvarlarının parçalanması yoluyla, LPS, karaciğer tarafından üretilen bir akut faz proteini olan LPS bağlayıcı protein (LBP) ile birleşir ve dolaşıma katılır. Bu şekilde oluşan kompleks, monositler ve makrofajlar üzerinde bir hücre yüzey reseptörü olan CD14'e yüksek afinite ile bağlanır. Bu, adaptör protein miyeloid farklılaşması birincil yanıt proteini 88'in (MyD88) uyarılmasına neden olur ve IκB kinaz kompleksi (IKK) birtakım ara basamaklar sonucunda aktive olur. Oluşan kompleks sonucu NF-κB inhibitörü olan IκB önce fosforile olur ve ardından parçalanır (Strassl ve ark., 2010).

2.3.2.1. İnflamatuar Yanıtta IL-6'nın Rolü

Sitokinler küçük immün düzenleyici proteinlerdir ve sepsis patofizyolojisinde önemli araçlardır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin humoral bileşenleridir ve hücreler veya

organlar arasında veya doğrudan istilacı patojenler üzerinde haberciler olarak hareket eder. Genel olarak sitokinler; IL, IFN, kemokinleri ve TNF içerir (Matsumoto ve ark., 2018). Tüm sitokinler, oldukça spesifik hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla hareket ederler.

Patojen istilasına karşı önce pro-inflamatuar sitokinlerin salgılandığı, daha sonrasında da sistemik inflamasyonu kontrol etmek için anti-inflamatuar sitokinler salgılandığı, bildirilmektedir (Cicchese ve ark., 2018). Ancak sepsisin karmaşık ve heterojen süreçlerinde bu durum, her zaman tek kural veya prensibe bağlı olarak işlememektedir. Birkaç anti-inflamatuar sitokin pro-inflamatuar özellikler gösterdiği gibi bazı pro-inflamatuar sitokinler de anti-inflamatuar özellikler gösterebilmektedir.

Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler sepsis sendromunun patofizyolojisinde karmaşık ilişkilerle birbirine bağlıdır. Pro-inflamatuar sitokinler, TNF- α ve IL-1'in yanı sıra IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-17'yi içerir. IL-6, en etkin pro-inflamatuar etkileri olan sitokin olarak bilinir. Bununla birlikte, bu pleiomorfik sitokin ayrıca anti-inflamatuar ve rejeneratif özelliklere sahiptir (McElvaney ve ark., 2021). IL-6'nın hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar özelliklere sahip olması sepsis patofizyolojisinde anahtar bir sitokin olduğunu kanıtlar niteliktedir (Hunter ve Jones, 2015).

IL-6, sepsisin özellikle erken bir belirteçidir. Bakteriyemi başlangıcından 2 saat sonra salınır, yaklaşık 6 saatte zirve yapar ve takip eden 24 saatte düşmeye başlar (Eichberger ve ark., 2022). IL-6 seviyeleri klinik sepsisin başlamasından 48 saat öncesine kadar önemli ölçüde yükselir. IL-6, α 2 makroglobulin gibi plazma proteinlerine bağlanması, karaciğerde erken depolanması veya diğer sitokinler tarafından inhibisyonu nedeniyle kısa yarılanma ömrü ile karakterize edilir (Messer ve ark., 1996). Stres ve doku hasarı, bir IL-6 yanıtını tetikleme potansiyeline sahiptir. IL-6, oldukça düşük seviyelerde dolaştığı için nispeten büyük bir örneklem büyüklüğü gereklidir. Dolaşımdaki düzeyleri,

hiperinflamatuar bir hasta fenotipini sınıflandırmada faydalı olabilir (Barichello ve ark., 2022).

IL-6, enfeksiyona karşı bir konak savunması olarak bağışıklık aktivasyonunu başlatan önemli bir faktör olmakla birlikte sepsis durumunda yararlı bir biyobelirteç ve tanısal göstergedir. IL-6 sinyallerinin bloke edilmesi, konak savunmasını etkilediğinden inflamatuvar yanıtları susturur ve bu da enfeksiyonun ciddiyetini değerlendirmeyi zorlaştırır. Bu nedenle, sepsis tedavisinde IL-6 sinyal inhibisyonu gerçekleştirilmeden önce çok dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir (Kang ve Kishimoto, 2021). Sepsis tanısında kullanılan birçok biyobelirtecin karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmalarda, IL-6'nın serum düzeylerinin tanısal değerinin diğer belirteçlerden üstün olduğu gösterilmiştir (Song ve ark., 2019).

2.3.2.2. IL-6

Başlangıçta bir B hücresi farklılaşma faktörü olarak tanımlanan IL-6, bağışıklık cevabını, hemopoezi, akut faz cevabını ve inflamasyonu düzenleyen çok işlevli bir sitokindir. Birden fazla biyolojik aktiviteye sahiptir. IL-6 biyolojik aktivitelerini iki molekül aracılığıyla gösterir; IL-6 Reseptor (IL-6R) ve gp130 (Rose-John ve ark., 2015).

IL-6, fonksiyonel pleiotropiye sahip bir sitokindir ve konak savunmasında önemli bir rol oynar. Enfeksiyonlar veya doku yaralanmaları meydana geldiğinde, IL-6 monositler ve makrofajlar tarafından derhal üretilir ve immün yanıt aktivasyonu yoluyla enfeksiyon ajanlarının uzaklaştırılmasını sağlayarak hasarlı dokuların onarımına katkıda bulunur. Konaktaki stres kaldırıldığında, IL-6 sentezi sona erer, ancak kontrolsüz aşırı veya kalıcı IL-6 üretimi, çeşitli inflamatuvar hastalıkların ve kanserlerin gelişiminde patolojik bir rol oynar, bu da IL-6'nın konak için iki ucu keskin bir kılıç olduğunu gösterir. Bu nedenle, uygun IL-6 ifadesi, konak savunmasında çok önemlidir ve kromatin yapısı,

transkripsiyonel düzenleme ve transkripsiyon sonrası modifikasyon tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Hücrelerin farklılaşma durumu, çeşitli transkripsiyon faktörleri, RNA bağlayıcı proteinler ve mikroRNA'lar bu süreçte yer alır (Rose-John, 2018).

IL-6, kemik iliğine ulaştığında trombositlerin salınımına yol açar. Kırmızı kan hücresi ve trombosit sayılarındaki değişiklikler, rutin klinik laboratuvar incelemelerinde inflamatuvar şiddetin değerlendirilmesi için kullanılır (Kang ve ark., 2020).

2.3.2.3. IL-6'nın Moleküler Yapısı

IL-6 insanda, 28 amino asitlik bir sinyal peptidi dahil olmak üzere 212 amino asitten oluşur ve geni 7p21 kromozomu ile eşlenmiştir (Rose-John ve ark., 2015).

IL6, IL-6R'nin zara bağlı formu (mIL-6R'ye) bağlandığında, gp130'un homodimerizasyonu indüklenir ve IL-6, IL-6R ve gp130'un yüksek afiniteli fonksiyonel reseptör kompleksi oluşturulur. Aynı şekilde, IL-6R'nin çözünür formu (sIL-6R), IL-6 ile bağlanır ve IL-6-sIL-6R kompleksi daha sonra gp130 ile bir kompleks oluşturabilir. Reseptör kompleksinin homodimerizasyonu, daha sonra gp130'un sitoplazmik alanındaki tirozin kalıntılarına fosforile eden Janus kinaz (JAK'ları) aktive eder (Rose-John, 2018).

2.4. Nanoteknoloji

Nano, metrenin milyarda biri (10^{-9} m) olarak tanımlanan ölçek birimdir. Yunancada, cüce veya çok küçük bir şey anlamına gelen bir önek olarak kullanılmaktadır (Bayda ve ark., 2019)

Nanobilim, yapıların atomik veya moleküler ölçekte manipülasyonu ile ilgilenirken, nanoteknoloji, nano boyutlarda üretim yapma, manipüle etme veya yapıları kontrol etme gibi kabiliyetleri içermektedir. Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde maddeyi gözlemleyerek, ölçerek, manipüle ederek, kontrol ederek ve üreterek nanobilim teorisini faydalı uygulamalara dönüştürme yeteneğidir. Nanobilim, inceleme ve uygulamalarında

nanoteknolojiyi kullanmaktadır. Nanobilim tarihi maddenin daha küçük parçalara sonsuza kadar bölünüp bölünemeyeceği tartışılan zamanlara kadar uzanmaktadır. Nanoteknoloji ise 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden biridir.

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), Nanoteknolojiyi; “Benzersiz fenomenlerin yeni uygulamalara olanak sağladığı nano ölçekte (1 ila 100 nm) kimya ve fizikten, mühendislik ve elektroniğe, biyolojiden tıba çok çeşitli alanlarda yürütülen bir bilim, mühendislik ve teknoloji olarak tanımlar.”

Öncelikli olarak nanoteknoloji, yapıların şekil ve boyutlarını nanometre ölçeğinde kontrol etmekle ilgilenmektedir. Nanoteknoloji, nanoölçekte yararlanılması faydalı olan şeylerle ilgilenmektedir. Örnek vermek gerekirse; gıda endüstrisinde, besin maddelerinin üretimini, ambalajlanmasını, raf ömrünü ve biyoyararlanımını büyük ölçüde artırmak için nanomalzemelerden yararlanılmaktadır. Aynı zamanda, nanoyapılar, bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterir. Günümüzde, gıda kalitesini ve güvenliğini tespit etmek için gıda sensörü yapımında çok sayıda farklı nanomalzeme kullanılmaktadır (Hulla ve ark., 2015).

Tıbbi nanomalzemelerin potansiyel faydalarından bazıları, geliştirilmiş ilaç dağıtımı, tıbbi cihazların antibakteriyel kaplamaları, daha iyi cerrahi doku iyileşmesi ve dolaşımdaki kanser hücrelerinin tespittir

Son yıllarda, nanoteknoloji, tıp bilimleri alanında biyomalzemeler, biyosensörler ve biyogörüntüleme gibi tıbbi cihazların kullanımı için temel öneme sahip hale gelmiştir.

2.5. Nanoyapılar

Benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanomalzemeler, bilim ve teknolojinin gelişiminde giderek daha önemli bir rol oynamaya başlamışlardır. Günümüzde iyi kontrol edilen fizikokimyasal özelliklere, yüzey yüküne, şekle ve boyuta sahip çeşitli nanomalzemeler daha kolay üretilmektedir. Yüksek reaktif yüzey alanı ve küçük

parçacık boyutu sayesinde nanomalzeme tabanlı nanosensörler, biyolojik ve biyomedikal uygulamalar için makro ölçekli malzemelere göre daha iyi optik, manyetik ve elektriksel algılama gibi özelliklere sahiptir (Maduraiveeran ve ark., 2018). Kimyasal bileşim, yüzey dokusu, kristal yapı mükemmelliği, kristalografik eksen oryantasyonu vb. nitelikler, hastalıkları teşhis etmek ve hastaların klinik durumunu çeşitli seviyelerde izlemek için in vivo ve in vitro ölçümler ile nanomalzemelerden türetilen elektrotlar üzerindeki elektron taşıma mekanizmasını kontrol eder (Xu ve ark., 2020).

Soy metal elementler (Au, Ag, vb.) tarafından oluşturulan nanoyapı malzemeleri, kimyasal ve biyolojik algılama alanında yoğun ilgi gören ve önemli araştırmalarda ilerleme sağlayan olağanüstü fotoelektrik özellikler, iyi stabilite ve düşük biyotoksisite sergiler (Pant ve ark., 2021). Ayrıca boyut ve şekillerine bağlı olarak fiziksel kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri sebebiyle in vitro medikal analizlerde kullanılmışlardır.

Tıbbi teşhis ve klinik analizde, insan vücudundaki çeşitli hücrelerin veya anatomik bölgelerin tespitinde nanobiyosensörlerin kullanımı potansiyel olarak genişlemektedir. Nanobiyosensörler, klinikte yüksek hassasiyet ve minyatürleştirme özellikleri ile analitik amaçla kullanılabilir. Biyomedikal uygulamaları için, nanomühendislik yoluyla minimum toksisite ve çevresel etkiye sahip nanomalzemelerin tasarımı, etkilenen dokuların net bir şekilde tanımlanmasının yanı sıra belirli hücrelerin ve dokuların seçici olarak hedeflenmesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Chen ve ark., 2015).

2.6. Nanoyapılarda Sensör Uygulamaları

Soy metal nanoyapılara dayalı elektrokimyasal sensörler, sinyal aracılığıyla hem duyarlılığı hem de seçiciliği geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir (Malekzad ve ark., 2017).

Farklı optiksel ve elektrokimyasal yöntemleri kullanılarak çeşitli sitokinlerin tespiti için çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörlerde kullanılan çeşitli

malzemeler arasında nanomalzemeler, küçük boyutları, minyatürleştirme yetenekleri, taşınabilirlikleri ve gelişmiş algılama yetenekleri nedeniyle en fazla ilgiyi çekmiştir (Tanak ve ark., 2021).


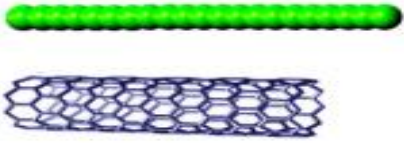
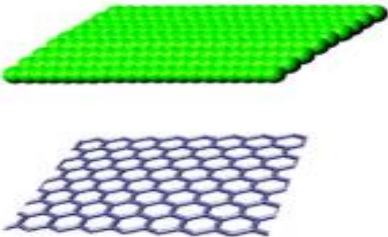
Nanomalzemeler genellikle biyosensörlerin önemli bir bileşeni olan dönüştürücü malzeme olarak kullanılır, ancak aynı zamanda immobilizasyon desteği ve sinyal yükseltici gibi diğer işlevler için de kullanılabilir (Batool ve ark., 2019). Yüksek reaktif yüzey alanı ve yüzey işlevselleştirmenin kolaylaşması sayesinde artan hassasiyet gibi biyosensörlerin gelişmiş performansı elde edilebilir. Nanomalzemelerin analit ile benzer boyutta olması hassasiyeti arttırmaktadır. Biyolojik uygulamalar için bir biyosensör tasarlarlarken biyoyumluluk önemli bir faktördür. Biyosensörlerin spesifik analitlere seçiciliği, biyolojik moleküllerin (örneğin enzimler, antikorlar ve reseptörler) sensör substratı üzerinde hareketsiz hale getirilmesiyle uyarlanabilir (Willner ve Vikesland, 2018).

Algılama için moleküllerin genellikle, enzimler ve antikorlar gibi kimyasal veya biyolojik aktif birimleri kullanarak yüksek seçicilik ve duyarlılık sağlanabilir. Algılayıcı dönüştürücü, ışık, elektrik ve ısı dahil kimyasal veya fiziksel sinyali tanıyabilir. Gelişmiş fotoelektrik özelliklere ve iyi biyoyumluluğa sahip soy metal nanomalzemeler, kimyasal ve biyoalgılama sisteminde önemli bir rol oynamaktadır.

Elektrokimyasal sensörler ve biyosensörler, taşınabilirlikleri ve düşük maliyetleri nedeniyle güçlü analitik araçlardır. İşlevselleştirilmiş nanomalzemelere dayalı elektroanalitik stratejiler, elektrokimyasal algılama ve biyoalgılama yaklaşımlar ile çeşitli biyolojik ve biyomedikal uygulamalarda son derece hızlı, hassas ve seçicidir (Bo ve ark., 2017).

2.7. Nanoyapıların Sınıflandırılması

Nanomalzemeler sıfır boyutlu (0D), bir boyutlu (1D) ve iki boyutlu (2D) olarak sınıflandırılabilir. 0D, nanoparçacıklardan (NP'ler) ve kuantum noktalarından oluşan temel birimdir. 1D; nanoçubuklar (NR'ler), nanotüpler (NT'ler), nanoteller (NW'ler) gibi doğrusal geometrik şekillere karşılık gelmektedir (Şekil 2). Kristal, yanal yön boyunca büyüdüğüde, temel olarak nanodisklerden, nanopullardan, nanotabakalardan ve nanoduvarlardan oluşan 2D olarak bilinen yüzey geometrik şekli oluşur. 0D, 1D ve 2D sınıfları, bir araya gelip hacmi olan bir geometrik şekile dönüştüğünde ise bu yapılar 3D adını alırlar (Napi ve ark., 2019). Biyosensörün performansını artırmak için (tespit limiti, hassasiyet ve tepki süresi), nanoyapıların boyutları değiştirilebilir.

	Biçim	Nanomateriyal Tipi
0D		Nanopartikül Nano-Kafes Bucky-Küresi (Fulleren Molekülü) Kuantum Noktaları
1D		Nanotüp Nanotel Nanoçubuk Nanofiber Nanoşerit Kuantum Tel
2D		2D İnce Film 2D Levha Kuantum Kuyusu

Şekil 2: Nanoyapıların Sınıflandırılması (Singh ve ark., 2017)

2.7.1. Nanoparçacıklar

NP'ler, 1 nm ile 100 nm arasında değişen çok küçük ölçekte üretilen ve kullanılan küçük kimyasal maddeler veya malzemelerdir. Genel olarak, kimyasal bileşimlerine göre iki tipe sınıflandırılabilir: organik ve inorganik NP'ler. Organikler, esas olarak

polimerler, eksozomlar, lipozomlar, protein bazlı NP'ler içerirken inorganikler, silika NP'ler, metal NP'ler, karbon NT'ler, kuantum noktalar ve benzerlerinden oluşur. Kimyasal yapılarının yanı sıra, NP'lerin boyut, şekil, esneklik, yüzey yükü ve yüzey işlevselleşmesi gibi fiziksel özellikleri de vücuttaki işlevlerini önemli ölçüde şekillendirebilir ve nanoteknolojinin biyoloji ve tıpta uygulanması için sınırsız potansiyel sağlayabilir (Ou ve ark., 2019).

NP'lerin kendisi basit moleküller değildir. Üç katmandan oluşur;

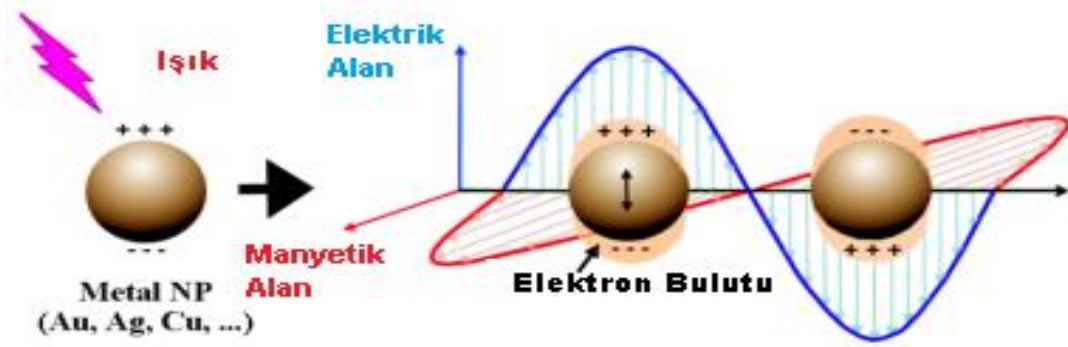
- Çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler ile işlevselleştirilebilen yüzey katmanı.
- Her yönüyle çekirdekten kimyasal olarak farklı bir malzeme olan kabuk tabakası
- NP'nin merkezi kısmı olan çekirdek

Bu tür özellikleri nedeniyle NP'ler, birçok alanda araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. NP'ler; ilaç dağıtımı, kimyasal ve biyolojik algılama, gaz algılama, CO₂ yakalama gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2019).

2.7.1.1. Metal Nanoparçacıklar

Nanomalzeme araştırmalarının gelişmesi soy metal nano malzeme çalışmalarına da yansımıştır. Özgün olarak hızlandırıcı, elektriksel ve optiksel özelliklerinden dolayı soy metal nano malzemeler; kataliz, sensörler ve biyosensörler, enerji dönüşümü ve enerji depolama cihazları gibi alanlarda uygulamalarda sıklıkla kullanılmıştır.

Biyolojik algılama bağlamında karbon NT'ler, silika NP'ler, kuantum noktalar, polimerik NP'ler ve metal NP'ler (MNP'ler) dahil olmak üzere çeşitli türlerde NP'ler incelenmiştir. Bu nanoparçacıklar arasında, altın NP'ler (AuNP'ler) ve AgNP'ler gibi MNP'ler, nano ölçekte benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Malekzad ve ark., 2017).



Şekil 3: MNP'lerin Manyetik ve Elektrik Alandaki Hareketi(Singh ve ark., 2017)

MNP'ler tamamen metal öncülerinden yapılıdır. Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) özellikleri nedeniyle, bu NP'ler benzersiz optoelektrik özelliklere sahiptir. Bakır (Cu), altın (Au) ve gümüş (Ag), gibi alkali ve soy metallerin NP'leri, elektromanyetik güneş spektrumunun görünür bölgesinde geniş bir absorpsiyon bandına sahiptir. Bunlar dışında platin (Pt) ve paladyum (Pd) gibi soy metal NP'ler (NMNP'ler), de boyut ve şekle bağlı fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle in vivo ve in vitro biyomedikal analizler, elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamalarında kullanılmıştır (Khan ve ark., 2019).

NMNP'lere dayalı elektrokimyasal sensörler, sinyal amplifikasyonları yoluyla hem duyarlılığı hem de seçiciliği geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Biyomedikal uygulamalar için, nanomühendislik yoluyla minimum toksisite ve çevresel etkiye sahip NP'lerin tasarımı, etkilenen dokuların tanınması üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. NMNP'ler; teşhis, klinik, farmasötik ve terapötikleri gibi çeşitli analitik yaklaşımların geliştirilmesine yöneliktir (Malekzad ve ark., 2017). NMNP'ler, kişiselleştirilmiş tıp ve tanıdaki önemlerinden dolayı son birkaç on yılda tıp alanında büyük öneme sahip olmuştur. Özellikle; PtNP, AuNP ve AgNP'ler, antimikrobiyal ve antiviral ajanlar, teşhis, ilaç taşıyıcıları ve görüntüleme problemleri gibi biyomedikal olanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır

(Alba-Patiño ve ark., 2022). Aşırı oksidasyona direnç göstermeleri tercih edilmelerinde önemli bir özelliktir. Son yirmi yılda, yüksek oranda fizikokimyasal, optik ve termal özelliklere ve biyokimyasal işlevselliklere sahip malzemeler sağlayan daha uygun maliyetli ve sağlam NMNP sentez yöntemlerinin yeni stratejilerinin geliştirilmesinde muazzam bir ilerleme olmuştur (Habibullah ve ark., 2021).

2.8. Gümüş Esaslı Nanoyapıların Sensör Uygulamaları

AgNP tabanlı elektrokimyasal sensör ve biyosensörler, yüksek iletkenlikleri, güçlendirilmiş elektrokimyasal sinyalleri ve mükemmel biyoyuumlulukları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda önemli bir yer tutmaktadır. AgNP'ler hastalıkların erken aşamada tespitinde ve tedavisinde; hastalık belirteçleri, biyolojik ve bulaşıcı ajanlar gibi birçok uygulamada kullanılmaktadırlar (Tan ve ark., 2021).

Metal oksitler, silikat ağları, polimerler, grafen, lifler, dendrimerler vb. gibi matrislere sahip gümüş nanoparçacıklara dayalı nanokompozit yapımı, biyoalgılama performansına önemli katkılar sağlamaktadır. Biyosensör platformunun hassasiyeti ve kararlılığı, ağ veya matrislerde gümüş nanoparçacıkların homojen dağılımına ve şekline bağlıdır (Maduraiveeran ve ark., 2018).

Bugüne kadar, biyosensör üretimi için metal, metal oksit ve karbon NP'ler gibi birçok türde nanomalzeme kullanılmıştır. Bu nanomalzemeler farklı algılama sistemlerinde farklı işlevlere sahip olsalar da temelde sinyal iletimi; optik, elektrokimyasal ve manyetik yöntemlerle gerçekleşmektedir(Lohcharoenkal ve ark., 2021).

AgNP'ler antimikrobia, antiviral ve antifungal özellikleriyle çevresel, endüstriyel, zirai ve biyomedikal birçok alanda kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanımları gıda ve tekstilin yanı sıra su arıtmada da yaygındır. Filtrelerde kullanımı hava kirliliğini belirli düzeyde önlemektedir. Bitki nanoteknolojisinde kullanımı, yeni zirai olanaklar geliştirmektedir(Tufail, 2022). Biyomedikal uygulamaları ise son yıllarda oldukça

popüler ve yararlıdır. Kanser, HIV ve viral hastalıklar, Sepsis ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi yaşamı tehdit eden çeşitli hastalıkların erken teşhis edilme çalışmaları biyomedikal alanında büyük bir öneme sahiptir. NP konjuge problemler, hedef biyomoleküllerin tespitini kolaylaştırıldığı bilinmektedir. Diğer nanoparçacıklar gibi, AgNP'ler de biyosensör alanına sıklıkla kullanılmaktadır. AgNP'lerin, biyomoleküllerin tespitinde yüksek verimlilikle çalıştığı gözlenmiştir. AgNP'ler mükemmel stabilite ve hassasiyet gösterir (Tan ve ark., 2021).

2.8.1. Gümüş Esaslı Nanoyapıların Sepsis Teşhisinde Kullanılması

Sepsis erken teşhis edilip tedavi edilmezse ölümcül olabilecek bir hastalıktır. Bu nedenle sepsis şüphesi bulunan hastalarda farklı zamanlarda biyobelirteçlerin ve patojenlerin hızla ölçülmesini gerektirir. Sepsis teşhisine yönelik mevcut kullanımlar, bu tıbbi zorluğun üstesinden gelmek için hızlı, hassas veya yeterince spesifik değildir. Elektrokimyasal biyosensör uygulamaları, duyarlılıkları, seçicilikleri ve tekrarlanabilirlikleri nedeniyle çeşitli biyobelirteçlerin tespiti için daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sepsis teşhisi için en popüler biyobelirteçler; laktat, prokalsitonin (PCT), sitokinler, C reaktif protein (CRP), miRNA'lardır (Alba-Patiño ve ark., 2022). CRP, enfeksiyona yanıt olarak inflamasyon sırasında salınan yaygın bir sepsis biyobelirteçtir. Ayrıca inflamasyonun başlangıcında Il-6 gibi sitokinlerin salınımında da rol oynamaktadır. CRP, enfeksiyonun şiddeti ile iyi bir korelasyon gösterir ve bu nedenle sepsis hastalarında erken tanıya yardımcı olur. Laktat doku oksijenasyonunu izlemek için yararlı bir biyobelirteçtir. PCT, kalsitonin hormonunun öncüsüdür. Parankimal hücreler tarafından esas olarak bakteriyel toksinlerin varlığına yanıt olarak salınır, ancak mantar veya virüslere ikincil enfeksiyonlarda da yükselmiş olarak bulunabilir. Il-6 gibi pro-inflamatuar sitokinler, sepsisin erken teşhisine yardımcı olmak için kullanılmıştır.

Sağlıklı bireyde bazal Il-6 konsantrasyonu 10 pg/ml'nin altındadır, ancak bu konsantrasyonun kronik inflamasyon ve yaşlanma ile değişebileceği bilinmektedir. Il-6, şüpheli sepsis vakalarını doğrulamak için yararlı bir biyobelirteçtir ve tedaviyi izlemek için de kullanılır (Alba-Patiño ve ark., 2022).

Literatürde AuNP biyosensörler ile sitokin tayini veya sepsis biyobelirteçlerini tanımasına ilişkin çalışmalar olmasına rağmen AgNP biyosensörler ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır (Giorgi-Coll ve ark., 2020; Taratummarat ve ark., 2018). Çalışmamız bu bakımdan hem biyolojik hem de elektrokimyasal alanda özgün bir nitelik taşımaktadır.

2.8.1.1. Sonokimyasal Yöntemle Üretilmiş Biyomatris İçerisinde Gümüş Nanoparçacıklar

Sonokimya, güçlü ultrason radyasyonunun (20 KHz-10 MHz) uygulanması nedeniyle moleküllerin kimyasal reaksiyona girdiği araştırma alanıdır (Elsupikhe ve ark., 2015). Sonokimyasal yöntem genel itibariyle kavitasyon ve nebulizasyonu fenomenleriyle bilinmektedir. Farklı türde nanomalzemeler, özellikle Au, Ag, Pt gibi NMNP'ler elde etmek için çalışılmıştır. Sonikasyonda kavitasyon, çok çeşitli nano yapıların sentezi için uygun koşullar yaratan sıvı içinde bir baloncukun oluşumunu, büyümesini ve içe doğru patlamasını içerir (Kithokoi ve ark., 2019). Çözeltide kabarcıklar büyür ve maksimum boyuta ulaştıklarında kabarcıklar çökerek yüksek sıcaklık ve basınç oluşturur. Bu koşullar kimyasal bağların kırılmasına ve serbest radikallerin oluşmasına neden olur (Elsupikhe ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

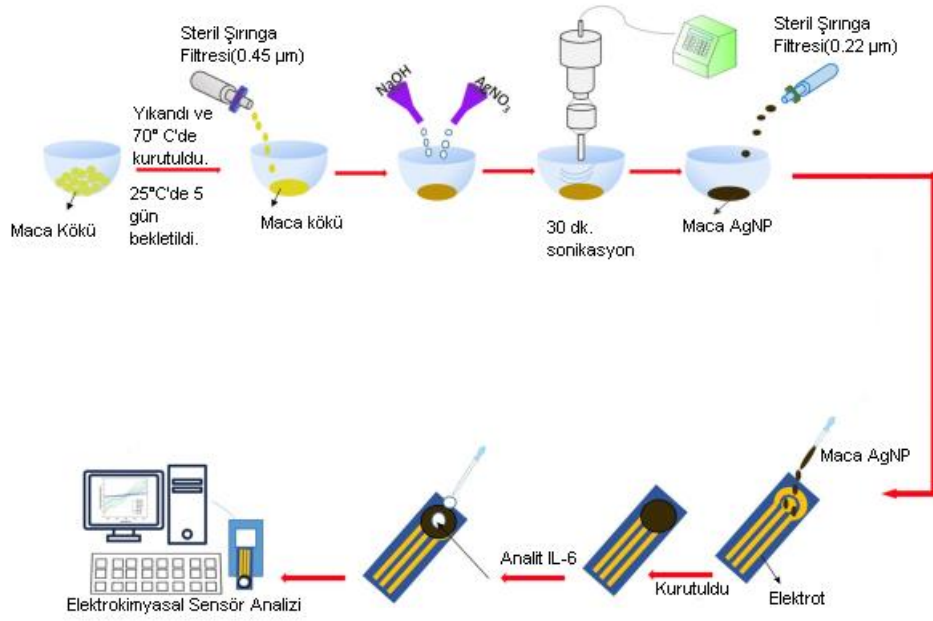
3.1. GEREÇLER

Nanoparçacık sentezlenmesi sırasında; Maca kökü tozu (Arifoğlu Baharat ve Gıda San. LTD. ŞTİ.), sodyum hidroksit (NaOH)(Merck), gümüş nitrat (AgNO_3)($\geq 99.0\%$), askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)(l-askorbik asit 99%), glukoz (d-+)-glukoz monohidrat, 99.0%), laktoz (α -laktoz monohidrat, 99%), üre (ACS reagent, 99%)(Sigma Aldrich), ethanol kullanılmıştır. Hücre kültürü deneylerinde de hücre medyumu(RPMI-1640), fetal bovine serum(FBS) (Pan Biotech), LPS (Sigma Aldrich), sodyum bikarbonat (NaHCO_3), Penisilin-Streptomisin kullanılmıştır. Ayrıca biyonosensör ölçümlerinde kalibrasyonu sağlamak için insan IL-6 proteini (AFG Scientific) ve IL-6'nın bağlanması için de insan IL-6 protein reseptörü (AFG Scientific) kullanılmıştır. İnsan IL-6 ELISA Kit (AFG Scientific) biyonosensörün etkinliğini karşılaştırmak için kontrol amaçlı kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Nanoparçacık Sentezlenmesi

Nanoparçacık sentezi Karakuş ve arkadaşlarının çalışması baz alınarak yapıldı(Karakuş ve ark., 2022). AgNP'lerin biyosentezi, 25°C'de ultrasonikasyon kullanılarak hazırlanır. Maca kökü tozu saflaştırılmak için yıkanır ve 70°C'de vakumlu bir fırında 5 saat kurutulur. 100 ml distile suya 1 g numune ilave edilerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 5 gün bekletilir. Daha sonra 0,45 μm 'lik şırınga filtresi kullanılarak süzülür. 0,42 g AgNO_3 , 250 ml distile su içinde çözülür. 0,1 g NaOH 125 ml distile su içinde çözülür, Ag çözeltilisine damla damla ilave edilir ve oda sıcaklığında 30 dakika sonikasyona tabi tutulur. Son olarak, hazırlanan nanoyapı, 0,22 μm 'lik bir steril şırınga filtresi kullanılarak süzülür (Şekil 4).



Şekil 4: Biyonanosensör Hazırlanması ve Ölçüm Alınması (Karakuş ve ark., 2022)

3.2.2. Nanoparçacık Karakterizasyonu

Hazırlanan nanoyapının, SEM(Scanning Electron Microscope-Taramalı Elektron Mikroskobu), TEM(Transmission Electron Microscope-Transmisyon Elektron Mikroskobu), ve FTIR(Fouirer Transform Infrared Spectroscopy-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır.

3.2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemesi

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi ve boyut analizleri SEM incelemesi ile yapıldı. Örnekler karbon bant üzerine yüklenir ve yüksek vakum altında üzerlerine altın püskürtülür. 7-10 kV ve 10.000X-80.000X büyütme ile görüntüleme yapılır.

3.2.2.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemesi

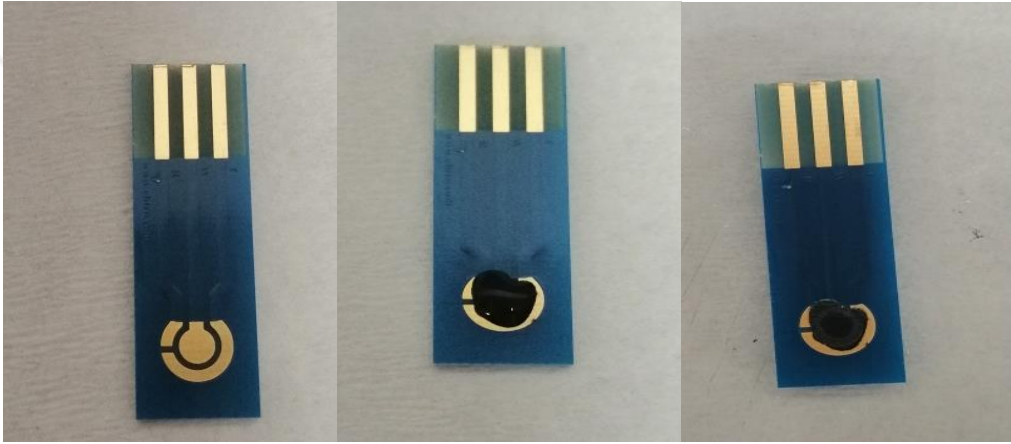
Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesi ve boyut analizleri TEM incelemesi ile yapıldı.

3.2.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) İncelemesi

AgNP'lerin bağlanma özelliklerinin analizi FTIR ile yapıldı. Örnekler cihazın ölçüm aparatı altına yerleştirilerek sıkıştırılır ve 4000-400 cm^{-1} frekans aralığında ölçümler alınır.

3.2.2.4. Elektrotun AgNP ile Kaplanması

Hazırlanan sıvı haldeki nanoyapı her bir elektrotta 10 μl olarak damlatılır. Nanoyapının kuruması için 60°C ısıtılmış fırında 5 dakika kadar bekletilir. Nanoyapının kuruyup elektrotta yapışması iletkenliği artırarak gerçekleşecek olan tepkimeyi hızlandırır.



Şekil 5: Elektrotun Nanoyapı ile Kaplanması

3.2.2.5. Biyobiosensörün Kalibrasyonu

Öncelikle, IL-6R ml'de 10 pg olacak şekilde seyretilir. Hazırlanan AgNP kaplı elektrotta 10 μl IL-6R damlatılarak 1 saat +4°C'de inkübe edilir. Sepsis hastalarının kanındaki IL-6 miktarının, 12-20 pg aralığında değiştiği bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, 16 pg, 20 pg ve 24 pg olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda ölçüm alınır. Ölçüm yapılacak olan konsantrasyondan 10 μl elektrotun nanoparçacık kaplı yüzeyine damlatılır ve elektrot cihaza yerleştirilir. EBTRO Potansiyostat programı yardımıyla ölçüm alınır.

3.2.3. *In Vitro* Deneyler

LPS'ye (10 ng/ml) maruz kalan insan total kanından yüksek konsantrasyonlarda farklı sitokinlerin kandaki üretimine izin veren bir *in vitro* sepsis modeli kullanılır. LPS

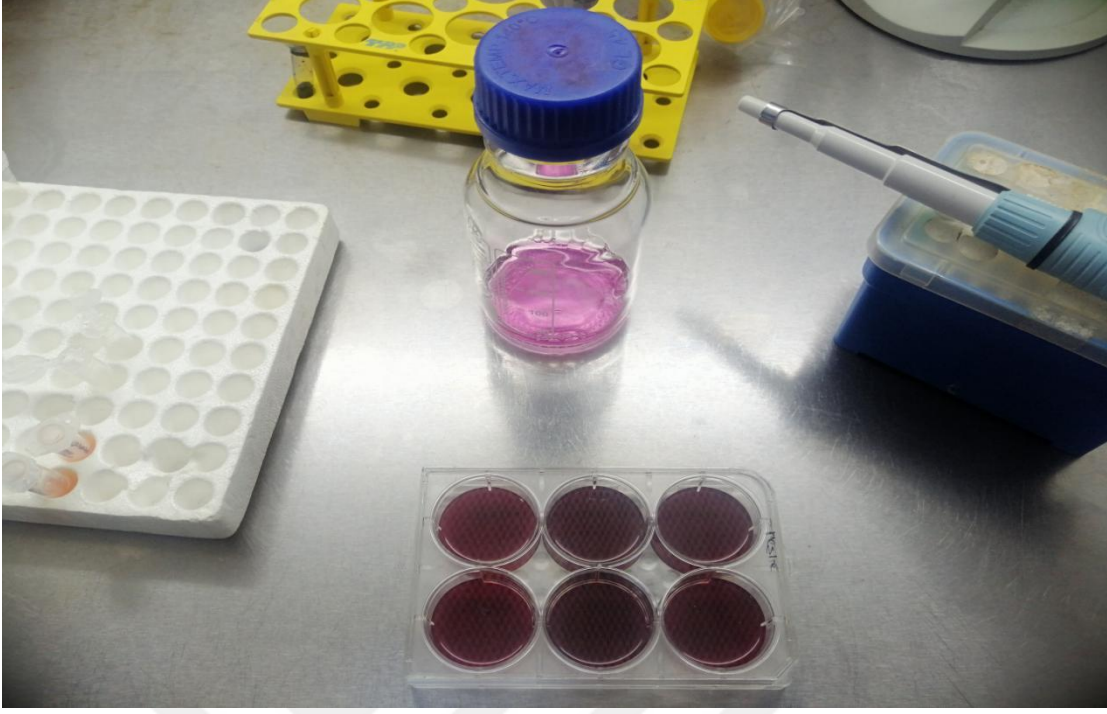
uygulaması, sepsisin başlangıçtaki klinik özelliklerin çoğunu taklit ederek TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin artışı sağlar.

3.2.3.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Bu aşamada, Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.09.2021/32 sayılı kararıyla 34 sağlıklı ve gönüllü kişi, gönüllü bilgilendirme formu doğrultusunda çalışma hakkında bilgilendirilir. Görevli doktor yardımıyla sağlıklı gönüllülerden 8 ml kan alınır. Alınan kan EDTA'lı tüplere konur.

3.2.3.2. *In Vitro* Tam Kan Sepsis Modelinin Geliştirilmesi

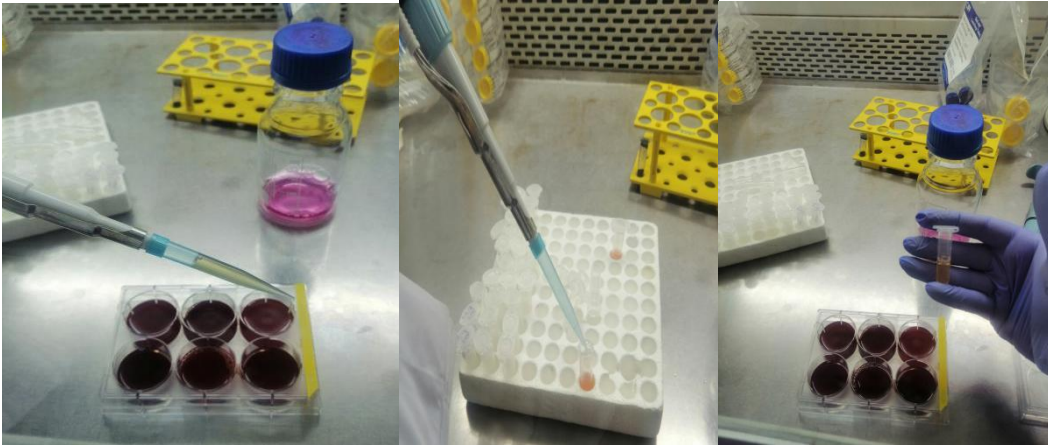
In Vitro tam kan sepsis modelinin uygulanmasında Dorresteijn ve arkadaşlarının çalışmalarından yararlanılmıştır(Dorresteijn ve ark., 2010). Alınan kan, LPS'li medyum ile muamele edilerek *in vitro* olarak lökositler uyarılır ve sitokin salgısı artırılır. Tam kan, 1:1 oranında %10 FBS içeren RPMI-1640 medyumuyla seyreltilir. Daha sonra 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 2 ml olacak şekilde konur. Üzerine her kuyucuğa tekrar 2 ml olacak şekilde 10 ng/ml LPS içeren %10 FBS'li RPMI-1640 medyum eklenir. Kontrol grubu için de LPS içermeyen RPMI medyum eklenir. Kan, %5 CO₂ ve 37°C'de etüvde inkübe edilir.



Şekil 6: Kan Örneklerine LPS'li Medyum Eklenmesi

3.2.3.3. Sitokin Ölçülecek Serumların Toplanması

İnkübasyona konulan kan örneklerinden 6. saatte 1 ml serum örneği alınır. Kontrol ve uyarılmış kan olmak üzere 2 farklı örnek alınmış olur. Serum örnekleri 1,5 ml'lik ependorflara konur. -20°C 'de ölçüm yapılacak zamana kadar bekletilir.



Şekil 7: Kan Örneklerinden Serum Toplanması

3.2.4. Biyonosensör İle Sitokin Ölçümü Yapılması

Toplanan serum örneklerinden hazırlanan biyonanosensör ile devirli voltametri yardımıyla ölçüm yapılır. Devirli voltametri, genelde redox tepkimeleri sırasındaki elektron transferinin oluşturduğu akımı ölçen elektrokimyasal bir ölçümdür. Devirli voltametri cihazı, ölçümleri EBTRO Potansiyostat programıyla bilgisayar üzerinden yapmaktadır. Cihaz, bilgisayar programına bağlı olarak çalışmaktadır. Artan sitokin salgısı sonucu serum plazmada serbest halde dolaşan IL-6'lar, IL-6R'ne bağlanarak bir redox tepkimesi gerçekleştirir. Nanoparçacıklar üzerinde gerçekleşen redox tepkimeleri tersinirdir. Elektrot yüzeyinde önce indirgenmiş alan taranıp pik değeri alınır sonrasında potansiyel ters tarama yaparak yükseltgenme tepkimeleri taranır. +X ve -X doğrultularındaki potansiyel alanlar birbirine eşittir. Elektrik alanın toplamda 0 olması nanoparçacık ve analit arasındaki tepkimenin gerçekleştiğini ve analitin aynı düzeyde akımı ilettiğini göstermektedir. Bu tepkime sonucunda elektrottaki elektriksel yük değişir ve polimerin iletkenliği sayesinde aradaki potansiyel fark kaynaklı akım ölçülebilir düzeye ulaşır.



Şekil 8: Devirli Voltmetri Cihazı Ve EBTRO Potansiyostat Programı

3.2.4.1 *In Vitro* Modelinden Elde Edilen Serumlar İle Sitokin Ölçümü Yapılması

Kalibrasyon aşamasında olduğu gibi gümüş nanoparçacık kaplı elektrotta 10 µl IL-6R damlatılarak 1 saat +4°C'de inkübe edilir. Sonrasında üzerine ölçüm yapılacak olan örnek elektrotun nanoparçacık kaplı yüzeyine 10 µl damlatılır ve elektrot cihaza yerleştirilir. EBTRO Potansiyostat programı yardımıyla ölçüm alınır.

3.2.5. IL-6 ELISA Kiti İle Biyonosensör Etkinliğinin Kontrol Edilmesi

Biyonosensörün etkinliği İnsan IL-6 ELISA Kit yardımıyla kontrol edilir. ELISA standartları hazırlanır ve numuneler belli oranda seyreltilerek plaka okuyucuyla ölçüm alınır. Ölçüm sonuçları biyonosensör ile yapılan ölçümlerle karşılaştırılır ve hassaslıkları değerlendirilir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

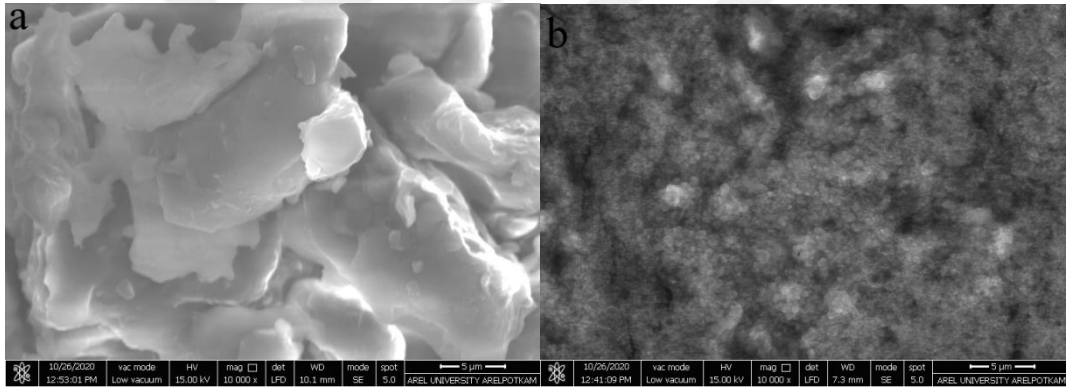
Çalışmamızda deneysel verilerin istatistiksel analizinde Graphpad Prism 5.0 programı kullanıldı. $P < 0,05$ kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde t testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Nanoyapılara Ait Bulgular

4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM tekniği, nanoyapıların morfolojisinin tanımlanmasına izin veren yüzey teknikleri arasında en çok kullanılanlardan biridir. Çalışma kapsamında; AgNP'lerin yüzey karakterizasyonları SEM tekniği ile araştırıldı. Nanoyapıların SEM sonucu, yapının düzensiz bir şekle ve buruşuk bir yüzeye sahip olduğunu ortaya çıkardı. Ek olarak, 10.000× büyütme ile AgNP'lerin 10–40 nm partikül boyutu aralığında küresel bir şekle ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 9).

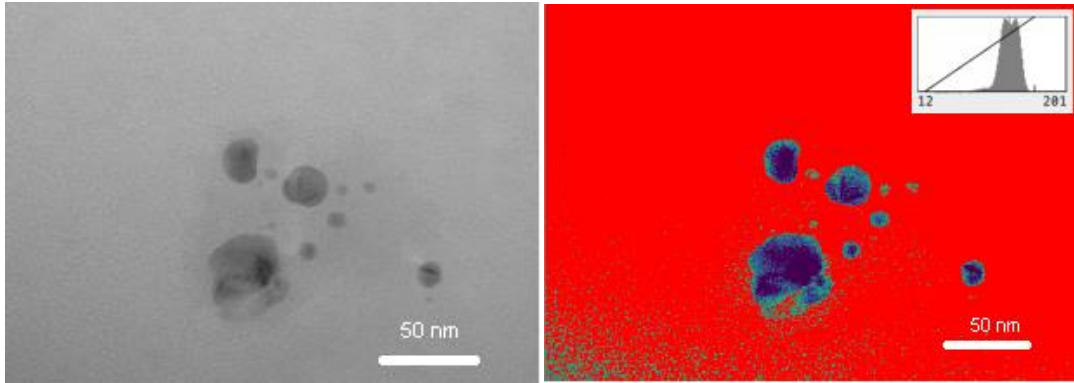


Şekil 9: a) Maca kökü (10.000×) b) Maca AgNP (10.000×)

4.1.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

AgNP'lerin TEM görüntüleri, nanoyapının 10 ila 40 nm arasında değişen partikül boyutunda polidispers bir yapıya sahip olduğunu gösterdi. Hazırlanan AgNP'ler, TEM görüntülerinde tek tip ve küresel bir şekle sahipti. TEM sonuçları, SEM sonuçlarımızla uyumlu, küçük boyutlu nanopartiküllerin varlığını açıkça göstermektedir. TEM, nanoparçacıkların morfolojisinin tanımlanmasına izin veren en gelişmiş yüzey tekniklerinden biridir. Ancak bazen operatör becerisi, cihaz kalibrasyonu ve malzeme yapısı nedeniyle yüksek kaliteli TEM görüntüleri elde etmek kolay olmamaktadır. Bu

nedenle, yapay zeka tabanlı yeniden odaklama yöntemini kullandık. Bu çalışmada, yapay zeka algoritmaları kullanılarak kırmızı renge bağlı eşik modu ile 8 bitlik görüntü stili ile hazırlanan AgNP'lerin TEM görüntüsünün renk histogramını elde ettik. Ayrıca, matristeki (kırmızı) AgNP'lerin (yeşil ve mavi) dağılımının net bir görüntüsünü elde etmek için ImageJ yazılımını kullandık (Şekil 10).

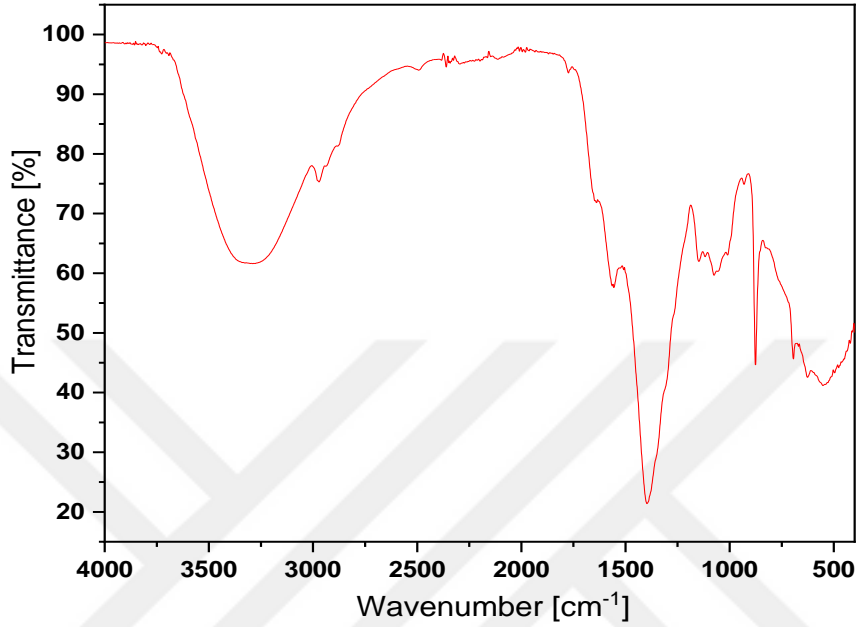


Şekil 10: AgNP'lere ait TEM görüntüleri

4.1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi

FTIR analizi kapsamında; maca kökü ve AgNP'ler üzerinde çalışıldı. Elde edilen sonuçlara göre; maca kökünün karakteristik pikleri; 3296.72 cm^{-1} (O–H), 2923.56 cm^{-1} (C–H), 1610.27 cm^{-1} (–NH), 1406.82 cm^{-1} (O–H), 1330.64 cm^{-1} (O–H) ve 1012.45 cm^{-1} (C–O). AgNP'lerin karakteristik FTIR pikleri; 3289.96 cm^{-1} (O–H), 2970.08 cm^{-1} (C–H), 1639.20 cm^{-1} (–NH), 1556.27 cm^{-1} (C=O), 1397.17 cm^{-1} (O–H) ve 1055.84 cm^{-1} (C–O) olarak gözlemlendi. 1148.4 cm^{-1} 'deki bant, karbonil grubunun karakteristiğidir (Şekil 11). Bu bant aynı zamanda, polifenol oksidasyonu nedeniyle AgNP'lerin FTIR spektrumlarında da mevcuttu. Bitki özlerinin, amid ve karbonil fonksiyonel gruplarının AgNP'lerin oluşum sürecinde indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak katıldığı bilinmektedir. Bununla beraber, maca kökünün sonokimyasal sürecinin, büyük ölçüde Ag nanoyapılarının indirgenmesi ve stabilizasyonunda rol oynadığı sonucuna vardık.

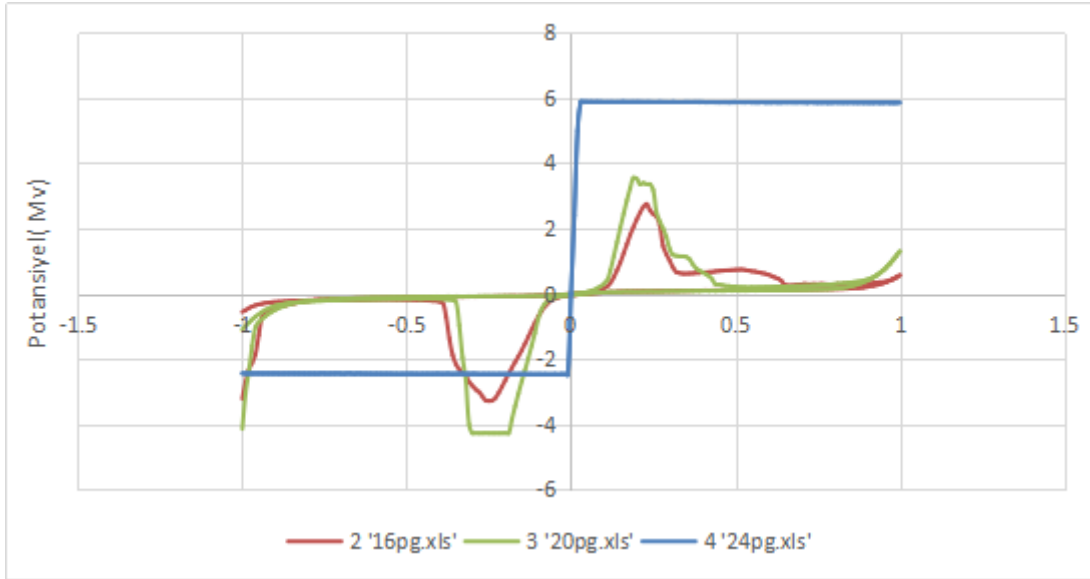
FTIR sonuçları, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ ve $-\text{NH}$ gruplarının Ag^+ iyonlarının Ag'ye indirgenmesinde rol oynadığını doğrulamaktadır.



Şekil 11: AgNP'lere ait FTIR grafiği

4.2. Biyonanosensör Kalibrasyonuna Ait Bulgular

IL-6 oranının kantitatif analizi için öncelikle çeşitli konsantrasyonlarda IL-6 proteini ölçümü yapıldı. 16 pg, 20 pg ve 24 pg olmak üzere 3 farklı konsantrasyondan alınan ölçümlere dayanan kalibrasyon eğrisi şekilde gösterilmiştir (Şekil 12). IL-6 proteini ile yapılan ölçümlerin sonucuna göre, en yüksek konsantrasyon olan 24 pg'dan 6 Mv akım geçmektedir. Konsantrasyon ve akım arasında doğrusal bir ilişki vardır.



Şekil 12: Biyonanosensör Kalibrasyon Grafiği

4.3. *İn Vitro* Deneylere Ait Bulgular

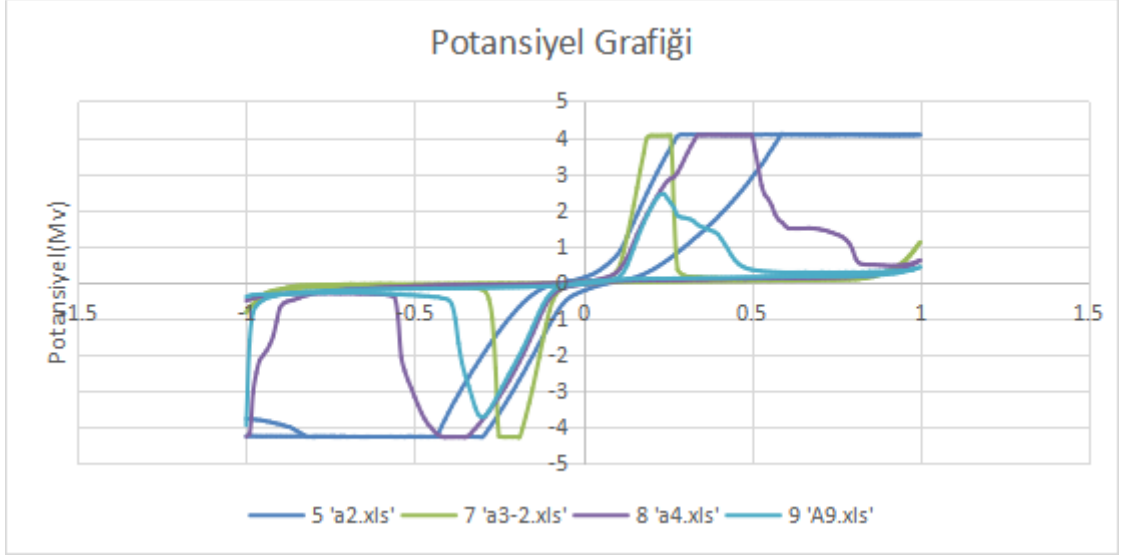
4.3.1. *İn Vitro* Tam Kan Sepsis Modeli Analizi

İnsan total kanının LPS'ye maruz kalması, sepsisin başlangıçtaki klinik özelliklerin çoğunu taklit ederek TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin artışı sağlar. Çalışma kapsamında, gönüllülerden alınan kan medyum ile 1:1 oranında seyreltildi. Daha sonra her kuyucuğa 2 ml seyreltilmiş kan koyuldu. Seyreltilmiş kana ml'de 10 ng LPS içeren 2 ml medyum eklendi. Seyreltme faktörü de hesaba katıldığında 40 ng LPS ile hazırlanmış kan örneklerinin serumlarında literatürde belirlenen normal insan kanındaki IL-6 konsantrasyonundan daha yüksek oranda IL-6'ya rastlandı. Bu sonuçlara göre uygulanan sepsis modelinin kanda IL-6 salgısını arttırdığı ve literatüre katkı amaçlı örnek bir çalışma olduğu söylenebilir.

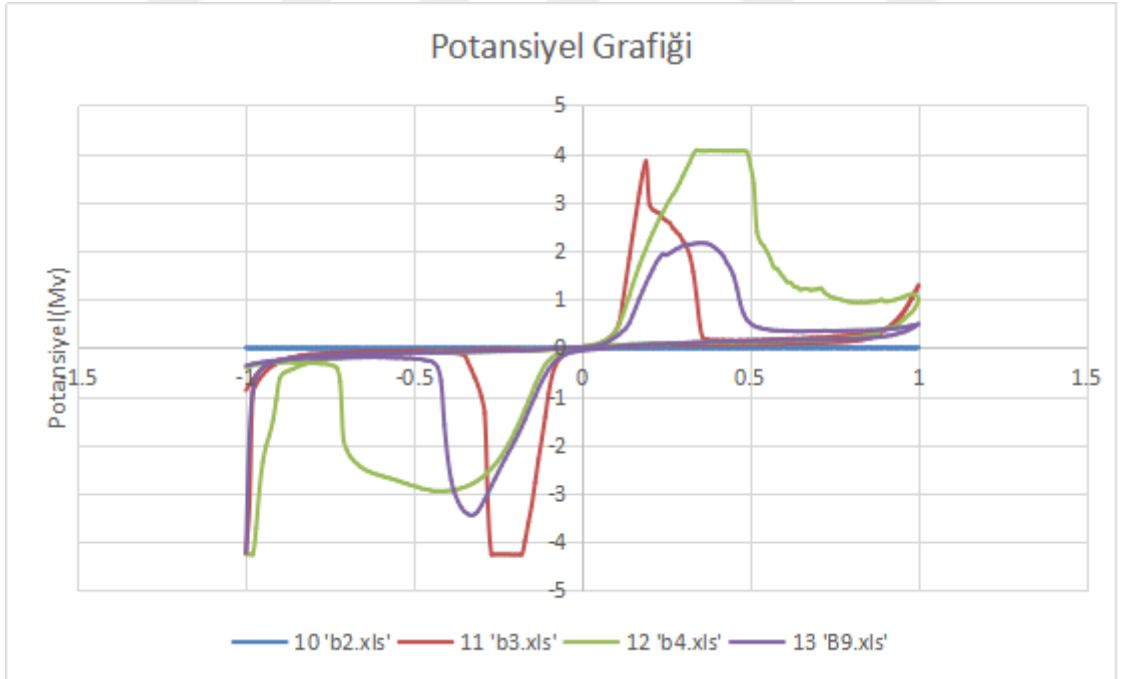
4.4. Biyonanosensör Ölçümüne Ait Bulgular

4.4.1. Kan Serumlarında Sitokin Ölçümüne Ait Sonuçlar

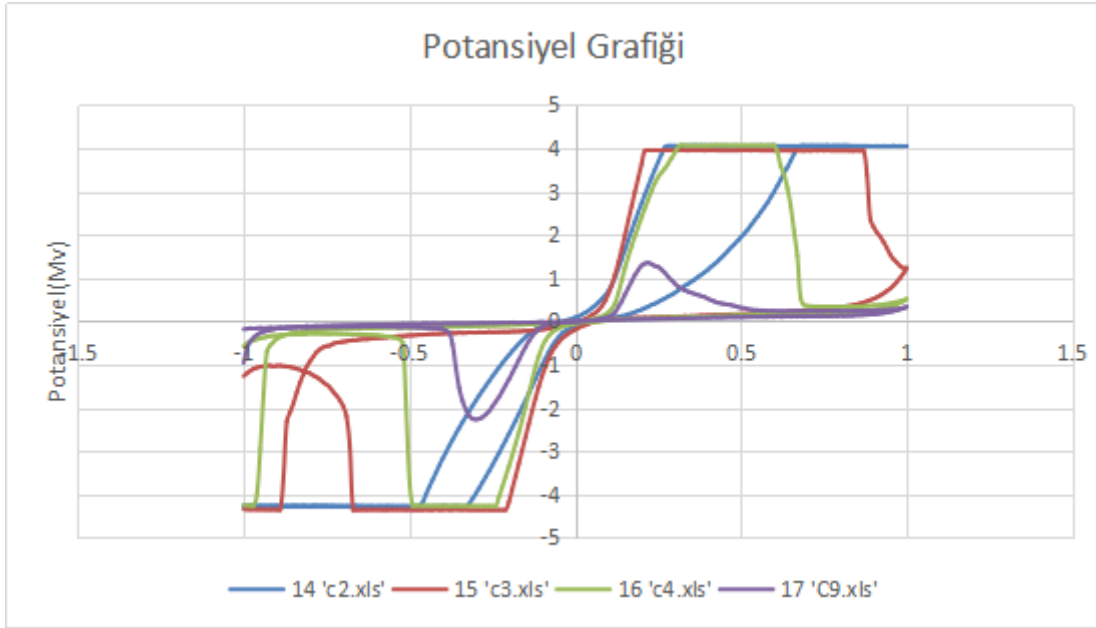
Gönüllülerden alınan kan serum örneklerinin potansiyel grafikleri herhangi bir sınıflandırma içermeden 3, 4 veya 5'li gruplar halinde çizilmiştir. Grafikler; şekil 13, şekil 14, şekil 15, şekil 16, şekil 17, şekil 18, şekil 19 ve şekil 20 ile gösterilmektedir.



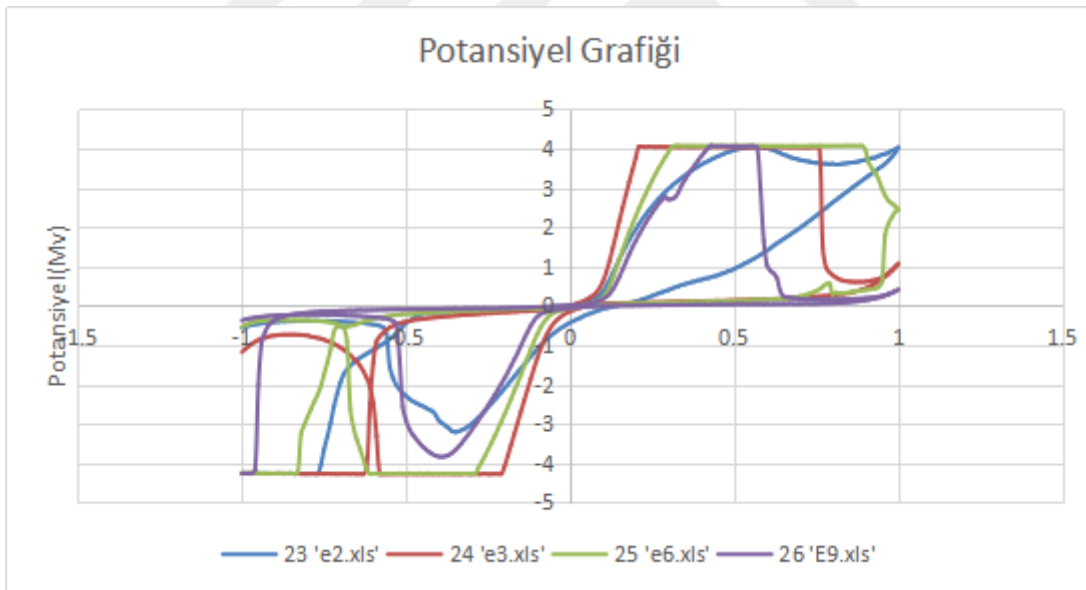
Şekil 13: Biyonosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



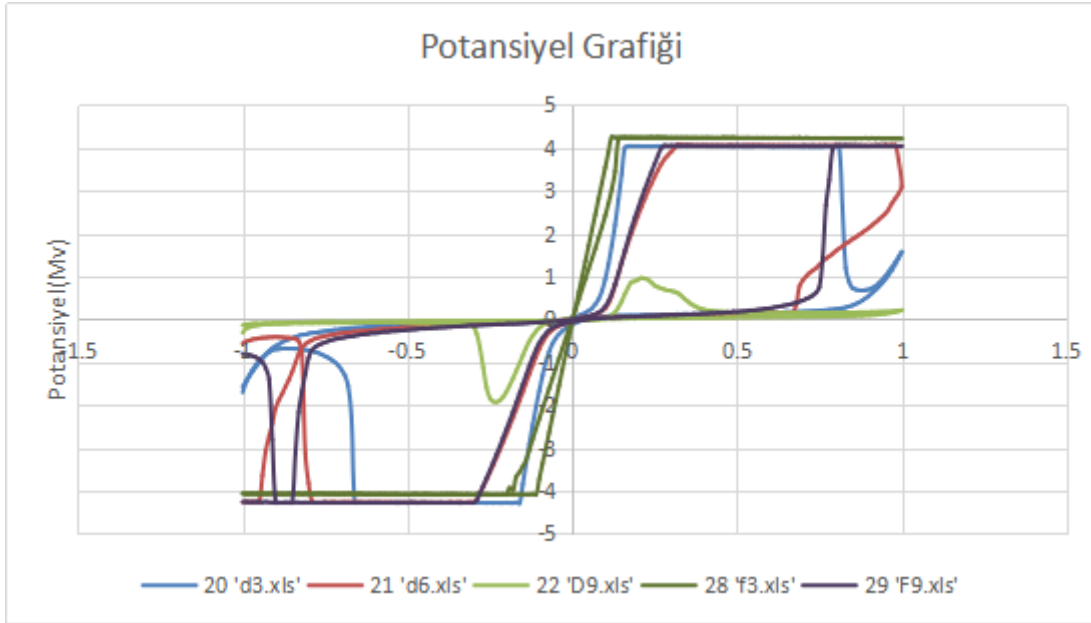
Şekil 14: Biyonosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



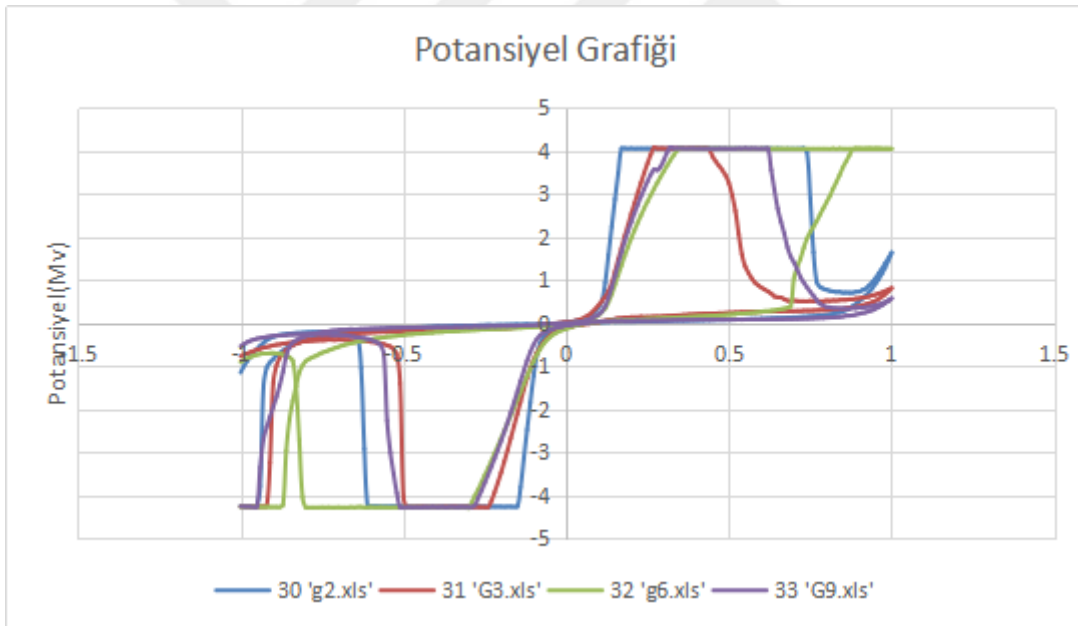
Şekil 15: Biyosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



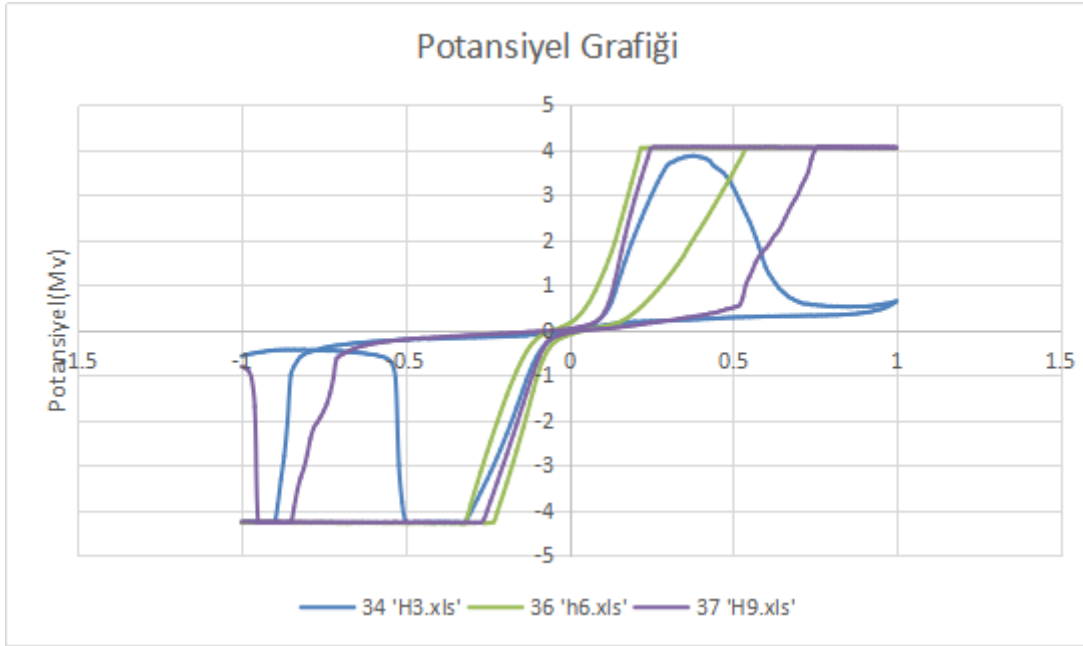
Şekil 16: Biyosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



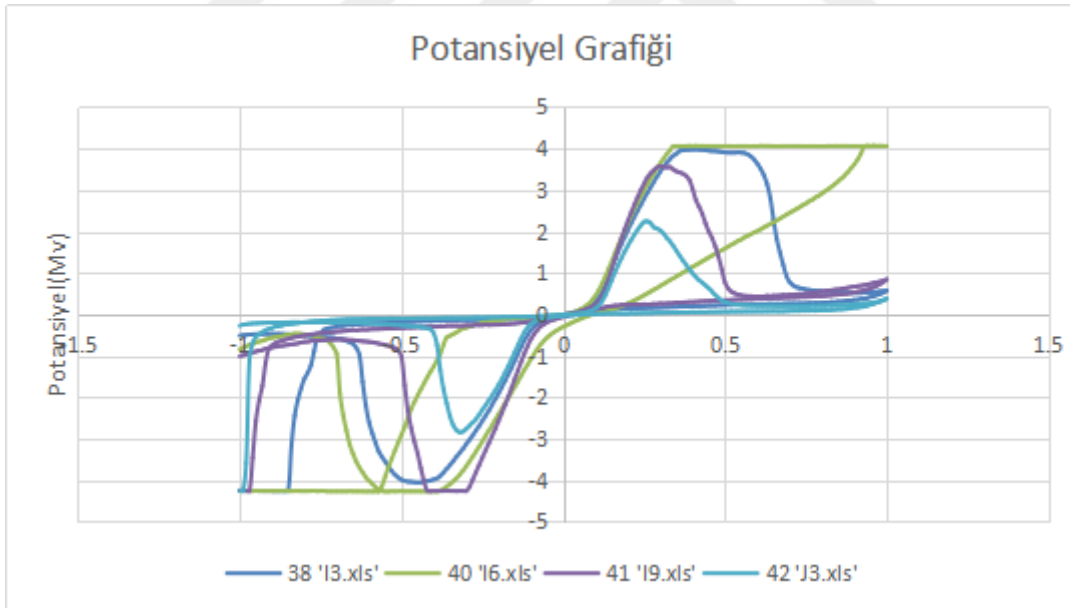
Şekil 17: Biyosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



Şekil 18: Biyosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



Şekil 19: Biyonosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği



Şekil 20: Biyonosensör ile IL-6 Ölçüm Grafiği

Potansiyostat ölçümleri sonucunda 24pg oranındaki ve üstündeki IL-6 konsantrasyonlarının 6 Mv değerinde bir gerilim yarattığı söylenebilir. Ayrıca 16pg ve 20pg konsantrasyonlarının da 2,5 Mv- 3,5 Mv aralığında bir gerilim yarattığı saptandı. Toplanan 34 örneğin, 24 tanesi 3,5 Mv üzerinde değer verdi. Kalan 10 sonuçtan 4'ü de

yine 2,5 Mv- 3,5 Mv aralığında sonuç verirken sadece 3 kişinin IL-6 değeri 16 pg altında ölçüldü. Diğer 3 kişinin ölçümleri anlamlı sonuçlar vermedi. 3 kişinin ölçümleri sırasında elektrotun nanoyapı ile doğru kaplanmadığı tespit edildi (Tablo 2)

Tablo 2: Örneklerdeki Gerilim Değeri ve IL-6 Miktarı Arasındaki İlişki

Örnek Sayısı	Ölçülen Gerilim Değeri (Mv)	Saptanan IL-6 miktarı (pg)
24	>3,5	>20
4	2,5- 3,5	16-20
3	<2,5	<16
3	Anlamsız	Bilinmiyor

4.5. İnsan IL-6 ELISA Kit Kontrolüne Ait Bulgular

4.5.1. İnsan IL-6 ELISA Kit ile Ölçülmüş Kan Serumlarına Ait Sonuçlar

ELISA sonuçlarına ait absorbans ve IL-6 değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: ELISA Sonuçlarına Ait Absorbans ve IL-6 Değerleri

Standard	1	2	3	4	5	6	7
IL-6 miktarı	13,5 ng	9 ng	6 ng	3 ng	1,5 ng	0,75 ng	0 ng
Absorbans	0,813	0,502	0,383	0,274	0,268	0,224	0,132
Değeri							
Aralıktaki	1	1	6	16	2	7	1
Örnek							
Sayısı							

Yapılan ELISA testinin sonuçlarına göre, örneklerden 16 tanesinde 3 ng ile 6 ng arasında IL-6 miktarı saptandı. 7 tanesinde 0,75 ng ile 1,5 ng arasında, 6 tanesinde 6 ng ile 9 ng arasında IL-6 tayin edildi. 1 örnekte 13,5 ng'dan fazla IL-6 düzeyi tespit edilirken 1 örnekte de 9 ng'dan fazla IL-6 bulundu. 2 tane örnekte 1,5 ng ile 3 ng arasında IL-6 tespit edildi. Sadece bir örnekte 0,75 ng'dan az IL-6 tayin edildi.

4.6. İstatistiksel Analiz

Biyonosensörler ile IL-6 ölçümünün ELISA ölçümlerine göre çok daha düşük konsantrasyonları tespit edebildiği belirlendi. ELISA sonuçları biyonosensör sonuçlarıyla karşılaştırıldığında (< 0.0001) biyonosensörün çok daha hassas olduğu görülmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Biyonosensör ve ELISA Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırılması

ÖRNEK ADI	BİYONANSENSÖR ÖLÇÜM SONUÇLARI (PG)	ELISA SONUÇLARI (NG)	P DEĞERİ
A-2	>20 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
A-3	16 -20 pg	1,5-3 ng 1500-3000 pg	< 0.0001
A-4	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
A-9	>20 pg	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001
B-2	0	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001

B-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
B-4	>20 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
B-9	16-20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
C-2	>20 pg	1,5-3 ng 1500-3000 pg	< 0.0001
C-3	>20 pg	13,5 ng > 13500 pg >	< 0.0001
C-4	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
C-9	<16 pg	0-0,75 ng 0-750 pg	< 0.0001
D-2	0	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
D-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
D-6	>20 pg	9-13,5 ng 9000-13500 pg	< 0.0001
D-9	<16 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
E-2	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001

E-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
E-6	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
E-9	>20 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
F-2	0	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001
F-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
F-9	>20 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001
G-2	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
G-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
G-6	>20 pg	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001
G-9	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
H-3	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
H-6	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001

H-9	>20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
I-3	>20 pg	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001
I-6	>20 pg	6-9 ng 6000-9000 pg	< 0.0001
I-9	16 -20 pg	3-6 ng 3000-6000 pg	< 0.0001
J-3	<16 pg	0,75-1,5 ng 750-1500 pg	< 0.0001

ELISA ölçümleri ng olarak, sensör sonuçları da pg olarak tayin edilmiştir. ELISA sonuçları pg'a çevrildiğinde biyosensörler ölçümlerinin çok daha hassas olduğu görülmüştür. İstatistiksel analiz de t testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir, fakat bizim p değerlerimiz bütün örneklerde < 0.0001 bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Çalışmada öncelikli amacımız, birçok hastalığın sebebi veya sonucu olarak vücutta salgılanan sitokinlerin düzeyinin klinikte tespitini çok daha hassas ölçümlerle yapabilecek bir biyosensör geliştirerek bu sensörün *in vitro* sepsis modeli ile elde edilen örneklerde hassasiyetini test etmektir. Bu biyosensörlerin akut inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların neden olduğu yoğun sitokin salımlarını sık sık ve hızlı takip ederek tedaviyi yönlendirmek amacıyla kullanılması hedeflenmiştir.

T hücreleri ve diğer immün kompetan hücreler, antijen ile karşılaştıklarında, cevap olarak birçok immünolojik aktif madde üretir ve salgırlar. Bu maddelere sitokin ismi verilmektedir. IL-6, hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar bir sitokindir ve bağışıklıkta önemli rol oynar. Sepsis sırasında erken ve hızlı tanı ile tedaviye erken başlanması hayattır(Santana Reyes ve ark., 2003).

In vitro sepsis modeli, insan tam kanındaki doğuştan gelen bağışıklığı incelemek için uygun, ekonomik ve güvenilirdir. Aynı zamanda klinik açıdan önemli bilgiler sağlayabilir. Bu model, sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinde, *in vitro* ortamda, sepsis biyobelirteçlerinin salgılanmasını temel almaktadır. Sepsisin karmaşık inflamatuvar yanıtının *in vitro* model olarak taklit edilmesinin zorluğu bilindiği için mümkün olduğunca doğal bir sepsis oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu model, daha önceki modellerde bahsettiğimiz bu sorunu çözüme kavuşturmakla beraber gelecekte yapılacak sepsis tanı ve tedavi çalışmalarına da bugünden ışık tutmaktadır. Mobed ve arkadaşları, LPS tespiti için biyosensörlerle ilgili güncel bilimsel literatür inceleyerek biyosensörlerin, LPS analizi için büyük bir potansiyel olduğunu kanıtlamışlardır(Mobed ve Hasanzadeh, 2022).

İdeal bir biyosensörün oluşturulmasında çeşitli faktörler kritik rol oynarlar. En önemli faktörler ise; kullanılan nanomateryal ve tekniklerin türüdür. Uygun nanomalzemelerin kullanılması, iyileştirilmiş analitik sonuçlara ulaşılmasında ana faktörlerden biridir. Soy metal elementler (Au, Ag, vb.) tarafından oluşturulan nanoyapı malzemeleri, kimyasal ve biyolojik algılama alanında yoğun ilgi gören ve önemli araştırmalarda ilerleme sağlayan fotoelektrik ve nontoksik özellikleriyle dikkat çekmektedirler. Ayrıca boyut ve şekillerine bağlı olarak fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri sebebiyle *in vitro* medikal analizlerde kullanılmışlardır. Nanobiyosensörler, klinikte kullanılacak analitik araçlar için yeni bir model geliştirmeye yardımcı olabilecek yüksek hassasiyet ve minyatürleştirme kolaylığı sunar.

Biyonanosensörler, biyolojinin moleküler temellerini fizikokimyasal metodlarla aydınlatmamıza yarayan ve son yıllarda tıbbi alanda büyük sıçramalara yol açan teknolojik gelişmelerdir. Nanoteknoloji ile disiplinlerarası çalışmalarla geliştirilecek olan biyosensörlerin hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden ölümcül bir enfeksiyon hastalığı olan sepsisi hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmesi beklenmektedir. Farklı optiksel ve elektrokimyasal yöntemleri kullanılarak çeşitli sitokinlerin tespiti için birçok biyosensör geliştirilmiştir (Wani, 2021). Bu biyosensörlerde kullanılan çeşitli malzemeler arasında nanomalzemeler; küçük boyutları, minyatürleştirme yetenekleri, taşınabilirlikleri ve gelişmiş algılama yetenekleri nedeniyle en fazla ilgiyi çekmiştir.

Kandan veya vücut sıvılarından alınan örneklerden sitokin tayini biyosensörler sayesinde diğer yöntemlere kıyasla çok daha hassas ve daha az maliyetli yapılabilmektedir. Genel olarak, fotokimyasal biyosensörler biyokimyasal reaksiyonların sonucunda yayılan veya emilen ışığın ölçümünü temel alarak çalışır. Giorgi-Coll ve arkadaşlarının altın nanopartiküller(AuNP'ler) ile yaptığı çalışma optik

bazlı biyonanosensör çalışmalarına yoğunlaşırken(Giorgi-Coll ve ark., 2020), Zhang ve arkadaşları AuNP'ler ile IL-6 tayinini elektrokimyasal biyonanosensörlerle gerçekleştirilmiştir (C. Zhang ve ark., 2022). Elektrokimyasal biyosensör uygulamaları, duyarlılıkları, seçicilikleri ve tekrarlanabilirlikleri nedeniyle çeşitli biyobelirteçlerin tespiti için daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler oldukça spesifiktir ve minyatürleştirilmesi basittir. Bu iki çalışma beraber değerlendirildiğinde elektrokimyasal biyonanosensörlerin kantitatif sonuçlar elde etmede daha verimli olduğu söylenebilir. Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında tespit sürecinde elektrot birçok farklı maddeyle kaplanabilir. Tan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada grafitik karbonla IL-6 tespiti yapmışlardır (P. S. Tan ve ark., 2021). Ayrıca Aydın ve arkadaşları da PPy-NHS kaplı elektrotları ile IL-6 tespiti yapmayı başarmıştır(Aydın ve ark., 2020).

AgNP tabanlı elektrokimyasal sensör ve biyosensörler, yüksek iletkenlikleri, güçlendirilmiş elektrokimyasal sinyalleri ve mükemmel biyoyuumlulukları sayesinde biyomedikal uygulamalar için önemli bir etki yaratmıştır. Bugüne kadar, biyosensör üretimi için metal, metal oksit ve karbon NP'ler gibi birçok türde nanomalzeme kullanılmıştır. Bununla beraber, biyonanosensör çalışmalarında AgNP kullanımının da AuNP'ler kadar yaygın olması, maliyet açısından daha faydalı bir tercih olacaktır. Çalışmamızda da görüldüğü gibi AgNP'lerin biyonanosensör kullanımı duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik açısından AuNP'lerden bir farkı olmamakla birlikte hem daha az maliyetli hem de antimikrobiyal ve antibakteriyel olması nedeniyle daha tercih edilebilir. Yüksek reaktif yüzey alanı ve yüzey işlevselleştirmenin kolaylaşması sayesinde artan hassasiyet gibi biyosensörlerin performansı geliştirilebilir. Nanomalzemelerin analit ile benzer boyutta olması hassasiyeti arttırmaktadır. Biyolojik uygulamalar için bir biyosensör tasarlarırken biyoyuumluluk önemli bir faktördür. Bu

çalışmada Karakuş ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak AgNP senteziyle elektrot kaplanmıştır(Karakuş ve ark., 2022). Kullanılan AgNP malzemeleri biyouyumlu, antimikrobiyal ve antibakteriyel niteliktedir. Bununla birlikte kaplama esnasında oluşabilecek sorun analitin ölçümü sırasında problem yaratabilir. Düzgün kaplanmamış elektrotların doğru sonuçlar vermediği çalışma sırasında tespit edilmiştir. Kaplama işlemi eğer bütün yüzeyde gerçekleşmezse biyosensörün voltmetri değeri anlamsız bir grafik değeri vermektedir. Ayrıca nanoyapı suda dağılan bir malzeme olduğu için analit damlatılması sırasında eğer karıştırılırsa kaplama yüzeyi zarar görmektedir. Bu durumda yine anlamsız grafik sonuçları gözlenmiştir.

Sitokinler, sitokin ağı olarak adlandırılan çoklu ve birbirlerinin içine geçen biyolojik aktiviteye sahiptirler. Patojen istilasına karşı önce pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanması, daha sonrasında da sistemik inflamasyonu kontrol etmek için anti-inflamatuar sitokinler salgılanması, sepsisin karmaşık ve heterojen süreçlerinde her zaman tek kural veya prensibe bağlı olarak işlememektedir(Uchino ve ark., 1992). Birkaç anti-inflamatuar sitokin pro-inflamatuar özellikler gösterdiği gibi bazı pro-inflamatuar sitokinler de anti-inflamatuar özellikler gösterebilmektedir. Pro-inflamatuar sitokinler, TNF- α ve IL-1'in yanı sıra IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-17'yi içerir. IL-6, en iyi pro-inflamatuar etkileri olan sitokin olarak bilinir. Bununla birlikte anti-inflamatuar özelliklere de sahiptir(Uchino ve ark., 1992). Çalışmada IL-6 molekülünün seçilme nedeni de sepsis patofizyolojisinde çift taraflı ajan gibi anahtar bir rol oynamasıdır. Bununla birlikte yüksek IL-3 oranının sepsiste yüksek ölümle ilgili olduğu da bilinmektedir. Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile Zeolite-Demir kaplanmış bir biyosensör ile IL-3 tayininde başarılı olmuşlardır(C. Chen ve ark., 2021). IL-3 düzeyini, 3 pg'a kadar ölçebilmişlerdir. Ayrıca kontrol deneyleri ile IL-3'ün spesifik tespitini doğrulamışlardır.

Biyosensör, sitokin bağlanmasını sağlamak amacıyla nano parçacıklarla yapılır ve bağlanan ilgili sitokinin reseptörü ile sitokin yakalanır. Vücut sıvılarındaki sitokin konsantrasyonun düşük olması nedeniyle bu çok kolay değildir. Bu sebeple, biyosensörün hassasiyeti klinik çalışmalarda çok önemlidir. Kandan veya vücut sıvılarından alınan örneklerden sitokin tayini genel olarak ELISA yöntemi ile yapılmaktadır. ELISA, hastalarda sitokin fırtınasının klinik teşhisi için kullanılan en yaygın sitokin ölçüm aracı olmakla beraber uzun inkübasyon süresi gerektirir. Birkaç saat süren işlem basamakları ve karmaşık dilüsyon ve kombinasyon süreci önemli sorunlardandır. Ayrıca, algılama için örnek miktarının fazla olması gerekmektedir. Bu çalışmada ELISA ile biyonanosensör sonuçları karşılaştırıldığında ELISA'dan çok daha hassas bir biyonanosensör üretildiği görülmektedir. Bu da biyonanosensörün klinik kullanım için geliştirilecek şeklinin hem daha az maliyetli olacağını hem de daha hassas ölçüm yapabileceğini kanıtlar niteliktedir. ELISA testlerinin dışında immünokromatografik kart testleri oldukça pratik ve düşük maliyetli olmalarına rağmen IL-6 gibi kandaki konsantrasyonu oldukça düşük olan interlökinlerin kantitatif analizi için uygun değildir. Nanoteknolojik biyosensör üretimi, hem hız hem kolaylık hem de hassasiyet açısından klinikte en çok tercih edilecek yöntem olmaya şimdiden adaydır. Bu çalışmada birçok hastalığın sebebi veya sonucu olarak vücutta salgılanan sitokinlerin klinikte tespitini çok daha hassas ölçümlerle yapabilecek bir biyosensör geliştirerek *in vitro* sepsis modelinde hassasiyeti test edilmiştir. Bu biyosensörlerin akut inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların neden olduğu yoğun sitokin salımlarını takip ederek tedaviyi yönlendirmek amacıyla kullanılması hedeflenmiştir. Çalışmadaki bulgular ELISA testlerinden daha hassas kantitatif sonuçların AgNP kaplı biyonanosensörler ile elde edildiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca biyonanosensörler ELISA testlerine göre daha az maliyetli ve kullanımı daha kolay testlerdir.

Çalışmada kullanılan *in vitro* tam kan sepsis modeli ile IL-6 salgılanması metodu ve sonokimyasal yöntemle sentezlenmiş AgNP ile kaplanan elektrotlarla salgılanan IL-6'nın tayini daha önce denenmemiş özgün bir çalışmadır. Soy metallerle kaplı biyonosensör çalışmaları bulunmakla birlikte AgNP kaplı bir biyonosensör ile IL-6 tayini bir çalışma yapılmamıştır. Bununla birlikte, *in vitro* tam kan sepsis modeli de sepsis modelleri arasında henüz yeni kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir. Bu sebeple disiplinlerarası bir çalışma olan bu tez, her iki alanda da özgün ve geliştirilmeye açık bir çalışmadır. *In vitro* tam kan sepsis modeli, sepsis çalışmalarında yeni yaklaşımlar için öncü niteliği taşımaktadır. Ayrıca birçok sitokinin aynı anda tayin edilebileceği yeni biyonosensörlerin geliştirilebilmesi gelecekteki hedeflerimiz arasındadır.

Sonuç olarak çalışmada;

- *In vitro* tam kan sepsis modeli uygulanarak ileri düzeyde çalışmalara öncülük edebilecek bir sepsis model yaklaşımı geliştirildi.
- AgNP çalışmalarıyla antibakteriyel, antiviral ve yeşil sentez nanoparçacıklar sentezlendi.
- Sentezlenen AgNP'ler ile hazırlanan sensörlerin bilindik yöntemlerden daha hassas ve kolay kullanımlı olduğu görüldü.
- Biyonosensör ile insan kan-serum örneklerindeki IL-6 sitokini tayin edildi.

KAYNAKLAR

- Alba-Patiño, A., Vaquer, A., Barón, E., Russell, S. M., Borges, M., & de la Rica, R. (2022). Micro- and nanosensors for detecting blood pathogens and biomarkers at different points of sepsis care. In *Microchimica Acta* (Vol. 189, Issue 2). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05171-2>
- Alfinito, E., Beccaria, M., & Ciccarese, M. (2020). Biosensing Cytokine IL-6: A Comparative Analysis of Natural and Synthetic Receptors. *Biosensors*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/bios10090106>
- Andaluz-Ojeda, D., Bobillo, F., Iglesias, V., Almansa, R., Rico, L., Gandía, F., Resino, S., Tamayo, E., de Lejarazu, R. O., & Bermejo-Martin, J. F. (2012). A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*, *57*(3), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.12.002>
- Aydin, E. B., Aydin, M., & Sezgintürk, M. K. (2020). The development of an ultra-sensitive electrochemical immunosensor using a PPy-NHS functionalized disposable ITO sheet for the detection of interleukin 6 in real human serums. *New Journal of Chemistry*, *44*(33), 14228–14238. <https://doi.org/10.1039/d0nj03183f>
- Barichello, T., Generoso, J. S., Singer, M., & Dal-Pizzol, F. (2022). Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. In *Critical Care* (Vol. 26, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03862-5>
- Batool, R., Rhouati, A., Nawaz, M. H., Hayat, A., & Marty, J. L. (2019). A review of the construction of nano-hybrids for electrochemical biosensing of glucose. In *Biosensors* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/bios9010046>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, *25*(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Bo, X., Zhou, M., & Guo, L. (2017). Electrochemical sensors and biosensors based on less aggregated graphene. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 89). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.002>
- Bone, R. C. (n.d.). *The Pathogenesis of Sepsis*. <http://annals.org/>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines

- for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, *101*(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Bosshart, H., & Heinzelmann, M. (2007). Targeting bacterial endotoxin: Two sides of a coin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1096*, 1–17. <https://doi.org/10.1196/annals.1397.064>
- Brenner, D., Blaser, H., & Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 362–374). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3834>
- Buras, J. A., Holzmann, B., & Sitkovsky, M. (2005). Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 10, pp. 854–865). <https://doi.org/10.1038/nrd1854>
- Burgelman, M., Vandendriessche, C., & Vandenbroucke, R. E. (2021). Extracellular vesicles: A double-edged sword in sepsis. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph14080829>
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M. M., Mcguire, F., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (n.d.). *Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis*.
- Chen, C., Gopinath, S. C. B., & Anbu, P. (2021). Longitudinal Zeolite-Iron Oxide Nanocomposite Deposited Capacitance Biosensor for Interleukin-3 in Sepsis Detection. *Nanoscale Research Letters*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03527-w>
- Chen, J., Shi, S., Su, R., Qi, W., Huang, R., Wang, M., Wang, L., & He, Z. (2015). Optimization and application of reflective LSPR optical fiber biosensors based on silver nanoparticles. *Sensors (Switzerland)*, *15*(6), 12205–12217. <https://doi.org/10.3390/s150612205>
- Chousterman, B. G., Swirski, F.K., & Weber, G. F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 39, Issue 5, pp. 517–528). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Cicchese, J. M., Evans, S., Hult, C., Joslyn, L. R., Wessler, T., Millar, J. A., Marino, S., Cilfone, N. A., Mattila, J. T., Linderman, J. J., & Kirschner, D. E. (2018). Dynamic balance of pro- and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology. *Immunological Reviews*, *285*(1), 147–167. <https://doi.org/10.1111/imr.12671>
- Dellinger, R. P., Carlet, J. M., Masur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J. C., Parker, M. M., Ramsay, G., Zimmerman, J. L., Vincent, J. L., & Levy, M. M. (2004). Surviving Sepsis Campaign guidelines for

- management of severe sepsis and septic shock. In *Critical Care Medicine* (Vol. 32, Issue 3, pp. 858–873). <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000117317.18092.E4>
- Donnelly, J. P., Safford, M. M., Shapiro, N. I., Baddley, J. W., & Wang, H. E. (2017). Application of the Third International Consensus Definitions for Sepsis (Sepsis-3) Classification: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(6), 661–670. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30117-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30117-2)
- Dorresteyn, M. J., Draisma, A., van der Hoeven, J. G., & Pickkers, P. (2010). Lipopolysaccharide-stimulated whole blood cytokine production does not predict the inflammatory response in human endotoxemia. *Innate Immunity*, *16*(4), 248–253. <https://doi.org/10.1177/1753425909339923>
- Eichberger, J., Resch, E., & Resch, B. (2022). Diagnosis of Neonatal Sepsis: The Role of Inflammatory Markers. *Frontiers in Pediatrics*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.840288>
- Elsupikhe, R. F., Shameli, K., Ahmad, M. B., Ibrahim, N. A., & Zainudin, N. (2015). Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ -carrageenan. *Nanoscale Research Letters*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0916-1>
- Esmon, C. T. (2004). Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? In *Critical care medicine* (Vol. 32, Issue 5 Suppl). <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000127036.27343.48>
- Esposito, S., de Simone, G., Boccia, G., de Caro, F., & Pagliano, P. (2017). Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 10, pp. 204–212). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.013>
- Fink, M. P., & Heard, S. O. (1990). CURRENT RESEARCH REVIEW Laboratory Models of Sepsis and Septic Shock. In *JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH* (Vol. 49).
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D. C., & Reinhart, K. (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *193*(3), 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
- Freund, Y., Lemachatti, N., Krastinova, E., van Laer, M., Claessens, Y. E., Avondo, A., Occelli, C., Feral-Pierssens, A. L., Truchot, J., Ortega, M., Carneiro, B., Pernet, J.,

- Claret, P. G., Dami, F., Bloom, B., Riou, B., & Beaune, S. (2017). Prognostic accuracy of sepsis-3 criteria for in-hospital mortality among patients with suspected infection presenting to the emergency department. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *317*(3), 301–308. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.20329>
- Funk, D. J., Parrillo, J. E., & Kumar, A. (2009). Sepsis and Septic Shock: A History. In *Critical Care Clinics* (Vol. 25, Issue 1, pp. 83–101). <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>
- Garidel, P., & Brandenburg, K. (2009). Current understanding of polymyxin B applications in bacteraemia/sepsis therapy prevention: Clinical, pharmaceutical, structural and mechanistic aspects. In *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* (Vol. 8, Issue 4, pp. 367–385). <https://doi.org/10.2174/187152109789760171>
- Giamarellos-Bourboulis, E. J., Tsaganos, T., Tsangaris, I., Lada, M., Routsis, C., Sinapidis, D., Koupetori, M., Bristianou, M., Adamis, G., Mandragos, K., Dalekos, G. N., Kritselis, I., Giannikopoulos, G., Koutelidakis, I., Pavlaki, M., Antoniadou, E., Vlachogiannis, G., Koulouras, V., Prekates, A., ... Gogos, C. (2017). Validation of the new Sepsis-3 definitions: proposal for improvement in early risk identification. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(2), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.003>
- Giorgi-Coll, S., Marín, M. J., Sule, O., Hutchinson, P. J., & Carpenter, K. L. H. (2020). Aptamer-modified gold nanoparticles for rapid aggregation-based detection of inflammation: an optical assay for interleukin-6. *Microchimica Acta*, *187*(1). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3975-7>
- Gotts, J. E., & Matthay, M. A. (2016). Sepsis: Pathophysiology and clinical management. In *BMJ (Online)* (Vol. 353). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
- Habibullah, G., Viktorova, J., & Ruml, T. (2021). Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 16, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03480-8>
- Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., & Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. In *Human and Experimental Toxicology* (Vol. 34, Issue 12). <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>

- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. In *Nature Immunology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 448–457). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>
- Jarczak, D., Kluge, S., & Nierhaus, A. (2021). Sepsis—Pathophysiology and Therapeutic Concepts. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.628302>
- Kang, S., & Kishimoto, T. (2021). Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 53, Issue 7, pp. 1116–1123). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00649-0>
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., & Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 217, Issue 5). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20190347>
- Karakuş, S., Baytemir, G., & Taştaltın, N. (2022). Digital colorimetric and non-enzymatic biosensor with nanoarchitectonics of *Lepidium meyenii*-silver nanoparticles and cotton fabric: real-time monitoring of milk freshness. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 128(5). <https://doi.org/10.1007/s00339-022-05529-6>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 908–931). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kinoshita, M., Nakashima, M., Nakashima, H., & Seki, S. (2019). Immune mechanisms underlying susceptibility to endotoxin shock in aged hosts: Implication in age-augmented generalized shwartzman reaction. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20133260>
- Kithokoi, K. J., Lawrence, O., John, M. M., Sauda, S., & Wilson, N. (2019). Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles using *Bridelia micrantha* extract and evaluation of their antibacterial activity. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 13(3). <https://doi.org/10.5897/ajpac2018.0776>
- Lohcharoenkal, W., Abbas, Z., & Rojanasakul, Y. (2021). Advances in nanotechnology-based biosensing of immunoregulatory cytokines. In *Biosensors* (Vol. 11, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios11100364>
- Luísa da Silveira Hahmeyer, M., & Eduardo da Silva-Santos, J. (2021). *Rho-Proteins and Downstream Pathways as Potential Targets in Sepsis and Septic Shock: What Have We Learned from Basic Research*. <https://doi.org/10.3390/cells>

- Machado, F. R., de Assunção, M. S. C., Cavalcanti, A. B., Japiassú, A. M., de Azevedo, L. C. P., & Oliveira, M. C. (2016). Getting a consensus: Advantages and disadvantages of Sepsis 3 in the context of middle-income settings. In *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* (Vol. 28, Issue 4, pp. 361–365). Associação de Medicina Intensiva Brasileira - AMIB. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20160068>
- Maduraiveeran, G., Sasidharan, M., & Ganesan, V. (2018). Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 103, pp. 113–129). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>
- Malekzad, H., Sahandi Zangabad, P., Mirshekari, H., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2017). Noble metal nanoparticles in biosensors: Recent studies and applications. In *Nanotechnology Reviews* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0014>
- Marshall, J. C., Deitch, E., Moldawer, L. L., Opal, S., Redl, H., & van der Poll, T. (2005). Preclinical models of shock and sepsis: What can they tell us? In *Shock* (Vol. 24, Issue SUPPL. 1, pp. 1–6). <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000191383.34066.4b>
- Matsumoto, H., Ogura, H., Shimizu, K., Ikeda, M., Hirose, T., Matsuura, H., Kang, S., Takahashi, K., Tanaka, T., & Shimazu, T. (2018). The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32275-8>
- McElvaney, O. J., Curley, G. F., Rose-John, S., & McElvaney, N. G. (2021). Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. In *The Lancet Respiratory Medicine* (Vol. 9, Issue 6, pp. 643–654). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00103-X)
- Messer, J., Donato, L., Gallati, H., Matis, J., & Simeoni, U. (1996). Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. In *J Pediatr* (Vol. 129).
- Messerer, D. A. C., Vidoni, L., Erber, M., Stratmann, A. E. P., Bauer, J. M., Braun, C. K., Hug, S., Adler, A., Nilsson Ekdahl, K., Nilsson, B., Barth, E., Radermacher, P., & Huber-Lang, M. (2020). Animal-Free Human Whole Blood Sepsis Model to Study Changes in Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571992>
- Mobed, A., & Hasanzadeh, M. (2022). Environmental protection based on the nanobiosensing of bacterial lipopolysaccharides (LPSs): material and method overview.

- In *RSC Advances* (Vol. 12, Issue 16, pp. 9704–9724). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1ra09393b>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 2, pp. 240–273). <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Munford, R. S., & Pugin, J. (2001). Critical Care Perspective Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. In *Am J Respir Crit Care Med* (Vol. 163). www.atsjournals.org
- Napi, M. L. M., Sultan, S. M., Ismail, R., How, K. W., & Ahmad, M. K. (2019). Electrochemical-based biosensors on different zinc oxide nanostructures: A review. In *Materials* (Vol. 12, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12182985>
- Oeschger, T., McCloskey, D., Koppaarthi, V., Singh, A., & Erickson, D. (2019). Point of care technologies for sepsis diagnosis and treatment. *Lab on a Chip*, 19(5), 728–737. <https://doi.org/10.1039/c8lc01102h>
- Osuchowski, M. F., Ayala, A., Bahrami, S., Bauer, M., Boros, M., Cavillon, J. M., Chaudry, I. H., Coopersmith, C. M., Deutschman, C., Drechsler, S., Efron, P., Frostell, C., Fritsch, G., Gozdzik, W., Hellman, J., Huber-Lang, M., Inoue, S., Knapp, S., Kozlov, A. v., ... Zingarelli, B. (2018). Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. In *Infection* (Vol. 46, Issue 5, pp. 687–691). Urban und Vogel GmbH. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1183-8>
- Ou, X., Liu, Y., Zhang, M., Hua, L., & Zhan, S. (2019). *Plasmonic gold nanostructures for biosensing and bioimaging*. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04964-1>/Published
- Pant, A., Mackraj, I., & Govender, T. (2021). Advances in sepsis diagnosis and management: a paradigm shift towards nanotechnology. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 28, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00702-6>
- Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N., & Sannomiya, P. (2008). Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, 30(SUPPL. 1), 53–59. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318181a343>
- Purcarea, A., & Sovaila, S. (2020). Sepsis, a 2020 review for the internist. *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine de Medecine Interne*, 58(3), 129–137. <https://doi.org/10.2478/rjim-2020-0012>

- Rao, R., Orman, M. A., Berthiaume, F., & Androulakis, I. P. (2015). Dynamics of hepatic gene expression and serum cytokine profiles in single and double-hit burn and sepsis animal models. *Data in Brief*, 3, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.02.018>
- Redl, H., & Bahrami, S. (2005). Large animal models: Baboons for trauma, shock, and sepsis studies. In *Shock* (Vol. 24, Issue SUPPL. 1, pp. 88–93). <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000191339.46777.63>
- Rello, J., & Leblebicioglu, H. (2016). Sepsis and septic shock in low-income and middle-income countries: need for a different paradigm. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 48, pp. 120–122). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.04.017>
- Rittirsch, D., Hoesel, L. M., & Ward, P. A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 137–143. <https://doi.org/10.1189/jlb.0806542>
- Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 4(1), 31–36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Rose-John, S., Scheller, J., & Schaper, F. (2015). “Family reunion” - A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 26, Issue 5, pp. 471–474). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.011>
- Rubio, I., Osuchowski, M. F., Shankar-Hari, M., Skirecki, T., Winkler, M. S., Lachmann, G., la Rosée, P., Monneret, G., Venet, F., Bauer, M., Brunkhorst, F. M., Kox, M., Cavaillon, J. M., Uhle, F., Weigand, M. A., Flohé, S. B., Wiersinga, W. J., Martin-Fernandez, M., Almansa, R., ... Bermejo-Martín, J. F. (2019). Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 19, Issue 12, pp. e422–e436). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30567-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30567-5)
- Salomão, R., Ferreira, B. L., Salomão, M. C., Santos, S. S., Azevedo, L. C. P., & Brunialti, M. K. C. (2019). Sepsis: Evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(4). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20198595>

- Santana Reyes, C., García-Muñoz, F., Reyes, D., González, G., Dominguez, C., & Domenech, E. (2003). Role of cytokines (interleukin-1 β , 6, 8, tumour necrosis factor- α , and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 92(2), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00530.x>
- Schultz, M. J., & van der Poll, T. (2002). Animal and human models for sepsis. In *Annals of Medicine* (Vol. 34, Issues 7–8, pp. 573–581). Taylor and Francis A.S. <https://doi.org/10.1080/078538902321117797>
- Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., Rea, T. D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J. M., Shankar-Hari, M., Singer, M., Deutschman, C. S., Escobar, G. J., & Angus, D. C. (2016). Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 315(8), 762–774. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0288>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 315, Issue 8, pp. 801–810). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, M., Truong, J., Reeves, W. B., & Hahm, J. I. (2017). Emerging cytokine biosensors with optical detection modalities and nanomaterial-enabled signal enhancement. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 17, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s17020428>
- Song, J., Park, D. W., Moon, S., Cho, H. J., Park, J. H., Seok, H., & Choi, W. S. (2019). Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: A prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4618-7>
- Sordi, R., Menezes-de-Lima, O., Della-Justina, A. M., Rezende, E., & Assreuy, J. (2013). Pneumonia-induced sepsis in mice: Temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. *International Journal of Experimental Pathology*, 94(2), 144–155. <https://doi.org/10.1111/iep.12016>

- Strassl, K., Di, Priv.-D., & Weber, V. (2010). *A Cell Culture Model of Lipopolysaccharide-induced Endothelial Activation Comparison of THP-1 Cells & PBMC-derived Monocytes*.
- Taeb, A. M., Hooper, M. H., & Marik, P. E. (2017). Sepsis: Current definition, pathophysiology, diagnosis, and management. In *Nutrition in Clinical Practice* (Vol. 32, Issue 3, pp. 296–308). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0884533617695243>
- Tan, P., Li, H. S., Wang, J., & Gopinath, S. C. B. (2021). Silver nanoparticle in biosensor and bioimaging: Clinical perspectives. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 68, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/bab.2045>
- Tan, P. S., Vaughan, E., Islam, J., Burke, N., Iacopino, D., & Tierney, J. B. (2021). Laser scribing fabrication of graphitic carbon biosensors for label-free detection of interleukin-6. *Nanomaterials*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/nano11082110>
- Tanak, A. S., Muthukumar, S., Krishnan, S., Schully, K. L., Clark, D. v., & Prasad, S. (2021). Multiplexed cytokine detection using electrochemical point-of-care sensing device towards rapid sepsis endotyping. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112726>
- Taratummarat, S., Sangphech, N., Vu, C. T. B., Palaga, T., Ondee, T., Surawut, S., Sereemasun, A., Ritprajak, P., & Leelahavanichkul, A. (2018). Gold nanoparticles attenuates bacterial sepsis in cecal ligation and puncture mouse model through the induction of M2 macrophage polarization. *BMC Microbiology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1227-3>
- Tosi, M. F. (2005). Innate immune responses to infection. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 116, Issue 2, pp. 241–249). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.05.036>
- Tufail, M. S. (2022). Silver nanoparticles and their applications-A comprehensive review. *Pure and Applied Biology*, *11*(1). <https://doi.org/10.19045/bspab.2022.110033>
- Uchino, S., Bellomo, R., Morimatsu, H., Goldsmith, D., Davenport, P., Cole, L., Baldwin, I., Panagiotopoulos, S., Tipping, P., Morgera, S., Neumayer, H. H., & Goehl, H. (n.d.). *Cytokine Dialysis: An Ex Vivo Study*. <https://doi.org/10.1097/01.MAT.0000033863.87464.63>
- van der Poll, T., & van Deventer, S. J. H. (n.d.). *BACTERIAL SEPSIS AND SEPTIC SHOCK CYTOKINES .AND ANTICYTOKINES IN THE PATHOGENESIS OF SEPSIS* (Vol. 13).

- Vincent, J. L., Martin, G. S., & Levy, M. M. (2016). qSOFA does not replace SIRS in the definition of sepsis. *Critical Care*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1389-z>
- Wang, J. Y., Chen, Y. X., Guo, S. bin, Mei, X., & Yang, P. (2016). Predictive performance of quick Sepsis-related Organ Failure Assessment for mortality and ICU admission in patients with infection at the ED. *American Journal of Emergency Medicine*, 34(9), 1788–1793. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.06.015>
- Wani, I. A. (2021). Review—Recent Advances in Biogenic Silver Nanoparticles & NanoComposite Based Plasmonic-Colorimetric and Electrochemical Sensors. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 10(4), 047003. <https://doi.org/10.1149/2162-8777/abf2df>
- WHO, "Sepsis Önemli Gerçekler", Erişim Tarihi: 20.11.2022
- Willner, M. R., & Vikesland, P. J. (2018). Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0419-1>
- Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. In *Theranostics* (Vol. 10, Issue 20, pp. 8996–9031). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>
- Xu, S., Xu, J., Hao, T., Yan, Y., Zhang, S., Li, A., Shi, C., Liu, Q., & Zhao, J. (2021). Paeonol Alleviates Lipopolysaccharide-induced Hepatocytes Injury through Alteration of Mitochondrial Function and NF- κ B Translocation. *Molecular Medicine Reports*, 24(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12419>
- Yıldırım, R., & Deveciöglu, M. C. (2022). IL-6, IL-8, TNF- α and C-Reactive Protein Levels in the Diagnosis and Prognosis of Neonatal Sepsis. *Van Medical Journal*, 29(3), 297–302. <https://doi.org/10.5505/vtd.2022.89166>
- Zhang, C., Shi, D., Li, X., & Yuan, J. (2022). Microfluidic electrochemical magnetoimmunosensor for ultrasensitive detection of interleukin-6 based on hybrid of AuNPs and graphene. *Talanta*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123173>
- Zhang, Y. yu, & Ning, B. tao. (2021). Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00816-9>

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**İN VİTRO SEPSİS MODELİNDE BİYONANOSENSÖRLERLE
SİTOKİN TAYİNİ****ORJİNALLIK RAPORU****%8****BENZERLİK ENDEKSİ****%7****İNTERNET KAYNAKLARI****%2****YAYINLAR****%3****ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ****BİRİNCİL KAYNAKLAR****1****acikbilim.yok.gov.tr**
İnternet Kaynağı**%3****2****docplayer.biz.tr**
İnternet Kaynağı**%1****3****Submitted to Istanbul University**
Öğrenci Ödevi**<%1****4****acikerisim.erbakan.edu.tr**
İnternet Kaynağı**<%1****5****app.trdizin.gov.tr**
İnternet Kaynağı**<%1****6****link.springer.com**
İnternet Kaynağı**<%1****7****nek.istanbul.edu.tr:4444**
İnternet Kaynağı**<%1****8****9lib.net**
İnternet Kaynağı**<%1****9****Submitted to Selçuk Üniversitesi**
Öğrenci Ödevi**<%1**