

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NERİUM OLEANDER* EKSTRELERİNDEN ELDE EDİLEN KARBON
NANODOTLARIN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO*
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

SİNEM ŞİMŞEK KEKEVİ

DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. BELMA ÖZBEK

EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. RÜKAN GENÇ ALTÜRK

İSTANBUL, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NERİUM OLEANDER* EKSTRELERİNDEN ELDE EDİLEN KARBON
NANODOTLARIN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO*
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sinem ŞİMŞEK KEKEVİ tarafından hazırlanan tez çalışması 12.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Nuran DEVECİ AKSOY

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Elçin YILMAZ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Sinem ŒİMŒEK KEKEVİ, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında doktora çalışması süresince TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora çalışmam esnasında bilgisi, deneyimi, pozitif yönlendirmeleri ve şefkati ile yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Belma ÖZBEK'e,

Tez eş danışmanım olarak, bilgi birikimi ile desteğini benden esirgemeyen, bana laboratuvarlarını açan ve yeni bir alanda kendimi geliştirme fırsatı veren değerli hocam Doç. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK'e,

Doktora eğitimim boyunca beni maddi açıdan destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi'ne geldiğim ilk günden bu yana, her konuda bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Elçin YILMAZ'a,

Tez çalışması boyunca, genotoksisite ve sitotoksiste çalışmalarının gerçekleştirilmesinde yoğun emekleri olan Doç. Dr. Dilek BATTAL, Ayça AKTAŞ ŞÜKÜROĞLU'na ve sitotoksisite çalışmalarının gerçekleştirilmesinde yoğun emeği olan Öğr. Gör. Derya YETKİN'e, yardım ve destekleri için,

Deneysel çalışmalarım esnasında, benden yardımlarını esirgemeyen Yük. Müh. Melis Özge ALAŞ ve Yük. Müh. Burcu BAC'a,

Benden sevgilerini, manevi ve maddi desteklerini esirgemeyen aileme,

Hayatımı kolaylaştıran ve güzelleştiren eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2019

Sinem ŞİMŞEK KEKEVİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xx
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
NANOTEKNOLOJİ	5
2.1 Tarihçe	5
2.2 Nanomalzemelerin Fiziksel Özellikleri	7
2.2.1 Boyut ve Şekil Özellikleri.....	8
2.2.2 Optik Özellikler	8
2.2.3 Mekanik Özellikler	8
2.2.4 Termal Özellikler.....	9
2.2.5 Elektriksel Özellikler	9
2.2.6 Manyetik Özellikler.....	10
2.3 Nanomalzemelerin Kimyasal Reaktivliği	10
2.4 Nanoparçacık Türleri.....	11
2.4.1 Organik Esaslı Nanoparçacıklar	11
2.4.2 İnorganik Esaslı Nanoparçacıklar	11
2.4.2.1 Metal Nanoparçacıklar	11

2.4.2.2	Metal Oksit Nanoparçacıklar.....	12
2.4.3	Karbon Esaslı Nanoparçacıklar.....	12
2.5	Nanoparçacık Sentez Yöntemleri.....	14
2.5.1	Yukarıdan Aşağıya Sentez Yöntemleri	15
2.5.2	Aşağıdan Yukarıya Sentez Yöntemleri	16
2.6	Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	18
2.7	Nanoparçacıkların/Nanomalzemelerin Uygulama Alanları	20
BÖLÜM 3		
KARBON NANODOTLAR		21
3.1	Karbon Nanodot Sentez Yöntemleri	23
3.1.1	Lazer ile Uzaklaştırma (Lazer Ablasyon) Yöntemi ile CD Sentezi.....	23
3.1.2	Elektrokimyasal Yöntemler ile CD Sentezi.....	24
3.1.3	Kimyasal Oksidasyon Yöntemi ile CD Sentezi	25
3.1.4	Ultrasonik Yöntem ile CD Sentezi	26
3.1.5	Termal Dekompozisyon/Piroliz Yöntemi ile Sentez.....	26
3.1.5.1	Hidrotermal ve Su Bazlı Yöntemler ile CD Sentezi	27
3.1.6	Mikrodalga Yöntemi ile CD Sentezi	29
3.1.6.1	Ev Tipi Mikrodalga Fırın ile Sentez	29
3.1.6.2	Mikrodalga ile Desteklenmiş Hidrotermal Yöntem ile Sentez	30
3.2	Karbon Nanodotların Uygulama Alanları.....	31
3.2.1	Sensörler.....	31
3.2.2	İlaç Taşıma Sistemleri	32
3.2.3	Biyo-görüntüleme.....	34
3.2.4	Fotokatalizörler	36
3.2.5	Diğer Uygulamalar	36
BÖLÜM 4		
NANOTOKSİKOLOJİ		37
4.1	Sitotoksosite Testleri.....	39
4.1.1	Kolorimetrik (Renk Ölçümüne Dayalı) Yöntemler	39
4.1.2	Empedans (Direnç) Ölçümüne Dayalı Yöntemler	41
4.1.3	Diğer Yöntemler.....	43
4.2	Genotoksosite Testleri	44
4.2.1	Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet) Testi	45
4.2.2	Mikronükleus Testi	47
4.2.2.1	Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN)	48
4.2.3	Diğer Yöntemler.....	49
4.3	Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsünün İncelenmesi	50
BÖLÜM 5		
LİTERATÜR ARAŞTIRMASI		53
BÖLÜM 6		

MATERYAL VE YÖNTEM	61
6.1 Kullanılan Cihazlar	61
6.2 Kullanılan Malzemeler	63
6.3 Deneyisel Çalışmalar	64
6.3.1 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	64
6.3.2 <i>Nerium oleander</i> Yaprak Ekstrelerinden Karbon Nanodot Sentezi	65
6.3.2.1 Termal Yöntemle CD Sentezi	65
6.3.2.2 Mikrodalga Sentez Yöntemiyle CD Eldesi	67
6.3.3 Karakterizasyon Çalışmaları	69
6.3.4 <i>In Vitro</i> Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi	69
6.3.4.1 CD'lerin MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki <i>In vitro</i> Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	69
6.3.4.2 CD'lerin HDFa Hücre Hattı Üzerindeki <i>In vitro</i> Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	70
6.3.5 Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Analizi	71
6.3.6 Genotoksitenin Belirlenmesi: <i>In Vitro</i> Comet Testi	72
6.3.6.1 DNA Hasarı Miktarının Belirlenmesi	73
6.3.6.2 İstatiksel Analiz	73
6.3.7 Klastojenitenin Belirlenmesi: Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN)	73
6.3.7.1 İstatiksel Analiz	75
BÖLÜM 7	
ARAŞTIRMA BULGULARI	76
7.1 Termal Yöntemle CD Sentezi	76
7.1.1 Ekstraksiyon Yöntemi ve Yüzey Modifikasyonunun Etkisi	76
7.1.2 Sentez Sıcaklığının Etkisi	89
7.1.3 Sentez Ortamının pH ve İyonik Kuvvetinin Etkisi	91
7.1.4 <i>In Vitro</i> Sitotoksitite ve Genotoksitite Çalışmaları Yürütülen CD'nin İleri Yapısal Analizi	96
7.2 Mikrodalga/Mikrodalga Destekli Yöntemle CD Sentezi	97
7.2.1 CD'lerin Floresan Özellikleri Üzerindeki Etkiler	97
7.2.2 CD'lerin UV-Vis Spektrumları Üzerindeki Etkiler	101
7.2.3 CD'lerin Hidrodinamik Boyut ve Yüzey Zeta Potansiyelleri Üzerindeki Etkiler	103
7.2.4 CD'lerin Yüzey Özellikleri Üzerindeki Etkiler	107
7.3 Sitotoksitite Çalışmaları	111
7.3.1 CD'lerin MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki <i>In vitro</i> Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	111
7.3.2 CD'lerin HDFa Hücre Hattı Üzerindeki <i>In vitro</i> Sitotoksitelerinin Belirlenmesi	115
7.4 Genotoksitite Çalışmaları	118
7.4.1 DNA Hasarının Belirlenmesi	118
7.4.2 Klastojenitenin Belirlenmesi	123
7.5 Hücre Döngüsünün İncelenmesi	124

BÖLÜM 8

SONUÇ VE ÖNERİLER	128
KAYNAKLAR.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	149

SİMGE LİSTESİ

m	Mobilite
R_h	Hidrodinamik parçacık boyutu
ζ -Pot	Yüzey zeta potansiyeli
$\lambda_{\max}$	Maksimum ışıma dalgaboyu
σ	İletkenlik

KISALTMA LİSTESİ

A-549	İnsan akciğer kanseri hücresi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Ark.	Arkadaşları
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
AU	Rastlantısal birim
B16F10	Fare melanoma kanser hücresi
BGC-823	İnsan mide kanseri hücresi
BrdU	5'-bromo-2'deoksiüridin
C33-A	İnsan rahim kanseri hücresi
CD	Karbon nanodot
CHO	Çin fare rahim hücresi
CNP	Karbon nanoparçacık
CNSI	Karbon nanoparçacık süspansiyon enjeksiyonu
CNT	Karbon nano tüp
COOH	Hidroksil grubu
CSN	Silika nanoküreye gömülü karbon nanodot
CT26.WT	Fare kolon kanseri hücresi
Cyt-B	Sitokalsin
Di	DNA indeksi
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOX	Doksorubisin
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EMS	Etil metansülfonat
EPR	Gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi
EtOH	Etanol
FL83B	Fare normal karaciğer hücresi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HCT 116	İnsan kolon kanseri hücresi
HDFa	İnsan primer dermal fibroblast hücre hattı
HeLa	İnsan rahim ağzı kanseri hücresi
HepG2	İnsan karaciğer kanseri hücresi

HK-2	İnsan böbrek normal hücresi
hMSCs	İnsan mezenşimal kök hüresi
HRTEM	Yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskobu
ISO	Uluslararası standardizasyon örgütü
İZE	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
KCl	Potasyum klorür
LDH	Laktat dehidrogenaz
LLC-PK-1	Domuz normal böbrek hücresi
MAH	Mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemi
MCF-10A	İnsan normal meme hücresi
MCF-7	İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücresi
MSS	Merkaptosüksinik asit
MTS	3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
MWO	Ev tipi mikrodalga fırın ile sentez yöntemi
N,S-CD	N,S katkılı karbon nanodot
Na ₂ -EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu dihidratı
NaCl	Sodyum klorür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
N-CD	Azot katkılı karbon nanodot
NH ₂	Amin grubu
NIH/3T3	Fare fibroblast hücresi
NIR	Yakın kızılötesi ışınım
NK	Negatif kontrol
NR	Nötral kırmızı
NS-CD	Azot ve/veya kükürt katkılı karbon nanodot
PBS	Phosphate buffered saline (fosfat tampon tuz çözeltisi)
PC-3	İnsan prostat kanseri hücresi
pCD	Polimer kaplı karbon nanodot
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PI	Propidyum iyodür
PK	Pozitif kontrol
PL	Fotoluminesans
pNCD	Polimer kaplı azot katkılı karbon nanodot
ppm	Milyonda bir birim
Pri	Pristin
QY	Kuantum verimi
rCD	İndirgenmiş karbon nanodot
SD	Standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SKOV3	İnsan yumurtalık kanseri hücresi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TGA	Termal ağırlık analizi

U251	İnsan glioblastoma hücresi
UV-Vis	Ultraviyole-görünür bölge
WST	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum
XPS	X-ray fotoelektron spektroskopi
XRD	X-ışını kırınımı
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Organik nanoparçacıklar; a. Dendrimer, b. Lipozom c. Misel [52]	11
Şekil 2. 2 Karbon esaslı nanoparçacıklar; a. Fullerenler, b. Grafen, c. Karbon nanotüpler, d. Karbon nanofiberler, e. Karbon siyahı, f. Karbon nanodotlar [52,53]	13
Şekil 2. 3 Nanoparçacık sentez yaklaşımları [56]	14
Şekil 2. 4 Nanoparçacık sentez yöntemleri [52,56,57,59]	18
şekil 2. 5 Nanoparçacık/nanomalzemelerin uygulama alanları [1-7]	20
Şekil 3. 1 Karbon nanodotların elektrokimyasal üretimi [55]	24
Şekil 3. 2 Karbon nanodotlar ve grafen kuantum nanodotların yapısal özellikleri a. CQD b. GQD [12]	25
Şekil 3. 3 Glisinden dehidrasyon, polimerizasyon, karbonizasyon ve pasivasyon basamaklarını takiben karbon nanodot sentezi modeli [79]	28
Şekil 3. 4 Mikrodalga yaklaşımı ile CD sentezi [81]	30
Şekil 3. 5 Mikrodalga ile desteklenmiş hidrotermal sentez yöntemi ile CD eldesi; ısıtma işleminin metodolojisi [19]	31
Şekil 3. 6 Aç kapa floresan probu ile fosfat tayinin şematik gösterimi [85]	32
Şekil 3. 7 pH'a bağlı olarak yük değiştirebilen CD temelli ilaç taşınımının şematik gösterimi [8,9]	34
Şekil 3. 8 Işığın dalga boyuna bağlı olarak dokulardan penetrasyonu	35
Şekil 3. 9 Karbon nanodotlar ile muamele edilmiş LLC-PK1 hücreleri; a. CD'lerin yerleşimi, b. CD'lerin fotoluminesans şiddeti [92]	35
Şekil 4. 1 Empedans ölçümü yönteminin şematik gösterimi [105]	43
Şekil 4. 2 Alkali comet yöntemi ile dna hasarının sınıflandırılması; a. Tip 0, b. Tip 1, c. Tip 2, d. Tip 3, e. Tip 4	46
Şekil 4. 3 Klastojen ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki mikronükleuslar [115]	48
Şekil 4. 4 Sitokinez bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu [115]	49
Şekil 4. 5 Hücre döngüsünün evreleri [120]	51
Şekil 6. 1 <i>N. oleander</i> yapraklarının öğütme işlemi sonrası görüntüleri; a. Elle ufalanmış kuru yapraklar, b. Bıçaklı öğütücü ile toz haline getirilmiş yapraklar	65
Şekil 6. 2 PEG içeren ve içermeyen CD formülasyonlarının şematik gösterimi	65

Şekil 6. 3	Fiziksel parametrelerin CD üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmaya dair akış şeması.....	67
Şekil 6. 4	Mikrodalga sentez yöntemiyle CD eldesi işlemlerinin şematik gösterimi ...	68
Şekil 6. 5	CBMN yöntemi şematik gösterimi.....	74
Şekil 7. 1	Termal yöntem ile sentezlenen CD'lerin 365 nm UV ışık altındaki floresan ışımaları; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	77
Şekil 7. 2	Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-1 (Farklı sentez sıcaklıklarında)	77
Şekil 7. 3	Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-2 (Farklı pH değerlerinde).....	78
Şekil 7. 4	Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-3 (Farklı iyonik kuvvet değerlerinde)	78
Şekil 7. 5	Sentez sıcaklığının CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD _E , CD _{E@PEG} , b. CD _W , CD _{W@PEG}	79
Şekil 7. 6	Sentez ortamının pH'sının CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	79
Şekil 7. 7	Sentez ortamının iyonik kuvvetinin CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	80
Şekil 7. 8	Termal sentez yönteminde, sentez sıcaklığının CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD _E , CD _{E@PEG} , b. CD _W , CD _{W@PEG}	80
Şekil 7. 9	Termal sentez yönteminde, sentez ortamının pH'sının CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	81
Şekil 7. 10	Termal Sentez yönteminde, sentez ortamının iyonik kuvvetinin CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	81
Şekil 7. 11	Sentez ortamına PEG ilavesinin absorbans üzerindeki etkisi	82
Şekil 7. 12	CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; PEG, karbon kaynağı ve sentez sıcaklığının etkisi	84
Şekil 7. 13	CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; PEG, karbon kaynağı ve sentez sıcaklığının etkisi	85
Şekil 7. 14	CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; pH etkisi	86
Şekil 7. 15	CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; iyonik kuvvet etkisi .	87
Şekil 7. 16	Termal sentez yöntemiyle 200 °C'de sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları.....	88
Şekil 7. 17	Termal sentez yöntemiyle 250 °C'de sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları.....	88
Şekil 7. 18	Termal sentez yöntemiyle 300 °C'de sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları.....	89
Şekil 7. 19	Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvetine bağlı olarak CD boyutları.....	92
Şekil 7. 20	Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvet değişimine bağlı olarak CD'lerin boyut değişimleri	92
Şekil 7. 21	Termal sentez yöntemiyle farklı iyonik kuvvet değerlerinde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları; a. Su ekstresi temelli CD'ler, b. Etanol ekstresi temelli CD'ler	94
Şekil 7. 22	Termal sentez yöntemiyle farklı pH değerlerinde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları; a. Su ekstresi temelli CD'ler, b. Etanol ekstresi temelli CD'ler	95

Şekil 7. 23	CD _{W@PEG} 'in XPS spektrumu	97
Şekil 7. 24	Mikrodalga yöntemi ile sentezlenen CD'lerin 365 nm UV ışık altındaki floresan ışımaları; a. Ev tipi mikrodalga fırında sentezlenen CD'ler, b. mikrodalga destekli hidrotermal yöntem ile sentezlenen CD'ler	98
Şekil 7. 25	Ev Tipi mikrodalga fırın ile sentezlenen ve farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları	99
Şekil 7. 26	Mikrodalga Sentez cihazı ile sentezlenen ve farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları	99
Şekil 7. 27	MWO ve MAH ile farklı koşullarda sentezlenen CD'lerin floresan spektrumları; a, b. MWO yöntemi, c, d. MAH yöntemi	100
Şekil 7. 28	MWO yöntemiyle farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin UV-Vis spektrumları; a. 5 dk, b. 15 dk	102
Şekil 7. 29	MAH yöntemiyle farklı sıcaklıklarda sentezlenen CD'lerin UV-Vis spektrumları; a. 200 °C, b. 250 °C.....	102
Şekil 7. 30	CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; ev tipi mikrodalga fırında sentez, sentez süresinin etkisi	104
Şekil 7. 31	CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; mikrodalga destekli hidrotermal sentez, sentez sıcaklığının etkisi	105
Şekil 7. 32	CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; ev tipi mikrodalga fırında sentez, sentez süresinin etkisi	106
Şekil 7. 33	CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; mikrodalga destekli hidrotermal sentez, sentez sıcaklığının etkisi	106
Şekil 7. 34	Ev tipi mikrodalga fırın ile farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları	108
Şekil 7. 35	Mikrodalga sentez cihazı ile farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları; a. 200 °C, b. 250 °C.....	109
Şekil 7. 36	Zamana bağlı MCF-7 hücre indeksi değişimi; a. CD _{E@PEG} , b. CD _{W@PEG}	113
Şekil 7. 37	a. CD _{E@PEG} ve b. CD _{W@PEG} uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinin ortalama hücre indeksi değerleri	114
Şekil 7. 38	Zamana bağlı HDFa hücre indeksi değişimi (CD _{E@PEG})	116
Şekil 7. 39	Zamana bağlı HDFa hücre indeksi değişimi (CD _{W@PEG})	117
Şekil 7. 40	CD _{W@PEG} uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda HDFa hücrelerinin ortalama hücre indeksi değerleri.....	118
Şekil 7. 41	a. Alkali comet testi ile MCF-7 hücrelerinin kuyruk uzunluğuna bağlı olarak 4 sınıfta görsel skorlanması esnasında rehber alınan farklı comet (kuyruklu yıldız) sınıflarının gösterimi, b. Negatif kontrol ve MCF-7 hücrelerinin 2.5 ppm CD _{W@PEG} ile muamele edildikten 48 ve 72 saat sonraki temsili görüntüleri.....	121
Şekil 7. 42	CD _{W@PEG} ile muamele sonrası MCF-7 Hücrelerinde alkali comet testi ile belirlenen hasar indeksleri; a. 48 saat, b. 72 saat.....	122
Şekil 7. 43	Farklı konsantrasyonlarda CD _{W@PEG} ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı mikronükleus yoğunluğundaki değişim, a. 48 saat, b. 72 saat	124

Şekil 7. 44	Negatif kontrol ve CD _{W@PEG} 'in hücre döngüsü faz profilinin akış sitometrisi (FACS) kullanılarak G0/G1, S ve G2/M fazları gibi farklı hücresel fazlarda karşılaştırılması; a. 48 saat sonra, b.72 saat sonra	125
Şekil 7. 45	CD _{W@PEG} ile muamele edilmemiş (NK) ve farklı konsantrasyonlarda (0.25-50 ppm) CD ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin a. 48 saat ve b. 72 saat süresince hücre döngüsü analizi	126
Şekil 7. 46	Hücre döngüsü ilerleyişinde CD'lerin olası etkisinin şematik gösterimi....	127

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması.....	54
Çizelge 7.1 Termal sentez yöntemiyle sentezlenen CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutu ve yüzey zeta potansiyeli ölçüm sonuçları.....	83
Çizelge 7.2 Mikrodalga destekli sentez yöntemleriyle sentezlenen CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutu ve yüzey zeta potansiyeli ölçüm sonuçları.....	103
Çizelge 7.3 Nanotoksitesite incelenen parçacıkların fiziksel özellikleri.....	111
Çizelge 7.4 CD _{W@PEG} 'in comet testi ile belirlenen DNA hasar potansiyeli.....	120
Çizelge 8.1 Benzer çalışmalara dair literatür verileri.....	133

***NERİUM OLEANDER* EKSTRELERİNDEN ELDE EDİLEN KARBON
NANODOTLARIN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO*
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sinem ŞİMŞEK KEKEVİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Eş Danışman: Doç. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK

Nanoparçacıklar, üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri ve umut vaadeden uygulama potansiyellerine rağmen, özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılmadan önce nanotoksikolojilerinin sistematik, hassas ve güvenilir olarak belirlenmesi gerekmektedir. Geleneksel sitotoksik testleri bu aşamada yetersiz kalabilmekte ve nanoparçacıkların testlerde kullanılan kimyasal ajanlarla etkileşimlerine ve/veya insan faktörüne bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle nanotoksikoloji araştırmalarında, söz konusu etkileşimlere mahal vermeyen, insan faktörünü ortadan kaldıran ve yüksek hassasiyette sonuç veren yenilikçi, güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu kapsamda, *Nerium oleander* ekstrelerinden, farklı sentez yöntemleri ile farklı fiziksel koşullarda sentezlenen karbon nanodotların (CD) karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular doğrultusunda, incelenen parametrelerin sentezlenen nanoparçacıklar üzerindeki etkileri açığa çıkartılmıştır. Yeni nesil *in vitro* sitotoksik aktivite tayini yöntemi, empedans ölçümü temelli gerçek zamanlı hücre analiz cihazı xCELLigence kullanılarak; CD'lerin MCF-7 insan meme kanseri ve HDFa insan primer dermal fibroblast hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir.

In vitro sitotoksik aktivite bulguları göz önünde bulundurularak seçilen karbon nanodotların MCF-7 hücre hattı üzerindeki *in vitro* genotoksiteleri tek hücre jel elektroforezi (comet yöntemi) kullanılarak araştırılmıştır. Ardından sitokinezi bloklanmış mikronükleus (CBMN) testi ile CD'lerin, hücrelerin DNA'ları üzerindeki hasar seviyeleri belirlenerek klastojenik etkileri irdelenmiştir. Nanoparçacıkların neden olduğu hasarın mekanizmasının açığa çıkarılması, amaca yönelik olarak verdikleri hasar seviyesinin güçlendirilmesi veya engellenmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle, akış sitometrisi yöntemi kullanılarak parçacıkların hücre döngüsü ilerleyişi üzerindeki etkileri belirlenerek hücre hasarının mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen bulgular neticesinde, CD sentezinde, karbon kaynağı olarak kullanılan ekstre tipinin, sentez yönteminin, yüzey modifikasyonunun ve sentez koşullarındaki değişimin; parçacıkların boyutu, fotolüminesansı ve yüzey özellikleri üzerinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Sentezlenen CD'lerin *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin araştırılması neticesinde, parçacıkların MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde doza (50 ppm) ve zamana bağlı sitotoksite gösterirken, sağlıklı HDFa hücreleri üzerinde en yüksek konsantrasyonda bile herhangi bir sitotoksik aktiviteye neden olmadıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda, parçacıkların MCF-7 hücre hattı üzerinde 0.25 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda bile genotoksik ve klastojenik etkiye neden olduğu saptanmıştır.

Biyolojik aktiviteleri incelenen CD'lerin memeli hücrelerindeki mutajenite ve karsinojenite potansiyellerininin desteklenmesi için daha fazla araştırmaya gerek duyulsa da, bu çalışma neticesinde, son derece küçük boyutlu CD'lerin, hücre çekirdeğine girerek tümör hücrelerinin hücresel fonksiyonlarını etkileyebileceği görülmüştür. Böylelikle CD'lerin tek başlarına bile, yüksek konsantrasyonlarda, MCF-7 meme kanseri hücrelerine seçici sitotoksikite gösterirken, HDFa insan primer dermal fibroblast hücrelerinde aynı konsantrasyonlarda büyümeyi indüklediği gözlenmiştir. CD'lerin genotoksikite ve hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelendiğinde, DNA hasarına bağlı kanser tedavisinde kullanılma potansiyellerinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Nerium oleander*, karbon nanodot, nanotoksikoloji, gerçek zamanlı hücre analizi, CBMN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF CARBON NANODOTS SYNTHESIZED FROM *NERIUM OLEANDER* EXTRACTS ON BREAST CANCER CELLS

Sinem ŞİMŞEK KEKEVİ

Department of Chemical Engineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Belma ÖZBEK

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Rükan GENÇ ALTÜRK

Despite their superior physical and chemical properties and promising application potentials, nanoparticles require the systematic, precise and reliable determination of their nanotoxicology, especially before they are used in biomedical applications. Tests in traditional cytotoxicity may be inadequate at this stage and may give deceptive results, depending on the interaction of the nanoparticles with the chemical agents used in the tests and/or the human factor. For this reason, in nanotoxicology studies, innovative, reliable methods that do not place these interactions, eliminating the human factor and giving high precision results are needed. In this context, the characterization studies of carbon nanodots synthesized from two different *Nerium oleander* extracts via different synthesis methods under various physical conditions were performed and the effects of the investigated parameters on carbon nanodots (CD) were revealed.

In this study, *in vitro* cytotoxic activities of carbon nanodots on human primary dermal fibroblast cells (HDFa) and human breast cancer cells (MCF-7) were determined by using the new generation *in vitro* cytotoxic activity determination method, impedance measurement based real time cell analyzer xCELLigence. The *in vitro* genotoxicity of the

selected CDs on the MCF-7 cell line was determined using single cell gel electrophoresis (comet assay). The cytoplasm blocked micronucleus (CBMN) test was used to determine the level of damage of carbon nanodots on the DNA of the cells and their clastogenic effects were examined. Revealing the mechanism of damage caused by the particles is important for strengthening or preventing the damage level they cause. Therefore, by using flow cytometry method, the mechanism of cell damage is tried to be explained by determining the effects of particles on cell cycle progression.

As a result of the outcomes, the significant effects of the extract type used as carbon source, synthesis method, surface modification and changes in synthesis conditions on the particle size, photoluminescence and surface properties of synthesized CDs were determined. The results obtained from the *in vitro* cytotoxicity assessment of CDs synthesized concluded that CDs have concentration and time-dependent cytotoxic potentials (at 50 ppm) over MCF-7 cells while they comforted the proliferation of healthy HFDa cells even at highest CD concentrations. Meanwhile, *in vitro* genotoxicity studies have shown that the particles cause genotoxic and clastogenic effects even at concentrations as low as 0.25 ppm on the MCF-7 cell line.

Although further studies are warranted to investigate the mutagenicity or carcinogenicity potency of CD in mammalian cells, this work shows evidence that CDs with super tiny size can specifically affect cellular function of tumour cells by entering the cell nucleus. Thus, at high concentrations, CDs showed selective cytotoxicity to MCF-7 breast cancer cells, while they induces growth at the same concentrations in HFDa human primary dermal fibroblast cells. When the effect of CDs on genotoxicity and cell cycle was examined, it was found that they have potential to be used in cancer treatment due to DNA damage.

Keywords: *Nerium oleander*, carbon nanodot, nanotoxicology, real-time cell analysis, CBMN

1.1 Literatür Özeti

Gelişen ve değişen dünyamızda, kullanılmakta olan geleneksel malzemelerin yerini, onlara göre üstün mekanik, kimyasal ve fiziksel özellikler taşıyan çok daha küçük boyutlu formları almakta ve nanoteknoloji bilimi her geçen gün, hayatımıza biraz daha dâhil olmaktadır. Nano boyutlu parçacıklar; elektronikten tarıma, sağlıktan gıdaya kadar pek çok alanda kullanılmakta; kullanım alanlarının yaygınlaştırılması ve genişletilmesi için umut vaadeden çalışmalar yapılmaya devam etmektedir [1–7].

Elde ediliş biçimleri, nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal yapılarında önemli değişimlere neden olabilmektedir. Kimyasal veya biyolojik bir sentez yoluyla elde edilen parçacıklarda, sentez koşullarının ve/veya kullanılan kimyasal, biyolojik kaynakların, parçacık yapısı üzerinde önemli etkileri olabilmektedir. Böylelikle amaca uygun olarak parçacık tasarımı da mümkün kılınmaktadır.

Yoğun olarak araştırılan ve sahip oldukları heyecan verici özellikleri nedeniyle ilgi çeken nanoparçacıkların arasına hızla dâhil olan karbon nanodotlar, fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, doğaları gereği sergiledikleri floresan özellikleri ile karbon temelli nanoparçacıklar grubunun gözde üyesi haline gelmiştir. Karbon nanodotların, yarı-iletken kuantum parçacıklara kıyasla düşük toksisite, fotokararlılık, kimyasal inertlik, üstün biyouyumluluk, yüzey fonksiyonel gruplarının modifiye edilebilmesi, düşük maliyetli, çok yönlü ve kolay sentez yollarının bulunması gibi avantajları bulunmaktadır [8,9]. Bu nedenle karbon nanodotlar, hâlihazırda kullanılan ve geleneksel floresan

malzemelerin yerini alabilecek alternatiflerin geliştirilmesi çalışmalarının merkezi haline gelmiştir.

Mevcut ilerlemeler ve öngörüler göz önüne alındığında, nanoteknolojinin önümüzdeki yıllardaki ilerleyişinin biyolojik nanomoleküller üzerine olacağı düşünülmektedir [10]. Ancak nanoparçacıkların özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılmadan önce nanotoksikolojilerinin sistematik, hassas ve güvenilir olarak belirlenmesi gerekmektedir. Geleneksel sitotoksiste testleri ile elde edilen sonuçlar bu aşamada yetersiz kalabilmekte ve nanoparçacıkların testlerde kullanılan kimyasal ajanlarla etkileşimlerine ve/veya insan faktörüne bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir [11]. Bu nedenle nanotoksikoloji araştırmalarında, söz konusu etkileşimlere mahal vermeyen, insan faktöründen kaynaklanan hataları minimize eden ve yüksek hassasiyette sonuç veren yenilikçi, güvenilir yöntemlerle doğrulanmış nanotoksikoloji çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Karbon nanodotlar, genel olarak masum ve düşük toksisiteli olarak ifade edilmelerine rağmen, genotoksik ve/veya klastojenik özellik gösterip göstermediklerine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu parçacıkların insan hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksiste ve genotoksitelerinin belirlenmesi, son derece önem arz etmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Karbon nanodotlar; lazer ile uzaklaştırma, elektrokimyasal yöntemler, kimyasal oksidasyon vb. çok farklı yöntemlerle sentezlenebiliyor olmalarına rağmen, günümüzde yaygın olarak; daha hızlı, daha kolay ve çevre dostu yaklaşımlarla; termal, hidrotermal, ultrasonik, mikrodalga destekli yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir [8,12–19]. CD sentezinde kullanılan kimyasaların azaltılması ve sentez maliyetinin düşürülmesi için organik malzemelerin karbon kaynağı olarak kullanımı tercih edilmektedir. Doğal kaynaklardan nanoparçacık sentezine dair çalışmalara son yıllarda yaygın olarak rastlanıyor olsa da [20–24], CD'lerin bitkiler kullanılarak sentezi yeni yeni araştırılmaktadır [25–33].

Tez kapsamında, barındırdığı kardiyak glikozitler nedeniyle anti-kanser özellik gösterdiği bilinen *Nerium oleander* ekstraktları kullanılarak, üç farklı sentez yöntemiyle ve değişen sentez koşullarında karbon nanodot eldesi gerçekleştirilerek, incelenen parametrelerin

sentezlenen karbon nanodotlar üzerindeki meydana getirdiği fiziksel ve kimyasal etkilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen parçacıklar arasından; boyut, yüzey karakteristikleri ve fotolüminesans özelliklerine bağlı olarak seçilecek CD'lerin, belirlenecek normal ve kanser hücre hatları üzerindeki nanotoksikolojik incelemesinin gerçekleştirilmesi ve edinilen bulgular doğrultusunda genotoksik etkilerinin de irdelenmesiyle, parçacık-hücre etkileşimlerinin açığa çıkartılması planlanmıştır.

1.3 Hipotez

Nanoteknolojinin biyomedikal uygulamalarda kullanılmasıyla umut vadeden sonuçlar elde edilmektedir. Özellikle karbon nanodotların, sahip oldukları fotolüminesans sayesinde, biyolojik sistemlerde yarı iletken kuantum paracıkların yerine kullanılabirliği yoğun olarak araştırılmaktadır. Ancak, nanoparçacıkların canlı sistemlerde kullanılabilmesi için sitotoksisitelerinin güvenilir ve sistematik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir. Bu ihtiyaç doğrultusunda, geleneksel toksisite testleri yerini daha teknolojik, test sonuçlarını etkileyecek etkileşimlere izin vermeyen sistemlere bırakmaktadır. Karbon temelli nanoparçacıklar genellikle düşük toksisiteli olarak belirtilse de, genotoksik ve/veya klastojenik özellik gösterip göstermediklerine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu parçacıkların memeli hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksisite ve genotoksisitelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Ayrıca, biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanoparçacıkların boyutları, yüzey kimyaları ve yüzey yüklerinin hücre ve/veya hücre çekirdeği içerisine alınma mekanizmaları üzerinde önemli değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, nanoparçacıkların sentez koşullarındaki değişikliklerin parçacık fizikokimyası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek karbon nanodotların farklı yöntemlerle ve farklı koşullarda sentezlenmesinin parçacık fizikokimyası üzerinde etkili olması beklenmekte, sentez parametrelerinin elde edilen parçacıklar üzerinde göstereceği etkilerin belirlenmesinin de amaca yönelik parçacık sentezinde literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, elde edilecek karbon nanodotların sağlıklı ve

kanser hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin güvenilir bir yöntem ile belirlenmesinin, bu parçacıkların toksisitelerine dair araştırmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Sentezelenen karbon nanodotların, kanser hücre hatları ile etkileşimlerinin detaylı olarak incelenmesinin, onların kanser tedavisinde ilaç taşıyıcısı olarak veya tek başlarına kullanımlarının mümkün olup olmayacağına dair bilgiler sunması beklenmektedir.

BÖLÜM 2

NANOTEKNOLOJİ

'Nano' kelimesi, Yunanca 'cüce, bodur' kelimesinden türemiş olup; bir nanometre, metrenin milyarda birini ifade etmektedir [34]. Avrupa Komisyonu'nun 2011 yılındaki önerisi ile benimsenen nanomalzeme tanımına göre; *'Nanomalzeme; doğal, tesadüfi ya da üretilmiş, serbest halde veya yığın ya da kümeleşmiş biçimde, sayıca % 50'si ya da daha fazlasının boyut dağılımının bir ya da daha fazla dış ebatı 1 nm ile 100 nm arasında olan malzeme'* olarak belirtilmektedir [35]. Nanoteknoloji bilimi ise 0.1 ila 100 nm arası boyutlara sahip atom ve moleküllerin incelendiği ve kullanıldığı yeni bir teknoloji olarak tanımlanabilmektedir [36]. Bu teknoloji; kimya, fizik, biyoloji, malzeme bilimi ve mühendisliği içeren çok disiplinli bir alan olup küçük ve aşırı küçük şeylerin bilimi olarak da ifade edilebilmektedir [37]. Uluslararası standardizasyon örgütü'nün (ISO) 2010 yılında yaptığı ve uluslararası kabul gören tanıma göre ise nanoteknoloji; *'Boyut ve yapıya bağlı özelliklerden ve daha küçük ya da daha büyük boyutlarda farklılık gösteren davranışlardan faydalanmak için maddeleri nanoboyut aralığında kontrol etmek ve işlemek amacıyla bilimsel bilgiye başvurulması'* olarak tanımlanmaktadır [38].

2.1 Tarihçe

'Nanometre' kavramı ilk kez, Kimya alanında 1925 yılında Nobel ödülü alan Richard Zsigmondy tarafından önerilmiştir. Zsigmondy, nanometre terimini parçacık boyutunu açık bir şekilde karakterize etmek amacıyla türetmiş ve altın kolloitleri gibi parçacıkların boyutlarını bir mikroskop kullanarak ölçen ilk kişi olmuştur. Modern nanoteknoloji ise 1965 Nobel Fizik Ödülü sahibi Fizikçi Richard P. Feynman'ın parlak fikri olarak

değerlendirilmekte ve kendisi modern nanoteknolojinin babası olarak kabul edilmektedir [39]. Feynman, nanobilim kavramını ilk kez 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'na verdiği '*Aşağıda Oldukça Yer Var (There's Plenty of Room at the Bottom)*' başlıklı konuşmasında, maddeyi atomik seviyede değiştirme fikri olarak ortaya atmıştır. Nanoteknoloji terimi ise ilk kez 1974 yılında, Japon araştırmacı Norio Taniguchi tarafından, yaklaşık bir nanometrede gerçekleşen yarı iletken prosesleri tanımlamak için kullanılmıştır. Nanoteknolojinin altın çağı 1980'lerde Kroto, Smalley ve Curl'ün fullerenleri keşfetmesi ve Eric Drexler'in Feynman'ın konferansındaki fikirlerini ve Taniguchi'nin nanoteknoloji terimini, 1986 basımı kitabı '*Evren Makineleri: Yaklaşan Nanoteknoloji Çağı (Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology)*'nda toplumun erişimine sunması ile başlamıştır. Drexler, kendisinin bir kopyasını ve diğer maddeleri gelişigüzel bir karmaşıklıkta meydana getirebilecek nanoboyutta bir 'düzenleyici' fikrini ortaya atmaktadır. Drexler'in nanoteknoloji görüşü genellikle 'moleküler nanoteknoloji' olarak adlandırılmaktadır. Japon bilim adamı Iijima'nın karbon nanotüpleri geliştirmesi ile ise nanoteknoloji bilimi daha da ilerletilmiştir [34,39]. 2004 yılında Xu ve ark.'nın diğer karbon esaslı nanoparçacıklara göre avantajlı yönleri bulunan karbon nanodotları keşfetmeleri ile nanoteknolojik ilerleyiş hızla devam etmektedir [40]. Amerikan Ulusal Bilim ve Teknoloji Topluluğu, Nanoboyut Bilimi alt komitesi başkanı Mihail Roco, 2002 yılında verdiği beyanda nanoteknolojinin endüstriyel ve ticari uygulamalarını dört aşamaya bölmüştür [10].

- I. Aşama, 2001 yılında başlamış olup pasif nanoyapı fazı olarak bahsedilmiştir. Bu aşamada nanomalzemelerin kaplama gibi uygulamalarına, nanoparçacıklar, nanoyapılı malzemeler, polimerler ve seramik materyallere odaklanılmıştır. Bunlar genel olarak, nanomalzemelerin etkin uygulama alanları değildir.
- II. Aşama, 2005 yılında başlamış olup etkin nanoyapı fazı olarak bahsedilmiştir. Nanomalzemelerin, iletkenler (transistor), yükselticiler, aktüatörler (devindirici) gibi uygulamaları ve uyarlamalı mekanizma uygulamalarını içermektedir. Böylece etkin nanomateryal uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

- III. Aşama, 2010 yılında başlamış olup üç boyutlu nanosistem aşaması olarak ifade edilmiştir. Bu aşama, tek düze olmayan nanoyapıları ve nanomalzemelerin kendiliğinden düzenlenmesini içermektedir.
- IV. Aşamanın 2020 yılında başlaması beklenmekte olup moleküler nanosistem aşaması olarak ifade edilmektedir. Nanomalzemelerin biyolojik simülasyonlar ve tek düze olmayan nanomoleküler sistemlerin yeni uygulamaları için tasarlanmasını içermektedir.

Bu aşamaların sıralanışı ve mevcut ilerlemeler, nanoteknolojinin en kapsamlı uygulama alanlarının moleküler nanoteknoloji üzerinde olacağını düşündürmektedir.

2.2 Nanomalzemelerin Fiziksel Özellikleri

Mikrometre boyutundaki malzemeler çoğunlukla kendilerinin makro formları ile benzer fiziksel özelliklere sahiptirler. Ancak, nanometre boyutundaki malzemelerin fiziksel özellikleri büyük boyutlu halleri ile dikkate değer biçimde farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, altın büyük boyutlu formunda katalitik özelliğe sahip değil iken, altın nanokristalleri mükemmel bir düşük sıcaklık katalizörü özelliği göstermektedir [41]. Malzemelerin yapısı ya da parçacık boyutu nano boyutların sonuna ulaştığında, malzemelerin optik, elektriksel ve manyetik özelliklerinde ilginç değişiklikler meydana gelmektedir. Nano boyutlu malzemelerin makro boyutlu malzemelere göre dört temel yönü vardır [42];

- Yerçekimsel kuvvetler ihmal edilebilir hale gelir ve elektromanyetik kuvvetler baskın olur,
- Hareket ve enerjiyi tanımlamak için klasik mekanik modellerin yerine kuantum mekaniği modelleri kullanılır,
- Hacim başına düşen yüzey alanı artar,
- Rastlantısal moleküler hareketler daha önemli hale gelir.

Nanoboyutlu malzemeler; küçük boyutları ve yüksek yüzey alanları sayesinde büyük boyutlu formları ile kıyaslandığında dikkate değer manyetik, elektriksel, elektronik, optik ve mekanik özellikler gösterebilmektedir [42].

2.2.1 Boyut ve Şekil Özellikleri

Nanomalzemelerin tanımlanmasında en önemli parametre boyut ve şekildir. Bir nanoparçacığın boyutu küçüldüğünde, parçacık yüzeyinde yer alan moleküllerin miktarı ekponansiyel olarak artmaktadır. Nanoparçacık tasarımı konusunda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; küre, çubuk, tüp biçiminde, fiber, disk şeklinde ve solucan, kare, denizkestanesi, elipsoit gibi sıra dışı birçok geometride parçacık elde edilmiştir. Ayrıca, nanoparçacıkların optik özellikleri de boyut ve şekle bağlı olarak değişim göstermektedir [43].

2.2.2 Optik Özellikler

Nanomalzemelerin yansıma, iletme, absorplama ve ışık yayımı gibi optik özellikleri, yüksek ihtimalle büyük boyutlu formlarına göre farklılık göstermektedir. Optik özellikler, nanomalzemelerin içsel elektronik yapıları ile ilişkili olduğu için nanomalzemelerin optik özelliklerinin incelenmesi, onların yapılarının detaylı biçimde anlaşılmasına olanak vermektedir. Ayrıca, nanomalzemelerin renkleri de büyük boyutlu formlarından farklı olabilmektedir. Rengin belirlenmesi yüzey plazmonu (plazma salınımları) ilkesine dayanmakta olup nanomalzemelerin yüzey plazmonları ile büyük boyutlu formları farklılık göstermektedir. Yüzey plazmonu frekansı aynı zamanda nanoparçacığın şekli ile de ilişkili olup küre şeklindeki nanoparçacıklar için bu değerin, büyük boyutlu formlarının plazma frekansına oranla 0.58 kat daha fazla olduğu bilinmektedir [44].

2.2.3 Mekanik Özellikler

Kristal yapıli katıların yapısal bileşenlerinin boyutları küçüldüğünde, genellikle ara yüzey alanında bir artış görülmektedir ve bu mekanik ve elektriksel özellikleri büyük oranda etkilemektedir [42]. Mekanik özellikler, yapısal malzemelerin potansiyel uygulamalarının belirlenmesindeki en önemli faktörlerdir. Daha küçük tanecik boyutlu nanokristaller ile konvansiyonel malzemeler arasında açık bir fark bulunmaktadır. Nanokristallerin mekanik özelliklerinin incelemesi üzerine gerçekleştirilen ilk aşama araştırmaları,

- Nanokristallerin elastik modüllerinin, konvansiyel formlarındaki malzemelere göre % 30-50 daha düşük olduğunu,

- 10 nm tanecik boyutlu saf metallerin sertlik ve dayanımlarının, bu metallerin 1 mm tanecik boyutlu hallerine oranla 2-7 kat daha yüksek olduğunu,
- Hall Petch bağıntısının 100 nm'nin altındaki tanecik boyutlarında geçersiz hale geldiğini; tanecik boyutundaki düşüşün hem dayanımın artması hem de sünekliğin artışı üzerinde etkili olduğunu ve bunun en etkili güçlendirme mekanizmalarından biri olduğunu,
- Tanecik boyutundaki küçülme ile orantılı olarak kırılma dayanımının genellikle arttığı ve bu durumun kırılmanın öncülü olan deformasyon esnasında oluşan çatlakların tanecik çapının boyutu ile sınırlı olduğunu,
- Nanokristal malzemelerin iyi tokluk göstermesinin üstün plastisite kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Ancak, nanokristal malzemelerin özelliklerinin tam ve doğru olarak belirlenebilmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır [45,46].

2.2.4 Termal Özellikler

Nanomalzemelerin termal özelliklerinin anlaşılması, nanomalzemelerin doğasının açığa çıkarılması ve nanomalzeme yapıları hakkındaki bilgilerin geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Erime noktasının incelenmesi, nanoparçacıklar ve yüksek yoğunluklu tanecik sınırları arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasına; termal iletkenlik araştırmaları ise ısı direnç ve fotonların yüzeyden ve tanecik sınırlarından yansımaları hakkında bilgi sahibi olunmasına olanak sağlayarak nanomalzemenin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, termal özelliklerin ölçülmesi ve incelenmesi, teorik öneminin yanı sıra nanomalzeme uygulamaları için de önem taşımaktadır. Örneğin, düşük termal iletkenliğe sahip nanomalzemeler yalıtım amacıyla kullanılabilir [47].

2.2.5 Elektriksel Özellikler

Özellikle sıfır ile iki boyut arasındaki nanomalzemeler, en önemli etkileri ve özellikleri parçacık içerisine hapsedilmiş yüklerin dalga fonksiyonunun kuantum sınırlandırmalarından kaynaklanılgı çekici elektromanyetik davranışlar sergilemektedir. Malzemelerin nanometre büyüklüğündeki boyutlarında, dalga fonksiyonu sınırlı sayıda

çözüme sahip olmaktadır. Bu durum, azalan karakteristik büyüklükle bant aralığının genişlemesi, iletkenliğin azalması ve durum yoğunluğunun düşmesi gibi bazı elektriksel özelliklerde değişikliği beraberinde getirmektedir [48].

2.2.6 Manyetik Özellikler

Manyetik nanoparçacıklar, yüksek alan tersinmezliği, yüksek doygunluk alanı, süperparamanyetizma, ekstra anizotropi (eşyönsüzlük) katkıları gibi dikkat çekici yeni davranışlar göstermektedir. Bu davranışlar, sınırlı ve sonlu-boyut etkileri ve bireysel nanoparçacıkların manyetik davranışı üzerinde egemen olan yüzey etkilerinden ileri gelmektedir [49]. Nanomalzemelerin manyetik özellikleri karakteristik boyuta güçlü şekilde bağlıdır [48]. Manyetik cisimlerin boyutları nanometre seviyesine indirildiğinde, nanoyapının yalnızca manyetik özellikleri değil aynı zamanda karakteristiği de oldukça farklılaşmaktadır [50]. Manyetik nanoparçacıklar, manyetik veri depolama araçlarında, manyetik sıvılarda (ferroakışkanlar), biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan manyetik boncuklarda, hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemler gibi önemli uygulamalarda kullanılmaktadır [51].

2.3 Nanomalzemelerin Kimyasal Reaktifliği

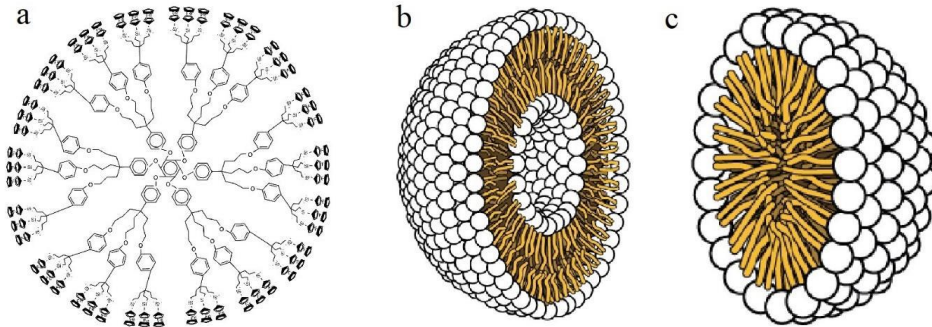
Parçacıklar küçüldüğünde, hacim başına düşen yüzey alanı artmaktadır. Reaksiyonlar, kimyasalın ya da malzemenin yüzeyinde meydana geldiği için aynı hacimde daha yüksek yüzey alanına sahip olmak daha fazla reaktivlik anlamına gelmektedir. Yüksek yüzey alanına sahip bir parçacık, düşük yüzey alanlı parçacığa oranla daha fazla sayıda reaksiyon bölgesine sahip olmakta ve bu durum kimyasal reaktifliğinin daha yüksek olmasını sağlamaktadır. Nanoparçacıklar, yüzeyler üzerinde tabakalar halinde dizilerek yüksek yüzey alanı sağlayabilmekte ve güçlendirilmiş aktiviteleri sayesinde katalizör uygulamalarında kullanılabilir [42].

2.4 Nanoparçacık Türleri

Nanoparçacıklar, içerdikleri bileşenler bakımından; organik, inorganik ve karbon temelli olmak üzere üç ana sınıfa ayrılabilirler.

2.4.1 Organik Esaslı Nanoparçacıklar

Dendrimeler, miseller, lipozomlar, ferritin vb. organik esaslı nanoparçacıklar veya polimerler olarak bilinmektedir (Şekil 2.1). Bu nanoparçacıklar; biyobozunur, toksik özellik göstermeyen nitelikte olup; miseller ve lipozomlar gibi bazı parçacıklar içi boş bir yapıya sahip oldukları için nanokapsül olarak da adlandırılmaktadır. Bu parçacıklar, sıcaklık ve ışık gibi ısı ve elektromanyetik radyasyona karşı hassas olup bu eşsiz özellikleri onları ilaç taşıma sistemleri için ideal bir seçenek haline getirmektedir. Organik esaslı nanoparçacıklar biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmakta ve vücudun belli bölgelerine enjekte edilerek hedefe yönelik ilaç taşıyımında kullanılabilmektedir [52].



Şekil 2. 1 Organik nanoparçacıklar; a. Dendrimer, b. Lipozom c. Misel [52]

2.4.2 İnorganik Esaslı Nanoparçacıklar

İnorganik esaslı nanoparçacıklar karbondan oluşmayan parçacıklardır. Metal ve metal oksit esaslı parçacıklar genellikle inorganik esaslı nanoparçacık olarak sınıflandırılmaktadır [52].

2.4.2.1 Metal Nanoparçacıklar

Metallerden yapıcı veya yıkıcı yöntemlerle sentezlenen nanoboyutlu parçacıklar, metal nanoparçacıklar olarak ifade edilmektedir. Neredeyse bütün metaller nanoparçacık

halinde sentezlenebilmektedir. Alüminyum, bakır, nikel, kadmiyum, kobalt, demir, gümüş ve altın; saha iyileştirmesi, bataryalar ve patlayıcılar gibi geniş kullanım alanına sahip metal nanoparçacıklardır. Bu parçacıklar, 10-100 nm aralığında düşük boyutlara sahip olma, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olma, gözenek boyutu, yüzey yükü ve yüzey yükü yoğunluğu, kristal ve/veya amorf yapıda olma, küresel ve silindirik şekilli olma, renk, reaktivlik ve hava, nem, ısı, güneş ışığı vb. çevresel etmenlere duyarlılık gibi ayırt edici özelliklere sahiptir [34,52].

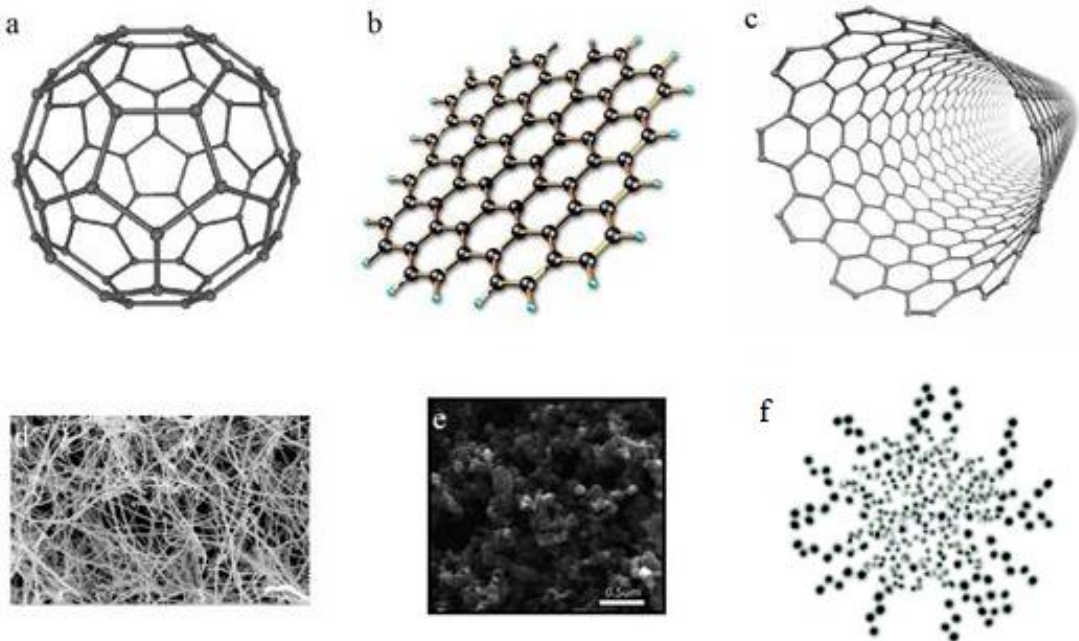
2.4.2.2 Metal Oksit Nanoparçacıklar

İnorganik nanomalzemelerin en büyük grubu metal oksitlerden oluşmaktadır. Metal oksit nanoparçacıklar, metal nanoparçacıkların özelliklerini modifiye etmek için sentezlenmektedir. Örneğin, demir nanoparçacıklar oksijen varlığında, oda sıcaklığında kendiliğinden, reaktifliği demir nanoparçacıklara göre daha yüksek olan demir oksite (Fe_2O_3) yükseltgenmektedir. Metal oksit nanoparçacıklar çoğunlukla yüksek reaktivlikleri ve verimlilikleri nedeniyle sentezlenmektedir. Metal oksit nanoparçacıklar en çok çeşitte nanoparçacık içeren grup olup bu parçacıkların üretim teknolojisi genellikle büyük ölçekli üretime uygun olarak gerçekleştirilmektedir [34,52].

2.4.3 Karbon Esaslı Nanoparçacıklar

Karbondan meydana gelen nanoparçacıklar karbon esaslı olarak ifade edilmektedirler. Fullerenler, grafen, karbon nanotüpler, karbon nanofiberler, karbon nanodotlar, karbon siyahı ve kimi zaman da nano boyutlu aktif karbon olarak sınıflandırılabilirler (Şekil 2.2) [52,53]. Fullerenler (C_{60}), sp^2 hibridizasyonu ile bir arada tutulan 60 karbon atomundan meydana gelen, kesik yirmi yüzlü olarak bilinen şekle sahip küresel bir karbon molekülüdür [52,54]. Küresel yapı, tek tabakalı fullerenler için 8.2 nm'ye kadar, çok tabakalı fullerenler için ise 4-36 nm çaplı olup; 28 ile 1500 arası karbon atomundan oluşmaktadır. Bir karbon allotropu olan grafen, karbon atomlarının iki boyutlu düzlem yüzeyinde oluşturduğu hekzagonal petek örgü ağıdır. Grafen plakalarının kalınlıkları genellikle 1 nm civarındadır. Karbon nanotüpler (CNT), petek örgülü karbon atomlarından oluşan bir grafen nanoyaprağının; çapları, tek tabakalı olanlar için 0.7 nm'ye, çok tabakalı olanlar için ise 100 nm'ye kadar düşebilen, uzunlukları ise birkaç

mikrometreden birkaç milimetreye kadar değişebilen nanotüpler oluşturmak için içi boş silindirler halinde sarılması ile meydana gelmektedir. Karbon nanotüplerin uçları boş veya yarım fulleren molekülü ile kapalı halde olabilmektedir [52]. Karbon nanotüpler, olağanüstü kuvvet ve eşsiz elektriksel özellikler sergilemekte olup uzunlukları boyunca etkin ısı iletkenleridirler [34]. Karbon nanofiberler, karbon nanotüp oluşturmak için kullanılan grafen nanoyapraklarının düzgün silindirik tüpler yerine koni ya da kadeh biçiminde sarılmasıyla meydana gelmektedir. Karbon siyahı, karbondan meydana gelen amorf bir madde olup genellikle 20-70 nm çaplı küresel şekillidir. Parçacıklar arasındaki bağlantılar çok kuvvetli olduğu için kümeleşmekte ve yaklaşık 500 nm boyutlu yığınlar meydana getirmektedirler [52]. Karbon nanoparçacıklar (CNP) veya karbon nanodotlar (CD) yeni bir karbon nanomalzeme sınıfı olup boyutları 10 nm'den küçüktür. Tek tabakalı karbon nanotüplerin preparatif elektroforezle saflaştırılması esnasında tesadüfen keşfedilen karbon nanodotlar, suda çözünebilen, etkili, verimli ve ucuz doğaları nedeniyle karbon ailesinin parlayan yıldızı haline gelmiştir. Bu parçacıkların yoğun ilgi çekmesinin temel nedeni ise yüksek floresan özellik göstermeleridir. Bu nedenle floresan karbon olarak da adlandırılmaktadırlar [55].

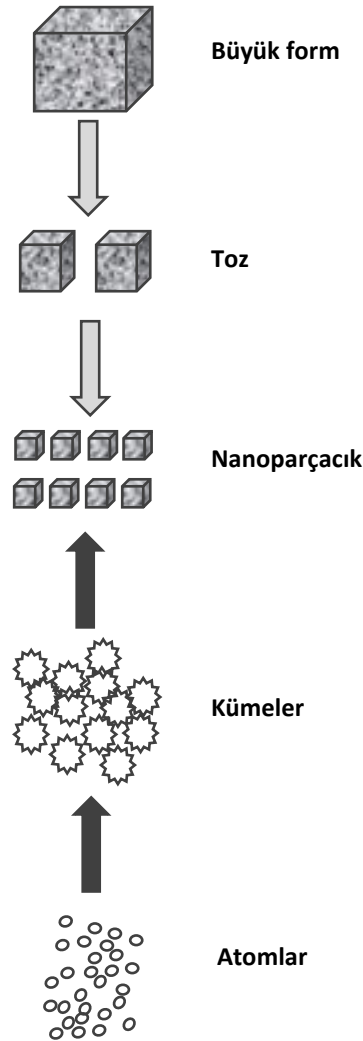


Şekil 2. 2 Karbon esaslı nanoparçacıklar; a. Fullerenler, b. Grafen, c. Karbon nanotüpler, d. Karbon nanofiberler, e. Karbon siyahı, f. Karbon nanodotlar [52,53]

2.5 Nanoparçacık Sentez Yöntemleri

Nanoparçacıkların sentez yöntemleri genel olarak 'aşağıdan yukarıya' ve 'yukarıdan aşağıya' yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Aşağıdan yukarıya sentez yöntemleri yapıcı yöntemler olarak adlandırılmakta ve nanomalzemelerin atomlardan kümeleri, kümelerden de nanoparçacıkları oluşturması temeline dayanmaktadır. Yukarıdan aşağıya da yıkıcı yöntemler ise büyük formdaki malzemenin nanometre boyutundaki parçacıklara indirgenmesini içermektedir [52] (Şekil 2.3).

Yukarıdan Aşağıya Yöntemler



Aşağıdan Yukarıya Yöntemler

Şekil 2. 3 Nanoparçacık sentez yaklaşımları [56]
(Arole ve Munde, 2014'e göre yeniden çizilmiştir.)

2.5.1 Yukarıdan Aşağıya Sentez Yöntemleri

Yukarıdan aşağıya sentez yöntemlerinden en yaygın olanları aşağıda sıralanmıştır.

Mekanik Öğütme: Mekanik yöntemler büyük miktarda nanomalzeme üretmek için en ucuz seçenektir. Bilyeli öğütme, mekanik yöntemler arasında en basit alternatif olup bu yöntemle, öğütücü ortamdaki kinetik enerjinin küçültülmekte olan malzemeye transfer edilmesi ile nanomalzeme üretimi gerçekleştirilmektedir. Metal, metal oksit ve polimer esaslı nanoparçacıklar bu yöntemle sentezlenebilmektedir [52,56].

Nanolitografi: Genel olarak litografi, istenilen şekil ya da yapının, ışığa duyarlı bir malzeme üzerine baskı yapılması işlemi olarak ifade edilmektedir. Nanolitografi, nanometre boyutundaki yapıların 1-100 nm büyüklüğünde, minimum tek boyutlu olarak üretilmesi çalışmaları olarak tanımlanabilmektedir. Optik, elektron demeti, çoklu foton, nano baskı ve taramalı sonda litografisi gibi çeşitli nanolitografik prosesler bulunmaktadır. Nanolitografi, karmaşık ekipmanlara ihtiyaç duyulan pahalı bir yöntem olmakla beraber, tek bir parçacıktan istenilen şekil ve boyutta bir yığın üretilmesine olanak vermektedir. Metal esaslı nanoparçacıklar bu yöntemle sentezlenebilmektedir [52].

Lazer ile Uzaklaştırma: Farklı çözücülerden nanoparçacık üretimi için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Sıvı çözelti içerisine daldırılmış bir metalin, bir lazer ışın demeti etkisiyle ışın yayması, nanoparçacıkları meydana getiren bir plazma buharı yoğunlaştırmaktadır. Metallerin geleneksel yöntemlerle metal esaslı nanoparçacıklara kimyasal indirgenmesi işlemine alternatif bir uygulama olup nanoparçacıkların organik çözeltiler ve su içerisinde herhangi bir stabilizatöre ihtiyaç duyulmadan kararlı bir şekilde sentezlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemle karbon esaslı ve metal oksit esaslı nanoparçacıklar sentezlenebilmektedir [52].

Termal Bozulma: Bileşiklerdeki kimyasal bağların ısı vasıtasıyla kırılması ile oluşan endotermik kimyasal bir bozulmadır. Bir elementin kimyasal parçalanmasının gerçekleştiği spesifik sıcaklığa dekompozisyon sıcaklığı denilmektedir. Karbon nanoparçacıklar ve metal oksit nanoparçacıklar bu yöntemle sentezlenebilmektedir [52].

Püskürtme: İyon bombardımanı yapılarak bir substrattan ayrılan parçacıkların bir yüzey üzerinde birikmesi yöntemi olarak ifade edilebilmektedir. Püskürtme yönteminde,

genellikle nanoparçacıkların bağlanmalarının ardından ince bir tabaka halinde birikmesi söz konusu olmaktadır. Nanoparçacıkların şekli ve boyutu; tabaka kalınlığı, sıcaklık ve bağlanma süresi, substrat türüne vb. bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntem, metal esaslı nanoparçacıkların sentezinde kullanılmaktadır [52].

Elektro patlama: Asal gaz ya da reaktif gaz ortamında, ince metal tel, aşırı yüksek sıcaklık ve çok kısa sürede çok yüksek akım oluşturulması ile plazma haline geçirilmektedir. Tel, içerisinden geçen çok yüksek akımlar nedeniyle 30.000 °C'ye kadar ısınabilmekte ve söz konusu sıcaklıkta direnci neredeyse sonsuz olduğu için akım akışı kesilmektedir. Bu aşamada elektromanyetik alan kaybolmaktadır. Metal plazma, hızla genişlemekte ve şok dalgası meydana getirmektedir. Saniyede 106-108 °C'ye ulaşan bu hızlı soğuma çeşitli yarı kararlı yapıların dengelenmesi için gerekli ideal ortamı sağlamaktadır. Bu yöntem kullanılarak metal tellerden 100 nm boyutunda, kimyasal ve metalürjik aktiviteye sahip metal tozları elde edilebilmektedir [57].

2.5.2 Aşağıdan Yukarıya Sentez Yöntemleri

Aşağıdan yukarıya sentez yöntemlerinden en yaygın olanları aşağıda sıralanmıştır.

Sol-jel: Basit ve çoğu nanoparçacığın sentezi için uygun bir yöntem olduğu için en çok tercih edilen aşağıdan yukarıya sentez metodudur. Sol, sıvı faz içerisinde askıda kalan katıların kolloidal çözeltisini, jel ise çözücü içerisine gömülmüş katı makro molekülü ifade etmektedir. Sol-jel yöntemiyle katı materyallerin sentezlenmesi genellikle yaş kimya reaksiyonlarını içermektedir. İnorganik sol veya jelde bir metal katyonu içeren tepken, kimyasal ön başlatıcı olarak adlandırılmaktadır. Metal oksitler ve kloritler sol-jel yönteminde yaygın olarak kullanılan kimyasal öncüllerdir. Öncüllerin, çalkalama, karıştırma ya da sonikasyon ile konak bir sıvı içerisinde yayılması (disperse edilmesi) ile meydana gelen sistem sıvı ve katı faz içermektedir. Nanoparçacıkların bu sistem içerisinde toplanması için sedimentasyon, filtrasyon, santrifügasyon gibi faz ayrımı yöntemi kullanılmakta ve ardından nem, kurutma işlemi ile giderilmektedir [52,58].

Eğirme: Nanoparçacıkların eğirme yöntemiyle sentezlenmesi işlemi, dönen bir disk içeren, sıcaklık gibi fiziksel parametrelerin kontrol edilebildiği bir reaktör ya da hazne içerisinde gerçekleşmektedir. Reaktör, içerisindeki oksijenin kimyasal reaksiyonlara neden olmaması için azot ya da başka bir inert gazla doldurulmaktadır. Öncüller ve su

gibi sıvıların sisteme pompalandığı ortamda disk farklı hızlarda dönmektedir. Dönmenin etkisiyle bir araya gelen atom ya da moleküller çökmekte ve toplanarak kurutulmaktadır. Sıvı akış hızı, disk dönüş hızı, sıvı/öncül oranı, beslemenin konumu, disk yüzeyi vb. parametreler bu yöntemle sentezlenen nanoparçacıkların karakteristiklerini belirlemektedir. Organik polimer esaslı nanoparçacıklar bu yöntemle sentezlenebilmektedir [52].

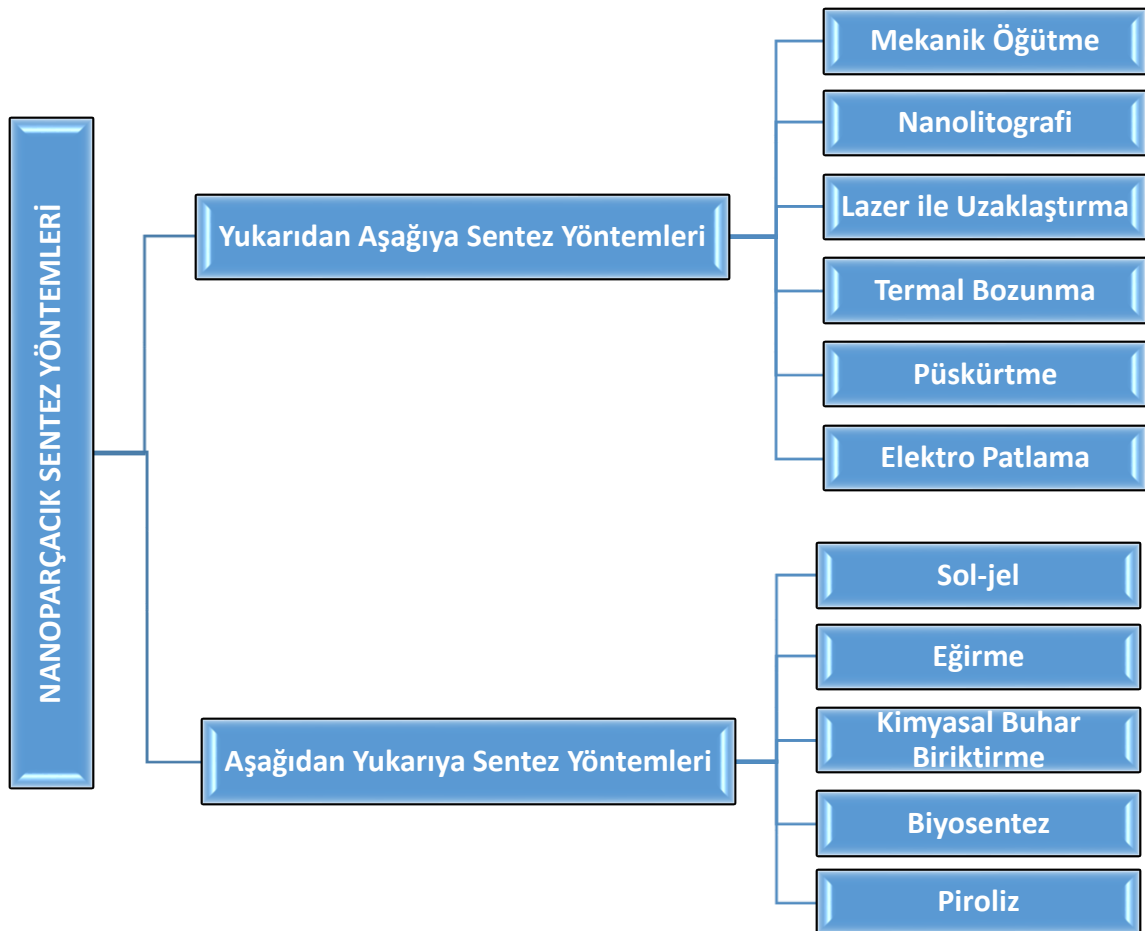
Kimyasal Buhar Biriktirme: Bir substrat üzerinde, gaz tepkenlerin ince bir film halinde birikmesi olarak ifade edilmektedir. Birikme işlemi bir reaksiyon haznesinde gaz moleküllerinin bir araya getirilmesiyle ortam sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. Isıtılan substrat bir araya getirilen gazlarla etkileşime girdiğinde kimyasal bir reaksiyon meydana gelmektedir. Bu reaksiyon substrat yüzeyi üzerinde ince bir ürün filmi oluşturmaktadır. Substrat sıcaklığı, bu yöntemi etkileyen bir faktör olarak belirtilmektedir. Kimyasal buhar biriktirme yöntemiyle yüksek saflıkta, uniform ve güçlü nanoparçacıklar elde edilebilmekle beraber, yöntemin özel ekipmanlara ihtiyaç duyması ve toksik gaz yan ürünlerin oluşması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Karbon nanoparçacıkların ve metal esaslı nanoparçacıkların sentezi bu yöntemle gerçekleştirilebilmektedir [52].

Biyosentez: Nanoparçacıkların doğa dostu bir üretim yöntemiyle, doğal kaynaklı maddelerden ya da canlı mikroorganizmalar kullanılarak elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bitki ekstraktları, bakteriler, funguslar, algler, mayalar ve enzimler kullanılarak sentezlenen nanoparçacıklar yoğun ilgi görmektedir. Bitki ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentezleri diğer biyosentez yöntemlerine kıyasla, kontaminasyon riskini azalttığı ve reaksiyon süresini kısalttığı için daha avantajlı olarak görülmektedir. Organik polimer nanoparçacıklar, karbon nanoparçacıklar ve metal esaslı nanoparçacıklar, bu yöntemle sentezlenebilmektedir [26,27,59].

Piroliz: Nanoparçacıkların büyük ölçekli üretimi için endüstride en sık kullanılan yöntemdir. Bir öncülün alev ile yakılması olarak ifade edilebilmektedir. Yüksek basınç altında küçük bir kanaldan geçerek yakma işleminin gerçekleşeceği fırına beslenen öncül, sıvı ya da gaz olabilmektedir. Daha sonra, nanoparçacıkların yanma gazları ya da gaz yan ürünlerden ayrılması işlemi gerçekleştirilmektedir. Bazı fırınlarda yüksek sıcaklığa

ulaşmak için alev yerine lazer ya da plazma kullanılmaktadır. Piroliz, basit, etkili, uygun fiyatlı ve yüksek verimli sürekli bir yöntem olarak bilinmektedir [52].

‘Aşağıdan yukarıya’ ve ‘yukarıdan aşağıya’ sentez yöntemleri Şekil 2.4’te özetlenmiştir [52,56,57,59].



Şekil 2. 4 Nanoparçacık sentez yöntemleri [52,56,57,59]

2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların karakterizasyonu için kullanılabilecek cihazlardan bazıları aşağıda sıralanmıştır [59–68].

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis Spektroskopisi): Nanoparçacıkların oluşumu hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar. Parçacıkların yapısı, stabilitesi ve kümelenmesinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): Parçacık boyutu ve şeklinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM): Parçacıkların şekil, boyutu ve morfolojilerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu (HRTEM): Bölgesel mikro yapıların ve kristalin yapıları nanoparçacıkların yüzeylerinin atomik dizilimlerinin incelenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM): Parçacıkların uzunluk, genişlik, yükseklik ve yapı ve morfoloji gibi diğer fiziksel özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS): Parçacıkların boyut dağılımının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

X-Işını Kırınımı (XRD): Nanoparçacıkların farklı kristal yapılarının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Titreşen Numune Manyetometrisi: Manyetik parçacıkların mıknatıslanmasının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Süperiletken Kuantum Girişim Manyetometrisi: Nanoparçacıkların manyetik özelliklerinin kestirimi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Zeta Potansiyeli: Nanoparçacıkların yüzey yüklerinin ve stabilitelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

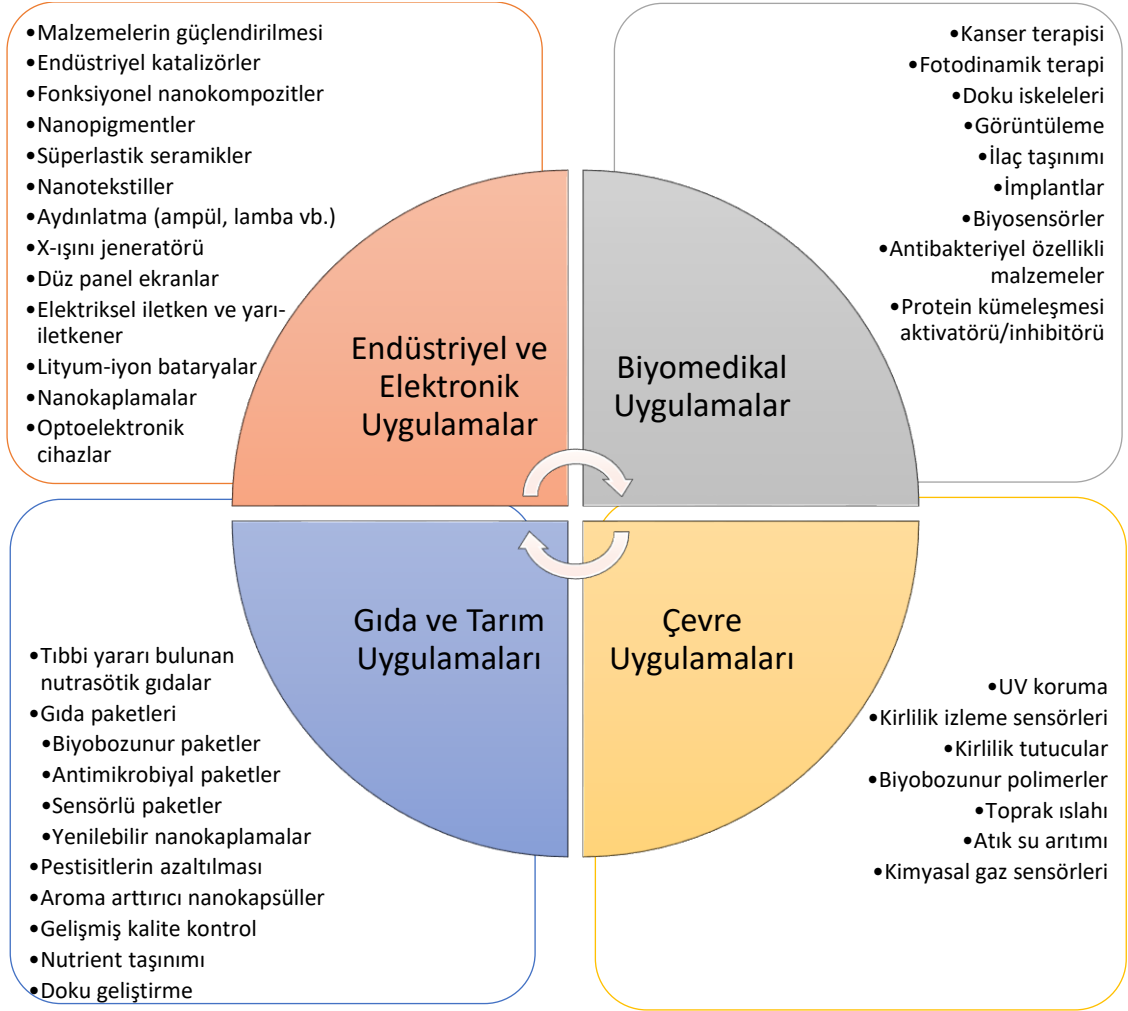
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR): Farklı fonksiyel grupların belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS): Manyetik nanoparçacıkların yüzeyinde meydana gelene reaksiyonların mekanizmasının belirlenmesi ve manyetik nanoparçacıkların kimyasal yapısında yer alan farklı elementlerin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

Termal Ağırlık Analizi (TGA): Nanoparçacıkların yüzey kaplamalarının ve nanoparçacık saflığının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

2.7 Nanoparçacıkların/Nanomalzemelerin Uygulama Alanları

Nanoparçacık/nanomalzeme uygulamaları geniş bir yelpazeye yayılmış olup temel olarak dört ana grupta toplanabilmektedir (Şekil 2.5) [1-7].



Şekil 2. 5 Nanoparçacık/nanomalzemelerin uygulama alanları [1–7]

KARBON NANODOTLAR

Karbon nanodotlar (CD) veya karbon nanoparçacıklar (CNP), yeni bir karbon nanomalzeme sınıfı olup boyutları genellikle 10 nm'nin altındadır. Karbon nanodotlar, 2004 yılında Xu ve ark. tarafından tek-duvarlı karbon nanotüplerin ark deşarjı yöntemi kullanılarak preparatif elektroforez ile saflaştırılması esnasında tesadüfi olarak bulunmuştur. Nanokarbon ailesinin parlayan yıldızı haline gelen karbon nanoparçacıklar; tehlikesiz, verimli ve ucuz olarak nitelendirilmektedir. Karbon, genellikle siyah bir malzeme olup sudaki çözünürlüğü düşük ve zayıf floresan özelliklidir. Karbon nanodotların son zamanlarda yoğun ilgi görmesinin temel sebebi ise yüksek floresan özellik göstermeleri ve floresan karbon olarak ifade edilmeleridir [9,40,55].

Karbon nanoparçacıklar genellikle yüzeylerinde karboksil gibi oksitlenmiş kısımlar içermektedir. Bu nedenle suda son derece iyi çözünmektedirler [69]. Farklı kaynaklardan farklı yöntemlerle sentezlenen karbon nanodotların yapısal analizleri yüzeysel olarak benzerlik göstermekle beraber, bünyelerindeki yüksek miktarda grafen tipi sp^2 hibridizasyonlu karbon-karbon bağı ve karbon atomlarının elmas tipi sp^3 hibridizasyonu varlığının, yapısal düzensizliğe neden olduğu belirtilmektedir [17].

Karbon nanoparçacıklar, keşiflerinden bu yana toksisiteleri ve çevresel zararları detaylı olarak belirlenmiş konvansiyonel yarı iletken kuantum parçacıklara kıyasla çeşitli avantajlara sahip oldukları için sayısız bilimsel çalışmanın gerçekleştirildiği popüler bir araştırma alanı haline gelmiştir. Karbon nanodotlar; biyo-görüntüleme, güneş pilleri için duyarlılaştırıcı, iyon saptama gibi uygulamalarda kullanılan metal esaslı toksik yarı

iletken kuantum parçacıkların yerini alabilecek umut vadeden nanoparçacıklar olarak görülmektedir. CD'lerin tipik yarı-iletken kuantum parçacıklara kıyasla düşük toksisite, fotokararlılık, kimyasal inertlik, üstün biyouyumluluk, yüzey fonksiyonel gruplarının modifiye edilebilmesi, düşük maliyetli, çok yönlü ve kolay sentez yollarının bulunması gibi avantajları bulunmaktadır. Bu nedenle karbon nanoparçacıklar, hâlihazırda kullanılan ve geleneksel floresan malzemelerin yerini alabilecek alternatiflerin geliştirilmesi çalışmalarının merkezi haline gelmiştir [8,9].

Karbon nanodotların, yakın kızıl ötesi spektral ışık uyarımları (NIR) altında, yakın kızıl ötesi spektral aralıklarda fotolüminesans (ışıldama) emisyonu gösterdiğinin belirlenmesi ile bu parçacıklara duyulan ilgi daha da artmıştır. Karbon nanodotların, NIR uyarımları ile harekete geçirilen NIR fotolüminesans emisyonu gösteriyor olmaları, vücut dokularının NIR'da şeffaf olmaları nedeniyle özellikle *in vivo* biyoteknoloji için önemli ve kullanışlı bir özelliktir. Karbon nanodotların fotolüminesansı, çözeltideki elektron alıcı ya da elektron verici moleküller tarafından etkin biçimde baskılanabilmektedir. Bu durum, ışıkla uyarılan karbon nanodotların mükemmel elektron alıcıları ve elektron vericileri olduğuna işaret etmektedir. Karbon nanodotların ışık uyaranlı bu ilginç elektron transfer özellikleri; ışık enerjisi dönüşümü, fotovoltaiik cihazlar ve benzer uygulamalar için heyecan verici fırsatlar sunmaktadır. Ayrıca, karbon nanodotlar hassas iyon tayini için nanoprob olarak da kullanılabilir [55].

Karbon nanodotların sentezleri ucuz ve dayanıklı olmasına rağmen, ilgilenilen malzemenin elde edilmesi için karmaşık ayırma ve saflaştırma yöntemlerine ihtiyaç duyulabilmektedir. Sentez yöntemiyle birlikte bu ayırma işlemlerinin etkinliği de karbon nanodotların fotolüminesans (PL) özelliklerini direkt olarak etkilemektedir. Mevcut sentetik yöntemler uniform olmayan nanoparçacıkların oluşumuna neden olduğu için nanoparçacıkların kuantum verimleri (QY), boyutları ve dalga boyuna bağlı PL spektrumları, geometrileri, bileşim ve yapıları sentez ve saflaştırmada kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişmektedir. Sentez koşullarındaki ufak bir değişiklik bile parçacık özelliklerinde önemli farklılıklara neden olabilmektedir. Ayrıca, fotolüminesans nitelikler; CD kompozisyonuna, başlangıç malzemelerinin dönüşüm miktarına, yüzeylerinde kalan kimyasal gruplara ve istenen ya da istenmeyen katkı maddelerinin varlığına güçlü bir şekilde bağlıdır. Bu nedenle, şu ana kadar karbon nanodotların

hazırlanması için çok sayıda yöntem ve başlangıç materyali kullanılmış ve dünya çapındaki araştırmalar, CD oluşumu için yeni malzemelerin kullanımı ve sentezin daha kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir şekilde olması üzerinde yoğunlaşmıştır [17].

3.1 Karbon Nanodot Sentez Yöntemleri

Karbon nanodot sentezi için kullanılan yöntemler oldukça geniş bir çerçeveye yayılmış olmakla beraber, son zamanlarda doğal ürünlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı, doğa dostu ve tek basamaklı sentez yöntemlerine olan ilgi artmaktadır.

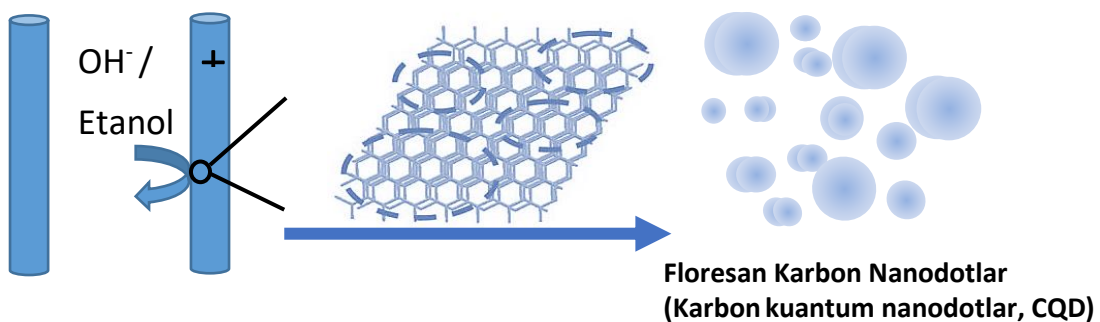
3.1.1 Lazer ile Uzaklaştırma (Lazer Ablasyon) Yöntemi ile CD Sentezi

Lazer ile uzaklaştırma yöntemi rutin olarak katı substratlardan inorganik nanoparçacıkların eldesi için kullanılmakta olup bir lazer ışını demeti vasıtasıyla gönderilen yüksek enerjinin hedeflenen katı substrattan parçacıkların ayrılması temeline dayanmaktadır. Katı substrattan ayrılan bu parçacıklar genellikle nanoboyutlu olmaktadır. Bu yöntem, Sun ve ark. 2006 yılında karbon nanodotların eldesi için kullanmış olup söz konusu çalışma karbon dotların doğrudan arz edildiği ilk çalışma olarak literatürde yerini almıştır. Karbon dotlar, argonun taşıyıcı gaz olarak kullanıldığı su buharı varlığında, sıcak presleme yöntemi ile grafit tozu ve çimento karışımının pişirme, kürlleme ve argon akımında sertleştirme adımlarını takiben elde edilen karbon bir hedeften, lazer uzaklaştırma yöntemi ile 900 °C ve 75 kPa basınçta üretilmiştir. Elektron mikroskobu analizleri doğrultusunda, üretilen örneklerin yoğun olarak nanoboyutlu karbon parçacıkların farklı büyüklükteki kümelerini içerdiği ve 5 nm boyutunda karbon nanoparçacıkların elde edildiği belirtilmiştir. Elde edilen örnek ve sulu çözeltisinde, asitle muamele işleminden sonra bile fotoluminesans saptanmamıştır. Ancak asitle muamele edilmiş karbon parçacıkların hidrokarbon zincirleri ile yüzey pasivasyonunun (pasifleştirme, yüzey işlevselleştirilmesi) gerçekleştirilmesinin ardından parlak luminesans ışımaya gözlenmiştir. Ayrıca diğerlerine göre daha büyük boyutlu olan karbon nanodotların çok daha az ışımaya yaydığı belirlenmiştir. Bu çalışma, karbon nanodotların sentezine yönelik öncül olmasının yanı sıra, CD yüzeyinin ve boyutlarının parçacıkların floresan özellikleri üzerinde önemli bir rolü olduğunu da ortaya çıkarmıştır [12,55,70].

Gonçalves ve ark. 2010 yılında lazer ablasyonu yöntemiyle elde ettikleri nanoparçacıklar 63 nm ve 373 nm büyüklüklerinde iki ana boyut dağılımı göstermiş olup floresan özellik göstermeleri için PEG ve merkaptosüksinik asit (MSS) ile yüzey pasivasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzey pasivasyonu için sıklıkla polietilen glikol (PEG) tercih edilmektedir [70,71]. Fonksiyonelleştirilmiş karbon dotların floresan şiddetinin su içerisinde stabil kaldığı, çözelti ve pH'a karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir [71].

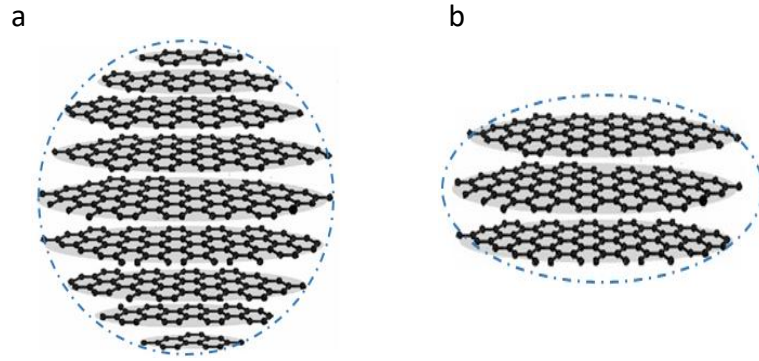
3.1.2 Elektrokimyasal Yöntemler ile CD Sentezi

Li ve ark.'nın 2010 yılında yayınladıkları çalışmada, karbon kaynağı olarak kullanılan grafit çubuklar, NaOH/etanolün elektrolit çözelti olarak yer aldığı bir elektrokimyasal hücre düzeneğı içerisinde hem anot hem de katot olarak konumlandırılmış ve karbon nanodotların alkali ile desteklenmiş tek basamaklı sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Akımın elektrokimyasal döngü boyunca geçişı, grafit çubuklarının aşınmasını ve farklı dalga boylarında farklı renkler sergileyen karbon nanodotların elde edilmesini sağlamıştır. Bu çalışmada elde edilen karbon nanodotlar uniform küresel morfoloji göstermemiş, farklı lüminesans renklerinin gözlenmesi parçacık boyutundaki farklılıklara ve yüzey bozukluklarına bağlanmıştır. HRTEM görüntüleri, parçacıkların, tipik grafit kristal öze sahip olduklarını, TEM görüntüleri ise boyutlarının 1.2-3.8 nm arasında olduğunu göstermekte olup karbon nanodot olarak ifade edilebileceklerini doğrulamıştır [12,72]. Elektrokimyasal yöntemle CD sentezinde karbon kaynağı olarak; tek duvarlı karbon nanotüpler, grafit çubuklar, karbon fiberler ve alkollerin kullanımına dair çalışmalar mevcut olup elde edilen karbon nanodotların boyutlarının genellikle 10 nm'nin altında olduğu belirtilmektedir [16].



Şekil 3. 1 Karbon nanodotların elektrokimyasal üretimi [55]
(Li ve ark. 2012'ye göre yeniden çizilmiştir.)

**Floresan karbon nanodotlar (karbon kuantum dotlar) ve grafen kuantum nanodotlar (GQD) birbirlerine son derece benzemekte olup aralarındaki temel farklılık CQD'lerin küresel, GQD'lerin ise disk benzeri morfolojide olmalarıdır (Şekil 3. 2) [12].*



Şekil 3. 2 Karbon nanodotlar ve grafen kuantum nanodotların yapısal özellikleri a. CQD
b. GQD [12] (Jelinek R. 2017'ye göre yeniden çizilmiştir.)

3.1.3 Kimyasal Oksidasyon Yöntemi ile CD Sentezi

Substratın yükseltgen bir ajanla muamelesi sonucunda oksidasyonu, CD sentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal oksidasyon, büyük ölçekli üretimler için basit ve etkili bir yaklaşımdır. Karbon kaynağı olarak kullanılan malzemelerin yüzeyi, nitrik asit gibi kuvvetli asitlerin varlığında aşınmakta ve karbon nanodotlar kolaylıkla elde edilebilmektedir [8]. Bu yöntem ile CD sentezini gerçekleştiren ilk ekip olan Liu ve ark., için için yanan bir mumun üzerine cam tutarak mum isini biriktirmiş ve 5 M nitrik asit ile muamele ederek; homojen, siyah, sulu bir çözelti elde etmişlerdir. Bu süspansiyon santrifügasyon ile siyah karbon çökeltisi ve 312 nm UV ışık altında sarı floresan ışıma gösteren açık kahverengi üst faza ayrılmıştır. Çökelti halindeki siyah fazın da floresan materyal içerdiği tespit edilmiş, floresan materyalin en yüksek oranda geri kazanımı için alt ve üst faz nötralize edilerek, su ile kapsamlı biçimde diyaliz edilmiştir. Nötralize edilen mum isinin suda çok iyi çözündüğü belirtilmiştir. Nötralize edilen mum isinden, poliakrilamit jel elektroforezi yöntemi ile saf floresan karbon nanodotlar elde edilmiş olup farklı renklerde floresan ışıma veren parçacıkların büyüklükleri yaklaşık 1 nm olarak belirtilmiştir [15].

3.1.4 Ultrasonik Yöntem ile CD Sentezi

Belirli ultrasonik frekanslarda, organik malzemelerin sırasıyla dehidrasyon, polimerizasyon ve karbonizasyona uğraması; kısa, tek bir çekirdek patlamasının oluşuma neden olmaktadır. Bu nedenle, CD'lerin ultrasonik yöntemle de sentezlenebileceği düşüncesi açığa çıkmış ve bu konudaki çalışmalar artmıştır [16]. 2011 yılında Li ve ark. tarafından CD'lerin asit ya da baz ile desteklenmiş ultrasonik yöntemle tek basamaklı sentezi gerçekleştirilmiştir. Glikozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada, suda oldukça iyi çözünen 5 nm'den küçük karbon nanodotlar elde edilmiş olup görünür bölgede ve NIR'da floresan ışıma verdikleri belirlenmiştir [73]. 2014 yılında ise Park ve ark., suda çözünebilen yeşil karbon nanoparçacıkların farklı gıda atığı türevli kaynaklardan büyük ölçekli üretimi için kullanılabilecek basit bir yöntem olarak ultrasonik sentez metodunun işlevselliğini incelemiştir. Çalışma sonucunda, ultrasonik sentez yaklaşımını kullanarak, basit ve çevre dostu bir yöntemle, 100 kg gıda atığından, yüzeylerinde bolca bulunan oksijen içeren gruplar sayesinde suda çözünürlükleri çok yüksek, fotoluminesans özellikte, yaklaşık 4 nm boyutunda ve fotokararlılıkları oldukça yüksek 120 gram yeşil-CD sentezinin başarıldığı rapor edilmiştir [74].

3.1.5 Termal Dekompozisyon/Piroliz Yöntemi ile Sentez

Termal dekompozisyon yöntemi farklı yarı iletken ve manyetik nanomalzemelerin sentezi için kullanılmakta iken, dışarıdan gelen ısının organik maddelerin dehidrasyon ve karbonizasyonuna katkıda bulunduğu ve onları karbon nanodotlara dönüştürdükleri tespit edildikten sonra CD sentezi için yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [16]. Tek basamaklı termal piroliz yöntemi ile CD eldesi ilk olarak Bourlinos ve ark. tarafından 2008 yılında gerçekleştirilmiş olup; CD sentezi için organik amonyum kısmının yüzey modifiye edici görevi gördüğü, sitrat kısmının ise karbon kaynağı olarak değerlendirildiği farklı amonyum sitrat tuzları kullanılmıştır. Tuzların kalsinasyon işlemi hava ortamında 10 °C/dakika ısıtma hızı ile 300 °C'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanoparçacıkların ortalama boyutlarının 10 nm'den daha küçük olduğu, yüzey işlevselleştirmesine bağlı olarak organik veya sulu çözeltiler içerisinde yüksek oranda çözünebildiği ve farklı dalga boyları ile uyarıldığında görünür bölgede ışıma verdiği belirtilmiştir [8,75].

Krysmann ve ark. tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen sitrik asit ve etanolamin öncüllerinin solvent içermeyen ortamda, farklı sıcaklıklarda (180 °C, 230 °C, 300 °C, 400 °C) kontrollü pirolizi ile CD sentezinin gerçekleştirildiği çalışmada, karbon çekirdeğin oluşması için daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulurken, moleküler floroforların düşük piroliz sıcaklıklarında baskın olması nedeniyle CD'lerin fotoluminesans davranışının sentez koşullarına şiddetle bağlı olduğu sonucuna varılmıştır [76].

2016 yılında Guo ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise CD eldesi için karbon kaynağı olarak doğal ve keratine zengin bir ürün olan insan saçı kullanılmıştır. 250 °C'de 24 saat süren saçın direkt karbonizasyonu ile elde edilen siyah katı çözünerek santrifüj edilmiş ve yüksek fotokararlılık gösteren CD'ler elde edilmiştir [77].

Termal dekompozisyon/piroliz işlemi genel olarak katı materyalin yüksek sıcaklıkta dekompozisyonunu içermektedir. Ancak karbon kaynaklarının sulu çözeltilerinden ısı destekli CD sentez yöntemleri daha kısa süreli, basit ve daha az saflaştırma işlemi ile CD eldesine olanak sağlayabildiği için daha fazla tercih edilmektedir.

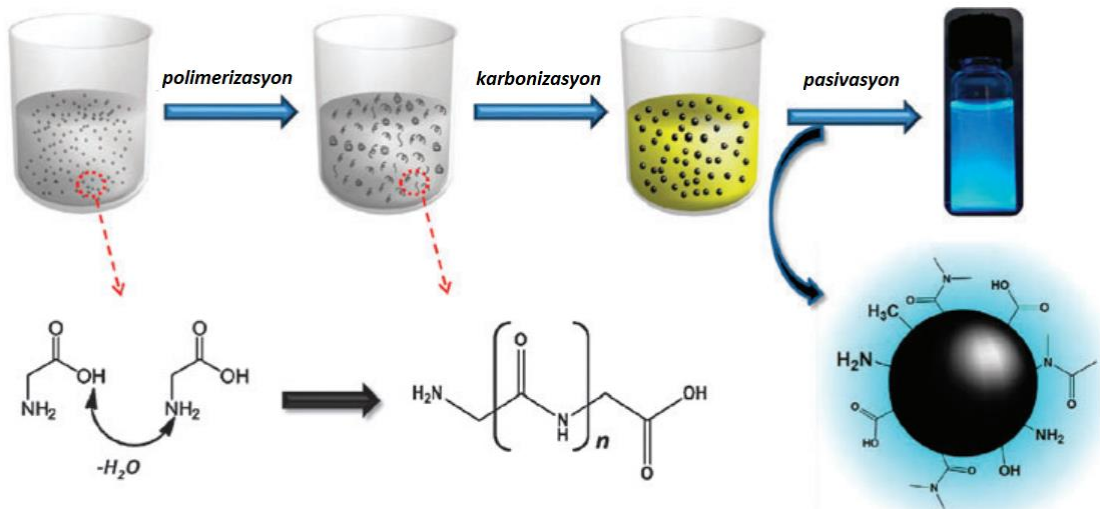
3.1.5.1 Hidrotermal ve Su Bazlı Yöntemler ile CD Sentezi

Karbon nanodotların üretimi için kullanılan en yaygın yöntemler olan hidrotermal ve su bazlı metotlar; karbon kaynaklarının sulu çözeltilerinden, basınçlı bir kap veya hava ortamında; bir ısı kaynağının üzerinde, bir fırın veya otoklav içerisinde karbon nanoparçacık sentezlenmesi presibine dayanan yöntemler topluluğudur.

Hidrotermal sentezin temeli, karbonlu yapı taşlarının yoğunlaşmasını ve grafit özün kristalleşmesini indükleyen yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesidir [12]. Hidrotermal sentez yönteminde tipik olarak bir karbon kaynağının sulu çözeltisinin (örneğin, asit ya da baz gibi katkı maddeleri içeren veya içermeyen karbonhidratlar) bir otoklav içerisinde sabit sıcaklıkta birkaç saat ısıtılması söz konusu olmaktadır. Ürün içeren çözeltinin üst fazı santrifüjasyon ile ayrılarak ürün elde edilmektedir. Biyokütle ve biyokütle türevi karbon kaynakları veya başka materyaller karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Elde edilen karbon nanodotların boyutları 2-3 nm'den yüzlerce nanometreye kadar değişebilmektedir. Karbon nanodotların yüzeyi karboksil, amino ya da hammadde kaynaklı farklı gruplarla stabilize edilerek ileri seviye fonksiyonelleştirmelerine olanak sağlanmaktadır [17].

Hidrotermal yöntemin karbon nanodot eldesi için kullanımına yönelik ilk çalışma 2011 yılında Yang ve ark. tarafından yayınlanmıştır. Söz konusu çalışmada, glikoz ve monopotasyum sülfat belli bir molar oranda karıştırılarak distile su içinde çözülmüş, ardından suyun içerisinde yer alan oksijenin azot vasıtasıyla giderimi gerçekleştirilmiştir. Sızdırmaz teflon tabanlı otoklav kabı içerisindeki karışım bir fırına konularak 200 °C’de 12 saat boyunca reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Ardından karışım çöken kısımların ayrılması için 9000 rpm’de santrifüj edilmiş ve üst faz alınarak dondurarak kurutma yöntemiyle kurutulmuştur. Bu yöntem, basit ve çok yönlü oluşu, farklı karbon kaynaklarından CD üretimine olanak vermesi ve CD oluşumu ile yüzey iyileştirmesinin eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesini mümkün kılması bakımından ilgi çekmektedir. Bahsi geçen çalışmada, monopotasyum sülfat konsantrasyonunun değişimi ile CD’lerin fotoluminesansının ayarlanabildiği belirtilmektedir [8,78].

Hsu ve ark., karbon nanodot eldesi için amino ve karboksilik asit içeren organik moleküllerden (etilendiamin tetra asetik asit –EDTA-, glisin vb.) de yararlanılabileceğini ileri sürerek CD oluşumunun, dehidrasyon, polimerizasyon, karbonizasyon, karbonizasyon (kömürleşme) ve pasivasyon olmak üzere dört basamakta gerçekleştiği fikrini ortaya atmıştır (Şekil 3.3) [79].



Şekil 3. 3 Glisinden dehidrasyon, polimerizasyon, karbonizasyon ve pasivasyon basamaklarını takiben karbon nanodot sentezi modeli [79]

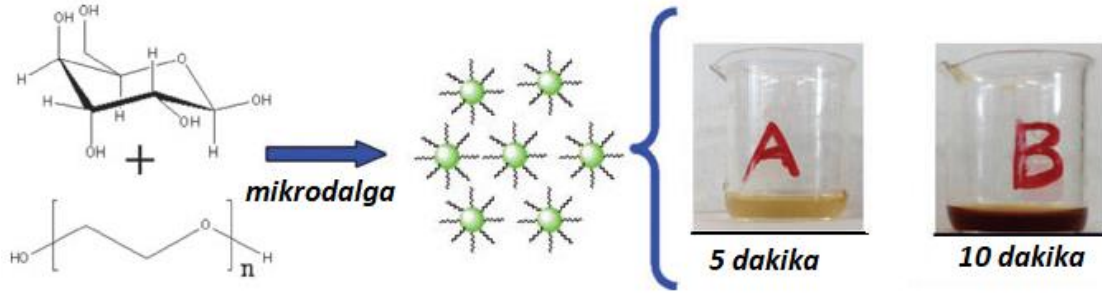
Karbon nanodotların sentezi için organik karbon kaynaklarının kullanıldığı hidrotermal yöntem, çevre dostu ve yeşil bir yaklaşım olarak ifade edilmektedir. Kahve telvesi, portakal suyu, yeşil çay vb. doğal karbon kaynaklarının kullanılarak floresan karbon nanodot eldesine dair çalışmalar bulunmaktadır [80].

3.1.6 Mikrodalga Yöntemi ile CD Sentezi

Karbon nanodot sentezinde kullanılan mikrodalga/mikrodalga destekli yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

3.1.6.1 Ev Tipi Mikrodalga Fırın ile Sentez

Mikrodalga, 1 mm'den 1 m'ye kadar geniş bir dalga boyu aralığındaki, günlük hayatta ve bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan elektromanyetik bir dalga türüdür. Lazer ışınları gibi mikrodalga da substratın kimyasal bağlarını koparmak için şiddetli enerji sağlayabilmektedir. Mikrodalga, CD sentezi için enerji tasarruflu bir yaklaşım olarak kabul edilmekte; homojen ısıtma sağlayan, düşük maliyetli, etkin ve tek basamaklı bir yöntem olarak ifade edilmektedir. Bu yöntem, reaksiyon süresini büyük ölçüde kısaltmaktadır. Genel olarak CD'lerin mikrodalga ile desteklenmiş sentezi ısı bozunma ve yüzeyin işlevselleştirilmesini içermektedir [8,16]. CD'lerin mikrodalga ile desteklenmiş sentezine dair bu ilgi çekici yaklaşım ilk olarak Zhu ve ark. tarafından 2009 yılında uygulanmıştır. PEG 200 ve sakkaritin (glikoz, fruktoz vb.) distile su içerisinde çözünmesiyle hazırlanan karışım, 500 W gücündeki mikrodalga fırında 2-10 dakika ısıtılmıştır. Oluşan karbon dotlar önce renksiz bir çözelti iken zamanla koyu kahverengi bir karışım haline gelmiştir (Şekil 3.4). Reaksiyon süresine bağlı olarak karbon dot boyutlarında farklılık gözlenmiştir. Boyutların, 5 dakika ısıtıldıklarında 2.57 ± 0.45 nm aralığında iken, 10 dakika ısıtıldıklarında 3.65 ± 0.6 nm aralığında olduğu belirtilmiştir [8,81]. Mikrodalga, yalnızca CD sentezi için değil aynı zamanda farklı yöntemlerle sentezlenmiş CD'lerin fotoluminesansını arttırmak için de kullanılmaktadır [18,82,83].



Şekil 3. 4 Mikrodalga yaklaşımı ile CD sentezi [81]

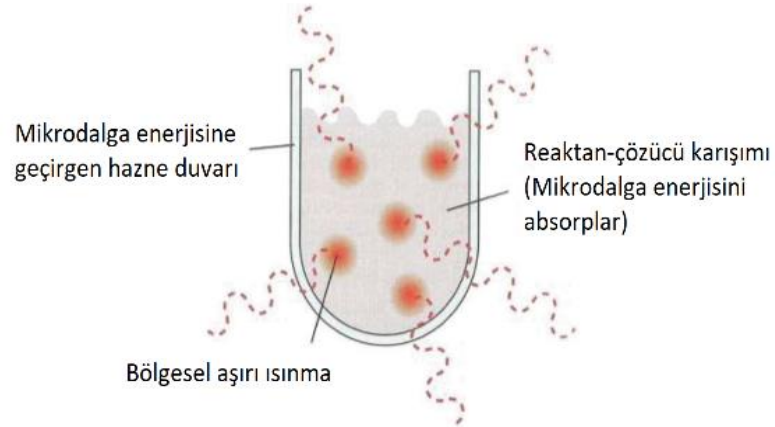
3.1.6.2 Mikrodalga ile Desteklenmiş Hidrotermal Yöntem ile Sentez

Mikrodalga ile desteklenmiş hidrotermal yöntem yenilikçi bir sentez tekniği olup hidrotermal yöntem ve mikrodalga yönteminin eş zamanlı kullanımı olarak düşünülebilir. Hidrotermal sentez, basınca dayanıklı bir kap içerisinde, 200 °C civarındaki sıcaklıklarda sulu ortamda gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar ile malzeme sentezlenmesidir. Uygun öncül çözeltilerin bir kap içerisinde ısıtılması sonucu yüksek basınç meydana gelmektedir. Bu durum, sıkıştırılmış sıvı ortam içerisindeki sistem bileşenlerinin dispersiyonunu arttırmakta ve konvansiyonel yöntemle kıyasla daha düşük sıcaklıkların ve kısa reaksiyon sürelerinin yeterli olmasını sağlamaktadır (Şekil 3.5) [19].

Mikrodalga sentez ise malzeme sentezi için mikrodalga radyasyondan yararlanmaktadır. Konveksiyonla gerçekleşen geleneksel ısı transferinin aksine mikrodalga, çeşitli mekanizmalarla malzemeye doğrudan bağlantı kurması nedeniyle, ısıyı direkt olarak reaktana transferine oldukça uygun bir yöntemdir. Mikrodalga ile ısıtmanın ana mekanizmaları, mikrodalgaların doğrudan elektrik dipollerine bağlanması ve dielektrik ve manyetik kayıp ısılarıdır. Doğrudan ve yoğun ısı transferi nedeniyle reaksiyon termal dengeden uzakta, hızlı biçimde gerçekleşmektedir [19].

Mikrodalgalar elektrik dipollerine iyi bağlandığı için, hidrotermal senteze yönelik sulu bir çözeltideki H₂O'nun yüksek polaritesi, mikrodalga ısıtmaya son derece uygundur. Mikrodalga ile desteklenmiş hidrotermal sentez sisteminde reaksiyon süresi son derece kısaldığı için bu yöntem bir hızlı kimya metodu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, düşük enerji ihtiyaçları da dikkate alındığında bu teknik, zararsız reaktan ve solventlerin kullanımı, enerji tüketiminde verim karşısında yüksek verimlilik, kirliliğin önlenmesi için kolay gözetim gibi çoğu yeşil kimya prensibine uymaktadır [19]. Mikrodalga ile

desteklenmiş yöntemler nanoparçacık eldesi için etkili yöntemler olup reaksiyon ortamının hızlı ve uniform şekilde ısınmasını sağladığı için reaksiyon süresini aşırı derecede kısaltmakta ve ürün verimi ve saflığını arttırmaktadır [84].



Şekil 3. 5 Mikrodalga ile desteklenmiş hidrotermal sentez yöntemi ile CD eldesi; ısıtma işleminin metodolojisi [19]

2015 yılında Liu ve ark., polietilen amin çözeltisinden, mikrodalga sentez cihazı kullanarak 200 W, 180 °C’de karbon nanodot sentezlemeyi başarmıştır. Sentezlenen CD’lerin üstün floresan özellik, düşük toksisite, iyi stabilite ve suda çözünürlük gösterdiği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde bu sentez yönteminin basit, kolay kontrol edilebilir ve endüstriyel seviyede ölçeklendirmesi kolay bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [84].

3.2 Karbon Nanodotların Uygulama Alanları

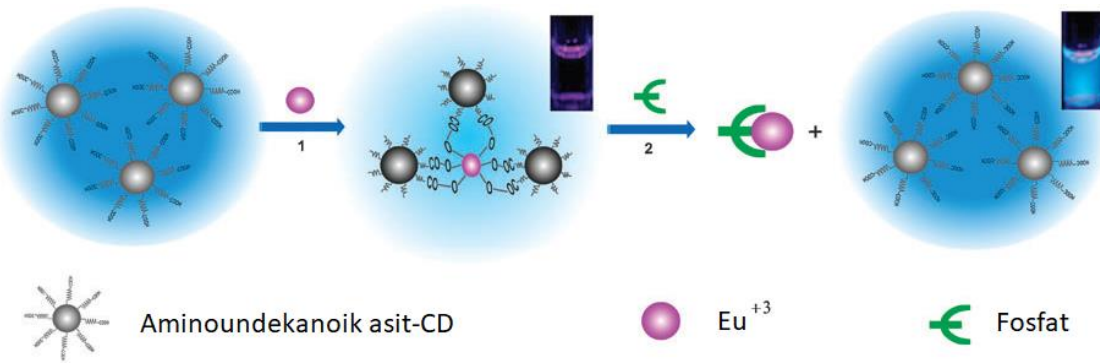
Karbon nanodotlar, sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle çok farklı alanlarda kullanılabilir. Karbon nanodotların başlıca uygulama alanları aşağıda sıralanmıştır.

3.2.1 Sensörler

Karbon dotların floresan şiddeti etraflarındaki çevre ile oldukça ilişkilidir. CD ve kimyasal maddeler arasındaki etkileşimler karbon dot emisyonunun sönmesine veya artmasına neden olmaktadır. Bu sayede karbon dotlar, maddelerin miktarının belirlenmesi için bir nevi floresan prob olarak kullanılabilir. CD floresansına dayalı, iyon algılama (katyonlar; demir, civa, bakır iyonları vb. ve anyonlar), pH tayini, biyolojik madde tespiti

(tiyoller, glikoz, reaktif oksijen ve azot türleri vb.), enzim, protein, DNA ve sıcaklık algılamaya dayalı sensör çalışmaları rapor edilmiştir.

Karbon nanodotların kullanıldığı bir çalışmada, başlangıçta evropiyum iyonlarının (Eu^{+3}) CD yüzeyindeki karboksilat grupları ile bir araya gelmesi ile sönümlenen ve kümeleşen karbon nanodotların, fosfat iyonlarının varlığında Eu^{+3} 'ün PO_4^{-3} 'a, karboksilat gruplarından çok daha yüksek afinite göstermesi nedeniyle CD kümeleşmelerinin önleniği ve floresan özelliklerin açığa çıktığı rapor edilmiştir. Bu parçacıklar, PO_4^{-3} iyonlarının hassas ve seçici biçimde tayini için kullanılmıştır (Şekil 3.6) [8,85].



Şekil 3. 6 Aç kapa floresan probu ile fosfat tayinin şematik gösterimi [85]

3.2.2 İlaç Taşıma Sistemleri

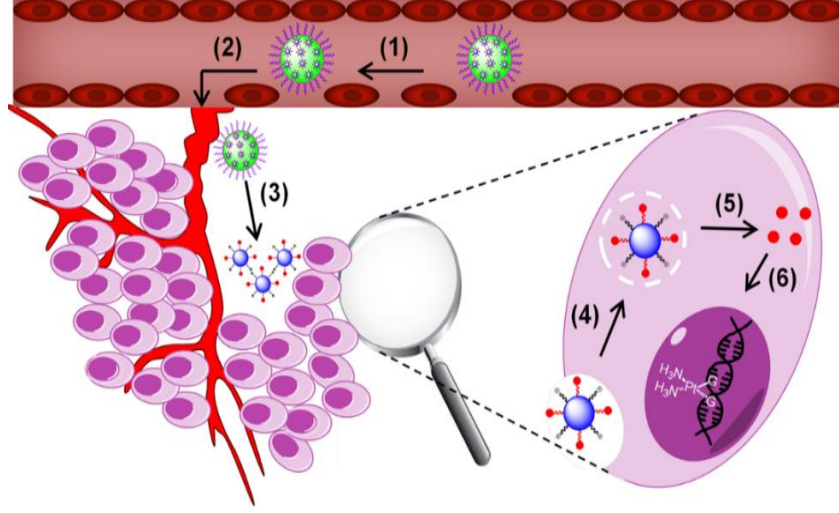
Karbon nanodotlar, genellikle sp^2 ve sp^3 hibridizasyonlarının bir karışımından oluşan, oksijen taşıyan fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilmiş konjuge karbon demetleri halindeki karbon nano yapısıdır. CD'lerin güçlü floresan özelliklerinin yanı sıra, özgün kimyasal yapıları, aktif terapötik moleküllerle sp^2 karbon çerçevesi dahilinde güçlü $\pi-\pi$ etkileşimleri kurmalarına izin vermekte ve yüzey fonksiyonel grupları, biyolojik afinite ligantları gibi diğer moleküllerle farklı birleşmeler gerçekleştirmelerine olanak sağlamaktadır. Bu özgün nitelikler karbon nanoparçacıkları, bireysel tıpta ilerlemelere yol açacak ilaç taşıyıcıları haline getirmektedir [86].

Yapılarında yer alan amino, karboksil ya da hidroksil gibi zengin ve ayarlanabilir fonksiyonel gruplar sayesinde karbon nanodotlar, terapötik ajanların taşınması, teşhis ve tedavi esaslı nano-ilaçların üretimi için kullanılma potansiyeline sahiptir. Karbon dotların sağladığı parlak emisyon, ilaç yayılımı ve ilaca karşı cevabın dinamik ve gerçek zamanlı olarak izleyebilmesine imkan tanımaktadır [8]. Floresan CD'ler, 10 nm'den daha

küçük boyutlu, yüksek biyouyumluluk gösteren, düşük toksisiteli, yüksek kuantum verimine sahip ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle nanotıp alanında parlayan bir yıldız olarak değerlendirilmektedir [87]. Fotolüminesans karbon nanodotların, yüksek kimyasal stabilite, suda çözünürlük, foto bozulmaya karşı direnç, biyouyumluluk, düşük toksisite ve kolayca ayarlanabilen optik özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilecekleri öngörülmektedir [88].

PEG ile modifiye edilmiş CD'lerin kullanıldığı bir çalışmada, karbon nanoparçacıklara anti-kanser özellikli ilaç etken maddesi doksurubisin (DOX) yüklemesi ve taşınımı gerçekleştirilmiştir. DOX'un hücre içerisindeki salım süreci floresan görüntüleri ile gözlenmiştir. Sitoplazma CD'lerden kaynaklı yeşil floresan verirken, çekirdek içerisinde DOX kaynaklı kırmızı floresan ışımaya tespit edilmiştir. DOX'un hücre içerisine girdiği ve ardından tedavi için çekirdeğin içerisine salınımının gerçekleştiği belirtilmiştir. Polietilenimin (PEI) ile modifiye edilmiş CD'lerin yer aldığı bir çalışmada ise PEI ile modifiye edilmiş CD'lerin yüzey potansiyelleri (yüzey yükleri) pozitif hale geldiği için negatif yüklü olan DNA'yı absorplayabildiği ve gen transferi için kullanılabileceği belirtilmiştir [89].

Karbon nanodotlar umut vaadeden optik ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle dikkat çekici nanotaşıyıcılar olmasına rağmen, kanser ilaç taşıyıcısı olarak pratikteki uygulamaları, tümörlerin *in vivo*'daki karmaşık mikroçevrelerine duyarlı olmayan yüzey özellikleri nedeniyle kısıtlanmaktadır. Bu nedenle tümörün hücre dışındaki mikroçevresine duyarlı, pH'a bağlı olarak yük değiştirilebilir, görüntüleme rehberli ilaç nanotaşıyıcı sistemlerinin tasarlanması için çalışılmaktadır (Şekil 3.7) [90].



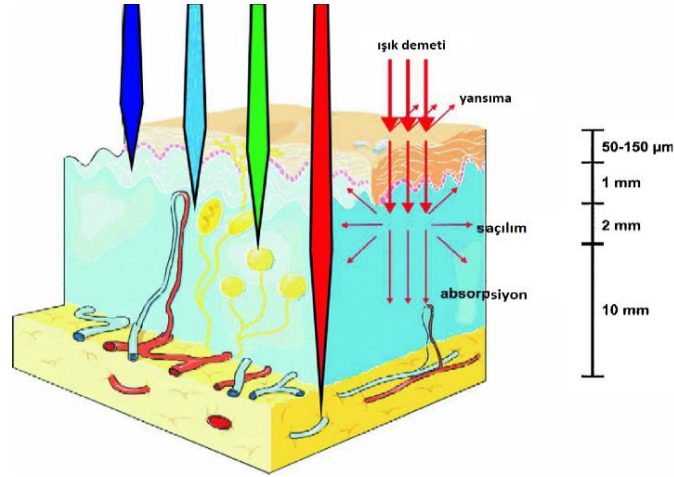
Şekil 3. 7 pH'a bağlı olarak yük değiştirebilen CD temelli ilaç taşınımının şematik gösterimi [8,90]

Şekil 3.7'de yer alan numaraların ifade ettiği basamaklar aşağıda sıralanmıştır [8,90].

- (1) Negatif yük/PEG'lemenin CD'nin kan dolaşımında kalma süresini uzatması
- (2) Gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi ile ilacın tümör bölgesinde toplanması
- (3) Tümör mikroçevresinde pH'a bağlı yüzey yükü değişimi
- (4) Kanseri hücreleri tarafından hücre içine alınması
- (5) Karbon dot taşıyıcılardan proton sünger etkisi ile ilaç salınımı
- (6) İlaç etken maddesinin DNA'ya bağlanarak kanser hücreleri için sitotoksik etki göstermesi

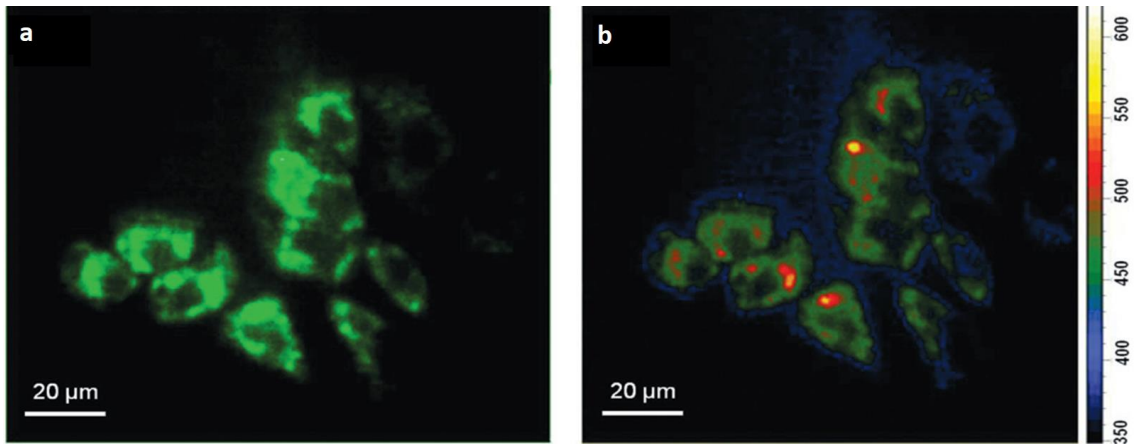
3.2.3 Biyo-görüntüleme

Karbon nanodotlar, biyoyumluluk, düşük toksisite, ayarlanabilir fotoluminesans, yüksek kimyasal/fotokararlılık ve basit yöntemlerle elde edilebilmeleri nedeniyle biyo-etiketlerin umut vadeden bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir. CD'lerin floresan emisyon spektrumu, uyarıma bağlı özellik göstermekte olup kuantum dotlar ve organik boyalardan oldukça farklıdır. Bu durum, *in vitro* optik görüntülemelerde çok renkli floresan tespitine olanak sağlamaktadır [86]. CD'lerin kırmızı renk bölgesinde saçılmaya uygun olması, derin kırmızı ve NIR ışınları daha derin doku penetrasyonu sağladığı için bilhassa biyo-görüntüleme uygulamaları için önem taşımaktadır [91].



Şekil 3. 8 Işığın dalga boyuna bağlı olarak dokulardan penetrasyonu

Karbon nanoparçacıkların hücre görüntüleme için uygunluğunu test etmek için domuz böbrek hücre hattı (LLC-PK1) kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, CD'ler hücre zarı ve LLC-PK1 hücrelerinin sitoplazmaları içerisine konumlandırılmıştır. Yüksek dalga boylarında (510-530 nm) uyarıldığında, besi yeri içerisinde kültüre edilen LLC-PK1 hücrelerinde kırmızı floresan gözlenmiştir (Şekil 3.9) [92]. Aynı dalga boyunda hücrelerin oto floresan özellik göstermediği belirtilmektedir. Hücreler içerisindeki güçlü fotolüminesans şiddeti, CD'lerin stabilitesini göstermekte ve iyonik kuvvetin yüksek olduğu ortamda güçlü ve kararlı floresan özellikte olduklarını doğrulamaktadır. Aynı çalışmada, CD'ler ile muamele edilmiş hücrelerin canlılığı ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar neticesinde CD'lerin kuantum dotlara oranla daha biyoyumlu olduğu belirtilmiştir [55,92].



Şekil 3. 9 Karbon nanodotlar ile muamele edilmiş LLC-PK1 hücreleri; a. CD'lerin yerleşimi, b. CD'lerin fotolüminesans şiddeti (Daha koyu kırmızı renk daha yüksek fotolüminesans şiddetini ifade etmektedir.) [92]

3.2.4 Fotokatalizörler

Nano-fotokataliz, nanobilim ve nanokimyanın heyecan verici ve önemli bir konusudur. Temel hedefi, güçlü ve ayarlanabilir kimyasal aktivite, özgünlük ve seçicilik sağlayan nanokatalizörlerin tasarlanmasıdır. İyi bir fotokatalizör, görünür ve/veya yakın UV ışıktaki kullanılabilen, fotokorozyona karşı fotokararlılık gösteren, ucuz ve çevre dostu olmalıdır. Nanobilim araştırmaları, fotokatalist özelliklerinin tasarımı ve kontrolü ile özellikle bant aralığı enerjisi, kimyasal bileşim ve yüzey modifikasyonu açısından yeni ve daha etkili katalizörlerin geliştirilmesini teşvik etmektedir. Boyut kontrollü karbon nanodotlar yakın kızıl ötesi bölgeden mavi dalga boyuna kadar değişebilen emisyon göstermekte ve bu özellikleri onları umut vadeden fotokatalizörler haline getirmektedir [55].

3.2.5 Diğer Uygulamalar

Karbon nanoparçacıkların bazı modifikasyonlar ile doğrudan beyaz ışık yaydığı belirlenmiş olup CD temelli LED cihazların tasarımına dair çalışmalar gerçekleştirilmektedir [8,55]. Akışkanlar fiziğinin mikro boyutlarda incelenmesi için üstün bir platform olan ve önemli ölçüde arttırılmış yüzey/hacim oranı sayesinde yüzey gerilimi ve vizkozitenin atalet kuvvetlerine üstün gelmesi ile akışkanın daha kolay yönlendirilmesine olanak sağlayan mikro akışkan sistemlerde kullanılan floresan malzemelerin, özellikle biyolojik uygulamalarda biyouyumluluk ve maliyet dengesini sağlayamıyor olması rotayı bu iş için karbon nanodotların kullanımına çevirmiştir [8].

NANOTOKSİKOLOJİ

Nanotoksikoloji, nanomalzemelerin neden olabileceği biyolojik etkiler hakkındaki bilgi eksikliğinden doğan yeni bir toksikoloji dalı olup sürdürülebilir ve güvenli nanoteknolojinin geliştirilmesine önemli katkı sağlamaktadır. Nanotoksikoloji fizikokimyasal etkenleri (boyut, şekil yüzey alanı, yüzey kimyası), temas yollarını (solunum sistemi, deri, sindirim sistemi), biyolojik yayılımı (geçiş, opsonizasyon), moleküler etkenleri (oksidatif stres, eflamasyon), genotoksisite (mutajenez-genetik mutasyona neden olma, kromozom bozuklukları) ve mevzuata ilişkin yönleri (devlet, endüstri, akademi) kapsamaktadır. Ayrıca nanotoksikoloji, nanomalzemelerin insan ve çevresel risk değerlendirmesinde güvenilir, sağlam ve veri garantili test protokollerinin tasarlanmasını da içermektedir [11, 93].

Nanoparçacıklar farklı şekillerde olabilmekte ve şekillerine bağlı olarak hücre içerisine alımları ya da hedef moleküllerle etkileşimleri farklılaşabilmektedir. Boyut ve şekil parçacığın yüzey alanını ciddi biçimde değiştirebilmekte, bu da doz tespiti üzerinde etkili olmaktadır. Partikül boyutu ile ters orantılı olarak artan yüzey alanı ile malzemenin katalitik aktivitesinde de artış meydana gelmektedir. Bu nedenle, nanoparçacıkların hücre içerisinde meydana getirecekleri yapısal hasar ya da oksidatif stres daha büyük boyutlu formlarına göre daha yüksek olabilmektedir. Hücrenin zarı pozitif yüklü olduğu veya DNA negatif yüklü olduğu için nanomalzemelerin hücre içerisine alımında veya hedef moleküle bağlanmasında, parçacıkların yüzey yükleri ve yüzey kimyaları da önem teşkil etmektedir. Bu nedenle nanomalzemelerin yüzeyleri amaca yönelik olarak modifiye edilebilmekte, çözünürlükleri arttırılabilmekte ve hedef moleküle daha kolay

bağlanmaları sağlanabilmektedir. Fakat bu değişiklikler sonucunda nanomalzemenin toksisitesi önemli değişimlere uğrayabilmektedir. Nanomalzemenin yapısal ve/veya kimyasal özellikleri nanotoksikoloji çalışmalarını zorlaştırmaktadır [93].

Normal bir toksisite testinde, hücreler ya da organizmalar bir doz kimyasala maruz bırakılmakta ve meydana gelen yanıt bir süre sonra ölçülmektedir. Bu denemelerde elde edilen doz-cevap ilişkisi ilaçlar için uygun dozun belirlenmesi ve kirleticilere maruz kalma için kabul edilebilir sınırların belirlenmesi için önem teşkil etmektedir [94]. Bununla birlikte, geleneksel toksikoloji çalışmalarında test edilen çözünebilen kimyasalların aksine, nanopartiküller bir şekle ve yüzey alanına sahiptir ve çözelti içindeki boyutlarına, yoğunluklarına ve fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre difüze olabilmekte (yayılabilir), kümeleşebilmekte/topaklaşabilmekte ve çökebilmektedirler. Bu durum, geleneksel *in vitro* deneylerin nanopartiküller için yanıt ve hücresel alım verilerini yanlış gösterebileceği ve test sonuçlarının tanecik türleri arasında karşılaştırılabilirliğinin, çözünür tip kimyasallara göre daha az olacağı anlamına gelmektedir. Örneğin, nanoparçacıkların çökmesinin *in vitro* testlerde hücre içine alınan nanoparçacık sayısını etkileyebileceği belirtilmektedir [94]. Bu nedenle nanotoksikoloji çalışmalarında, geleneksel toksikoloji yöntemlerinin yanı sıra farklı ve/veya ileri analiz yöntemlerine de başvurulmaktadır.

Nanomalzemeler doğaları gereği tek başlarına zararlı olmamakla beraber risk değerlendirmelerinde bazı özel durumların göz önünde bulundurulması gerekebilmektedir. Artan nanomalzeme çalışmaları ve çok sayıda yeni nanomalzemenin üretiliyor olması, tüketici ürünlerinde kullanılan bu nanomalzemelerin hızlı ve güvenilir bir güvenlik değerlendirmesinin yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmakta ve toksisite taraması için sağlam, standartlaştırılmış test yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro* test yöntemleri, nanomalzemelerin toksisitelerinin belirlenmesi için temel araçtır. Ancak nano formdaki malzemelerin bazı özellikleri, teste müdahale ederek deney çıktılarını engelleyebilmekte ve yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir.

Nanomalzemelerin *in vitro* toksisite değerlendirmesinde, nanomalzemelerin farklı analitik tekniklerle ölçülen stok solüsyon içerisindeki fizikokimyasal karakterizasyonu, onların biyolojik ortamdaki (hücre kültürü vb.) davranışlarının fizikokimyasal

karakterizasyonu ve proteinlerle etkileşimleri göz önünde bulundurulmalıdır. Nanomalzemeler ile test sistemleri arasındaki etkileşimler sistematik olarak analiz edilmelidir. Bu nedenle konvansiyonel ve iyi yapılandırılmış *in vitro* test protokollerinde kullanılan test kimyasalları ya da farmasötikler nanomalzemelere uygulanırken dikkatli olunmalı ve adapte edilmeye çalışılmalıdır [35]. Ayrıca, ilaç taşıma sistemleri vb. biyomedikal uygulamalarda, kanser hücreleri/dokularında kullanılmak üzere geliştirilen nanomalzemelerin, bu yapılar üzerindeki sitotoksik etkilerinin doğru olarak tespit edilmesi çalışma ve/veya geliştirilen ürün için hayati önem taşımaktadır.

4.1 Sitotoksite Testleri

Toksisite veya hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan ve farklı temellere dayanan çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

4.1.1 Kolorimetrik (Renk Ölçümüne Dayalı) Yöntemler

Renk ölçümüne dayalı kolorimetrik yöntemlerde, aşağıda sıralanan tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılmaktadır [95].

- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (**MTT**),
- 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfopenil)-2H-tetrazolyum (**MTS**),
- 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfopenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (**XTT**),
- 2-(4-iodopenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum (**WST**)

En yaygın olanlarından biri MTT ya da bu yöntemin MTS, XTT, WST-1 gibi çeşitleridir. Bu yöntemler ile hücre canlılığının saptanması, süksinat dehidroegnaz gibi mitokondriyel enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesi ile mitokondriyel fonksiyonun belirlenmesi temeline dayanmaktadır. MTT testi, canlı hücre sayılarını belirlemeye yarayan, hızlı ve kolay sonuç alınabilen bir test olup hücrelerin canlılık ölçümünde, hücre çoğalmasında ve hücre aktivasyonunun belirlenmesinde kullanılan nicel yöntemdir. Sadece canlı hücrelerde gerçekleşebilen bir reaksiyon olan bitkisel mavi tiyazolil boyasının mitokondriyal enzimlerce dönüşümüne dayalı bu yöntemde; canlı hücrelerdeki mitokondriyal

dehidrogenaz enzimlerinin, sarı renkli, suda çözünebilen substratları [3-(4,5- dimetil-tiyazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] (MTT), suda çözünmeyen koyu mavi/mor formazan ürünlere dönüştürmesi söz konusudur. Bu formazan ürünelerinin nicelik tayini belirli bir dalga boyundaki ışık absorpsiyonunun ölçülmesi ile gerçekleştirilebilmektedir. Absorbans değeri hem hücre sayısını hem de bu hücrelerin fonksiyonel canlılığını temsil ettiği için bu testlerle sitotoksitenin yanı sıra hücre proliferasyonu da belirlenebilmektedir [96,97].

Nanoparçacıklar tarafından tetiklenen hücre ölümlerinin belirlenmesinde kullanılan renk ölçümüne dayalı yöntemlerden biri de hücre süpernatantındaki laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının ölçülmesiyle gerçekleştirilen **LDH testi**dir [98]. LDH, apoptoz veya nekroz kaynaklı hücresel membran hasarını takiben hücre dışı ortama kolayca salındığından, litik hücre ölümünün bir göstergesi olarak görev yapan çözünür bir sitosolik enzimdir. Orijinal test, LDH pürivatı laktata indirgediğinde meydana gelen β -NADH'nin β -NAD⁺ (β -Nikotinamid adenin dinükleotid+)'ya oksidasyonunu ölçmek üzere tasarlanmış olup 340 nm dalgaboyunda gözlenen absorbans düşüşü olarak ölçülebilmektedir [99].

Tripan mavisi ile boyama testi de nanotoksikolojik incelemelerde, hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılabilecek yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, toksisitesi incelenen ajanlarla muamele edilen hücreler tripsine edilmekte ve ardından ölü hücreler tarafından hücre içerisinde alınan ancak canlı hücre tarafından alınmayan bir diazo boya olan tripan mavisi ile muamele edilmektedir. Boyanmamış hücreler, incelenen örnek içerisindeki toplam canlı hücre sayısını ifade etmektedir [99].

Nötral kırmızı (NR), canlı hücreleri renklendirerek onları belirlemek için kullanılan ve sayısız sitotoksite, hücre çoğalması ve hücre tutunması testinde uygulanan bir boyadır. Nötral kırmızı (3-amino-7-dimetil amino-2-metil fenazin hidroklorür) zayıf bir katyonik olup hücre zarından, iyonik olmayan difüzyon ile hücre sıvısına alındığı düşünülmektedir. Canlı hücrelerin lizozomlarında birikirken, ölü hücreler tarafından hücre içerisine alınmamaktadır. NR alımı, hücrenin adenozin trifosfat (ATP) üretimi yoluyla pH gradientini koruma kapasitesine bağlıdır. Bu nedenle tutulan boya miktarı, canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Nötral kırmızının hücre içerisine alınımı floresan ya da absorpsiyon ölçümleri ile tespit edilebilmektedir. NR alım testi, canlı hücrelerin nötral kırmızıyı

bünyesine alma ve onu lizozomları içerisinde tutma kapasitelerine ilişkin bir yöntemdir. Karbon nanomalzemeler nötral kırmızıyı kolaylıkla adsorplayabildiği için bu yöntemin karbon nanomalzemelerin toksisitesinin belirlenmesinde kullanımı uygun bulunmamaktadır [100].

Renk ölçümüne dayalı klasik yöntemler, hızlı ve kolay yöntemler olmalarına rağmen, bazı nanomalzemelerin boya/boya ürünleri ile etkileşime giriyor olması ve/veya onları adsorplamaları nedeniyle geçersiz sonuçlar verme ihtimali ile karşı karşıyadır. Ayrıca, karbon nanomalzemeler, klasik toksikoloji testlerinde test markerlarıyla (işaretleyicileri) etkileşime girerek sonuçların farklı çıkmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle bu tip yöntemlerin nanoparçacıkların sitotoksitesini değerlendirmek için uygun olmayabileceği belirtilmektedir [101].

4.1.2 Empedans (Direnç) Ölçümüne Dayalı Yöntemler

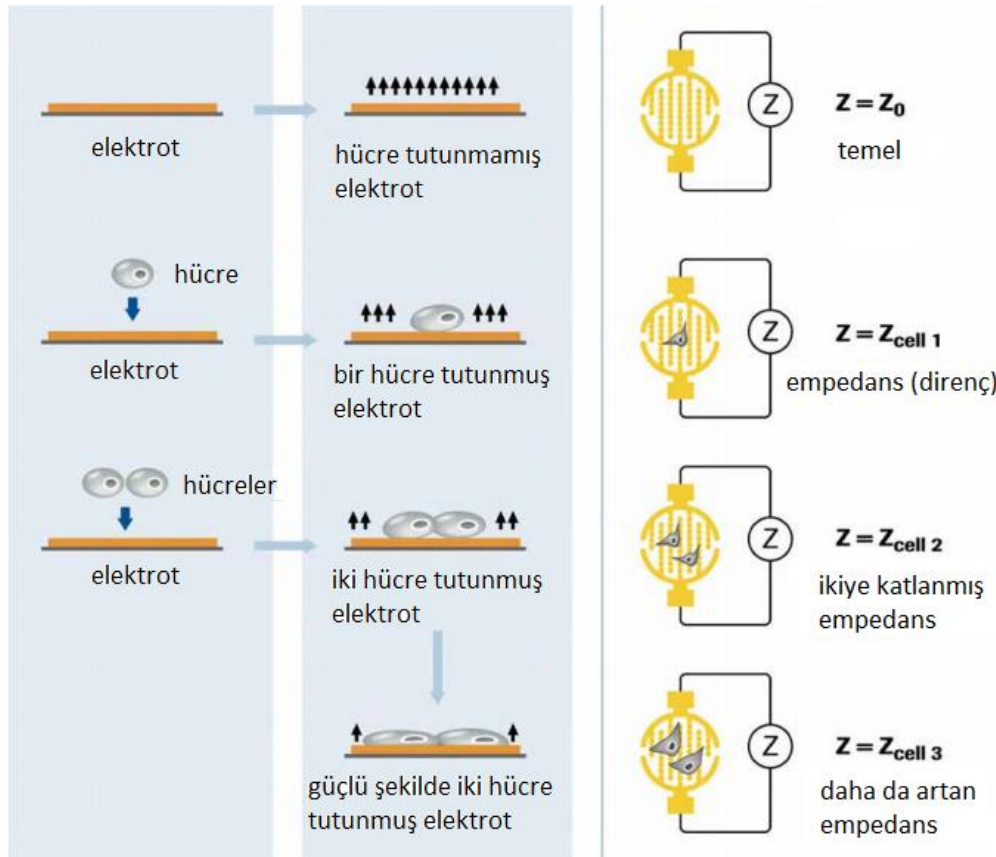
Nanomalzemelerin biyolojik etkilerinin güvenilir ve etkin bir şekilde değerlendirilmesi, yüksek çıktılı tarama yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Genel olarak, çözünebilir ve makro boyutlu maddelerin *in vitro* sitotoksitesilerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlere benzer yöntemler, nanoparçacıkların toksisitesinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Ancak çok sayıda nanotoksiste çalışmasında, nanoparçacıkların fizikokimyasal özelliklerinden dolayı çelişkili ve/veya tutarsız verilerin oluştuğu, nanoparçacıkların test bileşenlerine ve/veya tarama sistemlerine engel olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, etiketleme temeline dayanmayan sistemler, nanoparçacıklar ile onları etiketleme için kullanılan maddeler ve tespit sistemleri arasındaki etkileşimi elimine edecektir. Geleneksel yöntemlerin bir diğer yaygın problemi de bu testlerin belirli bir zamandaki sadece belirli bir noktada değerlendirilmeleri; biyokinetik davranışlar, canlı hücreler ve toksik maddeler arasında zamanla oluşan etkileşimler hakkında herhangi bir bilgi vermiyor olmalarıdır. Sonuç olarak, nanoparçacıkların canlı sistemler üzerindeki toksisitesinin incelenmesi için etiketsiz, gerçek zamanlı algılama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır [101].

Empedansa dayalı testler gibi hücrelerin elektriksel özelliklerini ölçen yöntemler, etiketlemeden bağımsız olup geleneksel yöntemlere güvenilir bir alternatif sunabilmektedir. Bu yöntemler, maddeleri aktif ya da pasif elektriksel özellikleriyle analiz

etmektedir. Pasif özelliklerden yararlanan bir yöntem olan empedansa dayalı izlemeye, bir nesnenin elektrik akımı geçişini ne kadar engellediğini ölçülmektedir. Empedansa dayalı izlemeye, sinyal frekansının bir fonksiyonu olarak hücrenin özellikleri hakkında bilgi üretmek için alternatif bir akım kullanılmaktadır. Proliferasyon, büyüme, morfoloji ve tutunma gibi çeşitli hücresel özellikler, hücreler tarafından kaplanmış bir elektrotta elektrik kaynağı uygulanarak ve hücrelerin akımı nasıl etkilediğini ölçerek ölçülebilmektedir [101].

Giaever ve Keese 1984 yılında, elektrot yüzeyleri üzerinde büyütülen bir hücre topluluğunun, empedans dalgalanmalarını ölçmeye yarayan bir yöntem bulmuş; 1990 yılında ise hücre hareketinin nanometre seviyesinde kantitatif olarak ölçüldüğü güçlü bir elektriksel teknik geliştirmiştir [102,103]. Gerçek zamanlı hücre analizi yapan xCELLigence cihazı, elektrik empedansındaki değişiklikleri ölçmek için benzer bir teknik kullanmaktadır. Bu yöntemde hücreler, her bir kuyucuğun altındaki alanın yaklaşık % 80'ini kaplayan bir altın mikro elektrot dizisi ile kaplı bir kültür kabına eklenmekte ve yayılmaktadır. Hücreler elektrot yüzeyine tutunup yayıldıkça, elektrik empedansında bir artış meydana gelmektedir. Empedans, hücrelerle kaplanmış doku kültürünün toplam alanı ile doğrudan orantılı olan '**hücre indeksi**' olarak adlandırılan boyutsuz bir parametre olarak gösterilmektedir. Bu nedenle, hücre indeksi, hücrenin yüzeye tutunmasını (hücre adezyonu), yayılmasını, morfolojisini ve hücre yoğunluğunu izlemek için kullanılabilir [104].

xCELLigence sistemi markerlar kullanmaksızın, hücrelerin '*in situ*' olarak izlenmesine olanak vermektedir. Sistem, kuyucukların altındaki mikro elektrotlardan alternatif akım göndererek, elektrik empedansını izlemekte; hücreler, mikroelektrotları kapladıkça da empedansta artış meydana gelmektedir. Empedanstaki artış elektrotlar boyunca voltaj düşüşünün artmasına neden olmaktadır. Ölçülen empedansa bağlı olarak, hücre miktarının artıp artmadığı sonucuna varılabilmektedir. Hücre sayısı, gelişmesi, morfolojisi, adezyon gücü ve derecesi hakkında da cihaz tarafından bir dereceye kadar çıkarım yapılabilir (Şekil 4.1) [101,105].



Şekil 4. 1 Empedans ölçümü yönteminin şematik gösterimi [105]

4.1.3 Diğer Yöntemler

Klonojenik test ya da koloni oluşturma etkinliği (CFE) testi, geniş zaman periyotlarında (haftalar) hücrelerin azalan ya da artan hayatta kalım ve çoğalmalarının değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Çok düşük bir konsantrasyonda hücre ekiminin gerçekleştirilmesinin ardından hücreler, koloni oluşumu gözlenene kadar (10 günden 3 haftaya kadar) büyütülmeye devam edilir. Hücreler incelenen parçacıklarla ön muamele edilebilmekte ya da hücre ekimini takiben muamele edilmektedir. Her bir koloninin ekilen tek bir hücreden meydana geldiği kabul edildiği için ‘kolojenik test’ olarak adlandırılmaktadır. Koloniler kristal mor veya nükleer boyalarla sayılarına ve/veya boyutlarına göre boyanabilmektedir. Bu yöntem karbon esaslı nanomalzemelerin toksisitelerinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir [99].

TUNEL ve **Apostain** testleri nanoparçacıkların *in vitro* sitotoksisitelerinin belirlenmesi için kullanılan diğer yöntemlerden olup apoptoza bağlı hücre ölümlerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bir tür programlı hücre ölümü olan apoptoz; hücre zarında çukıntı, mitokondriyal DNA hasarı, çekirdek ve sitoplazma büzüşmesi, apoptotik

kısımlara ayrılma, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması ile karakterize edilmektedir. Apoptotik hücreleri *in vitro* olarak görselleştirmek için çeşitli immünohistokimyasal teknikler bulunmakla beraber en yaygın olarak kullanılanları TUNEL ve Apostain yöntemleridir. TUNEL testi, apoptozun bir sonucu olarak endonükleazlar tarafından parçalanmış DNA uçlarını etiketleyerek, dUTP ile biyotine edilmiş 3'-OH uçlarının, yaban turbu peroksidaz ve bir diaminobenzid kromojeni kullanılarak ışık mikroskobu ile tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yerine, eklenen dUTP nükleotitleri floresan bir boyayla etiketlenerek floresan mikroskopunda görüntüleme işlemi de gerçekleştirilebilmektedir. TUNEL yöntemi çift sarmal DNA kırıklarının belirlenmesini sağlayan bir yöntem olup nekrozun ve apoptozun bir özelliği olarak parçalanmış DNA fragmentlerinin tespitine dayalı sitotoksiste tayini gerçekleştirdiği için apoptozu nekrozdan net olarak ayıramamaktadır [99].

Apoptoza bağlı sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise Apostain testidir. Apostain yoğunlaşmış kromatinleri etiketlediği için apoptozun spesifik bir markerı olduğu düşünülmektedir. Apoptopik çekirdekler DNA'nın ısı bozulmasına yol açan maddelere karşı daha hassas olduğu için hücrelerin MgCl₂ varlığında ısıtılmasının ardından apostain antikoru apoptotik hücrelerde yoğunlaşmış kromatinler sonucu oluşan tek-zincirli DNA'yı hedef almaktadır. Böylece apoptoza uğrayan hücreler tespit edilebilmektedir. Apostain yöntemi yalnızca apoptoza uğrayan hücrelerin işaretlenmesini sağladığı için apoptozu nekrozdan kesin olarak ayırmaktadır [99,106].

Nanoparçacıkların biyolojik ortamlardaki toksisitelerine ilişkin önemli bir husus da hücre zarından geçebilme kabiliyetleri nedeniyle genetik materyale zarar verebilme (genotoksiste) potansiyelleridir. Bu nedenle, sitotoksiste araştırmalarını takiben, incelenen nanomateryalin genotoksistesinin de irdelenmesinde fayda bulunmaktadır.

4.2 Genotoksiste Testleri

Nanoparçacıkların, toksisitelerinde olduğu gibi, genotoksisitelelerinde de, büyük boyutlu formlarına göre daha yüksek genotoksik etki gösterdikleri bilinmektedir. Benzer şekilde, nanoparçacık boyutunun da genotoksiste potansiyelini etkilediği, daha küçük boyutlu nanoparçacıkların daha büyük nanoparçacıklara kıyasla DNA ve kromozal hasarı önemli ölçüde indüklediği bilinmektedir. Nanoparçacıkların bildirilen etkileri arasında

kromozomal parçalanma, DNA zincir kırılmaları, nokta mutasyonları, oksidatif DNA katımları ve gen ekspresyon profillerindeki değişiklikler yer almakta olup mutajenez (genetik mutasyona neden olma) ve karsinojerezi (kanser oluşumu) başlatabileceği ve ilerletebileceği belirtilmektedir [107].

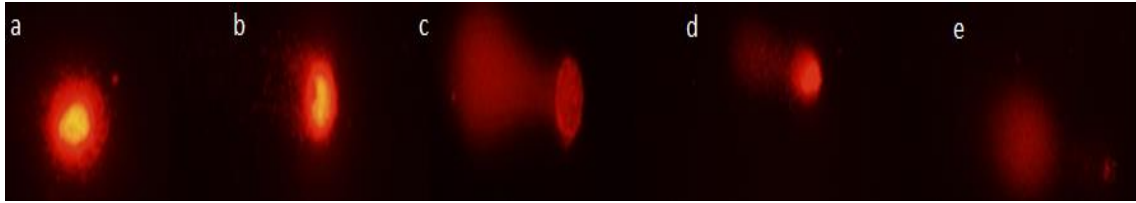
Bu nedenlerle, nanoparçacıkların *in vitro* ve *in vivo* toksisite incelemelerine ek olarak genotoksitelerinin de araştırılması gerekmektedir. Nanoparçacıkların genotoksik etkileri *in vitro* ve/veya *in vivo* olarak incelenebilmekte olup genotoksisite tespitinde kullanılan başlıca yöntemler, tek hücre jel elektroforezi (comet), mikronükleus, halo ve γ H2AX testleridir [93].

4.2.1 Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet) Testi

Tek hücre jel elektroforezi ilk olarak 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından nötral koşullar altında DNA iplikçik kopmalarını analiz etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde, mikroskop lamları üzerinde agaroz jele gömülü halde bulunan hücreler lizis (parçalama) çözeltisinde bekletilerek membranların parçalanmasını sağlanmakta ve ardından elektroforez işlemi uygulanmaktadır. Yüksek miktarda DNA zincir kırığına sahip DNA, sağlam DNA'ya kıyasla anoda doğru daha hızlı şekilde ilerlemektedir. DNA göçünün seviyesi etidyum bromür ile boyanan preperatların floresan yoğunluğunun ölçülmesi ile belirlenmektedir. Bu yöntemde elektroforezin nötral koşullarda gerçekleştirilmesi çift sarmal kırıklarının tespitinde bir sorun yaratmıyor olsa da tek sarmal kırıklarının belirlenmesinde eksik kalmaktadır. Bu nedenle, Singh ve ark., bu yöntemin alkali versiyonunu ($\text{pH} > 13$) geliştirerek; tek sarmal kırıklarının, tamamlanmamış eksizyon (kesip çıkarma) onarımı ile ilişkili tek sarmal kırıklarının ve alkali-duyarlı kısımların tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Comet yönteminin alkali versiyonu, alkali-duyarlı DNA lezyonlarına neden olan ajanları araştırırken artan hassasiyet sağlamakta olup son yıllarda kullanılan ana versiyondur. Hatta düşük seviyelerdeki DNA hasarı tespit edilmek istendiğinde genellikle alkali comet testi tercih edilmektedir. Comet yöntemi ismini, elektroforez esnasında göç eden DNA'lardan hasarlı olan DNA'ların parçalarının jel üzerinde ilerlerken bir kuyruk oluşturması ve meydana gelen şeklin kuyruklu yıldız benzetilmesinden almaktadır. Hasarsız DNA'da kuyruk oluşumu gözlenmemekte ve DNA bir benek (spot) halinde görülmektedir [108,109].

Yöntem sırasında, hücre kültürü ortamında hücre materyalinin hazırlanması, lamaların agaroz jel ile kaplanarak hazırlanması ve hücrelerin lam üzerine yayılması, tuz ve deterjan içeren hücre lizis çözeltisi ile hücre membranlarını parçalanması ve hücre içeriğinin hücre çekirdeğinden uzaklaştırılması, yüksek alkali ortamda, zincir kırıklarının bulunduğu bölgelerden başlayarak çift sarmal DNA yapısının açılması, elektroforez ile DNA'ların elektrik akımı altında anoda doğru göç etmesinin sağlanması, lamaların uygun pH'daki tampon çözeltileri ile nötralizasyonu, DNA'nın DNA spesifik boyalarla (en yaygın olarak kullanılan floresan boya etidyum bromür iken floresan olmayan boyalarla boyama işlemi gerçekleştirilmek isteniyorsa gümüş nitrat tercih edilmektedir) boyanmasıyla kuyruk yapılarının görüntülenmesi, kuyruk sayımı ve verilerin analizi ile DNA hasarının belirlenmesi basamakları takip edilmektedir [109].

Alkali comet yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi basamağında, floresan boyalarla boyanmış DNA ve/veya DNA parçalarının floresan mikroskobu altındaki görüntüleri dikkate alınarak hasarın derecesi 5 seviyede değerlendirilmektedir (Şekil 4.2)



Şekil 4. 2 Alkali comet yöntemi ile DNA hasarının sınıflandırılması; a. Tip 0, b. Tip 1, c. Tip 2, d. Tip 3, e. Tip 4

DNA hasar seviyeleri aşağıdaki gibi sıralanmaktadır [110]:

- Tip 0 seviyesinde, herhangi bir DNA hasarı söz konusu olmayıp, kuyruk oluşumu gözlenmemektedir.
- Tip 1 seviyesinde, baş (çekirdek) çapından daha kısa bir kuyruk oluşumu söz konusudur.
- Tip 2 seviyesinde, baş çapının 1-2 katı uzunluğunda bir kuyruk oluşumu gözlenmektedir.
- Tip 3 seviyesinde, baş çapının 2 katından daha uzun bir kuyruk oluşumu meydana gelmektedir.

- Tip 4 seviyesi ise aşırı yüksek hasar olarak tanımlanmakta olup baş çapından çok daha fazla kuyruk uzunluğu ile karakterize edilmektedir.

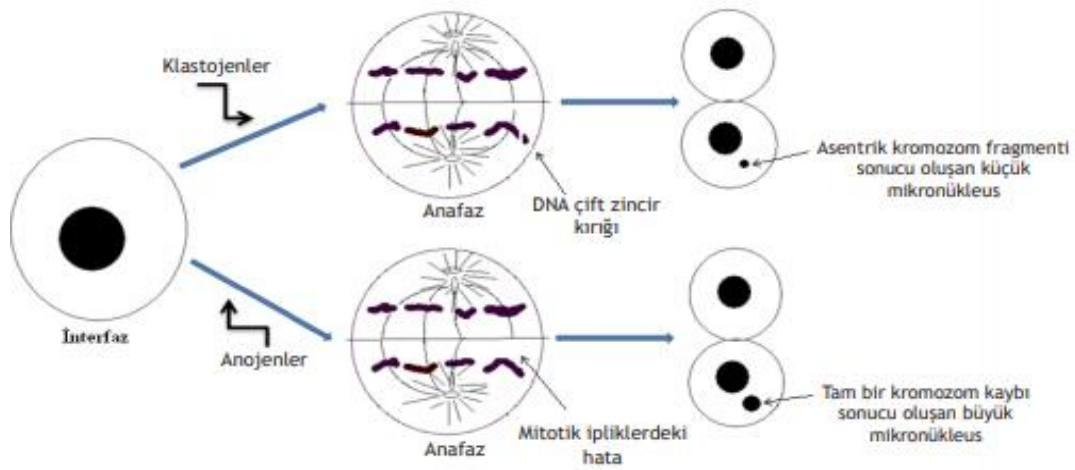
Kuyruk sayımı ile DNA hasarının derecelendirilmesi neticesinde elde edilen veriler, matematiksel bir formülasyon ile rastlantısal birim (AU) adı verilen bir birime dönüştürülerek DNA hasarının boyutu belirlenmektedir. Formülde yer alan N_i terimi i seviyesi ile derecelendirilmiş hücre sayısını ifade ederken, i terimi DNA hasar seviyesini (0, 1, 2, 3, 4) belirtmektedir. Elde edilen sonuçların, negatif/pozitif kontrol grupları ile birlikte değerlendirilerek istatistiksel olarak yorumlanması gerekmektedir.

$$AU = \sum_{i=0}^4 i \times N_i \quad (4.1)$$

4.2.2 Mikronükleus Testi

Klastojenitenin, kromozom kırılması ve/veya buna bağlı kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin belirlenmesinde, kromozom kırılmalarındaki miktarı ve mitotik iğdeki fonksiyon bozukluğunu gösteren bir test olan mikronükleus testi; basit, kısa zamanda sonuç alınabilen, büyük ölçeğe uygulanabilen, ekonomik, güvenilir, geçerli, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilen bir yöntem olması nedeniyle genotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [111–116].

İnterfaz evresindeki hücrede gözlenen ve mitoz bölünmesi esnasında ortaya çıkan mikronükleuslar (MN); temelde DNA hasarına bağlı oluşan, ana çekirdeğe dâhil olmayan, kökeni tam veya asentrik kromozom parçaları olan yapılardır (Şekil 4.3) [115]. Mikronükleusların oluşumu genellikle hücre dönüğüünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan veya kromozomal hasarlardan kaynakladığı için MN sayısındaki artış, genotoksik ajanların hücrelerde meydana getirdiği sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [93,113,115,117].



Şekil 4. 3 Klastojen (kromozom kırıklarına neden olan maddeler veya etmenler) ve anojenler (kromozom eksilmesi veya artmasına neden olan ajanlar) tarafından uyarılan hücrelerdeki mikronükleuslar [115]

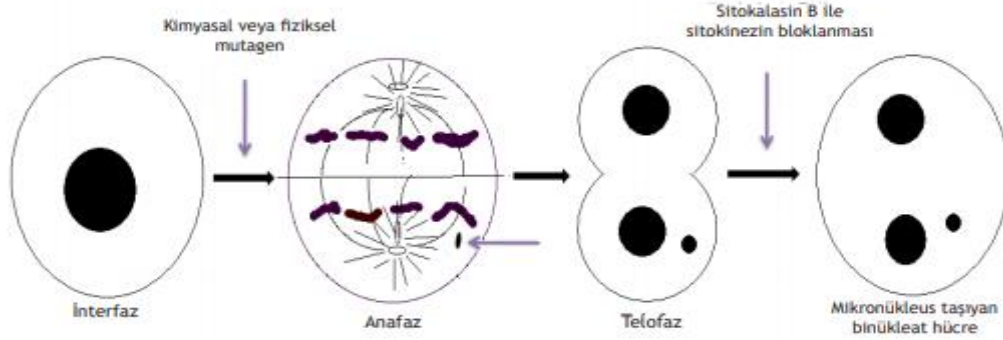
Mikronükleus testi, kromozom kırılmalarındaki miktarı ve mitotik iğdeki fonksiyon bozukluğunu biyolojik olarak izlemeye olanak veren bir yöntemdir [118]. Bu test, kromozomal değişiklik (yapısal ve nümerik) ve hücrenin iğ oluşumu düzenindeki bozukluğa bağlı olarak oluşan multipolar anafaz ve telofazın göstergesi olan interfazdaki mikronükleusların belirlenmesi prensibine dayanmaktadır [119].

Mikronükleusların yalnızca bölünmüş hücrelerde görülmesi nedeniyle, bu testin sayısal olarak doğru değerlendirilmesi ve anlamlı bir sonuç verebilmesi için hücrelerin, genotoksik etkisi incelenen maddeler ile muamale edildikten sonra bölünme gerçekleştirmiş olmaları gerekmektedir. Mikronükleus testlerinin bu eksikliğini üstesinden gelmek için bazı modifikasyonlar gerçekleştirilmiş ve hücrelerin sitokinez fazında kalmaları sağlanarak, incelenen madde uygulaması ardından bölünme geçiren hücrelerin tespitinde doğruluğun artırılması yoluna gidilmiştir.

4.2.2.1 Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN)

Mitoz bölünme geçiren hücrelerde, bölünmenin son evresinde gerçekleşen sitokinezi durduracak bir ajan (Sitokalsin B, Cyt-B) eklenmesi ile hücrelerin iki çekirdekli yapılar şeklinde sabitlenmelerini ve rahatça ayırt edilmelerini sağlayan modifiye bir mikronükleus testidir. Cyt-B, bölünen hücrenin iki yeni hücre olarak ayrılmasını uyaran mikrofilamentleri oluşturan molekül olan aktine bağlanarak aktin polimerizasyonunu durdurmakta ve aktine bağlı tüm süreçlerin engellenmesi ile sitokinezin durdurulmasını

sağlamaktadır (Şekil 4.4) [115]. Ardından, sitoplazma bölünmesi durdurulmuş olan çift çekirdekli hücrelerden, MN içeren hücrelerin oranı mikroskopik sayımla tespit edilmekte ve elde edilen sayısal veriler istatistiksel analiz ile değerlendirilerek genotoksik hasar belirlenmektedir [115].



Şekil 4. 4 Sitokinez bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu [115]

4.2.3 Diğer Yöntemler

Genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem olan **Halo testi**, comet testinde gözlenen aşırı yüksek hasarlı (Tip 4) hücrelerin apoptotik hücreler olabileceği ihtimaline karşı geliştirilmiş olup DNA tek zincir kırıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Comet testinden farklı olarak bu yöntemde elektforez basamağı yer almamakta; hasarlı DNA parçalarının merkezden çevreye doğru difüze olmaları sağlanmaktadır. Bunun sonucunda bir hare oluşturacak şekilde yayılan hasarlı DNA'nın hasar derecelendirmesi; normal hücre, hafif ve orta hasarlı hücre, yüksek hasarlı hücre olarak yapılmaktadır [93].

DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesinde yeni geliştirilen ve oldukça güvenilir bir yöntem olan **γ H2AX Testi** ise çift zincir DNA hasarı meydana geldiğinde, hasarlı DNA bölgesinde onarım başlatılması için H2AX protein yapısının bir nevi lokasyon gösterici olarak γ H2AX'e fosforillenmesi ve oluşan bu γ H2AX'ler ile DNA hasarının ilişkilendirilmesi prensibine dayanmaktadır. H2AX'in fosforillenmesi DNA çift zincir kırıklarının onarımda görevli diğer proteinlerin o bölgede toplanmaları için adeta bir sensör görevi görmektedir. DNA onarımının tamamlanmasının ardından γ H2AX defosforile olmaktadır. Böylece, interfaz hücrelerinde bir işaretleme yapılması ile gözlenecek γ H2AX yapılarının

sayısal değişimi belirlenebilmekte ve bu değişimler DNA çift zincir kırıklarının sayılarındaki değişimlerle ilişkilendirilebilmektedir [93].

4.3 Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsünün İncelenmesi

Hücre döngüsü, hücre büyümesini ve bölünmesini içeren bir seri olaylar dizisidir. Hücre bölünmesi yolundaki hücreler, kesin olarak zamanlanmış ve dikkatlice düzenlenmiş bir büyüme evresi boyunca ilerlemektedir. Hücre döngüsünün, interfaz ve mitotik faz olmak üzere iki temel fazı bulunmaktadır. İnterfaz evresinde hücre büyümekte ve DNA replikasyonu gerçekleşmektedir. Mitotik faz boyunca ise çoğaltılan DNA ve sitoplazmik içerikler ayrılmakta ve hücre iki yavru hücreye bölünmektedir [120].

İnterfaz evresinde, hücre normal büyüme proseslerini gerçekleştirirken bir yandan da hücre bölünmesi için hazırlık yapmaktadır. Bir hücre için interfazdan mitotik faza geçmek için birçok iç ve dış koşulun karşılanması gerekmektedir. İnterfaz evresi G_1 , S ve G_2 olmak üzere 3 basamaktan meydana gelmektedir (Şekil 4.5) [120].

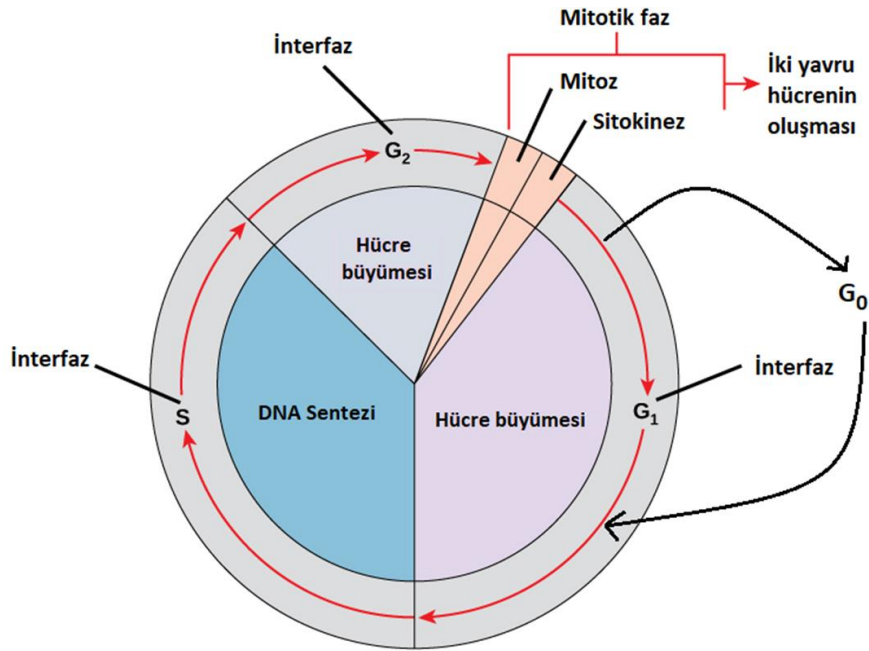
G_1 fazında, hücre biyokimyasal seviyede oldukça aktif olmakla beraber, mikroskopik açıdan gözlenebilen çok ufak değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle bu faz, 1. boşluk fazı olarak da isimlendirilmektedir. Hücre, kromozomal DNA ve onunla ilişkili proteinlerin yapı taşlarını biriktirmekte ve çekirdeğindeki her bir kromozomun çoğaltılması için gerek duyacağı enerji rezervlerini toplamaktadır.

S fazında, DNA replikasyonu, birbiriyle özdeş iki DNA molekülünün oluşumuyla sonuçlanan bir mekanizma boyunca gerçekleşmektedir. Sentrozom S fazı boyunca çoğaltılmaktadır. Sentrozomlar, kromozomların mitoz bölünme boyunca hareketini düzenleyen aparat olan mitotik iğni ortaya çıkmasını sağlamaktadır.

G_2 fazında, hücre enerji depolarını doldurmakta ve kromozom düzenlemeleri için gerekli olan proteinlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Bazı hücre organelleri çoğaltılmakta ve mitotik faza kaynak sağlamak amacıyla hücre iskeleti parçalanmaktadır. Mitotik faz için son hazırlıklar hücre mitozun ilk evresine girmeden tamamlanmalıdır [120].

Mitoz bölünme esnasında hücrede önce çekirdek bölünmesi (mitoz) gerçekleşmekte, ardından sitoplazma bölünerek (sitokinez) iki yavru hücre elde edilmektedir. Tüm

hücreler, yeni oluşturulan bir hücrenin derhal girdiği, klasik hücre döngüsü düzenine uymazlar.



Şekil 4. 5 Hücre döngüsünün evreleri (Rye ve ark. 2013'ten alınarak düzenlenmiştir.)
[120]

G₀ fazındaki hücreler, bölünmeye aktif olarak hazırlanmamaktadır. Bu faz, hücre döngüsünden çıkıldığında gerçekleşen sessiz (inaktif) bir aşamadır. Bazı hücreler G₀ fazına geçici olarak girmekte ve dış bir uyarıcı sinyalle G₁'in başlaması tetiklenene kadar bu fazda kalmaktadır. Diğerleri ise asla veya nadiren bölünen olgun kalp kası ya da sinir hücreleri gibi G₀ fazında kalıcı olarak yer almaktadır [120].

Hücrenin yaşam döngüsünün doğru sıra ile ilerlemesi, hücrelerin bütünlüğü ve varlığını devam ettirebilmesi için kritik öneme sahiptir. Sağlıklı hücreler söz konusu olduğunda bozulması istenmeyen bu sistematik döngünün, kanser hücreleri gibi tehdit oluşturan hücrelerde bozulması veya duraklatılması onlarla savaşta kilit rol oynamaktadır. Bu nedenle, hücre döngüsü üzerinde herhangi bir değişikliğe ve/veya gecikmeye neden olan dış etmenlerin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Akış sitometrisi kullanılarak hücre döngüsünün incelenmesinde yaygın olarak dört yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan ilk ikisi, hücresel DNA'nın propidyum iyodür (PI) ya da 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile boyanmasını takiben DNA içeriğinin tek değişkenli analizi ve hücresel DNA içeriğinin sıklık histogramlarının dekonvülüsyonunu

(ters evrişim) içermektedir. Bu yaklaşım hücre döngüsünün üç ana fazındaki (G1, S, G2/M) dağılımı ortaya koymakta ve fraksiyonel DNA içeriği ile apoptotik hücrelerin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Üçüncü yaklaşım, DNA içeriğinin ve proliferasyonla ilişkili proteinlerin iki değişkenli analizine dayanmaktadır. Siklin D, siklin E, siklin A ya da siklin B1'in ekspresyonuna karşı DNA içeriği örnek olarak sunulmaktadır. Bu yaklaşım G0'daki hücrelerin ve G1'deki hücrelerden ayırt edilmesine, mitotik hücrelerin ya da hücre döngüsü durumu ile ilişkili diğer hücre içi proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Dördüncü prosedür ise 5'-bromo-2'deoksiüridin (BrdU)'in belirlenmesi prensibine dayanmaktadır [121].

BÖLÜM 5

LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Karbon nanodotlar, sahip oldukları üstün fiziksel ve kimyasal özellikler nedeniyle son yıllarda yoğun olarak çalışılmakta olup 2013 yılından bu yana literatürde yer alan karbon nanodot çalışmalarının bir kısmı ve elde edilen bulgular Çizelge 5.1’de derlenmiştir. Çizelge 5.1’de özetlenen çalışmalarda elde edilen karbon nanodotların tamamı fotoluminesans özellik gösterdiği için bu parametre tabloya dahil edilmemiştir.

Çizelge 5.1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Yüzey Potansi-yeli	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Bayat vd. 2019 [32]	CD	<i>Thymus vulgaris</i> L. Esansiyel yağı	Hidrotermal	8 nm	-	SKOV3, İnsan over kanser hücresi Düşük toksisite	<i>In vitro</i> floresan görüntüleme
Bano vd. 2018 [30]	CQD	<i>Tamarindus indica</i> yaprağı	Hidrotermal	3.4 ± 0.5 nm	-	-	Civa (II) ve glutatyon tespiti
Bhatt vd. 2018 [31]	CD	Hint fesleğeni yaprağı	Hidrotermal	5 nm	-25.7 mV	<i>Escherichia coli</i> , Gram negatif bakteri Düşük toksisite	Cr (VI) sensörü, biyolojik görüntüleme ve desenleme ajanı
Cailotto vd. 2018 [122]	G-CD F-CD A-CD	Glikoz Fruktoz Askorbik asit	Hidrotermal	9-10 nm 9-10 nm Amorf	Negatif yüklü	HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi G-CD sitotoksosite yok, F-GC; sitotoksik, A-GC; düşük sitotoksosite	İlaç yüklemesi

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Li vd. 2018 [123]	CD	Glikoz, lizin	Maillard reaksiyonu esnasında (esmerleşme)	2.3-6.8 nm	HepG2, insan karaciğer kanser hücresi Doza bağlı sitotoksosite	-
Bagheri 2018 [124]	CD	Sitrik asit	Piroliz	3.1 ± 0.4 nm	Maya hücresi (<i>Pichia pastoris</i>) Yok ≤ 5 mg/mL Sitotoksik ≥10 mg/mL	-
Gomez vd. 2018 [125]	N-CD	L-arjinin	Mikrodalga	2.5 nm	C33-A ve HeLa, insan rahim; MCF-7 ve MDA-MB-231, insan meme; A-549, insan akciğer; PC-3, insan prostat kanseri hücreleri Sitotoksosite yok	Biyogörüntüleme ve kanser ilacı taşınımı
Sai vd. 2018 [126]	COOH-CDs NH ₂ -CDs PEI-CD	Glikoz Sitrik asit Sitrik asit	Mikrodalga Hidrotermal Hidrotermal	2-3 nm	Bitkiler üzerinde düşük toksisite	<i>In vivo</i> ışık dönüşümü için güneş enerjisindeki UV ışığının doğrudan kullanılması
Bihani vd. 2018 [127]	CD	Limon suyu, L-glutatyon	Hidrotermal	-	-	Protein kümelenmelerinin engellenmesi

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Yüzey Potansiyeli	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Li vd. 2018 [128]	CD	Üzüm kabuğu	Hidrotermal	4 ± 1.5 nm	-	-	Pikrik asit tayini için floresan prob
Si vd. 2018 [129]	CD	Pirinç samanı	Mikrodalga-destekli	2-3 nm	10 – (-60) mV	-	-
Zhang vd. 2017 [130]	N-CD	Diamonyum hidrojen sitrat	Mikrodalga	2.8 ± 0.7 nm	-	BGC-823, insan mide kanseri; CT26.WT, fare kolon kanseri hücreleri Düşük toksisite	Biyo-görüntüleme ve demir (III) iyonu tespiti
Xie vd. 2017 [131]	CNSI	Karbon siyahı	-	10-50 nm kümeler: 189 nm	-	Fareye damar içi enjeksiyon Düşük toksisite, oksidatif stresi tetikleme	-
Duarah vd. 2017 [132]	rCD	Nişasta ve limon ekstresi	Hidrotermal	3 nm	-	-	Fotokatalizör
Majumdar vd. 2017 [133]	CD	B-karoten	Hidrotermal	3.5-5.5 nm	-	-	Nanokatalizör
Wang vd. 2017 [134]	pCD	1-metil-2-pirolidinon	Solvotermal	17-33 nm	-33 – (-13) mV	-	Hedefe yönelik ilaç taşıyıcısı

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Gaddam vd. 2017 [135]	CD	Buhur (günlük) reçinesi/sakızı	Oksidatif asit muamelesi	5-10 nm	NIH/3T3, Fare fibroblast hücresi; CHO, Çin fare rahim hücresi; B16F10, fare melanoma kanser hücresi; MDA-MB-231, insan meme kanseri hücresi Kanser hücrelerinde doza bağlı sitotoksosite, normal hücrelerde sitotoksosite yok	İyon deteksiyonu, biyo-görüntüleme
Kalytchuk vd. 2017 [136]	N,S-CD	Sitrik asit ve L-sistein	Hidrotermal	3-6.5 nm	NIH/3T3, fare fibroblast hücresi; HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi Düşük sitotoksosite HeLa hücre döngüsü üzerinde etkisi yok, NIH/3T3 hücrelerinde G0/G1 fazında doza bağlı hafif tutuklanma	Sıcaklık sensörü
Wang vd. 2016 [137]	N-CD	Suda çözünen kitosan	Hidrotermal	3.8 ± 1.2 nm	HCT 116, insan kolon kanseri hücresi Düşük sitotoksosite	Akıllı telefon uygulaması ile civa iyonu algılama
Lee vd. 2016 [138]	N-CD	Sitrik asit	Hidrotermal	3 nm	FL83B, fare normal hücresi; HepG2, insan karaciğer kanser hücresi Sitotoksosite yok	Girişimsel olmayan fotoakustik görüntüleme ve fototermal terapi

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Yüzey Potansiyeli	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Suvarnapha et vd. 2016 [139]	CD	Limon	Hidrotermal	2-12 nm	-	HK-2, insan böbrek normal hücresi Sitotoksosite yok	Biyo-görüntüleme
Wen vd. 2016 [140]	N-CD	Domuz derisi	Hidrotermal	5.58 ± 0.21 nm	-	HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi Düşük toksisite	Çok renkli hücre görüntülemesi ve canlı hücrelerde Co ⁺² tespiti
Periasamy vd. 2016 [141]	CNP	-	-	50-100 nm	-	hMSCs, insan mezenşimal kök hücresi Doza bağlı sitotoksosite Hücre döngüsünde hafif blokasyon, G0/G1 fazında doza bağlı artan tutuklanma	-
Havrdova vd. 2016 [142]	CD-Pri CD-PEG CD-PEI	Mum isi	Oksidatif asit muamelesi	4-7 nm	-28 mV -6 mV 53 mV	NIH/3T3, fare fibroblast hücresi CD-Pri: sitotoksik, G2/M fazı blokasyonu, oksidatif strese neden olma, hücre çekirdeğine giriş yok CD-PEG: düşük sitotoksosite, hücre morfolojisi, hücre içi trafik ve hücre döngüsünde herhangi bir anormallik yok CD-PEI: sitotoksik, hücre çekirdeğine giriş, hücre döngüsünün G0/G1 fazında büyük değişimler, G2/M fazı blokasyonu	-

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Yüzey Potansi-yeli	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Shi vd. 2016 [143]	N-CD	Yün	Piroliz	6.05 ± 1.67 nm	-	HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi Düşük toksisite	Çok renkli hücre görüntülemesi, desenleme ve biyosensörler
Wang vd. 2016 [144]	CD	Süt	Mikrodalga	1-7 nm	-	HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi Sitotoksosite yok	Biyo-görüntüleme
Alas vd. 2016 [145]	CD	Keçi boynuzu pekmezi	Hidrotermal	10-15 nm	0 – (-100) mV	-	-
Shi vd. 2016 [146]	B-CD (mavi) G-CD (yeşil)	Pırasa	Piroliz Hidrotermal	-	-	-	Nanosensör; canlı hücrelerde pH ve Cu ⁺² algılama
Wang vd. 2015 [147]	NS-CD	Glikoz	Hidrotermal	2.81 nm	-10.6 mV	-	Metotreksat (kanseri ilacı) tayini için floresan prob
Wang vd. 2015 [148]	pNCD	1-metil-2-pirolidinon	Solvotermal	5-15 nm		U251, insan beyin tümörü hücresi Düşük toksisite	Biyo-görüntüleme

Çizelge 5. 1 Karbon nanodot çalışmalarına dair literatür taraması (devamı)

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Sitotoksosite	Uygulama Alanı
Wang vd. 2015 [149]	CD	Taze patates	Hidrotermal	1-3 nm	-	Sefaleksine (antibiyotik) tespiti
Li vd. 2014 [150]	CD	Zencefil suyu	Hidrotermal	8.2 ± 0.6 nm	HepG2, insan karaciğer kanser hücresi; MCF-10A, insan normal meme hücresi; FL83B, fare normal karaciğer hücresi; A549, insan akciğer kanser hücresi Doza bağlı sitotoksosite HepG2 hücre döngüsü üzerinde etkili (SubG1 fazında artış), diğer hücrelerin hücre döngüsü üzerinde belirgin bir etki yok	-
Wang vd. 2013 [151]	CD	İşlenmemiş is	Nitrik asit oksidasyonu	1-3 nm	Fareler ve sıçanlar üzerinde önemli bir sitotoksosite yok Organlarında herhangi bir anormallik veya lezyon yok	-
Hsu vd. 2013 [152]	CD	Yeşil çay	Termal	3.4 ± 0.8 nm	MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri; MCF-10A insan meme ve LLC-PK-1 domuz böbrek hücreleri Doza bağlı sitotoksosite Kanser hücrelerinde artan CD dozuna bağlı canlılık azalırken, normal hücrelerde pek bir değişiklik olmamıştır	-

MATERYAL VE YÖNTEM

6.1 Kullanılan Cihazlar

Etüv

Deneyler öncesinde veya esnasında ihtiyaç duyulan kurutma işlemlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla 30-220 °C aralığında çalışabilen iki raflı Memmert marka UE400 ürün kodlu etüv kullanılmıştır.

Öğütücü

Doğadan toplanan ve kurutulan bitki kısımlarının yüzey alanlarının arttırılması için boyut küçültme işlemleri basamağında ev tipi Sinbo marka SCM-2934 model numaralı bıçaklı öğütücü kullanılmıştır.

Terazi

Deneyler esnasında gerekli basamaklarda kullanılan hammaddelerin, kimyasalların ve/veya elde edilen ürünlerin tartılması amacıyla 0.0001 g hassasiyete sahip, 0-220 g tartım kapasiteli Precisa XB 220A analitik terazi kullanılmıştır.

Ultrasonik Su Banyosu

Bitki numunelerinin çeşitli çözücüler ile ekstraksiyonu, 25 veya 45 kHz frekansta çalışabilen, 30-80 °C aralığında sıcaklık kontrolü gerçekleştirebilen Elma marka TI-H-5 model ultrasonik su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj

Ekstraksiyon ve sentez basamaklarının ardından elde edilen hedef ürünlerin faz ayrımının ve eldesinin gerçekleştirilmesi için maksimum dönüş hızı 15000 devir/dk olan, -20-40 °C sıcaklık aralığında çalışabilen Hettich marka santrifüj kullanılmıştır.

Kül Fırını

Bitki ekstralerinden termal yöntemle karbon nanoparçacık sentezi basamağında 1100 °C'ye kadar çıkabilen, 1 °C hassasiyetli, kademeli sıcaklık artışı gerçekleştirebilen Nuve marka kül fırını kullanılmıştır.

Mikrodalga Fırın

Bitki ekstralerinden mikrodalga sentez yöntemiyle karbon nanodot eldesi için çıkış gücü 800 W, ızgara gücü 1000 W olan ve kontrol paneli üzerinden 5 farklı güç konumuna ayarlanabilen, zaman ayarlı Arçelik MD 565 S ev tipi mikrodalga fırın kullanılmıştır.

Mikrodalga Yakma/Sentez Cihazı

Bitki ekstralerinden mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemiyle karbon nanodot eldesi için kademeli sıcaklık artışı gerçekleştirebilen ve *in situ* sıcaklık ölçümü yapabilen CEM Mars marka mikrodalga yakma cihazı kullanılmıştır.

UV-Vis Spektrofotometre

Sentezlenen karbon nanodotların spektrum taramaları döteryum lambalı, 190-1100 nm dalgaboyu aralığında okuma yapabilen Shimadzu UV-1800 UV-Vis çift ışıklı spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Floresan Spektrofotometre

Sentezlenen karbon nanodotların fotoluminesans özelliklerinin belirlenmesi için 190-900 nm dalgaboyu aralığında 0.01-24.00 nm/dk tarama hızında, saniyede maksimum 80 data noktası okuyabilen zenon lambalı Agilent Cary Eclipse floresan spektrofotometre kullanılmıştır.

FT-IR

Sentezlenen karbon nanodotların yüzeylerinde yer alan fonksiyonel grupların belirlenebilmesi için 8300-350 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçüm yapabilen Perkin Elmer Frontier FT-IR kullanılmıştır.

Dinamik Işık Saçılımı Tekniği ile Hidrodinamik Parçacık Boyutu ve Yüzey Zeta Potansiyeli Analiz Cihazı

Sentezlenen karbon nanodotların hidrodinamik çaplarının ve yüzey zeta potansiyellerinin ölçülmesi için 0.3 nm - 10.0 mikron (çap) aralığında boyut ölçümü

yapabilen, patentli M3-PALS teknolojisini kullanarak zeta potansiyel ölçümü gerçekleştiren Malvern Zeta Sizer Nano-ZS cihazı kullanılmıştır.

xCELLigence

Seçilen karbon nanodotların MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı ve HDFa primer fibroblast hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksitelerinin belirlenmesi için ACEA Biosciences Inc. şirketi tarafından üretilen xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı kullanılmıştır.

Akış Sitometrisi

Seçilen karbon nanodotların MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında hücrel döngünün ilerleyişi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için BD FACSAria II akış sitometri cihazı kullanılmıştır.

Hücre Sayım Cihazı

Hücre çalışmaları esnasında kültive edilen hücrelerin sayım işlemleri Innovatis Inc. şirketi tarafından üretilen Cedex XS Analyser cihazında gerçekleştirilmiştir.

Floresan Mikroskobu

Comet yöntemi esnasında floresan etidyum bromür boyasıyla boyanan test numunelerinin görüntülenmesi için CCD-4230 video kamera ekipmanı bağlı Olympus BX 51 floresan mikroskobu kullanılmıştır.

X-Ray Fotoelektron Spektrometre

Seçilen parçacıkların X-ray fotoelektron spektroskopi (XPS) taraması Specs-Flex XPS Spectrometer (Al K α 1486.7eV) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6.2 Kullanılan Malzemeler

Kimyasal Maddeler

Karbon nanodotların sentez çalışmalarında kullanılan etanol (EtOH), polietilen glikol 10000N (PEG 10000N), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl) ve sodyum klorür (NaCl) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

In vitro sitotoksite ve genotoksite için kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), tripan mavisi solüsyonu, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS),

formaldehit, potasyum klorür (KCl), Giemsa, normal erime noktalı agaroz, düşük erime noktalı agaroz, dimetil sülfoksit (DMSO), etidyum bromür, Triton X-100, fosfat tamponlu tuz (PBS) tabletleri, etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu dihidratı (Na₂-EDTA), sitokalsin B (Cyt-B), genotoksisite testleri için pozitif kontrol ve etil metansülfnat (EMS) (CAS no. 62-50-0, lot 1338043) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. NaCl ve NaOH Merck Chemicals (Darmstadt, Almanya) firmasından, kromozom besiyeri (Chromosome medium B) Biochrom AG (Berlin, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tripsin tamponu, tirozin inhibitör tamponu, RNaz tamponu, propidyum iyodür çözeltisi Becton Dickinson (BD) firmasından temin edilmiştir. Buzlu mikroskop camları ve Menzel GmbH (Braunschweig, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Kimyasal Olmayan Maddeler

Nerium oleander (Oleander, zakkum) yaprakları Mayıs 2016'da Esenler, İstanbul'dan (41°01'37.7"N, 28°53'32.1"D) 82 metreden toplanmış ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na (İZEF) 6056 numarası ile kaydedilmiştir.

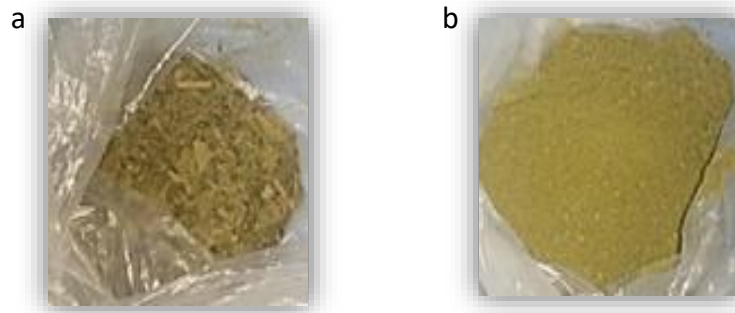
MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) ve HDFa (primer dermal fibroblast) hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edilmiştir.

6.3 Deneysel Çalışmalar

6.3.1 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Doğadan toplanan taze Oleander yaprakları, distile su ile üç kez yıkanarak üzerlerindeki toz vb. kirlilikler giderilmiştir. Yüzey temizlikleri tamamlanan yapraklar 70 °C'ye ayarlanmış etüv içerisinde tamamen kuruyana kadar iki gün bekletilmiştir. Kuruyan yapraklar ekstraksiyon işlemi öncesinde yüzey alanlarının arttırılması için mekanik öğütme işlemine tabi tutularak toz haline getirilmiştir (Şekil 6.1). Toz formdaki 12.5'er gram Oleander yaprağı, etanol ve su ekstratlarının hazırlanması için sırasıyla 100'er mL etanol ve ultra saf su içeren kapaklı erlenlere konularak oda sıcaklığında, ultrasonik su banyosu içerisinde 5 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstratlar 5000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek atık konumuna gelmiş çökelti fazı

uzaklaştırılmış ve temiz ekstreler elde edilerek +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

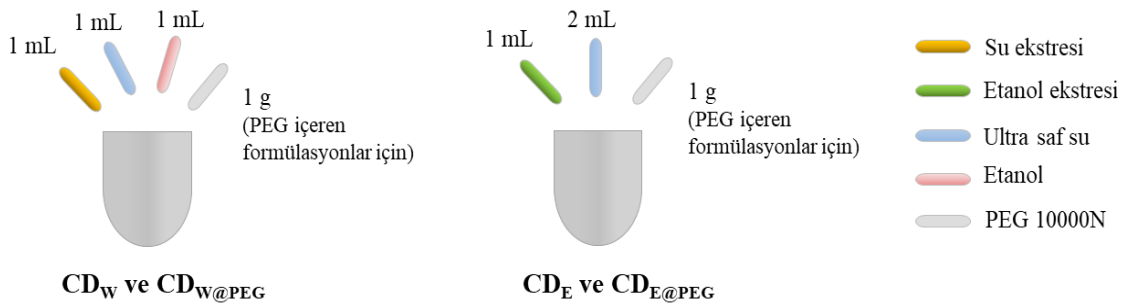


Şekil 6. 1 *N. oleander* yapraklarının öğütme işlemi sonrası görüntüleri; a. Elle ufalanmış kuru yapraklar, b. Bıçaklı öğütücü ile toz haline getirilmiş yapraklar

6.3.2 *Nerium oleander* Yaprak Ekstrelerinden Karbon Nanodot Sentezi

6.3.2.1 Termal Yöntemle CD Sentezi

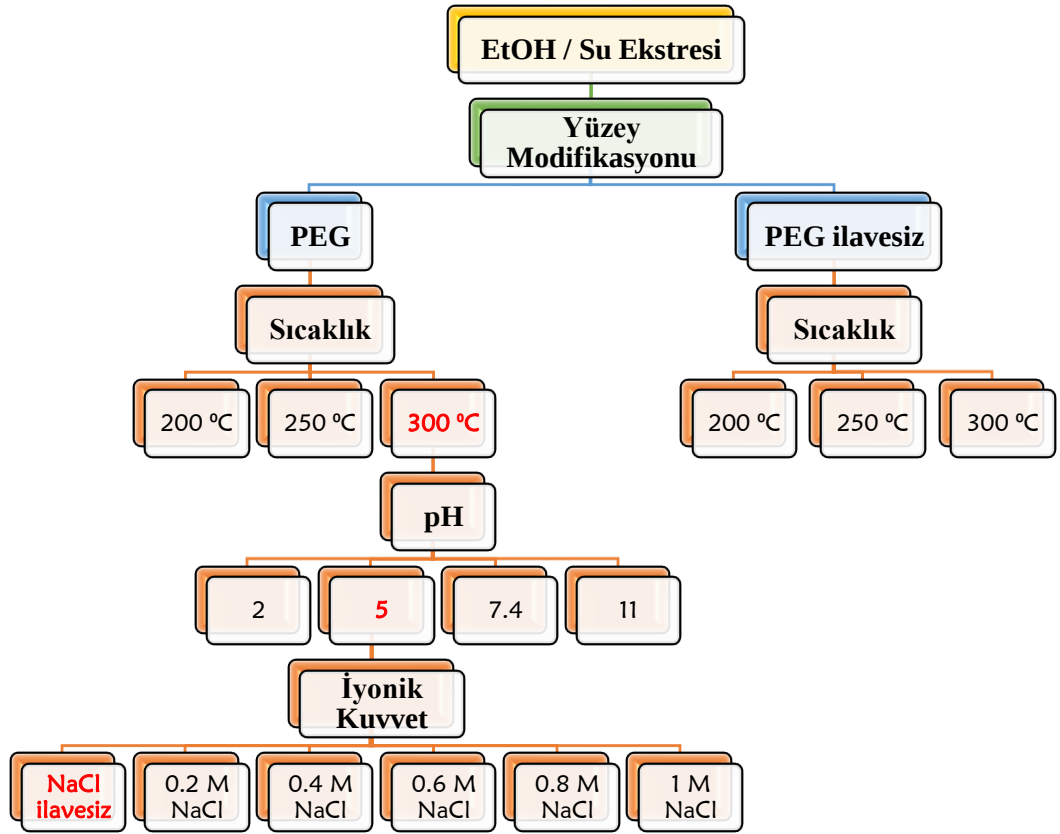
Karbon nanodotların sentezi için Oleander ekstreleri karbon kaynağı olarak kullanılmış; karbon kaynağı, yüzey modifikasyonu, reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvveti, sentez sıcaklığı gibi fiziksel etmenlerin CD oluşumu üzerindeki etkisinin incelenmesi için farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Genel olarak formülasyonda yer alan maddeler seramik krezeller içerisinde tamamen çözünene kadar metal bir spatula yardımıyla karıştırılmış ve pH değerleri ölçülerek, istenen pH değeri zayıf asit baz çözeltileri (HCl ve NaOH) kullanılarak ayarlanmıştır. Reaksiyon ortamının iyonik kuvvet değerinin değiştirilmesi için ise ortama artan konsantrasyon değerlerinde NaCl eklenmiştir. PEG içeren ve içermeyen formülasyonları hazırlanışının şematik gösterimi Şekil 6.2'de sunulmuştur.



Şekil 6. 2 PEG içeren ve içermeyen CD formülasyonlarının şematik gösterimi

Karbon kaynağının etkisinin incelenmesi için 2 (Oleander etanol ve su ekstreleri), yüzey modifikasyonunun etkisinin incelenmesi için 2 (PEG ilaveli, ilavesiz), reaksiyon sıcaklığının etkisinin incelenmesi için 3 (200, 250 ve 300 °C), reaksiyon ortamının pH'ının etkisi için 4 (2, 5, 7.4, 11), iyonik kuvvetin etkisinin incelenmesi için ise 6 (NaCl içermeyen, 0.2–1.0 M NaCl içeren) farklı koşulda çalışılmıştır (Şekil 6.3). Karbon kaynağı parametresi hariç tutularak, incelenen diğer parametrelerde floresan özellik, boyut, yüzey özellikleri vb. bakımından daha üstün görünen sentez koşulu seçilerek bir sonraki basamağa geçilmiştir.

Karbon nanodotlar, sıcaklığın etkisinin incelenmesi için kül fırınında farklı sıcaklıklarda 45 dakika boyunca sentezlenmiştir. Sentez basamağının ardından krozelerde kalan maddeler 6 mL ultra saf su içinde çözülmüş ve temiz çözeltilerin eldesi için örnekler sırasıyla 6000 ve 13500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Kalıntılardan temizlenen ve CD'leri içeren süpernatant faz alınarak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Elde edilen karbon nanodotlar ekstraksiyon yöntemine göre (E: etanol, W: su) ve PEG içermelerine bağlı olarak **CD_E**, **CD_{E@PEG}**, **CD_W**, **CD_{W@PEG}** şeklinde kodlanmıştır. Sentezlenen parçacıkların karakterizasyon çalışmalarında UV-Vis spektrofotometre, floresan spektrofotometre, FT-IR, dinamik ışık saçılımı cihazları kullanılmış olup bu çalışmalar esnasında kullanılan CD örneklerin konsantrasyonu 50 µL/3mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

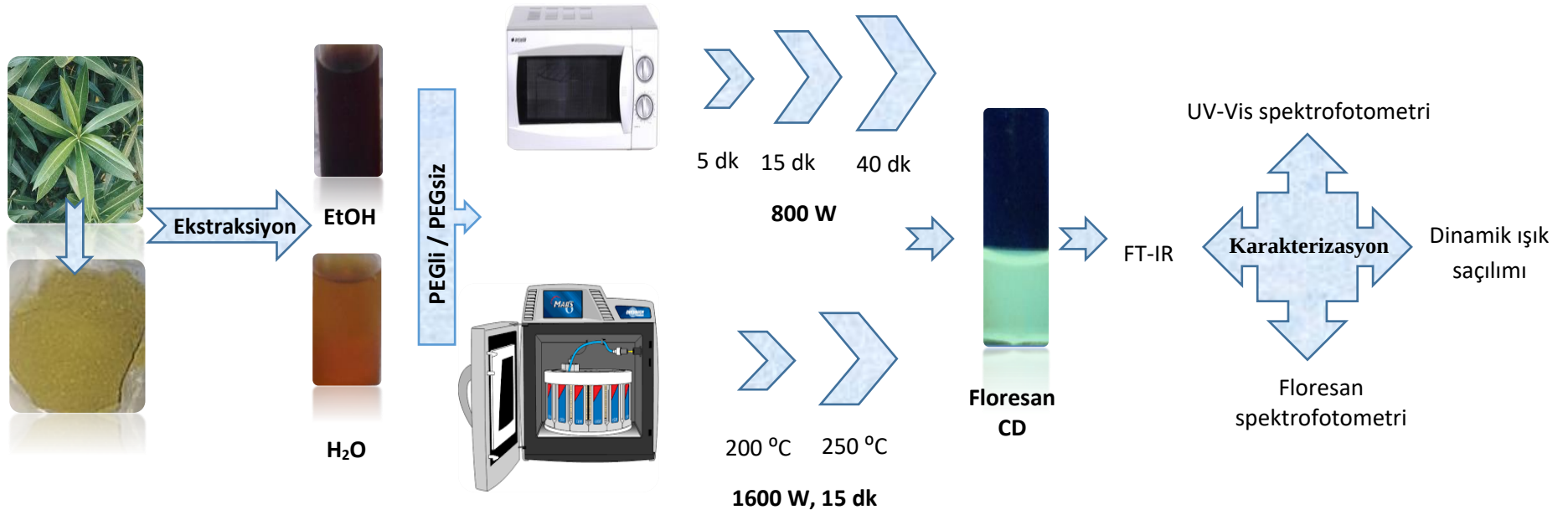


Şekil 6. 3 Fiziksel parametrelerin CD üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmaya dair akış şeması

6.3.2.2 Mikrodalga Sentez Yöntemiyle CD Eldesi

Bölüm 6.3.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan formülasyonlardan, farklı mikrodalga yöntemlerinin CD üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla, ev tipi mikrodalga fırın ve mikrodalga ile desteklenmiş hidrotermal sentez cihazları kullanılarak farklı koşullarda karbon nanodot sentezi gerçekleştirilmiştir. Ev tipi mikrodalga fırında sentez (MWO) için örnekler çıkış gücü 800 W olan mikrodalga fırına konularak sırasıyla 5, 15 ve 40 dakika boyunca fırında tutulmuştur. Mikrodalga esaslı diğer yöntem olan mikrodalga destekli hidrotermal sentez işlemi (MAH) ise istenilen sıcaklığa 15 dakikalık bir rampa değişimi ile ulaşması ve 15 dakika boyunca o sıcaklıkta kalarak sentez gerçekleşmesi için programlanmış mikrodalga sentez cihazında, teflon bir hidrotermal reaktör kullanılarak sırasıyla 200 ve 250 °C’de çalışılmıştır.

Sentez basamağının ardından gerçekleştirilen tüm işlemler Bölüm 6.3.2.1 ile aynı olup mikrodalga sentez yöntemiyle CD eldesine dair çalışmalar Şekil 6.4’te şematize edilmiştir.



Şekil 6. 4 Mikrodalga sentez yöntemiyle CD eldesi işlemlerinin şematik gösterimi

6.3.3 Karakterizasyon Çalışmaları

Karbon nanodotların optik özelliklerinin karakterizasyonu için fotolüminesans spektroskopisi (Agilent Cary Eclipse) kullanılmıştır. CD'lerin UV absorpsiyon spektrumları, 1 cm yol uzunluğunda bir küvet kullanılarak UV-spektrofotometre (Shimadzu UV-1800) üzerine kaydedilmiştir [153]. Ek olarak, CD'lerden yayılan floresan, 365 nm dalga boyunda bir UV lambası ile görselleştirilmiştir. Sentezlenen CD'lerin parçacık boyutu dağılımı ve yüzey zeta potansiyeli, dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği (Malvern Zetasizer Nano-ZS) ile ölçülmüştür.

Parçacık boyut dağılımının ölçülmesi esnasında, berrak, tek kullanımlık zeta hücresi kullanılmış olup içerisine yaklaşık 1 mL CD çözeltisi eklenmiştir. 3 tekrarlı olarak her biri 12 ölçümden oluşan setler halinde yapılan ölçümler neticesinde ortalama parçacık boyutları ve standart sapmalar belirlenmiştir. Yüzey zeta potansiyeli ölçümü için, yaklaşık 1 mL CD çözeltisi tek kullanımlık zeta hücresine konulmuş ve 3 tekrarlı olarak her biri 20 ölçümden oluşan setler halinde yapılan ölçümler neticesinde ortalama yüzey zeta potansiyelleri ve standart sapmalar belirlenmiştir.

CD'lerin Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrumu, FT-IR spektrometresinde (Perkin Elmer Frontier FT-IR) 4 cm^{-1} çözünürlükle, $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında toplanmıştır. CD'lerin yapılarının daha ileri tayini için X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) taraması, Specs-Flex XPS Spectrometer (Al K α 1486.7eV) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler ortam atmosferinde ve oda sıcaklığında yapılmıştır.

6.3.4 *In Vitro* Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

6.3.4.1 CD'lerin MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki *In vitro* Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Sentezlenen karbon nanodotların kanser hücreleri ile etkileşimlerini içeren biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi için seçilen CD'lerin, insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktiviteleri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence ile incelenmiştir.

MCF-7 hücre hattı, DMEM besiyeri içerisinde % 5 CO₂ içeren ortamda yetiştirilmiştir. Kuru formda bulunan karbon nanodotlar ve ekstratlar ultra saf su kullanılarak istenen konsantrasyonlarda hazırlanmış ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Hücreler her bir kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde 16 kuyucuklu e-plate'e (cihaza uyumlu, 16 kuyucuklu plaka) inkübe edilmiştir. Hücrelerin inkübasyonundan 24 saat sonra, steril edilmiş CD'ler nihai konsantrasyonları, 2.5 ppb, 25 ppb, 250 ppb, 2500 ppb ve 50 ppm olacak şekilde hücre kültür ortamına eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak her bir bitki ekstresi 50 ppm konsantrasyonda kullanılmıştır. Besiyerinin buharlaşmasının engellenmesi için e-plateler arasındaki boşluklara DPBS eklenmiştir. Ardından e-plateler xCELLigence sistemine yerleştirilerek 15 dakikada bir monitorize edilmiştir. Her deney 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

6.3.4.2 CD'lerin HDFa Hücre Hattı Üzerindeki *In vitro* Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Sentezlenen karbon nanodotların sağlıklı (normal) hücreler ile etkileşimlerini içeren biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi için seçilen CD'lerin, insan primer dermal fibroblast HDFa hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktiviteleri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence ile incelenmiştir.

Hücre indeksi kuyucuklardaki hücrenin varlığı ve yokluğu durumunda elektriksel empedansta değişikliğin ölçülmesiyle elde edilmiştir. Bu amaçla primer hücre hattında farklı konsantrasyonlarda kimyasal sentez içeren karışımlar sistemin 16 kuyucuklu e-plate'e 3x10⁴ hücre olacak şekilde inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra e-plate'in her bir kuyucuğu hücrelerin proliferasyonu ve hücrelerin yayılması gibi kriterlerin takip edilebilmesi için her 15 dakikada bir xCELLigence sistemi yardımıyla monitörize edilmiştir. Hücre ekiminden yaklaşık 18-24 saat sonra hücreler "log growth" (logaritmik çoğalma) fazına girdiğinde hücrelere seçilen karbon nanodot (CD_{W@PEG}, termal sentez ile pH 5 ve NaCl içermeyen ortamda 45 dakika sentez) (2.5 ppb, 25 ppb, 250 ppb, 2500 ppb ve 50 ppm) farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Kontrol olarak hücrelere yalnızca besiyeri eklenerek, tüm deneyler 96 saat içerisinde değerlendirilmiştir. Her deney 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

6.3.5 Akış Sitometrisi ile Hücre Döngüsü Analizi

Bu yöntem, farklı şekilde izole edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki anormal DNA'lı hücre hatlarını belirlemede, buna bağlı DNA indeksi (Di) tahmininde ve bu hücre hattında hücre döngüsü faz dağılımlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Takip edilen kitin çalışma metodu, hücre membranını oluşturan lipidlerin iyonik olmayan deterjanlar yardımıyla çözülmesini, hücre iskeletinin ve nükleer proteinlerin tripsin yardımıyla uzaklaştırılmasını, hücre RNA'nın enzimler ile parçalanmasını ve spermin ile nükleer kromatinlerin stabilize edilmesini içermektedir. Propidyum iyodür (PI) ile boyanmış nükleus 580 ve 650 nm dalga boyunda ışık yaymaktadır. Bu bilgiler ışığında deneyler planlanmış ve uygulanmıştır.

37 °C ve % 5 CO₂ ortamında 48 ve 72 saat boyunca 3 farklı konsantrasyonda CD eklenerek inkübe edilen hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanmış ve hücreler 17x100 mm'lik FACS tüplerine alınmıştır. Bu işlemi takiben hücrelere 5 dakika boyunca 500 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün dibinde oluşan pellete zarar verilmeden supernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 1 mL tampon çözelti eklenerek herhangi bir köpürme yapılmaksızın çalkalanmış ve takiben 5 dakika 500 rpm'de santrifügasyon yapılmıştır ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Uzaklaştırılan süpernatant sonrasında hücrelerin üzerine tekrar 1 mL tampon çözelti eklenerek hücreler Cedex XS cihazında sayılmıştır. Sayım sonrasında konsantrasyon tampon çözelti ile 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hücrelerin hazırlanması bu aşama ile tamamlandıktan sonra boyama protokolüne geçilmiştir. Hücreler bu basamakta ilk olarak 5 dakika boyunca 400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatantın tamamı atılarak son damla peçeteye alınmıştır. Tüplere 250 µL Solüsyon A (Trypsin tamponu) eklenerek vorteks yapılmadan el yardımıyla karışma sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından Solüsyon A'nın etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon A boşaltılmadan üzerine 200 µL Solüsyon B (Tirozin Inhibitör and RNase tamponu) eklenip tüplerin dibine el ile vurularak karışması sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından Solüsyon B'nin etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından solüsyon A ve B

boşaltılmadan üzerine 200 µL (2-8 °C) soğuk olarak Solüsyon C (Propidium Iodide Stain Solution) tüm tüplere eklenmiştir. Hızlıca karıştırılarak karanlıkta ve +4 °C'de 10 dakika daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşamasını takiben örnekler 35 µm ve 50 µm'lik filtreler kullanılarak 12x75 mm tüplere aktarılmıştır. Bu işlem ile birlikte örnekler akım sitometri cihazına verilmeye hazır hale getirilmiş olup akım sitometri cihazında okutulmuştur. Veriler akış sitometri analiz yazılımı ile analiz edilmiştir. Değerler, hücre döngüsü fazlarında hücrelerin fraksiyonları olarak ifade edilmiştir (ortalama ± standart sapma). Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

6.3.6 Genotoksisitenin Belirlenmesi: *In Vitro* Comet Testi

Sitotoksisite çalışmalarından elde edilen bilgiler ve IC₅₀ değerleri doğrultusunda; 0.25, 2.5 ve 50 ppm konsantrasyondaki karbon nanodotlar 48 ve 72 saat boyunca alkali comet testi deneylerini gerçekleştirmek için seçilmiştir. Logaritmik fazdaki MCF-7 hücreleri, CD ilavesine maruz bırakılmadan önce 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarında 2 gün boyunca kaplanmıştır. Muamele edilmemiş kontroller (negatif kontrol) ve 20 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilen pozitif kontroller bütün serilerde yer almaktadır. Comet yöntemi alkali koşullarda (pH>13) gerçekleştirilmiştir.

CD muamelesinin ardından hücreler tripsinize edilmiş ve 1100 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. 1-3x10⁴ hücre, 75 µL eriyik (37 °C) % 0.5 düşük erime noktalı agaroz içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Agaroz içerisinde yeniden süspanse edilen hücreler % 1 normal erime noktalı agaroz ile önceden kaplanmış kuru mikroskop lamaları üzerinde konulmuş ve agar 10 dakika süreyle katılaşmaya bırakılmıştır. Lamalar daha sonra 4 °C'de en az 1 saat boyunca soğuk lizisleme (parçalama) çözeltisi (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, % 1 Triton X-100) içine daldırılmış, daha sonra taze elektroforez tamponu (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH>13) içeren bir elektroforez tankına aktarılmış ve 20 dakika süreyle DNA açılmasının sağlamak için oda sıcaklığında tutulmuştur. Elektroforez işlemi; aynı tampon içerisinde, oda sıcaklığında, 15 dakika, 24 V ve 300 mA'de (0.8 V/cm) gerçekleştirilmiştir. Ardından lamalar 0.4 M Tris tamponu (pH 7.5) ile 3 kez nötralize edilmiş, hava ile kurumaya bırakılmış ve etanol içerisinde sabitlenmiştir. İlave DNA hasarını önlemek için tüm hazırlık adımları karanlıkta gerçekleştirilmiştir.

Lamlar etidyum bromür (0.1 mg/mL, 1:4) ile boyanarak video kamera ile donatılmış floresan mikroskobu ile analiz edilmiştir.

6.3.6.1 DNA Hasarı Miktarının Belirlenmesi

Comet görüntülerinin floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirilmesi basamağında DNA hasar miktarının ölçülmesi için numune başına 100 hücre (2 tekrarlı, her birinde 50 hücre/lam) görsel olarak incelenerek, oluşturdukları kuyruklu yıldızların kuyruğundaki DNA yüzdesi kullanılmıştır. Her hücreye, Tip 0'dan (hasarsız) Tip 4'e kadar (ultra-yüksek hasar) hasar şiddeti puanı verilmiştir. Gözlem yöntemi, gözlemcinin lamın içeriği hakkında hiçbir bilgisi olmadığı, kör biçimde gerçekleştirilmiştir. Farklı örnek konsantrasyonları ile muamele edilmiş her hücre kültürünün DNA hasarını değerlendirmek için lam başına 50 hücre ve örnek başına 2 lam incelenmiştir. Hücreler, gözle yapılan incelemeye esasen, Bölüm 4.2.1'de değinildiği gibi Tip 0 ile Tip 4 arasında hasar derecelendirmesine tabi tutulmuş ve rastlantısal birim (AU) değerleri Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

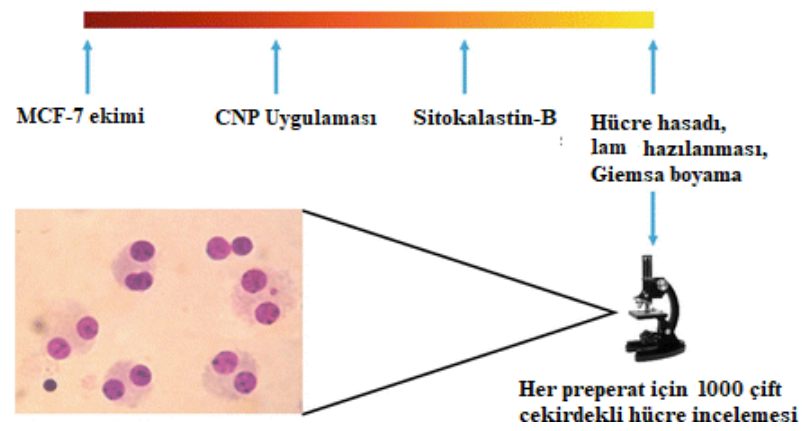
6.3.6.2 İstatiksel Analiz

Her değerlendirme için üç tekrarlı en az üç bağımsız deney yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Comet testinde elde edilen sonuçların değerlendirilmesi varyans, tekrarlı ölçümler için ANOVA ve Bonferroni post hoc yöntemi ile belirlenmiştir. $p < 0.001$ anlamlı kabul edilmiş olup veri analizlerin tamamı STATISTICA yazılımının ücretsiz deneme sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6.3.7 Klastojenitenin Belirlenmesi: Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Testi (CBMN)

Sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi için hücreler, her bir kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde T25 hücre kültür kapları içerisine ekilmiş ve karbon nanodotlarla muamele edilmiştir. Hücrelerin karbon nanodotlara maruz bırakılma periyodunun ardından hücreler iki kez PBS ile yıkanmış ve 38 saat boyunca $3 \mu\text{g/mL}$ Cyt-B içeren taze ortam içerisinde yeniden inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler hasat edilmiş ve oda sıcaklığında, 50 saniye boyunca çok soğuk (buz gibi) KCl içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir.

Daha sonra hücreler Carnoy çözeltisi (1:3 asetik asit ve metanol karışımı) içerisinde sabitlenmiş (fikse edilmiş) ve sitoplazmayı korumak için birkaç damla formaldehit eklenmiştir. 1500 rpm'de (1000 g) 10 dakika boyunca yapılan santrifüj işleminden hemen sonra hücreler tekrar Carnoy'nin çözeltisi içerisinde sabitlenmiştir. Son olarak, hücreler temiz mikroskopik lamlara damlatılarak hava ile kurumaya bırakılmış ve Giemsa ile boyanmıştır. Her örnek için toplam 1000 binükleer hücre mikroskopik olarak incelenmiştir. Kromozomal hasar seviyeleri, örnek ile muamele edilmemiş kontrole kıyasla mikronükleusun katlanmasını indüklenmesine göre rapor edilmiştir (Şekil 6.5) [154].



Şekil 6. 5 CBMN yöntemi şematik gösterimi (Migliore ve ark. [154], 2014'ten alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

CBMN testinin sonuçlarının doğru kabul edilebilmesi için çift çekirdekli hücreler ve mikronükleus sayımı aşağıdaki kriterler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir [113,115].

- Mikronükleuslar ana çekirdekten belirgin biçimde ayrılmış olmalı veya mikronükleer sınırları ayırt edilebilir olmalı ve ana çekirdek ile aynı sitoplazma düzlemi içerisinde bulunmalıdır.
- Ana çekirdeklere benzer bir kromatin materyaline sahip olmaları gerekmektedir.
- Hücreler belirgin çekirdek zarıyla çevrilmiş yuvarlak veya oval çift çekirdeğe ve belirgin sitoplazmaya sahip olmalıdır.
- Mikronükleus çapı ana çekirdeğin 1/3'ü ile 1/6'sı arasında olmalıdır.
- Boya alma yoğunluğu, ana çekirdek ile aynı olmalıdır.

- Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki mikronükleusların sayılması esas alınmalıdır.

Sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi uygulanırken, toksisite, hücreleri çekirdek sayısına göre sınıflandırarak değerlendirilmiştir.

6.3.7.1 İstatiksel Analiz

Her değerlendirme için üç tekrarlı en az üç bağımsız deney yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. CBMN testinde elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için bağımsız t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiş olup veri analizlerin tamamı STATA MP/11 yazılımının ücretsiz kısa süreli sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

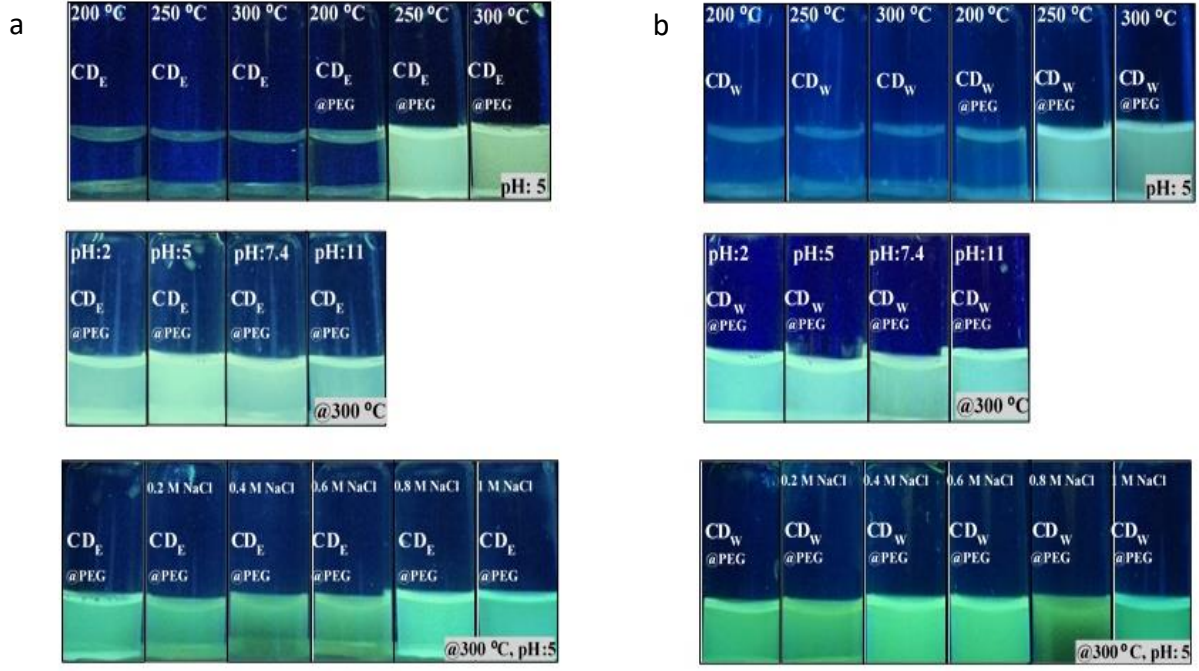
ARAŞTIRMA BULGULARI

7.1 Termal Yöntemle CD Sentezi

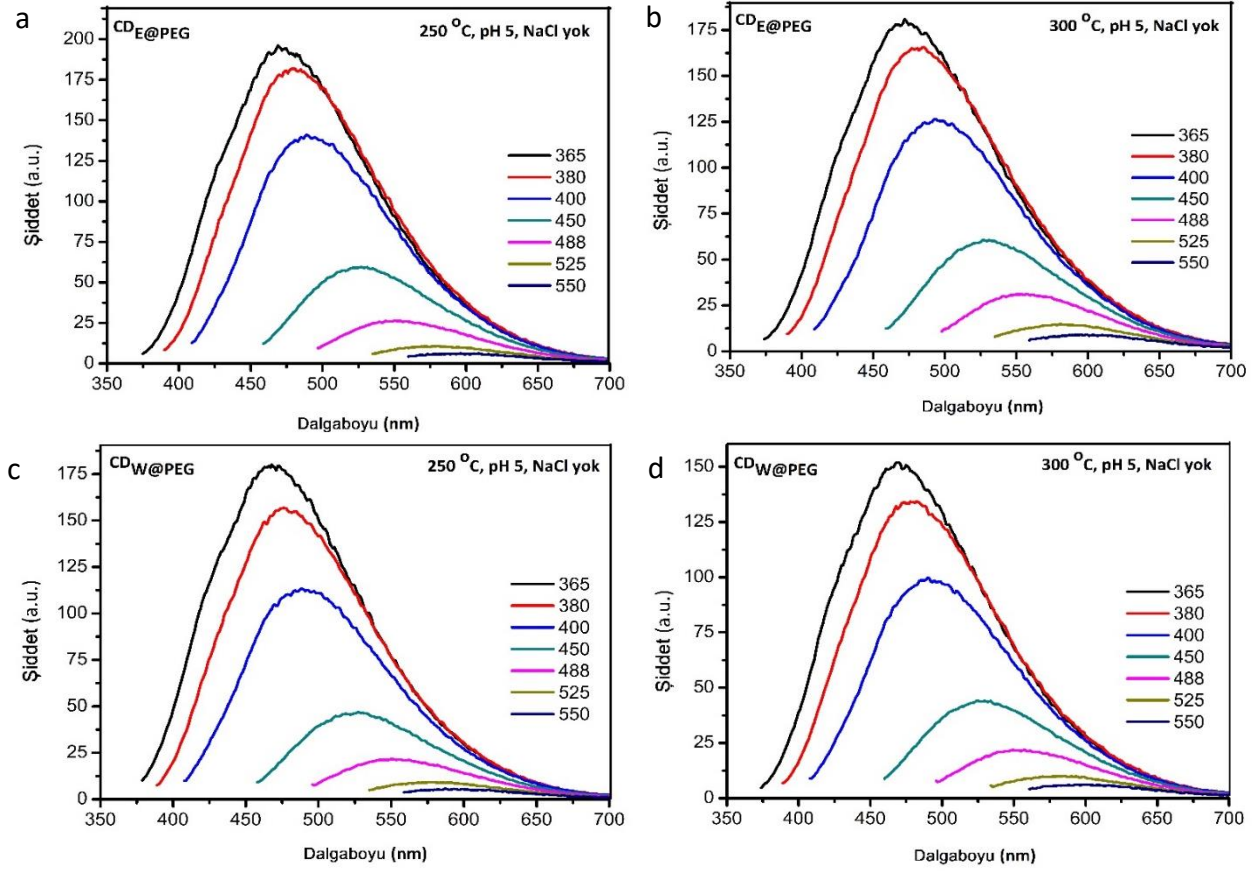
Termal yöntemle karbon nanodot sentezi çalışmaları esnasında, ekstre temelli olarak karbon kaynağının, yüzey modifiye edici ajan varlığının, reaksiyon ortamının (pH ve iyonik kuvvet) ve sentez koşullarının elde edilen karbon nanodotların fiziksel ve kimyasal karakteristikleri üzerindeki etkileri incelenmiş olup elde edilen bulgular doğrultusunda seçilen CD'lerin MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir.

7.1.1 Ekstraksiyon Yöntemi ve Yüzey Modifikasyonunun Etkisi

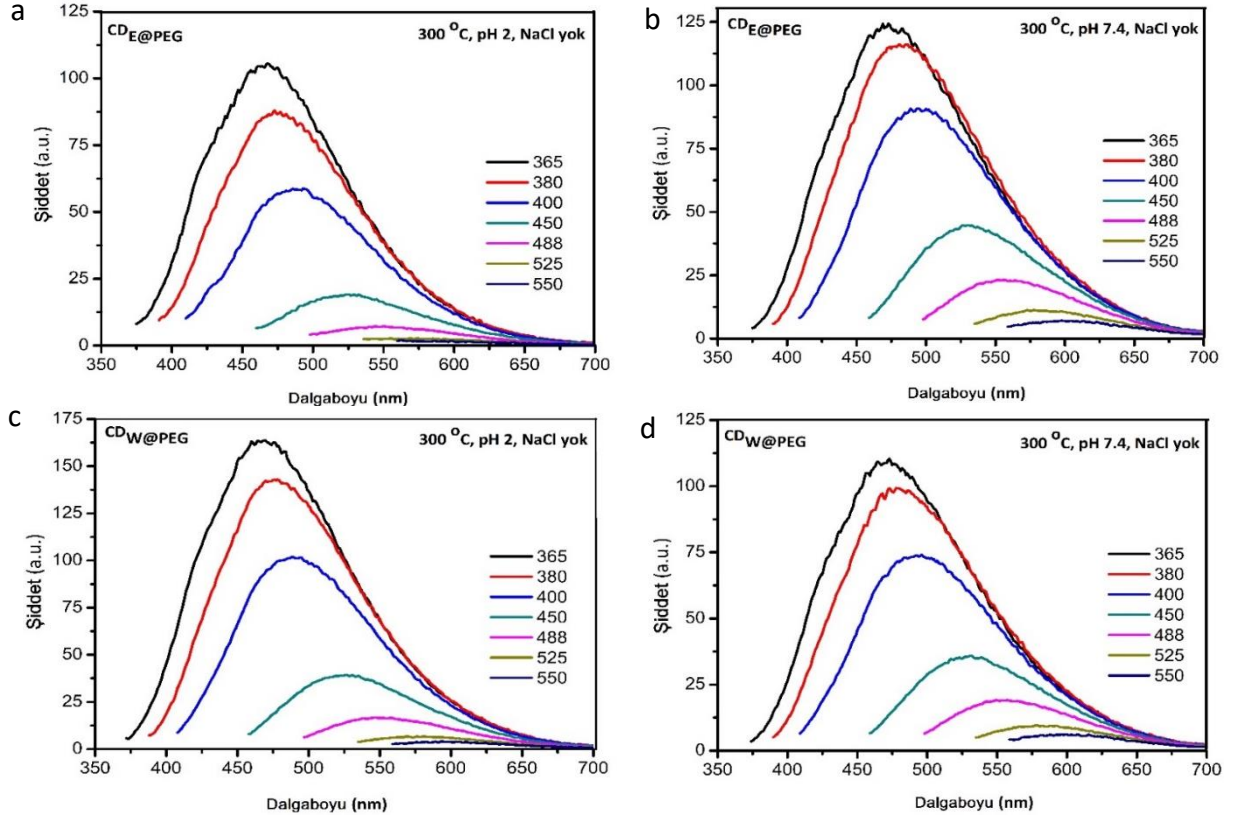
Sentezlenen karbon nanodotların floresan özellikleri öncelikli olarak 365 nm UV ışık altında gözlenmiş olup (Şekil 7.1), floresan ışımaya veren parçacıkların fotolüminesan özelliklerinin detaylı olarak incelemesi için floresan spektrofotometresi kullanılmıştır. Bu doğrultuda, parçacıkların floresan ışımaları (emisyon), 365-550 nm aralığında çeşitli uyarım (eksitasyon) değerlerinde incelenmiştir. Genel olarak daha yüksek şiddetteki ışımaya değerleri 365 nm eksitasyonda elde edildiği belirlenmiş ve ilerleyen aşamalarda bu uyarım değerinde çalışılmıştır (Şekil 7.2-7.4).



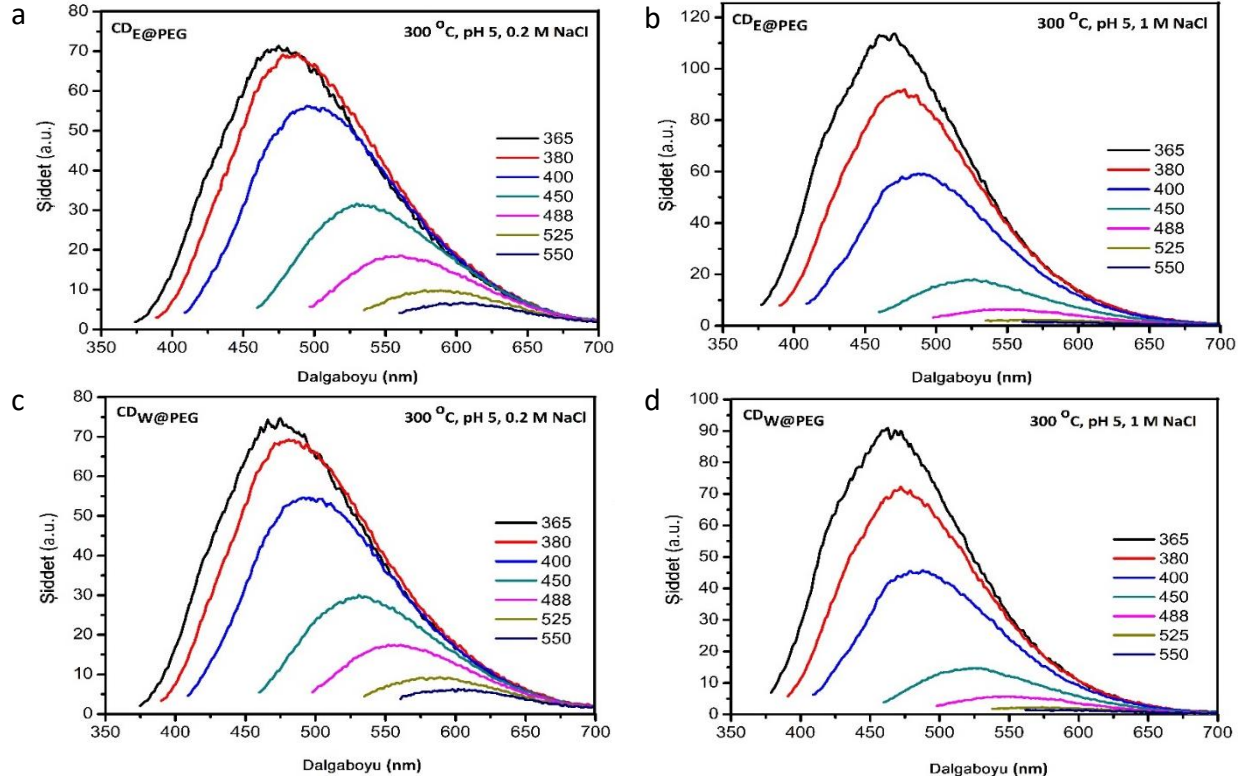
Şekil 7. 1 Termal yöntem ile sentezlenen CD'lerin 365 nm UV ışık altındaki floresan ışımaları; a. $CD_E@PEG$, b. $CD_W@PEG$



Şekil 7. 2 Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-1 (Farklı sentez sıcaklıklarında)

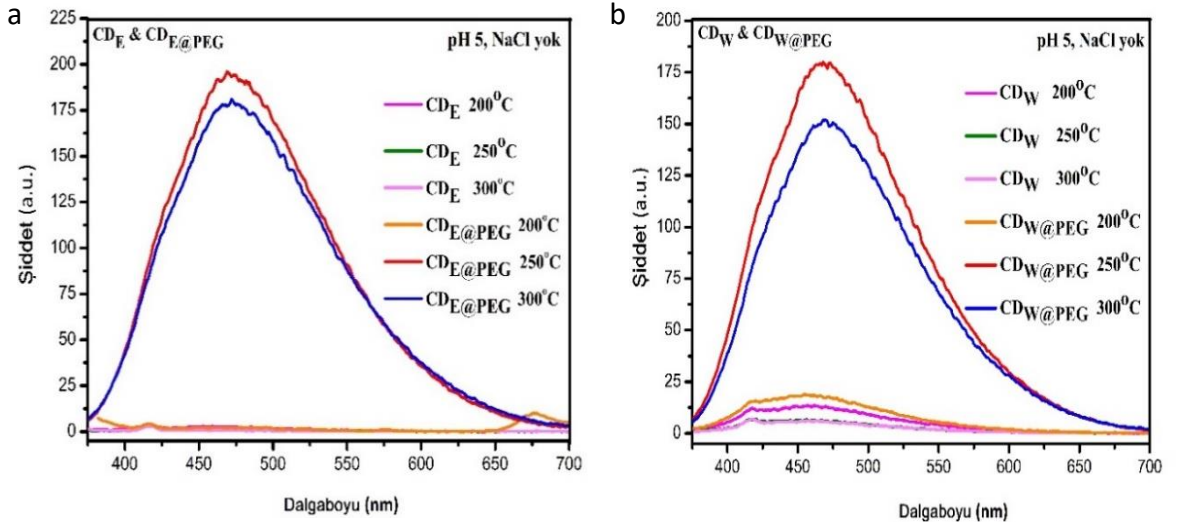


Şekil 7. 3 Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-2 (Farklı pH değerlerinde)

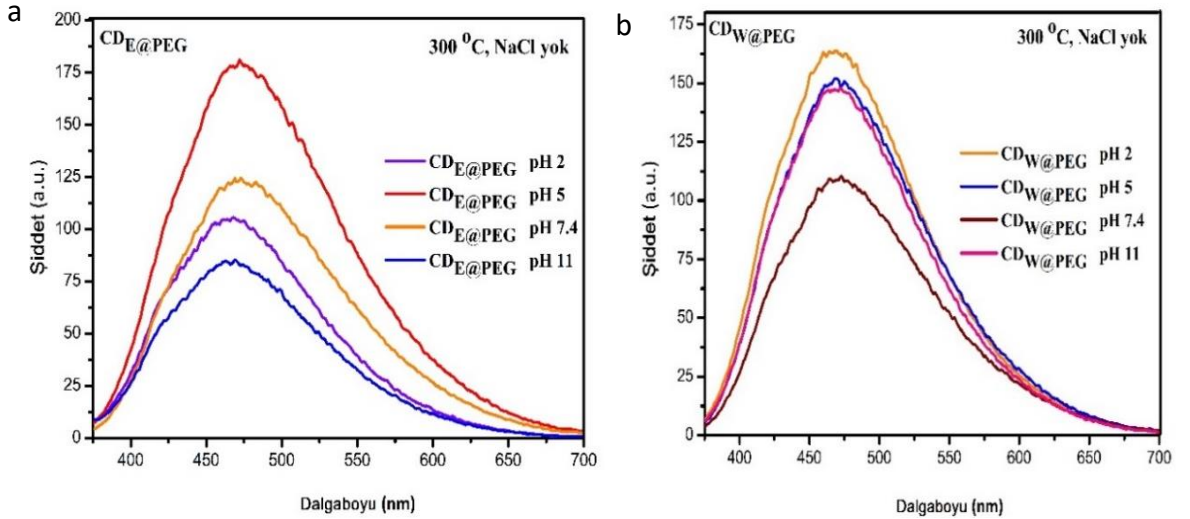


Şekil 7. 4 Farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları-3 (Farklı iyonik kuvvet değerlerinde)

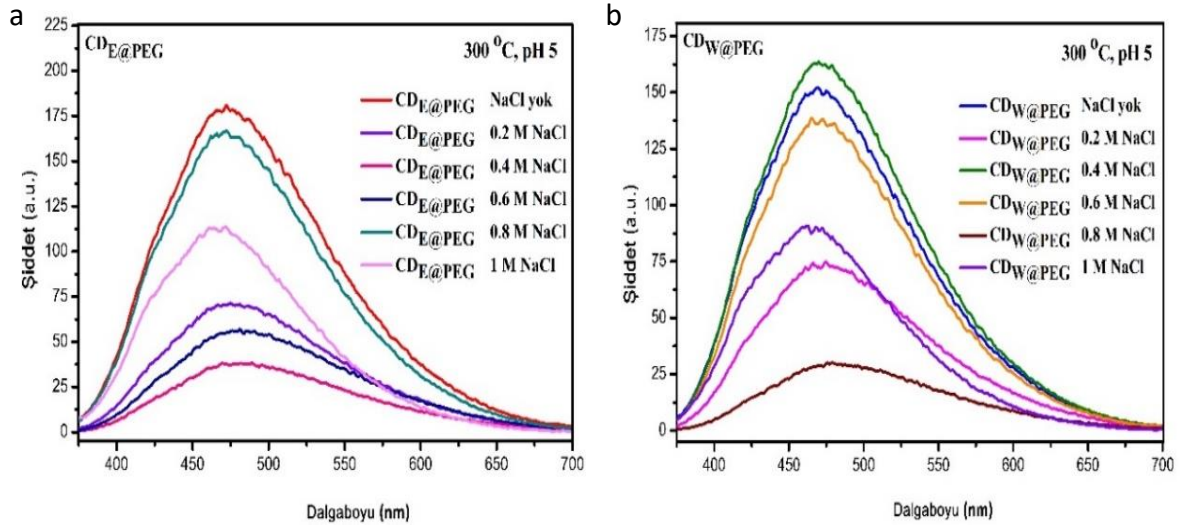
Reaksiyon ortamına yüzey modifikasyon ajanı polietilen glikolün eklenmesi ile elde edilen parçacıkların floresan ışıma şiddetleri arasında güçlü bir bağ olduğu belirlenmiş ve bu durum PEG'in yüzey pasifize edici etkisi ile açıklanmıştır (Şekil 7.5) [155]. Ayrıca, etanol ekstresi temelli karbon nanodotların su ekstresi temelli olarak sentezlenenlere oranla çoğunlukla daha yüksek floresan ışıma değerleri verdiği belirlenmiş olup ekstraksiyon tipinin floresan özellik üzerindeki etkisi açığa çıkartılmıştır (Şekil 7.5-7.7).



Şekil 7. 5 Sentez sıcaklığının CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD_E, CD_E@PEG, b. CD_W, CD_W@PEG

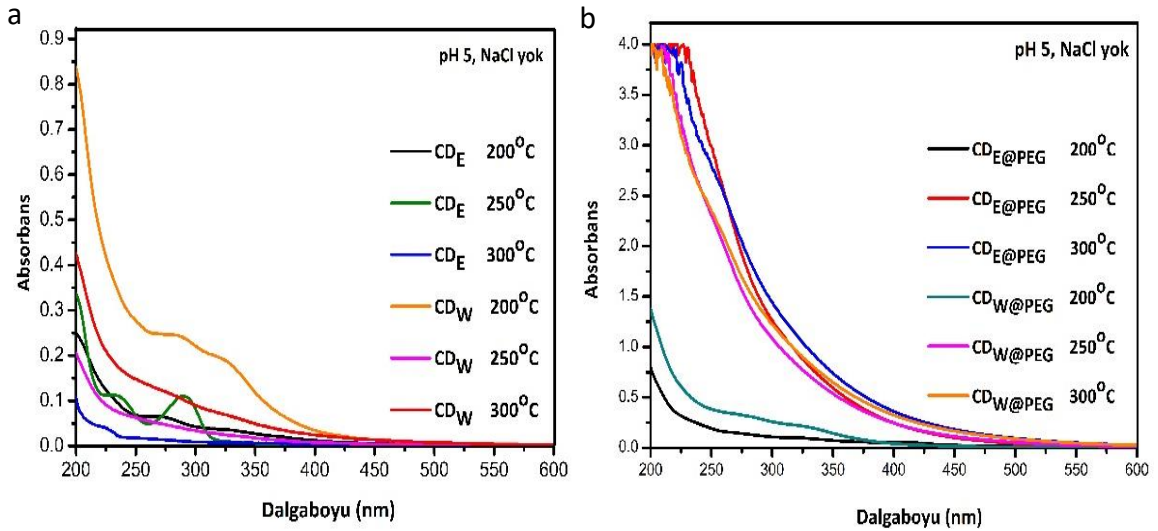


Şekil 7. 6 Sentez ortamının pH'sının CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD_E@PEG, b. CD_W@PEG

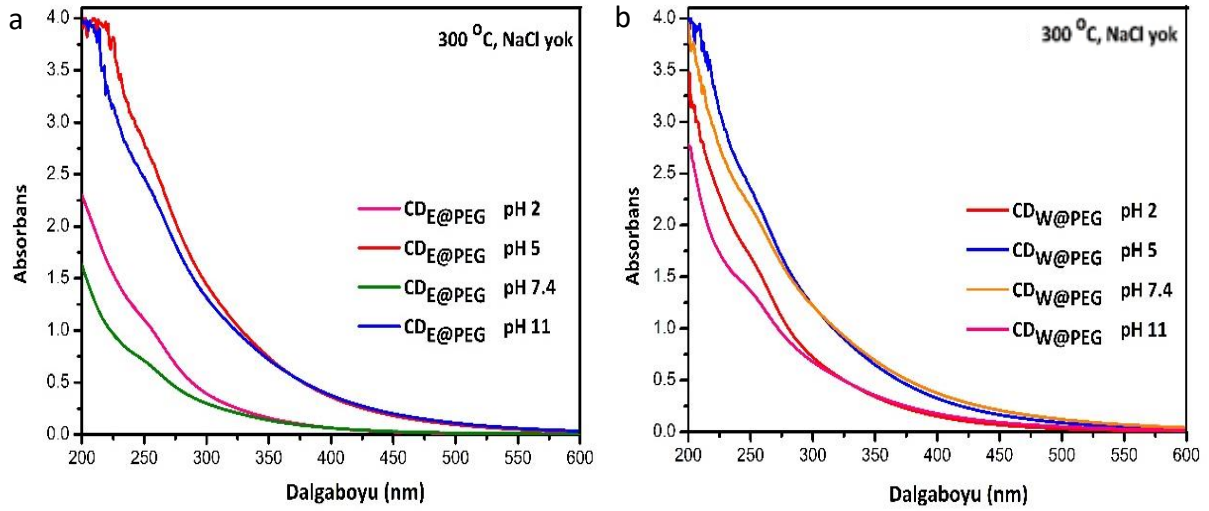


Şekil 7. 7 Sentez ortamının iyonik kuvvetinin CD'lerin floresan spektrumu üzerine etkisi; a. CD_E@PEG, b. CD_W@PEG

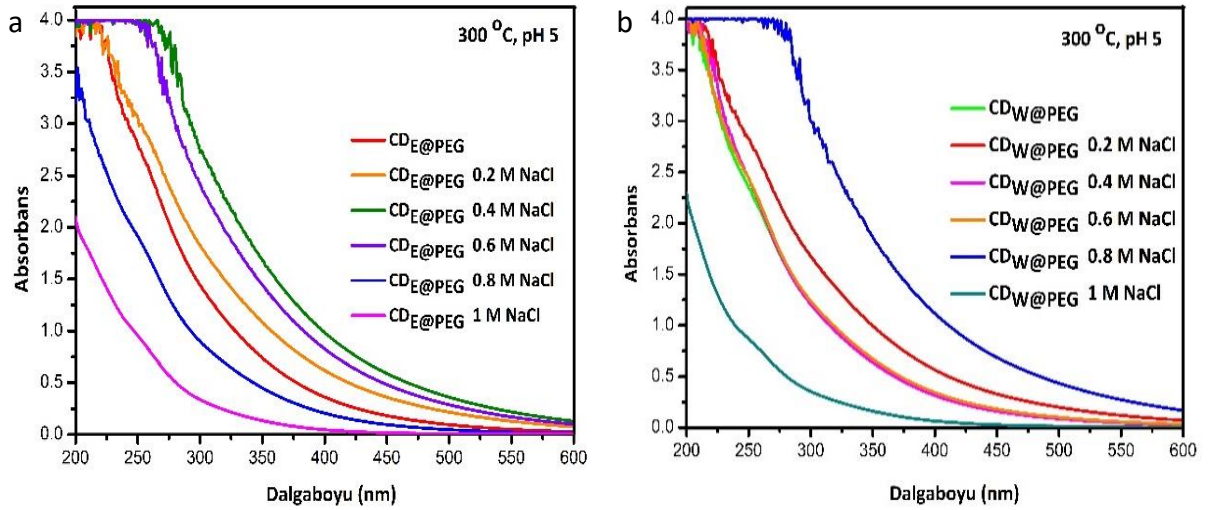
Nanoparçacıkların optik özellikleri UV-Vis spektroskopisi ile incelenebilmektedir [153]. Orijinal karbon nanodotlar 365 nm'de yayvan bir pik vermektedir [64]. 300-400 nm arasındaki bantların, C=O fonksiyonel grubuyla ilişkili $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinden [66,156–160] kaynaklanabileceği düşünülmektedir. 240 ve 300 nm'ler arasındaki pikler, C=C gruplarının $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi ile ilişkilendirilebilir [65,66,158,159,161]. Sentezlenen tüm orjinal karbon nanodotlarda, 240-300 nm ve 300-400 nm arasındaki bu piklerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 7.8-7.10).



Şekil 7. 8 Termal sentez yönteminde, sentez sıcaklığının CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD_E, CD_E@PEG, b. CD_W, CD_W@PEG

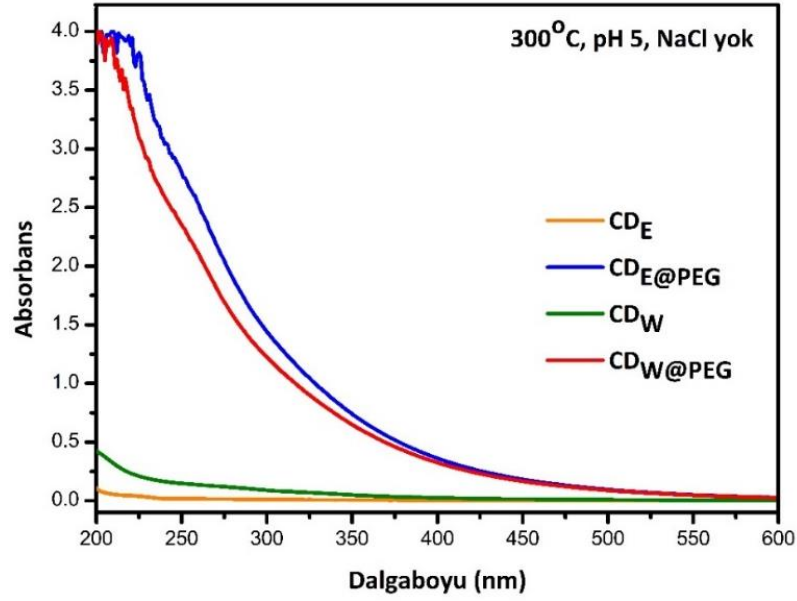


Şekil 7. 9 Termal sentez yönteminde, sentez ortamının pH'sının CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD_E@PEG, b. CD_W@PEG



Şekil 7. 10 Termal sentez yönteminde, sentez ortamının iyonik kuvvetinin CD'lerin UV-Vis spektrumları üzerindeki etkileri; a. CD_E@PEG, b. CD_W@PEG

PEG içermeyen formülasyonlara kıyasla PEG içeren formülasyonlardan sentezlenen karbon nanodotların absorban değerlerinde çarpıcı bir artış gözlenmiştir (Şekil 7.11). Yaklaşık 370 nm'de gözlenen bu artışlar, CD'lerin yüzey enerji seviyesinin artması ile ilişkilendirilebilmektedir [162]. Ekstraksiyon yönteminin CD'lerin optik özellikleri üzerindeki etkisi Şekil 7.8-7.10'da görülmektedir. Genel olarak, parçacıkların UV-Vis profili, ekstre tipinden bağımsız olarak birbirine benzer şekildedir. İncelenen diğer parametrelerin, parçacıkların optik özellikleri üzerinde ekstraksiyon tipinden daha etkili olabilecekleri düşünülmektedir.



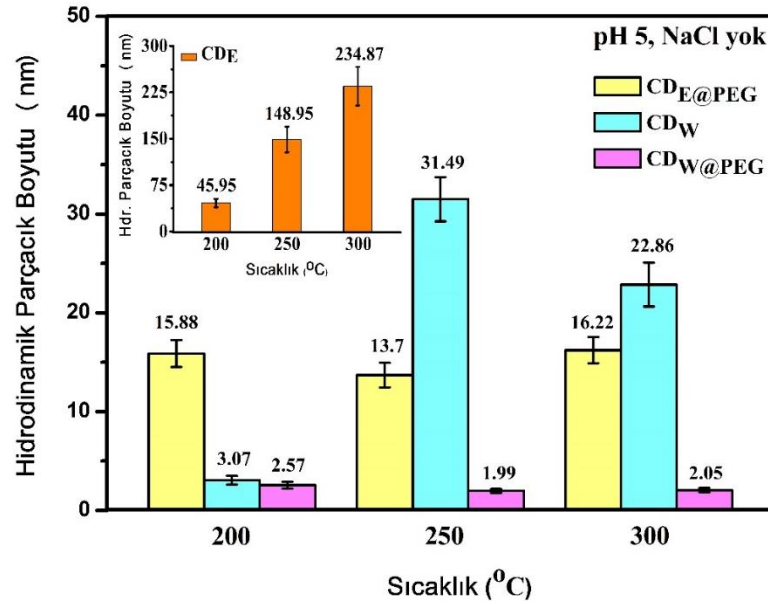
Şekil 7. 11 Sentez ortamına PEG ilavesinin absorbans üzerindeki etkisi

Partikül boyutu, karbon nanodotların fotolüminesans özelliği ve optoelektronik ve biyomedikal alandaki uygulamalarında kilit bir öneme sahiptir [55,163]. Ölçümler sonucunda, CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutunun (R_h), ~1 ila 235 nm arasında değiştiği ancak parçacıkların büyük çoğunluğunun 50 nm'nin altında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7.1).

PEG varlığında sentezlenen CD'lerin, PEG içermeyen formülasyonlara kıyasla partikül boyutlarının daha küçük olduğu görülmüştür (Şekil 7.12). Yüzey modifikasyonunun boyutun küçülmesi üzerindeki bu etkisinin, literatürde yer alan bulgularla uyumlu olduğu belirlenmiştir [164].

Çizelge 7.1 Termal sentez yöntemiyle sentezlenen CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutu ve yüzey zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

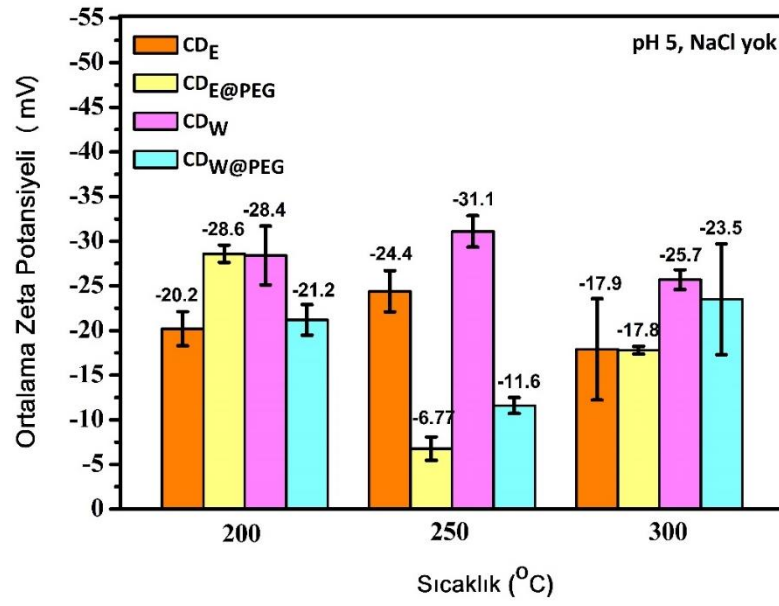
Sentez Ortamının Formülasyonu ve Reaksiyon Koşulları			Hidrodinamik Parçacık Boyutu (R_h) $\pm$ std. sapma (nm)	Yüzey Zeta Potansiyeli (ζ - Pot) $\pm$ std. sapma (mV)	İletkenlik (mS/cm)	Mobilite ($\mu\text{mcm}/$ Vs)
CD_E	200 °C	pH 5	45.95 ± 6.84	-20.2 ± 1.92	0.0242	-1.58
	250 °C		148.85 ± 20.58	-24.4 ± 2.31	0.0239	-1.91
	300 °C		234.87 ± 31.15	-17.9 ± 5.67	0.0115	-1.403
$CD_{E@PEG}$	200 °C		15.88 ± 1.36	-28.6 ± 0.96	0.0256	-2.241
	250 °C		13.70 ± 1.24	-6.77 ± 1.32	0.1670	-0.5304
	300 °C		16.22 ± 1.33	-17.8 ± 0.42	0.0543	-1.392
CD_W	200 °C		3.07 ± 0.44	-28.4 ± 3.29	0.0310	-2.226
	250 °C		31.49 ± 2.23	-31.1 ± 1.75	0.0271	-2.441
	300 °C		22.86 ± 2.22	-25.7 ± 1.11	0.0243	-2.015
$CD_{W@PEG}$	200 °C		2.57 ± 0.35	-21.2 ± 1.72	0.0404	-1.659
	250 °C		1.99 ± 0.19	-11.6 ± 0.90	0.0714	-0.9059
	300 °C		2.05 ± 0.22	-23.5 ± 6.21	0.0499	-1.84
$CD_{E@PEG}$	300 °C	pH 2	32.46 ± 2.30	-14.7 ± 2.95	0.0560	-1.155
		pH 5	16.22 ± 1.33	-17.8 ± 0.42	0.0543	-1.392
		pH 7.4	44.48 ± 2.75	-25.1 ± 4.92	0.0260	-1.967
		pH 11	24.24 ± 1.72	-23.7 ± 1.29	0.0414	-1.863
$CD_{W@PEG}$		pH 2	1.06 ± 0.10	-25.4 ± 4.90	0.0349	-1.99
		pH 5	2.05 ± 0.22	-23.5 ± 6.21	0.0499	-1.84
		pH 7.4	2.40 ± 0.22	-14.4 ± 2.49	0.0319	-1.132
		pH 11	1.69 ± 0.17	-23.6 ± 6.21	0.0411	-1.853
$CD_{E@PEG}$	300 °C pH 5	NaCl yok	16.22 ± 1.33	-17.8 ± 0.42	0.0543	-1.392
		0.2 M NaCl	12.7 ± 1.18	-12.8 ± 2.36	0.1550	-1.005
		0.4 M NaCl	11.98 ± 1.03	-14.8 ± 0.91	0.3200	-1.156
		0.6 M NaCl	11.68 ± 0.95	-9.34 ± 1.67	0.4520	-0.7334
		0.8 M NaCl	75.69 ± 4.99	-6.41 ± 0.70	0.5870	-0.055
		1.0 M NaCl	61.06 ± 5.53	-11.7 ± 1.04	0.7343	-0.9164
$CD_{W@PEG}$	300 °C pH 5	NaCl yok	2.05 ± 0.22	-23.5 ± 6.21	0.0499	-1.84
		0.2 M NaCl	22.04 ± 1.77	-22.2 ± 4.71	0.1430	-1.743
		0.4 M NaCl	44.50 ± 4.43	-28.07 ± 1.44	0.3410	-2.2007
		0.6 M NaCl	3.77 ± 0.53	-11.17 ± 1.33	0.4480	-0.876
		0.8 M NaCl	21.46 ± 1.70	-17.9 ± 2.01	0.6570	-1.404
		1.0 M NaCl	2.3 ± 0.19	-6.33 ± 0.64	0.7350	-0.496



Şekil 7. 12 CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; PEG, karbon kaynağı ve sentez sıcaklığının etkisi

Nerium oleander sulu ekstraktları temelli karbon nanodotların genel olarak etanol ekstresi temelli olanlardan daha küçük boyut olduğu görülmektedir. Örneğin, sulu ekstrenin PEG içeren formülasyonlarından sentezlenen **CD_W@PEG** kodlu parçacığın boyutu 2 nm civarında iken, etanol ekstresi orjinli **CD_E@PEG** isimli parçacığın boyutu 15 nm civarındadır (Şekil 7.12). Bu farkın, ekstraktların bünyesinde yer alan farklı kimyasal bileşenlerin yüzey pasifiye edici ajan olarak davranması ve yüzey gruplarını stabilize etmesi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Termal sentez yönteminin temel prensibi, yüksek sıcaklık ile indüklenen karbon temelli yapıların yoğunlaşması ve grafitik çekirdeğin kristalleşmesidir [165]. Suyun etanolden daha yüksek polarite değerine sahip olması nedeniyle; sulu ekstre, etanol ekstresinden daha fazla sakkarit türevi sahip olabilir. Bu sakkarit türevlerinin termal sentez basamağındaki karbonizasyonunun daha küçük parçacıkların oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir.

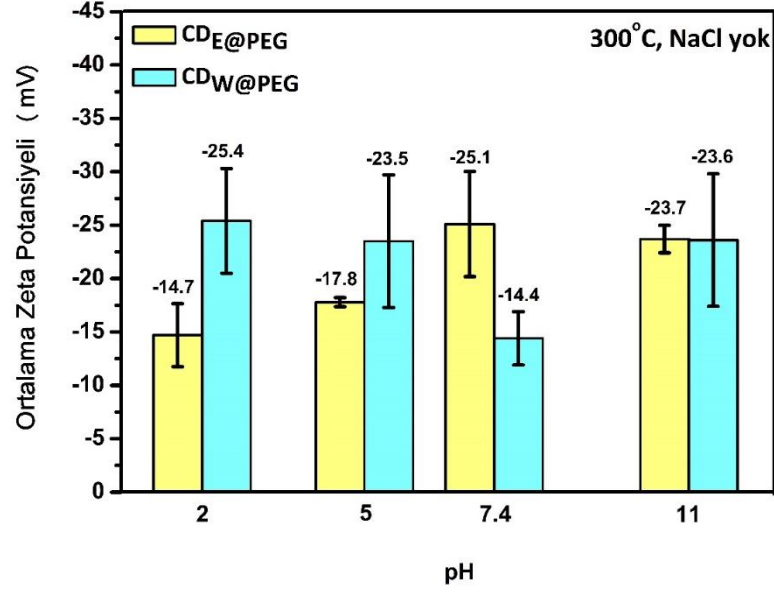
Termal sentez yöntemiyle elde edilen tüm CD'lerin yüzey zeta potansiyellerinin negatif yüklü olduğu belirlenmiş olup karbon kaynağı ve fiziksel koşullardaki değişikliklere bağlı olarak yüzey zeta potansiyeli değerlerinin -6 ile -31 mV arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 7.13-7.15).



Şekil 7. 13 CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; PEG, karbon kaynağı ve sentez sıcaklığının etkisi

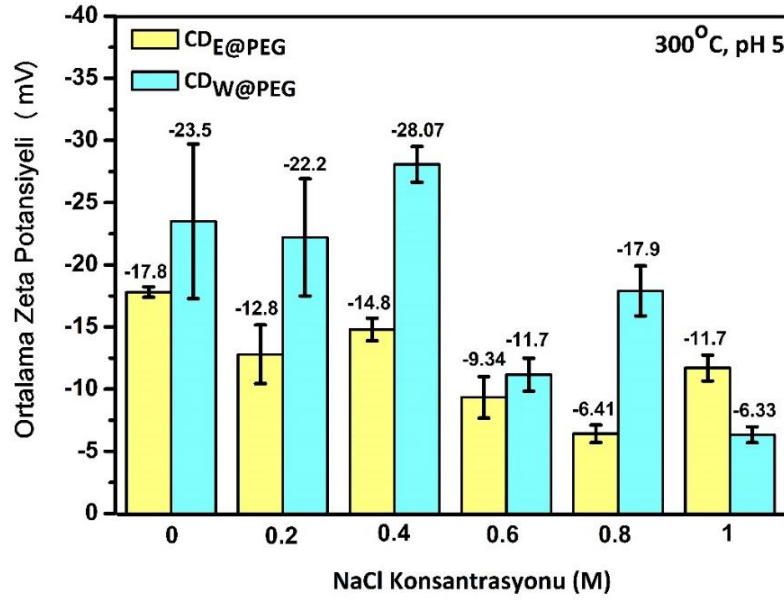
PEG ile modifiye edilmemiş CD'lerin yüzey zeta potansiyeli değerlerinin, sentez sıcaklığının 200 °C'den 250 °C'ye artmasıyla **CD_E** ve **CD_W** için sırasıyla -20.2'den -24.4 mV'a ve -28.4'ten -31.1 mV'a düştüğü görülmektedir. Ancak, PEG ile modifiye edilmiş CD'lerin yüzey zeta potansiyeli değerlerinin, **CD_E** ve **CD_W** için sırasıyla -28.6'dan -6.77 mV'a ve -21.2'den -11.6 mV'a anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Su ekstresi temelli CD'lerin yüzey zeta potansiyellerinin, etanol ekstresinden sentezlenen CD'lere göre daha negatif olduğu görülmüş ve etanol ekstresi temelli CD'lerin yüzey zeta potansiyellerinin genel ortalaması -16.38 mV olarak hesaplanırken, bu değer su ekstresi temelli CD'ler için -21.10 mV olduğu belirlenmiştir.

Farklı pH değerlerindeki reaksiyon ortamında sentezlenen karbon nanodotlardan **CD_{E@PEG}**, pH 7.4'e kadar yüzey zeta potansiyelinde artan bir negativite gösterdiği, ardından yüzey zeta potansiyelinin küçük bir düşüşle sabit kaldığı söylenebilmektedir. **CD_{W@PEG}** için ise yüzey zeta potansiyelinin pH 2, 5 ve 11 için sabit kabul edilebileceği, pH 7.4'te ise -23.5'ten -14.4 mV değerine dikkat çekici bir artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 7.14).



Şekil 7. 14 CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; pH etkisi

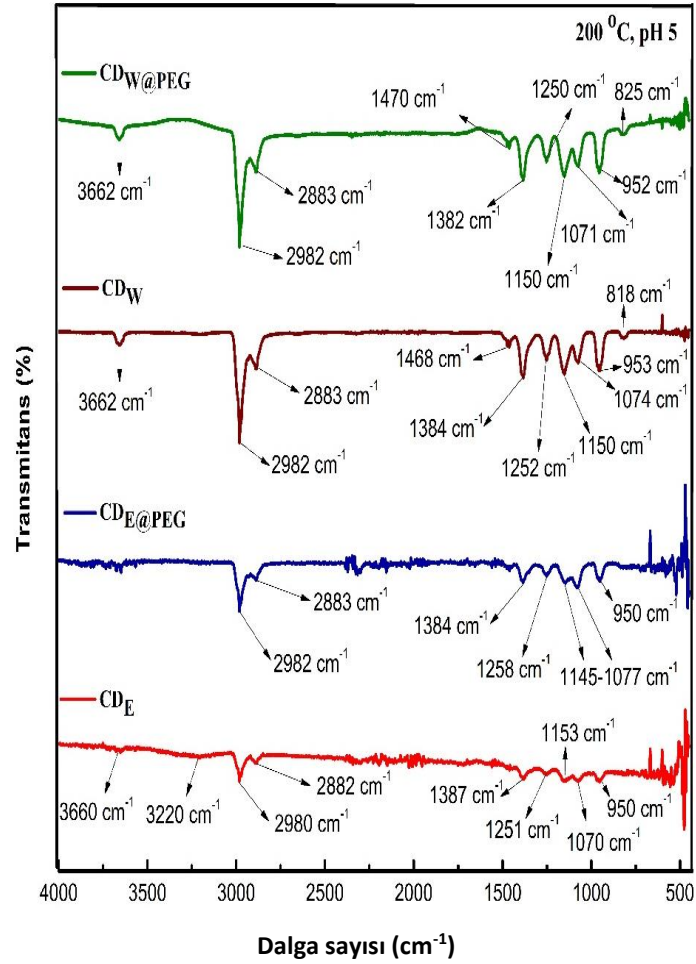
Reaksiyon ortamının iyonik kuvvetinin, CD'lerin yüzey zeta poansiyelleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, **CD_E@PEG** için 0.4 ve 1 M NaCl konsantrasyonları dışında, **CD_W@PEG** için ise 0.4 ve 0.8 M NaCl konsantrasyonları dışında, artan bir profil gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 7.15). Reaksiyon ortamına yüzey pasivasyon ajanı eklenmesinin etkileri incelendiğinde ise, PEG içermeyen CD'lerin, -COOH bakımından zengin olan daha asidik yüzeyin oluşması nedeniyle genel olarak daha negatif yüklü olduğu bulunmuştur. Yüzey PEG ile modifiye edildiğinde, yüzeydeki sallanan bağlar (dangling bonds) stabilize olmakta ve yüzey pasivasyonunun etkisiyle karboksil gruplarının sayısı azalmaktadır [155,164].



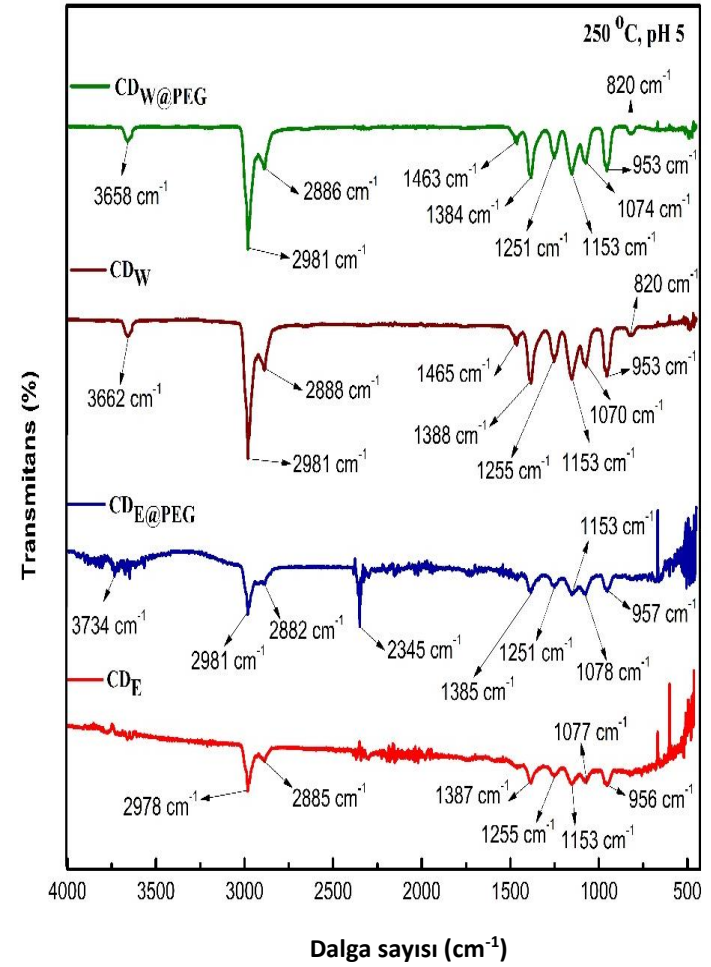
Şekil 7. 15 CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; iyonik kuvvet etkisi

Shaik ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada [166], negatif yüklü nanoparçacıkların, pozitif yüklü olanlara kıyasla, daha az DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, nanoparçacıkların yüzey potansiyelleri, nanoapartiküller ile biyolojik sistemler arasındaki sitotoksiteyi ve biyofizikokimyasal etkileşimleri de etkilemektedir [167,168]. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında rapor edilen, karbon kaynağındaki farklılaşma, yüzey pasivasyon ajanı ilavesi, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon ortamının fiziksel koşullarına bağlı olarak karbon nanoparçacıkların yüzey yüklerindeki meydana gelen değişiklikler, bilimsel literatüre önemli katkı sağlamaktadır.

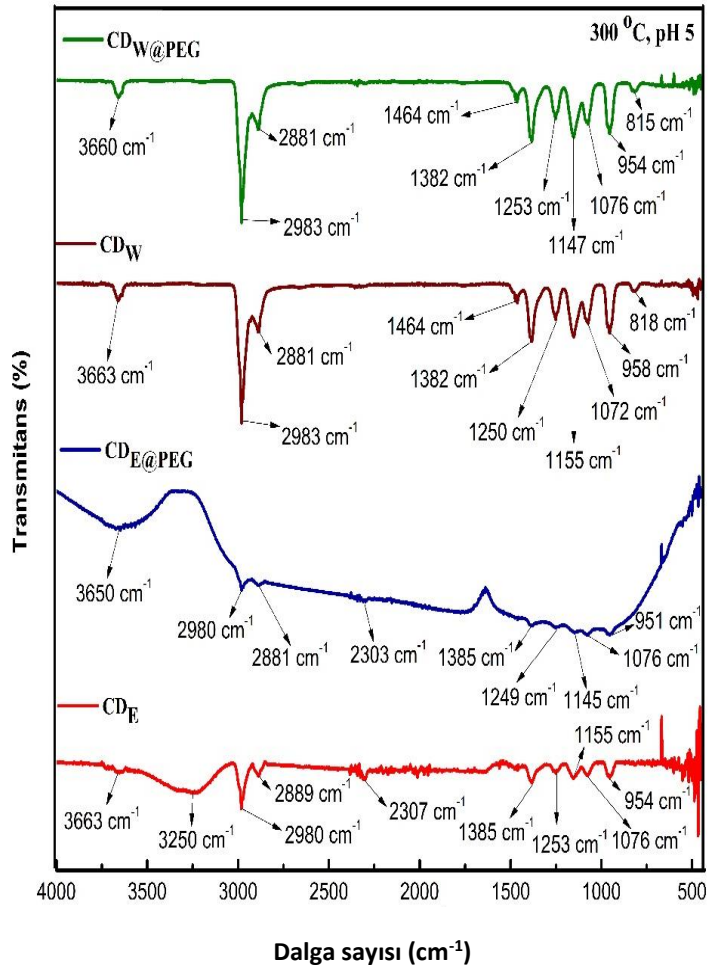
Karbon nanodotların, ekstraksiyon yöntemi ve yüzey modifikasyonuna bağlı olarak yüzey fonksiyonel gruplarında meydana gelen değişimler FT-IR spektrumları ile takip edilmiştir. Parçacıkların FT-IR spektrumlarının genel profilinin, PEG içeren ve içermeyen formülasyonlar ve farklı ekstrelerden sentezlenen CD'ler için benzer olduğu, sadece piklerin yerleşiminde ve/veya piklerin şiddetinde bazı değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.16-7.18). Örneğin; pH 5'de sentezlenen tüm CD'lerin her sentez sıcaklığında, 2880 ve 2980 cm⁻¹ civarında C-H gerilme (stretching) bantları gösterdiği, **CD_W** ve **CD_W@PEG** için bu piklerin etanol ekstresi temelli CD'lere göre daha keskin olduğu görülmektedir [61,62,169]. Yüzey fonksiyonel grupların detaylı analizi, Bölüm 7.1.2 ve 7.1.3'te yer almaktadır.



Sekil 7.16 Termal sentez yöntemiyle 200 °C’de sentezlenen CD’lerin FT-IR spektrumları



Sekil 7.17 Termal sentez yöntemiyle 250 °C’de sentezlenen CD’lerin FT-IR spektrumları



Şekil 7. 18 Termal sentez yöntemiyle 300 °C’de sentezlenen CD’lerin FT-IR spektrumları. Farklı karbon kaynaklarından (Oleander yapraklarının etanol veya su ekstraktları), yüzey pasivasyon ajanı içeren veya içermeyen sentez ortamları kullanılarak termal yöntem ile sentezlenen karbon nanodotların karakterizasyon çalışmalarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde; parçacıkların floresan özellikleri ve boyutları dikkate alınarak, tezin ilerleyen basamaklarına her bir karbon kaynağından sentezlenen ve PEG içeren formülasyonlarla hazırlanan parçacıklarla devam edilmesine karar verilmiştir.

7.1.2 Sentez Sıcaklığının Etkisi

PEG içeren formülasyonlardan sentezlenen karbon nanodotlardan hepsi floresan özellik gösterirken, sadece 200 °C’de sentezlenen parçacıkların floresan ışımaya vermediği belirlenmiştir. Düşük sentez sıcaklıklarında karbonizasyon oranının, karbon kuantum dotların yüzey pasivasyonu için yetersiz olabileceği ve floresan özellik göstermeyen parçacıkların sentezine neden olabileceği rapor edilmiştir [170]. 200 °C’de sentezlenen

CD'lerin floresan özellik göstermiyor olması bu şekilde açıklanabilmektedir. Artan sentez sıcaklıkları ile CD'lerin floresan şiddetinde artış gözlenirken, 250 °C'de sentezlenen CD'lerin beklenmedik floresan davranışının küçük parçacıkların kümeleşmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 7.5) [170].

Reaksiyon sıcaklığının CD oluşumu üzerindeki etkileri Şekil 7.8'den takip edilebilmektedir. 230 nm ve 290 nm civarındaki şiddetli absorpsiyon pikleri, bağlı olmayan elektronların $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri ile ilişkilendirilebilir [153]. PEG içeren formülasyonlardan sentezlenen CD'lerde, 370 nm civarında gözlenen absorbans artışlarının, yüzey enerji seviyelerinin artması ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir [162].

CD'lerin boyutları, yüzey yükleri ve sentez sıcaklığı arasında açık bir korelasyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte, sentez sıcaklığının CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutları ve yüzey zeta potansiyelleri üzerindeki etkileri sırasıyla Şekil 7.12 ve Şekil 7.13'ten takip edilebilmektedir.

Karbon nanodotların Şekil 7.16-7.18'de yer alan FT-IR spektrumlarına göre, tüm sentez sıcaklıklarında karbon nanodotlar; sırasıyla, keskin bir pik halinde 3000 cm^{-1} civarında ve 1400 cm^{-1} civarında $-\text{CH}_3$ ve $-\text{CH}_2$ gerilme ve eğilme titreşimleri göstermiştir [62]. Reaksiyon sıcaklığının, Oleander sulu ekstraktlarının karbon kaynağı olarak kullanılması ile sentezlenen CD'lerin (**CD_W** ve **CD_{W@PEG}**) yüzey fonksiyonelleştirmesi üzerinde anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir. Diğer yandan, etanol ekstresi temelli CD'lerin (**CD_E** ve **CD_{E@PEG}**) FT-IR spektrumları 250 ve 250 °C sentez sıcaklıklarında birbiriyle benzer iken, 300 °C'de yüzeyde belirgin bir değişiklik gözlenmiştir (Şekil 7.16-7.18). **CD_W**, **CD_{W@PEG}**, **CD_{E@PEG}** için farklı reaksiyon sıcaklıklarında, 3660 cm^{-1} civarında O-H/N-H gerilme bantları belirlenmiş ve 300 °C'de sentezlenmiş **CD_E** için 3200 cm^{-1} civarında H bağlı $-\text{OH}$ gerilmeleri gözlenmiştir (Şekil 7.16-7.18) [29,61,161,169,171–174].

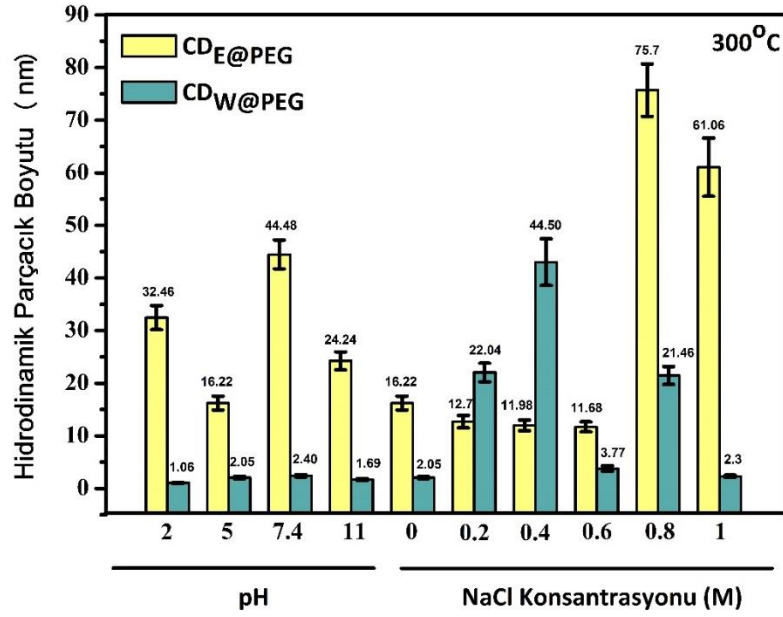
Karakterizasyon çalışmaları neticesinde elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, 300° C'de sentezlenen CD'lerin daha küçük boyutlu ve yüksek floresan özellik gösteren nitelikte olmaları nedeniyle çalışmanın ilerleyen kısımlarına bu sentez koşullarında sentezlenecek parçacıklar ile devam edilmesine karar verilmiştir.

7.1.3 Sentez Ortamının pH ve İyonik Kuvvetinin Etkisi

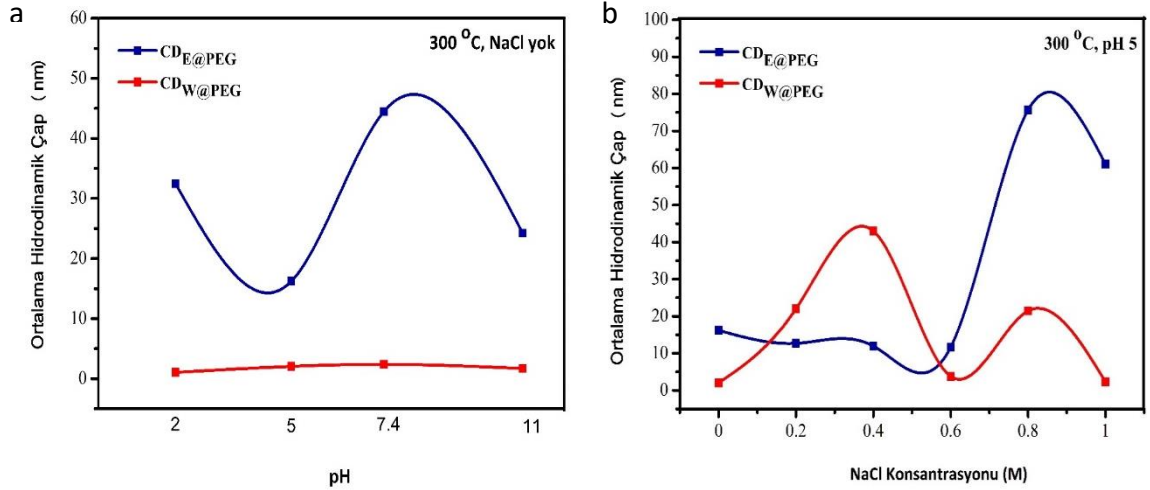
Reaksiyon ortamının pH'ının sentezlenen karbon nanodotların fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri pH 2 ile pH 11 aralığında incelenmiştir. Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvet gibi fiziksel özelliklerindeki değişikliklerin, CD'lerin floresan şiddeti değerlerinde değişikliğe neden olduğu Şekil 7.6 ve 7.7'de açıkça gözlenmektedir. Goncalves ve ark. [71], lazer ablasyonu yöntemi ile sentezledikleri karbon nanoparçacıkların fonksiyonelleştirilmesinde merkaptosüksinik asit kullanımı gibi farklı bir prosedür uygulamış olsalar da, söz konusu çalışmada elde edilen pH değişiminin karbon nanoparçacıkların floresan özelliği üzerindeki etkilerine dair sonuçların, bu tez kapsamında farklı pH değerlerinde sentezlenen karbon nanodotlarda gözlenen değişikliklerle uyumlu olduğu görülmektedir. Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvetindeki değişimlere bağlı olarak en yüksek floresan şiddetleri, $CD_{E@PEG}$ ve $CD_{W@PEG}$ için sırasıyla; pH 5 ve 2'de ve NaCl içermeyen ve 0.4 M NaCl içeren reaksiyon ortamlarından sentezlenen parçacıklardan elde edilmiştir.

Karbon nanodotların pH değişimine bağlı olarak absorbans spektrumlarında meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde, $CD_{E@PEG}$ için pH 5 ve 11'de absorbans değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.9a). Benzer şekilde, $CD_{W@PEG}$ için pH 5 ve 7.4'te absorbans değerlerinin diğer koşullarda sentezlenen parçacıklardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.9b). 370 nm civarındaki bu artışın CD'lerin yüzey enerji seviyelerindeki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [162]. İyonik kuvvet ile absorbans arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamasına rağmen (Şekil 7.10), pH'ın absorbans üzerindeki etkisi Şekil 7.9'da açıkça görülmektedir.

Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvetindeki değişimlerin karbon nanodotların ortalama boyutları üzerindeki etkileri incelendiğinde, söz konusu parametreler ile CD'lerin boyutları arasında anlamlı bir korelasyon belirlenememiştir. Ancak, reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvetine bağlı olarak, parçacık boyutundaki dağılım Şekil 7.19 ve Şekil 7.20'den takip edilebilmektedir.



Şekil 7. 19 Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvetine bağlı olarak CD boyutları

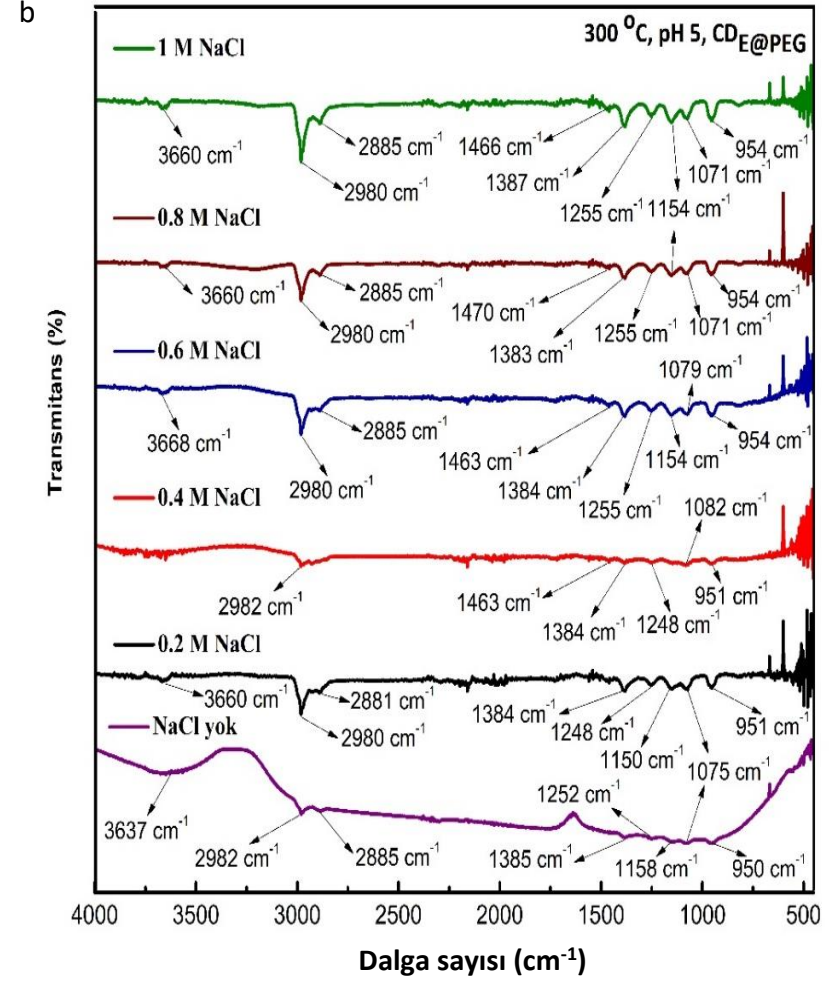
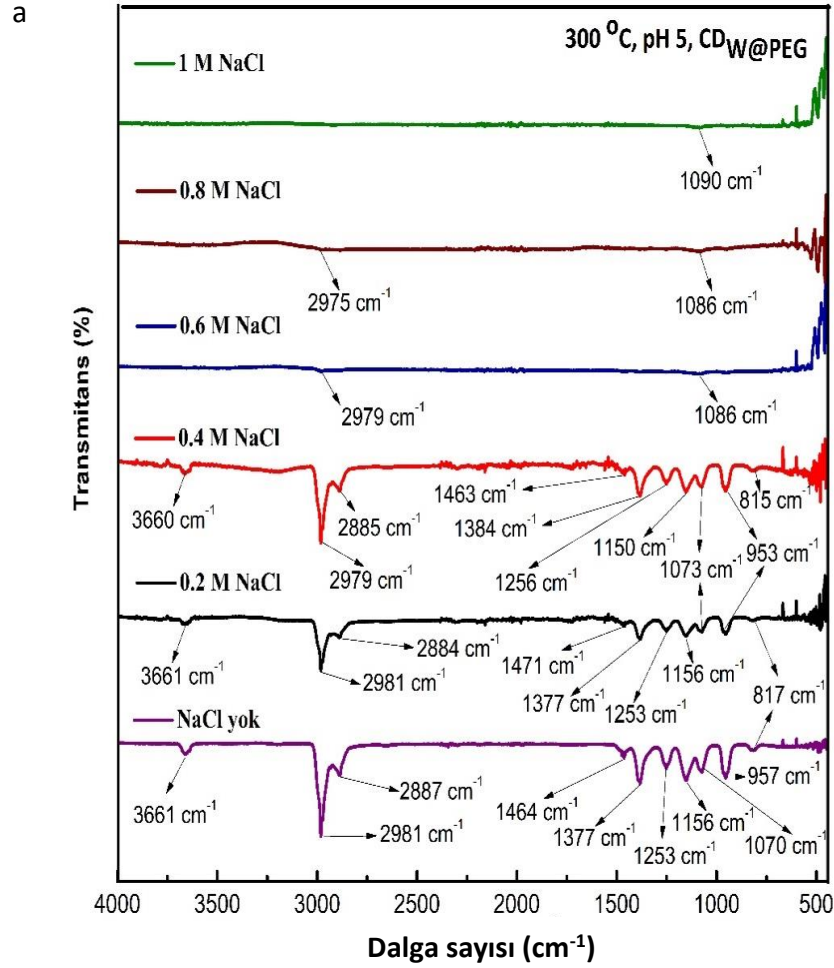


Şekil 7. 20 Reaksiyon ortamının pH ve iyonik kuvvet değişimine bağlı olarak CD'lerin boyut değişimleri

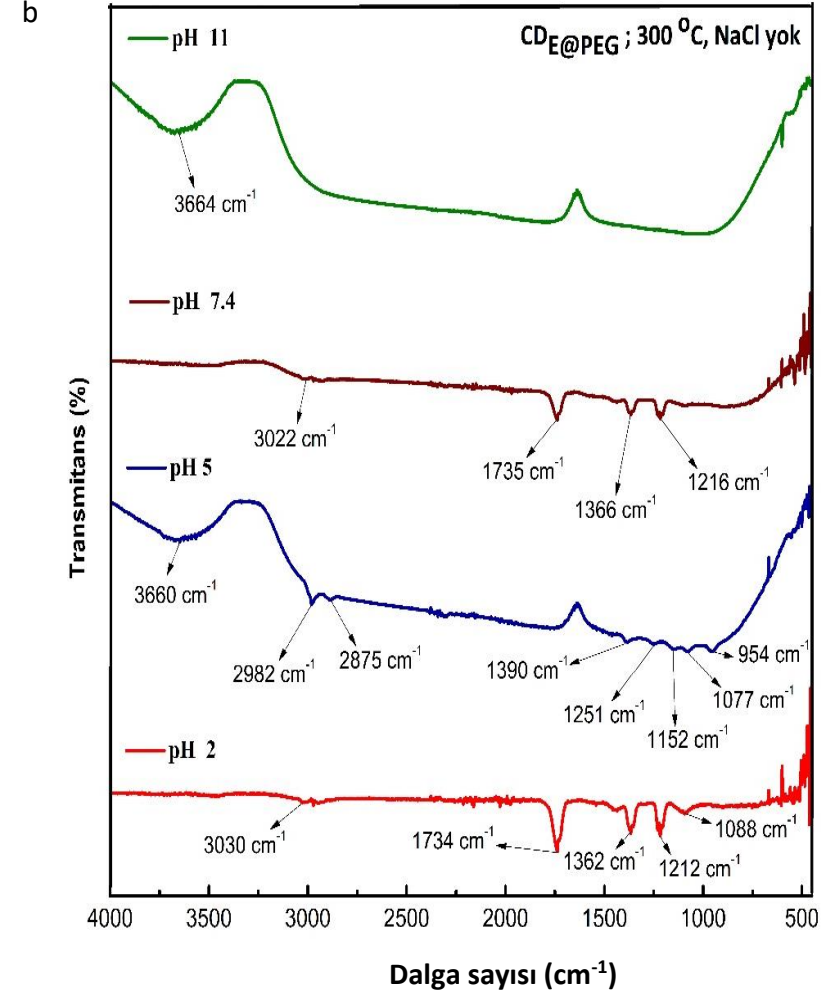
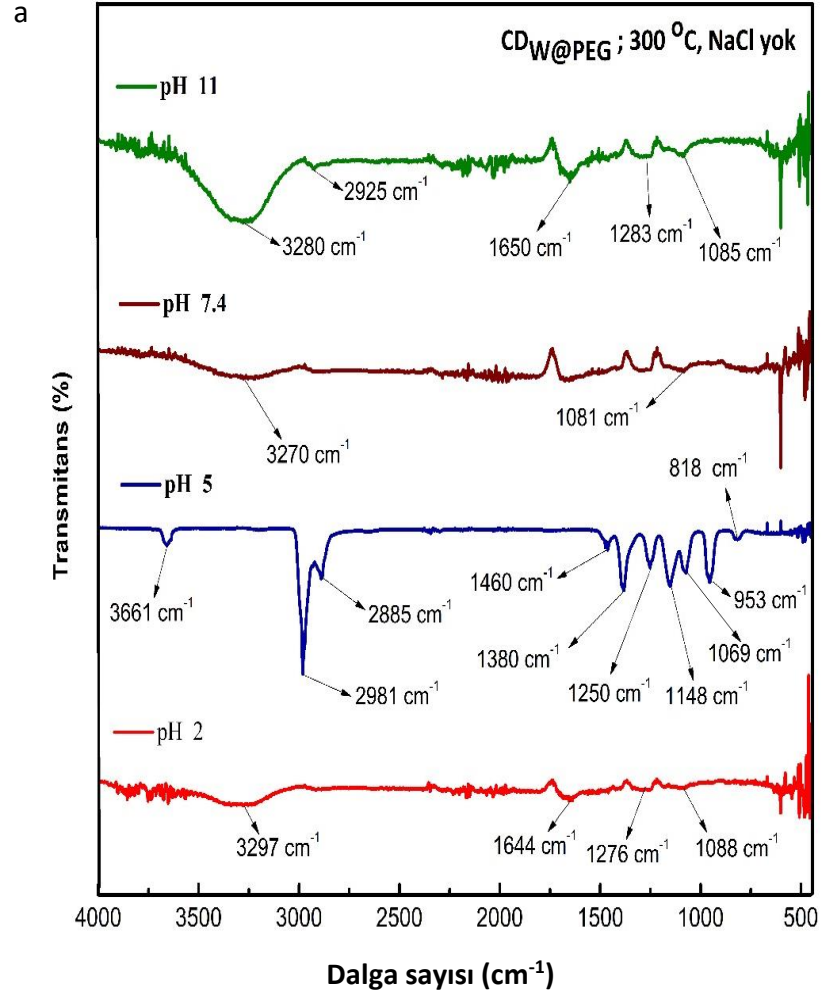
Sentez ortamının iyonik kuvvetindeki değişime bağlı olarak; **CD_W@PEG** için 0.6 M NaCl'den 1 M NaCl'ye kadar olan NaCl konsantrasyonlarında sentezlenen CD'lerde alifatik C-H bantlarının kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 7.21). Değişen pH ve iyonik kuvvet değerlerinde sentezlenen karbon nanodotların FT-IR spektrumlarında gözlenen; 1070, 1150, 1250 ve 1370 cm⁻¹ civarındaki gerilme bantları, asimetrik oksijen köprüleri ve C-O titreşimler ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 7.21, 7.22) [23,61,173–177].

CD_{E@PEG} için pH 2 ve 7.4'te, ~1735, ~1215 ve ~1360 cm⁻¹'de sırasıyla, C=O gerilme, C-C gerilme ve C-H eğilme bantları tespit edilmiştir [29,178]. pH 5 ve 11'de ise, C=O bantı kaybolurken, ~3660 cm⁻¹'de O-H/N-H gerilme bandı meydana gelmiştir. Ayrıca pH 5'de, 1000-1300 cm⁻¹ arasında C-O gerilme, 2875 ve 2982 cm⁻¹'de C-H gerilme bantları gözlenirken, aynı formülasyonun pH 11'de sentezlenen versiyonunda bu bantların ortadan kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 7.22) [171,172].

CD_{W@PEG} için pH 2, 7.4 ve 11'de sentezlenen parçacıkların FT-IR profilleri birbirine benzerken, pH 5'te yüzey fonksiyonel gruplarında çarpıcı bir değişiklik gözlenmiştir (Şekil 7.22). pH 5'te sentezlenen **CD_{W@PEG}**'de 3661 cm⁻¹, 2891-2885 cm⁻¹, ve 1070-1380 cm⁻¹ civarında sırasıyla O-H/N-H, C-H, C-O gerilme bantları gözlenmiştir. Diğer pH değerlerinde sentezlenen **CD_{W@PEG}**'lerde ise 3280 cm⁻¹ civarında yayvan H bağlı –OH gerilmeleri ve 1080-1280 cm⁻¹ aralığında C-O gerilmelerinde zayıflamalar belirlenmiştir. pH 2 ve 11 için, ~1645 cm⁻¹'de gözlenen C=C eğilme bandı ile UV-Vis spektrumlarında 260 nm civarında π - π^* geçişleri ile ilişkilendirilen pikler bir arada değerlendirildiğinde; CD'lerdeki aromatik yapılarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Şekil 7.9, 7.22) [171,176]. Bu nedenle, CD'lerin bünyesinde aromatik yapıların varlığının söz konusu olabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 7. 21 Termal sentez yöntemiyle farklı iyonik kuvvet değerlerinde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları;
a. Su ekstresi temelli CD'ler, b. Etanol ekstresi temelli CD'ler



Şekil 7. 22 Termal sentez yöntemiyle farklı pH değerlerinde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları;
a. Su ekstresi temelli CD'ler, b. Etanol ekstresi temelli CD'ler

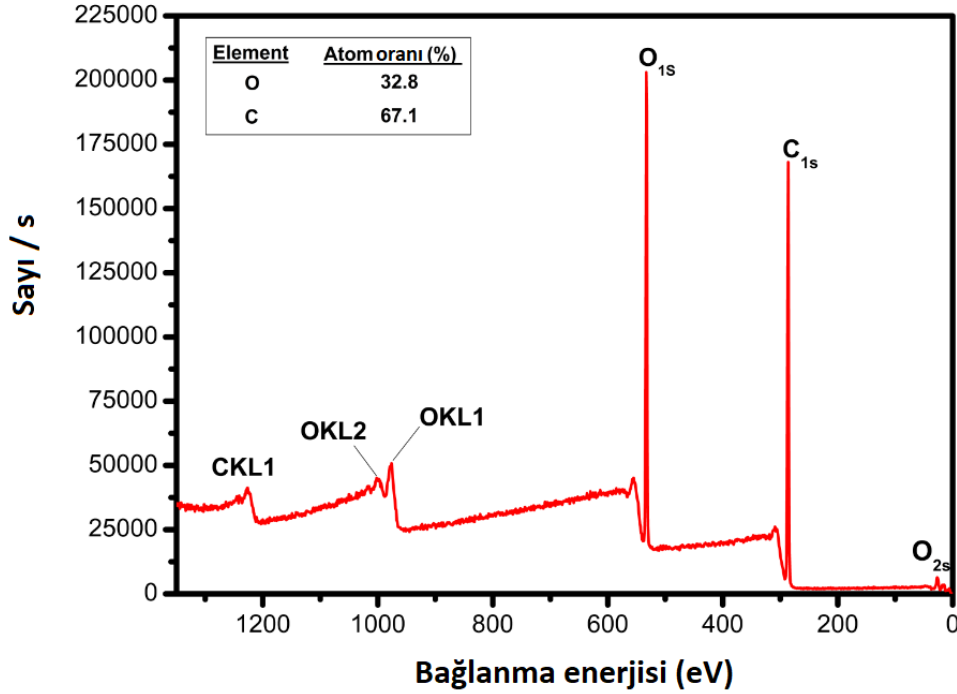
Reaksiyon ortamının iyonik kuvvetindeki değişimin karbon nanodotlar üzerindeki etkileri incelenirken, 0.2 M-1 M NaCl aralığında NaCl içeren formülasyonlardan sentezlenen **CD_{E@PEG}**'lerin FT-IR profillerinin birbirine benzer olduğu bulunmuştur (Şekil 7.21). 0.2 M ile 1 M NaCl arasında NaCl içeren reaksiyon ortamlarından sentezlenen **CD_{E@PEG}**'lerde, 1000-1400 cm⁻¹'de C-O gerilme, 2980-2880 cm⁻¹ aralığında C-H gerilme, 3660 cm⁻¹'de O-H/N-H gerilme bantları gözlenmiştir. Ancak, **CD_{E@PEG}**'lerin NaCl içermeyen reaksiyon ortamından sentezlenen örneklerinde, FT-IR profilinde ufak tefek farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu parçacıklarda, 1000-1400 cm⁻¹ aralığında C-O gerilme ve 2980-2880 cm⁻¹ civarında C-H gerilme bantlarının diğer formülasyonlardan sentezlenen **CD_{E@PEG}**'lere göre daha zayıf olduğu, 3637 cm⁻¹'de ise diğer formülasyonlarda gözlenenden daha yayvan bir O-H/N-H bandına sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 7.21). **CD_{W@PEG}**'ler için ise sentez ortamlarında 0.6 molar kadar NaCl içeren karbon nanodotlarda, O-H/N-H, ve C-H gerilmeleri sırasıyla ~3660 cm⁻¹ ve ~2980-2880 cm⁻¹'de gözlenmiştir. Buna karşın, daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında sentezlenen **CD_{W@PEG}**'lere ait FT-IR spektrumlarında, neredeyse bütün bantların kaybolduğu ya da önemli derecede zayıfladığı belirlenmiş ve parçacıkların kızılötesi inaktif (IR inaktif) olarak tanımlanabileceği görölmüştür. Bu durumun, kutupsal (polar) bağlar ya da elektriksel dipol momenti sıfır olan asimetrik moleküller ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 7.21) [176].

Farklı pH değerlerinde sentezlenen karbon nanodotların karakterizasyon çalışmalarından elde edilen veriler neticesinde, pH 5'te sentezlenen CD'lerin daha küçük boyutlu olduğu belirlenmiş ve bu nedenle reaksiyon ortamının iyonik kuvvetinin etkisinin incelenmesine dair çalışmalar pH 5'te gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, daha küçük boyutlu parçacıkların NaCl içermeyen reaksiyon ortamlarından elde edildiği belirlenmiştir.

7.1.4 *In Vitro* Sitotoksosite ve Genotoksosite Çalışmaları Yürütölen CD'nin İleri Yapısal Analizi

In vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi için seçilen **CD_{W@PEG}** kodlu, 300 °C, pH 5 ve NaCl içermeyen koşullarda sentezlenen karbon nanodotların bileşiminin ileri araştırması için parçacıkların X-ışını fotoelektron spektroskopisi geniş tarama spektrumu

ölçülmüştür. Şekil 7.23'te 283.6 eV ve 538.2 eV'de görülen ve sırasıyla oksijen ve karbona atfedilen iki güçlü pik, CD'lerin tamamen C=C çekirdeği ve –OH bakımından zengin, yüksek oranda oksijenlenmiş yüzeyden oluştuğunu göstermektedir [179,180].



Şekil 7. 23 CD_W@PEG'in XPS spektrumu

7.2 Mikrodalga/Mikrodalga Destekli Yöntemle CD Sentezi

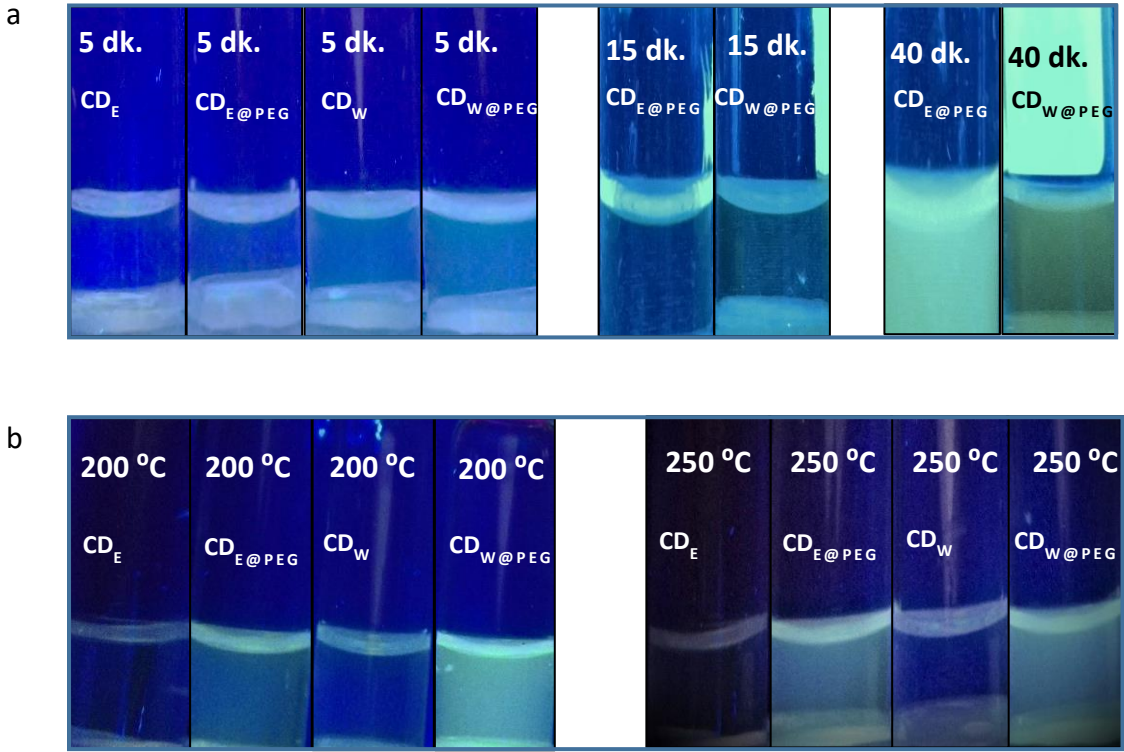
Mikrodalga/mikrodalga destekli yöntemle karbon nanodot sentezi çalışmaları esnasında, mikrodalga sentez yönteminin, ekstre temelli olarak karbon kaynağının, yüzey modifiye edici ajan varlığının ve sentez koşullarının (sentez süresi veya sentez sıcaklığı) elde edilen karbon nanodotların fiziksel ve kimyasal karakteristikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

7.2.1 CD'lerin Floresan Özellikleri Üzerindeki Etkiler

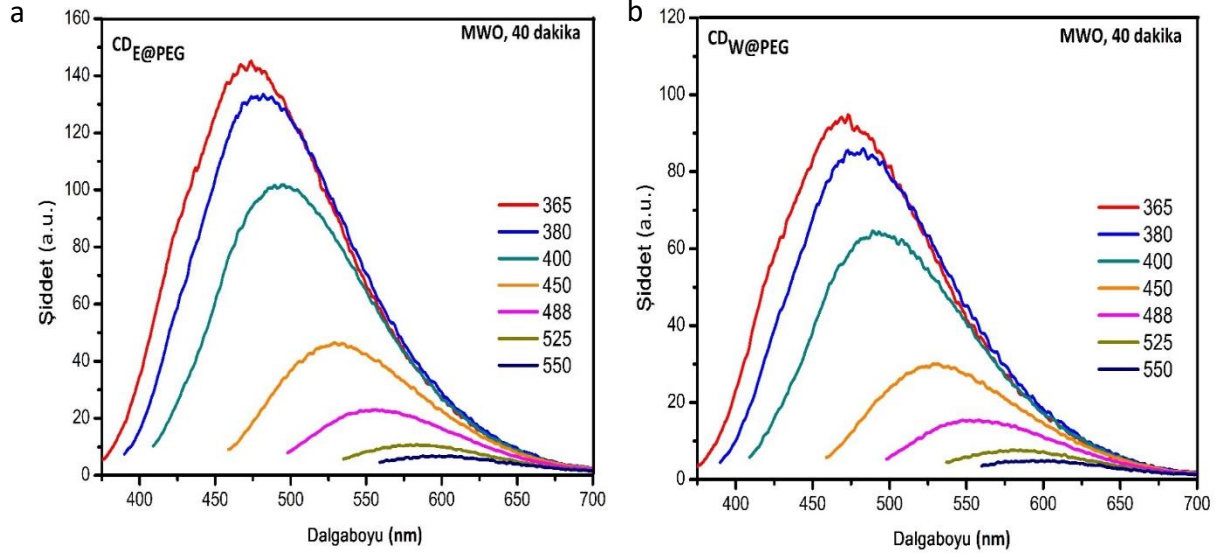
Sentezlenen karbon nanodotların floresan özellikleri öncelikli olarak 365 nm UV ışık altında gözlenmiş olup (Şekil 7.24), floresan ışıma veren parçacıkların fotolüminesan özelliklerinin detaylı olarak incelemesi için floresan spektrofotometresi kullanılmıştır. Bu doğrultuda, parçacıkların floresan ışımaları (emisyon), 365-550 nm aralığında çeşitli uyarım (eksitasyon) değerlerinde incelenmiştir. Genel olarak daha yüksek şiddeteki

ışılma değeri 365 nm eksitasyonda elde edildiği belirlenmiş ve ilerleyen aşamalarda bu uyarım değerinde çalışılmıştır (şekil 7.25, 7.26).

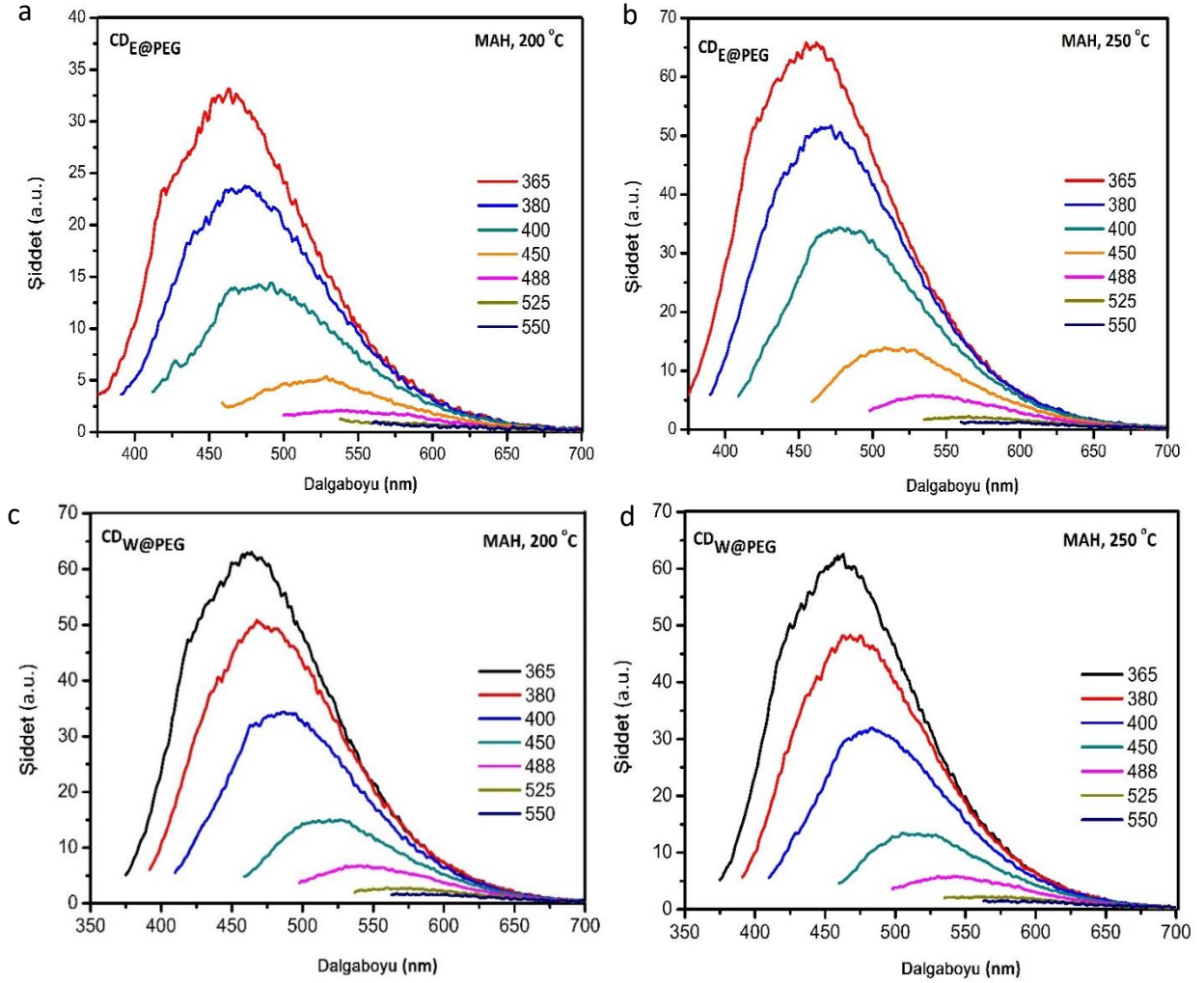
Polietilen glikolün yüzey pasivasyon ajanı olarak fotolüminesans arttırıcı etkisi, PEG içeren formülasyonlardan sentezlenen CD'lerin daha yüksek floresan ışması verdiğinin açıkça gözlenmesi ile doğrulanmıştır (şekil 7.27) [155,164,181,182].



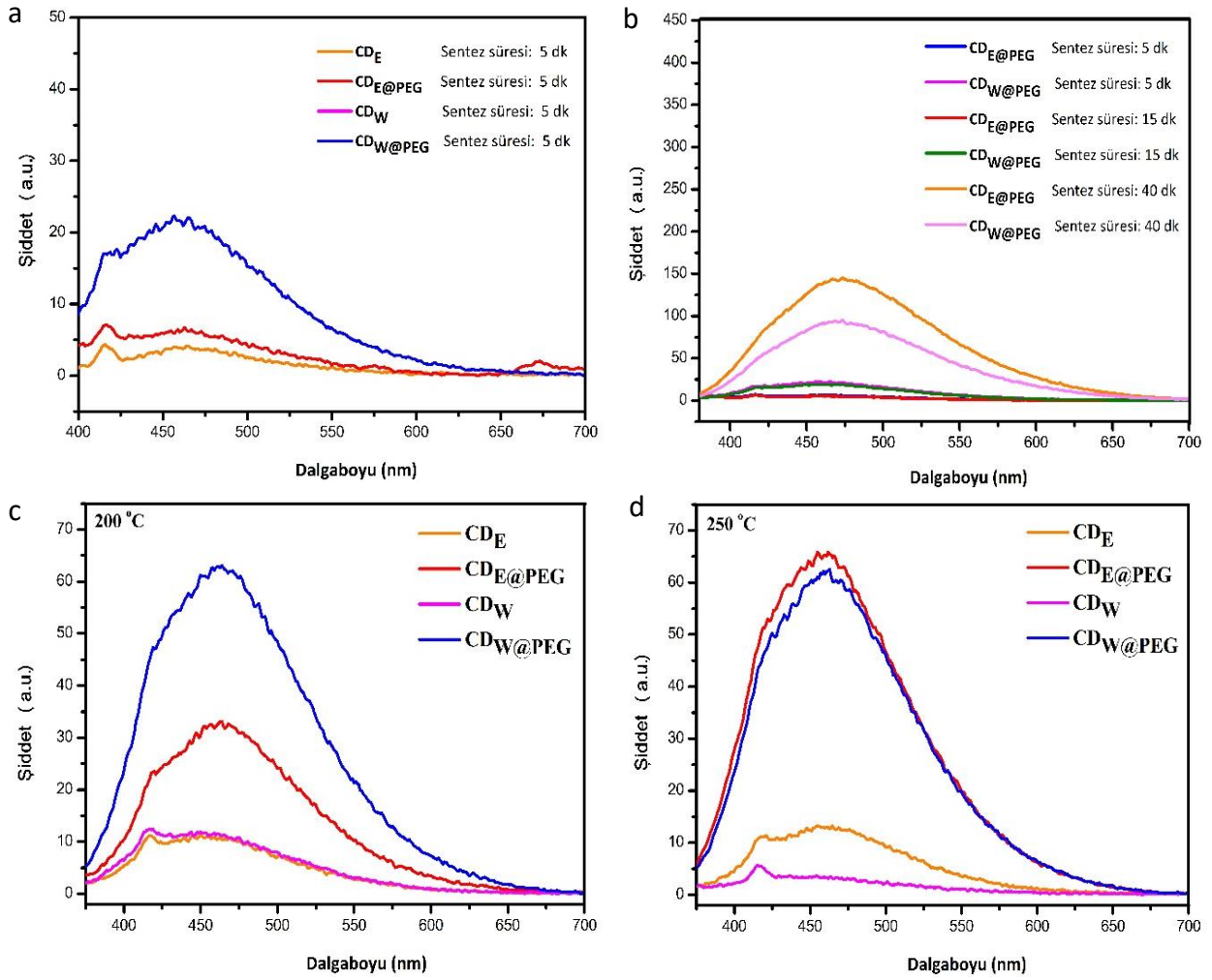
şekil 7. 24 Mikrodalga yöntemi ile sentezlenen CD'lerin 365 nm UV ışık altındaki floresan ışımları; a. Ev tipi mikrodalga fırında sentezlenen CD'ler, b. Mikrodalga destekli hidrotermal yöntem ile sentezlenen CD'ler



Şekil 7. 25 Ev tipi mikrodalga fırın ile sentezlenen ve farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları



Şekil 7. 26 Mikrodalga sentez cihazı ile sentezlenen ve farklı dalga boylarında uyarılan CD'lerin floresan spektrumları



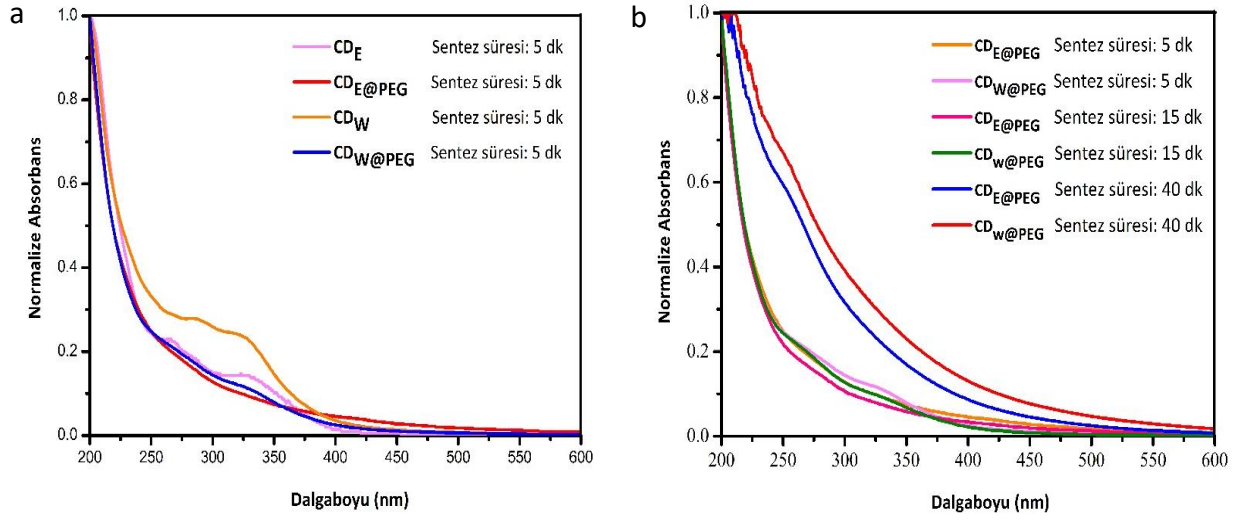
Şekil 7. 27 MWO ve MAH ile farklı koşullarda sentezlenen CD'lerin floresan spektrumları; a, b. MWO yöntemi, c, d. MAH yöntemi

Kullanılan sentez yönteminin CD'lerin fotolüminesansı üzerindeki etkisi incelendiğinde, ev tipi mikrodalga fırın kullanılarak, 40 dakikada sentezlenen **CDE@PEG** ve **CDW@PEG** kodlu parçacıkların fotolüminesanslarının en yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.27b). Ayrıca, 365 nm UV ışığı altında sergiledikleri floresan renklerine uygun olarak, mikrodalga fırında 40 dakika süre ile sentezlenen **CDE@PEG** ve **CDW@PEG**'in maksimum emisyon pikinin kırmızıya kaydığı görülmüştür (Şekil 7.25, 7.27b). MWO yöntemi ile daha kısa sentez sürelerinde sentezlenen CD'lerde fotolüminesans elde edilmemiş ve sentez süresinin CD'lerin floresan özelliği üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.25, 7.27a, 7.27b). Bu floresan özellik göstermeme durumunun, karbon nanodotların yüzey pasivasyonu için yetersiz karbonlaşma oranı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [170].

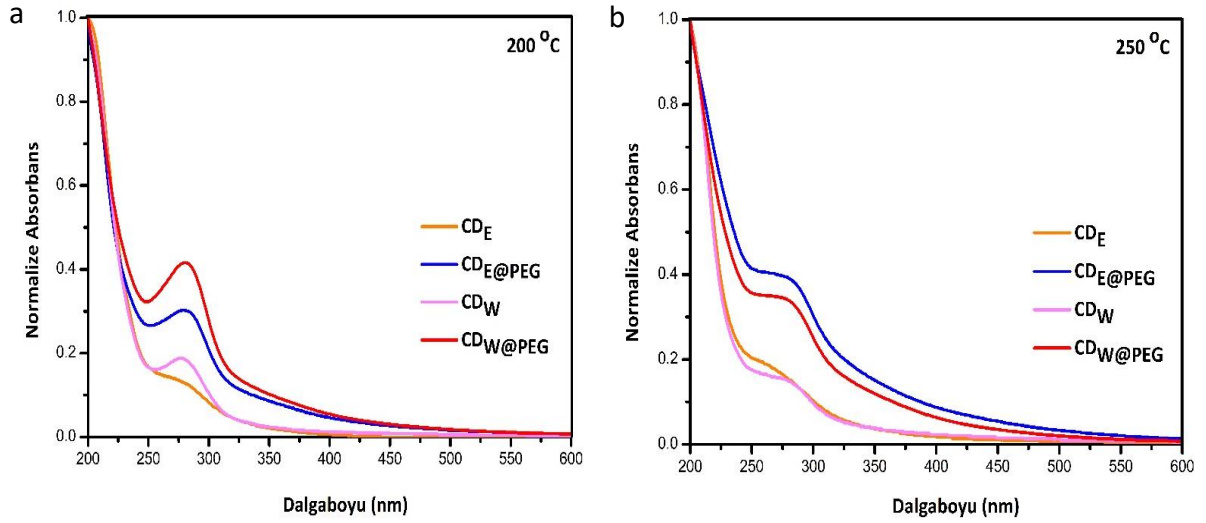
Mikrodalga destekli hidrotermal yöntem ile sentezlenen CD'ler için en yüksek fotolüminesans değerleri 250 °C'de 15 dakika boyunca sentezlenen parçacıklardan elde edilmiştir (Şekil 7.27d). 200 ve 250 °C'de sentezlenen **CD_{W@PEG}**'in fotolüminesansı birbirine benzemekte iken, 250 °C'de sentezlenen **CD_{W@PEG}**'in fotolüminesans değerinde 200 °C'de sentezlenene göre ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.27c, 7.27d). Bu durumda, etanol ekstresinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı CD'ler için PEG'in 200 °C'de karbonizasyon oranının yetersizliği ile açıklanabilmektedir [170]. Sonuç olarak, mikrodalga destekli sistemler, sentezlenen CD'lerin floresan özelliğine göre karşılaştırıldığında, ev tipi mikrodalga fırın ve mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemi arasında belirgin bir fark gözlenmiştir. Ev tipi mikrodalga fırın ile sentezin, CD'lerin fotolüminesansının arttırılması için daha iyi bir seçenek olduğu belirlenmiştir.

7.2.2 CD'lerin UV-Vis Spektrumları Üzerindeki Etkiler

Nanoparçacıkların optik özellikleri UV-Vis spektrofotometri ile araştırılabilmektedir [153]. Karbon nanoparçacıklar, 365 nm'de yayvan bir pik vermektedir [64]. Ayrıca, 300-400 nm arasındaki pikler, C=O fonksiyonel grubunun $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri ile ilişkilendirilebilmektedir [156–158]. 240 ve 300 nm arasındaki piklerin, aromatik ünitelerin $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir [155,183,184]. 240-300 nm ve 300-400 nm arasındaki bu orijinal pikler bütün CD'lerde gözlenmiştir (Şekil 7.28,7.29). ~230 nm ve ~290 nm'de güçlü şekilde absorplanan pikler, bağ yapmamış elektronların $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri ile bağdaştırılmıştır [153]. MWO ile sentezlenen CD'lerde absorptans artışı **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}** için 40 dakika sentez süreli parçacıklarda gözlenirken, aynı durum MAH ile sentezlenen **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}** için her iki sentez sıcaklığında da gözlenmiştir. 370 nm civarındaki bu artışın CD'lerin yüzey enerji seviyelerindeki artış ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir [162].



Şekil 7. 28 MWO yöntemiyle farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin UV-Vis spektrumları; a. 5 dk, b. 15 dk



Şekil 7. 29 MAH yöntemiyle farklı sıcaklıklarda sentezlenen CD'lerin UV-Vis spektrumları; a. 200 °C, b. 250 °C

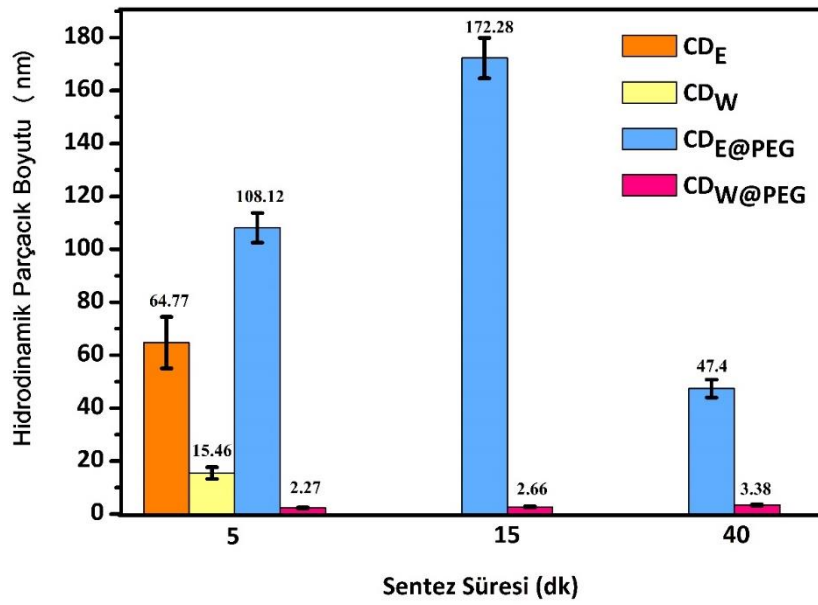
7.2.3 CD'lerin Hidrodinamik Boyut ve Yüzey Zeta Potansiyelleri Üzerindeki Etkiler

Mikrodalga destekli sentez yöntemleri ile farklı koşullarda sentezlenen karbon nanoparçacıkların hidrodinamik parçacık boyutu (R_h) ve yüzey zeta potansiyeli (ζ -Pot) verileri Çizelge 7.2'de sunulmuştur.

Çizelge 7.2 Mikrodalga destekli sentez yöntemleriyle sentezlenen CD'lerin hidrodinamik parçacık boyutu ve yüzey zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

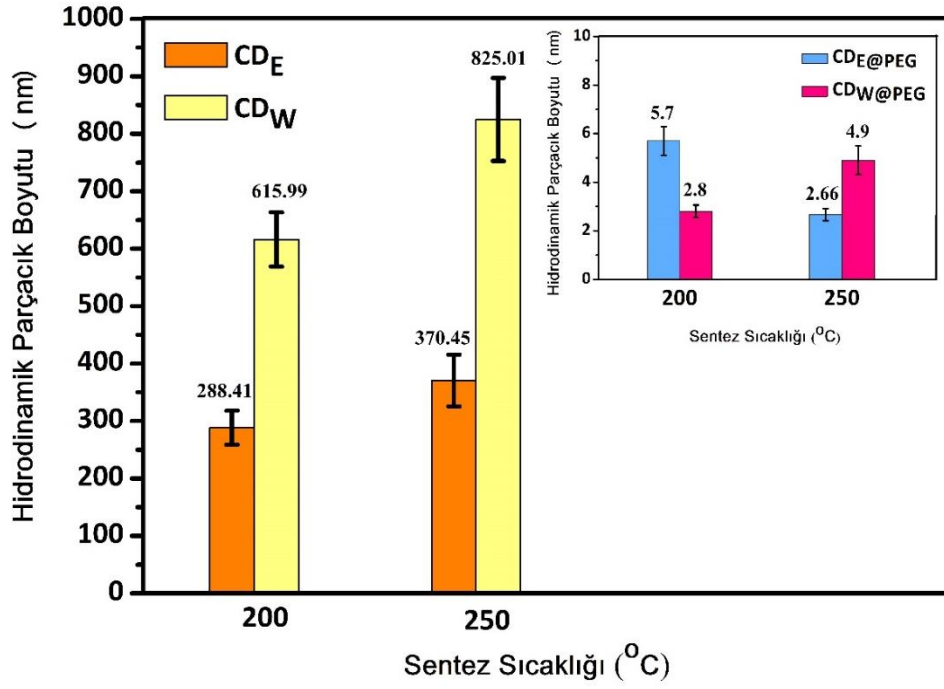
Sentez Yöntemi	Sentez Süresi / Sıcaklığı	Parçacık Kodu	Hidrodinamik Parçacık Boyutu (R_h) $\pm$ std. sapma (nm)	Yüzey Zeta Potansiyeli (ζ -Pot) $\pm$ std. sapma (mV)	İletkenlik (mS/cm)	Mobilite ($\mu\text{mcm/Vs}$)
Ev Tipi Mikrodalga Fırında Sentez	5 dk	CD _E	64.77 $\pm$ 9.735	-28.3 $\pm$ 5.8	0.0112	-2.217
		CD _{E@PEG}	108.12 $\pm$ 5.603	-12.3 $\pm$ 0.473	0.0268	-0.962
		CD _W	15.46 $\pm$ 2.253	-20.6 $\pm$ 6.09	0.0256	-1.611
		CD _{W@PEG}	2.27 $\pm$ 0.226	-14 $\pm$ 3.06	0.0375	-1.099
	15 dk	CD _{E@PEG}	172.28 $\pm$ 7.651	-16.1 $\pm$ 1.153	0.0234	-1.2637
		CD _{W@PEG}	2.66 $\pm$ 0.227	-22.37 $\pm$ 1.358	0.0338	-1.752
	40 dk	CD _{E@PEG}	47.4 $\pm$ 3.39	-11.4 $\pm$ 3.2	0.0023	-0.8936
		CD _{W@PEG}	3.38 $\pm$ 0.338	-16.7 $\pm$ 4.63	0.0342	-1.307
Mikrodalga Destekli Hidrotermal Sentez Cihazında Sentez	200 °C	CD _E	288.41 $\pm$ 29.64	-11 $\pm$ 2.32	0.0864	-0.8656
		CD _{E@PEG}	5.7 $\pm$ 0.587	-13.4 $\pm$ 1.04	0.0622	-1.053
		CD _W	615.99 $\pm$ 47.22	-14.8 $\pm$ 3.04	0.101	-1.163
		CD _{W@PEG}	2.8 $\pm$ 0.256	-14.63 $\pm$ 3.5	0.0909	-1.146
	250 °C	CD _E	370.45 $\pm$ 45.12	-8.9 $\pm$ 1.598	0.033	-0.698
		CD _{E@PEG}	2.66 $\pm$ 0.25	-9.67 $\pm$ 0.749	0.0984	-0.7567
		CD _W	825.01 $\pm$ 72.13	-13.87 $\pm$ 1.168	0.0466	-1.087
		CD _{W@PEG}	4.9 $\pm$ 0.589	-8.48 $\pm$ 2.185	0.0875	-0.664

MWO yöntemi ile sentezlenen karbon nanoparçacıkların büyük çoğunluğunun hidrodinamik parçacık boyutunun 100 nm'den küçük olduğu, su ekstresi temelli CD'lerin 2.27 ± 0.226 nm ile en küçük boyuta sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.30). Bu durumun su ekstresinin kimyasal bileşimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Her iki çözücünün polarite farklılığından ötürü suda çözünür polisakkarit ve/veya türevlerinin su ekstresinde etanol ekstresine kıyasla daha fazla olması beklenmektedir. Ayrıca, polisakkaritlerin varlığının, yüzey pasivasyonunu arttırması ve daha küçük parçacıkların oluşumuna neden olmasının söz konusu olabileceği düşünülmektedir.



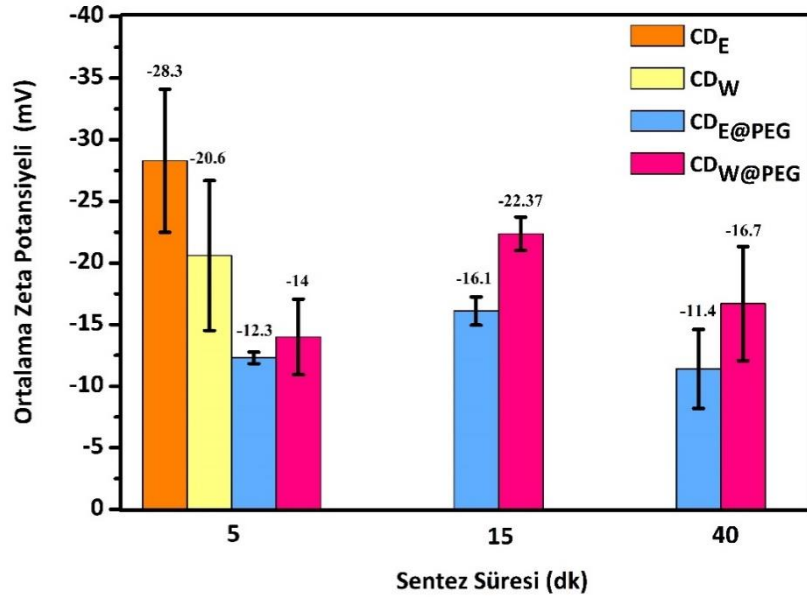
Şekil 7. 30 CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; Ev tipi mikrodalga fırında sentez, sentez süresinin etkisi

Mikrodalga destekli hidrotermal sentez cihazı ile sentezlenen karbon nanodotların hidrodinamik parçacık boyutunun 2.66 ila 825 nm aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.31). Veriler değerlendirildiğinde, reaksiyon ortamındaki PEG varlığının parçacık boyutu üzerindeki etkisi açıkça gözlenmiştir. PEG içeren formülasyonlardan sentezlenen CD'lerin PEG içermeyen formülasyonlardan çok daha küçük olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.31). Yüzey pasivasyon ajanının parçacıkların boyutu üzerindeki etkisi, Sonthanasamy ve ark.nın yayınladıkları çalışma ile uyumlu bulunmuştur [164]. Bununla birlikte, Şekil 7.31'de görülebileceği gibi, sentez sıcaklığı ve parçacık boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.



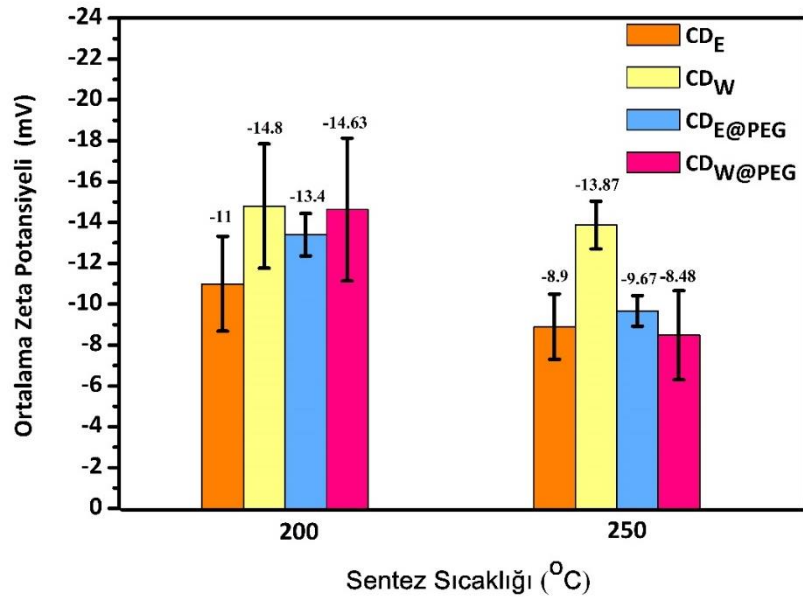
Şekil 7. 31 CD'lerin parçacık boyutu dağılımı; Mikrodalga destekli hidrotermal sentez, sentez sıcaklığının etkisi

Yüzey zeta potansiyeli ölçümleri sonucunda, mikrodalga destekli yöntemler ile sentezlenen tüm karbon nanodotların farklı çalışma parametrelerine rağmen, yüzey yüklerinin negatif olduğu ve -8.9 ila -28.3 mV arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 7.2). MWO ile sentezlenen CD'ler incelendiğinde, yüzey zeta potansiyelleri ile sentez koşulları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Yüzey zeta potansiyeli verileri arasında göze çarpan tek fark, PEG içeren sentez ortamında su ekstraktlarından sentezlenen CD'lerin, etanol ekstresi temelli CD'lerden daha negatif yüzey yüklerine sahip olmaları olmuştur. Sentez ortamına yüzey pasivasyon ajanı ilave edilmediğinde, parçacıkların yüzeylerinin -COOH bakımından zengin, daha asidik yapıda olmalarından dolayı yüzey net yükünün daha negatif olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.32).



Şekil 7. 32 CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; Ev tipi mikrodalga fırında sentez, sentez süresinin etkisi

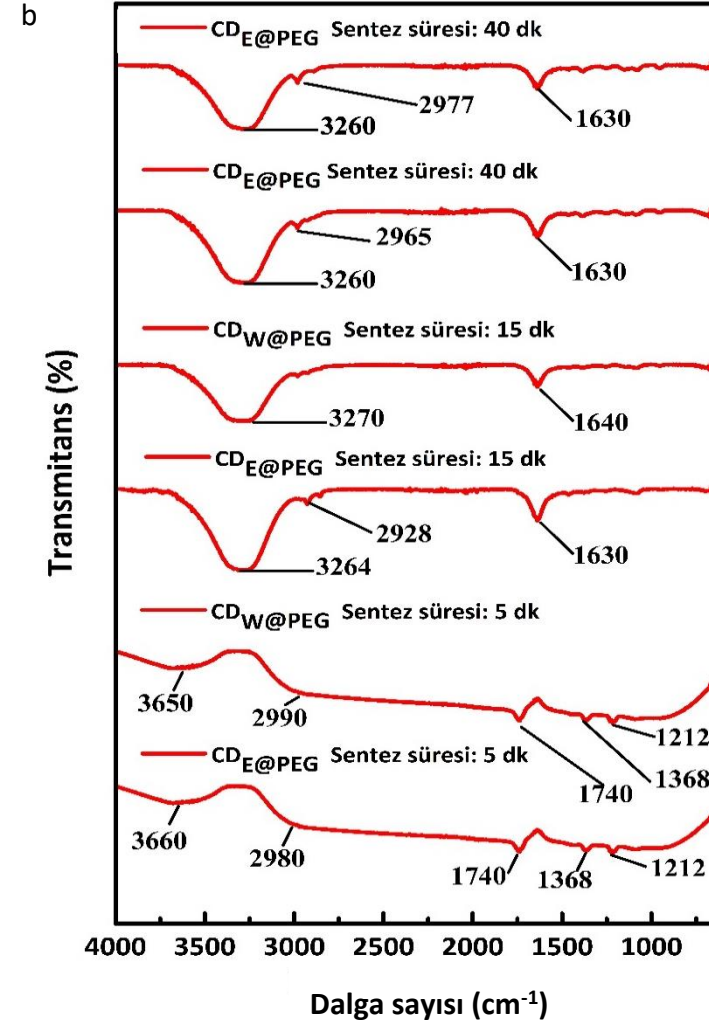
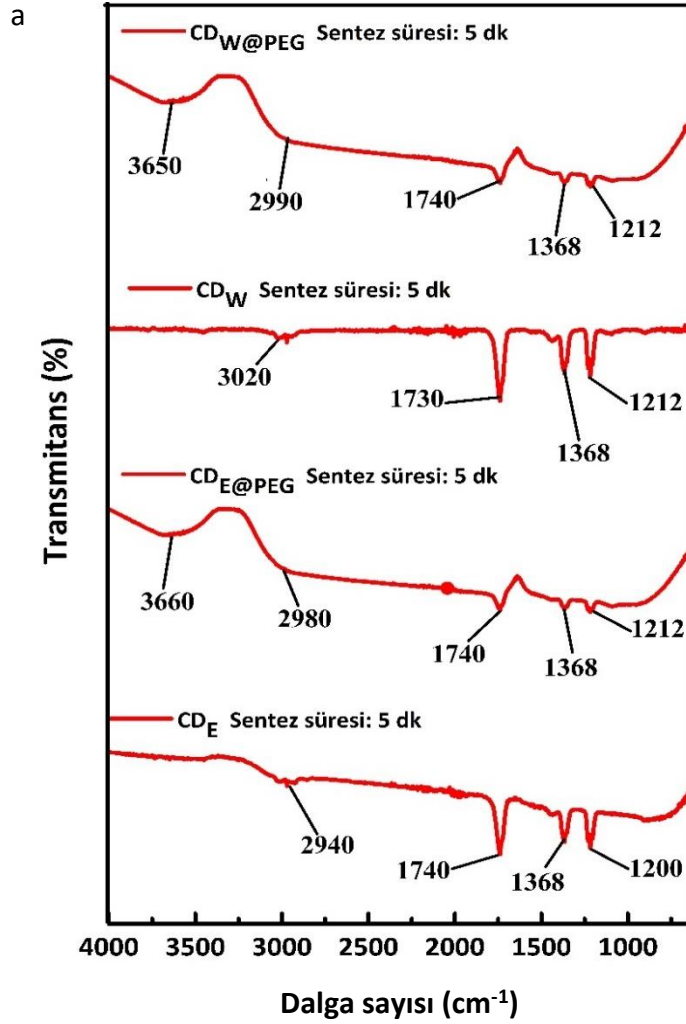
Mikrodalga destekli hidrotermal yöntem ile sentezlenen karbon nanodotların yüzey zeta potansiyel değerlerinde, sentez sıcaklığındaki artışa bağlı olarak fark edilebilir derecede bir düşüş gözlenmiştir. **CD_E**, **CD_W**, **CD_E@PEG** ve **CD_W@PEG** için yüzey zeta potansiyellerindeki değişimin sırasıyla, -11'den -8.9'a, -14.8'den -13.9'a, -13.4'den -9.7'ye ve -14.6'den -8.5 mV'ye şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.33).



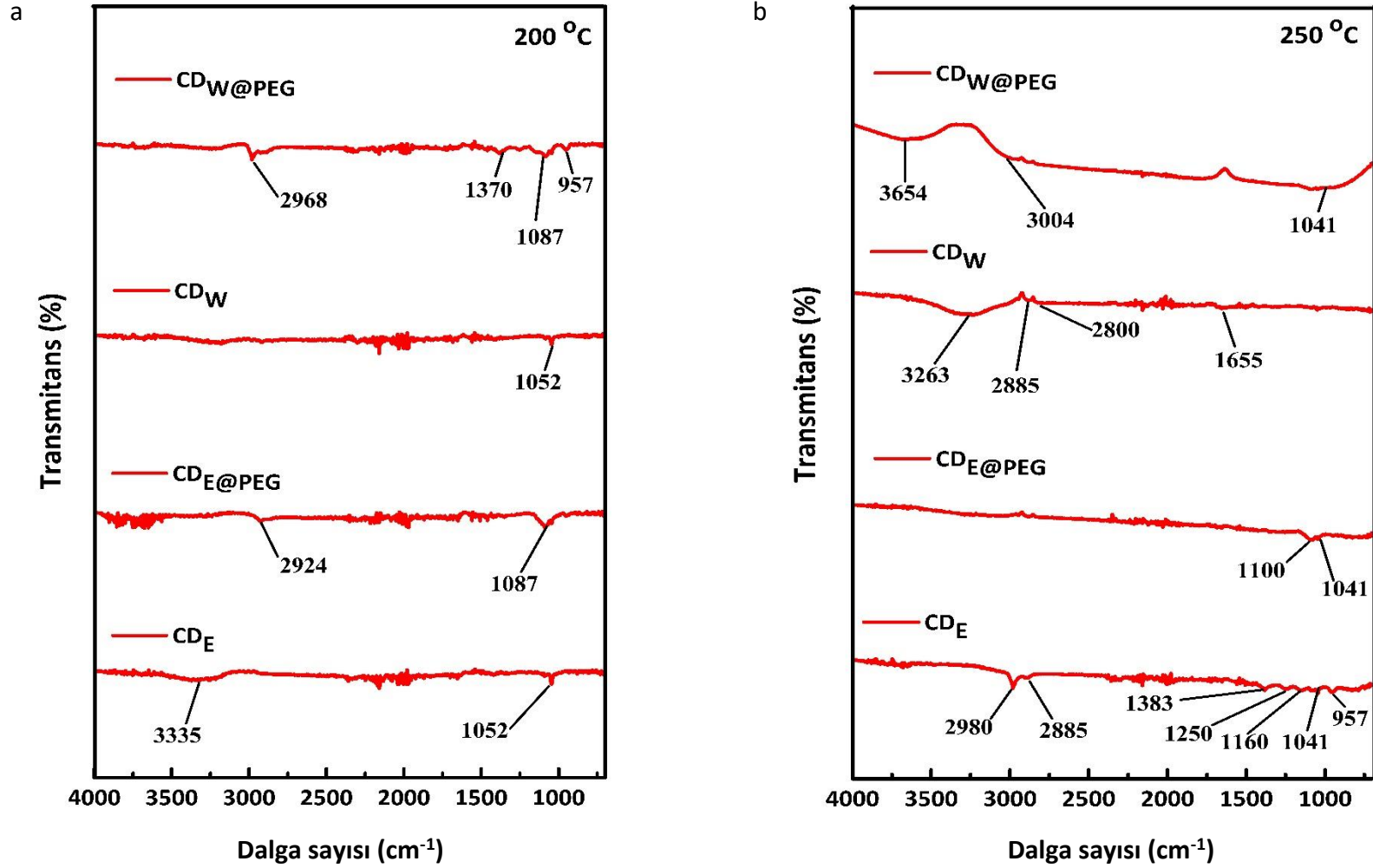
Şekil 7. 33 CD'lerin ortalama yüzey zeta potansiyelleri dağılımı; Mikrodalga destekli hidrotermal sentez, sentez sıcaklığının etkisi

7.2.4 CD'lerin Yüzey Özellikleri Üzerindeki Etkiler

Karbon nanodotların, reaksiyon koşullarına bağlı olarak yüzey fonksiyonel gruplarında meydana gelen değişiklikler FT-IR spektrometresi ile incelenmiştir. Ev tipi mikrodalga fırın ile sentezlenen karbon nanodotların FT-IR spektrumlarının genel profilleri birbirlerine oldukça benzemekte iken, sadece sentez süresi 5 dakika olan CD'lerin FT-IR profillerinin farklı olduğu görülmüştür (Şekil 7.34). MWO yöntemiyle 5 dakikalık sentez süresine sahip **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}** için $\sim 3660\text{ cm}^{-1}$ civarında O-H/N-H gerilme bantları belirlenirken, bu bantların artan sentez süreleri ile ortadan kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 7.34b). MWO yöntemiyle 15 ve 40 dakika sentez sürelerinde sentezlenen CD'lerde, 3600 cm^{-1} civarındaki serbest -OH pikinin kaybolmasının, -OH gruplarının sayısının bu grupların yerine diğer fonksiyonel grupların baskın hale gelmesi nedeniyle azalmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, MWO yöntemiyle 15 ve 40 dakikada sentezlenen **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}**'lerde 3260 cm^{-1} civarında H bağlı -OH gerilmeleri belirlenmiş ve bu bantların CD'lerdeki moleküller arası hidrojen bağları ile ilişkilendirilebileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 7.34b) [61,171–173,175].



Şekil 7. 34 Ev tipi mikrodalga fırın ile farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları



Şekil 7. 35 Mikrodalga sentez cihazı ile farklı sürelerde sentezlenen CD'lerin FT-IR spektrumları; a. 200 °C, b. 250 °C

CD'lerin çoğunda 2880 ile 2980 cm^{-1} arasında alifatik C-H gerilme bantları gözlenmiştir [61,62,175]. Bununla birlikte, 1383 ve 1370 cm^{-1} civarındaki pikler yalnızca MWO yöntemiyle 5 dakika sentez süresine sahip CD'lerde gözlenmiş olup bu pikler CH_2 eğilme titreşimlerine atfedilmiştir [62]. Mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemiyle elde edilen CD'lerin aksine, MWO yöntemiyle sentezlenen tüm CD'ler için $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler sırasıyla, C=O gerilme ve C=C eğilmeleri ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 7.35) [23,61,62,171,173,175]. Sentez süresi 5 dakika olan CD'lerde 1740 cm^{-1} civarında güçlü C=O gerilmeleri gözlenirken, sentez süresindeki artış ile bu bantlar kaybolmuş ve bu pikin yerine C=C eğilmeleri gözlenmiştir. Ayrıca, MWO yöntemiyle 15 ve 40 dakikada sentezlenen **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}**'de 1630 cm^{-1} 'de gözlenen C=C eğilmeleri, parçacıkların UV-Vis spektrumunda 260 nm civarında gözlenen ve π - π^* geçişleri ile ilişkilendirilen piklerle bir arada değerlendirildiğinde, CD'lerdeki aromatik yapılarla ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir (Şekil 7.28b, 7.34b) [171,176]. Bunlara ek olarak, 3000-3020 cm^{-1} arasında gözlenen gerilme titreşimleri aromatik C-H gerilme bantları ile ilişkilendirilmiştir [61,175].

Mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemi ile sentezlenen karbon nanodotlardan yalnızca 250 $^{\circ}\text{C}$ 'de sentezlenen **CD_{W@PEG}**'de, $\sim 3660 \text{ cm}^{-1}$ civarında O-H/N-H gerilme bantları belirlenmiştir (Şekil 7.35b) [61,171–173,175]. Benzer şekilde, 3260 cm^{-1} civarında yalnızca 250 $^{\circ}\text{C}$ 'de sentezlenen **CD_W**'de yayvan bir pik halinde gözlenen H bağlı –OH gerilme titreşimleri, CD'lerdeki moleküller arası hidrojen bağlarına atfedilmiştir (Şekil 7.35b) [61,171–173,175]. MWO yöntemiyle sentezlenen CD'lerde olduğu gibi, MAH yöntemiyle sentezlenen CD'lerin çoğunda 2880 ve 2980 cm^{-1} arasında alifatik C-H gerilme bantları gözlenmiştir (Şekil 7.35) [61,62,175]. 250 ve 200 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta sentezlenen **CD_E** ve **CD_{W@PEG}** için sırasıyla, 1383 ve 1730 cm^{-1} civarında zayıf CH_2 eğilme titreşimleri belirlenmiştir [62]. 250 $^{\circ}\text{C}$ 'de sentezlenen CD'lerde 1040, 1160 ve 1250 cm^{-1} civarında gözlenen zayıf gerilme bantları C-O titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 7.35b). Ayrıca, $\sim 1040 \text{ cm}^{-1}$ 'deki titreşimlerin, karboksilik grubun (-COOH) C-O gerilmeleri ile ilgili olabileceği düşünülmüştür [61,62,171,176,175]. 957 cm^{-1} 'deki gerilme titreşimlerinin epoksi gruplarındaki C-OH gerilmeleri ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür (Şekil 7.35) [61].

FT-IR spektrumlarının değerlendirilmesi ile elde edilen veriler çerçevesinde; her iki sentez yönteminde de nihai yüzey fonksiyonel gruplarının sisteme verilen enerji süresinden etkilendiği ve sentez esnasında kullanılan ekstre tipine bağlı olarak fonksiyonel gruplarda değişme meydana geldiği belirlenmiştir.

7.3 Sitotoksitesite Çalışmaları

7.3.1 CD'lerin MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki *In vitro* Sitotoksitesitelerinin Belirlenmesi

Gerçekleştirilen sentez ve karakterizasyon çalışmalarının ardından fotolüminesans, parçacık boyutu ve yüzey yükü bakımından model olarak kullanılabilecek 2 adet karbon nanodot seçilerek nanotoksitesiteleri araştırılmıştır. Seçilen karbon nanoparçacıkların ikisi de termal sentez yöntemi ile elde edilmiş olup, ilki **CD_{E@PEG}** olarak ifade edilen; *N. oleander* etanol ekstresi temelli, 250 °C sentez sıcaklığında, pH 5'te ve NaCl içermeyen reaksiyon ortamında PEG kullanılarak yüzey pasivasyonu gerçekleştirilmiş karbon nanodotları belirtmektedir. Nanotoksitesite araştırılan diğer nanoparçacık ise **CD_{W@PEG}** kodlu, *N. oleander* su ekstresi temelli, 300 °C sentez sıcaklığında, pH 5'te ve NaCl içermeyen reaksiyon ortamında PEG kullanılarak yüzey pasivasyonu gerçekleştirilmiş karbon nanodotlar olup parçacıkların hidrodinamik parçacık boyutu ve yüzey zeta potansiyeli değerleri Çizelge 7.3'te verilmiştir.

Çizelge 7.3 Nanotoksitesitesi incelenen parçacıkların fiziksel özellikleri

Parçacık kodu	$\lambda_{\max}$ (nm)	R_h (nm)	ζ -Pot (mV)	σ (mS/cm)	m ($\mu\text{m.cm/Vs}$)
CD_{E@PEG}	473	13.7 ± 1.24	-6.7 ± 1.32	0.17	-0.53
CD_{W@PEG}	466	2.05 ± 0.22	-23.5 ± 6.21	0.05	-1.84

$\lambda_{\max}$: Maksimum ışıma dalgaboyu, R_h : Hidrodinamik parçacık boyutu, ζ -Pot: Yüzey zeta potansiyeli, σ : İletkenlik, m : Mobilite

Karbon nanodotların MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksitesiteleri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence kullanılarak araştırılmıştır. Bu sistem, Bölüm 4.1.2'de detaylı olarak yer verildiği üzere, hücre indeksini empedans teknolojisine dayanarak belirlediği için diğer analiz yöntemlerinde gözlenen nanoparçacıkların reaktiflerle etkileşimi ile ilgili problemler ortadan kaldırılmaktadır. Normalize edilmiş

hücre indeksi değerleri, hücrelerin yüzeye tutunmasının bir göstergesi olup bu nedenle de hücrelerin canlılığı ile ilişkilendirilebilmektedir [185]. Şekil 7.36 ve 7.37, 2.5 ppb ile 50 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}** karbon nanodotları ve pozitif kontrol olarak kullanılan 50 ppm *N. oleander* ekstreleri ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin normalize hücre indeksi değerlerinin zamana bağlı değişimini göstermektedir. Tüm denemelerde hücreler e-platelere ekildikten 24 saat sonra nanoparçacık ve kontrol vb. muamelesi gerçekleştirilmiş olup hücre indeksi muamele noktasında normalize edilmiştir.

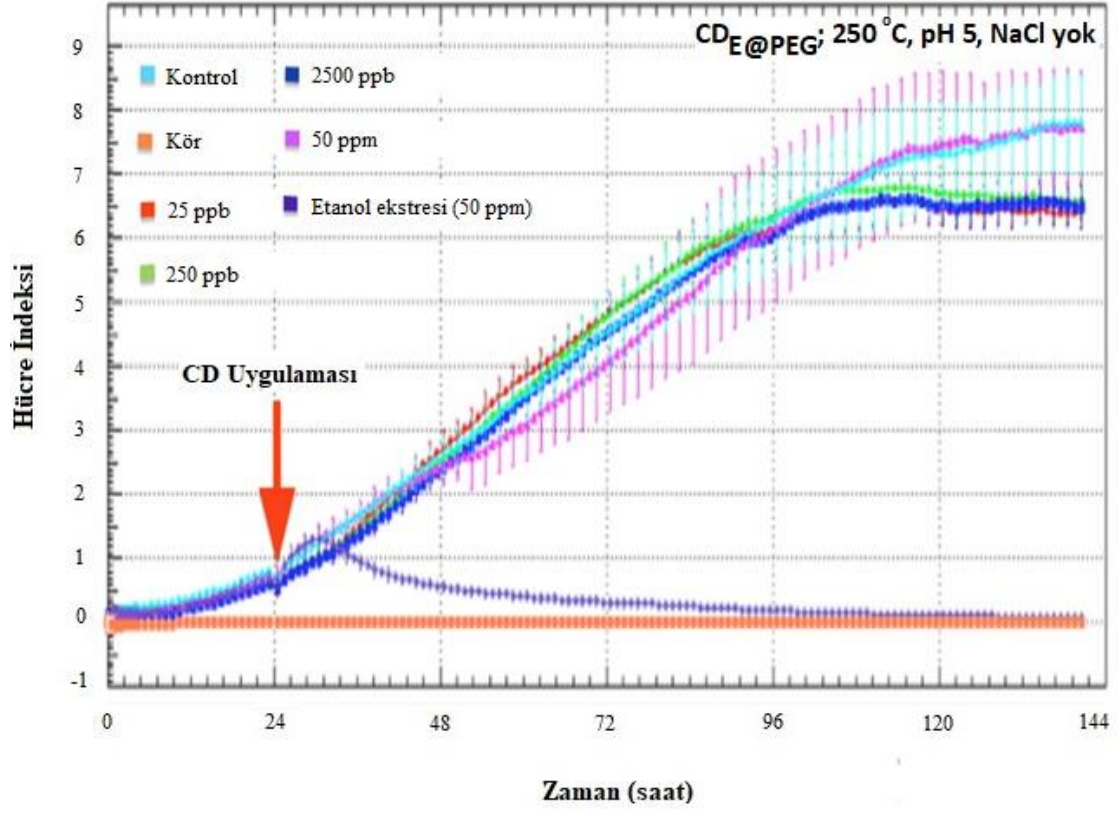
Ekstrelerin, uygulandıktan birkaç saat sonra MCF-7 hücrelerinin ölümüne ve hücre indeksinde keskin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek konsantrasyon olan 50 ppm **CD_{W@PEG}** ile muamele edilen hücrelerde, madde uygulamasından 24 saat sonra, herhangi bir madde ilavesi yapılmamış olan kontrol grubu hücreler ve aynı konsantrasyonda **CD_{E@PEG}** eklenen hücrelere kıyasla önemli farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 7.36, 7.37).

Bununla birlikte, her iki CD örneğinin de düşük konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücreler, CD ile muamele edilmemiş hücrelerle benzer bir büyüme eğilimi göstermiş olup CD uygulamasından 72 saat sonra bile doza bağlı bir yanıt gözlenmemiştir (Şekil 7.36, 7.37). Bu sonuçların, artan negatif net yükün ve düşük boyutun yüksek dozlarda, tümör hücreleri üzerindeki sitotoksosite riskini arttırdığına dair literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görülmektedir [142,186].

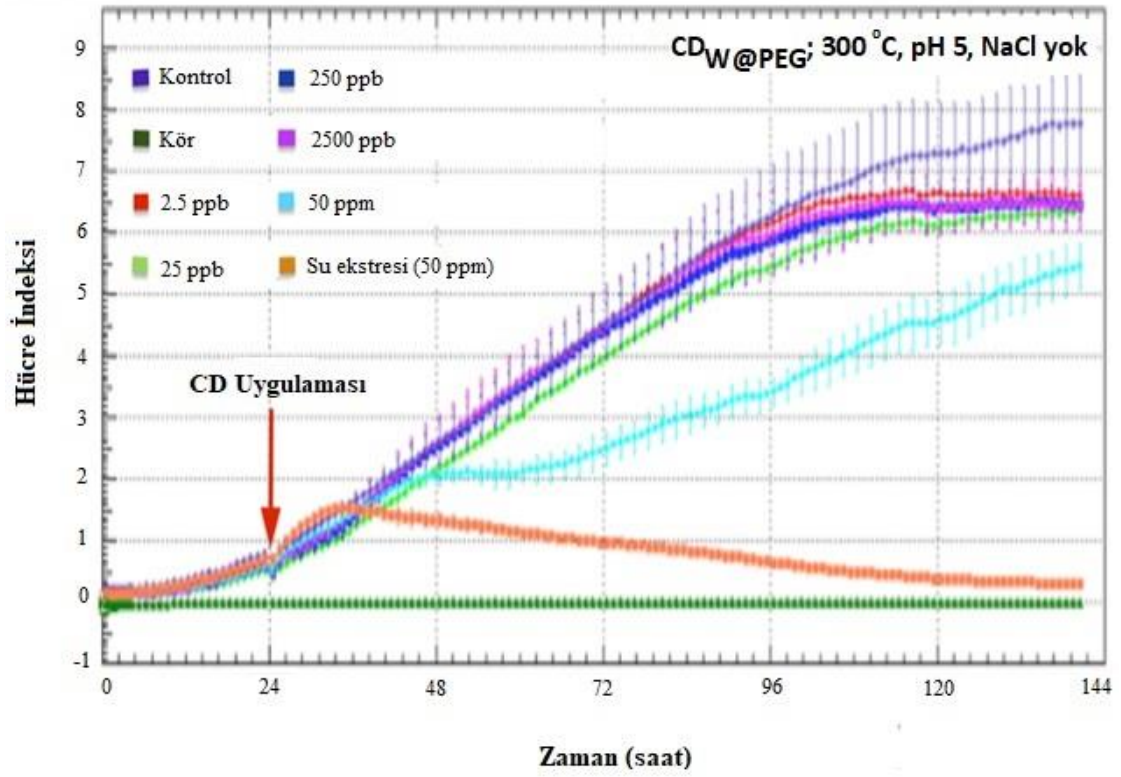
Elde edilen bulgular doğrultusunda, MCF-7 hücre hattı üzerindeki genotoksosite, klatojenite ve hücre döngüsü analizlerine **CD_{W@PEG}** ile devam edilemesine karar verilmiştir.

Ayrıca, karbon nanodotların normal (sağlıklı) hücre hattı üzerindeki sitotoksitesinin incelenmesinin biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğinin irdelenmesi bakımından faydalı olacağına karar verilmiş ve çalışmalar primer deri fibroblast hücre hattı (HDFa) kullanılarak xCELLigence sisteminde gerçekleştirilmiştir.

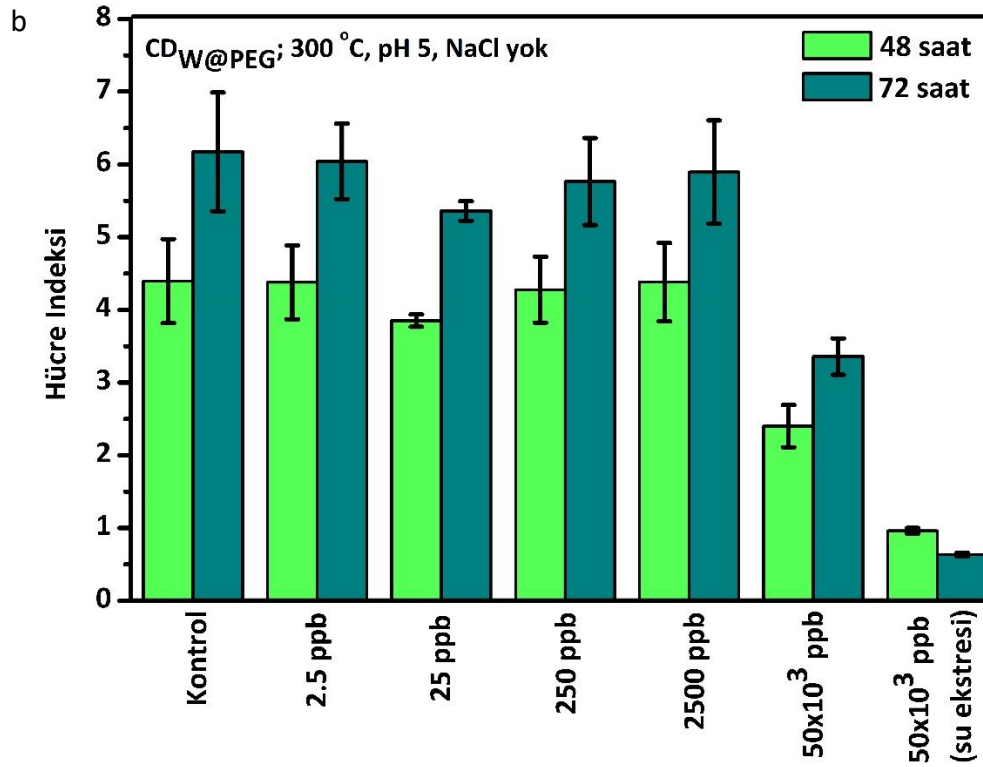
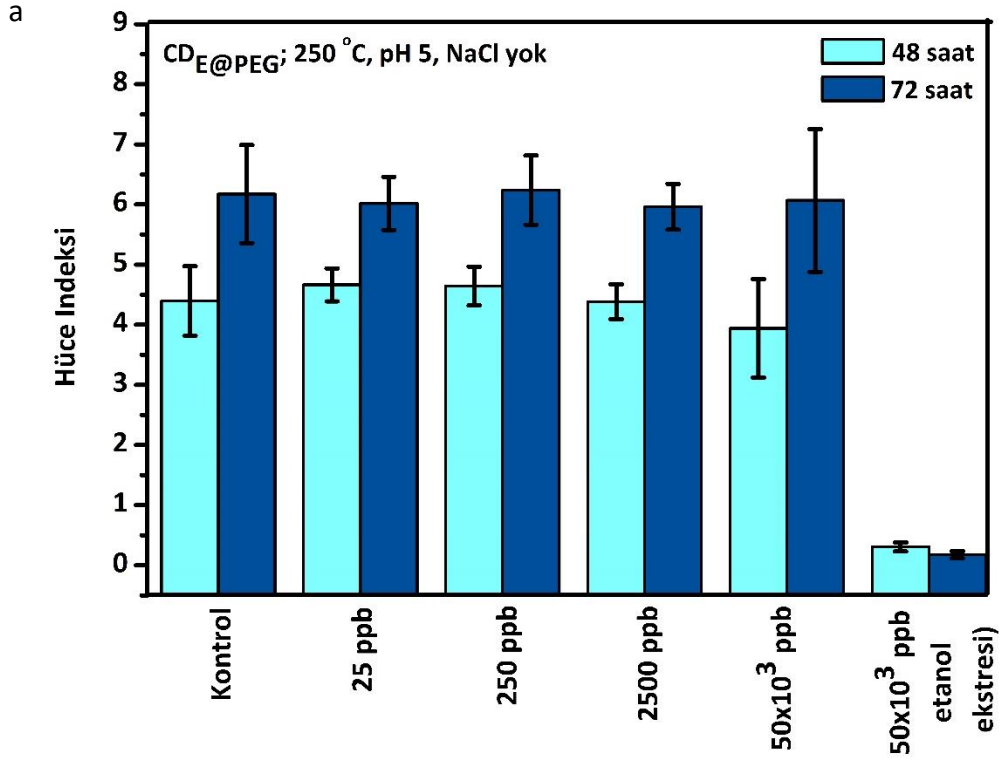
a



b



Şekil 7. 36 Zamana bağlı MCF-7 hücre indeksi değişimi; a. CD_E@PEG, b. CD_W@PEG

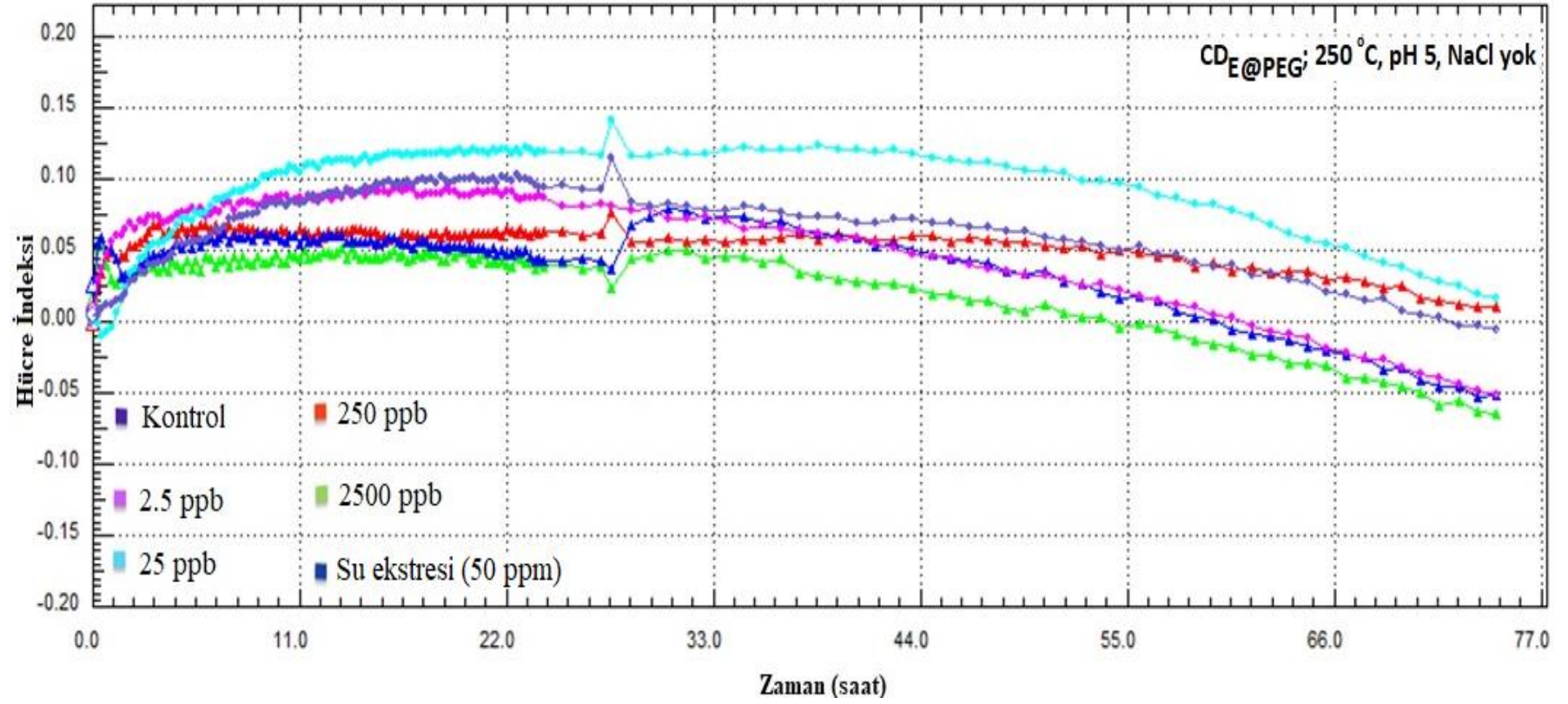


Şekil 7. 37 a. CD_E@PEG ve b. CD_W@PEG uygulandıktan 24 ve 72 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinin ortalama hücre indeksi değerleri

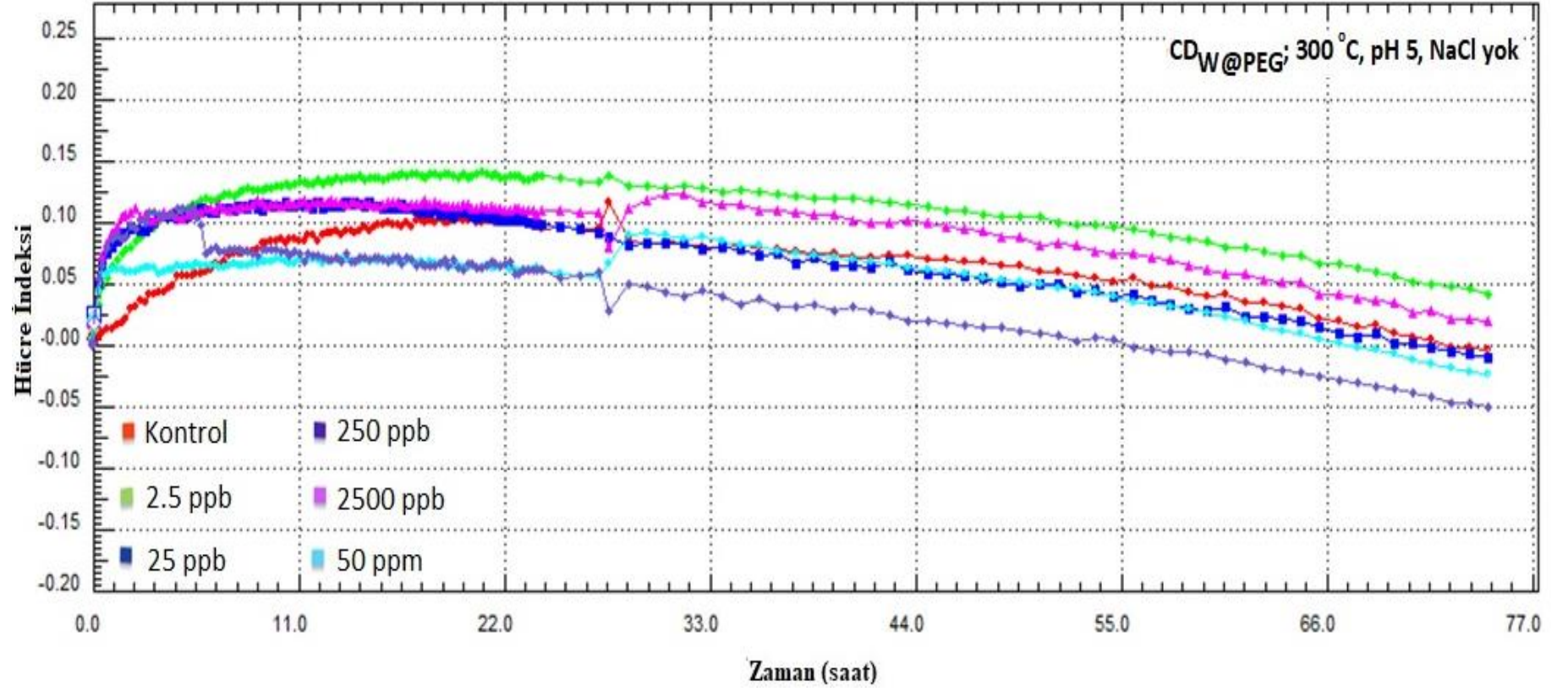
7.3.2 CD'lerin HDFa Hücre Hattı Üzerindeki *In vitro* Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Karbon nanodotların HDFa primer deri fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksiteleri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence kullanılarak araştırılmıştır. Şekil 7.38 ve 7.39, 2.5 ppb ile 50 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}** karbon nanodotları ve pozitif kontrol olarak kullanılan 50 ppm *N. oleander* su ekstresi ile muamele edilen HDFa hücrelerinin normalize hücre indeksi değerlerinin zamana bağlı değişimini göstermektedir. Tüm denemelerde hücreler e-platelere ekildikten 24 saat sonra nanoparçacık ve kontrol muamelesi gerçekleştirilmiş olup hücre indeksi muamele noktasında normalize edilmiştir.

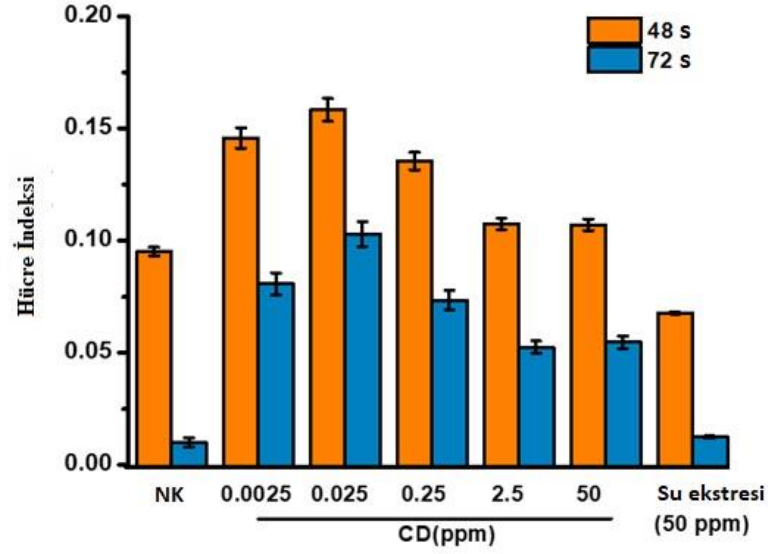
HDFa hücrelerinin hücre indeksindeki zamana bağlı değişimler Şekil 7.38 ve 7.39'dan takip edilebilmektedir.



Şekil 7. 38 Zamana bağlı HDFa hücre indeksi değişimi ($CD_{E@PEG}$)



Şekil 7. 39 Zamana bağlı HDFa hücre indeksi değişimi (CD_{W@PEG})



Şekil 7. 40 CD_{W@PEG} uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra belirtilen konsantrasyonlarda HDFa hücrelerinin ortalama hücre indeksi değerleri

Şekil 7.40'da **CD_{W@PEG}**'in hiçbir konsantrasyonda HDFa hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği, bununla birlikte, hücrelerin CD ile muamelesinden 72 saat sonra, 0.25 ppm ve altındaki konsantrasyonlarda, hücre proliferasyonunu indüklediği ve CD varlığının, yüksek CD konsantrasyonlarında bile hücreleri doğal ölümden koruduğu görülmektedir. Oleandrin ekstresinin (50 ppm) hücreler üzerinde zamanda bağımsız olarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Lu ve ark.'nın 2019 yılında adipoz türevli kök hücreler (rADSC) üzerinde yaptıkları çalışmada, CD'lerin, proliferasyonu benzer şekilde arttırdığı görülmektedir [187].

7.4 Genotoksisite Çalışmaları

7.4.1 DNA Hasarının Belirlenmesi

MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksiteleri incelenen karbon nanodotların, aynı hücre hattı üzerindeki genotoksiteleri ve klastojenite potansiyelleri, 0.25, 2.5 ve 50 ppm **CD_{W@PEG}** konsantrasyonunda sırasıyla comet yöntemi ve sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi ile incelenmiştir. Her bir koşul altında, mikronükleus frekansını saptamak için 1000 binükleer hücre analiz edilmiştir. MCF-7 hücre hattı, **CD_{W@PEG}** karbon nanodotlarına 48 saat ve 72 saat maruz bırakılmıştır. Genotoksisitenin indüklenmesi

sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi ile değerlendirilmiş ve hücresel DNA'daki DNA hasarı tek hücre jel elektroforezi (comet testi) ile analiz edilmiştir.

Farklı seviyelerdeki DNA hasarını gösteren AU değerleri Çizelge 7.4'te verilmiştir. Negatif kontrolde AU değeri 48 saat ve 72 saat boyunca sırasıyla 18.50 ± 4.20 ve 33.75 ± 6.24 'e ulaşmıştır. H_2O_2 ile muamele edilmiş olan pozitif kontrol grubunda ise AU değerinin 48 ve 72 saat için sırasıyla 337.75 ± 9.81 ve 292.50 ± 16.36 'ya yükseldiği görülmüştür. Negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) arasında 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.001$).

MCF-7 hücre hattındaki DNA hasarının kapsamı uygulanan tüm **CD_W@PEG** dozları için 48 ve 72 saat boyunca gözlenmiştir. CD ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarının değiştiği ve hasarın hem konsantrasyon hem de zamana bağlı bir tutum izlediği belirlenmiştir (Şekil 7.41, 7.42). Tüm konsantrasyon grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Comet testi ile elde edilen sonuçlar oksidatif DNA hasarı hakkında bir ipucu sağlamaktadır. Karbon nanodotların daha yüksek genotoksitelerinin, bu nanopartiküllerin çekirdekteki birikimlerine neden olabilecek kadar küçük boyutlu olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gözlenen kuyruklu yıldız kuyruğu oluşumunun, DNA kırılmasından veya oksidatif stresin neden olduğu başarısız DNA onarım mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [142].

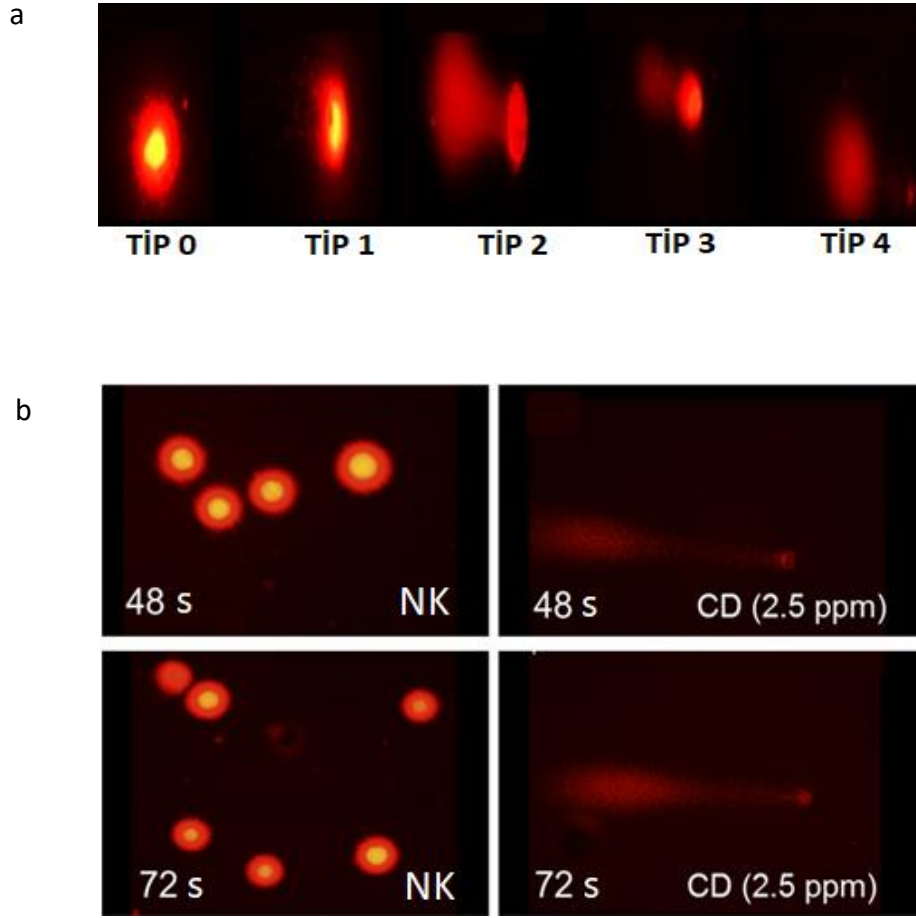
Çizelge 7. 4 CD_{W@PEG}'in Comet testi ile belirlenen DNA hasar potansiyeli

	48 saat						72 saat					
	AU (Ortalama ± std. sapma)	Min.	Maks.	% 25	Medyan	% 75	AU (Ortalama ± std. sapma)	Min	Mak	% 25	Medyan	% 75
NK[#]	18.50±4.20	13.00	23.00	14.25	19.00	22.25	33.75±6.24	220.00	260.00	28.50	32.00	40.25
PK[#] (H ₂ O ₂ 20 mM)	337.75±9.81*	326.00	350.00	328.00	337.00	347.00	292.50±16.36*	270.00	308.00	275.50	296.00	306.00
CD_{W@PEG} (0.25 ppm)	243.25±15.88*	229.00	257.00	229.25	243.50	257.00	191.25±58.40*	114.00	246.00	130.50	202.50	240.75
CD_{W@PEG} (2.5 ppm)	311.25±3.30*	307.00	315.00	308.00	311.50	314.25	269.75±3.78*	265.00	274.00	266.00	270.00	273.25
CD_{W@PEG} (50 ppm)	230.50±15.33*	210.00	246.00	214.75	233.00	243.75	273.00±3.16*	269.00	276.00	269.75	273.50	275.75

#: Grubun 48. ile 72. saatlik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır.

Her üst karakter, gruplar arasındaki aynı saatteki anlamlı farkı göstermektedir.

*: Pozitif kontrol ile AU değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p<0.001)



Şekil 7. 41 a. Alkali comet testi ile MCF-7 hücrelerinin kuyruk uzunluğuna bağlı olarak 4 sınıfta görsel skorlanması esnasında rehber alınan farklı comet (kuyruklu yıldız) sınıflarının gösterimi, b. Negatif kontrol ve MCF-7 hücrelerinin 2.5 ppm CD_{W@PEG} ile muamele edildikten 48 ve 72 saat sonraki temsili görüntüleri

DNA hasar sınıflarının değerlendirilmesi aşağıdaki sınıflandırmaya uygun olarak gerçekleştirilmiştir [110].

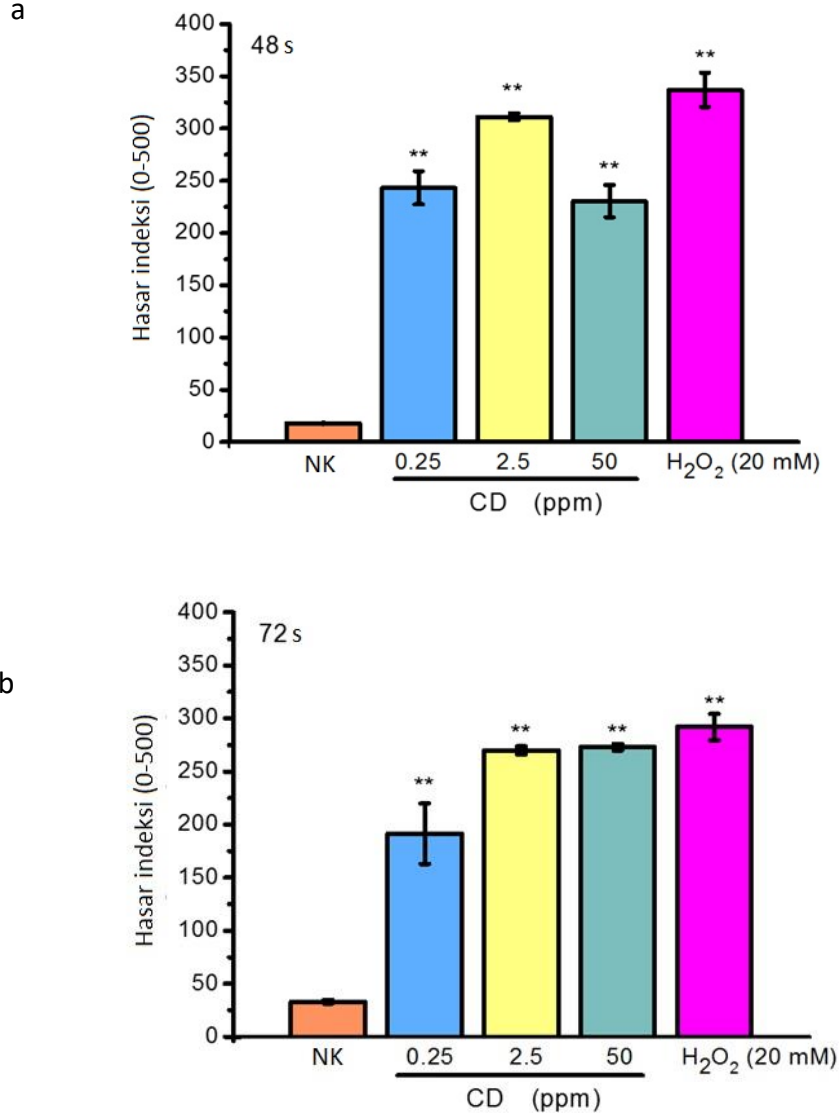
Tip 0: hasar görmemiş, kuyuksuz,

Tip 1: baş (çekirdek) çapından daha kısa bir kuyruk,

Tip 2: baş çapının 1-2 katı uzunluğunda bir kuyruk,

Tip 3: baş çapının 2 katından daha uzun bir kuyruk,

Tip 4: aşırı yüksek hasar, baş çapından çok daha fazla kuyruk



Şekil 7. 42 CD_{W@PEG} ile muamele sonrası MCF-7 hücrelerinde alkali comet testi ile belirlenen hasar indeksleri; a. 48 saat, b. 72 saat

H₂O₂ (20 mM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol ile CD ile muamele edilen hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.001$).

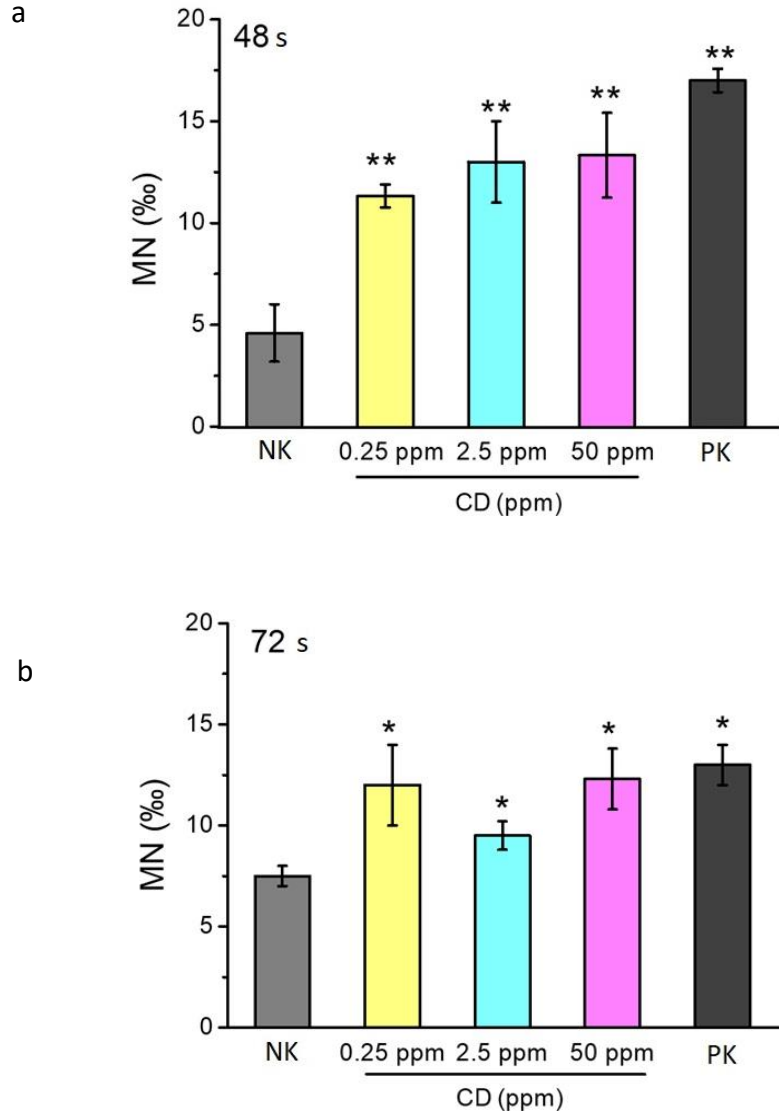
FT-IR, XPS ve ζ -Pot sonuçları ile yüksek miktarda oksijen içeren yüzeye sahip olduğu desteklenen **CD_{W@PEG}**'in, reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açabileceği ve oksidatif stresin bir sonucu olarak, DNA hasarı meydana getirebileceği, genomik kararsızlığa ve sonuç olarak da hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir [141,142,186,188]. İlerleyen çalışmalarımızda değerlendirilmesi söz konusu olabilecek diğer inhibisyon yollarına ek olarak, **CD_{W@PEG}**'in test edilen en düşük konsantrasyon değerinde bile (0.25 ppm) sitotoksitesi, oksidatif stres ile açıklanabilmektedir.

7.4.2 Klastojenitenin Belirlenmesi

Karbon nanodotların MCF-7 hücre hattı üzerinde neden olduğu klastojenik hasar sitokinezi bloklanmış mikronükleus yöntemi (CBMN) ile değerlendirilmiştir (Şekil 7.43). Hücreler, farklı konsantrasyonlardaki (0.25, 2.5 ve 50 ppm) **CD_{W@PEG}**'e maruz bırakılmıştır. CD'lerin 48 ve 72 saat boyunca uygulanan tüm dozlar için, negatif kontrolle kıyaslandığında, DNA hasarından anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, $p<0.01$ ve $p<0.05$).

CBMN testinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 48 saatte, klastojenik hasar seviyesinde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 7.43a). Ayrıca, 0.25 ppm'deki klastojenik hasarın bile kontrole kıyasla her bir zaman periyodunda anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 7.43). **CD_{W@PEG}** ile muamale edildikten 72 saat sonra, CD'lerin 0.25 ppm'deki klastojenitesinin, yüksek konsantrasyondaki dozlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.43b). Mikronükleus yoğunluğunda 48 saat boyunca muamele edilen örneklerle kıyasla azalma gözlenmiştir.

72. saatte hücresel hasardaki genel azalma ve en düşük konsantrasyondaki hafif artış, farklı şekillerde açıklanabilmektedir. Muhtemel birinci açıklama; hücresel hasar onarım mekanizmalarının uyarılması, böylece tümör hücresinin daha fazla kimyasal hasara karşı korunmasının arttırılması ve mevcut ve daha fazla kimyasal saldırıya karşı korumanın geri kazanılmasıdır. Muhtemel ikinci açıklama ise; meydana gelen hasar nedeniyle hücrenin ya nekrotik ölüme maruz kalması ya da geri dönüşümsüz şekilde apoptotik ölümün gerçekleşmesi, böylece daha fazla hasar görmüş hücre oranının azalmasıdır.



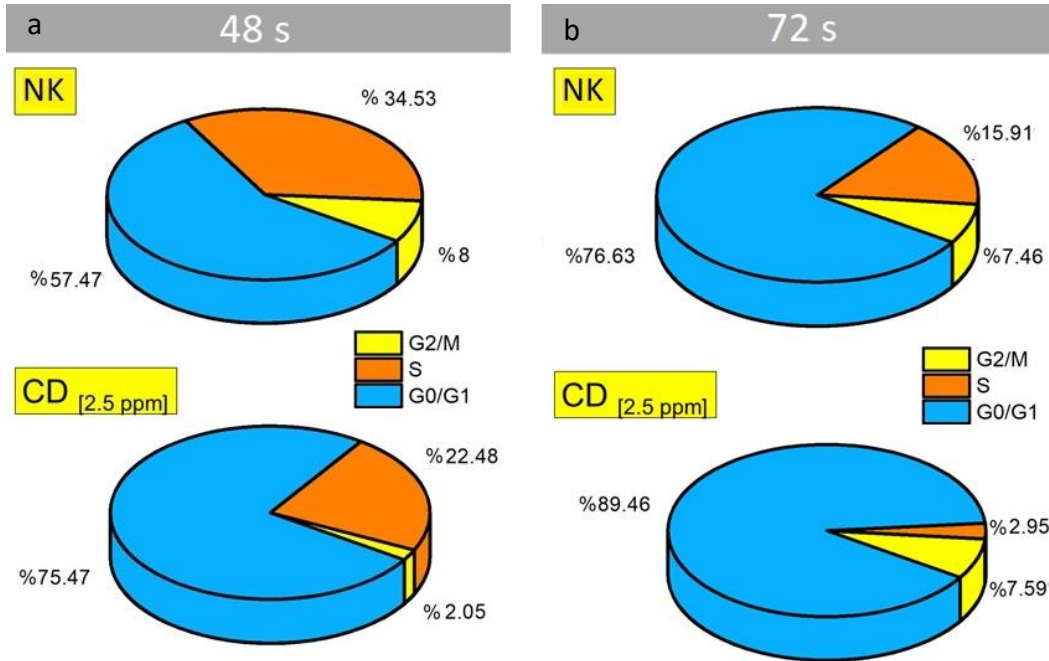
Şekil 7. 43 Farklı konsantrasyonlarda CD_{W@PEG} ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı mikronükleus yoğunluğundaki değişim, a. 48 saat, b. 72 saat

Negatif kontrol ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$).

7.5 Hücre Döngüsünün İncelenmesi

Karbon nanodotların neden olduğu genotoksisite ve klastojenite göz önüne alındığında, CD'lerin MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü fazları ve MCF-7 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkilerinin detaylı olarak incelenmesine karar verilmiştir. Proliferasyon, hücrelerin G0/G1 fazından S fazında ve son olarak da G2/M fazına geçtiği hücre döngüsü ilerlemesine bağlıdır.

Şekil 7.44a'da görülebileceği gibi, 2.5 ppm **CD_{W@PEG}** varlığında, CD uygulamasından 48 saat sonra, G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki canlı hücre popülasyonlarının sırasıyla % 75.5, % 22.48 ve % 2.05, CD ile muamele edilmemiş kontrol hücrelerinde ise bu değerlerin sırasıyla % 57.47, % 34.53 ve % 8.0 olduğu belirlenmiştir.



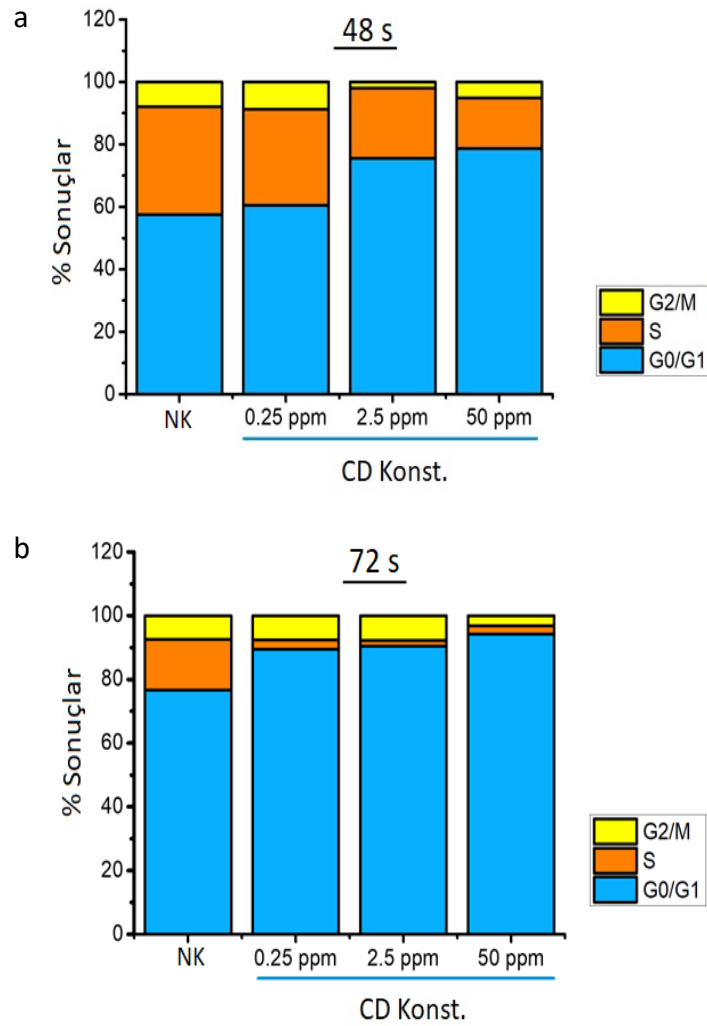
Şekil 7. 44 Negatif kontrol ve **CD_{W@PEG}**'in hücre döngüsü faz profilinin akış sitometrisi (FACS) kullanılarak G0/G1, S ve G2/M fazları gibi farklı hücresel fazlarda karşılaştırılması; a. 48 saat sonra, b.72 saat sonra

0.25 ppm konsantrasyondaki **CD_{W@PEG}** ile muamele edilen hücrelerde bile S fazındaki hücrelerin sayısında bir düşüş gözlenmiş ($p < 0.05$) ve sonuç olarak kontrol grubuna kıyasla G0/G1 fazlarındaki hücre sayısında hafif bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Artan CD konsantrasyonlarında, hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutuklu kalmasının tetiklenmesinin, konsantrasyona bağlı şekilde gerçekleştiği ve verilerin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 7.45).

Şekil 7.44b ve 7.45b'de, 72 saatte hücre döngüsü fazlarındaki değişikliklerin dramatik olarak farklılaştığı görülmektedir. 0.25 ppm, 2.5 ppm ve 50 ppm konsantrasyonda **CD_{W@PEG}** ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin sırasıyla % 89.5, % 90.5 ve % 94.2'si G0/G1 fazındayken (farklı CD konsantrasyonları için $p < 0.005$), kontrol grubunu sadece % 76.6'sının G0/G1 fazında olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

Farklı CD konsantrasyonları için hücre döngüsündeki anlamlı farklılıklar ($p<0.001$), CD'lerin en düşük konsantrasyonlarda bile (0.25 ppm), G0/G1 fazında uzun süreli gecikmenin CD'ler tarafından indüklendiği ve buna bağlı olarak da daha yavaş hücre büyümesine neden olduğu ve S fazına girişi geciktirdiğini göstermektedir (Şekil 7.45).

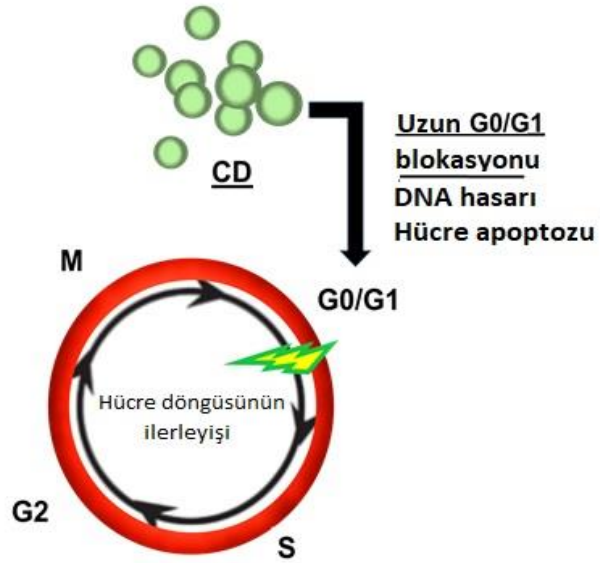
CD'ler ile muamele edilmemiş hücelere kıyasla, 2.5 ppm **CD_{W@PEG}** uygulanan S fazındaki hücrelerin inkübasyondan 48 ve 72 saat sonra sırasıyla % 35 ve % 82 civarında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 7.44, 7.45).



Şekil 7. 45 CD_{W@PEG} ile muamele edilmemiş (NK) ve farklı konsantrasyonlarda (0.25-50 ppm) CD ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin a. 48 saat ve b. 72 saat süresince hücre döngüsü analizi

Genotoksisite ve klastojenite analizleri ile birlikte, hücre popülasyonunun G0/G1 fazında belirgin şekilde tutulması ve S ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonundaki dramatik

düşüş, CD'lerin DNA hasarı ve mutajenik uyarımlarla G0/G1 fazındaki anomalilere neden olarak hücre apoptozisinin tetikleyebileceği fikrini desteklemektedir (Şekil 7.46).



Şekil 7. 46 Hücre döngüsü ilerleyişinde CD'lerin olası etkisinin şematik gösterimi

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında iki farklı *Nerium oleander* ekstresiden, farklı sentez yöntemleri ile farklı fiziksel koşullarda sentezlenen karbon nanodotların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular doğrultusunda, incelenen parametrelerin sentezlenen parçacıklar üzerindeki etkileri açığa çıkartılmıştır. Karbon nanodotların sahip oldukları floresan ışıma verebilme özellikleri, biyomedikal uygulamalarda –özellikle ilaç taşınımı, biyo-görüntüleme vb.- kullanım potansiyellerini oldukça yükseltmektedir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanoparçacıkların boyutları, yüzey kimyaları ve yüzey yüklerinin hücre ve/veya hücre çekirdeği içerisine alınma mekanizmaları üzerinde önemli değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, nanoparçacıkların sentez koşullarındaki değişikliklerin parçacık fizikokimyası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve amaca yönelik nanoparçacık tasarımının mümkün kılınması oldukça büyük önem taşımaktadır.

Ayrıca, karbon nanodotların biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğinin irdelenmesinde, hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi kilit rol oynamaktadır. Nanoparçacıkların, üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri ve umut vaadeden uygulama potansiyellerine rağmen, özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılmadan önce nanotoksikolojilerinin sistematik, hassas ve güvenilir olarak belirlenmesi gerekmektedir. Geleneksel sitotoksiste testleri bu aşamada yetersiz kalabilmekte ve nanoparçacıkların testlerde kullanılan kimyasal ajanlarla etkileşimlerine ve/veya insan faktörüne bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle nanotoksikoloji araştırmalarında, söz

konusu etkileşimlere mahal vermeyen, insan faktörünü minimize eden ve yüksek hassasiyette sonuç veren yenilikçi, güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, yeni nesil *in vitro* sitotoksik aktivite tayini yöntemi olan empedans ölçümü temeline dayanan gerçek zamanlı hücre analiz cihazı xCELLigence kullanılarak, karbon nanodotların MCF-7 insan meme kanseri ve HDFa insan primer dermal fibroblast hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir.

Karbon nanodotlar, genel olarak masum ve düşük toksisiteli olarak ifade edilmelerine rağmen, genotoksik ve/veya klastojenik özellik gösterip göstermediklerine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu parçacıkların insan hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi, son derece önem arz etmektedir.

Bu çalışmada *in vitro* sitotoksik aktivite bulguları göz önünde bulundurularak seçilen karbon nanoparçacıkların *in vitro* genotoksik etkileri tek hücre jel elektroforezi (comet yöntemi) kullanılarak belirlenmiştir. Ardından sitokinezi bloklanmış mikronükleus (CBMN) testi ile söz konusu parçacıkların hücrelerin DNA'ları üzerindeki, hasar seviyeleri belirlenerek klastojenik etkileri irdelenmiştir. Parçacıkların neden olduğu hasarın mekanizmasının açığa çıkarılması, amaca yönelik olarak verdikleri hasar seviyesinin güçlendirilmesi veya engellenmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu nedenle, akış sitometrisi yöntemi kullanılarak parçacıkların hücre döngüsü ilerleyişi üzerindeki etkileri belirlenerek, hücre hasarının mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen bulguların değerlendirilmesi sonucu elde edilen nihai sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Termal sentez yöntemiyle sentezlenen karbon nanodotlar için;

- *Nerium oleander* yapraklarının etanol ve su ekstraktlarından farklı fiziksel koşullarda sentezlenen karbon nanodotlar incelendiğinde, ekstraksiyon yönteminin, sentezlenen karbon nanopartiküllerinin yüzey kimyası, boyutu ve yüzey zeta potansiyeli üzerinde dikkate değer bir öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır.
- Ekstraksiyon tipi ve sentez koşullarına bağlı olarak 5 nm'den daha küçük nanoparçacıklar başarıyla elde edilmiştir.

- Reaksiyon ortamına PEG eklenmesinin parçacıkların floresan özellikleri üzerinde çok önemli bir etkisi olduğu doğrulanmıştır.
- Oleander'ın söz konusu ekstrelerinin, PEG içeren pH 5'teki NaCl içermeyen formülasyonlarından sentezlenen karbon nanodotların, floresan özellik, hidrodinamik çap vb. bakımından diğer koşullarda sentezlenen CD'lerden daha iyi alternatifler olduğu görülmüştür.
- Nanoparçacıkların yüzey yükleri, sitotoksiteleri ve nanoparçacık ile biyolojik sistemin biyofizikokimyasal etkileşimleri üzerinde büyük öneme sahiptir [167,168]. Bu nedenle, karbon nanodotların uygulama amacına göre seçilmesi daha iyi bir seçenek olacaktır. Karbon nanodotların sentez koşullarını CD'lerin yapıları ve karakteristikleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, amaca yönelik parçacık sentezi bakımından önem taşımaktadır.

Mikrodalga/mikrodalga destekli sentez yöntemleriyle sentezlenen karbon nanodotlar için;

- Ev tipi mikrodalga fırın ile sentezlenen CD'lerde reaksiyon süresinin parçacıkların floresan özelliği üzerinde kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir.
- Ev tipi mikrodalga fırın ile sentezlenen ve sentez süresi 40 dakika olan **CD_{E@PEG}** ve **CD_{W@PEG}**'in fotoluminesans değerlerinin, diğerlerinden neredeyse 10 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenen karbon nanodotlarda, reaksiyon ortamına yüzey pasivasyon ajanının eklenmesinin parçacık boyutu üzerinde son derece etkili olduğu gözlemlenmiştir.
- Mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenen CD'lerin yüzey zeta potansiyellerinde, sentez sıcaklığının artması ile negatifliğin azaldığı görülmüştür.
- CD sentezi için kullanılan mikrodalga destekli sentez yöntemleri karşılaştırıldığında, ev tipi mikrodalga fırın ile sentez yönteminin CD'lerde fotoluminesans artışını sağlamak için daha iyi bir alternatif olduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte CD'lerin mikrodalga destekli hidrotermal sentez yöntemiyle çok daha kısa reaksiyon sürelerinde sentezlenebildiği de yadsınamaz bir gerçektir.

Karbon nanoparçacıkların nanotoksikolojilerinin in vitro sitotoksisite, in vitro genotoksisite, in vitro klastojenite ve in vitro hücre döngüsü testleri ile belirlenmesi çalışmaları;

- Karbon, biyouyumlu olarak nitelendiriliyor olmasına rağmen, yine de karbon bazlı nanomalzemelerin sistematik ve güvenilir biyogüvenlik değerlendirmelerinin yapılması gerekmektedir.
- Karbon dotlar, biyo-görüntüleme ajanı ve hücre çekirdeğine taşınım için araç olarak kullanımı da dâhil olmak üzere çok çeşitli biyolojik ve biyomedikal uygulamalar için kullanışlı ve kullanılabilir bir platform görevi görmektedir.
- Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda, önceki çalışmaların birçoğunun aksine, CD'lerin uygulanan en yüksek konsantrasyon değerinde bile sağlıklı HDFa hücrelerinin proliferasyonuna olanak sağlıyorken, MCF-7 hücreleri üzerine konsantrasyona (50 ppm) ve zamana bağlı sitotoksisite potansiyelleri olduğu belirlenmiştir.
- *Nerium oleander*'in su ekstresinden sentezlenen CD'lerin, MCF-7 hücreleriyle muamelesinden 72 saat sonra bile herhangi bir sitotoksik aktiviteye neden olmuyorken, sitotoksik etkinin sadece 50 ppm konsantrasyonda görüldüğü, ancak aynı parçacıkların aynı hücre hattı üzerindeki genotoksisite ve klastojenite araştırmalarında, 0.25 ppm kadar düşük konsantrasyonda bile genotoksite ve klastojeniteye neden oldukları belirlenmiştir.
- CD'lerin hücre döngüsüne, hücreleri G0/G1 fazında tutarak müdahale etmesi, hücre çekirdeğine girebilediklerini göstermektedir.
- CD'lerin neden olduğu DNA hasarının, diğer mekanizmaların yanı sıra, karbon temelli nanomalzemelerde yaygın olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.
- CD'lerin memeli hücrelerindeki mutajenite ve karsinojenite potansiyellerininin desteklenmesi için daha fazla çalışmaya gerek duyulsa da, bu çalışma, son derece

küçük boyutlu CD'lerin, hücre çekirdeğine girerek tümör hücrelerinin hücresel fonksiyonlarını etkileyebileceğinin göstergesidir.

- CD'lerin tek başlarına bile, yüksek konsantrasyonlarda, MCF-7 meme kanseri hücrelerine seçici sitotoksikite gösterirken, HDFa insan primer dermal fibroblast hücrelerinde aynı konsantrasyonlarda büyümeyi indüklediği gözlenmiştir. CD'lerin genotoksikite ve hücre döngüsü üzerindeki etkisi incelendiğinde, DNA hasarına bağlı kanser tedavisinde kullanılma potansiyellerinin olduğu belirlenmiştir.
- Karbon dotların güvenliği konusundaki literatür dikkate alındığında, bu çalışmada elde edilen sonuçların bu alanda tartışmalara yol açabileceği ve CD'lerin biyogüvenliği ile ilgili gelecek çalışmaları tetikleyebileceği ve halihazırdaki gen hedefli antikanser terapilerinin etkinliğinin geliştirilmesi için öngörü oluşturacağı düşünülmektedir.
- Çizelge 8.1'de yer verilen literatür çalışmalarının sonuçları ile bu tez çalışmasında elde edilen bulgular karşılaştırıldığında/birlikte değerlendirildiğinde;
 - Doğal bir karbon kaynağı olan *Nerium oleander* ekstraktları kullanılarak, son derece küçük boyutlu (<5 nm) karbon nanodot sentezinin gerçekleştirilebilirliği doğrulanmıştır.
 - Karbon nanodotların MCF-7 hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksikite etkilerinin düşük veya doza bağlı olduğu desteklenmektedir.
 - Karbon nanodotların HDFa hücre hatları üzerinde *in vitro* sitotoksikite etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.
 - Karbon nanodotların hücrelerde oksidatif strese yol açma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir.
 - Karbon nanodotların MCF-7 hücrelerinde, hücre döngüsü üzerinde etkilerinin olduğu ve hücreleri G0/G1 fazında tutarak müdahale etmeleri nedeniyle, hücre çekirdeğine girebildikleri fikri desteklenmektedir.

Çizelge 8.1 Benzer çalışmalara dair literatür verileri

Kaynak	Parçacık Türü	Karbon Kaynağı	Sentez Yöntemi	Parçacık Boyutu	Sitotoksosite
Bu çalışma (2019)	CD	<i>Nerium oleander</i>	Termal	2 – 14 nm	MCF-7, insan meme kanser hücresi; HDFa, insan primer dermal fibroblast hücresi MCF-7 hücrelerinde doza bağlı sitotoksosite, HDFa hücrelerinde sitotoksosite yok MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsünde blokasyon, G0/G1 fazında tutuklama
Kalytchuk vd. 2017 [136]	N,S-CD	Sitrik asit ve L-sistein	Hidrotermal	3-6.5 nm	NIH/3T3, fare fibroblast hücresi; HeLa, rahim ağzı kanseri hücresi Düşük sitotoksosite HeLa hücre döngüsü üzerinde etkisi yok, NIH/3T3 hücrelerinde G0/G1 fazında doza bağlı hafif tutuklanma
Periasamy vd. 2016 [141]	CNP	-	-	50-100 nm	hMSCs, insan mezeneşimal kök hücresi Doza bağlı sitotoksosite Hücre döngüsünde hafif blokasyon, G0/G1 fazında doza bağlı artan tutuklanma
Havrdova vd. 2016 [142]	CD-Pri CD-PEG CD-PEI	Mum isi	Oksidatif asit muamelesi	4-7 nm	NIH/3T3, fare fibroblast hücresi CD-Pri: düşük sitotoksosite, G2/M fazı blokasyonu, oksidatif strese neden olma, hücre çekirdeğine giriş yok CD-PEG: düşük sitotoksosite, hücre morfolojisi, hücre içi trafik ve hücre döngüsünde herhangi bir anormallik yok CD-PEI: sitotoksik, hücre çekirdeğine giriş, hücre döngüsünün G0/G1 fazında büyük değişimler, G2/M fazı blokasyonu
Li vd. 2014 [150]	CD	Zencefil suyu	Hidrotermal	8.2 ± 0.6 nm	HepG2, insan karaciğer kanser hücresi; MCF-10A, insan normal meme hücresi; FL83B, fare normal karaciğer hücresi; A549, insan akciğer kanser hücresi Doza bağlı sitotoksosite, HepG2 hücre inhibisyonunda yüksek seçicilik HepG2 hücre döngüsü üzerinde etkili (SubG1 fazında artış), diğer hücrelerin hücre döngüsü üzerinde belirgin bir etki yok

ÖNERİLER

Elde edilen bulgular doğrultusunda çalışmanın ilerleyen aşamalarında araştırılması önerilen alanlar aşağıda listelenmiştir.

- Karbon nanodotların, HDFa insan primer deri fibroblast hücreleri üzerinde, sitotoksik aktivite göstermedikleri, hatta proliferasyona olanak sağladıkları belirlenmiş olsa da; CD'lerin bu hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksikite çalışmalarına ek olarak, *in vitro* genotoksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca, söz konusu parçacıkların, diğer hücre hatları (normal ve kanser) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, farklı kanser türlerinin tedavisi için kullanılabilirliklerinin irdelenmesi bakımından önem taşımaktadır.
- Karbon nanodotların HDFa hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, bu nanoparçacıkların biyogüvenliği ve MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri ile kıyaslanması bakımından önem taşıdığı için çalışmanın ilerleyen aşamalarında incelenmelidir.
- MCF-7 hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* genotoksikite ve hücre döngüsü çalışmaları neticesinde, CD'lerin DNA hasarına yol açtığı ve hücre döngüsünde G0/G1 fazında blokasyona neden olduğu belirlenmiştir. CD'lerin neden olduğu DNA hasarının, diğer mekanizmaların yanı sıra, karbon temelli nanomalzemelerde yaygın olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu öngörünün doğrulanması için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Zaman, M., Ahmad, E., Qadeer. A., Rabbani. G., Khan. R.H., (2014). "Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation", *Int J Nanomedicine*, 9:899-912.
 - [2] Ramos, A.P., Cruz, M.A.E., Tovani, C.B., Ciancaglini, P., (2017). "Biomedical applications of nanotechnology", *Biophys Rev*, 9:79-89.
 - [3] Rokde, K.Y., Dahikar, P.B., Hedau, M.J., Shende, S.S, (2014). "A Role of Nanotechnology in Biomedical Applications", *International Journal of Innovative Research in Computer and Communication Engineering*, 5709-15.
 - [4] Stark, W.J., Stoessel, P.R., Wohlleben, W., Hafner, A., (2015). "Industrial applications of nanoparticles", *Chem Soc Rev*, 44:5793-805.
 - [5] Santos, C., Gabriel, B., Blanchy, M., Neto, V., Santos, C.S.C., Menes, O. et al., (2015). "Industrial applications of nanoparticles-a prospective overview", *Materials Today: Proceedings 2*, 456-465.
 - [6] Khan, I., Saeed ,K., Khan, I., (2017). "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities", *Arab J Chem*, xx:1-24.
 - [7] Ngô, C., Van de Voorde, M., (2014). "Nanotechnology in a Nutshell", Atlantis Press, Paris.
 - [8] Xiao, L., Sun, H., (2018). "Novel properties and applications of carbon nanodots", *Nanoscale Horizons*, 3:565-97.
 - [9] Papaioannou, N., Marinovic, A., Yoshizawa, N., Goode, A.E., Fay, M., Khlobystov, A., et al., (2018). "Structure and solvents effects on the optical properties of sugar-derived carbon nanodots", *Sci Rep*, 8:1-10.
 - [10] Zhang, B., (2018). "Physical Fundamentals of Nanomaterials, Ch. Introduction", Chemical Industry Press, China.
 - [11] Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., (2012). "Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour", *Toxicol Appl Pharmacol*, 258:151-65.
 - [12] Jelinek, R., (2017). "Carbon Quantum Dots, Ch. Carbon-Dot Synthesis", Springer International Publishing, Switzerland, 5-27.
 - [13] Sun, Y.P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K.A.S., Pathak, P., et al., (2006). "Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence", *J Am*

Chem Soc, 128:7756-7.

- [14] Zhai, X., Zhang, P., Liu, C., Bai, T., Li, W., Dai, L., et al., (2012). "Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis", *Chem Commun*, 48:7955-7.
- [15] Liu, H., Ye, T., Mao, C., (2007). "Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot", *Angew Chemie - Int Ed*, 46:6473-5.
- [16] Miao, P., Han, K., Tang, Y., Wang, B., Lin, T., Cheng, W., (2015). "Recent advances in carbon nanodots: Synthesis, properties and biomedical applications", *Nanoscale*, 7:1586-95.
- [17] Goryacheva, I.Y., Sapelkin, A.V., Sukhorukov, G.B., (2017). "Carbon nanodots: Mechanisms of photoluminescence and principles of application", *Trends Anal Chem*, 90:27-37.
- [18] Omer, K., Hama Aziz, K., Salih, Y., Tofiq, D., Hassan, A., (2018). "Photoluminescence enhancement via microwave irradiation of carbon quantum dots derived from solvothermal of L-Arginine", *New J Chem*, 1-21.
- [19] Schmidt, R., Gonjal, J.P., Morán, E., (2015). "Microwave-Assisted Hydrothermal Synthesis of Nanoparticles", *CRC Concise Encycl. Nanotechnol.*, 561-72.
- [20] Mohamad, N.A.N., Jai, J., Arham, N.A., Hadi, A., (2013). "A short review on the synthesis of bimetallic nanoparticles using plant extract", *IEEE Int. Conf. Control Syst. Comput. Eng.*, 334-9.
- [21] Kavitha, K., Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, H., Yashwantha Rao, H., Harini, B., et al., (2013). "Plants as Green Source towards Synthesis of Nanoparticles", *Int Res J Biol Sci*, 2:66-76.
- [22] Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S.K., Poinern, G.E.J., (2015). "Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities", *Materials (Basel)*, 8(11): 7278-7308.
- [23] Fadllan, A., Marwoto, P., Aji, M.P., Susanto, Iswari R.S., (2017). "Synthesis of carbon nanodots from waste paper with hydrothermal method", *AIP Conf. Proc.*, 1788(1).
- [24] Varisco, M., Zufferey, D., Ruggi, A., Zhang, Y., Erni, R., Mamula, O., (2017). "Synthesis of hydrophilic and hydrophobic carbon quantum dots from waste of wine fermentation", *R Soc Open Sci*, 4(12):170900.
- [25] Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., (2014). "One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper(II) ion detection", *Sensors Actuators B Chem*, 196:647-52.
- [26] Phadke, C., Mewada, A., Dharmatti, R., Thakur, M., Pandey, S., Sharon, M., (2015). "Biogenic Synthesis of Fluorescent Carbon Dots at Ambient Temperature Using *Azadirachta indica* (Neem) gum", *J Fluoresc*, 25:1103-7.
- [27] Mewada, A., Pandey, S., Shinde, S., Mishra, N., Oza, G., Thakur, M., et al., (2013). "Green synthesis of biocompatible carbon dots using aqueous extract of *Trapa bispinosa* peel", *Mater Sci Eng C*, 33:2914-7.

- [28] Li, J., Zhang, L., Li, P., Zhang, Y., Dong, C., (2018). "One step hydrothermal synthesis of carbon nanodots to realize the fluorescence detection of picric acid in real samples", *Sensors Actuators B Chem*, 258:580-8.
- [29] Liu, H., Ding, L., Chen, L., Chen, Y., Zhou, T., Li, H., et al., (2018). "A facile, green synthesis of biomass carbon dots coupled with molecularly imprinted polymers for highly selective detection of oxytetracycline", *J Ind Eng Chem*, 69:455-63.
- [30] Bano, D., Kumar, V., Singh, V.K., Hasan, S.H., (2018). "Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots for the detection of mercury(ii) and glutathione", *New J Chem*, 42:5814-21.
- [31] Bhatt, S., Bhatt, M., Kumar, A., Vyas, G., Gajaria, T., Paul, P., (2018). "Green route for synthesis of multifunctional fluorescent carbon dots from Tulsi leaves and its application as Cr(VI) sensors, bio-imaging and patterning agents", *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 167:126-33.
- [32] Bayat, A., Masoum, S., Hosseini, E.S., (2019). "Natural plant precursor for the facile and eco-friendly synthesis of carbon nanodots with multifunctional aspects", *J Mol Liq*, 281:134-40.
- [33] Simsek, S., Alas, M.Ö., Ozbek, B., Genc, R., (2019). "Evaluation of the Physical Properties of Fluorescent Carbon Nanodots Synthesized using Nerium oleander Extracts by Microwave-Assisted Synthesis Methods", *J Mater Res Technol*, 8(3):2721-2731.
- [34] Park, B., (2007). "Current and Future Applications of Nanotechnology", *Issues in Environ Sci Technol*, 24:1-18.
- [35] Norlen, H.I.A., Andreoli, C., Lovera, A., Grollino, M.G., Pacchierrotti, F., et al., (2014). "JRC Science and Policy Reports: Interlaboratory comparison study of the Colony Forming Efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials", Publications Office of the EU.
- [36] Li, J., Yao, M., Shao, Y., Yao, D., (2018). "The application of bio-nanotechnology in tumor diagnosis and treatment: A view", *Nanotechnol Rev*, 7:257-66.
- [37] Ghattas, N.I., Carver, J.S., (2012). "Integrating nanotechnology into school education: A review of the literature", *Res Sci Technol Educ*, 30:271-84.
- [38] Roco, M.C., (2011). "The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years", *J Nanoparticle Res*, 13:427-45.
- [39] Hulla, J.E., Sahu, S.C., Hayes, A.W., (2015). "Nanotechnology: History and future", *Hum Exp Toxicol*, 34:1318-21.
- [40] Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H.J., Gearheart, L., Raker, K., et al., (2004). "Electrophoretic analysis and purification of fluorescent sing-walled carbon nanotube fragments", *J Am Chem Soc*, 126:12736-7.
- [41] Guozhong C., (2004). "Nanostructures and Nanomaterials", Imperial College Press, London.
- [42] Manivasakan, P., (2011). "Synthesis of Al₂O₃, ZrO₂ and TiO₂ Nanoparticles from Natural Minerals for Industrial Applications", Anna University of Technology,

Coimbatore, India.

- [43] Subbenaik, S.C., (2016). "Plant Nanotechnology Principles and Practices, Ch. Physical and Chemical Nature of Nanoparticles", Springer International Publishing Switzerland, 15-27.
- [44] Zhang, B., (2018). "Physical Fundamentals of Nanomaterials, Ch. Optical Properties of Nanomaterials", Chemical Industry Press, China, 291-335.
- [45] Zhang, B., (2018). "Physical Fundamentals of Nanomaterials, Ch. Mechanical Properties of Nanomaterials", Chemical Industry Press, China, 211-250.
- [46] Balaguru, B.R.J., Jeyaprakash, B.G., (2010). "Melting points, mechanical properties of nanoparticles and Hall Petch relationship for nanostructured materials". NPTEL–Electr Electron Eng–Semicond Nanodevices, 1-18.
- [47] Zhang, B., (2018). "Physical Fundamentals of Nanomaterials, Ch. Thermal Properties of Nanomaterials", Chemical Industry Press, China, 251-289.
- [48] Vajtai, R., (2013)., "Springer handbook of nanomaterials" Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- [49] Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S., (2012). "Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine", Nanoscale Res Lett, 7:144.
- [50] Zhang, B., (2018). "Physical Fundamentals of Nanomaterials, Ch. Magnetic Properties of Nanomaterials", Chemical Industry Press, China, 387-450.
- [51] Mørup, S., Frandsen, C., Hansen, M.F., (2017). "Magnetic properties of nanoparticles", Oxford University Press, v.1.
- [52] Ealias, A.M., Saravanakumar, M.P., (2017). "A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application", IOP Conf Ser Mater Sci Eng, 263.
- [53] Cayuela, A., Soriano, M.L., Carrillo-Carrión, C., Valcárcel, M., (2016). "Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency", Chem Commun, 52:1311-26.
- [54] Bhatia, S., (2016). "Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae, Ch. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications", Springer International Publishing, Switzerland.
- [55] Li, H., Kang, Z., Liu, Y., Lee, S.T., (2012). "Carbon nanodots: Synthesis, properties and applications", J Mater Chem, 22:24230-53.
- [56] Arole, V.M., Munde, P.S.V., (2014). "Fabrication of Nanomaterials By Top-Down and Bottom-Up Approaches – an Overview", JAAS:Material Science (Special Issue), 1(2):89-93.
- [57] Ates, H., Bahceci, E., (2015). "Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri", Gazi Üniversitesi Fen Bilim Derg, 3:483-99.
- [58] Toygun, Ş., Köneçoğlu, G., Kalpaklı, Y., (2013). "General principles of Sol-Gel", J

- [59] Devatha, C.P., Thalla, A.K., (2018). "Synthesis of Inorganic Nanomaterials: Advances and Key Technologies, Ch. Green Synthesis of Nanomaterials", Woodhead Publishing, Elsevier, 169-84.
- [60] Mansfield, E., Tyner, K.M., Poling, C.M., Blacklock, J.L., (2014). "Determination of nanoparticle surface coatings and nanoparticle purity using microscale thermogravimetric analysis", *Anal Chem*, 86:1478-84.
- [61] De, B., Kumar, M., Mandal, B.B., Karak, N., (2015). "An in situ prepared photo-luminescent transparent biocompatible hyperbranched epoxy/carbon dot nanocomposite", *RSC Adv*, 5:74692-704.
- [62] Nie, H., Li, M., Li, Q., Liang, S., Tan, Y., Sheng, L., et al., (2014). "Carbon dots with continuously tunable full-color emission and their application in ratiometric pH sensing", *Chem Mater*, 26:3104-12.
- [63] Edison, T.N.J.I., Atchudan, R., Sethuraman, M.G., Shim, J.J., Lee, Y.R., (2016). "Microwave assisted green synthesis of fluorescent N-doped carbon dots: Cytotoxicity and bio-imaging applications", *J Photochem Photobiol B Biol*, 161:154-61.
- [64] Song, Y., Kang, X., Zuckerman, N.B., Phebus, B., Konopelski, J.P., Chen, S., (2011). "Ferrocene-functionalized carbon nanoparticles", *Nanoscale*, 3:1984-9.
- [65] Pandey, S., Gedda, G.R., Thakur, M., Bhaisare, M.L., Talib, A., Khan, M.S., et al., (2017). "Theranostic carbon dots 'clathrate-like' nanostructures for targeted photo-chemotherapy and bioimaging of cancer", *J Ind Eng Chem*, 56:62-73.
- [66] Choi, Y., Thongsai, N., Chae, A., Jo, S., Bi Kang, E., Paoprasert, P., et al., (2017). "Microwave-assisted synthesis of luminescent and biocompatible lysine-based carbon quantum dots", *J Ind Eng Chem*, 47:329-5.
- [67] Alloyeau, D., Ricolleau, C., Oikawa, T., Langlois, C., Le Bouar, Y., Loiseau, A., (2009). "Comparing electron tomography and HRTEM slicing methods as tools to measure the thickness of nanoparticles", *Ultramicroscopy*, 109:788-96.
- [68] Pehlivan, M., Simsek, S., Ozbek, S., Ozbek, B., (2019). "An extensive study on the synthesis of iron based magnetic aluminium oxide nanocomposites by solution combustion method", *Journal of Materials Research and Technology*, 8(2):1746-1760.
- [69] Kim, T.H., (2015). "Synthesis and Applications of Carbon Dots", Griffith University, Australia.
- [70] Sun, Y.-P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando K.A.S., Pathak, P., et al., (2006). "Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence", *J Am Chem Soc*, 128:7756-7.
- [71] Gonçalves, H., Da Silva, J.C.G.E., (2010). "Fluorescent carbon dots capped with PEG200 and mercaptosuccinic acid", *J Fluoresc*, 20:1023-8.
- [72] Li, H., He, X., Kang, Z., Huang, H., Liu, Y., Liu, J., et al., (2010). "Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design", *Angew Chemie - Int*

Ed, 49:4430-4.

- [73] Li, H., He, X., Liu, Y., Huang, H., Lian, S., Lee, S.T., et al., (2011). "One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties", *Carbon*, 49:605-9.
- [74] Park, S.Y., Lee, H.U., Park, E.S., Lee, S.C., Lee, J.W., Jeong, S.W., et al., (2014). "Photoluminescent green carbon nanodots from food-waste-derived sources: Large-scale synthesis, properties, and biomedical applications", *ACS Appl Mater Interfaces*, 6:3365-70.
- [75] Bourlinos, A.B., Stassinopoulos, A., Anglos, D., Zboril, R., Karakassides, M., Giannelis, E.P., (2008). "Surface functionalized carbogenic quantum dots", *Small*, 4:455-8.
- [76] Krysmann, M.J., Kellarakis, A., Dallas, P., Giannelis, E.P., (2012). "Formation mechanism of carbogenic nanoparticles with dual photoluminescence emission", *J Am Chem Soc*, 134:747-50.
- [77] Guo, Y., Zhang, L., Cao, F., Leng, Y., (2016). "Thermal treatment of hair for the synthesis of sustainable carbon quantum dots and the applications for sensing Hg^{2+} ", *Sci Rep*, 6:1-7.
- [78] Yang, Z.C., Wang, M., Yong, A.M., Wong, S.Y., Zhang, X.H., Tan, H., et al., (2011). "Intrinsically fluorescent carbon dots with tunable emission derived from hydrothermal treatment of glucose in the presence of monopotassium phosphate", *Chem Commun*, 47:11615-7.
- [79] Hsu, P.C., Chang, H.T., (2012). "Synthesis of high-quality carbon nanodots from hydrophilic compounds: Role of functional groups", *Chem Commun*, 48:3984-6.
- [80] Roy, P., Chen, P.C., Periasamy, A.P., Chen, Y.N., Chang, H.T., (2015). "Photoluminescent carbon nanodots: Synthesis, physicochemical properties and analytical applications", *Mater Today*, 18:447-58.
- [81] Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., Yang, X., (2009). "Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties", *Chem Commun*, 5118-20.
- [82] Shi, L., Zhao, B., Li, X., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, C., et al., (2016). "Eco-friendly synthesis of nitrogen-doped carbon nanodots from wool for multicolor cell imaging, patterning, and biosensing", *Sensors Actuators B Chem*, 235:316-24.
- [83] Wen, X., Shi, L., Wen, G., Li, Y., Dong, C., Yang, J., et al., (2015). "Green synthesis of carbon nanodots from cotton for multicolor imaging, patterning, and sensing", *Sensors Actuators B Chem*, 221:769-76.
- [84] Liu, H., He, Z., Jiang, L.P., Zhu, J.J., (2015). "Microwave-assisted synthesis of wavelength-tunable photoluminescent carbon nanodots and their potential applications", *ACS Appl Mater Interfaces*, 7:4913-20.
- [85] Sun, X., Lei, Y., (2017). "Fluorescent carbon dots and their sensing applications", *Trends Anal Chem*, 89:163-80.
- [86] Jung, Y.K., Choi, Y., Kim, B.-S., (2016). "Carbon Nanomaterials for Biomedical

Applications", Springer International Publishing, London, v.5.

- [87] Zeng, Q., Shao, D., He, X., Ren, Z., Ji, W., Shan, C., et al., (2016). "Carbon dots as a trackable drug delivery carrier for localized cancer therapy: In vivo", *J Mater Chem B*, 4:5119-26.
- [88] Sharon, M., (2015). "Fluorescent carbon dots as a theranostic agent for controlled drug release", *Clin. Pharmacol. Biopharm.*, 4:66.
- [89] Tuerhong, M., Xu, Y., Yin, X.B., (2017). "Review on Carbon Dots and Their Applications", *Chinese J Anal Chem*, 45:139-50.
- [90] Feng, T., Ai, X., An, G., Yang, P., Zhao, Y., (2016). "Charge-Convertible Carbon Dots for Imaging-Guided Drug Delivery with Enhanced in Vivo Cancer Therapeutic Efficiency", *ACS Nano*, 10:4410-20.
- [91] Li, L., Zhang, R., Lu, C., Sun, J., Wang, L., Qu, B., Li, T., Liu, Y., Li, S., (2017). "In-situ synthesis of NIR-light emitting carbon dots derived from spinach for bio-imaging applications", *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 7328.
- [92] Hsu, P.C., Shih, Z.Y., Lee, C.H., Chang, H.T., (2012). "Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots", *Green Chem*, 14:917-20.
- [93] Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Coşkun, M., (2012). "Nano-C60 ve Pestisit Karışımlarının In-Vitro Sito-Genotoksik Etkilerinin RTG-2 ve IMR-90 Hücre Kültürlerinde Klonojenik Test, Mikronükleus, Komet, Halo ve Gama-H2AX Testleri Kullanılarak Araştırılması", TÜBİTAK Proje No: 209T046, Bursa.
- [94] Chen, L., Giesy, J.P., Xie, P., (2011). "The dose makes the poison", *Nat Nanotechnol*, 6:329-329.
- [95] Tokur, O., Aksoy, A., (2017). "In Vitro Sitotoksikite Testleri", *Harran Üniversitesi Vet Fakültesi Derg*, 6:112-8.
- [96] Altaş, E., (2009). "Co-Cr ve Ni-Cr Esaslı Kron Köprü Protezlerin Üretimi Sürecinde Meydana Gelebilecek İşçi Kaynaklı Hataların Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin In-Vitro Koşullarda Araştırılması", *Ege Üniversitesi, İzmir*.
- [97] Stone, V., Johnston, H., Schins, R.P.F., (2009). "Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology", *Crit Rev Toxicol*, 39(7):613-26.
- [98] Kumar, A., Singh, S., Shanker, R., Dhawan, A., (2018). "Nanotoxicology: Experimental and Computational Perspectives, Ch. Nanotoxicology: Challenges for", *Royal Society of Chemistry, United Kingdom*, 1-16.
- [99] Hillegass, J.M., Shukla, A., Lathrop, S.A., MacPherson, M.B., Fukagawa, N.K., Mossman, B.T., (2010). "Assessing nanotoxicity in cells in vitro", *Wiley Interdiscip Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2:219-31.
- [100] Kumar, V., Dasgupta, N., Ranjan, S., (2018). "Nanotoxicology : Toxicity Evaluation, Risk Assessment and Management", *CRC Press, Taylor & Francis Group*.
- [101] Cimpan, M.R., Mordal, T., Schölermann, J., Allouni, Z.E., Pliquett, U., Cimpan, E., (2013). "An impedance-based high-throughput method for evaluating the

- cytotoxicity of nanoparticles”, J Phys Conf Ser, 429.
- [102] Giaever, I., Keese, C.R., (1984). “Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field”, Proc Natl Acad Sci, 81:3761-4.
- [103] Giaever, I., Keese, C.R., (1991). “Micromotion of mammalian cells measured electrically”, Proc Natl Acad Sci USA, 88:7896-900.
- [104] Rahim, S., Üren, A., (2011). “A Real-time Electrical Impedance Based Technique to Measure Invasion of Endothelial Cell Monolayer by Cancer Cells”, J Vis Exp, 16-9.
- [105] GmbH RD. RTCA SP Instrument Operator’s Manual 2013:1-82.
- [106] Genç, K., Genç, Ş., Sönmez, Ü., Yılmaz, O., Sönmez, A., Tuğyan, K., et al., (2002). “Primer Oligodendrosit Kültüründe Metamfetamine Bağlı Hücre Ölümü”, DEU Tıp Fakültesi Derg, Eylül: 141-147.
- [107] Walters, C., Pool, E., Somerset, V., (2016). “Toxicology - New Aspects to This Scientific Conundrum, Ch. Nanotoxicology: A Review”, InTechOpen, 75-100.
- [108] Karlsson, H.L., (2010). “The comet assay in nanotoxicology research”, Anal Bioanal Chem, 398:651-66.
- [109] Dinçer, Y., Kankaya, S., (2010). “DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay”, Türkiye Klin J Med Sci, 30:1365-73.
- [110] Battal, D., Çelik, A., Güler, G., Aktaş, A., Yildirimcan, S., Ocakoglu, K., et al., (2015). “SiO₂ Nanoparticle-induced size-dependent genotoxicity-an in vitro study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay”, Drug Chem Toxicol, 38:196-204.
- [111] Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., (2011). “Genetik Toksikite Testleri”, Türk Bilim Araştırma Vakfı Derg, 4:221-9.
- [112] Fenech, M., Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., Üstüner, D., Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z., (2011). “Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi”, Türk Bilim Araştırma Vakfı Derg, 101:241-252.
- [113] Üstüner, D., (2011). “Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı”, Türk Bilim Araştırma Vakfı Derg, 4(1):64-69.
- [114] Fenech, M., (2007). “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, Nat Protoc 2:1084-104.
- [115] Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z., (2011). “Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi”, Türk Hij ve Deney Biyol Derg, 68:241-52.
- [116] Yıldız, M., Arıkan, E.S., (2007). “Pestisitlerin Sitotoksik Etkileri ve Bitki Biyotestleri”, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknol Derg, 8:299-311.
- [117] Demirel, S., Zamani, A. G., (2002). “Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları”, Genel Tıp Derg, 12:123-127.
- [118] Özkul M., (2016). “Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden 2,4-D ve Picloram’ın Genotoksik Etkilerinin Bitki Doku Kültüründe Allium Testi ile İncelenmesi”. Gazi Üniversitesi, Ankara.

- [119] Ataseven N., (2015). "Gıda Katkı Maddeleri olarak Kullanılan Monosodyum Glutamat, Sodyum Propiyonat ve Potasyum Propiyonatın İnsan Lenfosit Kültüründe Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi", Gazi Üniversitesi, Ankara.
- [120] Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., Desaix, J., Choi, J., Avissar, Y., (2013). "Biology", OpenStax.
- [121] Pozarowski, P., Darzynkiewicz, Z., (2004). "Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. In: Schönthal A.H. (eds) Checkpoint Controls and Cancer. " Methods in Molecular Biology, Humana Press, v. 281.
- [122] Cailotto, S., Amadio, E., Facchin, M., Selva, M., Pontoglio, E., Rizzolio, F., et al., (2018). "Carbon Dots from Sugars and Ascorbic Acid: Role of the Precursors on Morphology, Properties, Toxicity, and Drug Uptake", ACS Med Chem Lett, 9:832-7.
- [123] Li, D., Na, X., Wang, H., Xie, Y., Cong, S., Song, Y., et al., (2018). "Fluorescent Carbon Dots Derived from Maillard Reaction Products: Their Properties, Biodistribution, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity", J Agric Food Chem, 66:1569-75.
- [124] Bagheri, Z., Ehtesabi, H., Hallaji, Z., Latifi, H., Behroodi, E., (2018). "Investigation the cytotoxicity and photo-induced toxicity of carbon dot on yeast cell", Ecotoxicol Environ Saf, 161:245-50.
- [125] Gomez, I.J., Arnaiz, B., Cacioppo, M., Arcudi, F., Prato, M., (2018). "Nitrogen-doped carbon nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel", J Mater Chem B, 6:5540-8.
- [126] Sai, L., Liu, S., Qian, X., Xu, X., Yu, Y., (2018). "Nontoxic fluorescent carbon nanodot serving as a light conversion material in plant for UV light utilization", Colloids Surfaces B Biointerfaces, 169:422-8.
- [127] Bihani, O., Rai, T., Panda, D., (2018). "Interaction of proteins with lemon-juice/glutathione-derived carbon nanodot: Interplay of induced-aggregation and co-solubilization", Int J Biol Macromol, 112:1234-40.
- [128] Li, J., Zhang, L., Li, P., Zhang, Y., Dong, C., (2018). "One step hydrothermal synthesis of carbon nanodots to realize the fluorescence detection of picric acid in real samples", Sensors Actuators B Chem, 258:580-8.
- [129] Si, M., Zhang, J., He, Y., Yang, Z., Yan, X., Liu, M., et al., (2018). "Synchronous and rapid preparation of lignin nanoparticles and carbon quantum dots from natural lignocellulose", Green Chem, 20:3414-9.
- [130] Zhang, X., Lu, J., Zhou, X., Guo, C., Wang, C., (2017). "Rapid microwave synthesis of N-doped carbon nanodots with high fluorescence brightness for cell imaging and sensitive detection of iron (III)", Opt Mater (Amst), 64:1-8.
- [131] Xie, P., Yang, S.T., He, T., Yang, S., Tang, X.H., (2017). "Bioaccumulation and toxicity of carbon nanoparticles suspension injection in intravenously exposed mice", Int J Mol Sci, 18.
- [132] Duarah, R., Karak, N., (2017). "Facile and Ultrafast Green Approach to Synthesize

Biobased Luminescent Reduced Carbon Nanodot: An Efficient Photocatalyst", ACS Sustain Chem Eng, 5:9454-66.

- [133] Majumdar, B., Mandani, S., Bhattacharya, T., Sarma, D., Sarma, T.K., (2017). "Probing Carbocatalytic Activity of Carbon Nanodots for the Synthesis of Biologically Active Dihydro/Spiro/Glyco Quinazolinones and Aza-Michael Adducts", J Org Chem, 82:2097-106.
- [134] Wang, S., Li, C., Qian, M., Jiang, H., Shi, W., Chen, J., et al., (2017). "Augmented glioma-targeted theranostics using multifunctional polymer-coated carbon nanodots", Biomaterials, 141:29-39.
- [135] Gaddam, R.R., Mukherjee, S., Punugupati, N., Vasudevan, D., Patra, C.R., Narayan, R., et al., (2017). "Facile synthesis of carbon dot and residual carbon nanobeads: Implications for ion sensing, medicinal and biological applications", Mater Sci Eng C, 73:643-52.
- [136] Kalytchuk, S., Poláková, K., Wang, Y., Froning, J.P., Cepe, K., Rogach, A.L., et al., (2017). "Carbon Dot Nanothermometry: Intracellular Photoluminescence Lifetime Thermal Sensing", ACS Nano, 11:1432-42.
- [137] Wang, L., Li, B., Xu, F., Shi, X., Feng, D., Wei, D., et al., (2016). "High-yield synthesis of strong photoluminescent N-doped carbon nanodots derived from hydrosoluble chitosan for mercury ion sensing via smartphone APP", Biosens Bioelectron, 79:1-8.
- [138] Lee, C., Kwon, W., Beack, S., Lee, D., Park, Y., Kim, H., et al., (2016). "Biodegradable nitrogen-doped carbon nanodots for non-invasive photoacoustic imaging and photothermal therapy", Theranostics, 6:2196-208.
- [139] Suvarnaphaet, P., Tiwary, C.S., Wetcharungsri, J., Porntheeraphat, S., Hoonsawat, R., Ajayan, P.M., et al., (2016). "Blue photoluminescent carbon nanodots from limeade", Mater Sci Eng C, 69:914-21.
- [140] Wen, X., Shi, L., Wen, G., Li, Y., Dong, C., Yang, J., et al., (2016). "Green and facile synthesis of nitrogen-doped carbon nanodots for multicolor cellular imaging and Co 2+ sensing in living cells", Sensors Actuators B Chem, 235:179-87.
- [141] Periasamy, V.S., Athinarayanan, J., Alfawaz, M.A., Alshatwi, A.A., (2015). "Carbon nanoparticle induced cytotoxicity in human mesenchymal stem cells through upregulation of TNF3, NFKBIA and BCL2L1 genes", Chemosphere, 144:275-84.
- [142] Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., et al., (2016). "Toxicity of carbon dots – Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle", Carbon, 99:238-48.
- [143] Shi, L., Zhao, B., Li, X., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, C., et al., (2016). "Eco-friendly synthesis of nitrogen-doped carbon nanodots from wool for multicolor cell imaging, patterning, and biosensing", Sensors Actuators B Chem, 235:316-24.
- [144] Wang, D., Zhu, L., McCleese, C., Burda, C., Chen, J.F., Dai, L., (2016). "Fluorescent carbon dots from milk by microwave cooking", RSC Adv, 6:41516-21.
- [145] Alas, M.Ö., Genç, R., (2016). "Floresans Karbon Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi ve

Pasivasyon Ajanının Molekül Ağırlığının Nanoparçacık Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi”, Sinop Üniversitesi Fen Bilim Derg, 1:123-39.

- [146] Shi, L., Li, Y., Li, X., Zhao, B., Wen, X., Zhang, G., et al., (2016). “Controllable synthesis of green and blue fluorescent carbon nanodots for pH and Cu 2+ sensing in living cells”, Biosens Bioelectron, 77:598-602.
- [147] Wang, W., Lu, Y.C., Huang, H., Wang, A.J., Chen, J.R., Feng, J.J., (2015). “Facile synthesis of N, S-codoped fluorescent carbon nanodots for fluorescent resonance energy transfer recognition of methotrexate with high sensitivity and selectivity”, Biosens Bioelectron, 64:517-22.
- [148] Wang, S., Chen, J., Li, C., Huang, R., Wang, Y., Shi, W., et al., (2015). “Biomedical Imaging: Direct Solvent-Derived Polymer-Coated Nitrogen-Doped Carbon Nanodots with High Water Solubility for Targeted Fluorescence Imaging of Glioma”, Small, 11:3506-3506.
- [149] Wang, K., Guan, F., Li, H., Li, M., Feng, H., Fan, H., (2015). “One-step synthesis of carbon nanodots for sensitive detection of cephalexin”, RSC Adv, 5:20511-5.
- [150] Li, C.L., Ou, C.M., Huang, C.C., Wu, W.C., Chen, Y.P., Lin, T.E., et al., (2014). “Carbon dots prepared from ginger exhibiting efficient inhibition of human hepatocellular carcinoma cells”, J Mater Chem B, 2:4564-71.
- [151] Wang, K., Gao, Z., Gao, G., Wo, Y., Wang, Y., Shen, G., et al., (2013). “Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots”, Nanoscale Res Lett, 8:1-9.
- [152] Hsu, P.-C., Chen, P.-C., Ou, C.-M., Chang, H.-Y., Chang, H.-T., (2013). “Extremely high inhibition activity of photoluminescent carbon nanodots toward cancer cells”, J Mater Chem B, 1:1774-81.
- [153] Edison, T.N.J.I., Atchudan, R., Sethuraman, M.G., Shim, J.J., Lee, Y.R., (2016). “Microwave assisted green synthesis of fluorescent N-doped carbon dots: Cytotoxicity and bio-imaging applications”, J Photochem Photobiol B Biol, 161:154-61.
- [154] Migliore, L., Di Bucchianico, S., Uboldi, C., (2014). “Genotoxicity and DNA Repair- A Practical Approach, Ch. The In Vitro Micronucleus Assay and FISH Analysis”, Humana Press, New York, 73-102.
- [155] Alas, M.O., Genc, R., (2017). “An investigation into the role of macromolecules of different polarity as passivating agent on the physical, chemical and structural properties of fluorescent carbon nanodots”, J Nanoparticle Res, 19:185.
- [156] Hu, S., Trinchì, A., Atkin, P., Cole, I., (2015). “Tunable photoluminescence across the entire visible spectrum from carbon dots excited by white light”, Angew Chemie - Int Ed, 54:2970-4.
- [157] Lai, Q., Zhu, S., Luo, X., Zou, M., Huang, S., (2012). “Ultraviolet-visible spectroscopy of graphene oxides”, AIP Adv, 2:3-8.
- [158] Carata, E., Anna Tenuzzo, B., Arnò, F., Buccolieri, A., Serra, A., Manno, D., et al., (2012). “Stress response induced by carbon nanoparticles in *Paracentrotus lividus*”, Int J Mol Cell Med, 1:30-8.

- [159] De, B., Karak, N., (2013). "A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice", *RSC Adv*, 3:8286-90.
- [160] Zhao, Y., Liu, X., Yang, Y., Kang L, Yang Z, Liu W, et al., (2015). "Carbon Dots: From Intense Absorption in Visible Range to Excitation-Independent and Excitation-Dependent Photoluminescence", *Fullerenes Nanotub Carbon Nanostructures*, 23:922-9.
- [161] Liu, X., Pang, J., Xu, F., Zhang, X., (2016). "Simple Approach to Synthesize Amino-Functionalized Carbon Dots by Carbonization of Chitosan", *Sci Rep*, 6:31100.
- [162] Isnaeni, Rahmawati I., Intan, R., Zakaria, M., (2018). "Photoluminescence study of carbon dots from ginger and galangal herbs using microwave technique", *J Phys Conf Ser*, 985:0-6.
- [163] Baker, S.N., Baker, G.A., (2010). "Luminescent carbon nanodots: Emergent Nanolights", *Angew Chemie - Int Ed*, 49:6726-44.
- [164] Sonthanasamy, R.S.A., Fazry, S., Yamin, B.M., Lazim, A.M., (2018). "Surface functionalization of highly luminescent carbon nanodots from *Dioscorea hispida* with polyethylene glycol and branched polyethyleneimine and their in vitro study", *J King Saud Univ-Sci*.
- [165] Jelinek, R., (2017). "Carbon Quantum Dots, Ch. Carbon-Dot Synthesis", Springer International Publishing, Switzerland.
- [166] Sultana Shaik, A., Pasha Shaik, A., Al Faraj, A., Bammidi, V.K., (2018). "Effect of Polyethylene Glycol Surface Charge Functionalization of SWCNT on the in vitro and in vivo Nanotoxicity and Biodistribution Monitored Noninvasively using MRI", *Toxicol Mech Methods*, 0:1-41.
- [167] Liu, X., Li, H., Jin, Q., Ji. J., (2014). "Surface tailoring of nanoparticles via mixed-charge monolayers and their biomedical applications", *Small*, 10:4230-42.
- [168] Tatur, S., MacCarini, M., Barker, R., Nelson, A., Fragneto, G., (2013). "Effect of functionalized gold nanoparticles on floating lipid bilayers", *Langmuir*, 29:6606-14.
- [169] De, B., Voit, B., Karak, N., (2014). "Carbon dot reduced Cu₂O nanohybrid/hyperbranched epoxy nanocomposite: mechanical, thermal and photocatalytic activity", *RSC Adv*, 4:58453-9.
- [170] Milosavljevic, V., Moulick, A., Kopel, P., Adam, V., Kizek, R., Milosavljevic, V., Moulick, A., Kopel, P., Adam, V., Kizek, R., (2014). "Microwave preparation of carbon quantum dots with different surface modification", *J Metallomics Nanotechnol*, 3:16-22.
- [171] Li, W., Yue, Z., Wang, C., Zhang, W., Liu, G., (2013). "An absolutely green approach to fabricate carbon nanodots from soya bean grounds", *RSC Adv*, 3:20662-5.
- [172] Himaja, A.L., Karthik, P.S., Sreedhar, B., Singh, S.P., (2014). "Synthesis of carbon dots from kitchen waste: Conversion of waste to value added product", *J Fluoresc*, 24:1767-73.
- [173] Gupta, A., Verma, N.C., Khan, S., Nandi, C.K., (2016). "Carbon dots for naked eye

- colorimetric ultrasensitive arsenic and glutathione detection", *Biosens Bioelectron*, 81:465-72.
- [174] Naghdi, T., Atashi, M., Golmohammadi, H., Saeedi, I., Alanezhad, M., (2017). "Carbon quantum dots originated from chitin nanofibers as a fluorescent chemoprobe for drug sensing", *J Ind Eng Chem*, 52:162-7.
- [175] De, B., Voit, B., Karak, N., (2014). "Carbon dot reduced Cu₂O nanohybrid/hyperbranched epoxy nanocomposite: mechanical, thermal and photocatalytic activity", *RSC Adv*, 4:58453-9.
- [176] Țucureanu, V., Matei, A., Avram, A.M., (2016). "FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study", *Crit Rev Anal Chem*, 46:502-20.
- [177] Choi, J., Kim, N., Oh, J.W., Kim, F.S., (2018). "Bandgap engineering of nanosized carbon dots through electron-accepting functionalization", *J Ind Eng Chem*, 65:104-11.
- [178] Fadllan, A., Marwoto, P., Aji, M.P., Susanto Iswari, R.S., (2017). "Synthesis of carbon nanodots from waste paper with hydrothermal method", *AIP Conf Proc*, 1788.
- [179] Siddique, A.B., Pramanick, A.K., Chatterjee, S., Ray, M. (2018). "Amorphous Carbon Dots and their Remarkable Ability to Detect 2,4,6-Trinitrophenol", *Sci Rep*, 8:9770.
- [180] Lu, F., Yang, S., Song, Y., Zhai, C., Wang, Q., Ding, G., et al., (2019). "Hydroxyl functionalized carbon dots with strong radical scavenging ability promote cell proliferation", *Mater Res Express*, 6:65030.
- [181] Chen, Y., Yang, Q., Xu, P., Sun, L., Sun, D., Zhuo, K., (2017). "One-Step Synthesis of Acidophilic Highly-Photoluminescent Carbon Dots Modified by Ionic Liquid from Polyethylene Glycol", *ACS Omega*, 2:5251-9.
- [182] Hodgson, R.J., Plaxton, W.C., (1995). "Effect of polyethylene glycol on the activity, intrinsic fluorescence, and oligomeric structure of castor seed cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase", *FEBS Lett*, 368:559-62.
- [183] Jaiswal, A., Ghosh, S.S., Chattopadhyay, A., (2012). "One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly(ethylene glycol)", *Chem Commun*, 8:407.
- [184] Zhao, S., Li, C., Huang, H., Liu, Y., Kang, Z., (2015). "Carbon nanodots modified cobalt phosphate as efficient electrocatalyst for water oxidation", *J Mater*, 1:236-44.
- [185] Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C.P., O'Carroll, S.J., du Mez, E., et al., (2015). "Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time", *Biosensors*, 5:199-222.
- [186] Zhou, Y., Sun, H., Wang, F., Ren, J., Qu, X., (2017). "How functional groups influence the ROS generation and cytotoxicity of graphene quantum dots", *Chem Commun*, 53:10588-91.

- [187] Lu, F., Yang, S., Song, Y., Zhai, C., Wang, Q., Ding, G., et al., (2019). "Hydroxyl functionalized carbon dots with strong radical scavenging ability promote cell proliferation", *Mater Res Express*, 6.
- [188] Wang, D., Zhu, L., Chen, J.-F., Dai, L., (2015). "Can graphene quantum dots cause DNA damage in cells? ", *Nanoscale*, 7:9894-901.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sinem ŞİMŞEK KEKEVİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.11.1989 - Genk/BELÇİKA
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : sinemsimsekk@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2013
Lisans (Çift Anadal)	Kimya Mühendisliği	Ege Üniversitesi	2012
Lisans	Biyomühendislik	Ege Üniversitesi	2011
Lise	Fen Bilimleri	Tire Kutsan Anadolu Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014-2019	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2012-2014	Gebze Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Şimşek S., Alaş M.Ö., Genç R., Özbek B., (2019). "Evaluation of the Physical Properties of Fluorescent Carbon Nanodots Synthesized using Nerium oleander Extracts by Microwave-Assisted Synthesis Methods (Accepted for Publication)", Journal of Materials Research and Technology-JMR&T, 8(3):2721-2731.
2. Şimşek S., Alaş M.Ö., Özbek B., Genç R., (2019). "Fluorescent carbon dots from Nerium oleander: Effects of physical conditions and the extract types", Journal of Fluorescence, X:1-12.
3. Pehlivan M., Şimşek S., Özbek S., Özbek B., (2019). "Extensive Study on the Synthesis of Iron Based Magnetic Aluminium Oxide Nanocomposites by Solution Combustion Method", Journal of Materials Research and Technology-JMR&T, 8(2):1746-1760.

Bildiri

1. Şimşek S., Özbek B., (2018). "A new approach to dye removal from aqueous solutions: biological adsorption by human hair and modelling study ", 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 Ağustos 2018, Prag.
2. Pehlivan M., Şimşek S., Özbek S., Özbek B., (2018). "Synthesis and characterization of Fe-Al₂O₃ nanoparticles by solution combustion method", 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 Ağustos 2018, Prag.
3. Pehlivan M., Şimşek S., Özbek S., Özbek B., (2018). "An optimization study on the adsorption of reactive blue 19 dye onto iron based magnetic alumina nanocomposites from aqueous solutions", 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 Ağustos 2018, Prag.
4. Yayla B., Güneş H., Şimşek S., Özbek B., (2018). "A biosorption study on Reactive Blue 19 removal from aqueous solutions by autumn leaves and process

- optimization", 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 Ağustos 2018, Prag.
5. Güneş H., Yayla B., Şimşek S., Özbek B., (2018). "An optimisation and kinetic study on methyl orange removal from aqueous solutions by autumn leaves", 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA), 25-29 Ağustos 2018, Prag.
 6. Aktaş A., Şimşek S., Yetkin D., Özbek B., Battal D., Genç R., (2018). "In Vitro Genotoxicity and Clastogenicity Evaluation of Carbon-Based Engineered Nanoparticles (CDS)", 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 Haziran 2018, Ankara.
 7. Pehlivan M. , Şimşek S., Özbek S., Özbek B., (2018). "Effects of Synthesis Method on Al₂O₃ Nanoparticle Generation", Proceedings of Academic Conference Network (ACN) International Conference, 20-20 Şubat 2018, İstanbul.
 8. Pehlivan M., Şimşek S., Özbek S., Özbek B., (2018). "Characterization Study on Alumina Nanoparticles Synthesised by Solution Combustion Method", Proceedings of ACN (Academic Conference Network) International Conference, 20-20 Şubat 2018, İstanbul.
 9. Şimşek S., Yetkin D., Aktaş A., Battal D., Özbek B., Genç R., (2017). "An Evaluatory Study on in vitro Nanotoxicology of Fluorescent Carbon Dots", 14th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN17), 4-7 Temmuz 2017, Selanik.
 10. Şimşek S., Özbek B., Genç R., (2017). "Integration of Anti-Cancer Drugs on Carbon Nanodot", 14th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN17), 4-7 Temmuz 2017, Selanik.
 11. Şimşek S., Alaş M.Ö., Özbek B., Genç R., (2016). "Investigation of physical conditions on thermally synthesized carbon nanoparticles from Nerium oleander extracts",

22nd International Congress on Chemical and Process Engineering (CHISA), 27-31 Ağustos 2016, Prag.

12. Şimşek S., Alaş M.Ö., Özbek B., Genç R., (2016). "Green synthesize of carbon nanoparticles from Nerium oleander extracts via two different microwave assisted methods", 22nd International Congress on Chemical and Process Engineering (CHISA), 27-31 Ağustos 2016, Prag.
13. Şimşek S., Ünal Ş., Özbek B., (2015). "Biosorption of Aluminium Ions from Aqueous Solutions by using Brewery Waste", 10th International Congress of Chemical Engineering ECCE-10, 27 Eylül - 1 Ekim 2015, Nice.
14. Öztürk E., Şimşek S., Özbek B., (2015). "Bio reduction of graphene oxide by natural products", International Nanotechnology Conference, 15-17 Haziran 2015, Paris.
15. Bedir E., Sevimli Gür C., Bozoğlu F., Işikoğlu İ. , Şimşek S., (2013). "Phytochemical and Bioactivity Studies on the Roots of Nerium oleander", VI. International Bioengineering Congress "Human Welfare", 12-15 Kasım 2013, Aydın.

Proje

1. "Motor Yağı Katkısı Olarak Bitkisel Kaynaklı Karbon Nanoparçacık Kullanımı Ve Reolojik Özelliklerin Modellenmesi", Tübitak Projesi, 2209-A, 2018/1 Dönemi, Danışman.