



**BOR KATKILI KARBON NANODOT SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU  
VE HÜCRE UYGULAMALARI**

**Sezgin ÖZKASAPOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2020**

Sezgin ÖZKASAPÖĞLU tarafından hazırlanan “BOR KATKILI KARBON NANODOT SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE UYGULAMALARI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Başkan:** Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

**Üye:** Doç. Dr. Özcan YALÇINKAYA

Kimya Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 12/06/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sezgin ÖZKASAPOĞLU

12/06/2020

# BOR KATKILI KARBON NANODOT SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE HÜCRE UYGULAMALARI

(Yüksek Lisans Tezi)

Sezgin ÖZKASAPOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2020

## ÖZET

Karbon nano tanecikler, 10 nm'den küçük karbon esaslı nano parçacıklardır. Sahip oldukları biyouyumluluk, düşük toksisite, yüksek floresans şiddeti (kuantum verimi) nedeniyle son yıllarda özellikle biyolojik uygulamaları içeren çalışmalara konu olmuştur. Yüksek floresans kabiliyetleri ve canlılar için düşük toksisiteye sahip olmaları, karbon nano taneciklerin canlı hücre ve dokuları için mükemmel bir görüntüleme ajanı olmasına olanak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$   $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  ve  $NO_2^-$  gibi iyonların karbon nano taneciklerin floresans verimini etkileyen faktörler olduğu bilinmektedir. Bu sayede anyon ve katyonlara karşı duyarlı florimetrik sensörler geliştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında floresans verimi yüksek bor katkılı karbon nano taneciğin (BKKNT) hidrotermal yöntemle sentezlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma; BKKNT sentezi, karakterizasyonu, iyon deneyleri ve hücre uygulamaları olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Çalışmanın sentez aşamasında bor kaynağı olarak fenilboronik asit; karbon kaynağı olarak da bir amino asit olan glutamin (Glu) kullanılmıştır. Hidrotermal yöntemde, sülfürik asit ortamında farklı sıcaklıkların BKKNT ürününün floresans verimine ve yapısal özelliklerine etkisi incelenmiştir. Bunun sonucunda sentezlenen BKKNT ürününün  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı 1 ile 8 nM arasında duyarlı olduğu ve kanser hücrelerine hedef olarak seçildiği ortaya çıkmıştır. Karbon nano tanecik sentezi, sensör ve hücre uygulamaları ile ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde şimdiye kadar BKKNT ürününün görüntüleme ajanı olarak kullanılabilirliğinin ve  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlılığının incelendiği araştırmalara rastlanmamıştır. Bu amaçla yapılan çalışmanın özgünlüğünün uluslararası bilimsel çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışmanın ülkemizin zengin bor kaynaklarının teknolojik ve katma değeri yüksek ürünlere dönüşmesi yoluyla değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bilim Kodu : 20102  
Anahtar Kelimeler : Bor, Karbon nano tanecik, Kuantum verimi, Floresans, Florimetrik sensör, Kanser hücresi  
Sayfa Adedi : 103  
Danışman : Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN

# BORON DOPED CARBON NANODOT SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CELL APPLICATIONS

(M. Sc. Thesis)

Sezgin ÖZKASAPÖĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES

June 2020

## ABSTRACT

Carbon nanodots are carbon-based nanoparticles less than 10 nm in size. Due to their biocompatibility, low toxicity, and high fluorescence intensity (quantum yield), they have been the subject of studies especially involving biological applications in recent years. Their high fluorescence capabilities and low toxicity for living things enable carbon nanodots to be an excellent imaging agent for living cells and tissues. In addition, it is known that ions such as  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  ve  $\text{NO}_2^-$  are factors affecting the fluorescence yield of carbon nanodots. In this way, fluorimetric sensors sensitive to anions and cations have been developed. Within the scope of this work, boron doped carbon nanodot (BDCN) with high fluorescence yield was aimed to be synthesized by using the hydrothermal method. The work consists of four stages namely the synthesis of BDCN, its characterization, ion experiments and cell applications. In the synthesis stage of BDCN, phenylboronic acid and amino acid glutamine (Glu) was used as the boron and carbon sources respectively. In the hydrothermal method with sulphuric acid medium, the effect of the temperature on the fluorescence yield and the structural specs of BDCN was investigated. As a result, it has been revealed that the synthesized BKKNT product is sensitive to  $\text{SO}_4^{2-}$  ion between 1 and 8 nM and selected as a target for cancer cells. When the literature studies on the synthesis of carbon nanodots, their sensor and cell applications are examined, no studies investigating the usability of the BDCN as an imaging agent and its sensitivity to  $\text{SO}_4^{2-}$  ion have been encountered so far. The study with this purpose is thought to be an original work contributing to the international scientific effort. Along with this, rich boron sources of our country have been assessed, through the way presented in this work, as technological and high value-added products.

Science Code : 20102

Key Words : Boron, Carbon nanodot, Quantum yield, Fluorescence, Fluorimetric sensor, Cancer cell

Page number : 103

Supervisor : Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi esnasında desteğini esirgemeyen, değerli zamanını bana ayıran, büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek ve tecrübelerini aktarabilmek adına elinden gelenin fazlasını yapan kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre uygulamaları aşamasında, sahip olduğu bilgi ve birikimle çalışmaya büyük katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Hafize Seda VATANSEVER başta olmak üzere Hilal KABADAYI'ya teşekkürlerimi sunmak isterim.

Çalışmanın diğer bir ayağının yürütüldüğü Ankara Üniversitesi'nde öğretim görevlisi olan Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN'a Gazi Üniversitesi'nde BOREN bursiyeri olan Emre ERSİN'e ve tecrübelerini her daim paylaşan Oğuz BAYINDIR'a yardımları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında zamanlarını ayırıp büyük desteklerini gördüğüm Ragıp KIZILTAŞ, M. Nasuh ARIK, Mustafa ACAR, Cansu Tuğba KARAMAN ve Hüseyin DOYURAN başta olmak üzere tüm BOREN personeline içten bir teşekkürü borç bilirim. Bu çalışmanın deneysel ve karakterizasyon aşamalarında gerek sarf malzeme, makine-teçhizat; gerekse analiz anlamında 2018-30-06-30-003 kodlu “Bor Katkılı Karbon Nanodot Sentezi, Karakterizasyonu ve Hücre Uygulamaları” başlıklı proje kapsamında destek sağlayan Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü'ne katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yoğun çalışmalarım esnasında maddi manevi her türlü desteği benden esirgemeyen, büyük bir sabırla bana katlanan, moralimi daima yüksek tutan, bu hayattaki en büyük şansım olan sevgili eşim ve en büyük destekçim Gonca ÖZKASAPOĞLU'na en samimi duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim. Bu günlere gelmem de büyük fedakârlıklar gösteren, büyük pay sahibi olan ve beni her zaman destekleyen değerli ailem rahmetli annem Şükriye ÖZKASAPOĞLU, babam Basri ÖZKASAPOĞLU ve kardeşim Murat ÖZKASAPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                  | <b>Sayfa</b> |
|------------------------------------------------------------------|--------------|
| ÖZET .....                                                       | iv           |
| ABSTRACT.....                                                    | v            |
| TEŞEKKÜR.....                                                    | vi           |
| İÇİNDEKİLER .....                                                | vii          |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                        | x            |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                          | xi           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                     | xv           |
| 1. GİRİŞ.....                                                    | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                          | 3            |
| 2.1. Karbon Temelli Tanecikler .....                             | 3            |
| 2.1.1. Karbon temelli taneciklerin sınıflandırılması .....       | 3            |
| 2.1.2. Karbon nano tanecikler (KNT) .....                        | 4            |
| 2.1.3. Grafen karbon kuantum tanecikler (GKKT) .....             | 5            |
| 2.1.4. Polimer tanecikler (PT) .....                             | 6            |
| 2.2. Karbon Nano Taneciklerin (KNT) Sentezlenme Yöntemleri ..... | 7            |
| 2.2.1. Yukarıdan aşağı yöntemler .....                           | 8            |
| 2.2.2. Aşağıdan yukarı yöntemler .....                           | 11           |
| 2.2.3. Yüzey pasivasyonu .....                                   | 16           |
| 2.3. Karakterizasyon Yöntemleri .....                            | 17           |
| 2.3.1. Mikroskopik ve kırınım teknikleri .....                   | 17           |
| 2.3.2. Spektroskopik teknikler .....                             | 18           |
| 2.3.3. Termal teknikler .....                                    | 21           |
| 2.4. KNT'lerin Uygulama Alanları .....                           | 21           |
| 2.4.1. Biyo görüntüleme.....                                     | 22           |



|                                                                | <b>Sayfa</b> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.4.2. İlaç salınımı.....                                      | 25           |
| 2.4.3. Sensör uygulamaları.....                                | 26           |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>                             | <b>33</b>    |
| 3.1. Kullanılan Malzemeler.....                                | 33           |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar .....                                 | 33           |
| 3.2.1. BKKNT sentezi.....                                      | 34           |
| 3.2.2. BKKNT saflaştırma işlemi.....                           | 35           |
| 3.2.3. İyon deneyleri .....                                    | 35           |
| 3.2.4. Hücre deneyleri.....                                    | 36           |
| <b>4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>                   | <b>39</b>    |
| 4.1. Elementel Analiz Sonuçları.....                           | 39           |
| 4.2. ICP-MS ile Bor Tayini Sonuçları.....                      | 40           |
| 4.3. FTIR Analizi Sonuçları .....                              | 41           |
| 4.4. XRD Analizi Sonuçları .....                               | 42           |
| 4.5. XPS Analizi Sonuçları .....                               | 43           |
| 4.6. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları.....              | 47           |
| 4.7. TEM Analizi Sonuçları .....                               | 49           |
| 4.8. UV-GB ve FL Spektroskopisi Ölçümü Sonuçları.....          | 51           |
| 4.9. Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları.....                      | 56           |
| 4.10. İyon Deneyi Sonuçları.....                               | 57           |
| 4.10.1. Seçicilik deneyi sonuçları .....                       | 57           |
| 4.10.2. Duyarlılık deneyi sonuçları .....                      | 58           |
| 4.10.3. Gün içi tekrarlanırlık deneyi sonuçları.....           | 62           |
| 4.10.4. Günler arası tekrarlanabilirlik deneyi sonuçları ..... | 62           |
| 4.10.5. Gerçek numune deneyleri .....                          | 64           |
| 4.10.6. Hücre deneyi sonuçları.....                            | 65           |

|                                   | <b>Sayfa</b> |
|-----------------------------------|--------------|
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....        | 81           |
| KAYNAKLAR .....                   | 85           |
| EKLER.....                        | 93           |
| EK-1. XPS analizi sonuçları ..... | 94           |
| ÖZGEÇMİŞ.....                     | 103          |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                   | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 4.1. BKKNT ürünlerine ait elementel analiz sonuçları. ....                                        | 39    |
| Çizelge 4.2. BKKNT ürünlerinin B tayini sonuçları. ....                                                   | 40    |
| Çizelge 4.3. BKKNT ürünlerin element analizi için XPS genel tarama sonuçları. ....                        | 44    |
| Çizelge 4.4. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için C1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları.....   | 45    |
| Çizelge 4.5. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için N1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları.....   | 45    |
| Çizelge 4.6. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için O1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları.....   | 46    |
| Çizelge 4.7. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için S2p bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları.....   | 46    |
| Çizelge 4.8. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için B1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları.....   | 47    |
| Çizelge 4.9. Aynı konsantrasyona sahip 6 ürünün gün içinde farklı saatlerde yapılan analiz sonuçları..... | 62    |
| Çizelge 4.10. Aynı konsantrasyona sahip 3 adet ürünün farklı günlerde yapılan deney sonuçları .....       | 63    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                                                                                      | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Üç ana tipteki karbon taneciğinin şematik gösterimi.....                                                                                                                                                        | 4     |
| Şekil 2.2. Tipik bir GKKT'nin yapısal görünümü, (A) iskelet formülü, (B) üç boyutlu görünüm.....                                                                                                                           | 6     |
| Şekil 2.3. KNT'lerin aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı yöntemlerle sentezinin şematik gösterimi.....                                                                                                                      | 7     |
| Şekil 2.4. Ark deşarj cihazının şematik gösterimi .....                                                                                                                                                                    | 8     |
| Şekil 2.5. Grafit tozu kullanılarak lazer ablasyon yöntemiyle tek basamakta KNT sentezinin şematik gösterimi .....                                                                                                         | 9     |
| Şekil 2.6. KNT'lerin EKL ve FL mekanizmalarının hipotezinin şematik gösterim.....                                                                                                                                          | 10    |
| Şekil 2.7. $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , $\text{NH}_4\text{OH}$ ve $\text{H}_2\text{O}_2$ öncü maddeleri kullanılarak yeşil renkte floresans özelliğe sahip KNT'nin hidrotermal yöntemle sentezi ..... | 14    |
| Şekil 2.8. Tiyosalisilik asit ve etilendiamin öncü maddeleri kullanılarak KNT'nin hidrotermal yöntemle sentezi.....                                                                                                        | 15    |
| Şekil 2.9. KNT örneğine ait (A) SEM, (B) TEM ve (C) HRTEM görüntüleri.....                                                                                                                                                 | 18    |
| Şekil 2.10. MCF 7 kanser hücrelerinin (A) folik asit ile modifiye edilmemiş KNT, (B) folik asit ile yüzeyi modifiye edilmiş KNT ile floresans mikroskobu görüntüleri .....                                                 | 22    |
| Şekil 2.11. (A) KNT ile (B) PEI ve folik asit ile modifiye edilen KNT ile 30 dakika inkübe edilen KB hücrelerinin floresans mikroskobu görüntüleri.....                                                                    | 23    |
| Şekil 2.12. Gliserol ve 2-Merkaptoetanol öncü maddeleri kullanılarak sentezlenen KNT.....                                                                                                                                  | 23    |
| Şekil 2.13. Glisinin karbonlaştırılmasıyla hazırlanan KNT'nin kobayda tutulumu .....                                                                                                                                       | 24    |
| Şekil 2.14. KNT ile muamele edilmiş HeLa kanser hücrelerinin (A) aydınlık alan (B) mavi ışık uyarımı altındaki görüntüleri .....                                                                                           | 25    |
| Şekil 2.15. (A) Demir iyonlarının floresans sönümlemesi, (B) $\text{Fe}^{3+}$ iyonunun seçiciliği .....                                                                                                                    | 27    |
| Şekil 2.16. (A) artan $\text{Cu}^{2+}$ derişimine karşı floresans şiddetindeki azalış, (B) $\text{Cu}^{2+}$ iyonu ve $F_0/F$ arasındaki ilişki.....                                                                        | 29    |
| Şekil 2.17. Farklı iyonların ilavesiyle KNT'lerin floresans şiddetinde meydana gelen değişiklik .....                                                                                                                      | 30    |

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.1. 70, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C sıcaklıklarda 1,0 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> varlığında hazırlanan BKKNT ürünlerine ait FTIR spektrumları .....                                                                                                                          | 41    |
| Şekil 4.2. Altı farklı sıcaklıkta (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen ürünlere ait XRD difraktogramları .....                                                                                                                                                                  | 43    |
| Şekil 4.3. Üç farklı sıcaklıkta (190, 230 ve 270 °C) sentezlenen ürüne ait TGA termogramları .....                                                                                                                                                                                         | 48    |
| Şekil 4.4. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait (A) TEM görüntüsü (B) boyut dağılımı histogramı.....                                                                                                                                                                                    | 49    |
| Şekil 4.5. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait (A) TEM görüntüsü (B) boyut dağılımı histogramı.....                                                                                                                                                                                    | 50    |
| Şekil 4.6. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait TEM görüntüleri .....                                                                                                                                                                                                                   | 50    |
| Şekil 4.7. (A) 170 °C (B) 190 °C (C) 210 °C (D) 230 °C (E) 250 °C ve (F) 270 °C'de sentezlenen BKKNT ürünlerinin UV-GB absorbans ve maksimum FL şiddetinin alındığı emisyon spektrumlarının üst üste çakıştırılmış hali.....                                                               | 52    |
| Şekil 4.8. 190 °C sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 340-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim) ....                                                                | 53    |
| Şekil 4.9. 230 °C sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 340-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim) ....                                                                | 54    |
| Şekil 4.10. 270 °C sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 320-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim).....                                                               | 54    |
| Şekil 4.11. Sıcaklık ile KV arasındaki ilişki (iç grafik: 270 °C'de sentezlenen ürünün (A) günışığı altındaki (B) UV ışık altındaki görüntüsü) .....                                                                                                                                       | 55    |
| Şekil 4.12. Sıcaklık ile zeta potansiyel arasındaki ilişki.....                                                                                                                                                                                                                            | 56    |
| Şekil 4.13. 10 <sup>-5</sup> M Cl <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , Hg <sup>2+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Pb <sup>2+</sup> ve SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> iyonları için BKKNT ürününün FL şiddetinde meydana gelen değişim ..... | 58    |
| Şekil 4.14. BKKNT ürününün farklı konsantrasyonlarda SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ilavesi sonrasında FL şiddetinde meydana gelen değişim.....                                                                                                                                             | 59    |
| Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ilavesi sonrasında 325 nm'de emisyon yapan BKKNT ürününe ait kalibrasyon eğrisi (iç grafik: doğrusal bölgeyi gösteren eğri).....                                                                                       | 60    |

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.16. LOD, LOQ ve LOL değerlerinin kalibrasyon eğrisinde gösterimi.....                                                                                                                                                         | 61    |
| Şekil 4.17. $\text{SO}_4^{2-}$ konsantrasyonu belli ( $2,7 \times 10^{-5}$ M) olan içme suyu örneğine $\text{SO}_4^{2-}$ ilavesi sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi .....                                                         | 64    |
| Şekil 4.18. 190, 230 ve 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin Colo320 CD133+ ve CD133- hücrelerde 24 saat uygulanması sonrasında sitotoksosite değerleri.....                                                                       | 65    |
| Şekil 4.19. 190, 230 ve 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin Colo320 CD133+ ve CD133- hücrelerde 48 saat uygulanması sonrasında sitotoksosite değerleri.....                                                                       | 65    |
| Şekil 4.20. Colo 320 CD133+ hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması..... | 67    |
| Şekil 4.21. Colo 320 CD133+ hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması..... | 68    |
| Şekil 4.22. Colo 320 CD133+ hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması..... | 70    |
| Şekil 4.23. Colo 320 CD133- hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması.....  | 71    |
| Şekil 4.24. Colo 320 CD133- hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması.....  | 73    |
| Şekil 4.25. Colo 320 CD133- hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması.....  | 74    |
| Şekil 4.26. Vero hücrelerde 190 °C'ta elde edilen ürününün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması .....                        | 76    |
| Şekil 4.27. Vero hücrelerde 230 °C'ta elde edilen ürününün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması .....                        | 77    |

**Şekil****Sayfa**

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.28. Vero hücrelerde 270 °C'ta elde edilen ürününün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki6 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması ..... | 78 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b>    | <b>Açıklamalar</b>                    |
|--------------------|---------------------------------------|
| $\text{Ag}^+$      | Gümüş İyonu                           |
| $\text{Al}$        | Alüminyum elementi                    |
| $\text{B}$         | Bor Elementi                          |
| $\text{C}$         | Karbon Elementi                       |
| $\text{Cd}^{2+}$   | Kadmiyum İyonu                        |
| $\text{Cl}^-$      | Klor İyonu                            |
| $\text{Co}^{2+}$   | Kobalt (II) İyonu                     |
| $\text{CO}_3^{2-}$ | Karbonat İyonu                        |
| $\text{Cu}^{2+}$   | Bakır (II) İyonu                      |
| $\text{Fe}^{2+}$   | Demir (II) İyonu                      |
| $\text{Fe}^{3+}$   | Demir (III) İyonu                     |
| $\text{Hg}^{2+}$   | Cıva (II) İyonu                       |
| $\text{N}$         | Azot Elementi                         |
| $\text{Ni}^{2+}$   | Nikel (II) İyonu                      |
| $\text{NO}_2^-$    | Nitrit İyonu                          |
| $\text{NO}_3^-$    | Nitrat İyonu                          |
| $\text{O}$         | Oksijen Elementi                      |
| $\text{Pb}^{2+}$   | Kurşun (II) İyonu                     |
| $\text{S}$         | Kükürt Elementi                       |
| $\text{SO}_4^{2-}$ | Sülfat İyonu                          |
| $\text{Si}$        | Silisyum Elementi                     |
| $\text{K}$         | Absorbans-FL Şiddeti Grafiğinin Eğimi |
| $\eta$             | Kırılma İndisi                        |
| $\Phi$             | Kuantum Verimi                        |
| $\text{V}$         | Hacim                                 |
| $\bar{x}$          | Ortalama Değer                        |
| $s$                | Standart Sapma                        |



**Simgeler****Açıklamalar****m**

Eğim

**°**

Derece

**Kısaltmalar****Açıklamalar****AcOH**

Asetik Asit

**AFM**

Atomik Kuvvet Mikroskobu

**BKKNT**

Bor Katkılı Karbon Nano Tanecik

**DAB**

Diaminbenzidin

**DLS**

Dinamik Işık Saçınımı

**EDTA**

Etilendiamintetraasetik Asit

**EKL**

Elektrokemilüminesans

**FBA**

Fenilboronik Asit

**FKNT**

Floresans Karbon Nano Tanecik

**FL**

Fotoluminesans

**FTIR**

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

**GKKT**

Grafen Karbon Kuantum Tanecik

**GLU**

Glutamin

**GO**

Grafen Oksit

**ICP-MS**

Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi

**KNT**

Karbon Nano Tanecik

**KV**

Kuantum Verimi

**LOD**

Gözlenebilme Sınırı

**LOL**

Doğrusallık Limiti

**LOQ**

Tayin Alt Sınırı

**M**

Molarite

**mV**

Milivolt

**μL**

Mikrolitre

**μM**

Mikromolar

**μm**

Mikrometre

**nm**

Nanometre

**nM**

Nanomolar

**Kısaltmalar****Açıklamalar****NMR**

Nükleer Manyetik Rezonans

**PBS**

Fosfat Tampon Çözeltisi

**pm**

Pikometre

**PT**

Polimer Tanecik

**rpm**

Dakikadaki Devir Sayısı

**RSD**

Bağıl Standart Sapma

**TEM**

Geçirimli Elektron Mikroskobu

**TGA**

Termogravimetrik Analiz

**UV-GB**

Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi

**W**

Watt

**XPS**

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

**XRD**

X-Işını Kırınımı

## 1. GİRİŞ

Karbon, elementi hidrojen, helyum ve oksijenden sonra evrende en bol bulunan dördüncü elementtir [1]. Özellikle farklı sıcaklıklarda farklı özelliklerde birçok bileşik oluşturabilme özelliği onu yaşamın vazgeçilmez bir noktasına getirmiştir [1]. Karbon atomları kendi içinde farklı bağlanma kabiliyetine bağlı olarak amorf, elmas, grafit, nanotüp ve fulleren gibi birden fazla allotrop oluşturabilmektedir [2]. Bu allotropların fiziksel özellikleri doğal olarak birbirinden farklılıklar gösterir. Örneğin, grafit dünyanın bilinen en yumuşak malzemesi iken elmas bilinen en sert olanıdır. Dahası, mümkün olan dokuz farklı yükseltgenme durumu sayesinde uygun diğer çok değerlikli elementlerle kararlı kovalent bağlar oluşturabilmektedir. Dolayısıyla karbon bilinen herhangi bir elementten yaklaşık olarak on milyon kat (şu ana kadar açıklanan) daha fazla bileşik oluşturabilmektedir. Bu nedenle karbon organik bileşiklerdeki tüm moleküllerin bel kemiği niteliğindedir ve bu özelliği onu yaşamın sürekliliği için vazgeçilmez bir noktaya taşımaktadır [1].

Son yıllarda karbonun fulleren, karbon nanotüp ve grafen gibi allotropları keşfedilmiştir [3-5]. Özellikle karbon nanotüp, elmas gibi karbon temelli nano taneciklerin keşfi ile farklı kristal yapısına sahip karbon elementleri içinde ayrı bir yere sahip olşunu tescillemiştir [2]. 2004 yılında tek duvarlı karbon nanotüplerin saflaştırılması esnasında yeni bir karbon türevi daha keşfedilmiştir [6]. Karbon nano tanecik adı verilen bu karbon türevi, diğer nano taneciklere kıyasla daha güçlü bir fotoluminesans özellik göstermektedir.

Karbon nano tanecikler sahip oldukları biyo uyumluluk, yüksek floresans şiddeti ve düşük toksisite gibi özellikleri sebebiyle keşfedilmesinden bu zamana kadar birçok çalışmaya konu olmuştur. Karbon nano taneciklerin floresans şiddetlerini etkileyen önemli hususlardan bir tanesi de pH ve matriks etkisi olarak tarif edilen yabancı iyonlar veya moleküllere verdiği cevaptır [6]. Bu sayede yabancı iyonlara karşı duyarlı sensörlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Karbon dışında farklı elementlerin katkılanması sayesinde karbon nano taneciğin floresans özelliklerinin geliştirilmesi ve belirli bir analite karşı duyarlılığın ve seçiciliğin sağlanması mümkün olmaktadır. Bor elementi de KNT'nin elektronik doğasını önemli biçimde değiştirmesi suretiyle önemli bir modifiye edici element olarak dikkat çekmektedir.

Ülkemizin bor kapasitesi her geçen gün artmış ve dünya bor pazarında etkinliğimizin giderek kuvvetlenmesi ile 1970’li yıllarda %16 olan pazar payımızın bugün %55’lere ( $B_2O_3$  bazında) ulaşmış olmasına rağmen Türkiye’de bulunan bor işletmelerinin ürün yelpazesi oldukça sınırlı olup sadece doğal, konsantre ve rafine boratlar ihraç edilmektedir [7].

Dolayısıyla bu çalışma kapsamında sentezlenecek olan bor katkılı karbon nano taneciğın yüksek teknoloji gerektiren yeni bir ürün adayı olarak, çalışmanın hem ekonomik yönden hem de kendi teknolojimizi geliştirmemiz adına sağlayacağı katkı aşıkârdır.

Günümüzün en tehlikeli hastalıklarından biri olan kanser Türkiye’de de sıkça görülen bir hastalıktır. Sağlık Bakanlığı’nın 2015 verilerine göre Türkiye’de yılda ortalama 163.500, günde ise 450 kişiye kanser tanısı konulmaktadır. Kanser tedavisi hem maddi hem manevi anlamda oldukça yıpratıcıdır. Çalışma kapsamında sentezlenecek olan bor katkılı karbon nano taneciklerin (BKKNT) yüzeyindeki kalıntılar sebebiyle, bazı kanser hücrelerine afinite göstereceğı de beklenmektedir. Elde edilecek bu ürünün yüksek floresans şiddetine, biyo uyumluluğa ve düşük toksisiteye sahip olduğı düşünöldüğünde, BKKNT ürününün kanser hücrelerinin görüntülenmesi ve tedavisine yönelik yeni bir ajan olarak önerilmesi, tez çalışmasının amaçlarından bir tanesidir.

Bu çalışmayla tıpta kanserli hücrelerin görüntülenmesinde ve tedavisinde kullanım alanı araştırılan bor katkılı karbon nano tanecik (BKKNT) ürünü ile fenilboronik asit ve glutaminden yola çıkarak sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Hazırlanan BKKNT ürünleri hem sağlıklı hem de kanserli hücreler üzerinde test edilmek suretiyle kanserli hücreler üzerindeki etkinliğı aydınlatılmıştır. Hazırlanan BKKNT ürününün bir diğeri potansiyel uygulama alanı olarak sülfat iyonuna karşı duyarlılığı belirlenmiş ve içme sularında nM seviyede sülfat iyonunun tayini amacıyla kullanılabilecek bir floresans özelliğı sahip olduğı sonucuna varılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karbon Temelli Tanecikler

Karbon nano malzemeler, nano teknoloji biliminde geniş bir şekilde kullanılan, fullerenleri, karbon nano tüpleri ve grafeni içinde barındıran ve yıllardır üzerine çalışmalar yapılan konular olarak dikkati çekmektedir [8]. 2006 yılında yapılan bir çalışmada bu materyallerin yüzeyinde bulunan grupların değiştirilerek floresans özelliği gösteren karbon nano taneciklerin elde edilebildiği görülmüştür [5]. Bunun yanında “karbon tanecik” kelimesi lüminesans özellik gösteren yüzey işlevli tüm küçük karbon nano tanecikleri kapsayan bir terimdir. Tüm karbon nano tanecikleri en az bir boyuta sahip olup 10 nm’den daha küçük büyüklüğe sahiptirler ve esasen  $sp^2/sp^3$  hibritleşmiş karbon atomlarından oluşmaktadır. Dahası karbon tanecikler yabancı atomlar, modifiye edilmiş yüzey grupları ve agrega olmuş polimerler içerebilirler. Basitçe söylemek gerekirse, tüm karbon tanecikler modifikasyona veya pasivasyona uğramış yüzey grupları ile çevrili bir karbon çekirdekten oluşmaktadır. Bu yüzey modifikasyonları sadece çözünübilirlik ve kolloidal kararlılık sağlamakla kalmaz aynı zamanda farklı alanlarda özel uygulamalar için çalışma imkânı sağlarlar [9].

#### 2.1.1. Karbon temelli taneciklerin sınıflandırılması

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda üç ana karbon tanecikten bahsedilmiştir. Bunlar; karbon nano tanecikler (KNT), grafen karbon kuantum tanecikler (GKKT) ve polimer tanecikler (PT) şeklinde sıralanabilir. Bu tip karbon tanecikler yüzey fonksiyonel grupları, boyutları ve özgün moleküler yapılarıyla birbirinden ayırt edilebilirken fotolüminesans özellikleri birbirine çok benzerdir. Karbon taneciklerin sınıflandırılması Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Üç ana tipteki karbon taneciğın şematik gösterimi

### 2.1.2. Karbon nano tanecikler (KNT)

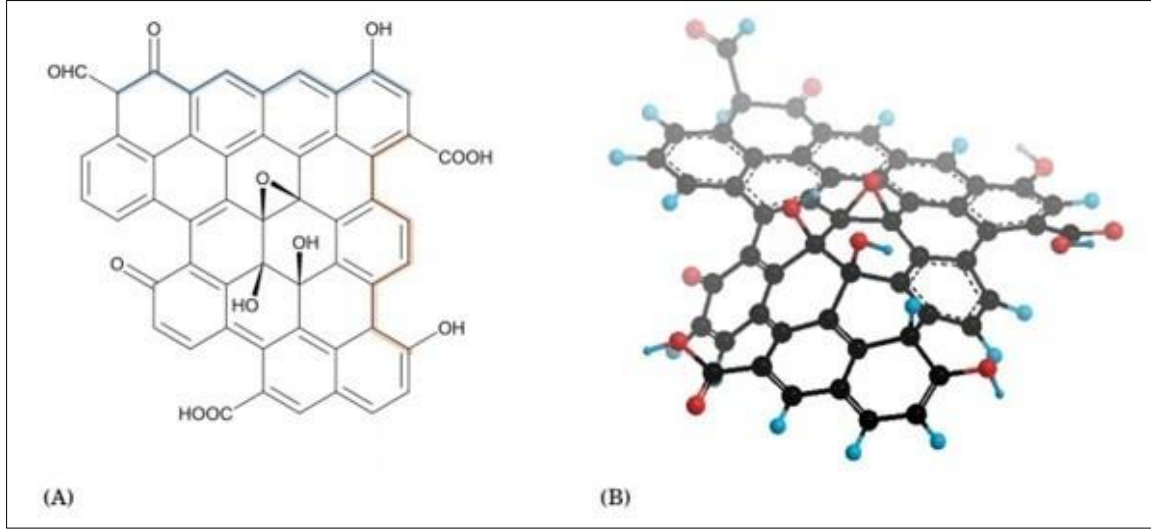
Karbon nano tanecikleri diğerkarbon taneciklerden (GKKT ve PT) ayıran temel fark karbon nano taneciklerde yapısal bir düzenin olmayışıdır. GKKT'ler belirgin bir kristal yapıya ve PT'ler de kendini tekrar eden birimlere sahipken karbon nano tanecikler amorf bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla kristal kafesleri yoktur. Bununla birlikte, GKKT'lerin aksine, karbon nano taneciklerden daima izotropik küresel parçacıklar olarak bahsedilmektedir. Fakat bazı çalışmalarda kristal yapıya sahip karbon nano taneciklerin varlığından da bahsedilmektedir [8]. Karbon kuantum tanecikleri (KKT) olarak adlandırılan bu yapıların kristal grafit benzer yapılar olduğu söylenmektedir [10]. Kristal yapıları nedeniyle bu KKT'lerin karbon nano tanecikten ziyade GKKT olarak adlandırılması, karışıklığa sebep olmasını önlemek bakımından doğru bulunmuştur [8].

Karbon nano tanecikler konjuge  $sp^2$  hibrit atomlarına sahip değildir ve fotolüminesans özellikleri yüzeyindeki fonksiyonel gruplardan kaynaklanmaktadır. Çeşitli enerji seviyelerine sahip bir dizi fonksiyonel grup, çeşitli emisyon durumları oluşturabilir. Uyarma dalga boyuna bağlı olarak tek bir emisyon yapan yüzey durumu tüm emisyonu domine edebilir. Büyük olasılıkla bu yüzey durumları yüzeydeki izole kimyasal gruplardan değil yüzeydeki kimyasal grupların ve karbon çekirdeğinin hibritleşmesinden oluşmaktadır. Sonuç olarak, yüzey pasivasyonu karbon nano taneciklerin fotolüminesans özelliklerinde kilit bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar amino-polietilen glikol (PEG), poli(propiyonil etilenimin-ko-etilenimin) (PPEI-EI) ve dallanmış polietilenimin (BPEI) gibi birçok organik molekülün yüzey pasivasyonu üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır [5, 8, 9] .

Karbon nano taneciklerin fotolüminesans özelliklerinin asıl kaynağının ne olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak son yıllarda bu durumun yüzey durumlarından kaynaklandığını gösteren kanıtlar bulunmuştur. Dolayısıyla karbon nano taneciklerin yüzeyindeki fonksiyonel kimyasal grupların modifiye edilmesi ile FL emisyonu için dalga boyu ve şiddeti ayarlanabilmektedir.

### 2.1.3. Grafen karbon kuantum tanecikler (GKKT)

Adından da anlaşılacağı üzere GKKT'ler kenarlardaki modifiye edilmiş genellikle 10 nm'den küçük bir veya daha fazla grafit tabakasından oluşmaktadır [9]. Bu nedenle GKKT'ler yanal boyutları yüksekliklerinden daha büyük olan anizotropik malzemelerdir. Grafen benzeri tek katmanlı karbon çekirdeği sayesinde GKKT'ler belirli bir kristal yapıya sahiptir. Grafenin (1 0 0) düzlemine karşılık gelen benzer yapısıyla ortalama kafes sabiti 240 pm'dir. Basit yapıları GKKT'leri, KNT'lerin PL mekanizmalarını ve süreçlerini araştırmak için ideal bir model yapmaktadır. Bununla birlikte ikinci bir kristal yapı olan karbon kuantum tanecikler (KKT) olarak adlandırılan yapılar yaklaşık 340 pm kafes ara katman mesafesine sahip yapılardır ve bu yapılar kristal grafitin (0 0 2) düzlemine karşılık gelmektedir [10]. Bu KKT'ler genellikle KNT olarak kabul edilmektedir [8]. Fakat sahip oldukları kristallik sebebiyle GKKT olarak da kabul edilmektedirler. Tipik bir GKKT'ye ait iskelet formülü ve üç boyutlu görünüm Şekil 2.2'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. Tipik bir GKKT'nin yapısal görünümü, (A) iskelet formülü, (B) üç boyutlu görünüm

Grafen oksit (GO), GKKT için önemli bir ilk katmandır ve çok katmanlı bir GKKT hazırlanmasında önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple GO ve GKKT benzer kimyasal yapılara sahiptir. Karbon çekirdeğin yanı sıra GO, taban düzleminde veya kenarlarında oksijen bazlı fonksiyonel gruplar içermektedir. Başka bir deyişle, aromatik  $sp^2$  alanları epoksi ve hidroksil bazlı  $sp^3$  karbon-oksijen matrisiyle çevrilidir [10]. Oksijen bazlı fonksiyonel gruplar elektrostatik ve sterik kararlılık sağlarken  $sp^2$  alanlarının büyüklüğü fotolüminesans özelliklerini belirlemektedir.

#### 2.1.4. Polimer tanecikler (PT)

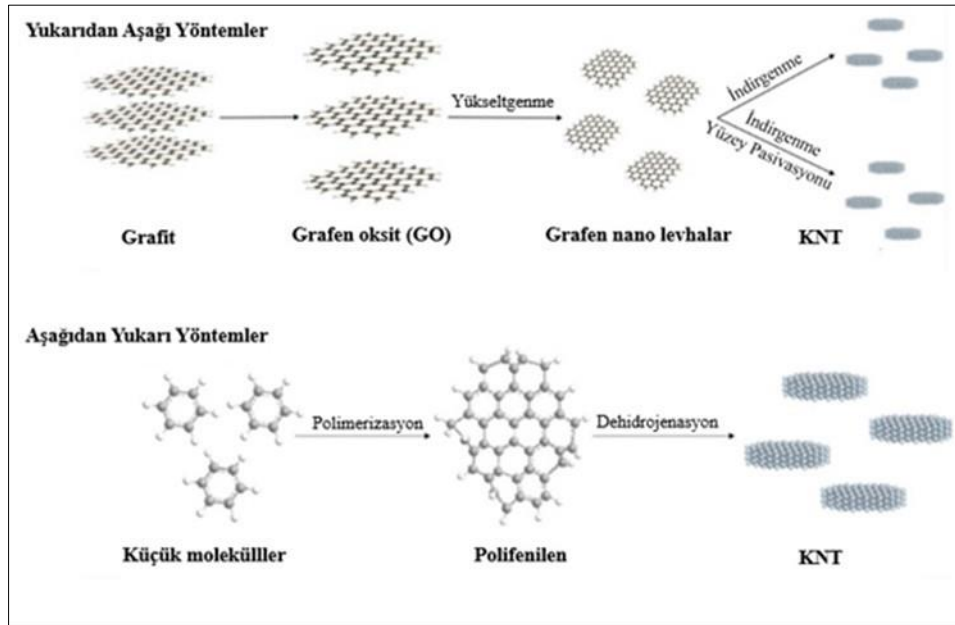
Polimer tanecikler, doğrusal monomer veya polimerlerden hazırlanan çapraz bağlı polimerlerden oluşan yapılardır. PT'lerin bilinen iki çeşidi vardır. Bir tanesi, floresans özelliği olan polimerlerin konjugasyonundan elde edilen konjuge PT'ler, bir diğeri ise kümelenmiş bir polimer yapıya sahip olan konjuge olmayan PT'lerdir. PT'lerin belirgin bir özelliği de karbonize olmuş karbon çekirdeğe sahip olmamasıdır. Ayrıca karbon çekirdek ve polimer zincirleri, PT'lere kendiliğinden bağlanabilmektedir [8]. Dolayısıyla, PT'lerin sahip oldukları fotolüminesans özelliğinin karbon çekirdek veya konjuge polimerlerin floroforları olduğu düşünülmektedir. PT'lerin karakteristik bir özelliği de yüzey modifikasyonlarının kolay olmasıdır. Bu durum da onları umut vadeden floresans malzemeler yapmaktadır.



## 2.2. Karbon Nano Taneciklerin (KNT) Sentezlenme Yöntemleri

Karbon nano tanecikler yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yöntemler olarak iki kategoriye ayrılan çeşitli yaklaşımlarla sentezlenmektedir [9]. Şekil 2.3'te KNT'lerin aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı sentez yöntemleri şematik olarak gösterilmektedir [11]. Yukarıdan aşağı yöntemler, grafit veya grafen gibi büyük malzemelerin küçültülüp ark deşarjı, lazer ablasyon, elektrokimyasal işlemler gibi fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak KNT sentezlenmesini ifade etmektedir. Aşağıdan yukarı yöntemler ise L-askorbik asit, sitrik asit veya konjuge olmayan glukoz gibi küçük moleküllerin yakma, mikro dalga ve hidrotermal yollara başvurularak KNT sentezlenmesini ifade etmektedir. Yukarıdan aşağı yöntemlerle kıyaslandığında, aşağıdan yukarı yöntemler seçilebilecek öncü maddeleri ve karbonizasyon yöntemleri açısından daha avantajlıdır. Dolayısıyla aşağıdan yukarı yöntemler farklı kompozisyon ve özelliklerde KNT sentezlenmesine olanak vermektedir [12].

KNT'lerin çoğu düşük kuantum verimine (KV) sahiptir. Ancak yarı iletken endüstrisinde, KNT'lerin elektron yoğunluklarını değiştirerek optik ve elektriksel özelliklerini ayarlamak için geniş bir şekilde kullanılan katkılama ve yüzey pasivasyonu yöntemleri aynı zamanda KNT'lerin fotolüminesans özelliklerini geliştirme konusunda da katkı sağlamaktadır.



Şekil 2.3. KNT'lerin aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı yöntemlerle sentezinin şematik gösterimi [11]

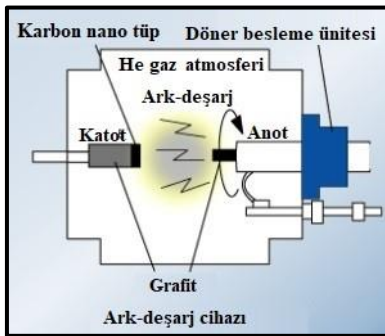
### 2.2.1. Yukarıdan aşağı yöntemler

Yukarıdan aşağıya yöntemler, büyük karbon moleküllerinin harici bir enerji yardımıyla daha küçük karbon moleküllerine parçalandığı fiziksel yaklaşımlardır. Büyük moleküllerin parçalanmasıyla oluşan bu küçük karbon parçacıkları karbon nano taneciklerin temelini oluşturmaktadır. Karbon nano taneciklerin sentezlendiği ilk yukarıdan aşağıya yöntem ark-deşarj yöntemidir. 2004 yılında tek duvarlı karbon nano tüplerin üretimi ve saflaştırılması esnasında ark-deşarj yöntemi kullanılmış olup, tesadüfen bu esnada bir karbon nano tanecik formunun oluştuğu anlaşılmıştır. 2004 yılından sonra lazer ablasyon, elektrokimyasal aşındırma, elektro-oksidasyon vb. daha fazla fiziksel yaklaşım keşfedilmiştir [9–11].

#### Ark-deşarj yöntemi

Floresans karbon nano tanecikler (FKNT) ilk kez 2004 yılında tek duvarlı karbon nano tüplerin

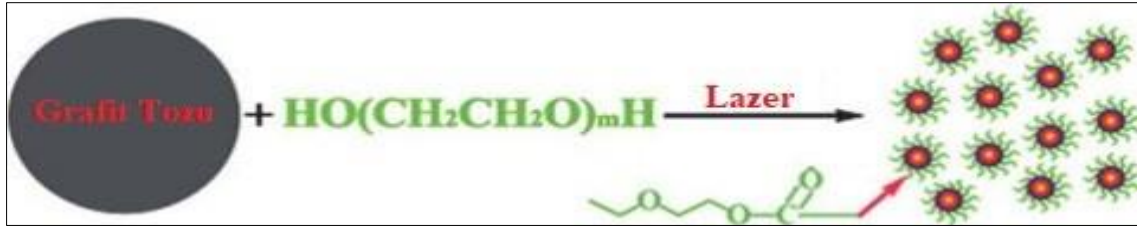
'te şematik gösterimi verilen ark-deşarj yöntemiyle saflaştırılması esnasında tesadüfen bulunmuştur [2]. Saflaştırma işlemi esnasında uzun-kısa karbon nano tüpler ve FKNT elde edilmiştir. Daha sonrasında bu FKNT'ler filtrasyon işlemiyle üç kısma ayrılmış, ayrılan bu ürünler 365 nm uyarım altında artan boyutlarına göre yeşil-mavi, sarı ve turuncu renkte emisyon yapmıştır. Sarı renkte emisyon yapan ürünün kuantum verimi (KV) 0,0116 olarak ölçülmüştür. Yapılan FTIR analizi, KNT'nin yüzeyinde fonksiyonel karboksil grupların olduğunu göstermiştir. Yine FTIR analizi sonucunda düzlem dışı bükülmeye sahip bir C-H pikine rastlanmamıştır. Bu da KNT'nin sahip olduğu floresans özelliğinin poliaromatik hidrokarbonlardan kaynaklanmadığını göstermektedir.



Şekil 2.4. Ark deşarj cihazının şematik gösterimi

### Lazer ablasyon yöntemi

Lazer ablasyon yöntemi KNT sentezinde kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Bu yöntemde KNT'ler pasifleştirici bir ortamda seyreltilmiş grafit tozunun ablasyonu ile elde edilmektedir [13]. Şekil 2.5'te lazer ablasyon yöntemiyle KNT sentezinin şematik gösterimi yer almaktadır [14]. Ayrıca bu ortam partikülleri kararlı hale getirerek floresans özellik kazandırmaktadır. KNT'lerin sentezi esnasında bazı etkileşimler ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple ortam seçimi oldukça önemlidir. Ortam, ablasyon işlemi esnasında fizikokimyasal olarak kararlı olmalı ve meydana gelen KNT'lerin de kararlı olmasını sağlamalıdır. Bu yöntemle ilgili yapılmış çalışmalar Madde 2.2.3'te verilen Yüzey Pasivasyonu başlığı altında detaylı şekilde anlatılmıştır.



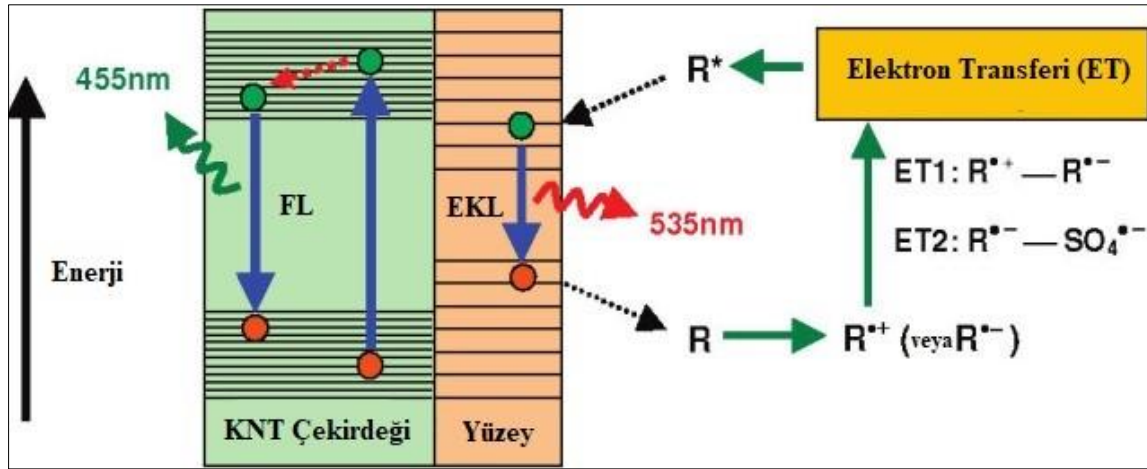
Şekil 2.5. Grafit tozu kullanılarak lazer ablasyon yöntemiyle tek basamakta KNT sentezinin şematik gösterimi [14]

### Elektrokimyasal Yöntem

Elektrokimyasal yöntem, yükseltgeyici bir madde yardımıyla karbon malzemelerin oksitlenerek daha küçük parçalara ayrılması işlemi kapsamaktadır. Bu yöntemde karbon malzemeler oksitlenerek yüzeylerinde çeşitli fonksiyonel gruplar oluşmaktadır. Bu durum KNT'lerin çözünürlüklerinin ve fotoluminesans şiddetlerinin artmasına sebep olmaktadır. 2007 yılında yapılan bir çalışmada yanan bir mumdan toplanan is, nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) ile oksitlenerek KNT sentezi gerçekleştirilmiştir [15]. Yanan mumdan toplanan bu isin hidrofobik özellikte olup karbon içeriğinin %91,69 olduğu belirtilmiştir. Daha sonra bu is  $\text{HNO}_3$  ile geri döngü işlemine tabi tutularak, isten bir süspansiyon elde edilmiştir. Bu süspansiyon da santrifüjlenerek üstte kalan süzütünün 312 nm uyarım altında sarı renkte floresans etki gösterdiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada  $\text{HNO}_3$  haricinde Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve Asetik Asit ( $\text{AcOH}$ ) gibi mavi renkte floresans etki gösteren yükseltgeyiciler kullanılmıştır. Floresans özellikteki bu KNT'ler poliakrilamit jel

elektroforezi kullanılarak saflaştırılmış ve sonucunda farklı hareket kabiliyetlerine sahip mor-mavi, yeşil-sarı ve turuncu-kırmızı renkte floresans etki gösteren KNT'ler meydana gelmiştir. Elde edilen bu KNT'lerin C, H, O, miktarlarının sırasıyla %36,79, %15,5 ve %44,66 olduğu saptanmıştır. FTIR ve  $^{13}\text{C}$  NMR ölçümleri de C=C, C=O bağlarının var olduğunu fakat doymuş  $\text{sp}^3$  karbon atomlarının var olmadığını göstermiştir.

Elektrokimyasal olarak sentezlenen KNT'ler aynı zamanda elektrokemilüminesans (EKL) üretmek için de kullanılabilir. 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada fosfat tampon çözeltisi içerisindeki platin (Pt) karşı elektrodu ve gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrodu kullanılarak grafit elektrokimyasal olarak oksitlenmiş ve KNT sentezlenmiştir [14]. Bu çalışma, KNT'lerin EKL'sinin yarı iletken nano kristallerinkiyle benzer olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda EKL emisyon mekanizmasının da pozitif ( $\text{R}^+$ ) ve negatif yüklü ( $\text{R}^-$ ) KNT'lerin elektron transferi imha yoluyla uyarılmaları ( $\text{R}^*$ ) sonucu oluştuğu belirtilmiştir. Bu durum Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmektedir [14].



Şekil 2.6. KNT'lerin EKL ve FL mekanizmalarının hipotezinin şematik gösterimi [14]

Yukarıda bahsedilen yöntemler genellikle maliyetli yaklaşımlar olup kullanılan enstrümanlar pahalı araç-gereçlerdir. Aynı zamanda bu yöntemlerde KNT'lerin boyut dağılımını homojenize etmek zor olabilmektedir. Boyut dağılımındaki homojenizasyonu sağlamak için de sentez sonrası fazladan işlem gerektirmektedir. Yukarıdan aşağı yöntemlere kıyaslandığında aşağıdan yukarı yöntemler, daha basit olmaları ve sistematik sonuçlar vermeleri sebebiyle 2009 yılından sonra daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

### 2.2.2. Aşağıdan yukarı yöntemler

KNT'ler ilk kez yukarıdan aşağı bir yöntem kullanılarak keşfedilmiş olmalarına rağmen aşağıdan yukarı yöntemler ürünün homojenliğini daha etkili bir şekilde kontrol edebilmek, fonksiyonelliği basitleştirmek ve maliyeti azaltmak adına daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem yukarıdan aşağı yöntemlerin aksine daha küçük karbon kaynaklarından yola çıkılarak atomlaşma ve yeniden topaklanma esnasında KNT oluşmasına dayanmaktadır. Kullanılan bu karbon kaynaklar meydana gelen KNT'nin çekirdeğini oluşturmaktadır. Aşağıdan yukarı yöntemlerin çoğu yukarıdan aşağıya yöntemlere oranla daha avantajlıdır. Mikrodalga, piroliz, ultrasonik ve hidrotermal gibi yaklaşımlar aşağıdan yukarı yöntemlere örnek olarak verilebilir.

#### Mikrodalga sentez yöntemi

Mikrodalga sentez yöntemi; yöntemin kolaylığı, düşük maliyeti ve reaksiyon hızı gibi özellikleri sebebiyle floresan KNT sentezinde oldukça popüler bir hal almıştır. Genel olarak bu yöntem, öncü maddelerin yer aldığı bir çözeltinin mikrodalga yoluyla belirli şartlarda yüksek sıcaklık ve basınçta işleme tabi tutularak KNT oluşmasına dayanmaktadır. 2009 yılında yapılan bir çalışmada ekonomik ve basit olan mikrodalga senteziyle kısa sürede KNT sentezlendiğinden bahsedilmiştir [16]. Bu çalışmada farklı miktarlarda polietilen glikol (PEG-200) ile glukoz, fruktoz gibi sakkaritler suda çözülerek mikrodalga fırında 500 W'lık bir enerji altında 2-10 dakika süreyle ısıtılmıştır. İşlem öncesi renksiz olan bu ürünler işlem sonrasında sarı ve açık kahverengi renklerde elde edilmiştir. Bu durumun da KNT oluşumunu gösterdiği belirtilmiştir. Elde edilen bu KNT'lerin amorf yapıya sahip olmakla birlikte yapısında C=O, C=C, C-O-C, C-H ve O-H bağlarını bulundurduğu gözlenmiştir.

2015 yılında yapılan bir diğer çalışmada sitrik asit ve üre öncü maddeleri kullanılarak çift emisyon yapan floresans özelliğe sahip KNT sentezi yapılmıştır [17]. Bu çalışmada 750 W'lık ev tipi mikrodalga fırın kullanılmıştır. 4-5 dakikalık işlem sonrasında yapısında C, H, O, N atomlarının ve hidroksil, karboksil, amin gruplarının bulunduğu suda yüksek çözünürlüğe, fotostabiliteye ve eşsiz floresans özelliğe sahip KNT'ler sentezlenmiştir. Fakat birden fazla öncü madde kullanılmasının sentez mekanizmasının anlaşılmasında kısıtlamalar yarattığı sonucuna varılmıştır.

2016 yılındaki bir çalışmada ise yine ev tipi mikrodalga fırında sadece amonyum sitrat öncü maddesi kullanılarak mavi floresans özellik gösteren KNT, 1 dakikadan kısa bir sürede sentezlenmiştir [18]. Floresans özelliğe sahip bu KNT'lerin öncü madde olan amonyum sitrat tuzunun polimerizasyonu ve ardından oluşan polimerin kısmi olarak karbonlaşmasıyla meydana geldiği düşünülmüştür. Reaksiyon sıcaklığı nispeten düşük olduğunda amonyum sitrat tuzunun oligomerleri oluşturmak için yoğunlaştığı ve moleküller arası dehidrasyona uğradığı varsayılmıştır. Reaksiyon sıcaklığının artması nedeniyle yüzeyinde hidrofilik fonksiyonel gruplara sahip, kristal olmayan ve düzgün bir şekilde büyüyen karbon nano parçacıkların oluşmasına sebep olmuştur. Hem amonyum hem de sitrat gruplarının KNT oluşumuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Benzer koşullar altında kontrol deneyleri yapılmıştır. Ancak bu deneylerde amonyum ve sitrik asit ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu deneylerin sonucunda sentezlenen KNT'lerin UV ışığı altında zayıf floresans özellik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

#### Piroliz yöntemi

Bu yöntem, karbon öncül maddelerinin yüksek sıcaklık koşulları altında pirolizi veya karbonizasyonu yoluyla KNT'lerin hazırlanmasına dayanmaktadır [19]. Karbon kaynağı yeterince yüksek bir sıcaklığa ısıtılarak KNT'lerin ayrılabilirdiği ve saflaştırılabildiği siyah pirolitik malzemelerin oluşumu sağlanmaktadır. Bu yöntem genel olarak karbon öncül maddelerindeki bağların kırılarak nano koloidal parçacıkların elde edilmesi için yüksek derişimde alkali veya güçlü asit ortamı gerektirmektedir. 2010 ve 2012 yıllarında yapılan çalışmalarda KNT sentezlemek için pirolitik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda özetle, öncü madde olarak kullanılan EDTA-2Na.2H<sub>2</sub>O kuvarz bir tüpün içine yerleştirilmiş ve 400°C sıcaklıkta 2 saat süreyle azot ortamında kalsine edilmiştir. Ancak pirolizin tam anlamıyla gerçekleşmemesi sebebiyle KNT'lere H, N, O ve Na katkısı yapılmıştır. Sonrasında elde edilen siyah toz asetonda çözülerek 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve reaksiyona girmeyen bileşenler ortamdan uzaklaştırılmıştır. TEM karakterizasyonu sonucunda KNT'lerin küresel bir yapıya sahip olup ortalama 3,8 nm büyüklüğünde küresel yapıya sahip oldukları anlaşılmıştır. FTIR spektrumu incelendiğinde 1470 cm<sup>-1</sup> ve 1647 cm<sup>-1</sup>'deki piklerin karboksil grubuna, 3346 cm<sup>-1</sup>'deki pikin ise O-H bağının bulunduğu işaret ettiği belirtilmiştir. Yüzeydeki bu grupların sadece KNT'lerin hidrofilik özelliklerini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda FL özelliklerini de arttırdığı sonucuna varılmıştır.

### Ultrasonik yöntem

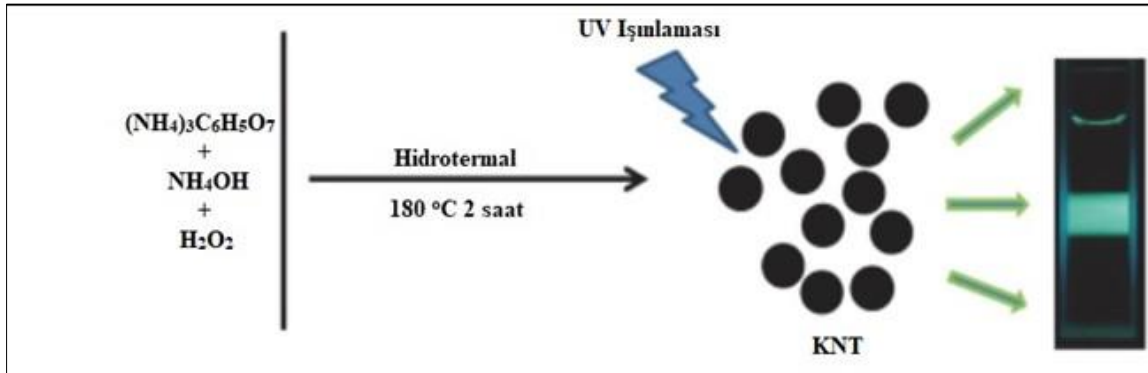
Literatürde yer alan araştırmalarda, KNT sentezinde ultrasonik yöntemin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. 2010 yılındaki bir çalışmada glukozdan yola çıkılarak asit ya da baz ortamında ilk kez ultrasonik işlemle suda çözünebilen homojen tane boyu dağılımlı KNT sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen KNT'lerin büyüklüklerinin 5 nm civarında ve karakteristik uyarma dalga boyuna bağlı emisyonlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç, ultrasonik yöntemin kullanılarak başarılı bir şekilde KNT sentezinin yapılabildiğini göstermiştir. Ayrıca elde edilen KNT'lerin yakın kızıl ötesi dalga boyu aralığına kadar genişleyebilen FL emisyonlarının olduğundan bahsedilmiştir. Yani bu KNT'lerin yakın kızıl ötesi dalga boyunda (700-1000 nm) uyarıldığında 450-750 nm aralığında daha kısa bir dalga boyunda emisyon yapabildikleri belirtilmiştir. Bu özelliğin KNT'leri, yakın kızıl ötesi radyasyonunun tesirinin fazla olduğu biyolojik görüntülemeye güçlü bir enerji transferi adayı olabileceğinden bahsedilmiştir [20].

2014 yılındaki bir diğer çalışmada yine ultrasonik yöntem ile doğal bir öncül olan narenciye limonu kullanılarak KNT sentezlenmiştir [21]. Bu çalışmada narenciye limonu özütlenerek NaOH ortamında ultrasonik işleme tabi tutulmuş sonrasında da elde edilen KNT'ler yoğunluk gradyenli santrifüj yöntemi kullanılarak tane boyutlarına göre iki kısma ayrılmıştır. Ayrılan her iki KNT ürününün karakterizasyon işlemleri yapılmış ve kullanılan bu yöntemin KNT sentezinde başarılı olduğu söylenmiştir. Ayrıca çalışmada bu yöntemin güçlü asit ortamına, karbonizasyon basamakları için çok yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymadığından bahsedilerek kullanılan öncül maddenin de doğal, ekonomik ve çevre dostu olduğu vurgulanmıştır. Son olarak da sentezlenen KNT'lerin, toksisitesi olmayan yüksek performanslı optik görüntüleme probu olarak kullanılabilecek sudaki çözünürlüğü yüksek, güçlü FL özelliğine sahip ve biyo uyumluluğu yüksek olan ürünler olduğu belirtilmiştir.

### Hidrotermal/solvotermal yöntem

Bu yöntem, KNT sentezinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Tekrarlanabilirliği yüksek ve güvenilir bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [22]. Literatürde bu yöntem kullanılarak KNT sentezinin yapıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu yöntem esasında yüksek sıcaklık ve basınç altında karbon kaynağı öncü maddenin karbonizasyonuna

dayanmaktadır. 2015 yılındaki bir çalışmada amonyum sitrat ( $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), amonyum hidroksit ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) kullanılarak  $180^\circ\text{C}$  sıcaklıkta 2 saat süre sonunda azot katkılı KNT sentezlendiği ortaya konmuştur [23]. Sentezlenen bu azot katkılı KNT'lerin %15,7 kuantum verimine sahip olup yeşil renkte güçlü floresans özellik sergilediği söylenmiştir. Sentez sırasında  $\text{NH}_4\text{OH}$ , hem azot kaynağı olarak kullanılmış hem de yapısındaki  $\text{NH}_3$ 'ün ayrılması sayesinde yüksek basınçlı alkali ortam oluşturarak  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 'nin ayrışmasına ve KNT'lerin oluşumuna olanak sağlamıştır. Bu sentezde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin rolünün ise yapısındaki hidroksil grubu sayesinde KNT'lerin emisyon renginin maviden yeşile kaydırmak olduğu belirtilmiştir. Şekil 2.7'de  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  öncü maddeleri kullanılarak yeşil renkte floresans özelliğe sahip KNT'nin hidrotermal yöntemle sentezine yönelik şematik gösterime yer verilmiştir.



Şekil 2.7.  $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  öncü maddeleri kullanılarak yeşil renkte floresans özelliğe sahip KNT'nin hidrotermal yöntemle sentezi [23]

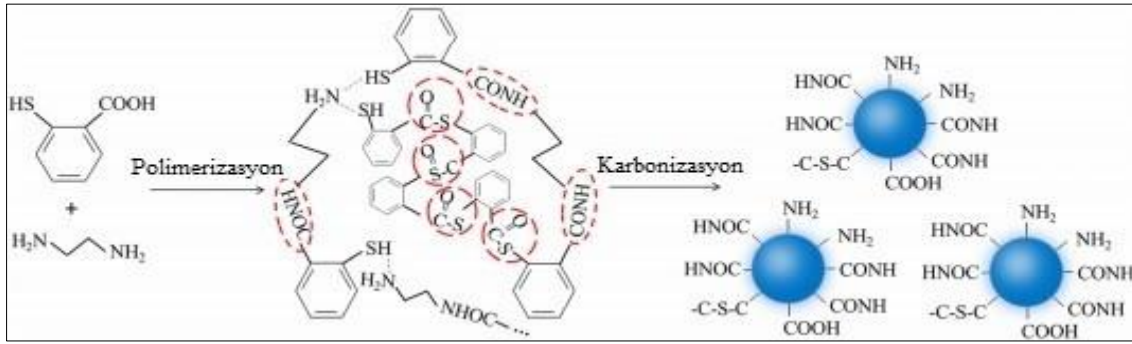
2017 yılında yapılan diğer bir çalışmada çapraz bağlı polietilenimin ve 4-formilfenilboronik asit öncü maddeleri kullanılarak hidrotermal yöntemle bor ve azot katkılı KNT sentezi yapılmıştır [24]. Sentezlenen bu KNT'lerin  $462\text{ nm}$ 'de mavi lüminesans özellik sergilediği, %15,85 kuantum verimine sahip olduğu ve dar aralıkta tane boyutu dağılımı gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca bor ve azot katkılı bu KNT'lerin floresans şiddetinin, sıcaklık ve pH değeri arttıkça azaldığı sonucuna varılmıştır.

Solvotermal yöntem ile KNT sentezlenen bir çalışmada öncü madde olarak sırasıyla orto, meta ve para-fenilendiamin kullanılmıştır [25]. Sentezlenen bu KNT'lerin yeşil, mavi ve kırmızı FL özellik sergilediği belirtilmiştir. TEM ve AFM ölçümleri sonrasında KNT'lerin tek tane boyu dağılımlı ve tane boyutlarının da sırasıyla  $8,2$ ,  $6,0$  ve  $10,0\text{ nm}$  olduğu görülmüştür. FTIR ve XPS ölçümleri de öncü maddelerin yapıları göz önüne alındığında



C-H, C-N= ve C=O gibi yeni bağların oluştuğunu göstermiştir. Üç farklı öncü madde ile sentezlenen KNT'lerin kuantum verimlerinin birbirinden farklı olması, öncü maddelerin yapısında bulunan azot miktarlarının farklı olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

2015 yılındaki bir çalışmada, tiyosalisilik asit ve etilendiamin öncü maddeleri kullanılarak hidrotermal yöntemle tek basamakta KNT sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada öncü maddeler su ile karıştırılmış ve teflon otoklav içerisinde ısıtılmıştır. İşlem sonrasında elde edilen KNT çözeltisi filtrasyon ve diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. KNT'lerin ortalama tane boyutunun 2,4 nm olduğu ve bu değer in reaksiyon süresi ve sıcaklığıyla değiştirilebileceği sonucuna varılmıştır [26]. Şekil 2.8'de tiyosalisilik asit ve etilendiamin kullanılarak sentezlenen KNT'nin sentez aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Tiyosalisilik asit ve etilendiamin öncü maddeleri kullanılarak KNT'nin hidrotermal yöntemle sentezi [26]

2014 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise tek öncü madde olarak fenilboronik asit kullanılarak hidrotermal karbonizasyon ile KNT sentezi yapılmıştır [27]. Öncü madde olarak fenilboronik asit kullanılmasının başlıca sebebi, fenilboronik asidin sahip olduğu halkalı yapının iyi bir karbon kaynağı olması gösterilmiştir. Bu çalışmada fenilboronik asit ultra saf suda çözülmüş sonrasında pH ayarlaması yapılarak NaOH ortamında bir süre karıştırılmıştır. Elde edilen bu çözelti teflon kaplı bir otoklav içerisinde 160°C sıcaklıkta 2 saat süreyle ısıtılmış ve daha sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen KNT içeren çözelti 30 dakika süreyle santrifüj edilerek büyük partiküller çöktürülmüş ve daha ileri saflaştırma için 24 saat süreyle diyaliz işlemine tabi tutularak karakterizasyon işlemlerine hazır hale getirilmiştir. TEM analizi, sentezlenen KNT'lerin homojen bir şekilde dağıldığını ve tane boyutlarının 2,5 – 6,5 nm arasında değiştiğini göstermiştir. 230 – 280 nm aralığında hem KNT'lerin hem de fenilboronik asidin çok açık

bir absorpsiyon bandına sahip olduğu belirtilmiştir. Bu absorpsiyon bandı, karbonun  $\pi-\pi^*$  geçişine atfedilmiştir. Bu KNT'lerin 320 nm'de uyarıldıklarında 408 nm'de emisyon yaptıkları gözlenmiştir. Fenilboronik asit çözeltisinin görünür bölgede emisyon yapmadığı dolayısıyla 408 nm'deki bu emisyonun sentezlenen KNT'lere ait olduğu sonucuna varılmıştır. Uyarma dalga boyu arttıkça emisyon dalga boyunun arttığı bununla birlikte floresans şiddetinin azaldığı söylenmiştir. Bu uyarma dalga boyu bağımlı floresans davranışı KNT'lerin en belirgin özelliklerinden birisi olduğu vurgulanmıştır. [28-29].

### 2.2.3. Yüzey pasivasyonu

KNT'ler yapısal bakımdan çok sayıda  $sp^2$  ve  $sp^3$  olarak hibritleşmiş karbon atomu içermektedir. Bununla birlikte, mikro düzeyde mükemmel olmayan  $sp^2$  hibritleri sebebiyle de birçok kusur bulunmaktadır [5, 30]. Bu durum da KNT'lerin FL özellikleri üzerinde etkili olmaktadır. KNT'lerin sahip olduğu FL özellikleri, yapının sahip olduğu karbon çekirdeği ile ilgilidir ve bu çekirdeklerin boyutlarının da genelde 10 nm altında olması tercih edilmektedir. Bu karbon çekirdekleri yaygın olarak homojen olmayan yüzeylerde bulunmaktadır [31–33]. KNT'ler, organik veya polimerik ajanlar kullanılarak yüzeydeki elektron çiftlerini harekete geçirmek için pasifleştirilmektedir. Yüzey pasivasyon işlemi, ışıkla indirgenmiş taşıyıcıların dağılmasını engellemesi açısından önemli bir rol oynamaktadır. Bunun sonucunda da KNT'lerin FL özelliklerinin artması sağlanmaktadır. Sonuç olarak yüzeyi pasifleştirilmiş KNT'lere oranla edilmeyen KNT'ler daha üstün optik özellikler sergilemekte olup yakın kızılötesi bölgede FL özelliği göstermektedir.

Şimdiye kadarki çalışmalarda pasifleştirici ajan olarak organik moleküller ve polimerler kullanılmıştır. Pasifleştirme işleminde kullanılan organik moleküller aynı zamanda sentez esnasında öncü madde olarak da kullanılabilir. Bu nedenle sentez sırasında öncü olarak kullanılan organik molekülün pasifleştirici etkisini anlamak zordur. Organik moleküllerle yapılan çalışmaların az olmasının sebebi de buna bağlanmaktadır. İlginç bir şekilde, pasifleştirici ajan olarak kullanılan organik moleküller KNT'lerin FL özelliklerinin artırılması için yapılan katkılama işlemleri kadar etkili olmaktadır. Yüzey pasifleştirici olarak kullanılan polimerler genellikle UV-GB aralığında belirgin bir şekilde emisyon yapmazlar. Bu durum açık bir şekilde, pasifleştirici ajanların, KNT'lerin FL özelliklerinin iyileştirilmesinde oynadığı kilit rolü göstermektedir.

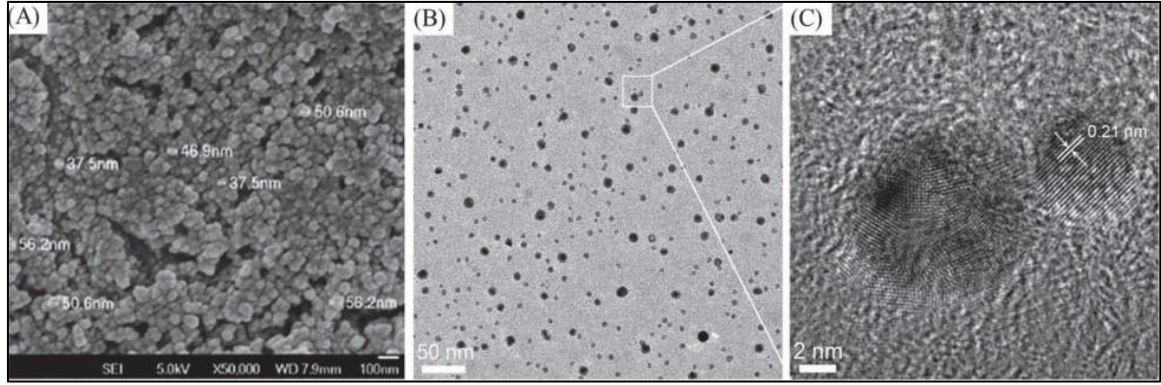
### 2.3. Karakterizasyon Yöntemleri

Kimyasal bileşim, boyut, biçim ve yapı KNT'lerin özel ve eşsiz özelliklerini belirleyen önemli faktörlerdir. Bu nedenle son zamanlarda KNT'lerin güvenilir ve sağlam bir şekilde karakterizasyonlarının yapılabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Bu bölümde KNT'ler için uygulanan karakterizasyon teknikleri detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

#### 2.3.1. Mikroskopik ve kırınım teknikleri

Nano taneciklerin boyut karakterizasyonu ve morfolojisi için numuneye zarar vermeyen farklı görüntüleme ve mikroskopik teknikler geliştirilmiştir. Mikroskopi tane boyutu ölçümü için nano tanecikleri gözlemleyebilen ve ölçebilen en faydalı yöntemlerden biridir. KNT'lerin ölçümleri için kullanılan yaygın teknikler olarak Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM), Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ve X-Işını Kırınımı (XRD) sıralanabilir.

Hem SEM hem de TEM, KNT'lerin tane boyutları, boyut dağılımları ve morfolojisi hakkında bilgi veren yararlı tekniklerdir [34-35]. Ayrıca SEM ve TEM görüntüleri taneciklerin topaklaşıp topaklaşmadığını veya iyi dağılıp dağılmadığını göstermek için de kullanılmaktadır. SEM, KNT'lerin atomları ile etkileşime geçen odaklanmış elektron ışını ile KNT örneğinin yüzeyini tarayarak görüntü üretmektedir. Ölçümlerin SEM çözünürlüğünü aştığı durumlarda daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olan TEM tercih edilmektedir [36-37]. TEM'de görüntü elde edebilmek için KNT'lerin yüksek hızdaki elektronları geçirgenliğine dayanarak bir ışın demeti numuneye gönderilir. KNT'lerin ortalama çapı TEM görüntülerindeki tanecik boyutunun rastgele sayılmasıyla tahmin edilebilmektedir. Son zamanlarda hem iletilen hem de saçılan ışınları kullanan Yüksek Çözünürlüklü TEM (HRTEM), KNT'lerin yapılarını ve kafes kusurlarını kapsamlı bir şekilde analiz edebilmek için kullanılmıştır. Şekil 2.9'da bir KNT numunesine ait SEM, TEM ve HRTEM görüntüleri yer almaktadır [34-35].



Şekil 2.9. KNT örneğine ait (A) SEM, (B) TEM ve (C) HRTEM görüntüleri [34-35]

AFM, 1 nm'den küçük boyutlara sahip KNT'lerin boyutsal yüzey görüntülerini elde etmek için kullanılan yüksek çözünürlüklü bir tekniktir [38-40]. SEM ve TEM ile kıyaslandığında AFM, sadece iki boyutlu görüntü vermekle kalmayıp aynı zamanda KNT'lerin morfolojileri hakkında üç boyutlu bilgiler de vermektedir. Bu mikroskopik teknikler oldukça güvenilir ve doğru sonuçlar vermelerine rağmen numune hazırlama bu tekniklerin en önemli kısmıdır. Bununla birlikte bu teknikleri kullanarak mükemmel görüntüler almak çok zor olmaktadır.

XRD, kristal yapıya sahip malzemelerin kırınım modellerine göre fazlarının tanımlanmasında ve karakterizasyonunda kullanılan bir tekniktir. Kristal yapıya sahip olan KNT örneğine gönderilen X-ışınları numune ile etkileşime girdiğinde belirli açılarda kırınımına uğrarlar. Kırılan X-ışınları dedektör tarafından tespit edilip işlenerek KNT'nin kristal yapısı hakkında bilgi elde edilir [41-42]. Bunun yanı sıra XRD, sentezlenen KNT örneğinin saflığı hakkında da bilgi vermektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada glukoz öncü maddesinden yola çıkılarak sentezlenen KNT'lerin saflığını tahmin edebilmek için XRD tekniğine başvurulabileceği bildirilmiştir [43]. XRD, kristal yapıya sahip KNT'lerin kritik özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılabilen bir teknik olmasına rağmen amorf yapıdaki KNT'ler için uygun gözükmemektedir.

### 2.3.2. Spektroskopik teknikler

KNT'lerin karakterizasyonu için kullanılan Dinamik Işık Saçınımı (DLS), Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-GB), Fotoluminesans (FL) Spektroskopisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR), Spektroskopisi, Raman Spektroskopisi, X-Işını Fotoelektron

Spektroskopisi (XPS) ve İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi (ICP-MS) gibi teknikleri içeren çeşitli spektroskopik yöntemler mevcuttur.

DLS tekniği, KNT'lere yanıt veren detektörlere sahip sıvı faz analitik sistemler kullanılarak hidrodinamik taneciklerin boyutlarının ölçümünde kullanılmaktadır. KNT'lerin ortalama yarıçapı sıvı içerisindeki KNT'lerin difüzyon hızı ölçülerek belirlenmektedir. DLS tekniği KNT'lerin tane boyutu ölçümü için kullanılan bir teknik olmasıyla beraber floresans özelliğın girişim yapması nedeniyle yaygın kullanımı bulunmamaktadır [44-45]. Diğer taraftan, tane boyutu dağılımını kalitatif ve dolaylı olarak verdiğinden DLS tekniği ile sıvı fazdaki nano taneciğın boyutunun belirlenmesi çok güvenilir bir teknik olarak kabul edilmez [46-57].

UV-GB ve FL Spektroskopisi, KNT'lerin optik özelliklerini ölçmek için kullanılan yaygın tekniklerdir. Literatür bilgileri göz önüne alındığında, UV-GB ve FL spektroskopisi ile karakterize edilen KNT'lerin bütün türlerinin elektromanyetik spektrumun UV-GB'sinde aktif oldukları, floresans emisyonlarının da uyarım dalga boyuna bağılı olduğu anlaşılmaktadır [38, 48–50]. Bunun yanı sıra, UV-GB ve FL spektroskopileri KNT'lerin KV'sini belirlemek amacıyla birlikte kullanılan tekniklerdir. Detaylı bir şekilde bahsedilecek olursa KV'si bilinen bir referans malzeme ile karşılaştırma yapılarak KNT'lerin KV'si belirlenebilir. KNT'nin ve referans malzemenin çözeltilerinin aynı dalga boyunda uyarılarak elde edilen UV absorbans değerleri ile FL spektrumları kaydedilerek iki maddenin FL yoğunluklarının oranlanması vasıtasıyla KV hesaplanmaktadır. KV hesaplanmasında kullanılan formül Eş. 2.1'de verilmektedir.

$$\Phi_x = \Phi_{ref} \left( \frac{I_x}{I_{ref}} \right) \left( \frac{A_{ref}}{A_x} \right) \left( \frac{n_x}{n_{ref}} \right)^2 \quad (2.1)$$

Burada  $\Phi_{ref}$  ve  $\Phi_x$  sırasıyla referans maddenin ve örneğın kuantum verimleri,  $I_{ref}$  ve  $I_x$  sırasıyla referans maddenin ve örneğın aynı uyarım dalga boyunda uyarıldıklarında ürettikleri floresans sinyali,  $A_{ref}$  ve  $A_x$  sırasıyla uyarım dalga boyunda ölçülen absorbansları,  $n_{ref}$  ve  $n_x$  sırasıyla referansın v örneğın bulunduğu çözücülerin kırılma indisleri olarak Eş 2.1'de yerlerini alırlar.

FTIR, katı malzemelerin işlevselliğini tanımlamak için yaygın şekilde kullanılan bir karakterizasyon aracıdır. FTIR spektroskopisi, KNT'lerin yüzeyindeki hidroksil (-OH) ve karbonil (C=O) gibi fonksiyonel grupların belirlenmesi dışında farklı atomların ilave edildiği KNT'lerin incelenmesinde de kullanılmaktadır [49-50]. Bu farklı atomlara N, S, P, Si ve B örnek olarak verilebilmektedir [51-53]. KNT'lerin yüzey karakterizasyonu amacıyla kullanılan bu tekniğin düşük maliyetli, hızlı ve numune hazırlık aşamasının kolay olması gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte FTIR spektroskopisi, KNT'lerin yapısal özellikleri hakkında detaylı bir bilgi vermemektedir. Ayrıca KNT'lere ilave edilen Al, Mg ve Ni gibi farklı atomlar bu teknik ile incelenemezler.

Raman Spektroskopisi, belirli bir KNT örneğindeki karbonun tanımlanması amacıyla kullanılan ve numuneye zarar vermeyen yaygın tekniklerden biridir. KNT'lerin Raman spektrumları genellikle iki tane temel birinci dereceden band sunmaktadır [54-56]. Bunlardan ilki olan D bandı, düzensiz grafit veya camsı karbonun son düzleminde bulunan delokalize karbon atomlarının titreşimlerini temsil etmektedir. G bandı ise iki boyutlu bir kafes içerisindeki  $sp^2$  hibritleşmesi yapmış karbon atomlarının titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir. Bir KNT örneğinin saflığını tahmin etmenin yaygın bir yolu da düzensizliği ifade eden D bandının yoğunluğu ile ve kristallliği ifade eden G bandının büyüklüklerinin oranlamasıdır. Amorf bir yapıya sahip KNT'nin D/G oranı yüksektir. Yüksek grafitleşme derecesi nispeten düşük D/G oranını ifade etmektedir. Raman spektroskopisi, tane büyüklüğü ve D/G oranı arasındaki ters ilişkiye dayanarak KNT'lerin tane boyutlarının ölçümünde de kullanılmıştır. 2013 yılında yapılan bir çalışmada bu teknik kullanılarak KNT'lerin tane boyutlarının ölçülebilme olasılığının varlığından bahsedilmiştir [57]. Raman Spektroskopisi, KNT'lerin karakterizasyonu için kullanılan güçlü bir tekniktir. Ancak bazı çalışmalarda KNT'lerin sahip oldukları floresans şiddetleri sebebiyle yüksek kalitede raman spektrumu elde edilememesinden ve bununla beraber hatalı sonuçlar alındığından bahsedilmektedir [43, 58-60].

XPS, bir malzeme içindeki elementlerin yüzey özellikleri, elementel kompozisyonu ve elektronik durumu hakkında bilgi veren kimyasal bir yüzey analiz tekniğidir. XPS spektrumu numune üzerine X-ışını gönderilmesiyle elde edilmektedir. Bu esnada numunenin elektron sayısı ve kinetik enerjisi ölçülmektedir. XPS genellikle FTIR ile birlikte KNT'lerin elementel kompozisyonunun ve kimyasal bağlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. N, S, P, Si ve B gibi metalik olmayan atomlarla

katkılanan KNT'ler XPS ile karakterize edilebilmektedirler [53, 58, 61-62]. Bunun yanı sıra FTIR ile tespit edilemeyen Al, Mg ve Ni gibi metal atomlarıyla katkıli KNT'lerin de XPS ile karakterize edilebildiği ispatlanmıştır [63–65]. XPS, KNT'lerin elementel kompozisyonları ve işlevsellikleri adına çok değerli bir karakterizasyon tekniği olmasına rağmen tek bir nano taneciğin incelenmesinde yeterli çözünürlüğe sahip değildir.

ICP-MS, inorganik nano taneciklerin kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan kimyasal bir yöntemdir. KNT'ler için çok yaygın olarak kullanılmamakla beraber 2015 yılındaki bir çalışmada bor katkıli karbon nano taneciklerin (BKKNT) karakterizasyonunda kullanılmıştır [53]. Bu çalışmada kalibrasyon standardı olarak boronik asit kullanılarak BKKNT içerisindeki B miktarı ICP-MS yardımıyla bulunmuştur. Bulunan sonucun XPS analizinin sonucuyla uyum sağladığı söylenmiştir.

### 2.3.3. Termal teknikler

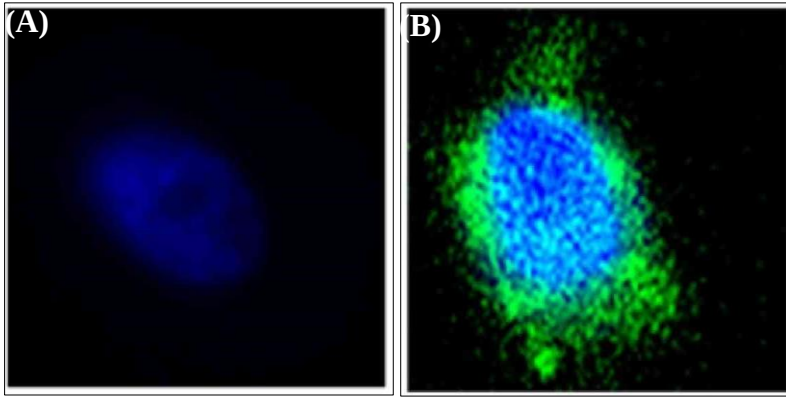
Termogravimetrik analiz (TGA), KNT'lerin termal karakterizasyonu için kullanılan tek yöntemdir [55-56, 66]. TGA ölçümünde, bir numunenin sıcaklık değişimine göre kütle kaybı veya değişim oranının hesaplanmasıyla bir diferansiyel eğri çizilmektedir. TGA özellikle numunenin termal kararlılığıyla ilgili bilgi vermektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada üç çeşit KNT'nin yüzey özelliklerinin karakterizasyonunda TGA/MS kullanılmıştır [62]. Bu çalışmada KNT örnekleri sabit helyum akışında (100 mL/d) 1000°C'a kadar ısıtılmış ve bu örneklerin TGA eğrileri elde edilmiştir. Bu eğriler incelendiğinde poli(4-amonyum stiren-sülfonik asit) öncü maddesinden yola çıkılarak sentezlenen KNT'lerin en zengin yüzey gruplarına sahip olduğu belirlenmiştir. 2012 yılında yapılan bir çalışmada ise TGA, FTIR ile eşleştirilerek kullanılmıştır [56]. TGA yönteminin çok az miktarda numuneye ihtiyaç duyması gibi avantajlarının olmasıyla beraber sadece ölçüm esnasında kütle değişimi gösteren belirli tip KNT'lerde anlamlı bilgiler vermektedir.

## 2.4. KNT'lerin Uygulama Alanları

KNT'lerin sahip oldukları eşsiz floresans özellikleri, düşük toksisiteleri ve suda iyi çözünmeleri gibi özellikleri sebebiyle biyo görüntüleme, ilaç salınımı, biyo hedefleme ve iyon tayinleri gibi alanlarda kullanımı mevcuttur.

### 2.4.1. Biyo görüntüleme

KNT'lerin en önemli uygulama alanlarından biri de hiç şüphesiz tümör hücrelerinin görüntülenmesi ve tedavisidir. Bu konuda literatürde bulunan çalışmalar incelendiğinde, KNT'lerin yüzey modifikasyonu veya modifikasyona ihtiyaç duymadan hedef tümör hücrelerce toplandığı görülmektedir. Örneğin göğüs kanseri hücrelerinin folat reseptörleri nedeniyle folik asite ilgi gösterdiği bilinmektedir. 2016 yılındaki bir çalışmada meme kanseri hücrelerinden olan MCF-7 hücrelerinin görüntülenmesi amacıyla KNT yüzeyi folik asit ile kaplanmış ve Şekil 2.10'da da verildiği üzere kanser hücrelerine yüksek bir seçicilikle penetre olabildikleri gösterilmiştir [67].

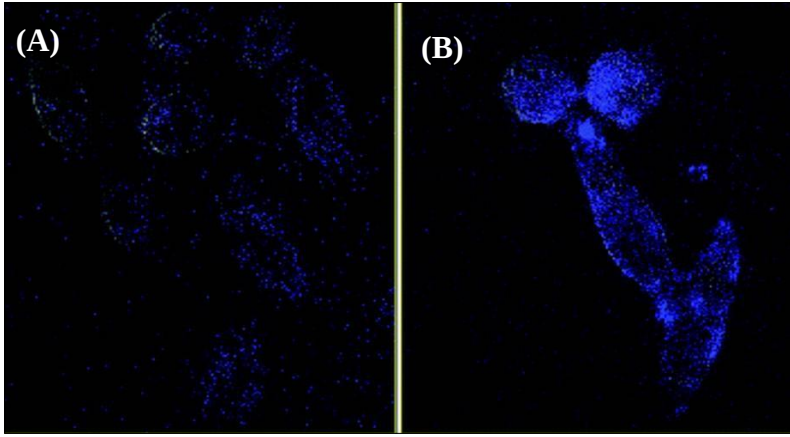


Şekil 2.10. MCF-7 kanser hücrelerinin (A) folik asit ile modifiye edilmemiş KNT, (B) folik asit ile yüzeyi modifiye edilmiş KNT ile floresans mikroskobu görüntüleri [67]

Genellikle daha büyük emisyon dalga boyuna sahip KNT'lerin biyo görüntülemelerde daha etkili sonuçlar verdiği söylenmektedir. Bunun nedeninin de kısa dalga boyuna sahip ışığın hücreye ve dokulara zarar verdiği bunun yanı sıra dokularda ve hücrelerde öz floresans etki oluşturduğu düşünülmektedir [68].

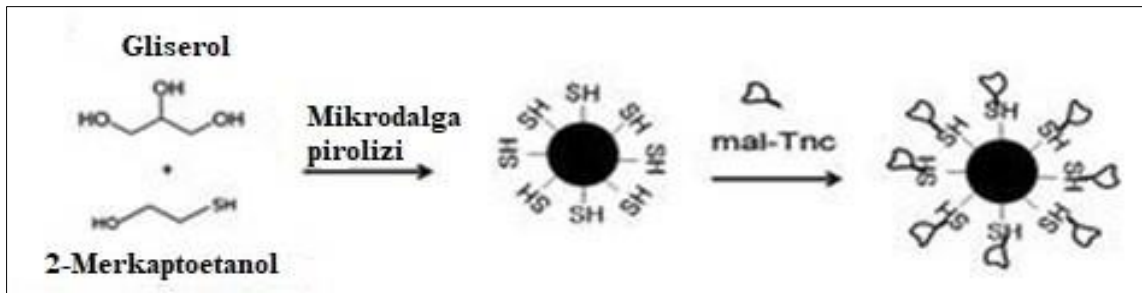
Yine 2016 yılında yapılan bir çalışmada polietilenimin (PEI) ile konjuge edilen folik asit KNT yüzeyini modifiye etmek için kullanılmış ve elde edilen modifiye KNT'ler KB hücrelerini (epidermal bir insan kanser hücresi) ve A549 hücrelerini (insan gırtlak kanseri hücresi) floresans mikroskobu altında görüntülemeyi başarmışlardır. Şekil 2.11'de (A) KNT ile (B) PEI ve folik asit ile modifiye edilen KNT ile 30 dakika inkübe edilen KB hücrelerinin floresans mikroskobu görüntüleri verilmiştir [69].





Şekil 2.11. (A) KNT ile (B) PEI ve folik asit ile modifiye edilen KNT ile 30 dakika inkübe edilen KB hücrelerinin floresans mikroskobu görüntüleri [69]

Literatürde dikkati çeken bir diğer çalışmada hazırlama yöntemine bağlı olarak KNT'nin herhangi bir yüzey modifikasyonuna ihtiyaç duymadan doğrudan tümör hücrelerine hedeflenebildiği görülmektedir [70]. Bu çalışmada dikkati çeken husus mikrodalga fırında gerçekleştirilen karbonlaşma esnasında KNT sentezinde kullanılan 2-merkaptoetanol bileşiğine ait -SH gruplarının, KNT üzerinde artık bıraktığı ve aptamer modifikasyonun bu -SH grupları üzerinden gerçekleştiğidir. Gliserol ve 2 merkaptoetanol öncü maddeleri kullanılarak sentezlenen KNT Şekil 2.12'de gösterilmiştir.

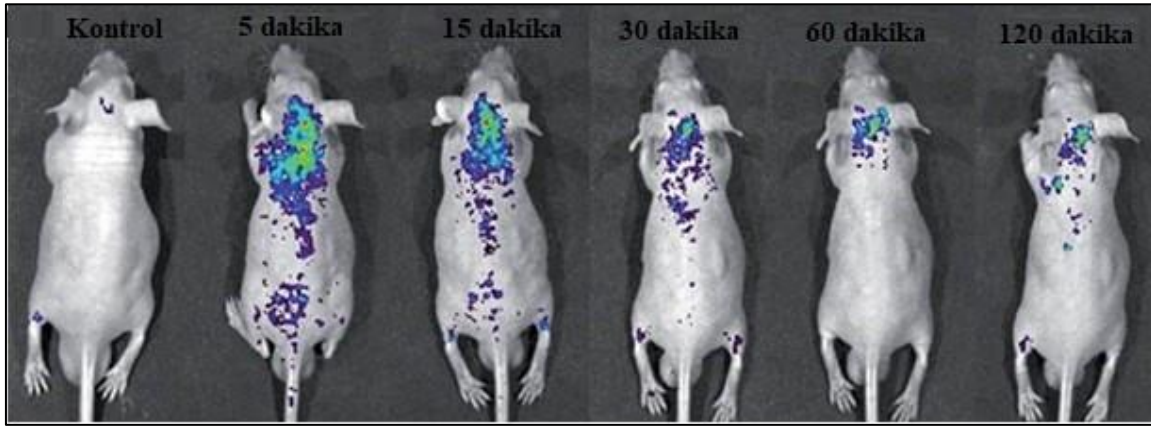


Şekil 2.12. Gliserol ve 2-Merkaptoetanol öncü maddeleri kullanılarak sentezlenen KNT [70]

2015 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise KNT sentezinde glukoz ve aspartik asit (KNT-Asp) ile glukoz ve glutamik asit (KNT-Glu) karışımı kullanılmıştır. Bu karışımlar, 200°C sıcaklıkta hidrotermal yöntemle karbonlaştırıldığında elde edilen KNT-Asp'nin % 7,5 kuantum verimine sahip olduğu, beyinde herhangi bir cerrahi müdahaleye gerek kalmaksızın glioma hücrelerine hedeflenebildiği görülmüş ve bu sayede glioma tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir [71]. Bu çalışmada, glioma hücrelerinin

glutamik asit değil de aspartik asit ile hazırlanan KNT'ye ilgi göstermesi önemli bir husustur. Zira, KNT eldesinde kullanılan kaynak moleküllerin nano tanecik yüzeyinde artık bıraktığı ve bu sayede moleküllerin fonksiyonel gruplarının işlevselliğini devam ettirdiği kanıtlanmıştır.

Öncü madde olarak sadece glisinin kullanıldığı bir çalışmada sentezlenen KNT'lerin % 29,7 KV'ye sahip oldukları görülmüştür [72]. Bununla birlikte glioma hücreleri tarafından tutulum gösterdiği ve glioma hücrelerinin görüntülenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Şekil 2.13'te glisinin karbonlaştırılmasıyla hazırlanan KNT'nin kobayda tutulumuna ilişkin görüntüye yer verilmiştir.

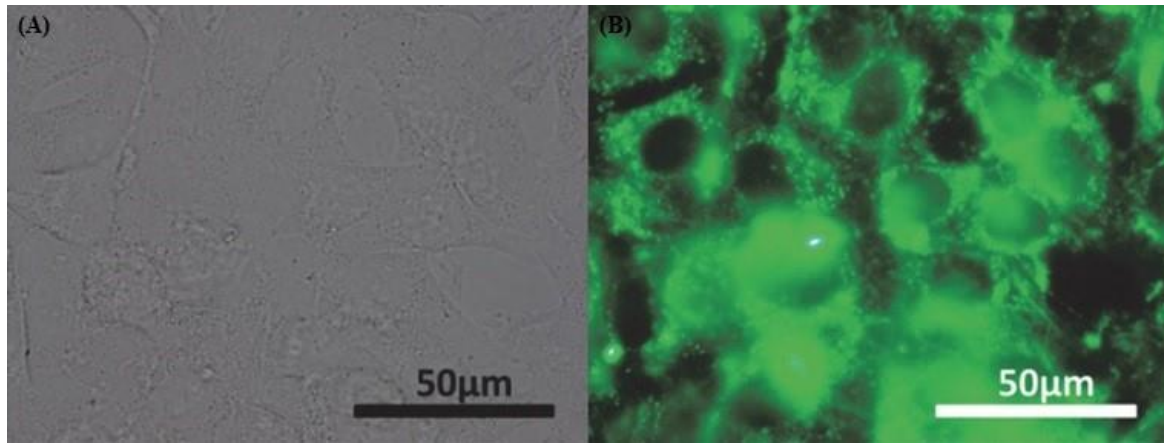


Şekil 2.13. Glisinin karbonlaştırılmasıyla hazırlanan KNT'nin kobayda tutulumu [72]

Önemli çalışmalardan bir tanesinde de zencefil özütü suyundan elde edilen KNT'lerin insan karaciğer kanser hücrelerine (HepG2) inhibisyon etkisi gösterirken, normal memeli epitel hücrelerine (MCF-10A) ve normal karaciğer hücrelerine (FL83B) herhangi inhibe etki göstermediği görülmüştür [73]. Bu çalışma, KNT sentezinde kaynak olarak kullanılan moleküllerin kalıntılarının etkinliklerini devam ettirdiğinin önemli bir kanıtıdır.

2015 yılında yapılan bir çalışmada tek basamakta sentezlenen floresans özelliğe sahip KNT'lerin yüzey modifikasyonuna ihtiyaç duyulmadan HeLa kanser hücrelerinde biyo görüntüleme amaçlı kullanılabileceğinden bahsedilmiştir. Çalışmada sitotoksikite testi HeLa kanser hücrelerine 0-2 mg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda KNT'ler enjekte edilerek yapılmıştır. KNT konsantrasyonunun artması hücre canlılığında belirgin bir azalmaya sebep olmamıştır. Hücrelerin %98'i yüksek konsantrasyonda KNT enjekte

edilmelerine rağmen 24 saat inkübasyon sonrasında bile canlılığını korumuştur. KNT'lerin HeLa kanser hücrelerine enjekte edilmesi sonrasında bu hücrelerin mavi ışık ile uyarıldıklarında güçlü bir yeşil floresan ışık yaydıkları görülmüştür. Bu durum da KNT'lerin hücre görüntüleme için harika bir floresan malzeme olduğunu göstermiştir [23]. Bu hücrelerin aydınlık alanda ve mavi ışık uyarımı altındaki görüntüleri Şekil 2.14'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14. KNT ile muamele edilmiş HeLa kanser hücrelerinin (A) aydınlık alan (B) mavi ışık uyarımı altındaki görüntüleri [23]

#### 2.4.2. İlaç salınımı

Geleneksel bir ilaç taşıyıcının gözlemlenebilirliği ve izlenebilirliği yoktur. Bu sebeple araştırmacılar bu sorunları çözebileceğini düşündükleri floresan malzemelere başvurmuşlardır. Sahip oldukları düşük toksisite, mükemmel biyo uyumluluk ve modifiye edilebilir yüzey fonksiyonel grupları sebebiyle KNT'ler ilaç salınımı araştırmalarında sıklıkla kullanılmışlardır.

2015 yılında yapılan bir çalışmada gliserol öncü maddesinden yola çıkılarak piroliz yöntemiyle KNT sentezlenmiştir [74]. Sentezlenen bu KNT'leri PEG ile modifiye etmişlerdir. Modifiye edilen bu KNT'lerin antikanser ilacı olan doksorubisin (DOX) taşıyıcısı olarak kullanılabildiği ve HeLa hücrelerinde DOX salınım hızının incelendiği söylenmiştir. Sonuçlar, sitoplazmadaki ve çekirdekteki KNT'lerin ve DOX'un sırasıyla mavi ve kırmızı renkte floresans emisyonu yaptığını göstermiştir.

Literatürdeki bir diğer çalışmada KNT'lerin yüzeyindeki amino asitler bir kanser ilacı olan oksaliptatin ile kimyasal bağlanma reaksiyonu kullanılarak birleştirilmiştir [75]. Bu şekilde modifiye edilen KNT'ler endositoz yoluyla kanser hücrelerinin içine penetre olabilmektedirler. Kanser hücrelerinin iç ortamındaki hızlı değişiklikler sebebiyle ilaç KNT'lerin yüzeyinden salınabilmektedir. Çalışmadaki sonuçlar, kanser hücrelerinde KNT'lerin floresans sinyallerinin izlenerek kanser vakalarında oksaliptatin dağılımının tam olarak anlaşılabilirliğini göstermiştir. Bu durum da ilacın kanserli hücrelere doğru zaman ve dozda enjekte edilebilmesi hakkında doktorlara daha net bilgiler sağlayacağı düşünülmüştür.

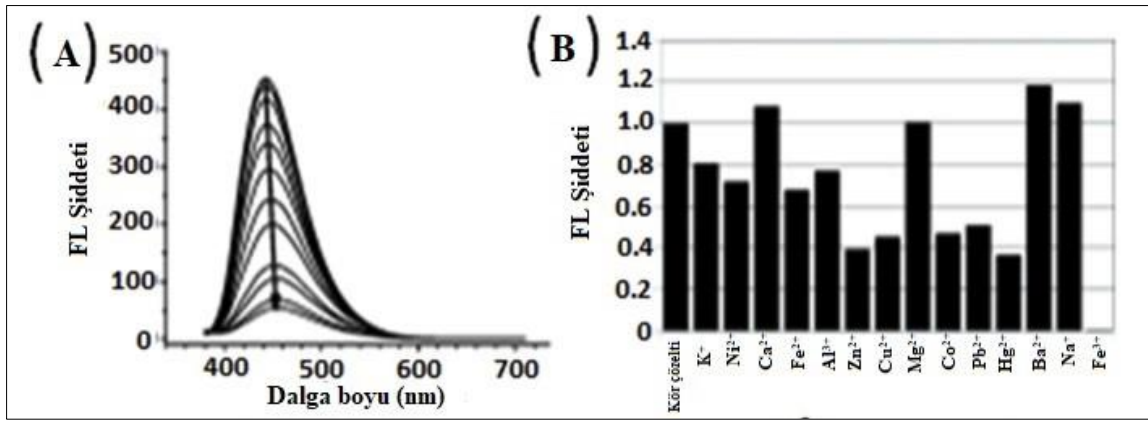
2016 yılında yapılan bir diğer çalışmada mikrodalga yöntemiyle tek basamakta sentezlenen yeşil renkte floresans yapan KNT'ler kanserli hücreleri sağlıklı hücrelerden ayıran ilaç salınım sistemine dönüştürülmüştür. Kansere özgü ilaç salınım sistemini tasarlarken kanserli ve sağlıklı dokular arasındaki pH farkından yararlanmışlardır. Çalışmada karaciğer kanseri hedef hastalık olarak seçilmiştir. Çünkü vaka sayısındaki artış hızı eğilimi ile dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en fazla gerçekleştiği üçüncü kanser çeşidi olduğu söylenmiştir. Kanser ilacı olarak da DOX seçilmiştir. Sentezlenen KNT'lerin ve DOX'un kovalent olmayan bağlarla KNT'ler üzerindeki COOH ve DOX üzerindeki  $\text{NH}_2$  gruplarıyla basit bir şekilde konjugatlar oluşturabildiği gösterilmiştir. Bir dizi in vivo ve in vitro çalışma yürütülmüş, karboksil grubunca zengin yeşil renkte floresans emisyon yapan KNT'lerin ilaç salınım araştırmalarında toksik olmayan bir ajan oldukları gösterilmiştir. Dahası in vivo olarak yapılan çalışma sonucunda KNT'lerin kararlı bir kanser ilacı salınım sistemi olarak kullanılabileceği, bölgesel terapi uygulayarak seçici bir şekilde kanser hücrelerini öldürdüğü anlaşılmıştır [76].

### 2.4.3. Sensör uygulamaları

KNT'lerin ilginç uygulama alanlarından bir tanesi de sensör uygulamalarıdır. KNT'ler ve kimyasallar arasındaki etkileşim KNT'lerin floresans özelliklerinin sönümlenmesi veya artmasıyla sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla KNT'ler maddelerin miktarlarını tayin etme açısından floresans probu olarak kullanılabilmektedir. Şu ana kadar KNT'lerin floresans özellikleri baz alınarak çeşitli sensörler geliştirilmiştir. KNT'ler en yaygın olarak metal iyonlarının tespitinde kullanılmaktadırlar. Literatür incelendiğinde  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  kationları, üzerinde en çok çalışma yapılan iyonlar olarak öne çıkmaktadır [77].

Bu metal iyonları arasında da demir katyonu da yapılan çalışmalarda en çok rapor edilen iyondur. Demirin insan hayatında çok önemli bir rolü vardır ve demir eksikliği de küresel besin eksikliği anlamında dünyada ilk sırada gelmektedir. Demir iyonlarının biyolojik sistemdeki ve çevredeki varlığı dikkatli bir şekilde izlenmelidir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada hidrotermal yöntemle sitrik asit ve etilendiamin öncü maddeleri kullanılarak yüksek floresans özelliğe sahip KNT'ler sentezlenmiştir. KNT'lere farklı metal iyonları ilave edilmiş ve  $\text{Fe}^{3+}$  iyonu KNT'lerin floresans şiddetini seçici bir şekilde sönmüştür. Gözlenebilirlik sınırı da 18  $\mu\text{M}$  olarak gözlenmiştir.  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun floresans şiddetini sönmülemesini ve farklı metal iyonlarının ilavesiyle floresans şiddetinde meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.15. (A) Demir iyonlarının floresans sönmülmesi (B)  $\text{Fe}^{3+}$  iyonunun seçiciliği [24]

Sönmüleme olayının,  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları ile KNT'lerin yüzeyindeki fenolik hidroksil grupları arasındaki güçlü etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir [24]. Bu tarz sensör mekanizmaları KNT bazlı  $\text{Fe}^{3+}$  iyonu sensörü geliştirmek için çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Sentez esnasında kullanılan farklı öncü maddeleri sebebiyle KNT, yüzeyinde farklı kimyasal gruplar bulundurmaktadır. Bu durum, KNT'lerin yüzeyindeki gruplarla analitin bağlanma özelliklerinin değişmesine sebep olmaktadır. Dolayısıyla ilave edilen iyonlar farklı şekilde duyarlılık ve seçicilik göstermektedir.

KNT'ler sadece öncü maddeler kullanılarak sentezlendiği gibi sentez esnasında farklı atomlarla katkılama yapılarak da sentezlenmektedirler. Bu şekilde sentezlenen KNT'lerin demir iyonlarının tespitinde daha etkili olduğu söylenmektedir [77]. Örneğin 2014 yılında

yapılan bir çalışmada Si katkılı KNT'ler sentezlenmiş ve bu KNT'lerin  $\text{Fe}^{3+}$  tespitinde oldukça seçici davrandıkları ortaya konmuştur. Araştırmacılar Si katkılı KNT'lerin yüzeydeki  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarını fiziksel olarak adsorbe edebileceğini açıklamışlardır [78]. Bir başka çalışmada ise S katkılı KNT'ler sentezlenmiştir.  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları ile KNT'lerin kenarlarında bulunan fenolik hidroksil grupları arasındaki etkileşim sebebiyle S katkılı KNT'lerin uyarılmış haldeki elektronları  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarının boş orbitallerini doldurduğu ve bu durumun da floresans sönümlemesine yol açtığı belirtilmiştir [79].

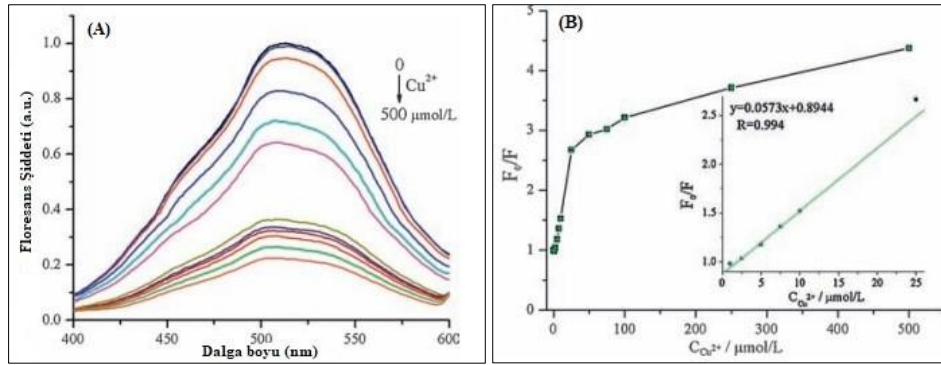
$\text{Hg}^{2+}$  iyonu çevre ve sağlık açısından en tehlikeli iyonlardan bir tanesidir. Bu iyonun derinin içine ve sindirim sistemi ile alakalı dokulara kolayca nüfuz ederek merkezi sinir sisteminde ve DNA'da büyük zararlara yol açtığı bilinmektedir. Amerikan Çevre Koruma Ajansı Standardına göre içme suyundaki  $\text{Hg}^{2+}$  miktarı azami 10 nM olarak belirlenmiştir. Konuyla alakalı yapılan çalışmalardan bir tanesinde greylift kabuğu kullanılarak hidrotermal yöntem ile floresans özelliğe sahip KNT'ler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu örneklerin  $\text{Hg}^{2+}$  tespitinde duyarlı ve seçici olduğu, gözlenebilirlik sınırının da 0,23 nM olduğu belirtilmiştir. Bu durum, KNT'lerin yüzeyindeki karboksilik grupların  $\text{Hg}^{2+}$  iyonuna karşı ilgisinden kaynaklandığı söylenmiştir [80].

2013 yılında yapılan diğer bir çalışma, amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ve sodyum sitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) varlığında hidrotermal yöntem kullanılarak KNT sentezinden bahsedilmektedir. Sentezlenen KNT'lere  $\text{Hg}^{2+}$  iyonunun yanında  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  iyonları da ilave edilmiştir. İlaveler sonrasında KNT'lerin en güçlü etkileşimi  $\text{Hg}^{2+}$  iyonu ile gösterdiği gözlenmiştir ve bu iyonla karşı seçiciliğinin iyi olduğu anlaşılmıştır. Sentezlenen bu KNT'lerin gerçek su numunelerinde kullanılabilirliğinin araştırılması adına birtakım deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde çeşme suyu ile az miktarda  $\text{Hg}^{2+}$  içeren ve ticari olarak satılan içme suyuna farklı derişimlerde  $\text{Hg}^{2+}$  iyonu ilave edilmiştir. Bu ilaveler sonunda elde edilen sonuçlar, bu KNT'lerin sulu çözeltilerde  $\text{Hg}^{2+}$  iyonunun tespitinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir [81].

Literatür incelendiğinde yoğun olarak çalışılan konulardan bir tanesi de KNT'ler ile  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun tespit edilmesidir.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu insan vücudunda bulunan önemli bir eser elementtir ve doğal suda yaygın olarak bulunmaktadır. Fakat yüksek derişimlerde zehirli olmakla birlikte uzun süre maruz kalındığında karaciğer ve böbrekte kalıcı hasarlara yol

açabilmektedir. Ayrıca  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun Alzheimer ve Parkinson gibi birçok beyin hastalığı ile ilişkili olabileceği varsayılmaktadır.

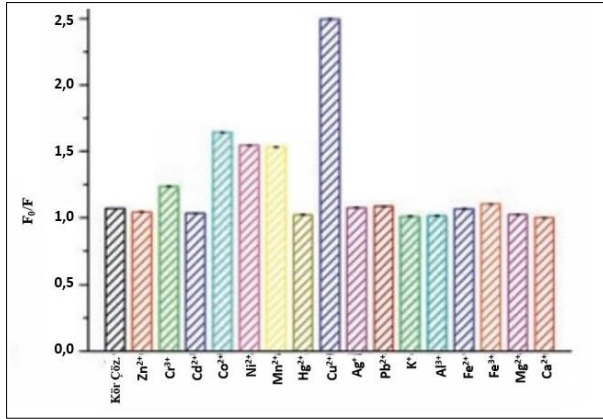
2014 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar karboksil, hidroksil ve amin gibi yüzey fonksiyonel gruplara sahip KNT'ler ile  $\text{Cu}^{2+}$  tespitine yönelik denemeler yapmışlardır. Bu fonksiyonel gruplar  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu ile kompleks oluşturmuş ve bu da KNT'lerin floresansında sönümlenmeye sebep olmuştur. Tayin sınırı da 23 nM olarak saptanmıştır [82]. Literatürde çıkan bir diğer çalışmada sadece aminofenilboronik asit öncü maddesi kullanılarak yakma yöntemi ile B ve N katkılı KNT'ler sentezlenmiş olup bu örneklerin yeşil renkte floresans emisyon yaptıkları ve %1,6 KV'ye sahip oldukları gözlenmiştir. Sentezlenen bu KNT'ler de yüzeylerinde bol miktarda karboksil, hidroksil ve amin grupları ihtiva etmektedir. Çalışmada da bu grupların  $\text{Cu}^{2+}$  iyonuna olan afinitesi araştırılmıştır.  $\text{Cu}^{2+}$  ilavesinin artışıyla birlikte KNT'lerin floresans şiddetinde hızlı bir azalış meydana gelmiştir.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu için tayin sınırı 0,3  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir [83].  $\text{Cu}^{2+}$  ilavesiyle floresans şiddetindeki azalışı ve artan  $\text{Cu}^{2+}$  derişimine karşı çizilen  $F_0/F$  grafiği Şekil 2.16'da verilmiştir.



Şekil 2.16. (A) artan  $\text{Cu}^{2+}$  derişimine karşı floresans şiddetindeki azalış, (B)  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu ve  $F_0/F$  arasındaki ilişki [83]

Yine aynı çalışmada B ve N katkılı KNT'lerin seçiciliği de araştırılmıştır. Bu KNT'lerin floresans şiddetindeki değişimi gözlemlemek için farklı iyon denemeleri yapılmıştır. Yapılan bu iyon denemeleri sonucunda KNT'lerin  $\text{Cu}^{2+}$  iyonuna karşı gösterdiği seçicilik Şekil 2.17'de sunulmuştur.





Şekil 2.17. Farklı iyonların ilavesiyle KNT'lerin floresans şiddetinde meydana gelen değişiklik [83]

Literatürde,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  gibi iyonların yanında  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$  gibi bir seri metal iyonu üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Örneğin,  $\text{Cr}^{6+}$  tespitine yönelik çalışmalar farklı araştırma grupları tarafından çalışılmıştır. Bu araştırmacılar floresans şiddetindeki sönümlenme için  $\text{Cr}^{6+}$ 'nın indirgenmesi, iç filtre etkisi ve  $\text{Cr}^{6+}$  ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşim gibi birden çok mekanizma önermişlerdir [84].

Konu ile alakalı yapılan çalışmalarda genellikle iyon ilavesi floresans şiddetinde azalmaya sebep olmaktadır. Ancak bunun tersinin gerçekleştiği çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, 2015 yılındaki bir çalışmada  $\text{Ag}^+$  ilavesinin KNT'lerin floresans şiddetini arttırdığı görülmüştür. Bu durumun da KNT yüzeyindeki  $\text{Ag}^+$ 'nın  $\text{Ag}^0$ 'a indirgenmesinden kaynaklandığı söylenmiştir [77].

Metal iyonlarının yanında KNT'ler anyon tayininde de kullanılmaktadır ancak metal iyonlarıyla yapılan çalışmalara oranla daha azdır. Bu çalışmalardan bir tanesi  $\text{NO}_2^-$  iyonu üzerinedir. Bu iyonun aşırı miktarda alınması insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü içme suyundaki  $\text{NO}_2^-$  derişimini azami 3 mg/L olarak belirlemiştir. 2018 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, hidrotermal yöntemle sentezlenen KNT'ler kullanılarak  $\text{NO}_2^-$  iyonuna duyarlı sensör geliştirilmiştir. KNT'lere  $\text{NO}_2^-$  ilavesi sonrasında floresans şiddetlerinde azalma meydana gelmiştir. Burada  $\text{NO}_2^-$  iyonu elektron alıcı olarak kabul edilmiş ve KNT'lerin bazı elektronları uyarılarak bu iyonla transfer olmuştur. Bu olay da KNT'lerin floresans şiddetinde azalmaya sebep olmuştur. Floresans şiddetindeki değişimlerin pH değişimine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmiş ve bunun sebebinin de sulu çözeltideki  $\text{H}^+$  iyonunun konsantrasyonunun KNT'ler üzerindeki



fonksiyonel gruplar üzerindeki etkisine dayandığı savunulmuştur. pH değeri azaldığında  $\text{NO}_2^-$  iyonunun sönümleme etkisinin arttığı gözlenmiş ve bu iyonun KNT'lerin floresans şiddetindeki değişimden yararlanılarak tayin edilebileceği iddia edilmiştir [85].

2014 yılındaki diğer bir çalışmada  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{PO}_4^{3-}$  iyonlarının arasındaki güçlü etkileşimden yararlanılarak KNT'ler  $\text{PO}_4^{3-}$  iyonu tayininde kullanılmıştır. Başlangıçta KNT'ler üzerine belirli konsantrasyonlarda  $\text{Fe}^{3+}$  iyonu ilave edilmiş ve floresans şiddetinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Ancak daha sonra  $\text{PO}_4^{3-}$  iyonunun ilavesiyle azalarak zayıflamış olan floresans şiddeti artmaya başlamıştır. Bu durumun da  $\text{PO}_4^{3-}$  iyonunun  $\text{Fe}^{3+}$  iyonuna karşı güçlü bir afinitesinin olduğu ve  $\text{Fe}^{3+}$  ile kararlı bir kompleks oluşturmasıyla gerçekleştiği ifade edilmiştir [86].

Literatürde karşılaşılan bir diğer çalışmada ise araştırmacılar,  $\text{ClO}^-$  iyonuna karşı duyarlı KNT bazlı sensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu sensör çeşme suyunda  $\text{ClO}^-$  tayinine yönelik çalışmalarda denenmiş ve  $\text{ClO}^-$  ilavesiyle floresans şiddetinde azalma meydana gelmiştir. Bu sensörün yüksek seçiciliğe sahip olması, kısa sürede tepki vermesi ve tepki aralığının çok geniş olması gibi önemli avantajlarının olduğu söylenmiştir. Sahip olduğu bu avantajlar sayesinde çeşme suyundaki  $\text{ClO}^-$  iyonunun tayininde etkili bir şekilde kullanılabileceği iddia edilmiştir [87].

Tüm bunların yanı sıra KNT'ler bazı küçük moleküllerin tayin edilmesinde de kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi glukoz tayinidir. Glukozun insan vücudunda taşınımının diyabet ve bazı kanser hastalıklarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sebeple glukozun izlenmesi hastalıkların teşhisi, tedavisi ve hastalıklardan korunmak için kritik bir öneme sahiptir. 2014 yılındaki bir çalışmada fenilboronik asidin öncü madde olarak kullanılarak tek basamakta sentezlendiği KNT'ler glukoz tayininde kullanılmıştır. Çalışmada KNT'lerin floresans şiddetiyle ilave edilen glukoz derişimi arasında ters bir orantı olduğu anlaşılmıştır. Yani ilave edilen glukoz derişimi arttıkça floresans şiddetinde azalma meydana gelmiştir. Seçicilik çalışmalarının yapıldığı bu araştırmada KNT'lere glukoz haricinde askorbik asit, glutamin, dopamin ve ürik asit gibi farklı moleküller de ilave edilmiştir. Ancak bu moleküllerin KNT'lerin floresans şiddeti üzerindeki etkisi glukoz kadar olmamıştır. Glukozun floresans şiddetini azaltmasına ve diğer moleküllere nazaran daha çok tepki vermesine, boronik asit ile cis-diol grupları arasında kararlı boronat komplekslerin oluşması sebep gösterilmiştir [27]. Bu çalışmaya benzer, yüzeyinde boronik

asit grupları ihtiva eden bir dizi KNT sentezlemiş ve glukoz tayini çalışmalarında kullanılmıştır. Örneğin, 2013 yılındaki bir çalışmada yüzeyinde karboksil grupları bulunduran ve aminofenilboronik asit bağlanmış KNT'ler sentezlenmiştir. Boronik asit ile fonksiyonelleştirilmiş KNT'ler glukoz ile reaksiyona girmiş ve bu durum da floresans şiddetinde azalma meydana getirmiştir [66]. Bir başka çalışmada sitrik asit öncü maddesi kullanılarak KNT sentezi yapılmıştır. Aminofenilboronik asit ise yüzey pasifleştirici olarak kullanılmış ve sentezlenen KNT'ler glukoz tayini için kullanılmıştır [88].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler

BKKNT sentezinde bor kaynağı olarak fenilboronik asit (Sigma-Aldrich, %98), karbon kaynağı olarak L-glutamin (Sigma-Aldrich, reagent plus,  $\geq$  %98 (HPLC)), çözücü olarak da sülfürik asit (Merck, emsure, %95-97) ve sodyum hidroksit (Merck, pellets pure) kullanılmıştır. pH ayarlamaları için sodyum karbonat (Merck, emsure, iso) tercih edilmiş olup diyaliz işleminde membran zar (spectra/por, MWCO:2 kD) ve ultra saf su (18,2 M $\Omega$ ) kullanılmıştır. Hücre uygulamaları kapsamında hücre kültürü malzemeleri olarak Colo 320 CD133+ (ATCC: CCL-220.1) ve Colo320 CD133- (ATCC: CCL-220.1), RPMI-1640 ortamı (Gibco, 52400-025), %10'luk ısı ile etkisizleştirilmiş (heat inactivated) fetal bovin serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1'lik penislin-streptomisin (Capricorn Scientific-PS-B), %1'lik glutamin (EMD Millipore, K0282), %0.25'lik Trypsin-EDTA (Capricorn Scientific-TRY-3B) ve DMEM F12 (Capricorn Scientific, DMEM-12-A) kullanılmıştır. MTT analizlerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Biotium, #30006) ve dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) tercih edilmiştir. İmmunohistokimyasal analizlerde ise %3'lük hidrojen peroksit (Merck, K31355100 303), triton-X100 (Applichem, Mt 646, 85g/mol), bloklama çözeltisi (Invitrogen, 859043), anti-kaspaz 3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-98785), anti-Ki67 (Thermofisher Scientific RB-081-A1), lamin B1 (Proteintech, 12987-1-AP), P16 (Proteintech, 10883-1-AP), sitokrom C (Santa Cruz Biotechnology, 13156), biotin-streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Invitrogen, 859043), diaminobenzidine kromojeni (DAB) (ScyTek, ACC125), Mayer's hematoksilen (05-06002/L) ve immunositokimya kapatma ortamı (Spring Bioscience, DMM-125) kullanılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

BKKNT ürünlerinin sentez aşamasında Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarında bulunan Nüve marka FN500 model etüv kullanılmıştır. Sentezlenen BKKNT ürünlerinin içerisindeki büyük partikülleri çöktürmek ve ürünleri daha saf hale getirmek için BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan Eppendorf marka 5810R model santrifüj cihazı kullanılmıştır. Sentezlenip saflaştırılan ürünlerin katı haldeki karakterizasyonlarının

yapılabilmesi için BOREN Laboratuvar altyapısında bulunan Hypercool marka HC3110 model liyofilizatör kullanılmıştır.

BKKNT ürünlerinin B tayinleri BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar altyapısında bulunan Perkin Elmer marka ELAN 9000 model ICP-MS cihazı ile yapılmıştır. Sentezlenen ürünlerin C, H, N, S, ve O miktarları Gazi Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yer alan Thermo Scientific marka S2000 model Elementel Analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ürünlerin yapısal özelliklerini incelemek amacıyla X-Işını Kırınımı (XRD) difraktogramları BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan PANalytical marka Empryan model XRD cihazı ile çekilmiştir. Yine ürünlerin yapısal karakterizasyonu için BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan Varian marka 660 IR model Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FTIR) cihazı kullanılmıştır. Ürünlerin sıcaklıkla kütle kayıpları arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla ölçümler yine BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar alt yapısında bulunan Netzsch marka STA 449 F3 Jupiter model termal analiz cihazı ile alınmıştır. Ürünlerin UV-GB ve FL spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde bulunan Agilent marka Cary 60 model UV-GB Spektrofotometresi ve Agilent marka Cary Eclipse model FL Spektrofotometresi ile alınmıştır. Zeta potansiyel ölçümünde BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar altyapısında yer alan Malvern marka Zetasizer Nano ZSP model zeta potansiyel ölçüm cihazı kullanılmıştır.

XPS ölçümleri yine BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan Thermo Scientific marka K-Alpha model XPS cihazı ile alınmıştır. TEM ölçümleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FEI marka Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Biotwin model cihaz ile alınmıştır. Hücre uygulamaları kapsamında yapılan MTT analizleri Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji Bölümü Laboratuvarında bulunan BioTek marka ELx800™ model cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1. BKKNT sentezi**

BKKNT sentezinde bor kaynağı olarak Fenilboronik asit (FBA), karbon kaynağı olarak da bir amino asit olan glutamin (GLU) kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak amino asit kullanılmasının nedeni tümör hücrelerinin amino aside afinite göstermesi ve hücre

geçirgenliğini arttırmasıdır. Bor kaynağı olarak, sahip olduğu aromatik grup ve buna bağlı olarak etkin grafenleşme kabiliyeti nedeniyle FBA kullanılmıştır. İlk etapta FBA ve GLU örneklerinden 0,25'er g tartılarak teflon kap içerisine alınmıştır. Sonrasında teflon kap içerisine alınan örnekler üzerine yaklaşık 25 mL 1 M sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) ilave edilerek teflon kabın kapağı kapatılmış ve sızdırmayı önlemek için teflon bant ile sarılmıştır. Son olarak teflon kap paslanmaz çelik reaktör içerisine koyularak 170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C sıcaklıklarda 2 saat süreyle etüv içerisinde bekletilmiş ve BKKNT ürünü elde edilmiştir. FBA'nın etkili bir şekilde karbonlaşması için tercih edilen sıcaklık 160-200 °C aralığında olup amino asit için bu değer 200-300 °C gibi geniş bir aralıktır [71]. Bu sebeple sıcaklık değişkeni olarak yukarıda belirtilen değerler tercih edilmiştir.

### 3.2.2. BKKNT saflaştırma işlemi

Sentezlenen BKKNT ürünü hücre uygulamalarında kullanılacağı için pH yaklaşık 7 olana kadar  $Na_2CO_3$  ilavesi yapılmıştır. pH ayarlaması yapıldıktan sonra BKKNT ürünü, 2 mL'lik santrifüj tüplerine aktararak 5300 rpm'de 10 dakika, 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve çözelti içerisinde kalan büyük partiküllerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra ürün, 0,22  $\mu$ 'luk süzgeç kağıdından geçirilerek içerisindeki tuzdan ve safsızlıklardan arındırılmak amacıyla 2 kD'luk membran zar içerisine alınmış ve diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işlemi yaklaşık 2 L ultra saf su içerisinde gerçekleştirilmiş ve su 2 saatte bir değiştirilmiştir. 3 kez tekrarlanan bu işlem sonucunda saf BKKNT ürünü elde edilmiştir.

Elde edilen BKKNT ürününün karakterizasyon çalışmaları için hem katı hem de sıvı ürün ihtiyacı bulunmaktadır. Katı halde yapılacak karakterizasyon çalışmaları için saflaştırma sonrasında elde edilen ürün ilk olarak -4 °C'de dondurulmuş ve sonrasında liyofilizatörde 2 gün süreyle -110 °C'de toz haline gelmesi sağlanmıştır. Sıvı halde karakterize edilecek olan ürünlere ise herhangi bir işlem uygulanmamış ve ürünler +4 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.3. İyon deneyleri

Bu tez çalışmasında, sentezlenen BKKNT ürünlerinin yabancı iyonlara karşı duyarlılığı ve seçiciliği üzerine de deneyler yapılmıştır. Bu kapsamda BKKNT ürününün  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $CO_3^{2-}$  ve  $SO_4^{2-}$  iyonları üzerinde duyarlılığı ve seçiciliği test edilmiştir.

Ölçümler, cihazın konfigürasyonu uyarma yarık aralığı 10, emisyon yarık aralığı 5 nm olacak şekilde ayarlanarak 270 nm ile 500 nm dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde 6 farklı sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürününden 270 °C'ta sentezlenen ve en yüksek KV'ine sahip olan ürün tercih edilmiştir. Öncelikle ürünün absorbands değeri pH'si 7 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 0,1 olarak ayarlanmıştır. PBS kullanılmasının sebebi iyon ilavesi sonrasında meydana gelebilecek pH değişimini engellemektir. Test edilecek iyonlara ait konsantrasyonu  $10^{-5}$  M olan standart çözeltiler hazırlanmış ve sırasıyla ürüne ilave edilerek FL şiddetleri ölçülmüştür. Seçicilik deneylerinden alınan sonuçlar doğrultusunda  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonu üzerinde de duyarlılık deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerde de aynı BKKNT ürünü kullanılmış ve aynı ayarlamalar yapılmıştır. Bu kez 1 ile 15 nM arasında değişen konsantrasyonlarda  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltileri hazırlanmış ve ürüne ilave edilerek FL şiddetleri ölçülmüştür.

#### 3.2.4. Hücre deneyleri

Tez çalışması kapsamında 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünler hücre uygulamaları için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiş ve hücre uygulamaları burada gerçekleştirilmiştir. Uygulamada primer kolon kanseri hücre hattı olan Colo320, kontrol hücresi olarak da vero hücreleri kullanılmıştır. Colo320 hücre hattı RPMI-1640, %10'luk fötal bovin serum, 2 mM L-glutamin, ve %1'lik penisilin-streptomisin içeren kültür ortamında, vero hücre hattı ise %10'luk FBS, %1'lik pensilin-streptomisin ve 1 L-glutamin içeren DMEM F12 içerisinde 37 °C sıcaklık ve %5'lik  $\text{CO}_2$  sağlayan inkübatörde kültüre edilmiştir. Kültüre edilen hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak toplanmıştır. 1637 rpm'de 10 dakika süreyle gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra üstte kalan faz atılarak hücrelerin üzerine 60 µl tampon eklenmiş ve resüspanse edilmiştir. Daha sonra 20 µl bloklama çözeltisi ve 20 µl CD133 mikro boncuk eklenmiş 15 dakika buz üzerinde karıştırılıp hücrelerin inkübasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonrası 1 ml tampon eklenip 1637 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan faz atılarak 500 µl tampon eklenmiş ve pellet resüspanse edilmiştir. Manyetik ayırma işlemi için kolon manyetik alana yerleştirilmiş ve 500 µl tampon ile kolon yıkanmıştır. Hücre içeriği kolondan geçirilmiş ve pozitif ayırmada CD 133+ hücreler kolonda kalmıştır. İstenmeyenler (negatif ayırma-CD133-) ise alt tüpte birikmiştir. 3x500 µl tampon ile istenmeyen hücreler akıtılmıştır. Kolon manyetik alandan ayrılıp 1ml tampon kullanılarak

kolon hızlıca kendine ait şırınga ile yıkanmıştır. CD133+ hücreler ayrı bir tüpe toplanmış ve 1637 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek tampon uzaklaştırılmıştır. Hücreler vasat ile bir kez yıkandıktan sonra kültür kabına konularak inkübasyona bırakılmıştır. Colo 320 hücrelerinden ayrıştırılmış olan CD133+ ve CD133- ile vero hücreleri konfluent olduktan sonra iki ana gruba ayrılmıştır. Gruplardan bir tanesi kültür ortamında belirli oranlarda 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünleri ile 24 saat inkübe edilerek BKKNT ürünlerinin hücreler ile konjuge olması sağlanmıştır. Diğer ana gruba ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır.





## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında öncelikle BKKNT ürünlerinin sentezi gerçekleştirilmiş, sentezlenen ürünler karakterize edildikten sonra hücre uygulamaları yapılarak yabancı iyonlara karşı duyarlılığı ve seçiciliği test edilmiştir. Yapılan deneylere ve karakterizasyonlara ait sonuçlar bu bölümde detaylı bir şekilde verilmiştir.

### 4.1. Elementel Analiz Sonuçları

C, H, N, S ve O doğanın temel elementleridir. Bu elementlerin miktarlarını tayin eden cihaz da Elementel Analiz Cihazıdır. Bu cihazda temel prensip numunenin yüksek sıcaklıklarda yanması esasına dayanmaktadır. Sıcaklık 800-1200 °C'a kadar çıkabilmektedir. İlk aşamada, numune genellikle kalay bir kapsüle konularak yüksek sıcaklıklarda yakılmakta ve yükseltgenmektedir. Yakılarak gaz haline gelen numuneler, taşıyıcı bir inert gaz ile, genelde He, bir kromatografi kolonuna gönderilerek O<sub>2</sub> gazı ile yakılmaktadır. Yanma işlemi sonrasında oluşan ve ayrılan gazlar ayrı ayrı özel tutucu kolonlarda tutularak her birinin miktarı ısısal iletkenlik dedektörü aracılığıyla belirlenmektedir. Her bir gazın miktarı ile orantılı olarak bir elektrik sinyali elde edilmektedir. Bu elektrik sinyali daha sonra spektrumda elde edilen eğri alanlarıyla orantılı olarak örneğin elementel bileşim yüzdesini vermektedir. Farklı sıcaklıklarda (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen BKKNT ürünlerine ait elementel analiz sonuçları Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. BKKNT ürünlerine ait elementel analiz sonuçları

| Ürün Adı  | C (%) | H (%) | N (%) | S (%) |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| BKKNT-170 | 10,92 | 1,25  | 2,63  | 17,44 |
| BKKNT-190 | 10,07 | 1,09  | 2,25  | 18,43 |
| BKKNT-210 | 7,78  | 1,05  | 1,92  | 19,33 |
| BKKNT-230 | 8,27  | 1,12  | 1,83  | 19,16 |
| BKKNT-250 | 9,27  | 1,36  | 1,93  | 18,36 |
| BKKNT-270 | 9,26  | 1,21  | 1,73  | 18,54 |

Çizelge 4.1 incelendiğinde dikkati çeken husus ürünlerdeki S miktarlarının yüksek olmasıdır. Ancak ürünlerin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamında gerçekleştirilmiş olması sebebiyle S miktarının yüksek çıkması öngörülebilir bir durumdur.

## 4.2. ICP-MS ile Bor Tayini Sonuçları

ICP-MS, örneklerin yüksek sıcaklıktaki argon gazıyla elde edilmiş bir plazmaya gönderilmek suretiyle atomlaştırıldığı analitik bir tekniktir. Örnek, genel olarak bir çözelti halinde örnek giriş sistemi aracılığıyla nebulizöre ve sprey odacığına gönderilmektedir. Burada yüksek hızlı argon akışı sayesinde örnek çözeltisi sisleştirilir. Sadece çok küçük damlacıklar argon plazmasına taşınmakta, diğerleri doğrudan atığa gitmektedir. 6000 K civarında sıcaklığa sahip olan plazma, örneği buharlaştırarak aynı zamanda iyonlaştırır. İyonlar, atmosferik basınçtan örnekleyici ve süzücü konlarla yüksek vakumlu ortama geçmektedirler. Sonrasında iyon akımı, iyon lensleri ile kuadropole odaklanarak kütle filtresine yönlendirilmektedir. İyonlar, kütle spektrometresinde kütle/yük oranına göre ayrılarak ölçülmektedir. Bor (B) tayini için en çok kullanılan yöntemler spektrofotometrik ve plazma kaynaklı spektrometrik yöntemlerdir. Çalışma kapsamında sentezlenen ürünlerin B miktarlarını tayin etmek amacıyla BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar alt yapısında mevcut Perkin Elmer marka ELAN 9000 model ICP-MS cihazı kullanılmıştır. Numuneler analizden önce 10 kat seyreltilmiştir. Farklı sıcaklıklarda (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen BKKNT ürünlerinin B tayini sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. BKKNT ürünlerinin B tayini sonuçları

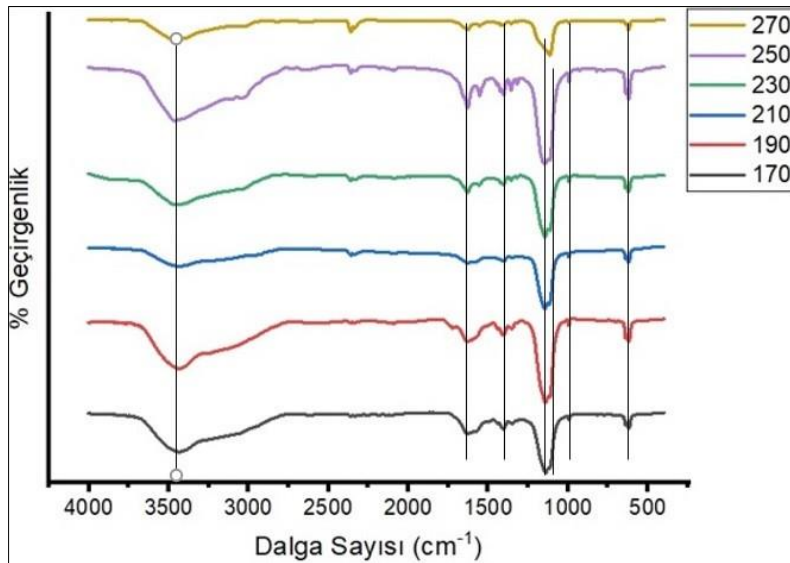
| Ürün Adı  | Reaksiyon Öncesi B Miktarı (%) | Reaksiyon Sonrası B Miktarı (%) |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|
| BKKNT-170 | 4,45                           | 0,27 ± 0,03                     |
| BKKNT-190 | 4,45                           | 0,28 ± 0,09                     |
| BKKNT-210 | 4,45                           | 0,33 ± 0,05                     |
| BKKNT-230 | 4,45                           | 0,34 ± 0,04                     |
| BKKNT-250 | 4,45                           | 0,28 ± 0,06                     |
| BKKNT-270 | 4,45                           | 0,25 ± 0,07                     |

Çizelge 4.2’de yer alan değerler incelendiğinde reaksiyon öncesi ve sonrasındaki değerler arasında önemli bir fark mevcuttur. Sonuçlar birbirinden bağımsız 6 ölçüm neticesinde elde edilmiş (N=6) ve standart hatasıyla birlikte verilmiştir. Reaksiyon sonrasında önemli bir miktar B’nin yapıdan uzaklaştığı anlaşılmaktadır. Sıcaklığın sentezlenen ürünlerdeki B miktarına etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla elde edilen değerlerin bağlı standart sapması (RSD) kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan hesaplamalarda sonuçlar 170-

270 °C aralığında %12,2 RSD ile elde edildiğinden sıcaklığın B miktarı üzerine anlamlı bir etkisinin olduğu istatistiki olarak görülmüştür.

### 4.3. FTIR Analizi Sonuçları

Kızılötesi spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanmaktadır. Soğrulma, moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşmektedir. Kızılötesi ışık ancak değişken dipol momente sahip moleküller tarafından soğrulmaktadır. Çalışma kapsamında sentezlenen ürünlerin bağ yapılarını ve yüzey fonksiyonel gruplarını incelemek amacıyla BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan Varian marka IR 660 model FTIR cihazı kullanılarak 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  çekim aralığında ölçümler yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen BKKNT ürünlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C sıcaklıklarda 1,0 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  varlığında hazırlanan BKKNT ürünlerine ait FTIR spektrumları

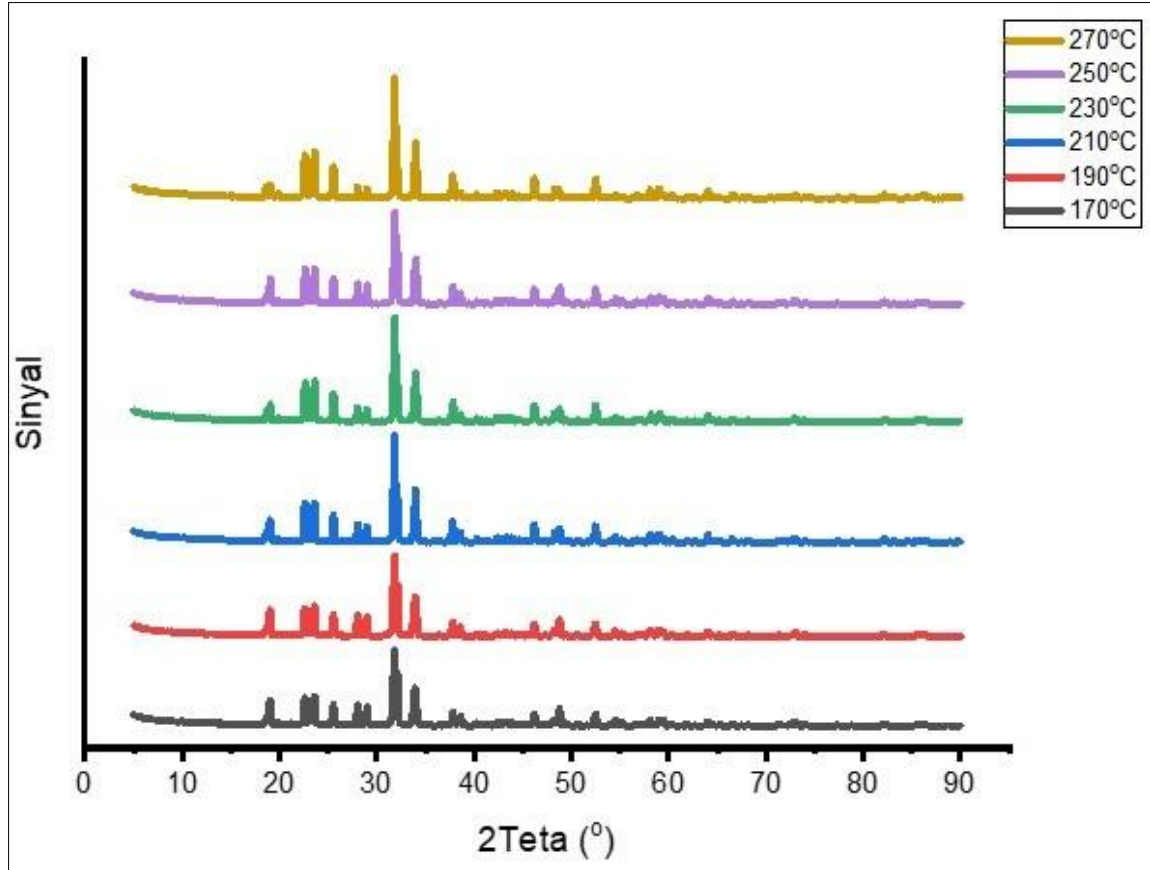
Şekil 4.1'de görüldüğü üzere üst üste çakıştırılmış farklı sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünlerine ait FTIR spektrumları incelendiğinde 3500  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pikin B-NH veya B-OH gerilmelerine, 1620  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pikin C=O titreşim bandına, 1400  $\text{cm}^{-1}$  civarında yer alan pikin B-N gerilme bandına, 1200  $\text{cm}^{-1}$  civarında yer alan piklerin B-C,

C-C veya C-N gerilme bantlarına,  $990\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikin B-O gerilmesine ve  $600\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikin de  $\text{BO}_2$  düzlem dışı bükülme bandına ait olduğu düşünülmektedir. [83, 89]. Burada dikkati çeken bir durum da  $1200\text{ cm}^{-1}$  civarında oluşan şiddetli pikin yanında küçük bir omuz oluşması ve bunun da sıcaklık arttıkça azalarak  $270\text{ }^\circ\text{C}$ 'ta kaybolmasıdır.

Buradan yola çıkarak sentezlenen ürünlerde B'nin yapıya dahil olduğu, yüzeyindeki polar fonksiyonel gruplar sebebiyle yüksek oranda hidrofilik olduğu ve suda iyi dağıldığı söylenebilir. Sıcaklığın değişmesi bu piklerin şiddetlerinde düzenli bir artışa veya azalışa sebebiyet vermemiştir. Ancak en yüksek sentez sıcaklığında ( $270\text{ }^\circ\text{C}$ ) bu piklerin en düşük şiddete sahip olduğu görülmüştür.

#### 4.4. XRD Analizi Sonuçları

X-Işını kırınım yöntemi, her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. Her bir kristalin faz için bu kırınım profilleri bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımlamaktadır. X-Işını Kırınım analiz metodu, analiz sırasında numuneyi tahrip etmemekte ve çok az miktardaki numunelerin dahi analizlerinin yapılmasını sağlamaktadır. X-Işını Kırınım cihazıyla kayaçların, kristalin malzemelerin, ince filmlerin ve polimerlerin nitel ve nicel incelemeleri yapılabilmektedir. Tez çalışması kapsamında sentezlenen BKKNT ürünlerinin kristal yapıları BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar alt yapısında mevcut PANalytical marka Empyrean model XRD cihazı ile  $5\text{-}90^\circ$  aralığında  $45\text{ kV}$   $40\text{ mA}$  şartlarında  $\text{Cu K}\alpha$  X-ışın kaynağı ( $\lambda=1,5406\text{ \AA}$ ) kullanılarak yapılan çekimler ile incelenmiştir. Ürünlere ait difraktogramlar Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Altı farklı sıcaklıkta (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen ürünlere ait XRD difraktogramları

Şekil 4.2 incelendiğinde altı ürünün de sıcaklıktan bağımsız olarak yüksek bir kristal yapıya sahip olduğu görülmektedir. Çalışmanın başında düşünülen amorf yapı yerine yüksek kristal yapının oluşması BKKNT ürünündeki kükürt varlığıyla dolayısıyla da sentez ortamında kullanılan  $H_2SO_4$  ile ilişkilendirilmektedir. Bir başka değerlendirme de ürünlerin polimerik karboranlar ile benzer kristal yapılara sahip olduğudur.

#### 4.5. XPS Analizi Sonuçları

XPS, katı malzemelerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan gelişmiş bir yüzey analiz tekniğidir. XPS ile katı yüzeylerdeki birkaç nm kalınlığındaki filmler, yüzeydeki atomik bileşimin % dağılımı, yüzeydeki atomik bileşimin sitokiyometrik oranları, yüzeyin atomik bileşimindeki değişim miktarı ve kaplama kalınlığı hakkında bilgi alınabilmektedir. Bu teknikte, analizi yapılacak numuneye vakum ortamında tek enerjili X-ışınları gönderilerek numunenin uyarılması sağlanmaktadır.

Bunun sonucunda numunenin yüzeyinden saçılan elektronların kinetik enerjileri bir elektron spektrometresi yardımıyla ölçülerek numune hakkında nitel ve nicel analizler yapılabilmektedir.

190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünlerindeki fonksiyonel gruplar ile C, N, O, S ve B elementlerinin birbirine bağlanma şekillerini aydınlatmak amacıyla yüzey analizleri BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvarında bulunan Thermo Scientific marka K-Alpha model XPS cihazı ile Al K $\alpha$  X-ışın kaynağı ( $\lambda=8,3386$  Å) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup XPS genel tarama, C1s, N1s, O1s, S2p ve B1s bağlanma enerjilerine karşılık gelen kimyasal kaymaları gösteren spektrumlar Ekler Bölümünde sunulmuştur.

Çizelge 4.3, XPS genel tarama sonuçlarından doğrudan alınan elementel oranlardır.’ten de görüldüğü üzere sentez sıcaklığı artışına bağlı olarak elementel oranların değişiminde bir genelleme yapılamamıştır. Bununla birlikte, sentez sıcaklığı artışıyla birlikte BKKNT ürünlerdeki C miktarının azaldığı söylenebilir.

Çizelge 4.3. BKKNT ürünlerin element analizi için XPS genel tarama sonuçları

|   | Elementel Oranlar (%m/m)   |      |      |
|---|----------------------------|------|------|
|   | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |      |      |
|   | 190                        | 230  | 270  |
| C | 28,1                       | 26,8 | 25,9 |
| N | 2,74                       | 2,48 | 2,95 |
| O | 41,5                       | 44,9 | 44,7 |
| S | 13,0                       | 14,4 | 12,7 |
| B | 14,6                       | 11,4 | 13,7 |

Ekler bölümünde yer alan yüksek çözünürlükte C1s, N1s, O1s, S2p ve B1s taramaları CasaXPS programı yardımıyla kemometrik olarak çalışılmış ve farklı kimyasal çevreye sahip elementlerden kaynaklanan pikler birbirinden ayrılarak yüzde oranları ve bağlanma enerjileri ile birlikte sırasıyla Çizelge 4.4’te, Çizelge 4.5’te, Çizelge 4.6 ’da, Çizelge 4.7’de ve Çizelge 4.8’de listelenmiştir.

Çizelge 4.4’te 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen BKKNT ürünlere ait C1s spektrumlarından sıcaklık artışıyla birlikte BKKNT ürünlerdeki C=O oranı azalmış ve O-C=O oranı ise 270 °C sıcaklıkta artış göstermiştir. Bu sonuç, yüksek sıcaklıkta

oksidasyonun arttığı şeklinde değerlendirilmiştir. Bir diğer husus ise 285 eV taki C-C ve C-H oranlarının 270 °C sıcaklıktaki sentez ile birlikte en yüksek değere sahip olması, C-C ve C-H bağlarının sıcaklığa dayanıklılıklarıyla izah edilmiştir. Bununla birlikte 284 eV taki C=C oranı beklenenin aksine 190 °C sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürünüde en yüksektir.

Çizelge 4.4. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için C1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları

| C1s                            | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |             |           |             |           |             |
|--------------------------------|----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                                | 190                        |             | 230       |             | 270       |             |
|                                | B.E. (eV)                  | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) |
| C=C                            | 284,0                      | 2,38        | 283,9     | 1,46        | 284,0     | 1,60        |
| C-C, C-H                       | 285,0                      | 14,5        | 285,0     | 14,2        | 285,0     | 21,2        |
| C-N                            | 285,7                      | 24,2        | 285,7     | 17,4        | 285,8     | 17,2        |
| C-O-H, C-O-N                   | 286,3                      | 22,0        | 286,5     | 30,4        | 286,5     | 25,5        |
| C=O                            | 287,1                      | 13,6        | 287,4     | 13,1        | 287,5     | 7,79        |
| C-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 288,0                      | 7,27        | 288,5     | 14,2        | 288,5     | 9,94        |
| O-C=O                          | 289,6                      | 16,1        | 289,7     | 15,7        | 289,4     | 16,9        |

190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen BKNNT ürünlerindeki azot elementi için kimyasal yapı N1s üzerinden yapılmıştır. Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere 270 °C sıcaklıkta sentezlenen BKKNT ürünün organik matris oranının en yüksek oluşu dikkat çekicidir. Bununla birlikte alkil amonyum olarak değerlendirilen 402,3 eV civarındaki pik 270 °C sıcaklıkta en düşük değere sahip oluşu, yapıdaki pozitif yüklü iyonların kaynağı olabilecek azot türlerinin azalması ve yapının iyonik karakterindeki azalma olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için N1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları

| N1s                        | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |             |           |             |           |             |
|----------------------------|----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                            | 190                        |             | 230       |             | 270       |             |
|                            | B.E. (eV)                  | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) |
| N-B                        | 400,4                      | 10,9        | 398,8     | 3,81        | 400,1     | 16,0        |
| Organikmatris (N-C, N-C=O) | 401,4                      | 25,0        | 400,5     | 20,9        | 401,4     | 34,1        |
| Alkil amonyum              | 402,5                      | 47,7        | 402,0     | 49,3        | 402,3     | 41,0        |
| Nitrite, C=N veya Nitril   | 403,5                      | 16,4        | 403,1     | 26,0        | 403,5     | 8,91        |

Oksijen elementi için XPS değerlendirmesi O1s için yapılmıştır. Çizelge 4.6'dan görüldüğü üzere BKKNT sentez sıcaklığı artışıyla birlikte 533,3 eV civarındaki aromatik C-O-C yapılarındaki artış gözlenmiştir. Bu sonuç, PL spektrumlarındaki 270 °C

sıcaklıktaki ürünün gösterdiği grafenizasyona bağlı ikinci bir spektral mekanizmanın gözlenmesi ile uyum içindedir. Buradan, sıcaklık artışıyla birlikte BKKNT ürünlerindeki aromatikliğin arttığı değerlendirilmiştir. Ayrıca, C1s spektrumlarında gözlenen 285 eV'taki C-C ve C-H artışıyla uyum içinde olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için O1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları

|                                                    | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |             |           |             |           |             |
|----------------------------------------------------|----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| O1s                                                | 190                        |             | 230       |             | 270       |             |
|                                                    | B.E. (eV)                  | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) |
| O=C-N                                              | 532,0                      | 13,5        | 531,8     | 15,6        | 531,5     | 19,5        |
| C-O-C<br>(Alifatik)                                | 532,7                      | 33,9        | 532,6     | 28,1        | 532,4     | 38,4        |
| C-O-C<br>(Aromatik)<br>veya O-C-O                  | 533,3                      | 6,73        | 533,3     | 7,80        | 533,2     | 18,7        |
| O*-(C=O) <sub>2</sub> , O-<br>(C=O*)-O veya<br>O-B | 533,8                      | 27,5        | 534,0     | 30,6        | 534,0     | 9,64        |
| Na KLL Auger                                       | 537,0                      | 18,4        | 537,1     | 17,9        | 536,9     | 13,9        |

Kükürt atomlarının kaynağı olarak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ortamında gerçekleştirilen reaksiyon görülmektedir. Reaksiyon sıcaklığındaki artışla birlikte Çizelge 4.7’de gösterilen SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> miktarındaki azalma ürünün iyonik karakterinde azalma olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç, Çizelge 4.5’te gözlenen alkil amonyum miktarındaki azalma ve buna bağlı olarak pozitif yüklü karakterindeki azalmayla uyum içindedir.

Çizelge 4.7. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için S2p bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları

|                                 | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |             |           |             |           |             |
|---------------------------------|----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| S2p, 3/2                        | 190                        |             | 230       |             | 270       |             |
|                                 | B.E. (eV)                  | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>   | 169,8                      | 90,0        | 169,4     | 61,5        | 169,1     | 68,1        |
| C-SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> | 171,4                      | 10,0        | 170,7     | 38,5        | 170,2     | 31,9        |

BKKNT ürünlerindeki B atomlarının kaynağı tepken olarak ortama eklenen fenilboronik asittir. BKKNT ürünündeki B katkısı ile ilgili olarak 188 eV civarında B-C, B-H bağları, 190,5 eV civarında B-N bağı ve 192,3 eV civarında B-O bağlarının BKKNT ürünlerinde



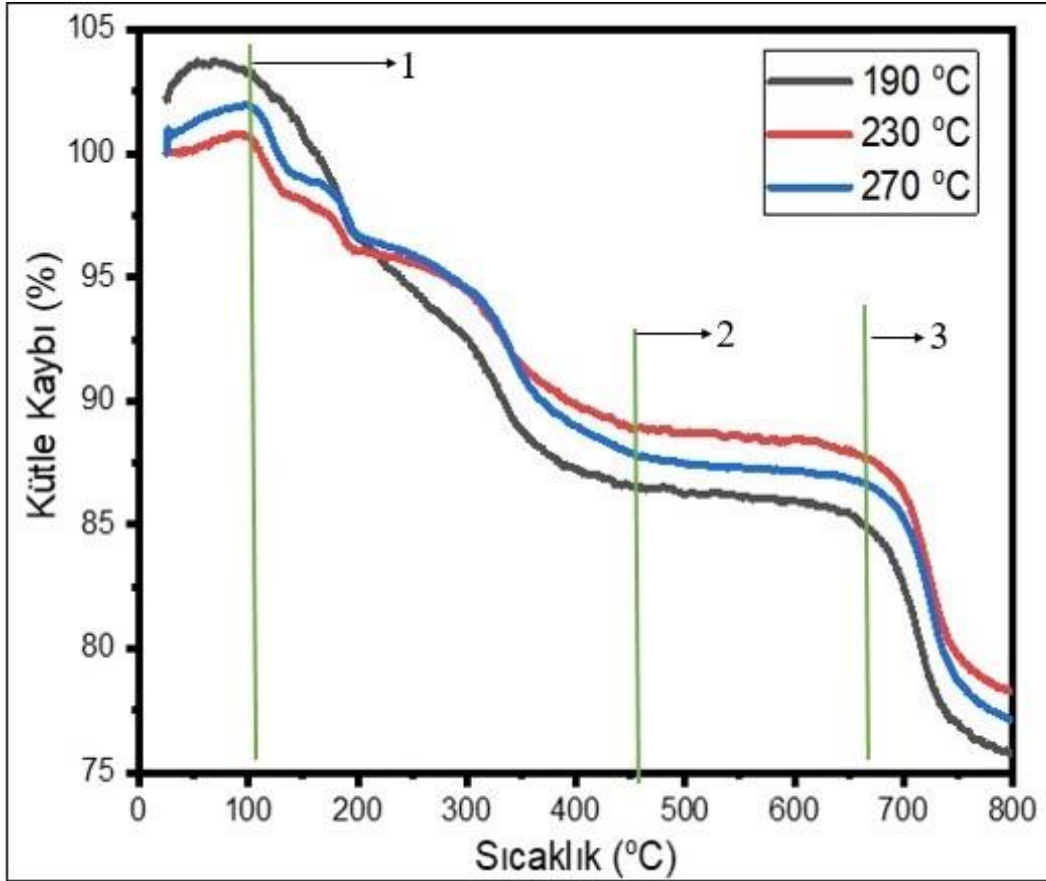
bulunduğu Çizelge 4.8’de görülmüştür. B elementi için bağlanma türlerine sıcaklığın önemli bir etkiye sahip olmadığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı kimyasal çevreye sahip türler için B1s bağlanma enerjileri ve yüzde miktarları

|          | BKKNT Sentez Sıcaklığı, °C |             |           |             |           |             |
|----------|----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| B1s      | 190                        |             | 230       |             | 270       |             |
|          | B.E. (eV)                  | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) | B.E. (eV) | Miktarı (%) |
| B-C, B-H | 188,2                      | 24,6        | 188,2     | 14,0        | 187,5     | 25,7        |
| B-N      | 190,7                      | 19,8        | 190,5     | 27,0        | 190,2     | 22,0        |
| B-O      | 192,9                      | 55,6        | 193,5     | 59,0        | 193,0     | 52,3        |

#### 4.6. Termogravimetrik Analiz (TGA) Sonuçları

TGA, genel olarak malzemelerde sıcaklığın veya zamanın bir fonksiyonu olarak meydana gelen kütle kaybı veya kazanımlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde numune yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılırken numunenin kütlesi sürekli olarak izlenmektedir. Kütlenin veya kütle yüzdesinin zamana, sıcaklığa ve atmosferdeki değişime karşı grafiği çizilmekte ve bu eğri de termogram veya termal bozunma eğrisi olarak adlandırılmaktadır. BKKNT ürünlerinin termal davranışları BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar alt yapısında mevcut Netzsch marka STA 449 F3 Jupiter model termal analiz cihazı kullanılarak argon atmosferinde 25-800 °C aralığında 10 °C/d ısıtma hızında yapılan çekimler ile incelenmiştir. Üç farklı sıcaklıkta (190, 230 ve 270 °C) sentezlenen BKKNT ürünlerine ait TGA termogramları Şekil 4.3’te sunulmuştur.

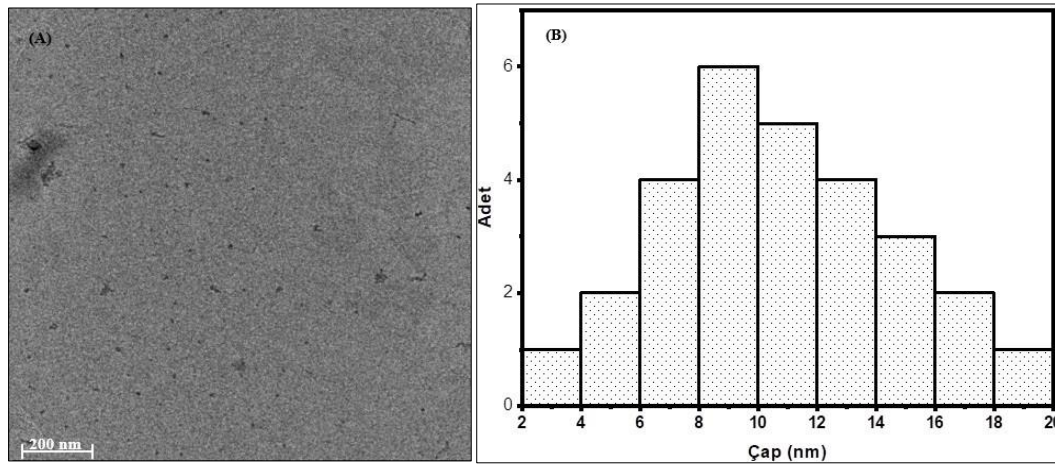


Şekil 4.3. Üç farklı sıcaklıkta (190, 230 ve 270 °C) sentezlenen ürüne ait TGA termogramları

Şekil 4.3'teki termogramlar incelendiğinde kütle kayıpları her üç ürün için de yaklaşık olarak aynı miktardadır. Termogramda 1 numara ile gösterilen bölgeden (100 °C civarı) 2 numara ile gösterilen bölgeye (400 °C) kadar üç numunede de yaklaşık %15 kütle kaybı meydana gelmiştir. 2 numaralı bölge (400 °C) ile 3 numaralı bölge (670 °C civarı) arasında üç numunede de kütle kaybı yaşanmamıştır. 3 numaralı bölgeden sonra ise yaklaşık %12'lik bir kütle kaybı daha yaşanmıştır. Toplam kütle kaybına bakıldığında 800 °C'ye kadar kütle kaybının yaklaşık olarak %25'ler mertebesinde olduğu görülmektedir. Kütle kaybının az olması yapının karalı olduğunu ve inorganikleşmeye başladığını düşündürmüştür. Bu kütle kaybı da yapıdaki fonksiyonel grupların sıcaklık arttıkça yapıdan uzaklaşmaları ile ilişkilendirilebilir [90].

#### 4.7. TEM Analizi Sonuçları

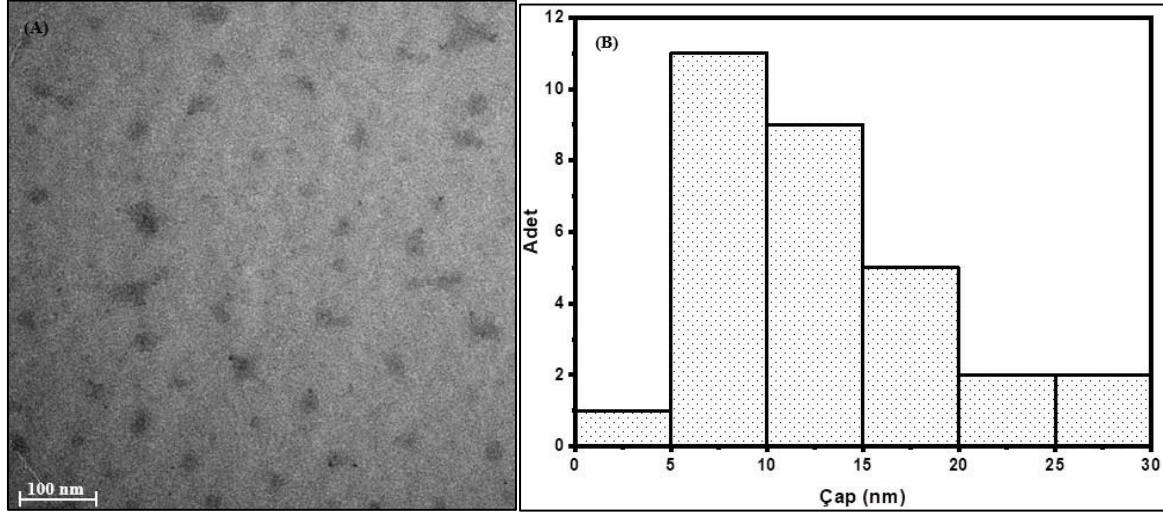
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelemlerde malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir. Yüksek potansiyel farkı altında hızlandırılmış elektronlar numune hazırlama koşullarına göre hazırlanmış yeterince geçirgen malzemeden geçerek, objektif ve projeksiyon lensler ile floresans ekrana malzemenin büyütülmüş görüntüsünü oluşturmakta bu görüntü de kameraya aktararak bilgisayara işlenmektedir. Çalışma kapsamında sentezlenen BKKNT ürünlerinin TEM görüntüleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FEI marka Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Biotwin model cihaz ile 120 kV'ta hızlandırılan elektronlar yardımıyla alınmıştır. Numuneler ölçüm alınmadan önce 500 kat seyreltilmiştir. 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlere ait TEM görüntüleri ve boyut dağılımlarını gösteren histogramlar sırasıyla Şekil 4.4'te, Şekil 4.5'te ve Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.4. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait (A) TEM görüntüsü (B) boyut dağılımı histogramı

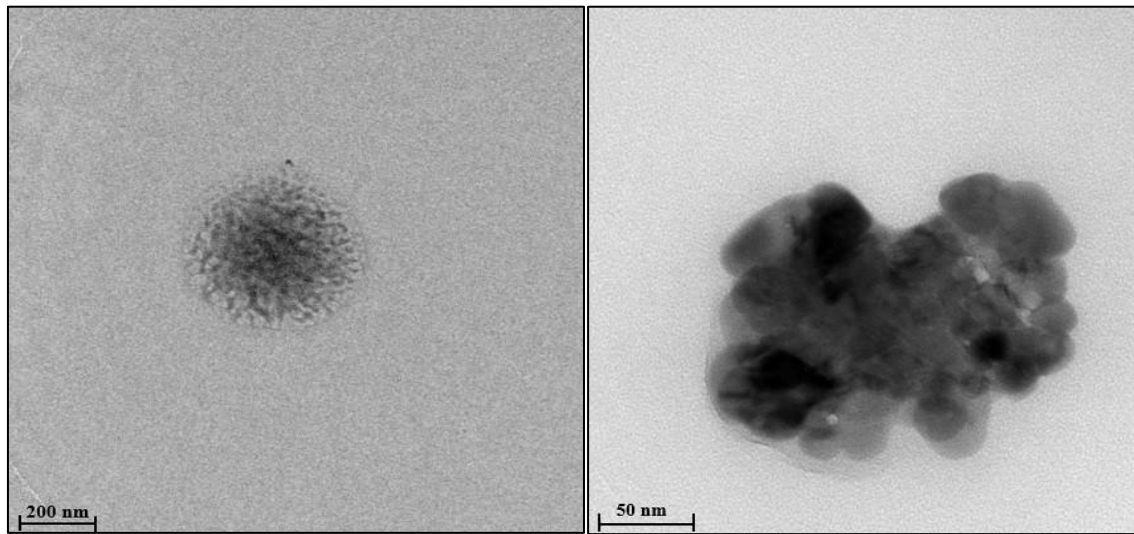
Şekil 4.4'te yer alan TEM görüntüsü (A) incelendiğinde BKKNT ürününün tam olarak küresel bir yapıya sahip olmadığı gözlenmiştir. Boyut dağılımını gösteren histogram (B) 30 adet BKKNT baz alınarak oluşturulmuştur. Bu histograma göre BKKNT'lerin yaklaşık %20'sinin 8-10 nm, %13'ünün 6-8 nm, % 6'sı 4-6 nm ve %3'ü 2-4 nm arasında olduğu

anlaşılmaktadır. 10 nm ve üstü partiküllerin KNT'lerin topaklanmasıyla oluşan agragatlar olduğu söylenebilir.



Şekil 4.5. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait (A) TEM görüntüsü (B) boyut dağılımı histogramı

Şekil 4.5'teki TEM görüntüsü (A) incelendiğinde de agregatların oluştuğu ve oluşan bu agregatların 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe oranla daha büyük olduğu dikkati çekmektedir. Boyut dağılımını gösteren histogram (B) 30 adet BKKNT baz alınarak elde edilmiştir. Histogramdaki dağılım göz önüne alındığında ise BKKNT ürününün yaklaşık %40'ına yakınının 10 nm altında olduğu anlaşılmaktadır.



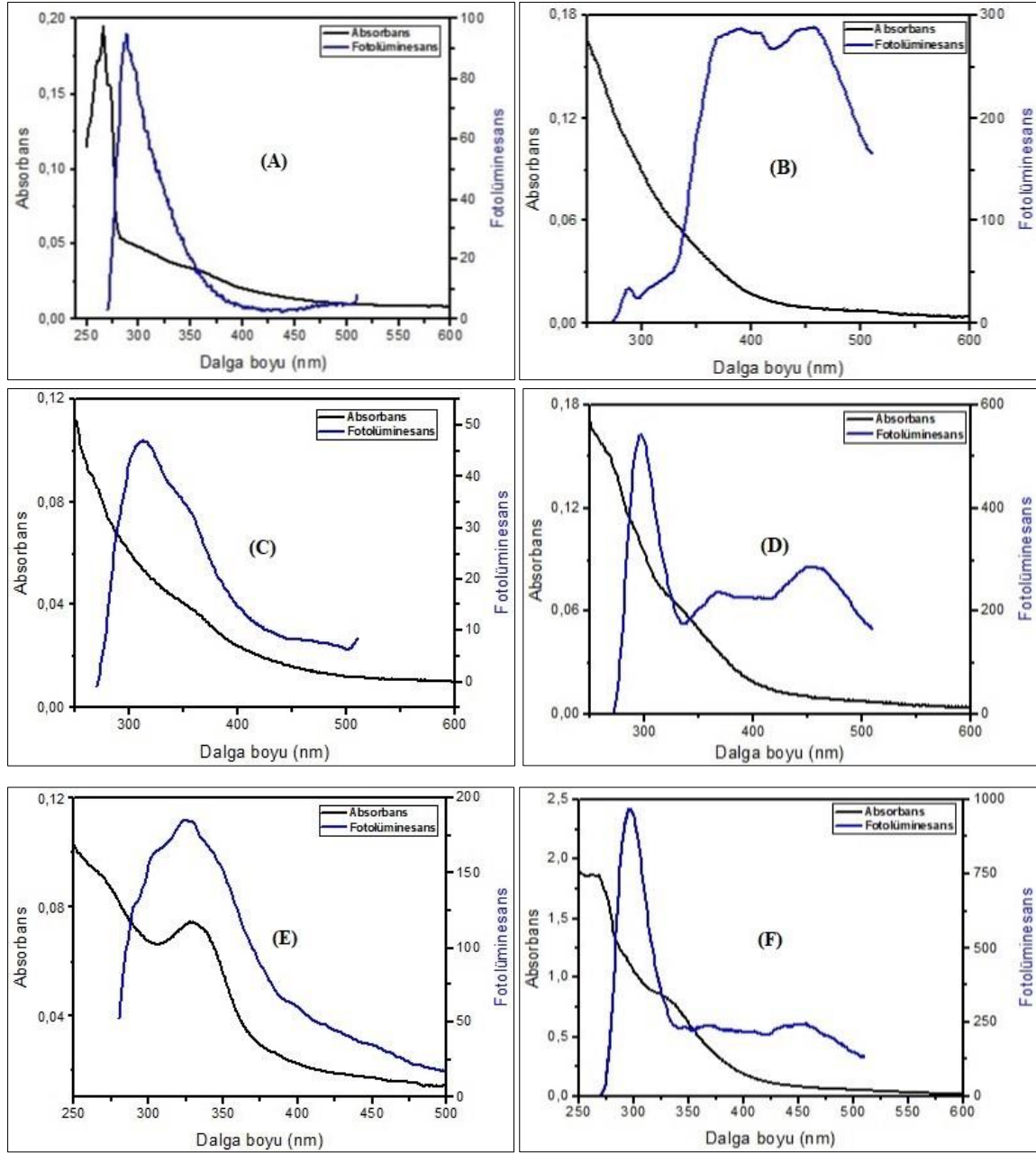
Şekil 4.6. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait TEM görüntüleri

Şekil 4.6’da yer alan 270 °C’ta sentezlenen BKKNT ürünlerine ait TEM görüntülerinde topaklanmanın oldukça fazla olduğu görülmektedir. Bu BKKNT ürünündeki agregasyonun fazla olması sebebiyle boyut dağılımı histogramı oluşturulamamıştır. Sonuç olarak Şekil 4.4’te, Şekil 4.5’te ve Şekil 4.6’daki TEM görüntülerinden yola çıkarak 10 nm’den küçük BKKNT ürünlerinin elde edildiği ancak bununla birlikte agregasyonun da olduğu söylenebilir. Agregasyon, 190 ve 230 °C’ta yer yer olmak üzere 270 °C’ta oldukça fazladır. Agregasyonun oluşmasına yapıda var olan hidrojen bağlarının veya yüzey fonksiyonel grupların afinitelerinin sebep olduğu düşünülmektedir [83]. Agregasyonu önlemek amacıyla numune hazırlama aşamasında yüzey aktif madde kullanılarak tekrar ölçüm alınması uygun görülmüştür.

#### 4.8. UV-GB ve FL Spektroskopisi Ölçümü Sonuçları

UV-GB absorpsiyon spektroskopisi bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten sonra şiddetindeki azalmanın absorbans ile ifade edildiği bir teknik olarak UV-GB spektroskopisi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Bir absorpsiyon spektrumu, molekülün yapısını gösteren elektronik geçişlere ait birçok absorpsiyon bandından oluşmaktadır.

Moleküler floresans spektroskopisinde, elektromanyetik ışın demeti ile uyarılmış bir atom veya molekül temel enerji seviyesinden bir üst enerji seviyesine çıkmaktadır. Üst enerji seviyesindeki uyarılmış atom veya molekül kararsızdır ve soğurduğu fazla enerjiyi atarak temel enerji seviyesine dönmek ister. Bu aşamada, fazla enerjinin tamamı veya bir kısmı, atom veya molekülden ışık emisyonu olarak ayrılabilir. Bu olay gerçekleşme türüne bağlı olarak floresans veya fosferasans olarak adlandırılrsa da genel adıyla lüminesans olarak adlandırılmaktadır. Bu sayede üzerinde çalışılan örneklerin lüminesans karakterleri tayin edilebilmektedir. Tez çalışması kapsamında sentezlenen BKKNT ürünlerinin UV-GB ölçümleri Agilent marka Cary 60 model UV-GB Spektrofotometresi ile FL ölçümleri de yine Agilent marka Cary Eclipse model Floresans Spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. UV-GB ve FL ölçümleri 6 farklı sıcaklıkta (170, 190, 210, 230, 250 ve 270 °C) sentezlenen ürünler için alınmış olup ölçümler sonucunda elde edilen grafiklerin karşılaştırmalı hali Şekil 4.7’de sunulmuştur.

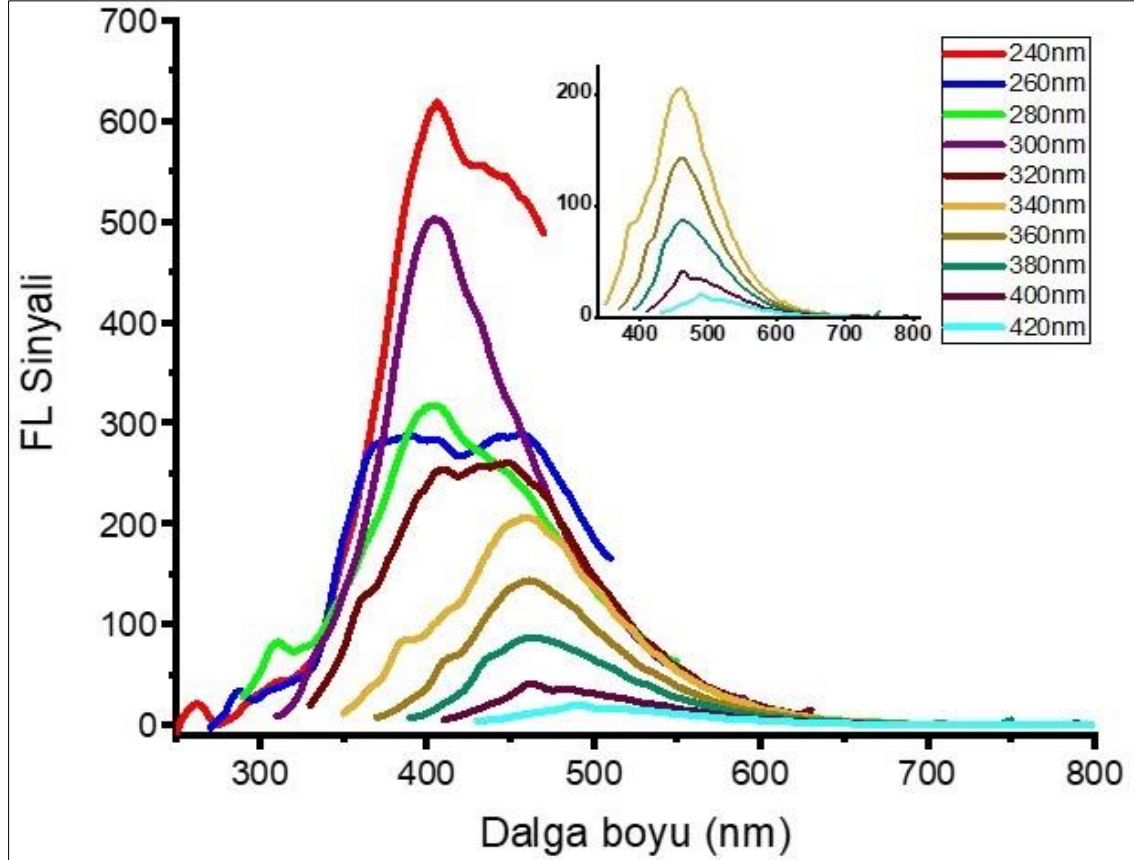


Şekil 4.7. (A) 170 °C (B) 190 °C (C) 210 °C (D) 230 °C (E) 250 °C ve (F) 270 °C’ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin UV-GB absorbans ve maksimum FL şiddetinin alındığı emisyon spektrumlarının üst üste çakıştırılmış hali

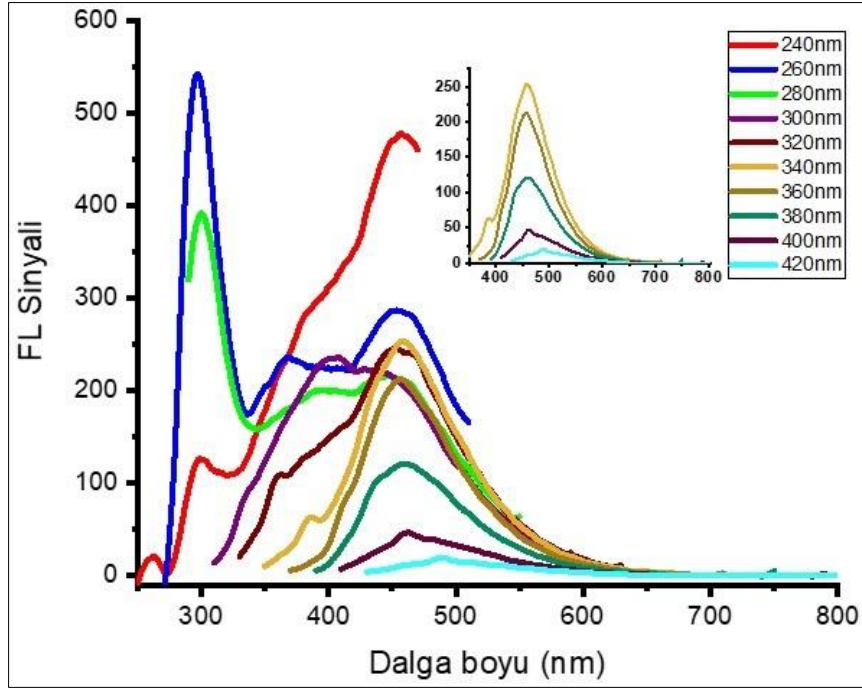
Şekil 4.7’de yer alan grafikler incelendiğinde 170 ve 270 °C’larda sentezlenen ürünlerde daha belirgin olmak üzere tüm ürünlerde 265 nm civarında bir absorpsiyon gözlenmiştir. Bu absorpsiyonun karakteristik bir aromatik  $\pi-\pi^*$  geçişine ait olduğu düşünülmektedir [90]. Bunun yanı sıra 210, 230, 250 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlerde 330 nm civarında absorpsiyon pikleri görülmektedir. Bu durumun sebebinin ise  $n-\pi^*$  geçişi olduğu ve yapıdaki C=O fonksiyonel gruplarından kaynaklandığı söylenebilir [90].



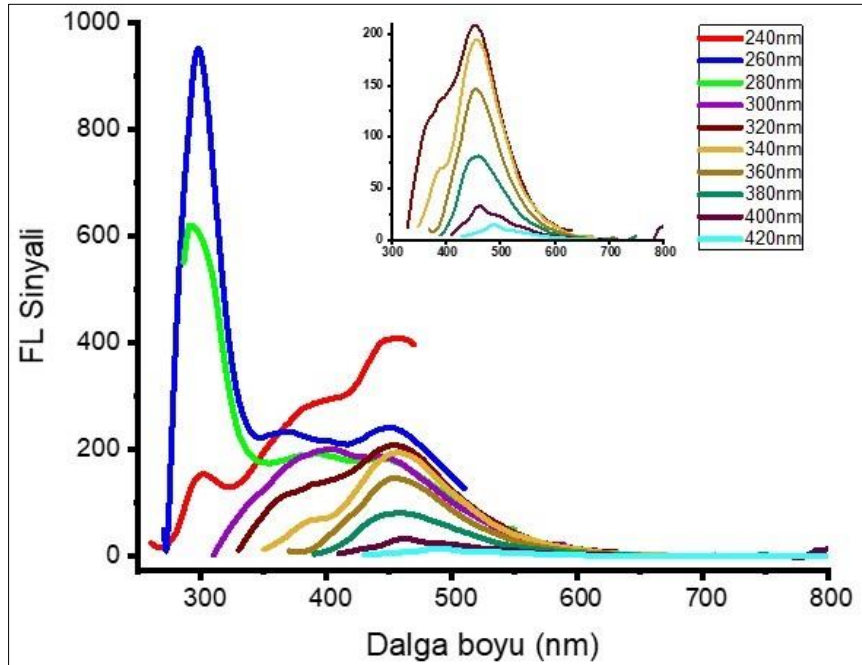
Tez çalışması kapsamında sentezlenen BKKNT ürünlerinin FL mekanizmaları hakkında yorum yapabilmek adına 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünler 240 nm’den 420 nm’ye kadar değişen dalga boylarında uyarılarak FL şiddetlerindeki değişimler gözlenmiştir. Bu değişimleri gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.8’de, Şekil 4.9’da ve Şekil 4.10’da sunulmaktadır.



Şekil 4.8. 190 °C’ta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 340-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim)



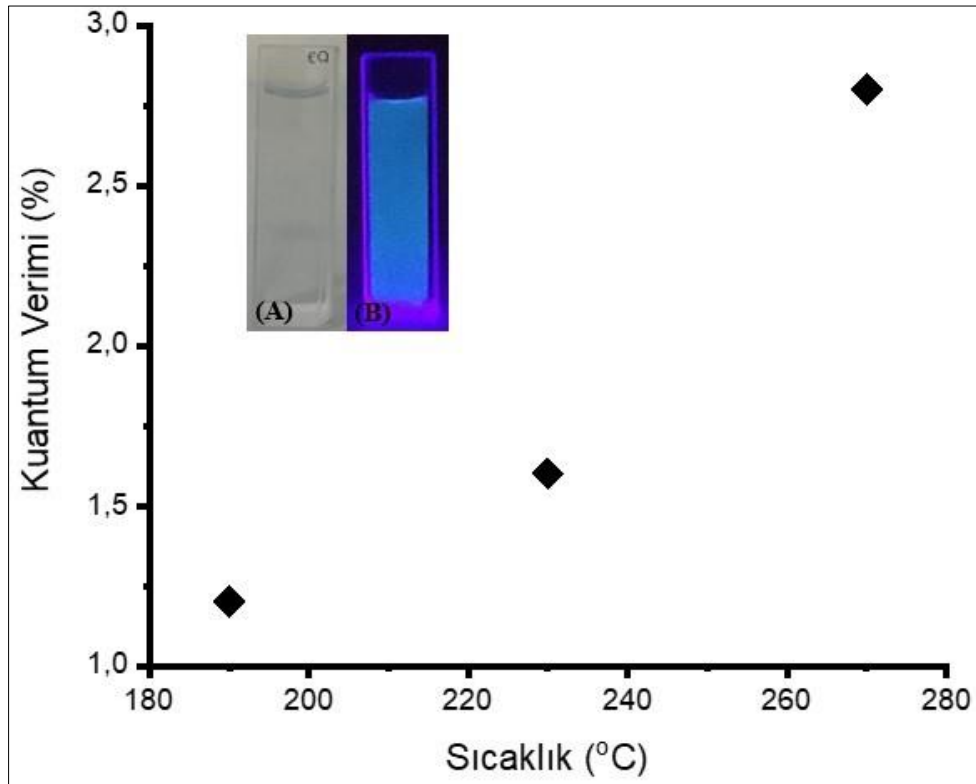
Şekil 4.9. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 340-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim)



Şekil 4.10. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uyarma dalga boyuna bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen kaymalar (iç grafik: 320-420 nm arası uyarıma bağlı olarak FL emisyonunda meydana gelen değişim)



Şekil 4.8’de Şekil 4.9’da ve Şekil 4.10’da yer alan grafikler incelendiğinde 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen BKKNT ürünlerinin birbiriyle benzer FL mekanizmalar gösterdiği 190 °C’ta sentezlenen ürünün ise bunlardan farklı bir mekanizmaya sahip olduğu görülmektedir. 190 °C’ta sentezlenen ürünün FL emisyonlarında uyarma dalga boyuna bağlı olarak belirgin bir kayma gözlenmezken 230 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlerin FL emisyonlarında 320 nm’ye kadar kaymalar gözlenmiştir. Bunun yanında her üç ürünün FL emisyon şiddetleri uyarma dalga boyunun artmasıyla birlikte azalma eğilimi göstermiştir. Bu durumların ürünlerde bulunan fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı düşünülmektedir [83]. Bu sonuçlardan yola çıkılarak sentezlenen BKKNT ürünlerinin uyarma dalga boyuna bağımlı oldukları söylenebilir. Bu ürünlerin KV’leri de ölçülmüştür. Ölçümde referans olarak triptofan kullanılmıştır. En yüksek KV’ne sahip olan BKKNT ürünü 270 °C’ta sentezlenen üründür. Bu da 190 ve 230 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlere kıyasla 270 °C’ta sentezlenen ürünün en şiddetli FL özelliklere sahip olduğu anlamına gelmektedir. KV’nin sıcaklıkla değişimini gösteren grafik Şekil 4.11’de verilmiştir.

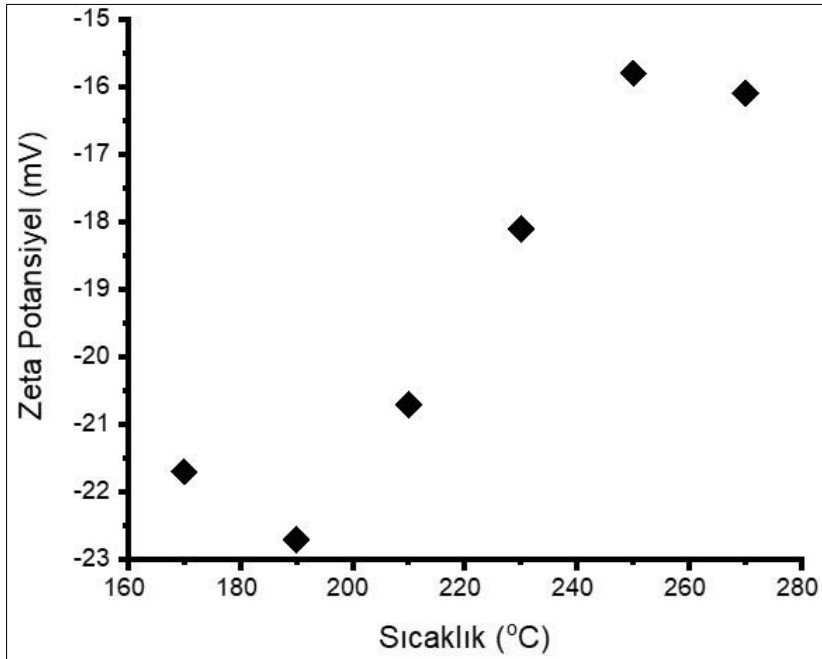


Şekil 4.11. Sıcaklık ile KV arasındaki ilişki (iç grafik: 270 °C’de sentezlenen ürünün (A) gün ışığı altındaki (B) UV ışık altındaki görüntüsü)

#### 4.9. Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Zeta potansiyeli, parçacıklar arasındaki elektrostatik veya yük itme-çekmenin büyüklüğünün bir ölçüsüdür ve kararlılığı etkilediği bilinen temel parametrelerden biridir. Zeta potansiyel ölçümü; dispersiyon, topaklaşma veya flokülasyonun nedenleri hakkında ayrıntılı bilgi sağlamakta ve dispersiyon, emülsiyon ve süspansiyonların formülasyonunu geliştirmek için uygulanabilmektedir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, aday formülasyonlarının sayısını azaltarak kararlılık testini kısaltmanın yollarından biridir, dolayısıyla raf ömrünü uzatmanın yanı sıra testin süresini ve maliyetini de azaltmaktadır. Zeta potansiyelinin ölçümü, seramik, eczacılık ürünleri, ilaç, maden işleme, elektronik ve su arıtma gibi geniş bir endüstri yelpazesinde önemli uygulamalara sahiptir.

Çalışma kapsamında sentezlenen BKKNT ürünlerinin kararlılığı ve biyolojik uygulamalarda kullanılabilirliği hakkında bilgi sahibi olabilmek adına zeta potansiyel ölçüm sonuçları önem arz etmektedir. Bu ölçümler BOREN Prof. Dr. Ayhan MERGEN Ar-Ge Merkezi Laboratuvar alt yapısında bulunan 633 nm dalga boyunda He-Ne lazer ışık kaynağına sahip olan Malvern marka Nano ZSP model Zeta Potansiyel Ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyelin sıcaklıkla değişimini gösteren grafik Şekil 4.12’de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Sıcaklık ile zeta potansiyel arasındaki ilişki

Ölçüm alınmadan önce numunelere herhangi bir seyreltme işlemi uygulanmamış ve hücreye konmadan önce numuneler 0,22 µm'lik şırınga filtreden geçirilmiştir. Bir numunenin zeta potansiyel değeri negatif veya pozitif çıkabilmektedir. Bu değer -30 ile +30 mV arasında çıkarsa numune için kararlı bir yapıya sahiptir denebilmektedir. Şekil 4.12'de yer alan grafikten yola çıkılarak, sentezlenen BKKNT ürünlerinin negatif yüklü oldukları anlaşılmakta olup sıcaklık artışıyla genel anlamda zeta potansiyel değerinin sayısal değer olarak azaldığı görülmektedir. Ürünlerin zeta potansiyel değerlerinin -30 ile +30 mV arasında olması yapının kararlı olduğunu göstermekte olup negatif yüklü olmaları da ürünün yüzeyinde hidroksil veya karboksil gruplarının bulunduğunu ve bu gruplar sayesinde de suda iyi dağılarak biyolojik uygulamalar için kullanılabilir olduğunu ifade etmektedir [73].

#### 4.10. İyon Deneyi Sonuçları

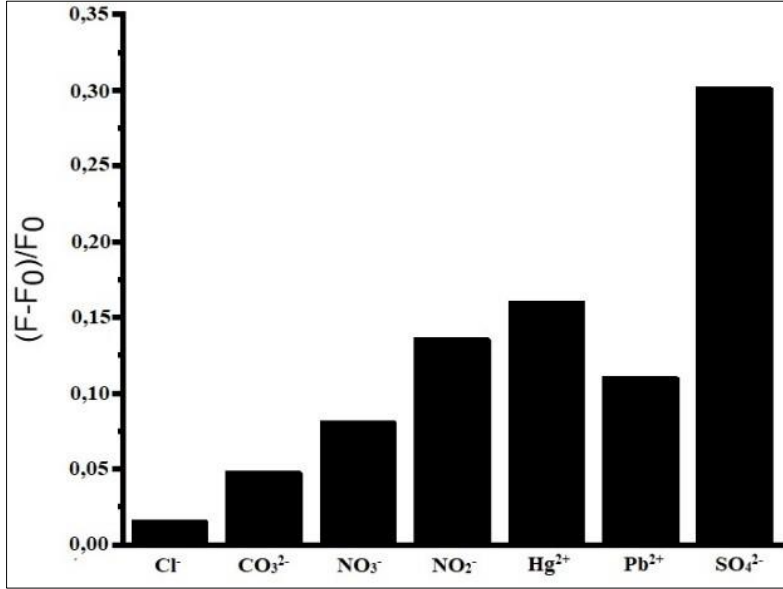
KNT'lerin çeşitli iyonlara karşı duyarlı ve seçici oldukları literatürdeki çalışmalarda mevcuttur. Bu tez çalışması kapsamında da sentezlenen BKKNT ürünlerinin  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ve  $\text{SO}_4^{2-}$  gibi iyonlara karşı duyarlılıkları ve seçicilikleri test edilmiştir. Yapılan bu seçicilik testlerinde Hitachi marka F-7000 model floresans spektroskopisi cihazı kullanılmıştır.

##### 4.10.1. Seçicilik deneyi sonuçları

Stok  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ve  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltilerinde nihai konsantrasyonu  $10^{-5}$  M olacak şekilde 20 µL'lik kısımlar halinde ayrı ayrı belirli bir miktarda BKKNT sulu çözeltisine ilave edilmiş ve bu ilaveler sonucunda ürünün FL şiddetinde meydana gelen değişimler gözlenmiştir. BKKNT sulu çözeltisinin konsantrasyonu, uyarım yapılacak dalga boyunda UV-GB absorbanı 0,1 olacak şekilde ayarlanmış ve tüm deneylerde buna uyulmuştur. Floresanstaki değişim Eş. 4.1'deki formülle incelendiğinden, her deneydeki BKKNT miktar farklılığından gelebilecek etkiler bertaraf edilmiştir. Yapılan bu deneylere ilişkin veriler Şekil 4.13'te sunulmuştur.

$$\text{Floresanstaki bağıl değişim} = \frac{(F_0 - F)}{F_0} \quad (4.1)$$

Burada,  $F_0$  herhangi bir ilave yapılmadan cihazdan alınan ölçümün FL şiddetini,  $F$  ise ilave işlemi yapıldıktan sonra alınan ölçümün FL şiddetini ifade etmektedir.



Şekil 4.13.  $10^{-5}$  M  $Cl^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $SO_4^{2-}$  iyonları için BKKNT ürününün FL şiddetinde meydana gelen değişim

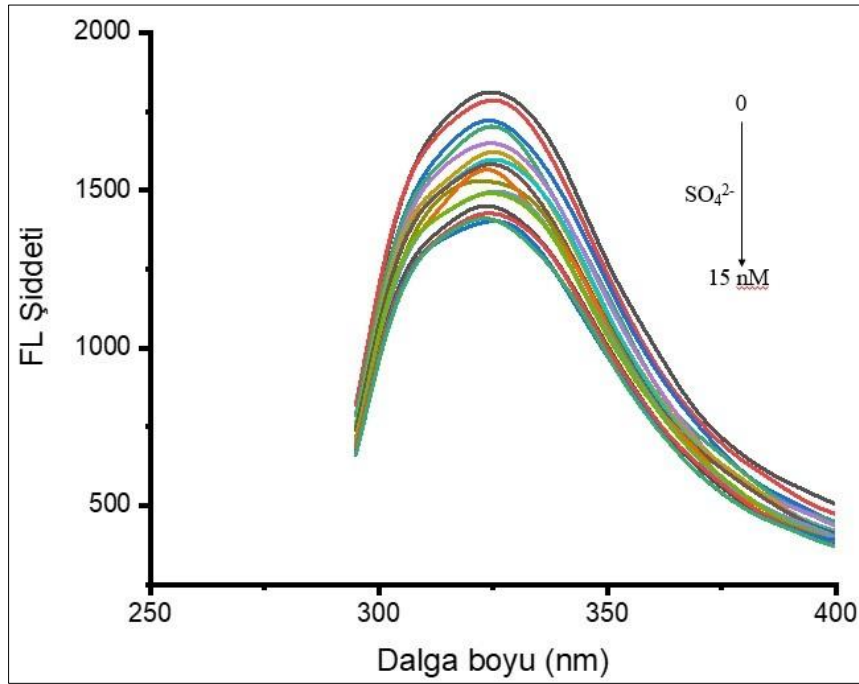
Şekil 4.13'te yer alan grafik incelendiğinde ilave edilen iyonlar sonrasında BKKNT ürününün FL şiddetinde değişimler olduğu anlaşılmaktadır. Grafikte en çok dikkati çeken durum BKKNT ürününe  $SO_4^{2-}$  iyonu ilave edildiğinde ürünün FL şiddetinde meydana gelen belirgin değişimdir. Bu belirgin değişime, sentezde öncü madde olarak kullanılan FBA ve GLU arasında meydana gelen yapının ve sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) ortamından kaynaklanan iz etkisinin sebep olduğu düşünülmektedir. Literatürde, KNT'lerin yüzeylerinde bulundurdıkları karboksilik gruplar sebebiyle  $Hg^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  gibi iyonlara karşı afinitelerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [80]. Ancak  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı afinitelerinden bahsedilen bir çalışma mevcut değildir. Bu açıdan bakıldığında  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlı bir KNT özgün bir sonuç olarak değerlendirilerek,  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşılık bir sensör olarak kullanılıp kullanılamayacağının belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılmasına karar verilmiştir.

#### 4.10.2. Duyarlılık deneyi sonuçları

Seçicilik testleri sonrasında elde edilen veriler BKKNT ürününün  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı belirgin bir afinitesinin olduğunu göstermişti. Bu veriler doğrultusunda  $SO_4^{2-}$  iyonu

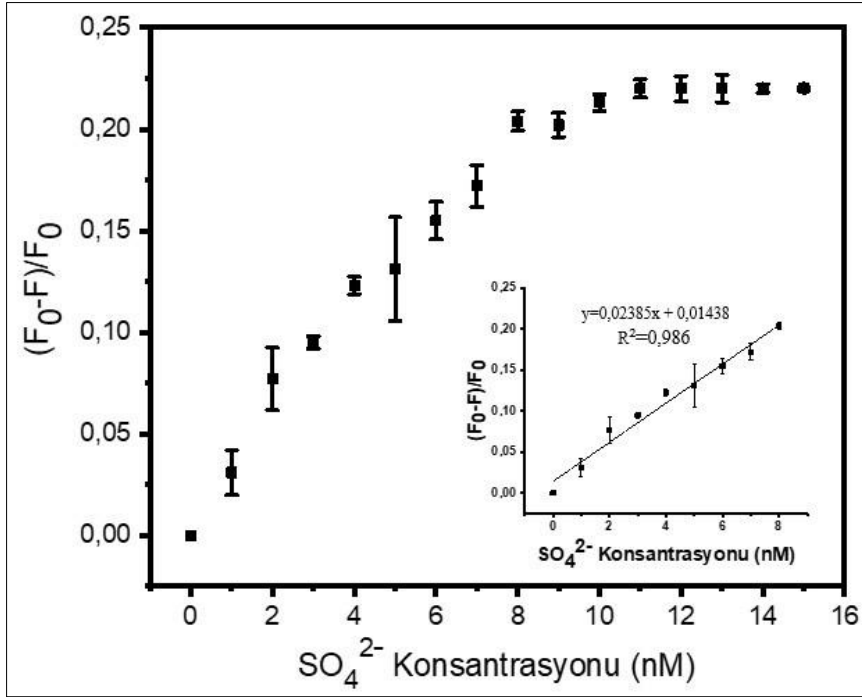
üzerinde duyarlılık testleri yapılmıştır. Yapılan bu testler kapsamında 1 nM ve 15 nM arasında değişen konsantrasyonlarda olacak şekilde stok  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltilerinden hazırlanarak BKKNT ürününe ilaveler yapılmıştır.

Şekil 4.14'te verilen grafikte iyon ilavesi sonrasında ürünün FL şiddetinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir.



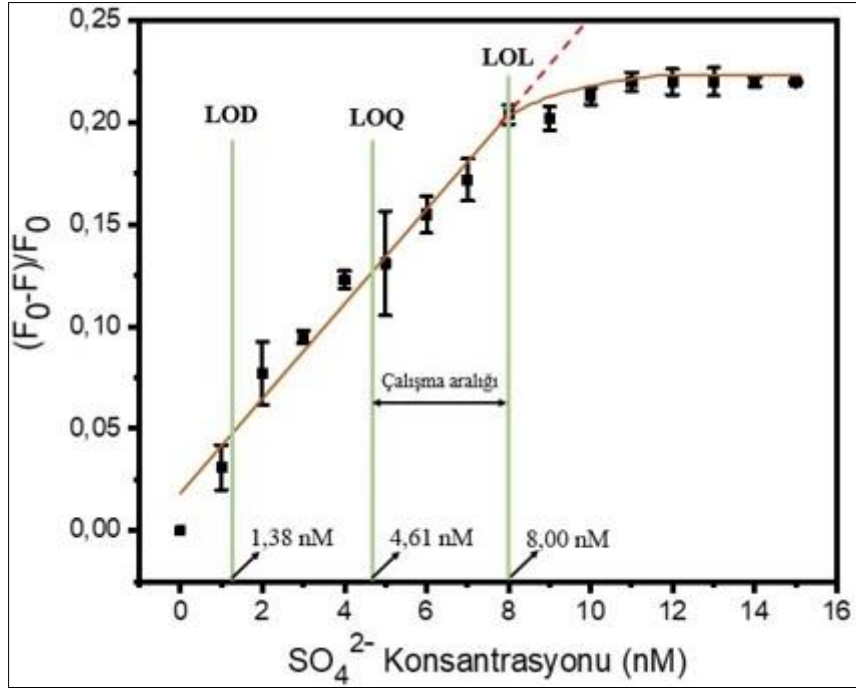
Şekil 4.14. BKKNT ürününün farklı konsantrasyonlarda  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesi sonrasında FL şiddetinde meydana gelen değişim

Farklı konsantrasyonlarda (1-15 nM)  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonu BKKNT ürününe ilave edildiğinde Şekil 4.14'te yer alan grafik elde edilmiştir. Grafik incelendiğinde ürünün 325 nm'de emisyon yaptığı ve her bir ilave sonrası BKKNT ürününün FL şiddetinde bir azalma meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ancak belli bir noktadan sonra bu azalma durmuş ve FL şiddeti değişmemiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak FL şiddetindeki değişimi daha net görebilmek adına ürüne ilave edilen  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonuna karşılık  $(F_0-F)/F_0$  değeri grafiğe aktararak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu eğri Şekil 4.15'te verilmektedir



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesi sonrasında 325 nm’de emisyon yapan BKKNT ürününe ait kalibrasyon eğrisi (iç grafik: doğrusal bölgeyi gösteren eğri)

Şekil 4.15’teki grafikte,  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesiyle  $(F_0-F)/F_0$  değerinde meydana gelen artma net bir şekilde görülmektedir. Ancak 8 nM’lık  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesinden sonra doğrusallık, sapma % 5’lik sınırın çok üstünde olacak şekilde değişim göstererek üst çalışma sınırını belirlemiştir. Hata barları birbirinden bağımsız alınan 3 ölçümü ifade etmektedir (N=3). Sentezlenen BKKNT ürününün  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlılığını belirlemek adına gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ) ve doğrusallık sınırı (LOL) değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Gözlenebilme sınırı, analizi yapılan örneğin belirlediği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmediği en küçük derişimdir. Tayin alt sınırı, analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin doğrusallığının en alt sınırını oluşturan düzeyidir. Doğrusallık sınırı (LOL) ise tayin edilebilen en düşük derişimden doğrusallıktan %5 ve daha yüksek miktarda sapma gösterdiği derişimi ifade etmektedir. Tayin alt sınırı ve doğrusallık sınırı arasında kalan doğrusal bölge de çalışma aralığını göstermektedir. Şekil 4.15’teki doğrusal çalışma aralığını gösteren iç grafikten yararlanılarak gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ) ve doğrusallık sınırı (LOL) değerleri belirlenmiş olup bu değerler Şekil 4.16’da sunulmuştur.



Şekil 4.16. LOD, LOQ ve LOL değerlerinin kalibrasyon eğrisinde gösterimi

Şekil 4.16'daki grafikte yer alan kalibrasyon eğrisinde gösterilen LOD ve LOQ değerleri yapılan hesaplamalar sonrasında sırasıyla 1,38 ve 4,61 nM olarak bulunmuştur. Bu hesaplamalar için kullanılan eşitlikler sırasıyla Eş. 4.2'de ve Eş. 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.16'da, 8 nM  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesinden sonra eğrinin doğrusallıktan % 5 ve daha fazla sapmaya başladığı görülmekte olup bu değer LOL değerini belirtmektedir. LOQ ve LOL değerleri arasında kalan alan değerler (4,61-8,00 nM) ise çalışma aralığını ifade etmektedir. Bu sonuçlar, sentezlenen BKKNT ürününün sulu çözeltilerde  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonuna karşı etkili bir duyarlılık gösterdiği ve potansiyel uygulama alanına sahip olabileceğini göstermektedir.

$$LOD = 3 \times \frac{s}{m} \quad (4.2)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{m} \quad (4.3)$$

Eş. 4.2'deki ve Eş. 4.3'teki formülde yer alan s standart sapmayı, m ise Şekil 4.15'te yer alan iç grafikteki doğrunun eğimini ifade etmektedir.

#### 4.10.3. Gün içi tekrarlanırlık deneyi sonuçları

Tekrarlanırlık, bağımsız deney sonuçlarının, kısa zaman aralıkları içinde, aynı donanım kullanılarak, aynı deneyi yapan kişi tarafından, aynı laboratuvarında, eş değer deney maddeleri üzerinde aynı yöntem ile elde edildiği şartlar (tekrarlanırlık şartları) altındaki kesinliktir. Bu tanımdan yola çıkarak yapılan deneylerin tekrarlanırlığını test etmek amacıyla gün içinde belli saatlerde aynı cihaz kullanılarak 6 adet numune için ölçümler alınmıştır. Ölçümler Edinburgh marka FS5 model Floresans Spektrofotometresi ile alınmıştır. Bu ölçümlerin sonuçları Çizelge 4.9’da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. Aynı konsantrasyona sahip 6 ürünün gün içinde farklı saatlerde yapılan analiz sonuçları

|          | Sinyal   |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | Numune-1 | Numune-2 | Numune-3 | Numune-4 | Numune-5 | Numune-6 |
| 1. Ölçüm | 100,00   | 100,36   | 100,14   | 101,82   | 98,30    | 99,17    |
| 2. Ölçüm | 101,49   | 100,32   | 101,45   | 100,58   | 97,19    | 99,04    |
| 3. Ölçüm | 100,57   | 100,56   | 99,61    | 98,85    | 99,91    | 98,24    |
| RSD      | 0,75     | 0,13     | 0,94     | 1,48     | 1,38     | 0,50     |

Çizelge 4.9’da yer alan veriler, 6 adet aynı konsantrasyona sahip ürünün gün içinde saat başı aynı cihazdan ölçümlerinin alınmasıyla elde edilmiş olup sonuçlar sinyal cinsinden verilmiştir. İlk numunenin ölçümünden alınan sinyal 100 kabul edilmiş ve bundan sonra alınan ölçümler kabul edilen bu değer üzerinden hesaplanmıştır. Her bir ürün için alınan ölçüm 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve toplamda 18 adet ölçüm alınmıştır. Her bir ürün için alınmış ölçüm sonuçları kendi aralarında değerlendirilerek Bağıl Standart Sapmaları (RSD) hesaplanmıştır. Yapılan bu hesaplamalar sonucunda 6 ürünün de RSD’si %2’den düşük çıkmıştır. Bu durum alınan ölçümlerin sapma göstermediği ve sonuçların gün içi tekrarlanırlık bakımından güvenilir olduğunu göstermektedir.

#### 4.10.4. Günler arası tekrarlanabilirlik deneyi sonuçları

Günler arası yapılan deneyler de alınan ölçümlerin tekrarlanabilir olduğunu göstermek adına yapılan deneylerdir. Bu deneylerde ölçümler 5 gün boyunca aynı cihaz kullanılarak aynı şartlarda alınmıştır. Yapılan deneyler kapsamında Numune-1, 2 ve 3 olarak sırasıyla 2, 4 ve 6 nM’lık  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltileri hazırlanmış olup 270 °C’ta sentezlenmiş en yüksek KV’ne sahip olan BKKNT ürünü kullanılmıştır. Öncelikle ürünün absorbans değeri UV-



GB Spektrofotometresi cihazı kullanılarak 0,1 olarak ayarlanmıştır. Sonrasında ürün 3 eşit hacme ayrılmış ve bu ürünler Numune-1, 2 ve 3 olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan 2, 4 ve 6 nM'lık  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltileri sırasıyla numaralandırılan bu ürünlere ilave edilerek 3 üründen de ölçümler alınmıştır. Ölçümler Edinburgh marka FS5 model Floresans Spektrofotometresi ile alınmıştır. Alınan bu ölçümlerin sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Aynı konsantrasyona sahip 3 adet ürünün farklı günlerde yapılan deney sonuçları

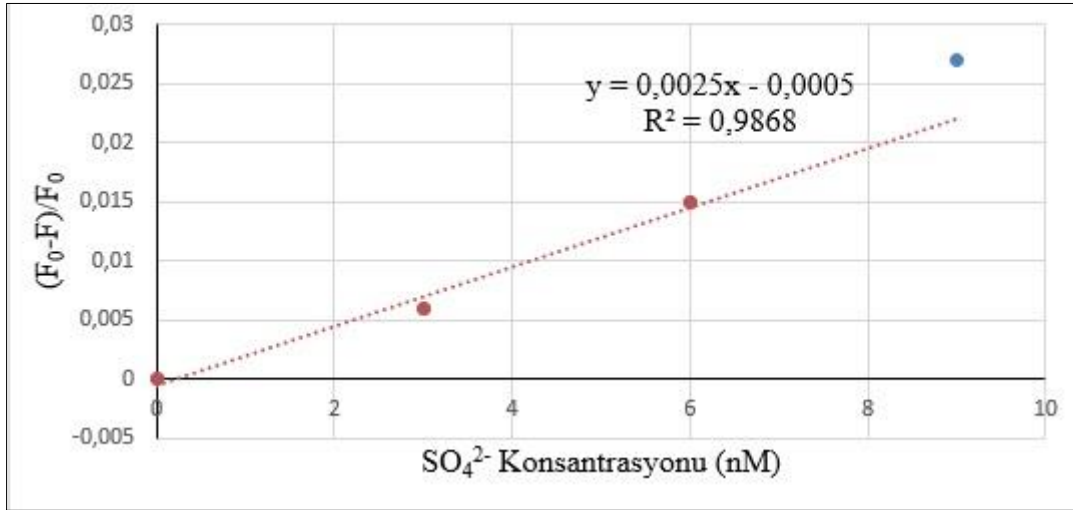
|        | Sinyal   |          |          | RSD  |
|--------|----------|----------|----------|------|
|        | Numune-1 | Numune-2 | Numune-3 |      |
| 1. Gün | 103,03   | 104,21   | 106,12   | 1,48 |
| 2. Gün | 104,09   | 105,50   | 105,02   | 0,68 |
| 3. Gün | 104,61   | 107,65   | 104,78   | 1,61 |
| 4. Gün | 106,98   | 115,24   | 110,61   | 3,73 |
| 5. Gün | 111,88   | 118,90   | 110,34   | 4,01 |

Çizelge 4.10'da yer alan veriler, 5 gün boyunca aynı cihaz kullanılarak alınan ölçümler sonucunda elde edilmiştir. 3 eşit hacme ayrılan BKKNT ürünü Numune-1, 2 ve 3 şeklinde numaralandırılmış örnekler için ilk ölçüm sinyali 100 olarak kabul edilerek, gün sonundaki değer ilk gün sonucu olarak kaydedilmiştir. Bu işlem 5 gün boyunca tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda ölçüm sonuçlarının kendi aralarında Bağıl Standart Sapmaları (RSD) hesaplanmıştır. RSD sonuçları günler arasında yapılan deneylerin gün içinde yapılan deneylere kıyasla sapmaların daha fazla olduğunu göstermektedir. RSD hesaplamaları Eş. 4.4'te verilen formül kullanılarak yapılmıştır.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.4)$$

#### 4.10.5. Gerçek numune deneyleri

Bölüm 4.10.2’de, tez çalışması kapsamında sentezlenen BKKNT ürününün  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlı olduğundan,  $\text{SO}_4^{2-}$  ilave edildikçe ürününün FL şiddetinde azalma meydana geldiğinden (Bkz. Şekil 4.14) ve bu konuda gerçek numunelerde bir kullanım alanı bulabileceği bahsedilmişti. Ürünün gerçek numunelerde potansiyel kullanım alanı bulup bulamayacağını anlamak adına  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonu  $2,7 \times 10^{-5}$  M olarak daha önceden ölçülmüş bir içme suyu örneği kullanılmış ve  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesi sonucunda ürünün FL şiddetinde meydana gelen değişimler gözlenmiştir. İlave edilen  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonuna karşılık  $(F_0-F)/F_0$  değeri grafiğe aktarılmış ve Şekil 4.17’de sunulmuştur.



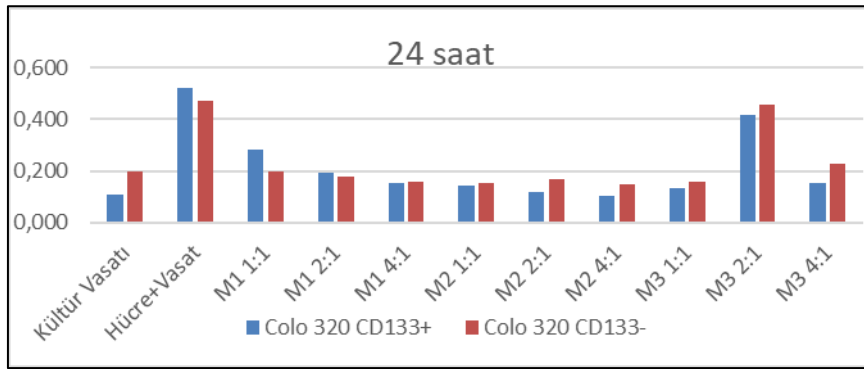
Şekil 4.17.  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonu belli ( $2,7 \times 10^{-5}$  M) olan içme suyu örneğine  $\text{SO}_4^{2-}$  ilavesi sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.17’de yer alan eğri,  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonu  $2,7 \times 10^{-5}$  M içme suyuna 3 nM’lık  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltisi ilave edilmesiyle alının ölçümler neticesinde elde edilmiştir. Bu kapsamda öncelikle içme suyu  $\text{SO}_4^{2-}$  konsantrasyonu 3 nM oluncaya kadar seyreltilmiştir. Sonrasında herhangi bir ilave olmaksızın ölçüm alınmış ve bu ölçüm  $F_0$  olarak kabul edilmiştir. Daha sonra 20  $\mu\text{L}$  3 nM  $\text{SO}_4^{2-}$  çözeltisinden ilave edilerek tekrar ölçüm alınmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlanmış ve her ölçüm birbirinden bağımsız olacak şekilde 3 defa alınmıştır (N=3). Şekil 4.17’deki veriler Bölüm 4.10.2’de yer alan kalibrasyon eğrisiyle kıyaslandığında (Bkz. Şekil 4.15) duyarlılığın azaldığı görülmektedir. Duyarlılığın azalmasının da girişim etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple kalibrasyon

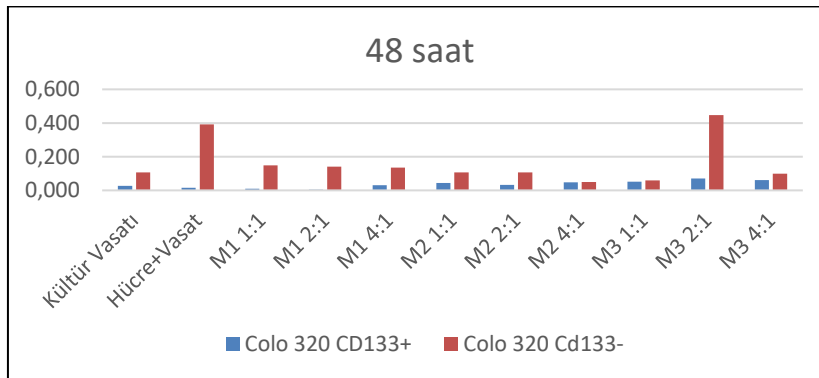
eğrisi üzerinden ölçüm almak uygun olmayıp standart ekleme yöntemi kullanılması uygun görülmüştür.

#### 4.10.6. Hücre deneyi sonuçları

KNT'lerin en önemli uygulama alanlarından biri de hiç şüphesiz tümör hücrelerinin görüntülenmesi ve tedavisidir. Tez çalışması kapsamında da 190, 210 ve 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin kanserli ve sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksosite analizleri ile immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Yapılan bu analizler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan histoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite analizine ilişkin veriler sırasıyla Şekil 4.18'de ve Şekil 4.19'da sunulmuştur.



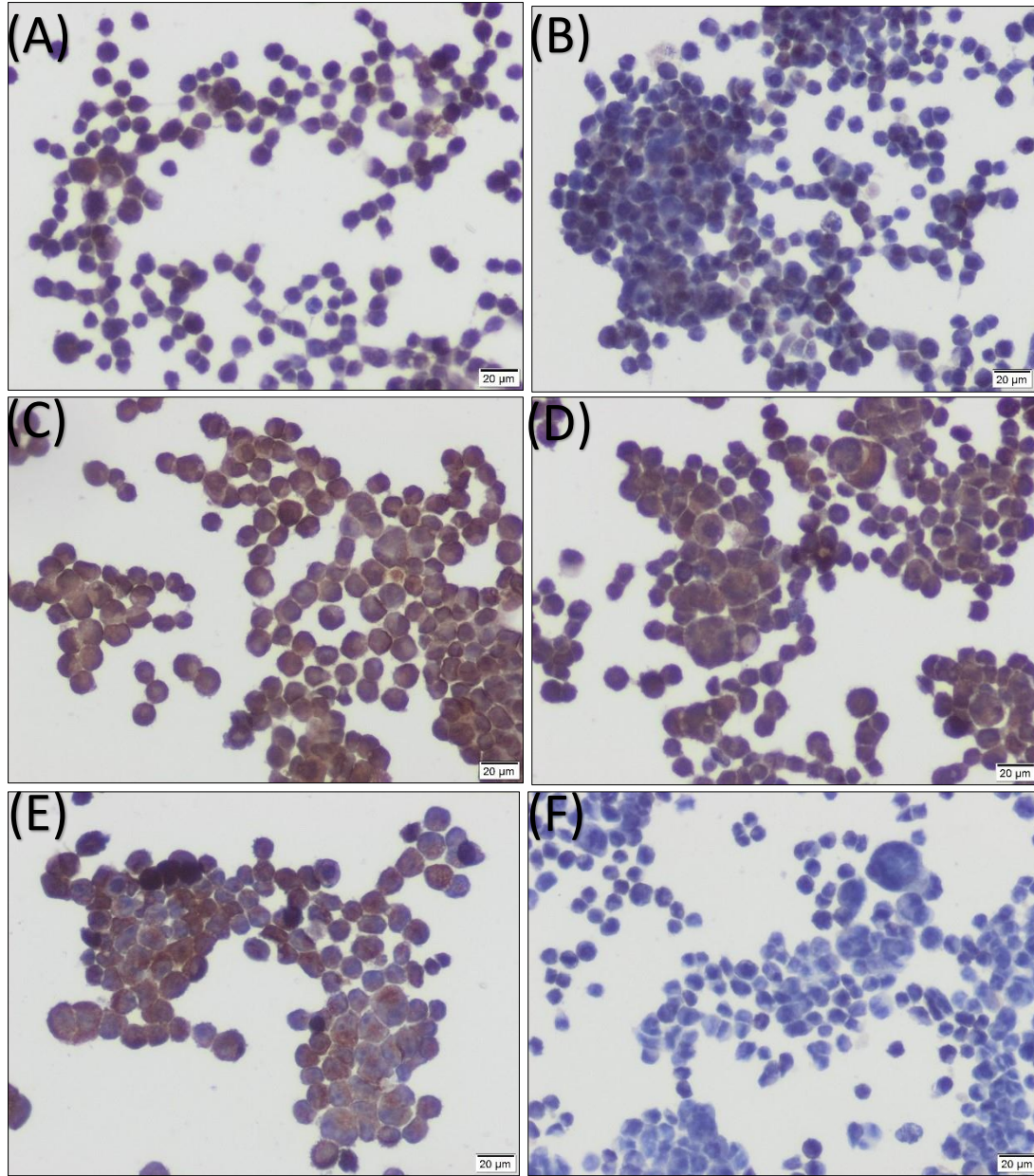
Şekil 4.18. 190, 230 ve 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin Colo320 CD133+ ve CD133- hücrelerde 24 saat uygulaması sonrasında sitotoksosite değerleri



Şekil 4.19. 190, 230 ve 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünlerinin Colo320 CD133+ ve CD133- hücrelerde 48 saat uygulaması sonrasında sitotoksosite değerleri

Şekil 4.18’de ve Şekil 4.19’da yer alan grafiklerde 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünleri sırasıyla M1, M2 ve M3 olarak kodlanmış olup ürün: kültür vasatı 1:1, 2:1 ve 4:1 oranlarında olacak şekilde analizler gerçekleştirilmiştir. Colo320 primer insan kolon kanseri hücre hattı olup CD133+ yayılma eğiliminde olan hücreleri, CD133- ise yayılma eğiliminde olmayan hücreleri ifade etmektedir. Sitotoksosite analizleri için 96 gözlü kültür kapları kullanılmış ve kültür vasatı konulan gözler hariç her bir gözde  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuş, sonrasında da 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile sitotoksosite analizi yapılmıştır. MTT analizi sonrasında 48 saat yapılan uygulamanın hücrelerde toksik etki yaratmasından dolayı uygulamaların 24 saat inkübasyon süresi sonunda 1:1 oranında yapılması uygun bulunmuştur.

Aynı ürünler üzerinde immunohistokimyasal analizler de yapılmıştır. İmmunohistokimya bir hücre ya da dokuda özel bir antijeni (proteini) ya da hücreyi arama tekniği olarak ifade edilmektedir. İmmunohistokimyasal sonuçlar hücrelerdeki kaspaz-3, Ki67, lamin B1, p16 ve sitokrom C proteinlerinin varlığı ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.20’de bu proteinlerin Colo 320 CD133+ hücrelerde 190 °C’ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasındaki immunoreaktiviteleri gösterilmiştir.



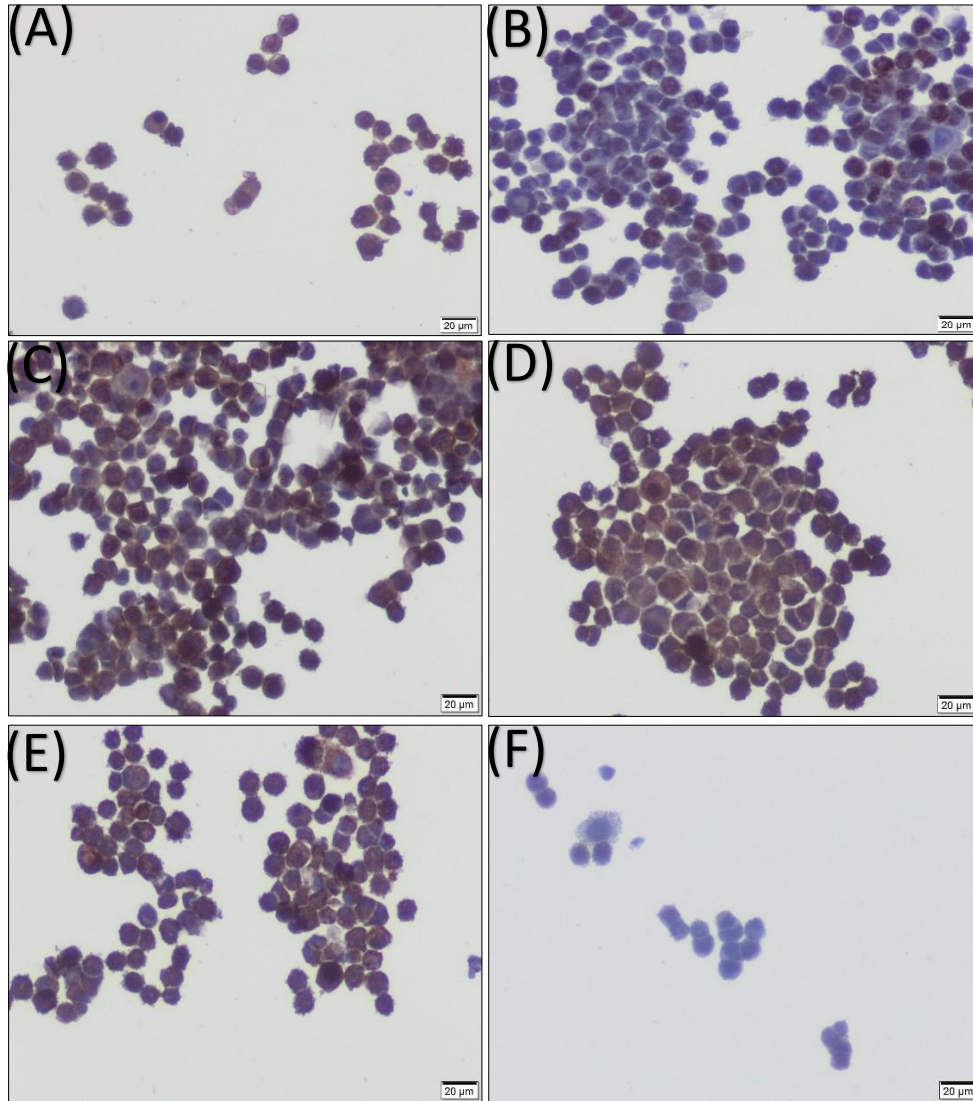
Şekil 4.20. Colo 320 CD133+ hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.20'de yer alan sonuçlara göre, Colo 320 CD133+ hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uygulaması sonucunda Kaspaz 3 immunoreaktivitesi yer yer pozitif (+) iken, Ki67 immunoreaktivitesinin negatif (-) olduğu görülmüştür. Hücresel yaşlanma belirteçlerinden olan lamin B1 ve P16 dağılımları orta derecede pozitif (++), fakat yer yer Lamin B1 immunoreaktivitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Sitokrom C immunoreaktivitesinin ise orta derecede pozitif (++) olduğu görülmüştür. BKKNT ürünü uygulamasının Colo320 CD133+ hücrelerde sitokrom C ve P16 immunoreaktivitelerinin



gözlenmesi ile apoptozu ve hücresel yaşlanmayı tetiklediği, lamin B1 immunoreaktivitesinin de gözlenmesi ile hücresel yaşlanmaya karşı artışın olduğunu düşündürmüştür. Kaspaz 3 immunoreaktivitesinin diğerlerine göre az olması ise, sitokrom C artışı ile apoptozun başladığı fakat tüm hücrelerde kaspaz 3 artışına neden olamadığı, bunun da sebebinin 24 saat uygulamadan dolayı olabileceğini düşündürmüştür. Ki67'de boyanmanın olmaması 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün Colo320 CD133+ hücrelerde proliferasyonu tetiklemediğini işaret etmektedir.

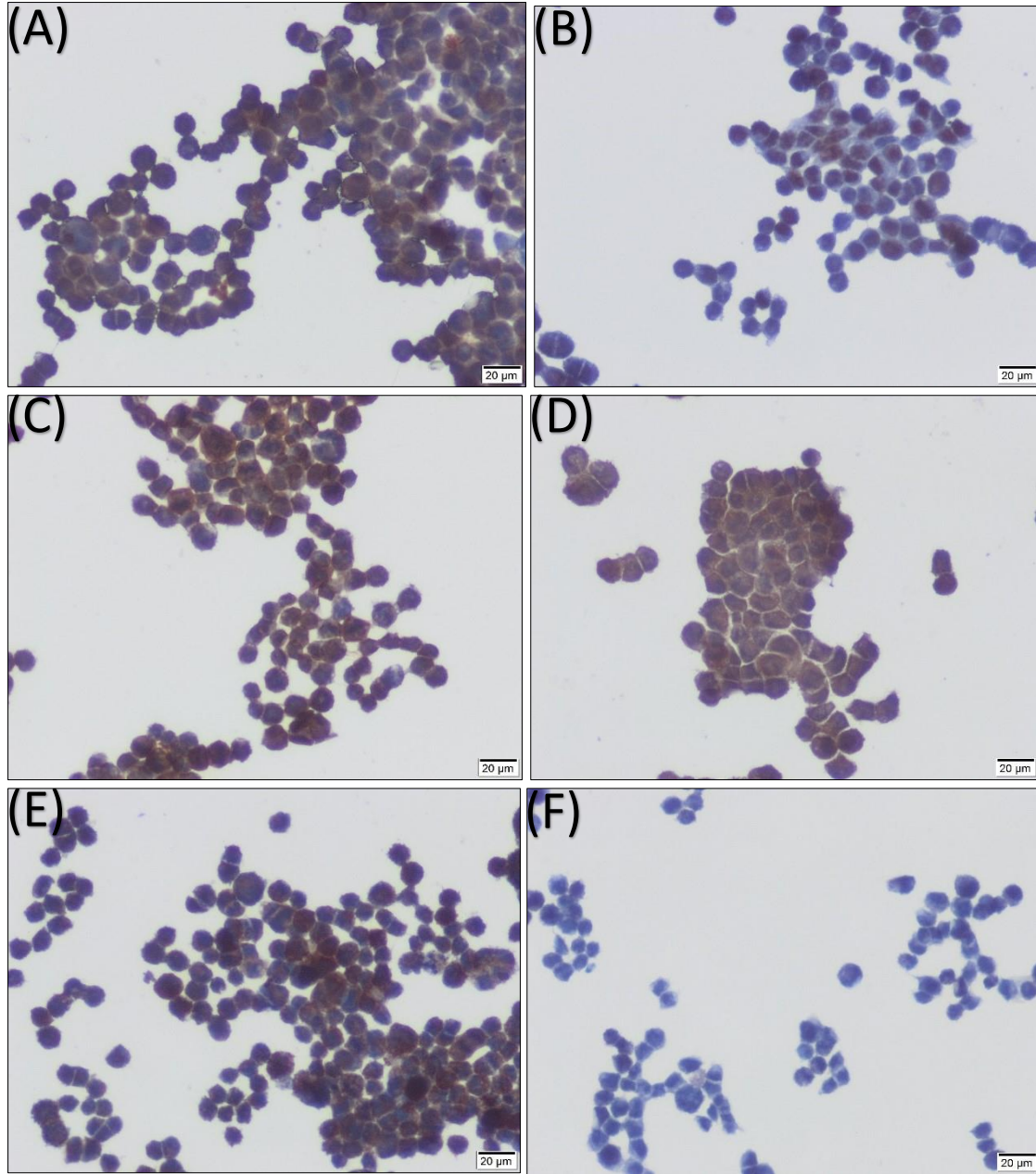
230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün Colo320 CD133+ hücrelerinde uygulaması yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. Colo 320 CD133+ hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.21'deki sonuçlar, Colo 320 CD133+ hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uygulaması sonucunda elde edilen sonuçların 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün sonuçları ile benzerlik gösterdiğini ifade etmektedir. Fakat kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde zayıf pozitif (+) veya yer yer orta şiddette pozitif (++), Ki67 immunoreaktivitesinin ise negatif (-) olduğu görülmüştür. Hücresel yaşlanma belirteçlerinden olan lamin B1 ve P16 dağılımları orta derecede pozitif (++), fakat yer yer p16 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif (+++) olduğu anlaşılmıştır. Sitokrom C immunoreaktivitesinin ise orta derecede pozitif (++) olduğu görülmüştür. 230 °C'ta sentezlenen ürünün uygulanması sonrasında Colo320 CD133+ hücrelerde sitokrom C ve kaspaz 3 immunoreaktivitelerinin görülmesi ve bunun da apoptozu tetiklediği, Ki67 immunoreaktivitesinin negatif olmasının ise proliferasyonu tetiklemediği düşünülmüştür. Hücresel yaşlanmada lamin B1'in p16'ya oranla daha az olması 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün Colo320 CD133+ hücrelerde yaşlanmayı da tetiklediğini düşündürmüştür.

Colo320 CD133+ hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünü de uygulanmıştır. Bu uygulamaya ait sonuçlar Şekil 4.22'de verilmiştir.



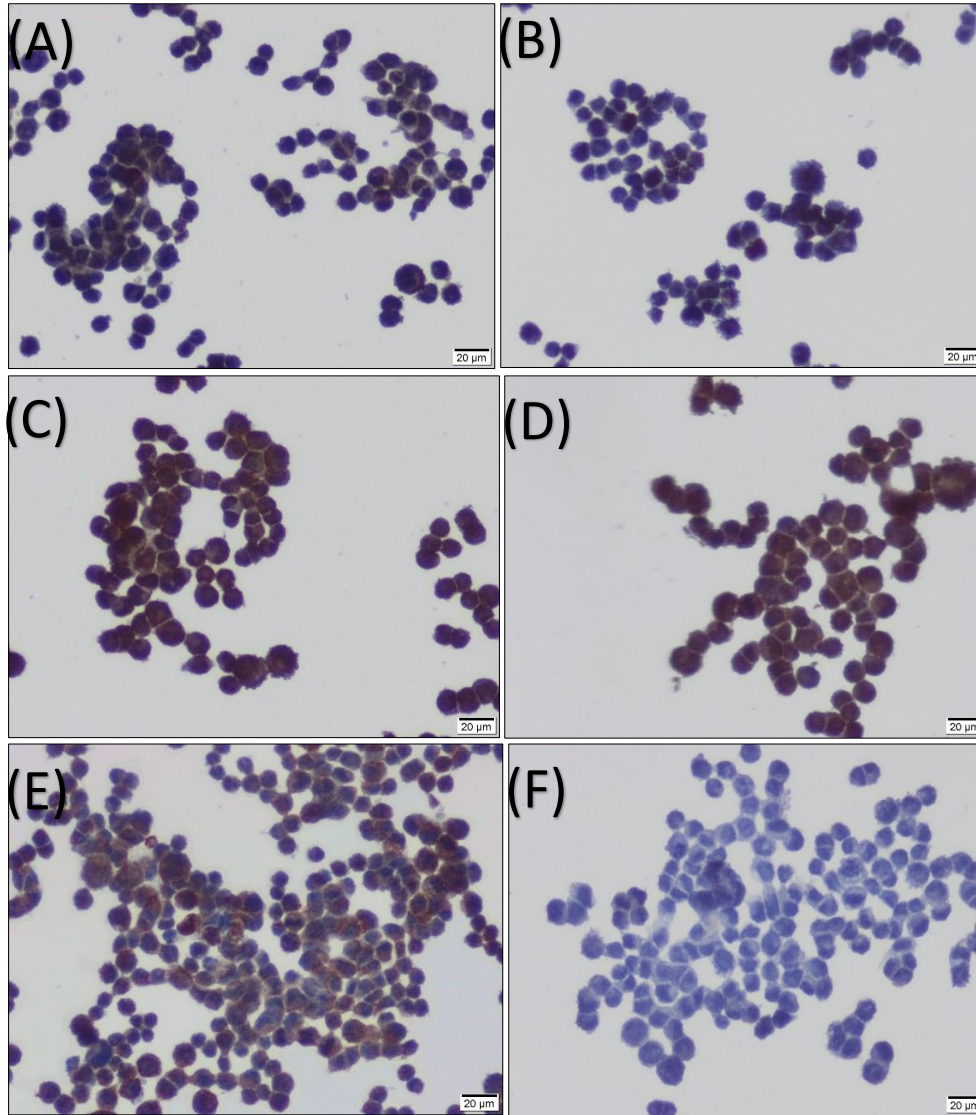
Şekil 4.22. Colo 320 CD133+ hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulanması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.22'de Colo 320 CD133+ hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen ürünün uygulanması sonrasında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde orta şiddette pozitif (++), Ki67 immunoreaktivitesinin ise yer yer zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmektedir. Bunun yanında lamin B1 immunoreaktivitesinin yer yer orta şiddette pozitif (++), P16 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde orta şiddette pozitif (++) ve sitokrom C immunoreaktivitesinin ise yer yer orta derecede pozitif (++) olduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak 270 °C'ta sentezlenen ürünün uygulamasının 190 ve 230 °C



sıcaklıklarda sentezlenen ürünlerin uygulamalarına göre Colo320 CD133+ hücrelerde kaspaz 3 ve p16 immunoreaktivitelerini daha fazla arttırdığı buna rağmen yer yer proliferasyon belirteci olan Ki67'nin zayıf da olsa pozitif (+) olması, hücrede apoptoz ve hücresel yaşlanmanın tetiklendiğini, fakat bir miktar da olsa proliferasyonu desteklediği sonucuna varılmıştır.

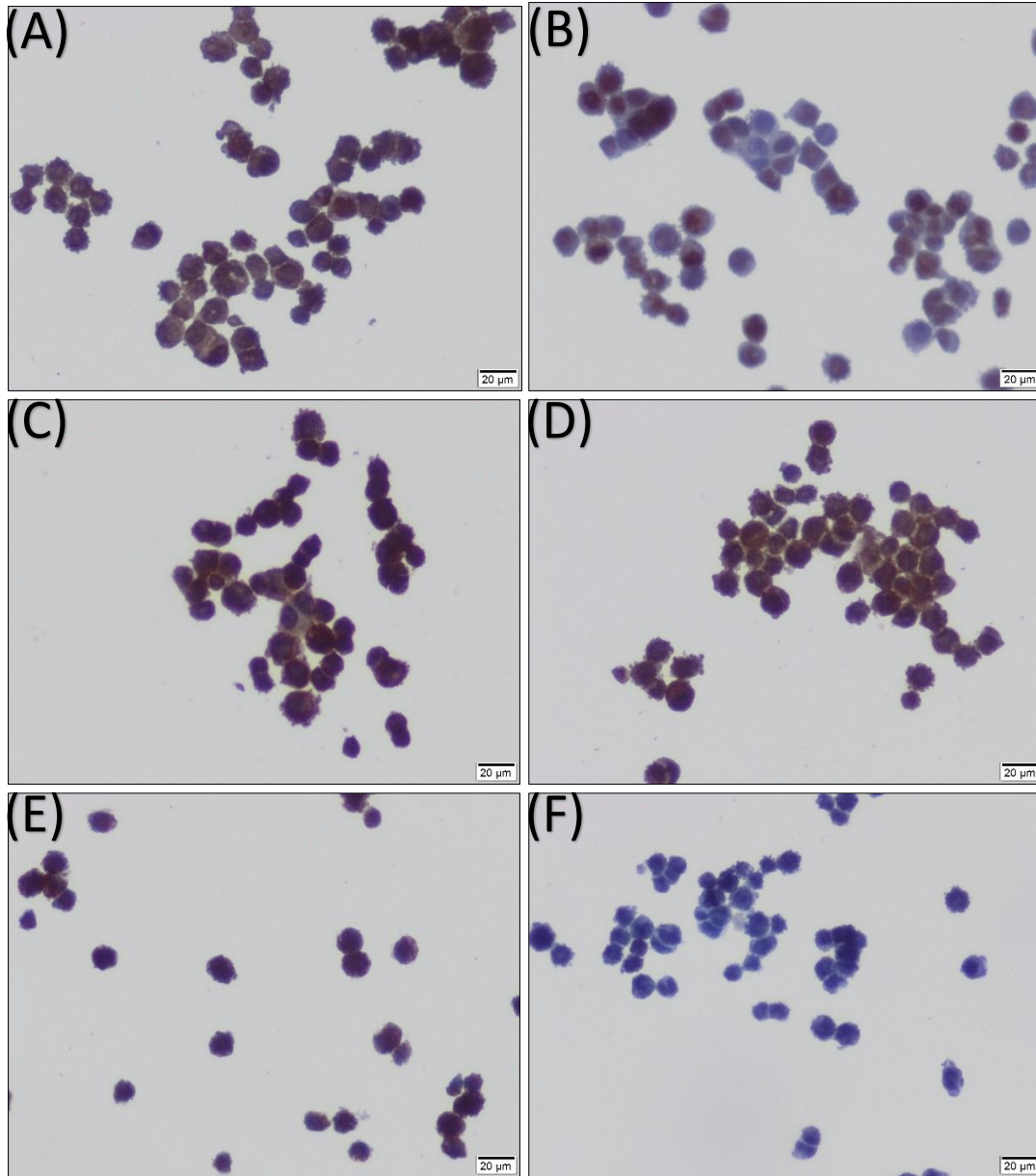
Aynı ürünlerin yayılma eğiliminde olmayan Colo320 CD133- kanser hücrelerinde de uygulamaları yapılmıştır. Şekil 4.23'te 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uygulamaları sonucunda elde edilen görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.23. Colo 320 CD133- hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.24'teki sonuçlara göre Colo 320 CD133- hücrelerde 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uygulaması sonucunda kaspaz 3 immunoreaktivitesinin nadiren pozitif (-/+) ve Ki67 immunoreaktivitesinin negatif (-) olduğu görülmektedir. Bununla beraber hücrel yaşlanma belirteçlerinden lamin B1 ve P16 dağılımlarının benzer olup orta derecede pozitif (++) olduğu anlaşılmaktadır. Sitokrom C immunoreaktivitesi ise tüm hücrelerde gözlenir iken, orta derecede pozitif (++) ve yer yer kuvvetli pozitif (+++). 190 °C'ta sentezlenen ürününü uygulamasının Colo320 CD133- hücrelerde sitokrom C artışına neden olduğu, bunun yanında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin az olmasından dolayı apoptozu tetiklediği fakat henüz sonlanmadığını işaret etmektedir. Bununla beraber hücrel yaşlanmanın da p16 immunoreaktivitesinin artışı ile başladığı, ancak lamin B1 immunoreaktivitesinin varlığı da hücrel yaşlanma ile canlı kalma arasında dengenin kurulmaya çalışıldığını düşündürmüştür.

230 °C'ta elde edilen BKKNT ürününün Colo320 CD133- hücrelerde yapılan uygulamasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.24'te verilmektedir.

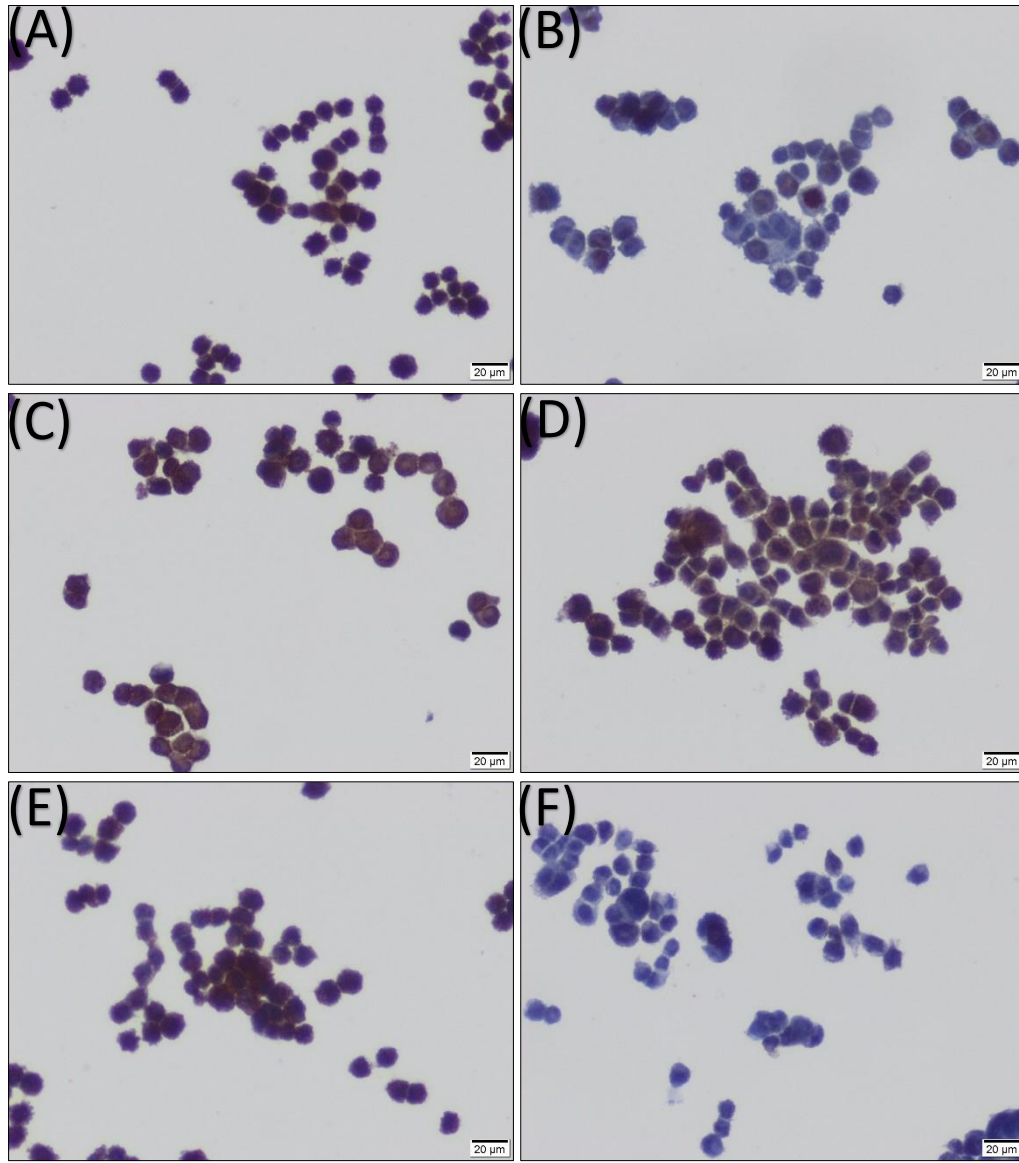


Şekil 4.24. Colo 320 CD133- hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.24'te Colo 320 CD133- hücrelerde 230 °C'ta sentezlenen ürününün uygulaması sonrasında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde orta şiddette pozitif (++), Ki67 immunoreaktivitesinin de yer yer zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmektedir. Hücresel yaşlanma belirteçlerinden olan lamin B1 ve P16 dağılımlarının benzer olup 190 °C'ta sentezlenen ürünün uygulaması ile benzerlik gösterdiği ve orta derecede pozitif (++) olduğu izlenmiştir. Sitokrom C immunoreaktivitesi ise tüm hücrelerde kuvvetli pozitif (+++). 190 °C'ta elde edilen ürünün uygulamasına oranla 230 °C'ta elde edilen ürünün

uygulamasının hem sitokrom C hem de kaspaz 3'teki artış nedeni ile Colo320 CD133- hücrelerde apoptozu tetiklediğini düşündürmüştür. Colo320 CD133- hücrelerde hücresel yaşlanmanın, 190 °C'ta elde edilen ürünün uygulamasına benzer şekilde p16 immunoreaktivitesinin artışı ile başladığı, fakat lamin B1 immunoreaktivitesinin varlığı ile de dengede tutulmaya çalışıldığı izlenimini vermiştir.

Son olarak 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün Colo320 CD133- hücrelerde uygulaması yapılmış ve bu uygulamaya ilişkin sonuçlar Şekil 4.25'te sunulmuştur.

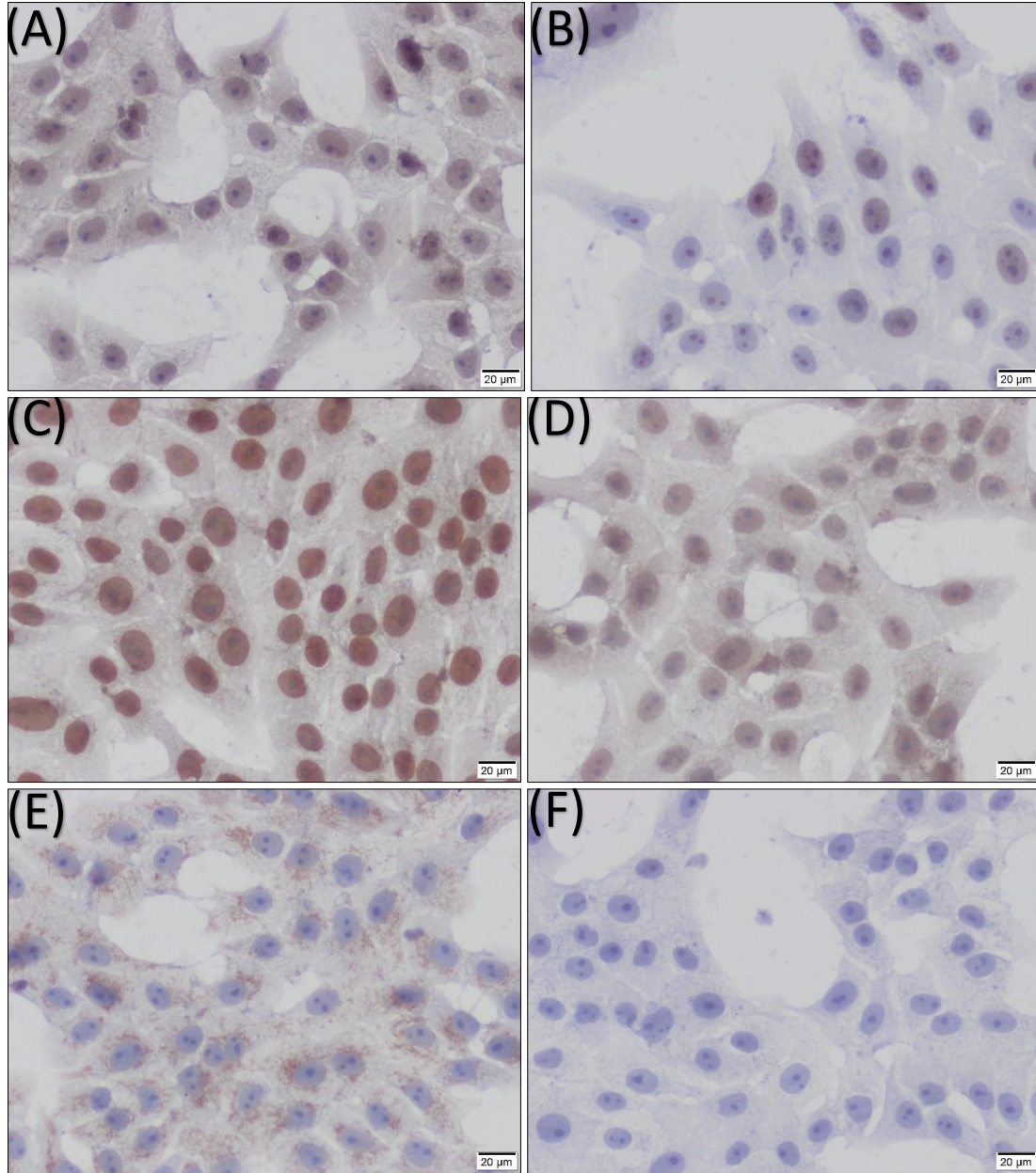


Şekil 4.25. Colo 320 CD133- hücrelerde 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün 24 saat uygulaması sonrasında (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) P16 (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.25'te yer alan görüntüler, Colo 320 CD133- hücrelerde 270 °C'ta elde edilen ürünün uygulaması sonucunda kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde kuvvetli şiddette pozitif (+++), Ki67 immunoreaktivitesinin de çok nadiren zayıf şiddette pozitif (+) Lamin B1 ve P16 immunoreaktivitelerinin kuvvetli şiddette pozitif (+++) ve sitokrom C immunoreaktivitesinin ise tüm hücrelerde kuvvetli pozitif (+++) veya yer yer orta şiddette pozitif (++) olduğunu göstermiştir. 270 °C'ta elde edilen ürünün uygulaması ile Colo320 CD133- hücrelerde apoptozun diğer iki ürüne oranla daha fazla olduğu, hücresel yaşlanmanın ise benzer olduğu izlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında kontrol hücresi olarak böbrek epitelyal hücre hattı olan vero hücresi belirlenmiş ve bu hücrede 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen ürünlerin uygulamaları yapılmıştır. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün vero hücresinde uygulaması sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 4.26'da verilmiştir.

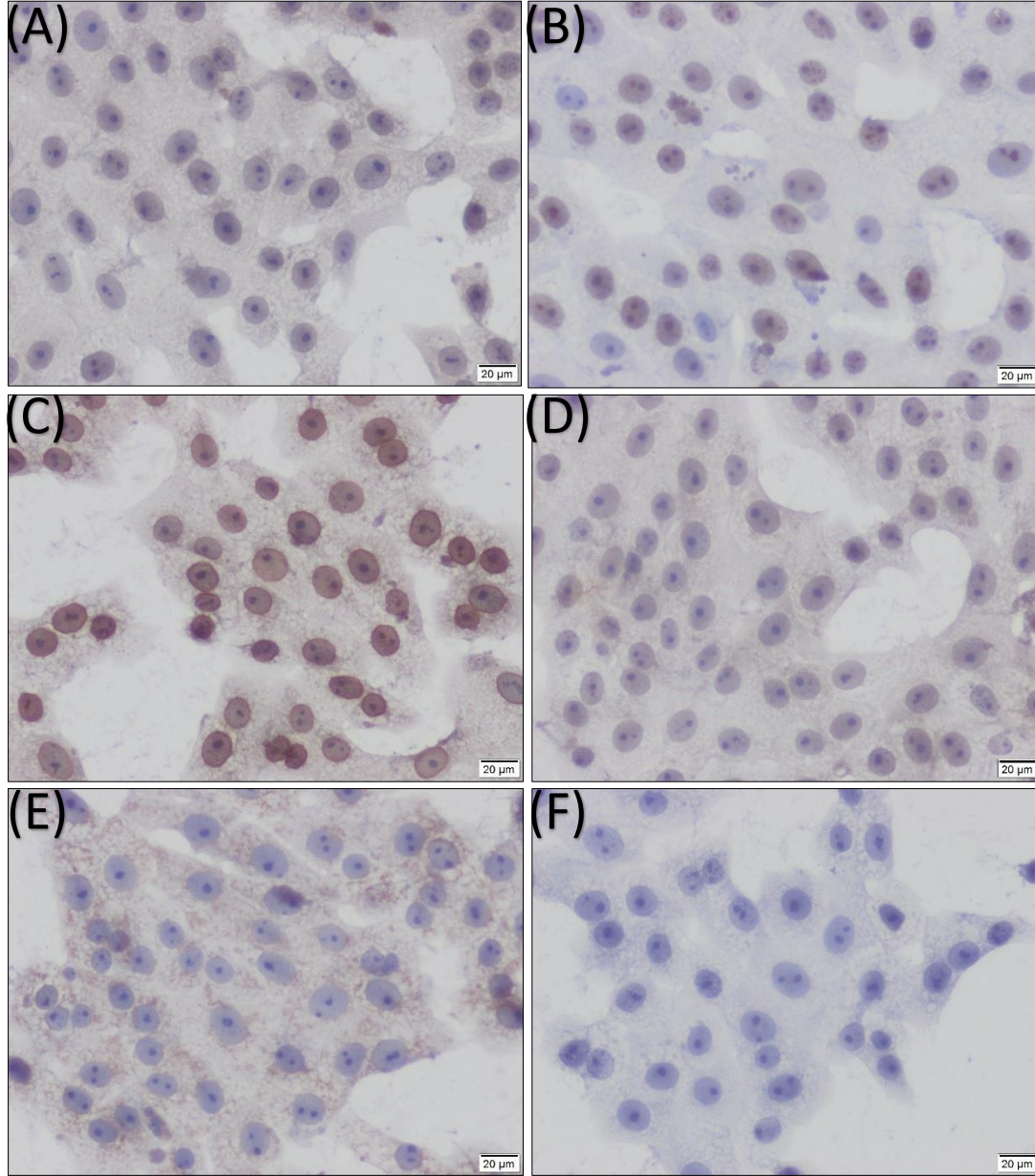




Şekil 4.26. Vero hücrelerde 190 °C'ta elde edilen ürünün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.26'da verilen sonuçlara göre kontrol hücre olarak belirlenen vero hücresinde 190 °C'ta elde edilen ürünün uygulaması sonrasında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde zayıf şiddette pozitif (+), Ki67 immunoreaktivitesinin de yer yer zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmüştür. Hücresel yaşlanma belirteçlerinden lamin B1 immunoreaktivitesinin kuvvetli şiddette pozitif (+++) iken p16 immunoreaktivitesinin zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmüştür. Sitokrom C immunoreaktivitesinin ise tüm hücrelerde zayıf şiddette pozitif (+) olduğu tespit edilmiştir.

230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün vero hücresinde uygulaması sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de sunulmuştur.



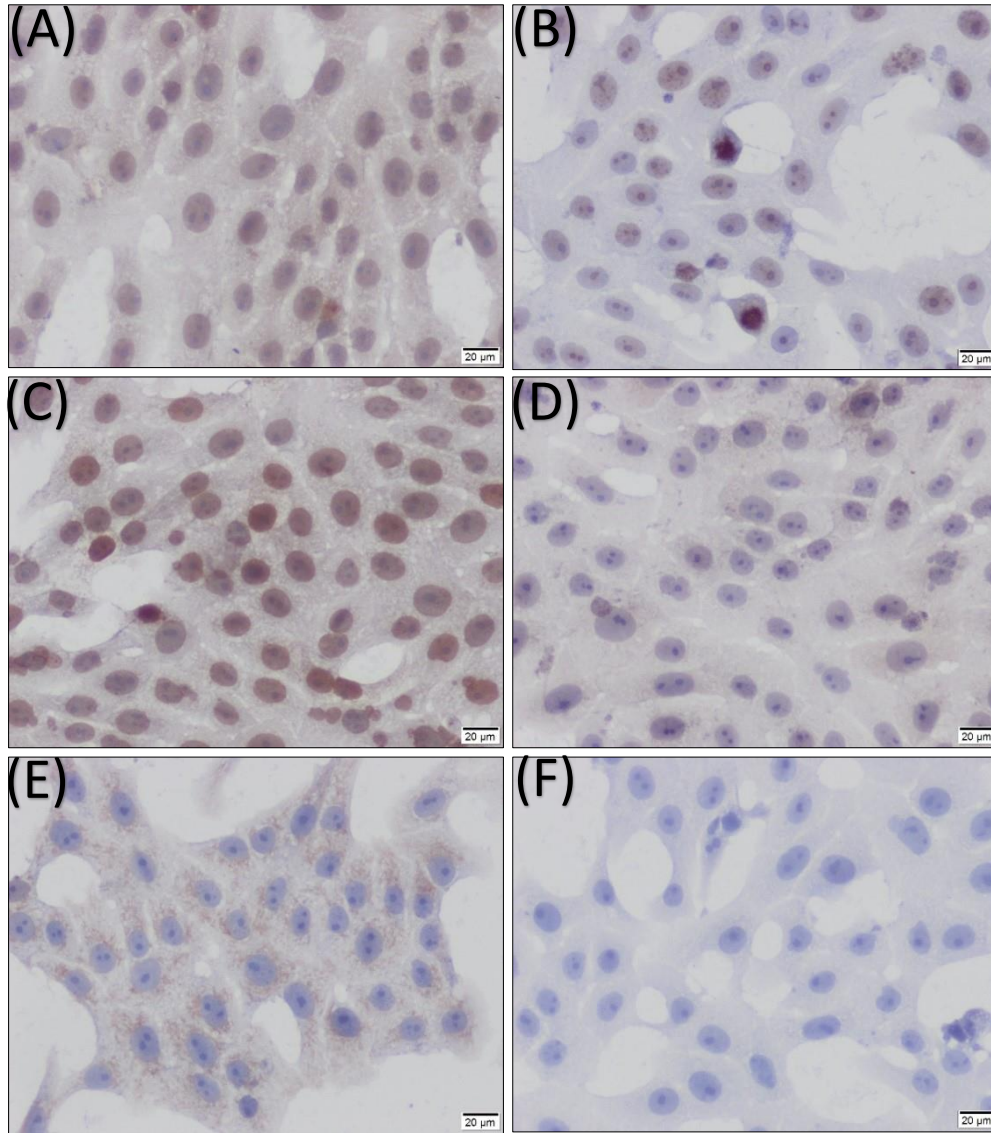
Şekil 4.27. Vero hücrelerde 230 °C'ta elde edilen ürününün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki67 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması

Şekil 4.27'deki görüntüler incelendiğinde vero hücrelerinde 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün uygulaması sonrasında ise kaspaz 3 immunoreaktivitesinin negatif (-), Ki67 immunoreaktivitesinin ise çoğu hücrede zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmektedir. Lamin B1 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde kuvvetli şiddette pozitif(+++) iken P16



immunoreaktivitesinin negatif (-) olduğu görülmüştür. 230 °C'ta sentezlenen ürününün vero hücrelerinde uygulaması sonrasında sitokrom C immunoreaktivitesinin 190 °C'ta sentezlenen ürününü uygulamasına benzer şekilde tüm hücrelerde zayıf şiddete pozitif (+) olduğu anlaşılmıştır.

Son olarak da 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün vero hücresinde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamaya ilişkin veriler Şekil 4.28'de sunulmuştur.



Şekil 4.28. Vero hücrelerde 270 °C'ta elde edilen ürününün uygulaması sonucunda (A) kaspaz 3 (B) Ki6 (C) lamin B1 (D) p16 ve (E) sitokrom C immunoreaktivitesi (F) kontrol immunohistokimyasal boyaması



Şekil 4.28'deki görüntülerde 270 °C'ta sentezlenen ürünün vero hücrelerinde uygulaması sonrasında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin tüm hücrelerde zayıf şiddette pozitif (+), Ki67 immunoreaktivitesinin de yer yer zayıf şiddette pozitif (+) olduğu görülmüştür. Hücresel yaşlanma belirteçlerinden lamin B1 immunoreaktivitesi tüm hücrelerde kuvvetli şiddette pozitif (+++) iken p16 immunoreaktivitesi negatiftir (-). 270 °C'ta sentezlenen ürünün vero hücrelerinde uygulaması sonrasında 190 ve 230 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlerin uygulamalarına benzer şekilde sitokrom C immunoreaktivitesi tüm hücrelerde zayıf şiddette pozitif (+) olarak görülmüştür. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol immunohistokimyasında boyanmaların olmaması immunoreaktivitelerin spesifik olduğunu göstermektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler sonucunda 10 nm'den küçük floresans özelliğe sahip BKKNT ürünleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu ürünlerin karakterizasyonları yapılmış, iyonlar üzerinde seçicilik ve duyarlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak da ürünlerin kanserli ve sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla sitotoksikite analizleri ve immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Sentez ortamı olarak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tercih edilmiştir. BKKNT ürünlerinin optik özellikleri, UV-GB ve floresans spektroskopileri kullanılarak incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda elde edilen ürünlerde 170 ve 270 °C sıcaklıklarda sentezlenen ürünlerde daha belirgin olmak üzere tüm ürünlerde 265 nm'de absorpsiyon pikleri gözlenmiştir. Bununla birlikte 210, 230, 250 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen ürünlerde de 330 nm civarında absorpsiyon pikleri gözlenmiştir. 265 nm'deki absorpsiyon piklerinin  $\pi-\pi^*$  geçişlerine 330 nm civarındaki piklerin de  $n-\pi^*$  geçişlerine ait olduğu düşünülmüştür. Floresans spektroskopisi incelemeleri sonucunda BKKNT ürünlerinin KV'lerinin sıcaklıkla arttığı ve en yüksek KV'ne sahip olan ürünün 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürünü olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında ürünlerin uyarma dalga boyu arttıkça emisyonlarında kaymalar gözlenmiş ve FL şiddetlerinde azalmalar meydana gelmiştir. Bu durumun ürünlerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı düşünülmektedir [83]. Bu sonuçlardan yola çıkarak elde edilen BKKNT ürünlerinin uyarma dalga boyuna bağımlı oldukları söylenebilir.

Ürünlerin yapısal karakterizasyonları TEM, FTIR, XRD ve XPS analizleri ile belirlenmiştir. TEM analizi sonucunda elde edilen ürünlerin çoğunluğunun 10 nm'den küçük olduğu fakat yer yer agregasyonların meydana geldiği anlaşılmıştır. Bu agregasyonları önlemek için numune hazırlama aşamasında yüzey aktif madde kullanılarak tekrar ölçüm alınması önerilmektedir. FTIR analizinde elde edilen veriler yapıda B-C, B-O, C-C, C-N, B-NH ve OH gerilmelerine sahip fonksiyonel gruplar gözlenmiş olup bu grupların varlığı da XPS analizleri ile de desteklenmiştir.

BKKNT ürünlerinin termal kararlılığı TGA analizleri ile belirlenmiş ve 800 °C sıcaklıkta kütle kaybının yaklaşık olarak %25 mertebesinde olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç yapıların yüksek sıcaklıkta oldukça kararlı olduklarını göstermektedir. Elde edilen

ürünlerin zeta potansiyel ölçümleri sonucundaki veriler yapıların negatif (-) olarak yüklendiğini göstermiş ve bu durumun da ürünün yüzeyinde bulunan karboksil veya hidroksil gibi fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı düşünülmüştür [73].

KNT'lerin iyonlara karşı seçici ve duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu sebeple KNT'lerin kullanım alanlarından bir tanesi de sensör uygulamalarıdır. Tez çalışması kapsamında  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $CO_3^{2-}$  ve  $SO_4^{2-}$  iyonlarına karşı 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününün seçiciliği ve  $SO_4^{2-}$  iyonuna duyarlılığı üzerine deneyler yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler ürünün  $SO_4^{2-}$  iyonuna seçici olduğunu göstermiş ve bir potansiyel uygulama alanı olarak içme sularında nM seviyede sülfat iyonunun tayini amacıyla kullanılabilecek bir floresans özelliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır. BKKNT ürününün  $SO_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlı olmasının sebebinin sentez ortamında kullanılan  $H_2SO_4$ 'in üründe bıraktığı iz olduğu düşünülmüştür.

Son olarak 190, 230 ve 270 °C sıcaklıklarda elde edilen BKKNT ürünlerinin sağlıklı ve kanserli hücreler üzerindeki etkileri hücre uygulamaları ile incelenmiştir. Bu uygulamalar kapsamında sitotoksikite analizleri ile immunohistokimyasal analizler yapılmış ve sonuçlar kaspaz-3, Ki67, lamin B1, p16 ve sitokrom C proteinlerinin varlığı ile değerlendirilmiştir. Uygulamada primer kolon kanseri hücresi olan Colo320 hücre hattı ve kontrol hücresi olarak da vero hücreler kullanılmıştır. Yapılan bu uygulamaların ardından elde edilen sonuçlara göre, kontrol hücre olarak vero hücrelerinde farklı sıcaklıklarda (190, 230 ve 270 °C) elde edilen ürünlerin uygulaması sonrasında apoptozun tetiklenmediği görülmüştür. Lamin B1 immunoreaktivitesinin p16 ya oranla çok daha fazla olmasından dolayı kanser hücrelerinde hem apoptozun hem de yaşlanmanın tetiklenmesine rağmen vero hücrelerinde benzer etkinin görülmemesi, özellikle etkinliğin kanser hücrelerine hedef olarak seçildiğini desteklemektedir. Özellikle Colo320 CD133+ hücrelerde hücre ölümü ve hücre yaşlanmanın tetiklenmesi, bunun yanı sıra vero hücrelerinde apoptozun tetiklenmemesi ve Ki67 ile özellikle de lamin B1'in varlığı ve p16'nın tetiklenmemesi adına 230 °C'ta elde edilen ürünün uygulamasının en iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm bu deneyler sonucunda elde edilen veriler, sentezlenen BKKNT ürününün yüksek teknoloji gerektiren yeni bir bor ürünü adayı olduğunu göstermekte olup hem ekonomik yönden hem de kendi teknolojimizi geliştirmemiz adına ülkemize büyük katkı sağlayacağı aşikârdır. Bunun yanı sıra elde

edilen ürünün kanser hücreleri tarafından hedef olarak seçilmesi kanser tedavilerinde görüntüleme ajanı olarak kullanılabileceğinin göstergesidir. Özellikle  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonuna karşı gösterdiği duyarlılık, bu iyonla karşı duyarlı bir sensör geliştirilmesi ve içme sularında nM seviyelerinde  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonu tayini yapılabileceğini göstermektedir. Bununla beraber şu ana kadar yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde KNT'lerin  $\text{SO}_4^{2-}$  iyonuna karşı duyarlılıklarının test edildiği araştırmalara rastlanmamıştır. Bu anlamda bakıldığında literatüre bir yenilik katacağı ve indekse kayıtlı uluslararası dergilerde yayımlanma potansiyelinin mevcut olduğu söylenebilir.



## KAYNAKLAR

1. Williams, R. J. P., (1991). The chemical elements of life, *Journal of the Chemical Society*, (S), 539–546.
2. Demming, A. (Editör). (2010). King of the elements, *Nanotechnology*, (21)30, 2–3
3. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. and Smalley, R. X. (1985). C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene, *Nature*, 318, 162-163
4. Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K. and Scrivens, W. A. (2004). electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments, *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736-12737.
5. Sun, Y. P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. A. S., Pathak, P., Mezziani, M. J., Harruf, B. A., Wang, X., Wang, H., Luo, P. G., Yang, H., Kose, M. E., Chen, B., Veca, L. M. and Xie, S. Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence, *Journal of the American Chemical Society*, 128(24), 7756–7757.
6. Feng, Z., Li, Z., Zhang, X., Xu, G. and Zhou, N. (2018). Fluorescent carbon dots with two absorption bands: luminescence mechanism and ion detection, *Journal of Material Science*, 53(9), 6459–6470.
7. Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı. (2018). *Bor sektör raporu*.
8. Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J. and Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective, *Nano Research*, 8(2), 355–381.
9. Miao, P., Han, K., Tang, Y., Wang, B., Lin, T. and Cheng, W. (2015). Recent advances in carbon nanodots: Synthesis, properties and biomedical applications, *Nanoscale*, 7(5), 1586–1595.
10. Lim, S. Y., Shen, W. and Gao, Z. (2015). Carbon quantum dots and their applications, *Chemical Society Reviews*, 44(1), 62–381.
11. Wu, Y. (2016). *Carbon Nanodots as Biolabels for Fluorescence Immunoassays*. Unpublished Doctoral Dissertation, Oregon State University, U.S.A.
12. Zheng, L., Chi, Y., Dong, Y., Lin, J. and Wang, B. (2009). Electrochemiluminescence of water-soluble carbon nanocrystals released electrochemically from graphite, *Journal of the American Chemical Society*, 131(13), 4564–4565.
13. Castro, H. P. S., Souza, V. S., Scholten, J. D., Dias, J. H., Fernandes J. A., Rodembusch, F. S., Dos Reis, R., Dupont, J., Teixeira, S. R. and Correia, R. R. B. (2016). Synthesis and Characterisation of Fluorescent Carbon Nanodots Produced in Ionic Liquids by Laser Ablation, *Chemistry - A European Journal*, 22(1), 138–143.

14. Hu, S. L., Niu, K. Y., Sun, J., Yang, J., Zhao, N. Q. and Du, X. W. (2009). One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation,” *Journal of Material Chemistry*, 19(4), 484–488.
15. Liu, H., Ye, T. and Mao, C. (2007). Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot, *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(34), 6473–6475.
16. Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F. and Yang, X. (2009). Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties, *Chemical Communications*, 34, 5118–5120.
17. Qu, S., Wang, X., Lu, Q., Liu, X. and Wang, L. (2012). A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon nanodots, *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(49), 12215–12218.
18. Sun, X., He, J., Meng, Y., Zhang, L., Zhang, S., Ma, X., Dey, S., Zhao, J. and Lei, Y. (2016). Microwave-assisted ultrafast and facile synthesis of fluorescent carbon nanoparticles from a single precursor: Preparation, characterization and their application for the highly selective detection of explosive picric acid,” *Journal of Material Chemistry A*, 4(11), 4161–4171.
19. Sarswat, P. K. and Free, M. L. (2015). Light emitting diodes based on carbon dots derived from food, beverage, and combustion wastes, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(41), 27642–27652.
20. Li, H., He, X., Liu, Y., Huang, H., Lian, S., Lee, S. T. and Kang, Z. (2011). One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties, *Carbon*, 49(2), 605–609.
21. Sarswat, P. K. and Free, M. L. (2015). Light emitting diodes based on carbon dots derived from food, beverage, and combustion wastes, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(41), 27642–27652.
22. Roy, P., Chen, P. C., Periasamy, A. P., Chen, Y. N. and Chang, H. T. Photoluminescent carbon nanodots: Synthesis, physicochemical properties and analytical applications, *Materials Today*, 18(8), 447–458, 2015.
23. Cui, Y., Zhang, C., Sun L., Hu, Z. and Liu, X. (2015). Simple and efficient synthesis of strongly green fluorescent carbon dots with upconversion property for direct cell imaging, *Particle and Particle Systems Characterization*, 32(5), 542–546.
24. Zhu, S., Meng, Q., Wang, L., Zhang, J., Song, Y., Jin, H., Zhang, K., Sun, H., Wang, H. and Yang, B. (2013). Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging, *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(14), 3953–3957.
25. Jiang, K., Sun, S., Zhang, L., Lu, Y., Wu, A., Cai, C. and Lin, H. (2015). Red, green, and blue luminescence by carbon dots: Full-color emission tuning and multicolor cellular imaging, *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(18), 5360–5363.



26. Feng, X. T., Zhang, F., Wang, Y. L., Zhang, Y., Yang, Y. Z. and Liu, X. G. (2015). Luminescent carbon quantum dots with high quantum yield as a single white converter for white light emitting diodes, *Applied Physics Letters*, 107(21), 1–6.
27. Shen, P. and Xia, Y. (2014). Synthesis-modification integration: One-step fabrication of boronic acid functionalized carbon dots for fluorescent blood sugar sensing, *Analytic. Chemistry*, 86(11), 5323–5329.
28. Ray, S. C., Saha, A., Jana, N. R. and Sarkar, R. (2009). Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application, *Journal of Physical Chemistry C*, 113(43), 18546–18551.
29. Jiang, J., He, Y., Li, S. and Cui, H. (2012). Amino acids as the source for producing carbon nanodots: Microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement, *Chemical Communications*, 48(77), 9634–9636.
30. Dong, Y., Shao, J., Chen, C., Li, H., Wang, R., Chi, Y., Lin, X. and Chen, G. (2012). Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid, *Carbon*, 50(12), 4738–4743.
31. Wen, J., Xu, Y., Li, H., Lu, A. and Sun, S. (2015). Recent applications of carbon nanomaterials in fluorescence biosensing and bioimaging, *Chemical Communication*, 51(57), 11346–11358.
32. Vijayanthimala, V. and Chang, H. C. (2009). Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications, *Nanomedicine*, 4(1), 47–55.
33. Liu X., Rui, M., Song, J., Shen, Z. and Zeng, H. (2015). Carbon and Graphene Quantum Dots for Optoelectronic and Energy Devices: A Review, *Advanced Functional Materials*, 25(31), 4929–4947.
34. Chen, W., Hu, C., Yang, Y., Cui, J. and Y. Liu. (2016). Rapid synthesis of carbon dots by hydrothermal treatment of lignin, *Materials (Basel)*, 9(3), 184.
35. Wang, Q., Zhang, S., Ge, H., Tian, G., Cao, N. and Li, Y. (2015). A fluorescent turn-off/on method based on carbon dots as fluorescent probes for the sensitive determination of Pb<sup>2+</sup> and pyrophosphate in an aqueous solution, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 207(Part A), 25–33.
36. Gommès, C., Blacher, S., Masenelli-Varlot, K., Bossuot, C., McRae, E., Fonseca, A., Nagy, J. B. and Pirard, J. P. (2003). Image analysis characterization of multi-walled carbon nanotubes, *Carbon*, 41(13), 2561–2572.
37. Taschner, C., Pacal, F., Leonhardt, A., Spatenka, P., Bartsch, K., Graff, A., Kaltoven, R. (2003). Synthesis of aligned carbon nanotubes by DC plasma-enhanced hot filament CVD, *Surface and Coatings Technology*, 174, 81–87.
38. Huang, J. J., Zhong, Z. F., Rong, M. Z., Zhou, X., Chen, X. D. and Zhang, M. Q. (2014). An easy approach of preparing strongly luminescent carbon dots and their polymer based composites for enhancing solar cell efficiency, *Carbon*, 70, 190–198.

39. Gao, Z., Shen, G., Zhao, X., Dong, N., Jia, P., Wu, J., Cui, D., Zhang, Y. and Wang, Y. (2013). Carbon dots: A safe nanoscale substance for the immunologic system of mice, *Nanoscale Research*, 8(1), 1–8.
40. Gao, X., Ding, C., Zhu, A. and Tian, Y. (2014). Carbon-dot-based ratiometric fluorescent probe for imaging and biosensing of superoxide anion in live cells, *Analytical Chemistry*, 86(14), 7071–7078.
41. Liu, C., Zhang, P., Zhai, X., Tian, F., Li, W., Yang, J., Wang, H., Wang, W. and Liu, W. (2012). Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence, *Biomaterials*, 33(13), 3604–3613.
42. Hu, Y., Yang, J., Tian, J., Jia, L. and Yu, J. S. (2014). Waste frying oil as a precursor for one-step synthesis of sulfur-doped carbon dots with pH-sensitive photoluminescence, *Carbon*, 77, 775–782.
43. Wei, X. M., Xu, Y., Li, Y. H., Yin, X. B. and He, X. W. (2014). Ultrafast synthesis of nitrogen-doped carbon dots via neutralization heat for bioimaging and sensing applications, *RSC Advances*, 4(84), 44504–44508.
44. Liu, R., Zhang, J., Gao, M., Li, Z., Chen, J., Wu, D. and Liu, P. (2015). A facile microwave-hydrothermal approach towards highly photoluminescent carbon dots from goose feathers, *RSC Advances*, 5(6), 4428–4433.
45. Feng, T., Ai, X., An, G., Yang, P. and Y, Zhao. (2016). Charge-Convertible Carbon Dots for Imaging-Guided Drug Delivery with Enhanced in Vivo Cancer Therapeutic Efficiency, *ACS Nano*, 10(4), 4410–4420.
46. Kato, H., Suzuki, M., Fujita, K., Horie, M., Endoh, S., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Takahashi, K., Nakamura, A. and Kinugasa, S. (2009). Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment, *Toxicology in Vitro*, 23(5), 927–934.
47. Kato, H., Nakamura, A., Takahashi, K. and Kinugasa, S. (2012). Accurate Size and Size-Distribution Determination of Polystyrene Latex Nanoparticles in Aqueous Medium Using Dynamic Light Scattering and Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation with Multi-Angle Light Scattering, *Nanomaterials*, 2(1), 15–30.
48. Wu, Z. L., Zhang, P., Gao, M. X., Liu, C. F., Wang, W., Leng, F. and Huang, C. Z. (2013). One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from *Bombyx mori* silk-natural proteins, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2868.
49. Wang, L. and Zhou, H. S. (2014). Green synthesis of luminescent nitrogen-doped carbon dots from milk and its imaging application, *Analytical Chemistry*, 86(18), 8902–8905.
50. Niu, J., Gao, H., Wang, L., Xin, S., Zhang, G., Wang, Q., Guo, L., Liu, W., Gao, X. and Wang, Y. (2014). Facile synthesis and optical properties of nitrogen-doped carbon dots, *New Journal of Chemistry*, 38(4), 1522–1527.

51. Barati, A., Shamsipur, M., Arkan, E., Hosseinzadeh, L. and H. Abdollahi. (2015). Synthesis of biocompatible and highly photoluminescent nitrogen doped carbon dots from lime: Analytical applications and optimization using response surface methodology, *Materials Science and Engineering C*, 47, 325–332.
52. Kong, W., Wu, H., Ye, Z., Li, R., Xu, T. and Zhang, B. (2014). Optical properties of pH-sensitive carbon-dots with different modifications, *Journal of Luminescence*, 148, 238–242.
53. Bourlinos, A. B., Trivizas, G., Karakasside, M. A., Baikousi, M., Kouloumpis, A., Gournis, D., Bakandritsos, A., Hola, K., Kozak, O., Zboril, R., Papagiannouli, I., Aloukos, P. and Couris, S. (2015). Green and simple route toward boron doped carbon dots with significantly enhanced non-linear optical properties, *Carbon*, 83, 173–179.
54. Zhao, Q. L., Zhang, Z. L., Huang, B. H., Peng, J., Zhang, M. and Pang, D. W. (2008). Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite, *Chemical Communications*, (41), 5116–5118.
55. Wang, J., Wang, C. F. and Chen, S. (2012). Amphiphilic egg-derived carbon dots: Rapid plasma fabrication, pyrolysis process, and multicolor printing patterns, *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(37), 9297–9301.
56. Mewada, A., Pandey, S., Shinde, S., Mishra, N., Oza, G., Thakur, M., Sharon, M. and Sharon, M. (2013). Green synthesis of biocompatible carbon dots using aqueous extract of *Trapa bispinosa* peel, *Materials Science and Engineering C*, 33(5), 2914–2917.
57. Khanam, A., Tripathi, S. K., Roy, D. and M. Nasim. (2013). A facile and novel synthetic method for the preparation of hydroxyl capped fluorescent carbon nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 102, 63–69.
58. Zou, Y., Yan, F., Zheng, T., Shi, D., Sun, F., Yang, N. and Chen, L. (2015). Highly luminescent organosilane-functionalized carbon dots as a nanosensor for sensitive and selective detection of quercetin in aqueous solution, *Talanta*, 135, 145–148.
59. Guo, Y. and Li, B. (2015). Carbon dots-initiated luminol chemiluminescence in the absence of added oxidant, *Carbon*, 82(C), 459–469.
60. Wang, F., Pang, S., Wang, L., Li, Q., Kreiter, M. and Liu, C. Y. (2010). One-step synthesis of highly luminescent carbon dots in noncoordinating solvents, *Chemistry of Materials*, 22(16), 4528–4530.
61. Wang, C., Sun, D., Zhuo, K., Zhang, H. and Wang, J. (2014). Simple and green synthesis of nitrogen-, sulfur-, and phosphorus-co-doped carbon dots with tunable luminescence properties and sensing application, *RSC Advances*, 4(96), 54060–54065.
62. Bandosz, T. J., Rodriguez-Castellon, E., Montenegro, J. M. and Seredych, M. (2014). Photoluminescence of nanoporous carbons: Opening a new application route for old materials, *Carbon*, 77, 651–659.

63. Wang, L., Ruan, F., Lv, T., Liu, Y., Deng, D., Zhao, S., Wang, H. and Xu, S. (2015). One step synthesis of Al/N co-doped carbon nanoparticles with enhanced photoluminescence, *Journal of Luminescence*, 158(3), 1–5.
64. Li, F., Liu, C., Yang, J., Wang, Z., Liu, W. and Tian, F. (2014). Mg/N double doping strategy to fabricate extremely high luminescent carbon dots for bioimaging, *RSC Advances*, 4(7), 3201–3205.
65. Guo, Y., Wang, D., Liu, X., Wang, X., Liu, W. and Qin, W. (2014). Synthesis and characterization of the nickel@carbon dots hybrid material and its application in the reduction of Cr(VI), *New Journal of Chemistry*, 38(12), 5861–5867.
66. Qu, K., Wang, J., Ren, J. and Qu, X. (2013). Carbon dots prepared by hydrothermal treatment of dopamine as an effective fluorescent sensing platform for the label-free detection of iron(III) ions and dopamine, *Chemistry - A European Journal*, 19(22), 7243–7249.
67. Aiyer, S., Prasad, R., Kumar, M., Nirvikar, K., Jain, B. and Kushwaha, O. S. (2016). Fluorescent carbon nanodots for targeted in vitro cancer cell imaging,” *Applied Materials Today*, 4, 71–77.
68. Gomez, I. J., Arnaiz, B., Cacioppo, M., Arcudi, F. and Prato, M. (2018). Nitrogen-doped carbon nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel, *Journal of Material Chemistry B*, 6(35), 5540–5548.
69. Wang, J. and Liu, J. (2016). PEI-folic acid modified carbon nanodots for cancer cell-targeted delivery and two-photon excitation imaging, *RSC Advances*, 6(24), 19662–19668.
70. Lee, C. H., Rajendran R., Jeong, M. S., Ko, H. Y., Joo, J. Y., Cho, S., Chang, Y. W. and Kim, S. (2013). Bioimaging of targeting cancers using aptamer-conjugated carbon nanodots, *Chemical Communications*, 49(58), 6543–6545.
71. Zheng, M., Ruan, S., Liu, S., Sun, T., Qu, D., Zhao, H., Xie, Z., Gao, H., Jing, X. and Sun, Z. (2015). Self-Targeting Fluorescent Carbon Dots for Diagnosis of Brain Cancer Cells, *ACS Nano*, 9(11), 11455–11461.
72. Ruan, S., Qian, J., Shen, S., Zhu, J., Jiang, X., He, Q. and Gao, H. (2014). A simple one-step method to prepare fluorescent carbon dots and their potential application in non-invasive glioma imaging, *Nanoscale*, 6(17), 10040–10047.
73. Li, C. L., Ou, C. M., Huang, C. C., Wu, W. C., Chen, Y. P., Lin, T. E., Ho, L. C., Wang, C. W., Shih, C. C., Zhou, H. C., Lee, Y. C., Tzeng, W. F., Chiou, T. J., Chu, S. T., Cang, J. and Chang H. T. (2014). Carbon dots prepared from ginger exhibiting efficient inhibition of human hepatocellular carcinoma cells, *Journal of Material Chemistry B*, 2(28), 4564–4571.
74. Lai, C. W., Hsiao, Y. H., Peng, Y. K. and Chou, P. T. (2012). Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; Gram scale production of carbon dots/mSiO<sub>2</sub> for cell imaging and drug release, *Journal of Material Chemistry*, 22(29), 14403–14409.

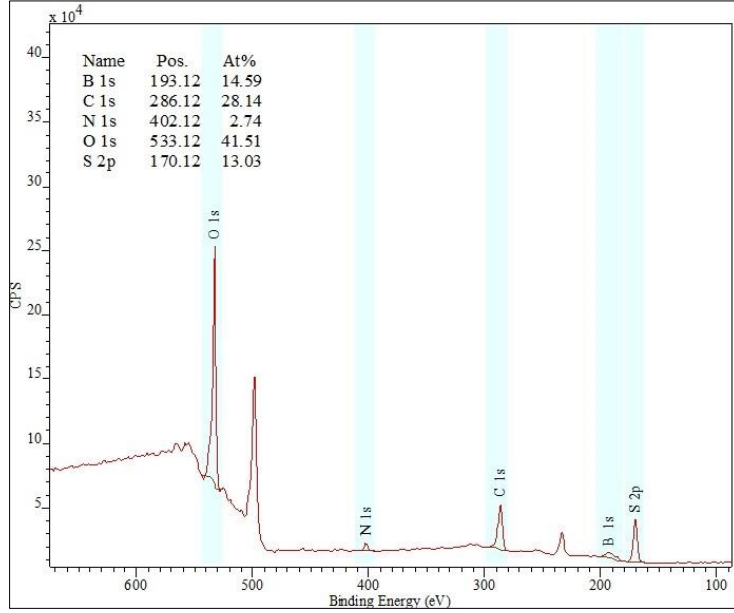
75. Zheng, M., Liu, S., Li, J., Qu, D., Zhao, H., Guan, X., Hu, X., Xie, Z., Jing, X. and Sun, Z. (2014). Integrating oxaliplatin with highly luminescent carbon dots: An unprecedented theranostic agent for personalized medicine, *Advanced Materials*, 26(21), 3554–3560.
76. Zeng, Q., Shao, D., He, X., Ren, Z., Ji, W., Shan, C., Qu, S., Li, J., Chen, L. and Li, Q. (2016). Carbon dots as a Trackable Drug Delivery Carrier for Localized Cancer Therapy in Vivo, *Journal of Materials Chemistry B*, 4(30), 5119–5126.
77. Sun, X. and Lei, Y. (2017). Fluorescent carbon dots and their sensing applications, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 89, 163–180.
78. Qian, Z., Shan, X., Chai, L., Chen, J. and Feng, H. (2014). Si-Doped Carbon Quantum Dots: A Facile and General Preparation Strategy, Bioimaging Application, and Multifunctional Sensor, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, 6797–6805.
79. Xu, J., Zhou, Y., Cheng, G., Dong, M., Liu, S. and Huang, C. (2015). Carbon dots as a luminescence sensor for ultrasensitive detection of phosphate and their bioimaging properties, *Luminescence*, 30(4), 411–415.
80. Lu, W., Qin, X., Liu, S., Chang, G., Zhang, Y., Luo, Y., Asiri, A. M., Al-Youbi, A. O. and Sun, X. (2012). Economical, green synthesis of fluorescent carbon nanoparticles and their use as probes for sensitive and selective detection of mercury(II) ions, *Analytical Chemistry*, 84(12), 5351–5357.
81. Guo, Y., Wang, Z., Shao, H. and Jiang, X. (2013). Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions, *Carbon*, 52, 583–589.
82. Zong, J., Yang, X., Trinchì, A., Hardin, S., Cole, I., Zhu, Y., Li, C., Muster, T. and Wei, G. (2014). Carbon dots as fluorescent probes for ‘off-on’ detection of Cu<sup>2+</sup> and l-cysteine in aqueous solution, *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 330–335.
83. Gao, X., Lu, Y., Zhang, R., He, S., Ju, J., Liu, M., Li, L. and Chen, W. (2015). One-pot synthesis of carbon nanodots for fluorescence turn-on detection of Ag<sup>+</sup> based on the Ag<sup>+</sup>-induced enhancement of fluorescence, *Journal of Material Chemistry C*, 3(10), 2302–2309.
84. Bu, G., Peng, J., Peng, H., Liu, S., Xiao, S., Liu, D., Pan, Z., Chen, Y., Chen, F. and He, Y. (2016). Fluorescent carbon dots for the sensitive detection of Cr(VI) in aqueous media and their application in test papers, *RSC Advances*, 6(98), 95469–95475.
85. Lin, H., Ding, L., Zhang, B. and J. Huang. (2018). Detection of nitrite based on fluorescent carbon dots by the hydrothermal method with folic acid, *Royal Society Open Science*, 5(5), 172149.
86. Xu, Z. Q., Yang, L. Y., Fan, X. Y., Jin, J. C., Mei, J., Peng, W., Jiang, F. L., Xiao, Q. and Liu, Y. (2014). Low temperature synthesis of highly stable phosphate functionalized two color carbon nanodots and their application in cell imaging, *Carbon*, 66, 351–360.

87. Yin, B., Deng, J., Peng, X., Long, Q., Zhao, J., Lu, Q., Chen, Q., Li, H., Tang, H., Zhang, Y. and Yao, S. (2013). Green synthesis of carbon dots with down- and up-conversion fluorescent properties for sensitive detection of hypochlorite with a dual-readout assay, *Analyst*, 138(21), 6551–6557.
88. Kiran, S. and Misra, R. D. K. (2015). Mechanism of intracellular detection of glucose through nonenzymatic and boronic acid functionalized carbon dots, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(9), 2888–2897.
89. Bhaisare, M. L., Talib, A., Khan, M. S., Pandey, S. and Wu, H. F. (2015). Synthesis of fluorescent carbon dots via microwave carbonization of citric acid in presence of tetraoctylammonium ion, and their application to cellular bioimaging, *Microchimica Acta*, 182(13–14), 2173–2181.
90. Dubey, P., Tripathi, K. M. and Sonkar, S. K. (2014). Gram scale synthesis of green fluorescent water-soluble onion-like carbon nanoparticles from camphor and polystyrene foam, *RSC Advances*, 4(12), 5838–5844.

## **EKLER**

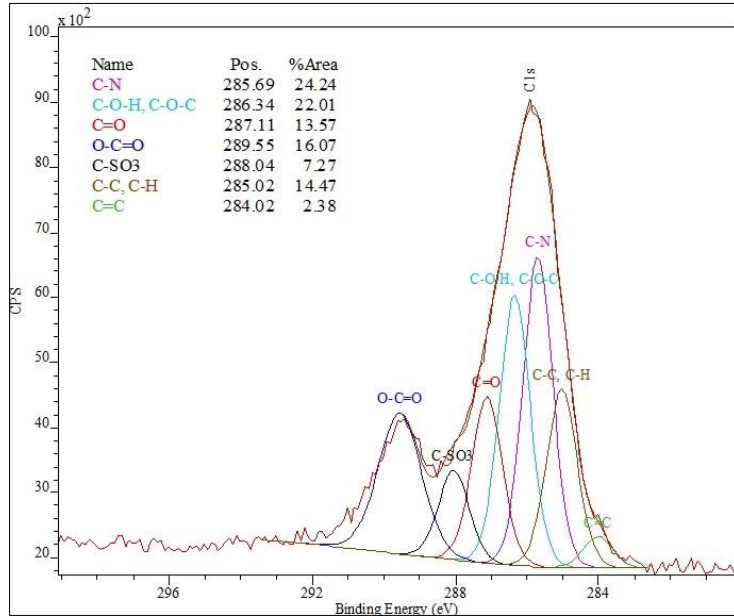
## EK-1. XPS analizi sonuçları

190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. 190 °C'ta elde edilen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu

190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.2'de verilmiştir.

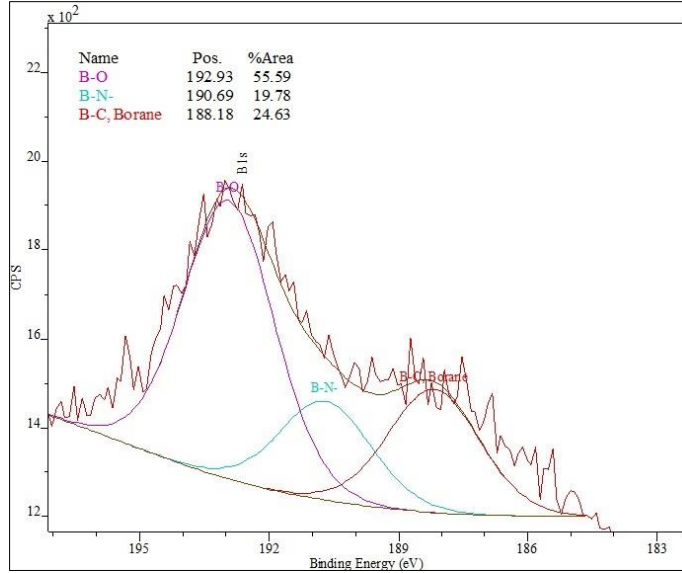


Şekil 1.2. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar



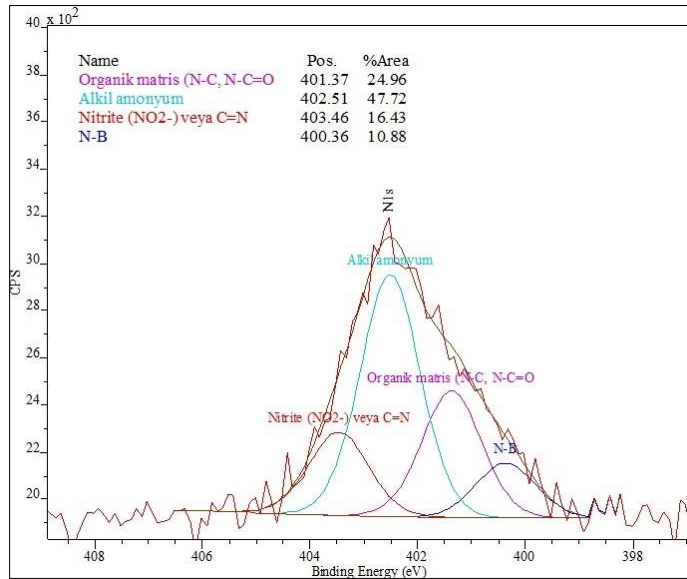
### EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.3'te verilmiştir.



Şekil 1.3. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

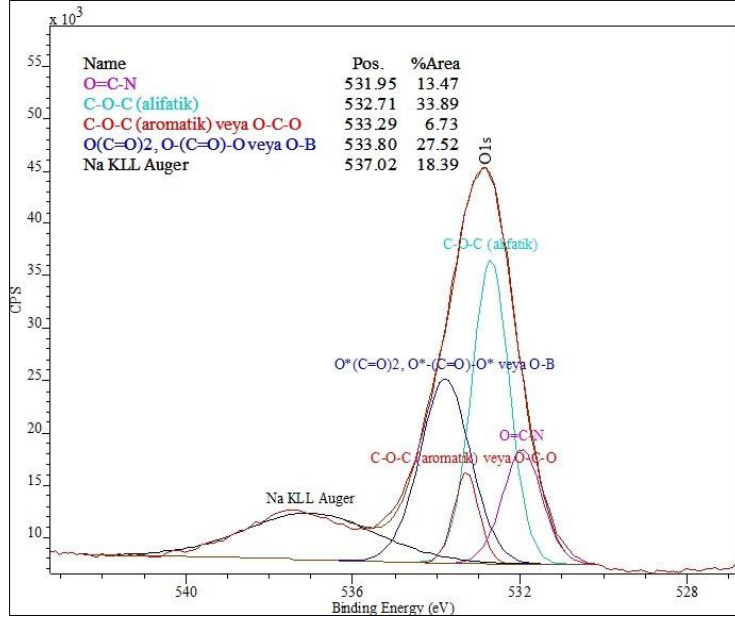
190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1.4. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

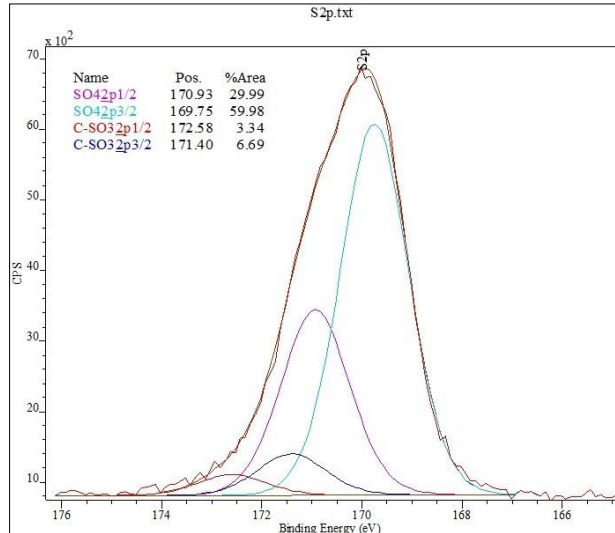
# EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

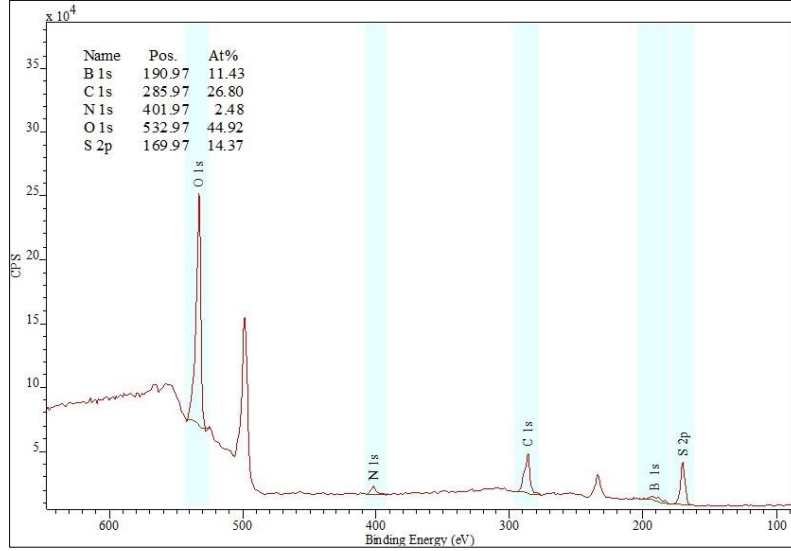
190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait S2p pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. 190 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

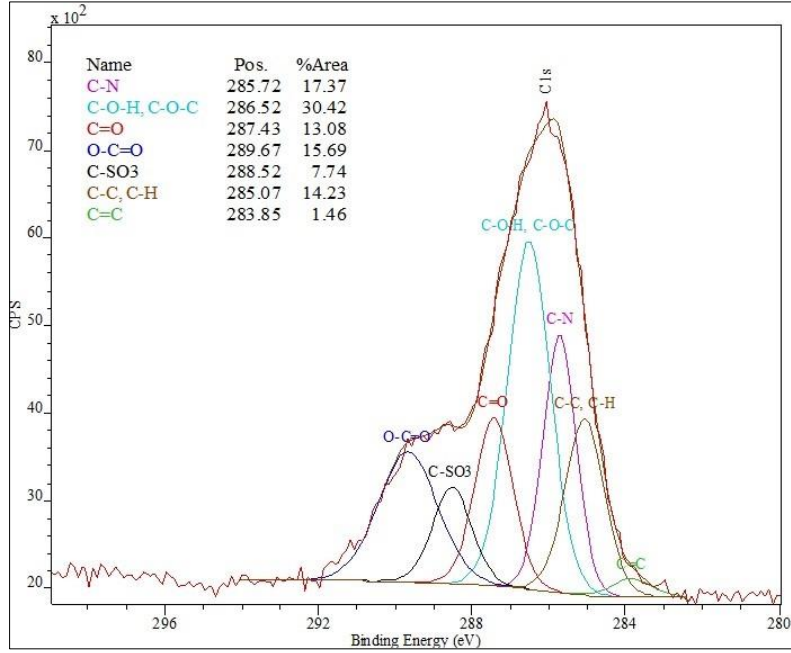
## EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. 230 °C'ta elde edilen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu

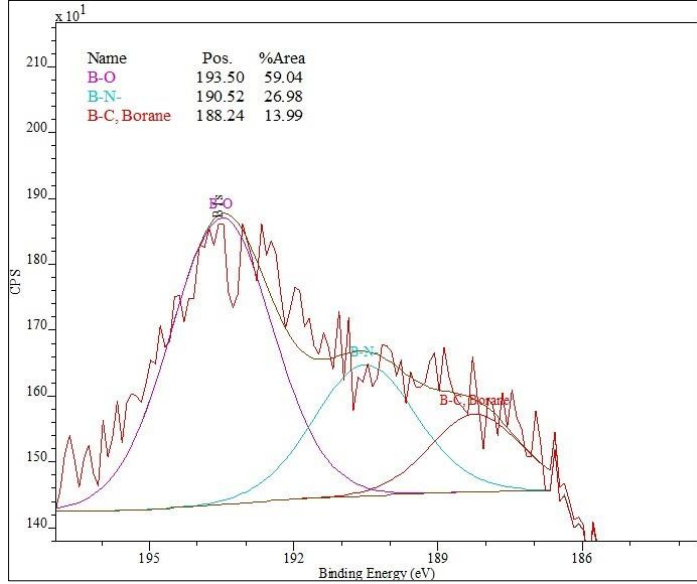
230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

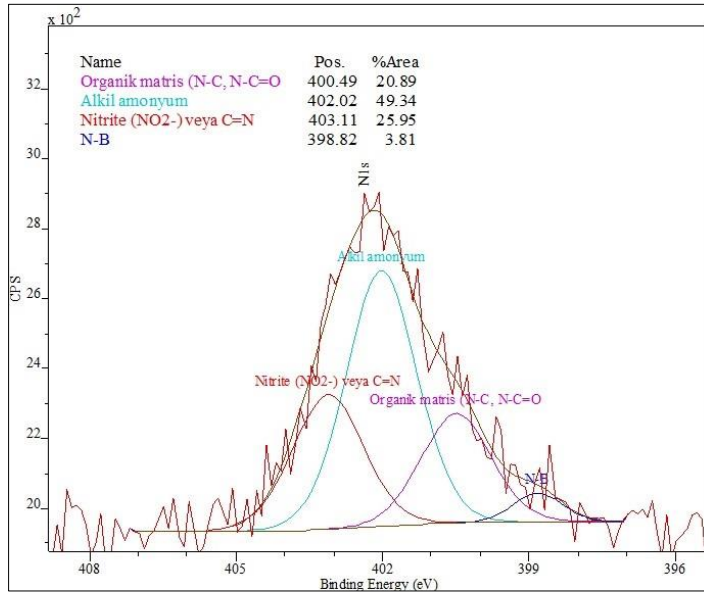
# EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.9'da verilmiştir.



Şekil 1.9. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

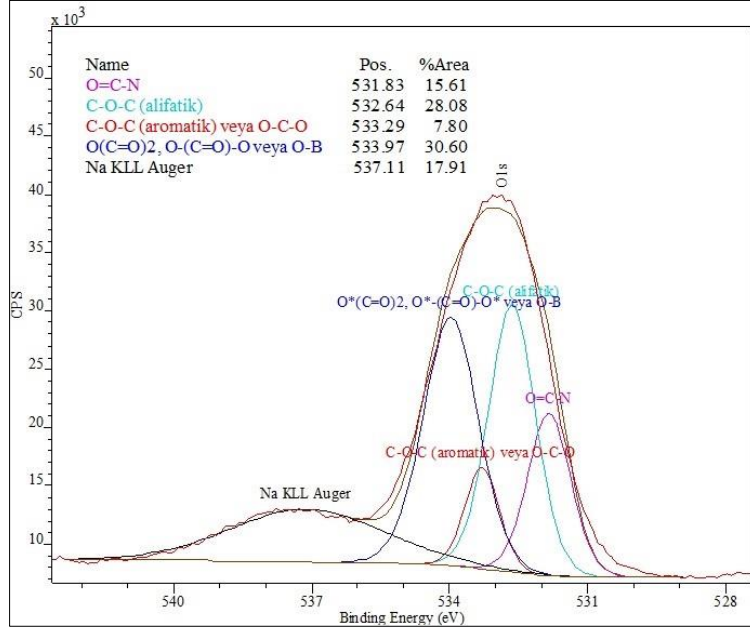
230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.10'da verilmiştir.



Şekil 1.10. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

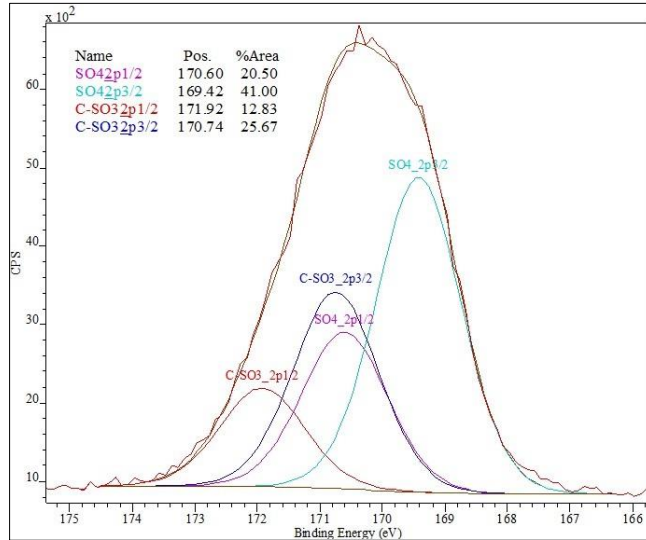
# EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.11. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

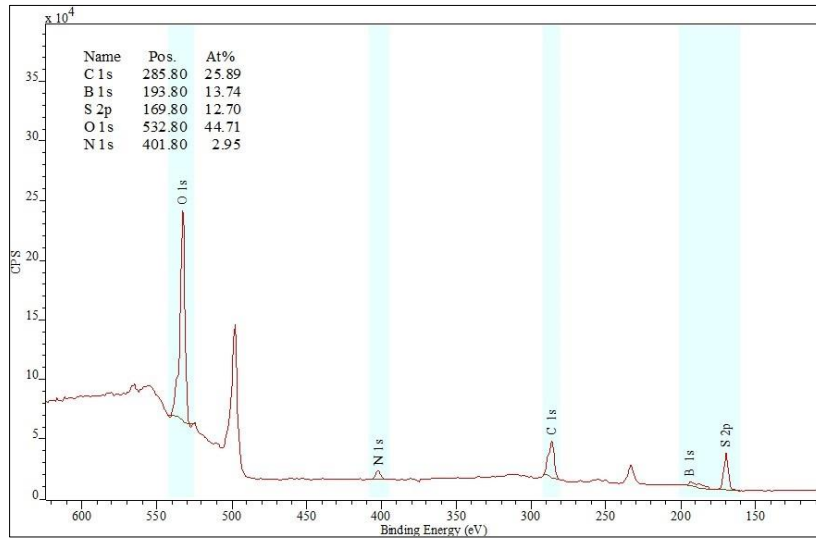
230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait S2p pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.12'de verilmiştir.



Şekil 1.12. 230 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait S2p pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

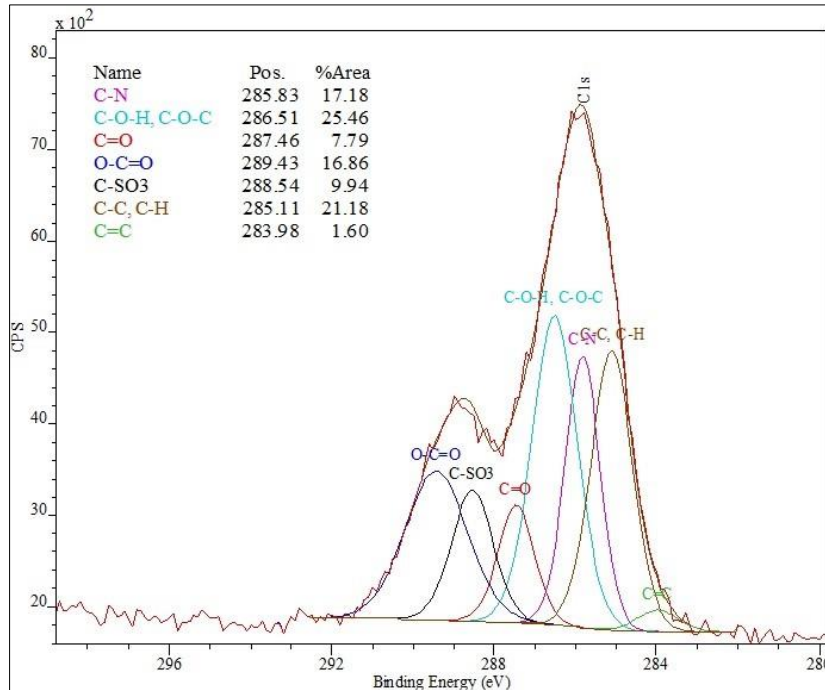
### Ek-1. (devam) XPS analizi sonuçları

270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu Şekil 1.13'te gösterilmiştir.



Şekil 1.13. 270 °C'ta elde edilen BKKNT ürününe ait XPS genel tarama spektrumu

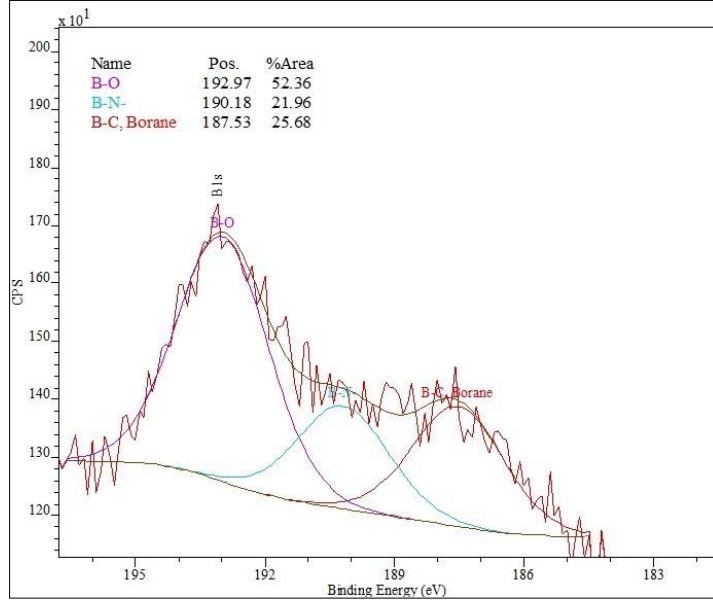
270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.14'te verilmiştir.



Şekil 1.14. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait C1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

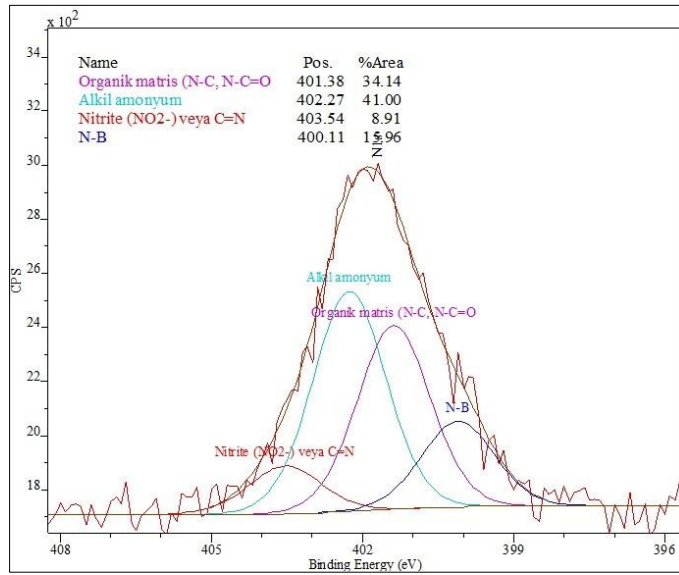
# EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.15'te verilmiştir.



Şekil 1.15. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait B1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

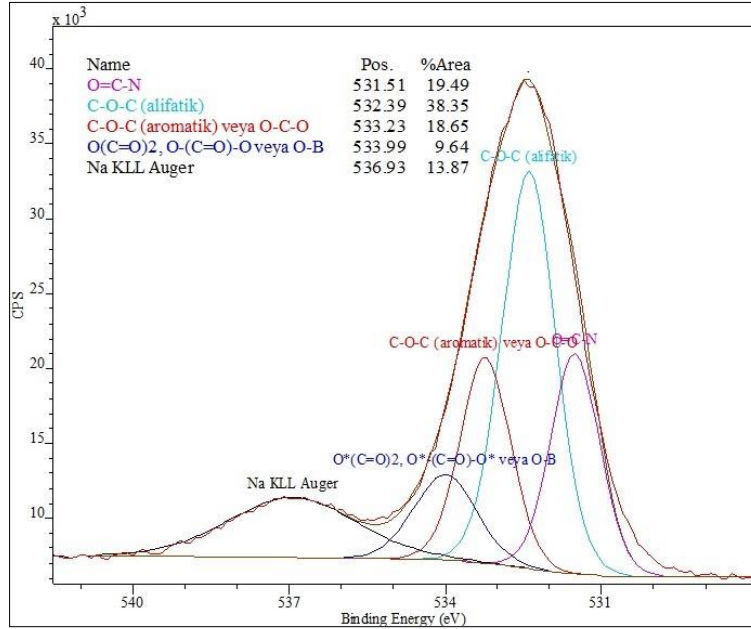
270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.16'da verilmiştir.



Şekil 1.16. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait N1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

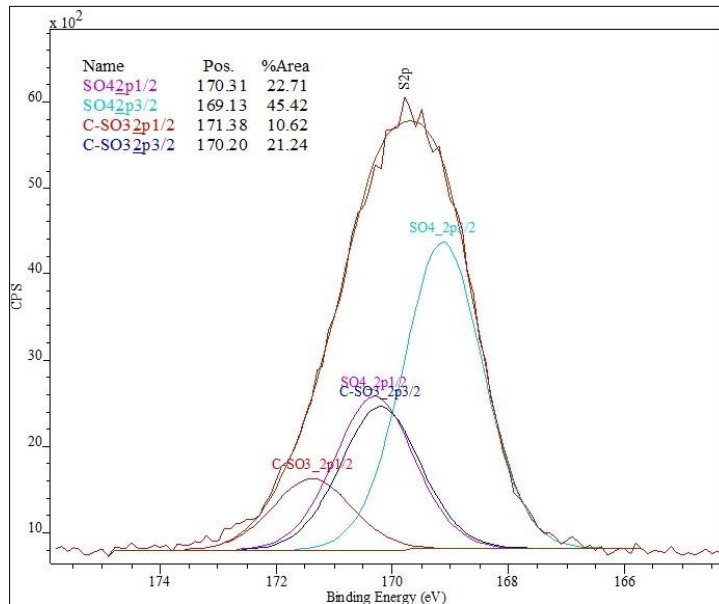
# EK-1. (devam) XPS analizi sonuçları

270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.17'de verilmiştir.



Şekil 1.17. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait O1s pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar

270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait S2p pikinin XPS tarama spektrumu Şekil 1.18'de verilmiştir.



Şekil 1.18. 270 °C'ta sentezlenen BKKNT ürününe ait S2p pikinin bağlanma enerjisine karşılık gelen kaymalar



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZKASAPOĞLU, Sezgin  
 Uyruğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 13.04.1985, BURSA  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 0 (506) 725 51 88  
 e-mail : sezginozkasapoglu@gmail.com



### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                          | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|----------------------------------------|------------------|
| Yüksek lisans | Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü       | Devam Ediyor     |
| Lisans        | Dumlupınar Üniversitesi / Kimya Bölümü | 2009             |
| Lise          | Bursa Anadolu Erkek Lisesi             | 2003             |

### İş Deneyimi

| Yıl        | Yer                                     | Görev    |
|------------|-----------------------------------------|----------|
| 2016-Halen | Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü          | Kimyager |
| 2013-2016  | Türkiye İş Kurumu-Şişli Hizmet Merkezi  | Memur    |
| 2011-2013  | MG Med. Tıbbi Sarf Malz. Tic. Ltd. Şti. | Kimyager |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

- Özkasapoğlu, S., Çelikkan, H. ve Karaman, C. T. (2019, 7-8 Kasım). *Bor katkılı karbon nanodot sentezi, karakterizasyonu ve hücre uygulamaları*. Ulusal Spektroskopi Kongresinde sunuldu, Ankara.

### Hobiler

Spor yapmak, kitap okumak.



*GAZİ GELECEKTİR..*