

**KANDA SİYANÜR TAYİNİ İÇİN FLORESAN ALTIN
NANOKÜMELER İLE KOMBİNE MİKROAKIŞKAN
TABANLI BİR PLATFORM TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ**

**DESIGN AND DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC-
BASED PLATFORM, COMBINED WITH FLUORESCENT
GOLD NANOCLOUDS FOR CYANIDE DETECTION IN
BLOOD**

UĞUR AYDIN

DOÇ. DR. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Sevgili Eşim Miray'a

ÖZET

KANDA SİYANÜR TAYİNİ İÇİN FLORESAN ALTIN NANOKÜMELER İLE KOMBİNE MİKROAKIŞKAN TABANLI BİR PLATFORM TASARIMI VE GELİŞTİRİLMESİ

UĞUR AYDIN

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Memed DUMAN

Temmuz 2020, 121 sayfa

Siyanür birçok evsel gıda ve üründe bulunabileceği gibi özellikle endüstride kullanılan birçok sentetik malzemenin yanma ürünleri olarak da ortaya çıkmaktadır. Özellikle birçok endüstri veya ev yangınında siyanür içeren bileşiklerin yanması sonucu ortaya çıkan hidrojen siyanür (HCN) gazından zehirlenme ile karbonmonoksit (CO) zehirlenmesi arasında ayrımın çok kolay yapılamadığı, teşhis ve buna bağlı tedavinin uygulanmasında zorluklar yaşandığı ve birçok can kaybının yaşanabildiği literatür kaynaklarında yer almaktadır. Siyanür içeren maddelerin ağız yoluyla alınması, solunması ve deriden emilimi sonucunda birçok toksik etki meydana gelmektedir. Siyanürün yarılanma ömrü kısa olduğundan, tedavi için teşhis hızı da çok büyük önem arz etmektedir. Günümüzde kan ve idrar bazlı siyanür tayini çalışmaları bulunmakta ancak hem örnek saklama hem de nakliye, maliyet ve analiz süreleri bakımından yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple çok kısa süre içerisinde maruz kalan kişiden siyanür teşhisine ve maruz kalan siyanür derişiminin (konsantrasyonunun) ölçülmesine olanak sağlayacak bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu sebeple tez kapsamında, floresan altın nanokümelerin (AuNCs) siyanür varlığında sönümlenme etkisine dayanan ve insan tam kan plazmasından uygun maliyetli ve hızlı kolorimetrik siyanür tayini yapılabilen mikroakışkan bir sistem tasarlanmış ve üretilmiştir. AuNC'ler ve siyanür arasındaki Elsner reaksiyonu, diğ r metal iyonlarının ve tuzlarının aksine siyanür için yüksek seçicilik sağlamaktadır. 200  m ve 500  m kanallara sahip çok katmanlı bir mikroakışkan kompakt disk (CD) ve insan tam kanından hızlı plazma ayırıştırma işlemi için gerekli 500 RPM ve 5000 RPM dönme hızı aralığına sahip Arduino Uno tabanlı bir taşınabilir santrifüj cihazı da yine tez kapsamında tasarlanmış ve üretilmiştir. CD'nin dönme hızını kontrol etmek için gerekli yazılım da ayrıca geliştirilmiştir.

Bir akıllı telefon ve ticari/ticari olmayan kullanımlar için ücretsiz sunulan bir cep telefonu uygulaması yardımı ile insan kan plazmasında siyanür tespiti için yeni bir kolorimetrik tayin yöntemi geliştirilmiştir. Sistem, insan kan plazmasındaki siyanürü, literatürde güvenli ve tehlikeli aralık olarak tanımlanan 0,1 mg/L ile 5 mg/L arasındaki derişim aralığında tespit edebilmektedir. Tez  alışmaları sonucunda ortaya çıkarılan, insan kan plazmasından son derece seçici, hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde siyanür tayini yapabilen AuNC bazlı mikroakışkan sistem, geleneksel siyanür tespit sistemlerine güçlü bir alternatif olacaktır.

Anahtar Kelimeler: floresan sensör, altın nanokümeler, siyanür tespiti, insan kan plazması, kolorimetrik tayin, mikroakışkan sistemler.

ABSTRACT

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A MICROFLUIDIC-BASED PLATFORM, COMBINED WITH FLUORESCENT GOLD NANOCLOUDS FOR CYANIDE DETECTION IN BLOOD

UĞUR AYDIN

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine

Division

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Memed DUMAN

July 2020, 121 pages

Cyanide can be found in many household foods and products, as well as the combustion products of many synthetic materials, especially used in industry. The distinction between poisoning from carbon monoxide (CO) and hydrogen cyanide (HCN) caused by the burning of cyanide-containing compounds, especially in many industrial or household fires, is not easily to detect. Due to difficulties in diagnosis and application of treatment related to the detection on time, many casualties may occur as described in literature. Many toxic effects occur as a result of oral intake, inhalation and absorption of cyanide-containing substances. Because of the half-life of cyanide is short, the rate of diagnosis for treatment has also a great importance. There are currently blood and urine-based cyanide determination methods, but they are insufficient in terms of both sample storage and transportation, cost and analysis times. For this reason, there is a need for a system that will allow rapid diagnosis of cyanide from the exposed person and to measure the concentration of exposed cyanide level.

A cost-effective and rapid microfluidic platform for colorimetric cyanide detection in human whole blood plasma based on quenching effect of fluorescent gold nanoclusters (AuNCs) in the presence of cyanide has been designed and developed within the scope of the thesis. Elsner reaction between AuNCs and cyanide provides high selectivity in contrast to other metal ions and salts. A microfluidic multi layer compact disc (CD) with 200 μm and 500 μm channels and an Arduino Uno based portable centrifuge device which has rotational speed range between 500 RPM and 5000 RPM for rapid plasma separation from whole human blood were also designed and developed in this study. A software for controlling the rotational speed of CD was also developed.

With the help of a smart phone and a mobile application which is free for commercial and non-commercial use we represent a novel colorimetric method for detection of cyanide in human blood plasma. The system can detect cyanide in human blood plasma in the concentration range between 0,1 mg/L and 5 mg/L which is described safe and dangerous interval in the literature. We believe that a highly selective, rapid and cost effective AuNCs based centrifugal microfluidic cyanide detection system in human blood plasma which is reported in this study can be an alternative to conventional cyanide detection systems.

Keywords: fluorescent sensor, gold nanoclusters (AuNCs), cyanide detection, human blood plasma, colorimetric detection, microfluidic systems.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman yakın ilgisini, alakasını hissettiğim ve hem yüksek lisans hem de doktora çalışmalarım boyunca birlikte uyum içinde çalıştığımız değerli danışman hocam Doç. Dr. Memed Duman'a, tez ve tez harici çalışmalarına her zaman katkı sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak ve Doç. Dr. Çağlar Elbüken'e, tez çalışmalarına katkıda bulunan ve uzun yıllardır birlikte çalıştığımız değerli arkadaşlarım Emre Kazancı, Melih Zeki Yıldırım ve Dr. Tayfun Vural'a, sabır ve destekleri için iş arkadaşım Ece Umay'a, her an yanımda olan ve tüm gücüyle beni destekleyen çok sevdiğim eşim Miray'a ve doğduğum günden beri her konuda maddi ve manevi desteklerini veren, bana her zaman inanan değerli aileme,

teşekkür ederim...

Uğur AYDIN

Temmuz 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siyanür Zehirlenmesi	3
2.2. Tarihsel Kullanımı	3
2.2.1. Siyanürün Keşfi ve Antik Zamanlardan Yakın Tarihe Kullanımı	3
2.2.2. İntihar Amaçlı Kullanımı	4
2.2.3. Siyanür Kaynakları ve Kazara Zehirlenmeler	4
2.3. Siyanür Zehirlenmesinin Biyokimyası	6
2.3.1. Siyanür Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği	8
2.3.2. Toksisite	8
2.4. Siyanür ve Siyanür Metabolitlerinin Tespiti	8
2.5. Floresan Altın Nanokümeler: Sentez ve Biyolojik Uygulamaları	13
2.5.1. Floresan AuNC'lerin Hazırlanması	14
2.5.1.1. Kimyasal İndirgeme	14
2.5.1.2. Fotoindirgeme	17
2.5.1.3. Biyoindirgeme	17
2.5.1.4. Floresan AuNC'lerin Fonksiyonelleştirilmesi	18
2.5.2. Floresan AuNC'lerin Biyomedikal Uygulamaları	19
2.5.2.1. Biyoetiketleme	19

2.5.2.2. Biyotalgılama	20
2.5.2.3. Biyogörüntüleme	21
2.5.2.4. Gen ve siRNA Taşınımı	22
2.5.2.5. İlaç Taşınımı ve Kontrollü Salım	22
2.5.2.6. Radyasyon Tedavisi	23
2.5.2.7. Fotodinamik Tedavi	23
2.6. CD Üzeri Laboratuvar (Lab-on-a-CD/ Lab-on-a-Disk) Teknolojisi: Tam Entegre Moleküler Tanı Sistemi	24
2.6.1. LoCD Sistemlerinin Fiziksel Altyapısı	24
2.6.2. CD/Disk Üretimi	26
2.6.3. Sıvı İletimi Teknikleri	26
2.6.3.1. Valf Teknikleri	26
2.6.3.1.1. Pasif Valfler	28
2.6.3.1.2. Santifüjal-Pnömatik Sifon Valfler	28
2.6.3.1.3. Pasif Pnömatik Valfler	29
2.6.3.1.4. Aktif Valfler	30
2.6.3.1.4.1. Parafin Mum Valfleri	30
2.6.3.1.4.2. Aktif Pnömatik Valfler	30
2.6.3.1.4.3. Lazerle Çalışan Valfler	30
2.6.3.1.4.4. Manyetik Valfler	30
2.6.3.1.5. Yarı Aktif Valfler	31
2.6.3.1.5.1. Çözünebilir Film Valfler	31
2.6.3.1.5.2. Kağıt Valfler	31
2.7. Portatif Bir Santrifüj Cihazı İçin Temel Presipler	31
2.8. Karakterizasyon Teknikleri	34
2.8.1. Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu (HR-TEM)	34
2.8.2. Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (ATR - FTIR)	35
2.8.3. UV Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis)	35
2.8.4. Color Grab	35
2.8.5. MALDI-TOF-MS Spektrometre Analizleri	36
2.8.6. UV Işık Kaynağı Altında Emisyon	36
2.8.7. Akıllı Telefon	36
2.8.8. pH Metre	37

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1. Materyal ve Yöntemler	38
3.2. BSA Stabilize AuNC'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	39
3.3. Sönümlenme Mekanizmasına pH ve Derişimin Etkisi	40
3.4. Siyanür ve Farklı Maddelerin Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi ve Sistemin Seçiciliğinin İncelenmesi	40
3.5. AuNC-Siyanür Spesifitesinin İncelenmesi.....	41
3.6. Siyanür Ölçüm Limiti ve Ölçüm Doğruluğunun İncelenmesi	41
3.7. Color Grab Renk Değişimi İncelenmesi	41
3.8. Portatif Santrifüj Cihazının Tasarımı ve Üretimi	42
3.9. Hızlı Plazma Ayrımı için Çok Katmanlı Mikroakışkan CD/Disk Tasarımı	46
3.10. Lab on a CD/Disk Üzerinde Siyanür Denemeleri	48
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. BSA Stabilize AuNC'lerin Karakterizasyonu	49
4.1.1. BSA Stabilize AuNC'lerin HR-TEM Analizleri	50
4.1.2. BSA Stabilize AuNC'lerin ATR-FTIR Analizleri.....	51
4.2 Siyanür ve 13 Farklı Anyonun Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi ve Sistemin Seçiciliğinin İncelenmesi	51
4.2.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi.....	52
4.2.2. Seçicilik Analizi.....	53
4.2.3. UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işıma Şiddeti Analizi	53
4.3. Siyanür, 14 Farklı Metal İyonu ve Metal İyonlarından Oluşan Karışımın Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi	54
4.3.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi.....	55
4.3.2. Seçicilik Analizi.....	56
4.3.3. UV Işık Kaynağı Altında Floresan Şiddeti Analizi	57
4.4. AuNC-Siyanür Etkileşimi MALDI-TOF-MS Karakterizasyonu	57
4.5. Siyanür Ölçüm Limiti ve Ölçüm Doğruluğu Karakterizasyonu.....	59
4.5.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi.....	60
4.5.2. Stern-Volmer Analizi	61
4.6. Sönümlenme Mekanizması üzerinde pH ve Derişim Etkisi Karakterizasyonları	62
4.6.1. AuNC Derişim Analizleri.....	62

4.6.2. Farklı pH değerlerinde AuNC Derişimleri ile Siyanür Etkileşimi	
Analizleri.....	63
4.6.2.1. 1:1 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis	
Spektroskopi Analizi.....	64
4.6.2.2. 1:10 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis	
Spektroskopi Analizi.....	66
4.6.2.3. 1:100 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis	
Spektroskopi Analizi.....	67
4.7. Color Grab Renk Farkı Karakterizasyonu	68
4.7.1. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M CN ⁻ ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi L*a*b*	
Değerleri.....	69
4.7.2. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M CN ⁻ ile Etkileşen 1:10 AuNCs Çözeltisi L*a*b*	
Değerleri.....	70
4.7.3. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10 ⁻⁶ M CN ⁻ ile Etkileşen 1:100 AuNCs Çözeltisi L*a*b*	
Değerleri.....	71
4.8. Kan Deneyleri.....	74
4.8.1. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile	
Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri.....	75
4.8.2. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile	
Etkileşen 1:10 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri.....	77
4.8.3. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile	
Etkileşen 1:100 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri.....	79
4.9. Tasarımı ve Üretimi Yapılan Portatif Santrifüj Cihazının Karakterizasyonu	82
4.10. Hızlı Plazma Ayrımı için Tasarlanan ve Üretilen Çok Katmanlı Mikroakışkan	
CD'lerin Karakterizasyonu.....	85
4.10.1. CD Deneme - 1	85
4.10.2. CD Deneme - 2	86
4.10.3. CD Deneme – 3.....	87
4.10.4. CD Deneme – 4.....	88
4.11. Lab on a CD/Disk Üzerinde Siyanür Denemeleri	88
4.11.1. CD üzerinde 1:1 AuNC – Kan – Siyanür Etkileşimi	89
4.11.2. UV Işık Kaynağı Altında CD üzerinde 1:1 AuNC – Kan – Siyanür	
Etkileşimi Analizleri	92

4.11.2.1. 0,1 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri	94
4.11.2.2. 1 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri	95
4.11.2.3. 3 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri	96
4.11.2.4. 5 mg/L CN ⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri	97
5. YORUM.....	100
6. KAYNAKLAR.....	102
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	120
ÖZGEÇMİŞ	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Portatif Santrifüj Cihazı İçin Kullanılan Devre Şeması.....	43
Şekil 4.1. BSA Stabilize Floresan AuNC'lerin a) 10 nm ve 5 nm (İç Resim) Skalalarında HR-TEM Görüntüleri İle b) Gün Işığında ve c) UV Işık Kaynağı Altında Görüntüleri.....	50
Şekil 4.2. BSA Stabilize Floresan AuNC'lerin ATR-FTIR Spektrumları.....	51
Şekil 4.3. AuNC ve 100×10^{-6} M (S^{2-} , CO_3^{2-} , NO_2^- , Cl^- , NO_3^- , $EDTA^{2-}$, Ac^- , N_3^- , PO_4^{3-} , Sitrat, $C_2O_4^{2-}$ ve F^- , SO_4^{2-} Anyonları) İle 5×10^{-6} M (CN^-) (yeşil grafik) Varlığında AuNC'lere Ait UV Absorbans Spektrumları.....	52
Şekil 4.4. AuNC'lerin 5×10^{-6} M Derişimde CN^- ve 100×10^{-6} M Derişimlerde 13 Farklı Anyona Karşı Seçiciliği.....	53
Şekil 4.5. AuNC ve 5×10^{-6} M Derişimde CN^- ile 100×10^{-6} M Derişimlerde 13 Farklı Anyon Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.....	54
Şekil 4.6. AuNC ve PDCA (2 mM), BSA (0,4 mg/mL) ve GSH (0,4 mM) Varlığında ve Yokluğunda AuNC'ler ile 5×10^{-6} M Cu^{2+} Etkileşimi.....	54
Şekil 4.7. AuNC ve 5×10^{-6} M (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}), 5×10^{-5} M Metal İyonlarından Oluşan Karışım (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) ve 5×10^{-6} M CN^- (yeşil grafik) Varlığında AuNC'lere Ait UV Absorbans Spektrumları.....	55
Şekil 4.8. AuNC'lerin 5×10^{-6} M Derişimlerde CN^- ve Farklı Metal İyonları ile 5×10^{-5} M Derişimde Metal İyonlarından Oluşan Karışıma Karşı Seçiciliği.....	56
Şekil 4.9. 5×10^{-6} M Derişimlerde 14 Farklı Metal İyonu ve 5×10^{-5} M Derişimde Metal İyonlarının Karışımından (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) oluşan Çözeltiler Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.....	57
Şekil 4.10. BSA'ya Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu.....	58
Şekil 4.11. BSA Stabilize AuNC'lere Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu (Çözelti İçerisinde Yer Alan Eser Miktarda Fazla BSA, 66,6 kDa'da Bir Omuz Oluşturmaktadır).....	58
Şekil 4.12. Diyaliz Membranı İçerisinde Siyanür İle Etkileştirilmiş BSA Stabilize AuNC'lere Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu.....	59

Şekil 4.13. AuNC ve (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10) $\times 10^{-6}$ M Derişimlerde Siyanür İle Etkileşen AuNC'lere ait Absorbans Spektrumları.	60
Şekil 4.14. Farklı Derişimlerde Siyanür İle Etkileşen AuNC'lerin Absorbans Şiddet Değişimleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).	61
Şekil 4.15. 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC'lerin Absorbans Spektrumları ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	62
Şekil 4.16. pH: 7,4'de 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC'lerin Absorbans Spektrumları ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	63
Şekil 4.17. pH: 12'de 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	64
Şekil 4.18. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) $\times 10^{-6}$ M) İle Etkileşen 1:1 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).	65
Şekil 4.19. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) $\times 10^{-6}$ M) İle Etkileşen 1:10 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).	66
Şekil 4.20. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) $\times 10^{-6}$ M) İle Etkileşen 1:100 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).	67
Şekil 4.21. a) 1:1, b) 1:10 ve c) 1:100 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	68
Şekil 4.22. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 $\times 10^{-6}$ M CN ⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	69
Şekil 4.23. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 $\times 10^{-6}$ M CN ⁻ İçeren 1:10 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	70
Şekil 4.24. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 $\times 10^{-6}$ M CN ⁻ İçeren 1:100 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	71
Şekil 4.25. 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	72
Şekil 4.26. 1:10 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	72
Şekil 4.27. 1:100 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	73

Şekil 4.28. 1:1 AuNC, 1:1 AuNC + CN ⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	74
Şekil 4.29. 1:10 AuNC, 1:1 AuNC + CN ⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	74
Şekil 4.30. 1:100 AuNC, 1:1 AuNC + CN ⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.	75
Şekil 4.31. a) 1:1 AuNC, 1:1 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN ⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	75
Şekil 4.32. a) 1:10 AuNC, 1:10 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN ⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	77
Şekil 4.33. a) 1:100 AuNC, 1:10 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN ⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.	79
Şekil 4.34. 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	80
Şekil 4.35. 1:10 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	81
Şekil 4.36. 1:100 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür içeren Plazma Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	81
Şekil 4.37. Portatif Santrifüj Cihazının 3 Boyutlu Tasarımı.	82
Şekil 4.38. Portatif Santrifüj Cihazının Üretim Sonrası Görüntüsü.	83
Şekil 4.40. Harici Güç Kaynağı ile Motora Uygulanan Voltaj Karşısında Elde Edilen RPM Değerleri.	84
Şekil 4.41. Portatif Santrifüj Cihazı İçin Kullanılan Güç Kaynağı ile Motora Uygulanan Voltaj Karşısında Elde Edilen RPM Değerleri.	85
Şekil 4.42. Geniş Ayrıştırma Odacıklı CD.	86
Şekil 4.43. Tikotropik Jel İçeren CD.	87
Şekil 4.44. Dolum Kanalı Pnömatik Odacığa Bağlı CD.	87

Şekil 4.45. Dolum Kanalı Ayırıştırma Odacığına Bağlı CD.....	88
Şekil 4.46. Kullanılan 5 Katmanlı Mikroakışkan CD.	89
Şekil 4.47. a) 1:1 AuNC ve Sırasıyla (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür İçeren Kan Örneklerinin Santrifüj Edildiği CD'nin Genel Görüntüsü, b) Kullanılan Mikroakışkan CD Üzerinde Yer Alan Alanlar ve c) Kullanılan CD üzerinde Plazma Ayırıştırma İşlemi İçin Uygulanan RPM ve Zaman Aralıkları.	90
Şekil 4.48. Mikroakışkan CD Üzerinde Gerçek Zamanlı Plazma Ayırma İşlemi.	91
Şekil 4.49. 1:1 AuNC İçeren ve Sırasıyla (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür İçeren Kan Örneklerinin Santrifüj Edildiği CD'nin UV Işık Kaynağı Altında Genel Görüntüsü.	93
Şekil 4.50. CD Üzerinde a) 0,1 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.	94
Şekil 4.51. CD Üzerinde a) 1 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.	95
Şekil 4.52. CD Üzerinde a) 3 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.	96
Şekil 4.53. CD Üzerinde a) 5 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.	97
Şekil 4.54. CD üzerinde 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Pnömatik Sifon Valf İçeren Mikroakışkan CD Sistemi İçin Hesaplanan Değerler.....	47
Çizelge 4.1. 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC Çözeltileri İçin $L^*a^*b^*$ Renk Değerleri.....	68
Çizelge 4.2. 1:1 AuNC Çözeltisi İçin $(0.25, 1, 5 \text{ ve } 10) \times 10^{-6} \text{ M CN}^-$ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	69
Çizelge 4.3. 1:10 AuNC Çözeltisi İçin $(0.25, 1, 5 \text{ ve } 10) \times 10^{-6} \text{ M CN}^-$ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	70
Çizelge 4.4. 1:100 AuNC Çözeltisi İçin $(0.25, 1, 5 \text{ ve } 10) \times 10^{-6} \text{ M CN}^-$ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	71
Çizelge 4.5. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	76
Çizelge 4.6. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:10 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	78
Çizelge 4.7. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:100 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	80
Çizelge 4.8. 0,1 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	94
Çizelge 4.9. 1 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	95
Çizelge 4.10. 3 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	96
Çizelge 4.11. 5 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	97
Çizelge 4.12. Mikroakışkan CD Üzerinde Kullanılan Siyanür Derişimlerine Karşı Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.....	98

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Au	Altın
CN ⁻	Siyanür
K_{SV}	Stern-Volmer Sönüm Kat Sayısı
ΔE^*	Renk Farkı

Kısaltmalar

AuNCs	Altın Nanokümeler
BSA	Bovin Serum Albumin
CD	Kompakt Disk
FTIR	Fouirer Transform Infrared Spektroskopi
GSH	Glutasyon
HR-TEM	Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu
L*a*b*	Color Grab Renk Değerleri
LoC	Çip Üstü Laboratuvar
LOD	Tespit Limiti
LoCD	CD/Disk Üstü Laboratuvar
PDCA	2,6-piridindikarboksilik asit
RPM	Dakikada Dönüş Sayısı
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, floresan altın nanokümelerin (AuNCs) çok küçük boyutları (1-3 nm), biyouyumlulukları ve fotostabiliteleri sayesinde birçok sensör sisteminde kullanımına olanak sağlamıştır. Bu sistemler içerisinde metal, ağır metal ve metal tuzları gibi toksik etkiye sahip olan veya olabilecek malzemelerin tayinine olanak sağlayan biyo algılayıcı sensörlerde floresan etiketler olarak AuNC'ler sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok evsel ve/veya endüstriyel malzemede ve bunların yanma ürünlerinde bulunabilen siyanür ve altın arasındaki benzersiz etkileşim sayesinde, siyanürün seçici tayinine yönelik sensör çalışmaları literatürde yer almaktadır.

Siyanür vücutta depolanmaz, kanserojen değildir. Günümüzde en çok sigara dumanı ve yangınların dumanının solunması ile maruz kalınmaktadır. Siyanür kanda bulunan methemoglobin'e geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanarak etkinlik gösterir. Bu özelliği kanın dokulara oksijen perfüzyonunu sağlayamaması sonucu hipoksiye ve sonuçta hipoksik şok ve ölüme neden olur. Oksijen mevcuttur fakat kanda taşınmaz. Vücut adeta oksijen havuzunda boğulur.

Siyanür tayini için kullanılan geleneksel yöntemler maliyet, zaman ve analiz açısından getirdiği yükler sonucunda istenilen hızlarda yapılamamakta ve siyanüre maruz kalan kişilerin tedavisinde aksaklıklar ve gecikmeler yaşanmaktadır. Bu sebeple daha hızlı ve maliyet etkin bir tayin sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak oluşturulacak yeni sistemin de seçicilik ve hassasiyet açısından geleneksel tayin sistemlerine güçlü bir alternatif olması beklenmektedir. Kanda yapılacak siyanür tayinlerinde plazma tiyosiyanat ve oksihemoglobinden yapay siyanür oluşumu nedeniyle tam kandan siyanür tespiti yerine, plazmadan siyanür tespitinin daha güvenilir sonuçlar verdiği literatürde yer almaktadır. Bunun için öncelikle kanın bileşenlerine ayrıştırılması gerekmektedir. Geleneksel olarak kan ve plazma ayrıştırma işlemi hastane ortamında, geniş çaplı ve yüksek hızlı santrifüj cihazları ile gerçekleştirilir. Bu işlem zaman alıcıdır ve eğitimli bir laboratuvar teknisyeni tarafından yapılması gereken prosedürler içerir. Santrifüjal veya kompakt disk

(CD) tabanlı mikroakışkan sistemler; çökmeye ve sıvının yönlendirilmiş bir şekilde hareket etmesine dayalı bir tekniğin minyatürize edilmesi, otomasyon ve Kompakt Disk (CD) üzerinde kurulan sistemin çok katmanlı olması gibi sebeplerden dolayı hem analiz için örnek hazırlama hem de kullanılacak örnek miktarı açısından kolaylıklar sunar. Kan bileşenleri arasındaki yoğunluk ve parçacık boyutu farklarından yararlanarak, kanın hücresel bileşenleri ve plazma kısmı yüksek saflıkta ayrıştırılır.

Tez kapsamında siyanür içeren tam kandan ayrıştırılan plazma sıvısı floresan AuNC'ler ile etkileştirilerek floresan şiddetlerde meydana gelen sönümlenme değişimleri bir akıllı telefon ve telefona yüklenen, renk farklılıklarına ait değişimleri veren bir uygulama ile kolorimetrik olarak tayin edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında standart prosedürün aksine küçük boyutlu, CD tabanlı bir mikroakışkan sistem tasarlanması ve kanın bileşenlerine ayrılması işlemi için gerekli zaman ve yüksek maliyet kısıtlamalarının ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve literatürde yer alan bilgiler ile karşılaştırıldığında tez kapsamında siyanürün hızlı, seçici ve hassas tayini için tasarlanan ve üretilen sistemin gelecek uygulamalar için de yol gösterici olacağı bir gerçektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siyanür Zehirlenmesi

Siyanür binlerce yıldır zehir olarak kullanılmaktadır. Yüksek doz siyanürün etkileri hızlıdır ve ölüm dakikalar içinde gerçekleşir. Panzehirler zamanında uygulanırsa etkilidirler ancak panzehirlerin yüksek doz maruziyetlerde gereken zamanda bulunma olasılığı son derece düşüktür. Bazı gıdalarda ve sentetik malzemelerin yanma ürünlerinde de bulunan siyanür ayrıca endüstride de yaygın olarak kullanılır.

2.2. Tarihsel Kullanımı

2.2.1. Siyanürün Keşfi ve Antik Zamanlardan Yakın Tarihe Kullanımı

Eski Mısır'dan bu yana, acı badem, defne kirazı (*Prunus laurocerasus*) yaprağı, şeftali çekirdekleri ve manyok gibi siyanür türevleri içeren bitkiler ölümcül zehir olarak kullanılmıştır [1, 2]. Eski Mısırlıların adli infazlarında kullanılan şeftali çekirdekleri Paris Louvre Müzesi'nde sergilenmektedir ve Mısır papirüslerinde bu infaz “şeftali cezası” şeklinde tanımlanmaktadır [2]. Romalılar da defne kirazı ağacı yapraklarını bir infaz yöntemi olarak (“kiraz ölümü” olarak adlandırılır) kullanmışlardır. Roma imparatoru Nero, aile üyelerini ve memnun olmadığı kişileri zehirlemek için defne kirazı suyunu kullanmıştır. III. Napolyon, Fransız-Prusya Savaşı sırasında askerlerinin süngülerinde daha ölümcül olabilmesi adına siyanür kullanılmasını emretmiştir. Ayrıca Napolyon'un da siyanürden öldüğü öne sürülmektedir [3]. Siyanür zehirlenmesi, ilk olarak 1679'da Wepfer tarafından, acı badem özütü uygulamasının etkileri ile ilgili çalışmasında tanımlanmıştır [2]. 1731'de Maddern, ağız yoluyla, rektuma veya enjeksiyonla köpeklerle verilen defne kirazı suyunun hızla köpekleri öldürdüğünü göstermiştir [4]. Siyanür içeren maddeler yüzyıllardır zehir olarak kullanılmasına rağmen, İsveçli eczacı ve kimyager Carl Wilhelm Scheele'nin prusya mavisi boyasını seyreltik sülfürik asitle ısıtarak asidik ve suda çözünebilen bir gaz olan hidrojen siyanür (HCN) elde ederek siyanürü izole ettiği tarih olan 1782 yılına kadar siyanür tanımı yapılamamıştır. Scheele'nin Berlin mavi asidi olarak isimlendirdiği bu yeni asit daha sonraları prusik asit olarak adlandırılmış ve günümüzde ise mavi anlamına gelen yunanca bir sözcük olan “kyanos” yani siyanür olarak adlandırılmaktadır. Scheele'nin keşfi birkaç yıl sonra, tat testi ve HCN koklama gibi güvensiz deneysel uygulamalara girişmekten ve kazara siyanür şişesini kırmaktan hayatına mal olmuştur. 1815 yılında Fransız kimyager Joseph Louis Gay-Lussac siyanür

bileşiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır [2]. Gay-Lussac, badem benzeri bir tadı ve önemli termal stabilitesi olan siyanojen adı verilen renksiz, zehirli bir gaz tespit etti. HCN de dahil olmak üzere asitler üzerinde yaptığı çalışmalar, asitlerin oksijen içermesinin gerekmediğinin farkına varılmasına ve böylece siyanojen parçaların tek tek karbon ve azot atomlarını ayırmadan bileşikten bileşiğe aktarılabilceğinin farkına varılmasına yol açmıştır.

2.2.2. İntihar Amaçlı Kullanımı

Siyanür genellikle bireyler ve gruplar tarafından intihar etmek için de kullanılmıştır [5]. Bu tür olayların en meşhurlarından biri 1978'de Guyana Limanı'nın yakınında, bir kült lideri olan Jim Jones'un takipçileri siyanür ile muamele edilmiş üzüm aromalı bir içecek ile toplu intiharıdır. 900'den fazla çocuk ve yetişkin bu olayda hayatını kaybetmiştir [6].

2.2.3. Siyanür Kaynakları ve Kazara Zehirlenmeler

Siyanürün birçok kimyasal formu olmasına rağmen, HCN (veya siyanür anyonu CN^-) kökeni ne olursa olsun birincil toksik ajandır. Askeri personel ve siviller, yenilebilir ve yenmeyen bitkiler, endüstriyel operasyonlar, yangınlar ve sigara dumanı yoluyla ortak doğal ve antropojenik siyanür kaynaklarına maruz kalabilirler. Devam eden düşük seviyeli siyanür maruziyetleri, biyolojik toleransları aşan miktarları detoksifiye eden reaksiyon yolları ile vücut tarafından yönetilmektedir. Siyanür zehirlenmesi ile ilgili tıbbi bilgilerin çoğu siyanür zehirlenmesine maruz kalan siviller, yangın ve endüstriyel kaza deneyimlerinden oluşmaktadır. Çeşitli araştırmalar, karbon monoksit (CO) ve HCN'nin ev yapılarında yaygın olarak bulunan malzemelerin ana yanma ürünleri olduğunu ve özellikle yüksek sıcaklıklarda ve düşük oksijen varlığında piroliz durumunda yüksek miktarda HCN salındığını bildirmiştir.

Karbon içeren maddelerin yetersiz yanması sonucu yangınlarda CO açığa çıkmaktadır. Azot ve karbon içeren köpük (poliüretan), akrilikler, boyalar, naylon ve plastikler (poliakrilonitriller, poliakrilamidler) ve ayrıca yün, ipek, pamuk, kağıt ve ahşap gibi doğal malzemelerin yanması sırasında HCN oluşabilmektedir. Genel olarak, yangın ortamında azot bileşikleri ne kadar fazla ise, HCN'nin potansiyel salımı o kadar büyük olmaktadır. Polimerlerin giderek yaygınlaşması yangın dumanında HCN ile daha sık karşılaşılması olasılığını artırmaktadır [1,7–9,10–12].

Hem karbon monoksit hem de siyanür zehirlenmesi, mide bulantısı ve kusma dahil olmak üzere gastrointestinal rahatsızlıkların ve baş dönmesi ve baş ağrısı gibi nörolojik işaretlerin bir dereceye kadar kombinasyonuna neden olabilmektedir. Bu bulgular genellikle hafif ila orta şiddette karbon monoksit zehirlenmelerinde görülmektedir. Ayrıca siyanür zehirlenmelerinde de zehirlenmenin erken evresinde bu bulguların görüldüğü rapor edilmiştir [13].

Siyanür seviyeleri ile ilgili epidemiyolojik veriler birçok önyargıyı da beraberinde getirmektedir. Siyanür çok kısa bir yarı ömre sahip olduğundan ve kısa bir süre içinde kan örnekleri nadiren elde edilebildiğinden, ölçülen siyanür derişimleri genellikle hatalı olarak düşük çıkabilmektedir. Örneklenmiş kanın depolanması (saklama sıcaklığı, örnekleme ve test arasındaki süre) ve çeşitli olaya özgü ve mağdurlara özgü faktörlerin (örneğin; karboksihemoglobin doygunluğu, methemoglobin içeriği) etkisi de hataya katkıda bulunabilmektedir [7,14]. CO'nun aksine, kandaki HCN için hızlı bir tespit yöntemi yoktur ve analitik doğrulama yapmak zaman almaktadır. Laboratuvar analizi tanıyı doğrular, ancak laboratuvar sonuçlarını beklemeden tedavi başlamalıdır. Kısa yarılanma ömrü nedeniyle, mümkünse yangın mahallinde kan örneği alınmalıdır. Siyanür derişimleri ile semptomların şiddeti arasındaki ilişkiler; 0.5-1 mg/L aralığındaki derişimler hafif, 1 ila 2 mg/L aralığında orta, 2 ila 3 mg/L aralığında şiddetli ve 3 mg/L'den fazla ise ölümcül olarak kabul edilmektedir. Sistemik siyanür zehirlenmesinin bir göstergesi olarak siyanür soluma derişimini değerlendirmek için çalışmalar da ayrıca gerçekleştirilmiştir [9, 12, 15-17].

HCN, volkanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlar tarafından atmosfere salınır [18-24]. Bununla birlikte, insanlarda ve hayvanlarda siyanür zehirlenmesinin birincil doğal kaynağı bitkilerdir. Yenilebilir meyve ve sebzeler dahil olmak üzere 2.000'den fazla bitki türü, yutulduğunda siyanürü serbest bırakabilen siyanojenik glikozitler içermektedir [21, 25, 26]. Siyanojenik glikozitlerin hızlı hidrolizi ve HCN salımı, bitki hücre yapısı bozulduğunda ortaya çıkar. Bu nedenle yanlış işlenmiş siyanojenik glikozitler içeren bitkilerin tüketimi sonrası vücutta HCN salgılanır ve hastalık veya ölümle sonuçlanabilir. Siyanür zehirlenmesine neden olduğu bildirilen bazı yaygın siyanojenik yenilebilir bitkiler arasında manyok, sorgum, tatlı patates, patates, mısır, darı, bambu, şeker kamışı,

bezelye, lima fasulyesi, soya fasulyesi, badem çekirdekleri, limon, mikset limonu, elma, armut, şeftali, yabani kiraz, kayısı, kuru erik ve erik bulunmaktadır [21, 25-33]. Manyok ve sorgum, birçok tropik ülkede yüz milyonlarca insanın temel gıdalarıdır ve bu bölgelerdeki merkezi ve periferik nöropatilerin görülme sıklığı bu bitkiler ile ilişkilendirilmektedir [34]. Bitkilerdeki bilinen siyanojenik glikozitler amigdalin, linamarin, prunasin, dhuririn, lotaustralin ve taksifilin'dir.

Endüstriyel ve tarımsal talebi desteklemek için dünya çapında siyanür üretimi yıllık 2,5 milyon ton civarındadır. Siyanür kullanan endüstrilerde, mesleki maruziyetler öncelikle dermal ve inhalasyon yolları ile gerçekleşmektedir. Endüstriyel olmayıp kazara gerçekleşen klinik öneme sahip maruziyetler tipik olarak plastiklerin yanmasını içeren ticari yangınlarla ilişkilidir [35, 36].

2.3. Siyanür Zehirlenmesinin Biyokimyası

Siyanürün, özellikle ferrik (Fe^{3+}) durumunda demir ve kobalt içerenler olmak üzere çeşitli enzimleri bağladığı ve inaktive ettiği bilinmektedir. Mitokondriyal membranlar içinde bulunan elektron taşıma zincirindeki terminal protein olan sitokrom c oksidazın aktif bölgesine bağlanarak histotoksik oksijensizlik sonucu nihai ölümcül etkisini gösterdiği düşünülmektedir. Bu sayede siyanür, elektronların moleküler oksijene transferini önler. Bu nedenle, kandaki oksijen varlığına rağmen, Adenozin Trifosfat (ATP) oluşumu için kullanılamaz, böylece aerobik hücre metabolizması durdurulur [37, 38]. Hücreler ATP enerji kaynağını glikoliz yoluyla gerçekleştirmeye çalışırlar, ancak bu yöntem de, özellikle metabolik olarak aktif kalp ve beyinde kısa ömürlüdür. Siyanür, hücrelere girmeden önce birkaç işlemle çıkarılabilir. Siyanür, endotel kökenli gevşeme faktörü ile (nitrik oksit olduğu düşünülen) bir kompleks oluşturabilmektedir. Ağır metaller (örneğin; altın, molibden veya kobalt tuzları) veya metal merkezlere sahip organik bileşikler (örneğin; hidrosikobalamin) siyanürü temizleyebilir, hücreye girmeden önce etkili bir şekilde çıkarabilmektedir. Son olarak, albümin enzim benzeri davranış sergileyebilmekte ve siyanürü detoksifiye etmek için elemental bağlı kükürt [39] kullanabilmektedir.

Siyanür, hücreler içinden ise çeşitli işlemlerle çıkarılabilir. Siyanür methemoglobin ile reaksiyona girdiğinde kırmızı kan hücrelerinde siyanometemoglobin üretimi oluşmaktadır. Siyanür detoksifikasyonunda en az dört hücre içi enzim yer almaktadır;

rhodan, merkaptopiruvat sülfürtransferaz, tiyosülfat redüktaz ve sistatyonaz. Siyanür ayrıca 2-aminotiazolin-4-karboksilik asit (ATCA) oluşturmak için sistin ile reaksiyona girmektedir. Oksijen takviyesi, siyanür zehirlenmesinden iyileşmeyi arttırmaktadır ancak bunun gerçekleştiği mekanizma belirsizdir [40].

Siyanür epitelyum yoluyla kolayca yayılabilir. Bu özellik, HCN gazının solunması, siyanür tuzlarının veya siyanojenlerin yutulması veya siyanürün yüksek derişimli çözeltilerinden perkütan emiliminden sonra ölüme yol açabilmektedir. Siyanür atılımının en önemli yolu, daha sonra idrarla atılan tiyosiyanat (SCN^-) oluşumudur [34]. Tiyosiyanat; siyanür, siyanat (CNO^-) veya izosiyanattan daha az doğal bir toksikolojik tehlikeye sahiptir. Tiyosiyanat oluşumu doğrudan rhodanese enzimi tarafından katalize edilir ve dolaylı olarak 3-merkaptopiruvat sülfürtransferaz [41] ve tiyosülfat redüktaz enzimlerinin siyanür ve persülfid kükürt ürünleri arasında kendiliğinden bir reaksiyon yoluyla katalize edilir. Her üç enzimin [42] mekanizmalarının yanı sıra tiyosiyanat oluşumunun [43, 44] farmakokinetiği yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Enzimatik yollar siyanür detoksifikasyonunda etkilidir, ancak yetersiz sülfür donör substratı sebebi ile çok yoğun aşırı doz durumlarında etkinliği kısıtlıdır.

Mitokondriyal sulfurtransferaz reaksiyonları, akut zehirlenmelerin tedavisinde sodyum tiyosülfat uygulanmasından yararlanır. Sistin ve siyanürün ATCA ve totomerini oluşturmak için etkileşimi, siyanür metabolizmasının yaklaşık% 20'sini oluşturmaktadır [45]. Bu yüzde, toksik siyanür dozlarıyla birlikte artmaktadır [46]. Tam olarak bilinmeyen küçük bir metabolizma yolu, siyanürün siyanate dönüştürülmesidir. Kombine olarak, bu metabolik yollar, ortalama insanda (70 kg'lık bir kişide 1.19 mg/dakika), vücut ağırlığının kilogramı başına 0.017 mg siyanürü detoksifiye etmektedir [47, 48]. Siyanür, belirli bir biyolojik etkiye neden olmak için gerekli olan Ct'nin (derişim ve zaman ürünü) çeşitli derişimler ve süreler boyunca sabit olduğunu bildiren Haber'in yasalarına uymayan birkaç kimyasal maddeden biridir. Bu nedenle, LC₅₀ (maruz kalan popülasyonun % 50'si için öldürücü olan buhar veya aerosol maruziyeti) yüksek bir derişime kısa bir maruziyet ile düşük bir derişime uzun maruziyetten doğan etkiler birbirinden farklıdır.

2.3.1. Siyanür Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği

Siyanürün, ilk toksisite döneminde birinci dereceden kinetik sergilediği görülmüştür [43]. Siyanür için dağılım hacmi, kimyasalın kan seviyeleri değiştikçe değişiyor gibi görünmekle birlikte bu değişiklikler muhtemelen molekülün belirgin hücre içi sekestrasyonunu yansıtmaktadır. Hayvan çalışmaları [49, 50], akciğer, kalp ve beyinde bulunan en yüksek doku seviyelerine sahip inhale HCN'nin farklı bir eğilimini göstermektedir. Bu veriler, diğer hayvan çalışmalarından ve bu organların siyanür toksisitesindeki önemini vurgulayan klinik raporlardan gelen kanıtları destekler niteliktedir. Siyanürün yutulması; karaciğerde, inhalasyon maruziyetinden çok daha yüksek etkilere yol açar; bu, adli soruşturmalarda yararlı bir farklılık noktasıdır. Siyanür ayrıca, zehirlenmenin erken evrelerinde vasküler direncin anlaşılmayan bir şekilde artışı [51] ve köpeklerde serebral kan akışında belirgin bir artış da dahil olmak üzere geniş kapsamlı kardiyovasküler etkilere sahiptir [52]. Kemirgen çalışmalarından elde edilen veriler, siyanür tuzunun tek bir akut uygulamasının ölüm veya tam iyileşme ile sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca köpeklerde, tavşanlarda, maymunlarda ve insanlarda yapılan HCN inhalasyon çalışmalarından elde edilen veriler, ölümün 8 güne kadar ertelenebileceğini düşündürmektedir [53, 54]. Siyanür zehirlenmesinin nörolojik sekelleri bir yıla kadar ertelenebilmektedir [2]. Beynin bölgesel duyarlılıklarındaki bu gecikmiş değişikliklerin hipoksik stresden kaynaklandığı düşünülmektedir ve ölümcül karbon monoksit zehirlenmesinden sonra görülenler ile benzerdir.

2.3.2. Toksisite

Diğer ölümcül kimyasal savaş ajanları ile karşılaştırıldığında genellikle çok toksik maddeler olarak kabul edilmesine rağmen, siyanürler en az toksik olanlardır. HCN için LC_{50} 'nin genellikle 2.500 ila 5.000 $g \cdot dk/m^3$ olduğu belirtilmektedir; siyanojen klorür için, yaklaşık 11.000 $mg \cdot min/m^3$ 'dir [55]. (Sinir ajanları için karşılaştırılabilir değerler 10-200 $mg \cdot min/m^3$; kükürt hardalı için, 1.500 $mg \cdot min/m^3$; ve fosgen için 3.000 $mg \cdot min/m^3$ 'tür). İnsanlar için; maruz kalan popülasyonun % 50'si için ölümcül olan (LD_{50}) tahmini intravenöz HCN dozu yaklaşık 1.0 mg/kg 'dır ve derideki sıvı için tahmini LD_{50} yaklaşık 100 mg/kg 'dır.

2.4. Siyanür ve Siyanür Metabolitlerinin Tespiti

Biyolojik sıvılardaki siyanür veya metabolitleri tiyosiyanat ve ATCA'nın belirlenmesi adli tıp, klinik, araştırma veya veterinerlik amaçları için sıklıkla gereklidir. Diğer taraftan

siyanür ve siyanür bileşiklerinin saptanması endüstriyel, çevresel ve araştırma uygulamaları için de son derece önemlidir [18, 45, 56, 57]. Biyolojik örneklerde siyanür ve siyanür metabolitlerinin doğrudan belirlenmesi için uygulanan analiz yöntemleri arasında spektrokimyasal absorpsiyon veya lüminesans yöntemleri [16, 24, 58–94], elektrokimyasal yöntemler [58-66], kılcal elektroforez [67, 68], ve gaz [95-116] veya çeşitli tespit tekniklerine bağlı sıvı kromatografi teknikleri [117-139] yer almaktadır. Biyolojik sıvılardaki siyanür ve siyanür metabolitlerinin saptanmasını inceleyen yüzlerce literatür referansı, bir yöntem seçme zorluğuna katkıda bulunabilmektedir. Ek olarak, literatürde yer alan sayısız belirsizlik ve tutarsızlık, karmaşık bir yöntemin seçimine de sebep olabilmektedir. Bu noktada verilmesi gereken ilk karar siyanürün, metabolitlerinden birinin mi, yoksa her ikisinin de mi aranılacak madde olarak seçileceğine karar verilmesidir. Bu seçimi etkileyen faktörler hücrel absorpsiyon ve detoksifikasyon kinetiği, numune alma ve analiz süresi, numune saklama süresi ve koşulları, numune matrisi, etkileşimler, tespit limitleri, mevcut ekipman ve uzmanlık ile bütçedir.

Antidotal tedaviden önce siyanür ve/veya siyanür metabolitlerinin analitik olarak belirlenmesi, zehirlenmenin şiddetinin ve antidot doz seviyelerine ilişkin değerlendirmelerin daha doğru bir şekilde yapılabilmesini sağlamaktadır (özellikle yüksek dozlarda antidotlar da toksik olabilmektedir) [22, 69, 70]. Bununla birlikte, mevcut hiçbir yöntem, antidotal tedavi uygulanmadan önce test sonuçlarını beklemeyi gerekçe gösterecek kadar basit, doğru ve hızlı değildir (siyanür, analizin gerçekleştirilme süresinden daha hızlı bir şekilde öldürebilir). Siyanür ve metabolitlerinin ölçümü, öldürücü değer altında olduğunda tanı veya tedavi edici değere sahip olabilir; minimal veya orta derecede semptomatik zehirlenmeye maruz kalma ayırıcı tanının bir parçasıdır. Ek olarak siyanür zehirlenmesinin varsayılan bir tanısının doğrulanması veya reddedilmesi için biyolojik numuneler değerlendirilmelidir. Siyanür derişimleri belirlenirken kan tercih edilen biyolojik örnek olmuştur. Siyanür detoksifikasyon işlemleri, metal merkezleri veya hem (heme) birimlerini içeren proteinlere ve enzimlere bağlanma veya diğer uygun hücrel varlıklarda sekestrasyon yoluyla kandan hızla çıkarılır [24, 57, 71-82, 140]. Siyanürün karakteristik özellikleri [83, 84], biyolojik bir örneğin hızlı bir şekilde toplanması ve analizin mümkün olan en kısa sürede yapılması gerektiğini göstermektedir. Siyanür analizi hızlı bir şekilde gerçekleştirilemezse,

biyolojik numunelerin daha sonraki testler için örneklenmesi ve saklanması için aşağıdaki etmenler göz önünde bulundurulmalıdır:

Siyanür derişimlerinin belirlenmesi için kan örneğinin toplanmasında heparinize flakonlar kullanılmalıdır. Heparin ve etilendiamintetraasetat (EDTA) gibi antikoagülanlar içeren kaplar, pıhtılaşmayı önlemeye yardımcı olur ve ayrıca kan alındıktan sonra santrifüj işlemi ardından plazmanın verimli bir şekilde toplanabilmesini sağlar. Yapılan çalışmalar methemoglobine bağlı eritrositlerin siyanür bağlama kapasitesinin sodyum nitrit ilavesi üzerine 89 nM'den 517 nM'ye yükseldiğini göstermiştir [72]. Ancak bazı çalışmalar, plazma tiyosiyanat ve oksihemoglobinden yapay siyanür oluşumu nedeniyle tam kandan siyanür tespiti yerine, plazmadan siyanür tespitinin daha güvenilir sonuçlar verdiğini belirtmektedir [81]. Bununla birlikte, plazmada siyanür kararsızdır ve kan örnekleri aldıktan sonra hızlı bir tespit yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır [86, 141].

Siyanür, fizyolojik pH'ta HCN'nin uçuculuğu nedeniyle buharlaşabilir ve siyanür nükleofilik etkisinin azaltılması gerekmektedir. Sonraki hususlar biyolojik örneklerden buharlaşma ve siyanür kaybını azaltmak ve nükleofilik reaksiyonları önlemek olmalıdır. Sıkıca kapatılmış şişeler, düşük sıcaklık ve koruyucu maddeler kullanmak, siyanür kaybını önlemek için kullanılan yaygın prosedürlerdir. Kauçuk tıpların, gazla temas ettiğinde HCN'yi adsorbe ettiği veya çözdüğü gösterilmiştir, bu nedenle şişeleri kapatmak için kauçuk tıpların kullanılmasından kaçınılmalıdır [85]. Kimyasal reaksiyonları yavaşlatmak için numunelerin düşük sıcaklıklarda saklanma koşulları test edilmiş ve siyanür içeren biyolojik numuneler için sıcaklık çalışmaları yapılmıştır. Bununla birlikte, literatürde birçok sıcaklık tutarsızlığı bulunmaktadır [59, 71, 73, 86, 87].

Saklama sırasında siyanür oluşabilir. Saklama şartlarına bağlı olarak biyolojik numunelerde yapay siyanür oluşumu da meydana gelebilmektedir [81, 87, 89-91]. Oksihemoglobin [90], tiyosiyanat oksidaz [81,91], ve granülositlerin (beyaz kan hücrelerinin bir bölümünü oluşturan çeşitli hücre tipleri) [89] tiyosiyanatı, siyanüre oksitleyebileceği ve bu reaksiyonların numunenin sıcaklığına ve pH'ına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Lundquist'in sıcaklık bağımlılığı analizinin önceki çalışmalardan farklı

olduğu bulunmuştur [59, 86, 87] ve gümüş iyonları kullanımı da tiyosiyanat stabilitesini artırabilmektedir [72]. Mikroorganizmalar da ayrıca siyanür üretiminden sorumludurlar [91] ve düşük sıcaklıkta saklama, mikroorganizmaların büyümesini ortadan kaldırmaya yardımcı olur.

Tüm analitik yöntemlerde ortak olan bu düşünceler, kazazedelerden bildirilen siyanür ve siyanür metaboliti seviyelerindeki büyük tutarsızlıklar için önemli bir kaynaktır. Detoksifikasyon süreçleri ve siyanürün fiziksel ve nükleofilik özellikleri nedeniyle, doğrudan siyanür analizi normalde idrar veya tükürük örnekleri ile yapılmaz, ancak idrar, tükürük ve solunmuş havada izler bulunur. Siyanür metabolitleri tiyosiyanat ve ATCA, idrar, tükürük ve kan plazmasında belirlenebilir. Derişimlerinin siyanür maruziyetiyle korelasyonu ayrıca yapılan çalışmalarda incelenmiştir [86, 92-94, 142-145]. Tiyosiyanatı ölçmenin avantajları, maruz kaldıktan hemen sonra kayda değer derişimlerin bulunabilmesidir ve bunun siyanidden daha kararlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, gerçek derişimin saklama sırasında siyanüre dönüşmesi nedeniyle belirlenmesi zor olabilmektedir [145]. ATCA biyolojik numunelerde donma ve ortam sıcaklıklarında aylarca stabildir. pK_a değerlerinin (karboksilik asit: 2.03, amin: 8.48) ve nükleer manyetik rezonans çalışmalarının belirlenmesine dayanarak, ATCA çözelti içinde iki kutuplu bir iyon oluşturur ve bu nedenle uçucu değildir [146]. ATCA'nın tiyosiyanattan daha düşük başlangıç derişimlerine sahip olduğu ileri sürülmüştür, ancak stabilitesi ve hassas analitik tekniklere uygulanabilirliği daha faydalı olabilmektedir. ATCA ve tiyosiyanat ölçümü için dezavantajlar, siyanürde olduğu gibi, her bir kişi için farklı olan doğal olarak oluşan arka plan seviyelerini içermeleridir, bu da maruziyetten önce bir birey için taban çizgisi seviyeleri oluşturmadan düşük seviyeli siyanür maruziyetini ölçmeyi zorlaştırır [86, 147]. Ek olarak, siyanür dağılımı ve organlardaki derişimler uygulama yoluna ve primat türüne bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Organ siyanür derişimleri, adli vakalarda kan siyanür zehirlenmesi seviyeleri için de kullanılmıştır; ancak siyanürün ölüm sonrası üretimi ve dönüşümü sonuçları yorumlarken dikkat edilmesi gereken hususlardır [75, 76, 82, 148-151].

Siyanürün analitik tayini, uçuculuğu, nükleofilik özellikleri ve renksiz olmasından dolayı kolay bir iş değildir. Çok sayıda yöntem geliştirilmesine rağmen, her bir yöntem siyanür

etkileşimleri ve enstrümantasyon kabiliyetleri nedeniyle önlemlerle kullanılmalıdır. Bununla birlikte, tüm yöntemler bir şekilde biyolojik sıvılardaki siyanürün saptanması hakkında bilgi sağlamasına yardımcı olmuştur. Analitik bir yöntem seçerken, tespit limitine ve gereken süreye ek olarak çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır:

- Yöntem, saklama sırasında siyanür ve metabolitlerinin korunmasını dikkate alıyor mu?
- Yöntem stok çözeltilerinin doğru bir şekilde saklanmasını [85] içeriyor mu veya günlük olarak taze örnekler kullanıyor mu?
- Yöntem kanda bulunan tipik etkileşimlerin dikkate alınmasını içeriyor mu?
- Yöntem, klinik olarak kullanılan panzehirli ve antidot içermeyen siyanürü test ediyor mu?
- Yöntem siyanür kaybına yol açabilecek analiz prosedürlerini (örn. pH, ısıtma ve asitleştirme) içeriyor mu? Kauçuk tıplar veya septumlar kullanılıyor mu?
- Tespitte kullanılan kimyasallar toksik veya kanserojen mi?
- Yöntem kesin, doğru, ucuz ve pratik mi?

Literatür bilgileri, saklama sırasında siyanür veya tiyosiyanat örneklerinin nasıl bozulduğunu, antidotların varlığında yöntemin validasyonunu ve örnek toplama zamanlamasının raporlanmasında büyük bir tutarsızlık olduğunu göstermektedir. Bazı yazarlar siyanürle kontamine olmuş biyolojik örneklerin toplanmasının ve saklanmasının önemini ayrıca vurgulamaktadır [72, 77, 95-99, 150-152].

Biyolojik sıvılardaki siyanürün tespiti için şu anda basit, hızlı, hafif, hassas ve doğru yöntemler mevcut olmadığından, hiçbirisi ilk müdahale ekipleri tarafından teşhis amaçlı kullanım için uygun değildir. Acil durum personeli, siyanür zehirlenmesinin diğer zehirlenmelere benzer semptomlara sahip olabileceğini kabul ederek, laboratuvar sonuçlarını beklemek yerine başlangıçta hastanın geçmişine ve fiziksel semptomlarına güvenmek zorundadır [91, 100]. Kan ve idrar örnekleri, onay veya çürütme süreçleri için mümkün olan en kısa sürede toplanmalı ve analiz edilmelidir. Test hemen gerçekleştirilemediğinde, daha sonraki analizler için örnekleri toplamak ve saklamak için aşağıdaki prosedürlerin kullanılması gerektiği literatürde belirtilmiştir:

Prosedür 1:

Adım 1. Bir antikoagülan (örn. EDTA, heparin, sodyum sitrat) içeren bir kan toplama tüpünde kan örneği toplanır.

Adım 2. 1 mL kan başına 0.05 mL, 0.05 mol/L sodyum nitrit eklenir, kapatılır ve 2 dakika bekletilir.

Adım 3. Analiz yapılana kadar -20° C'de saklanır [77].

Prosedür 2:

Adım 1. Antikoagülan sodyum sitrat (~17 mg) içeren kan alma tüpleri hazırlanır. 20 µL % 50 sulu sodyum nitrit çözeltisi (~10 mg) ilave edilir ve susuz kalsiyum klorür üzerinde vakumla kurutulur.

Adım 2. 5 mL'lik bir kan örneği alınır.

Adım 3. 5° C'de saklanır [152].

Prosedür 3:

Adım 1. Bir antikoagülan (EDTA veya heparin) içeren bir kan toplama tüpünde kan örneği toplanır. Tüpün üst kısmının (kapağının) kauçuktan yapılmadığından emin olmak gereklidir.

Adım 2. 10 mL asit gümüş sülfat reaktifine (0.5 mmol H₂SO₄ içinde 20 mmol) 1 mL tam kan eklenir.

Adım 3. Analiz yapılana kadar -20° C'de saklanır [72].

2.5. Floresan Altın Nanokümeler: Sentez ve Biyolojik Uygulamaları

Biyomedikal uygulamalar için ümit vaat eden floresan nanomalzemeler olarak floresan metal nanokümeler (NCs), fizikokimyasal ve optik özellikleri nedeniyle önemli bir ilgi kaynağı haline gelmiştir [153, 154]. Özellikle, floresan altın nanokümeler (AuNCs), kolay hazırlanmaları, yüksek biyouyumlulukları, düşük sitotoksisite ve yüksek fotostabiliteye sahip olmaları ve diğer biyomoleküllerle kolayca fonksiyonelleştirilebilmesi sayesinde diğer metal nanomalzemelerden çok daha fazla dikkat çekmiştir. Floresan AuNC'lerin genellikle 3 nm'den küçük boyutlara sahip olan ve bu nedenle elektronların Fermi dalga boyu ile karşılaştırılabilen birkaç ila yüzlerce Au atomundan oluştuğu bilinmektedir [155, 156]. Büyük altın nanopartiküllerin (AuNP) aksine, ultra küçük floresan AuNC'ler, görünür bölgede yüzey plazmon rezonans

absorbsiyonu göstermezler. Ancak görünür bölgeye yakın kızılötesinde (NIR) belirgin bir floresan emisyonuna sahiptirler [157]. Ultra küçük boyutlarına ek olarak, yüzey ligandları, yapı ve yük durumlarının yanı sıra iyonik güç, pH seviyesi ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin de floresan özellikleri üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu mükemmel özelliklerden yararlanılarak, floresan AuNC'ler biyolojik etiketleme, biyoalgılama, biyogörüntüleme ve spesifik hedefli kanser tedavisi uygulamalarında kullanılmak üzere büyük umut vaat etmektedir [154, 158, 159]. Floresan AuNC'ler biyomedikal uygulamalarda son yıllarda giderek daha fazla ilgi görmektedir ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır [155, 160, 161].

2.5.1. Floresan AuNC'lerin Hazırlanması

Floresan AuNC'ler genellikle aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya olmak üzere iki strateji ile hazırlanır. İlk yaklaşımda, altın iyonları Au atomlarına indirgenir ve ardından Au atomlarının çekirdeklenmesi ile oluşan AuNC'ler oluşumuna sebep olur. Bu yöntem AuNC'lerin kimyasal, biyolojik, elektrokimyasal ve optik indirgenmesinde yaygın olarak kullanılır [162-165]. Bununla birlikte, bu yaklaşım ile hazırlanan AuNC'ler birbirleriyle etkileşim kurma ve agregasyon ile AuNP'lere dönüşme eğilimindedir. Bu nedenle, kararlı ve yüksek kaliteli floresan AuNC'lerin hazırlanması için küçük tiyol molekülleri, DNA oligonükleotitler, dendrimerler, polimerler, peptitler ve proteinler [153, 154] gibi uygun stabilize edici ajanların kullanılması gerekmektedir. Alternatif olarak, yukarıdan aşağıya olan yaklaşımda, daha büyük AuNP'lerin, kademeli olarak aşındırılarak ultra küçük AuNC'lerin üretilmesi sağlanmaktadır.

2.5.1.1. Kimyasal İndirgeme

Genellikle, floresan AuNC'ler, stabilize edici ve indirgeyici ajanlar varlığında altın öncül maddelerin Au atomlarına indirgenmesiyle hazırlanmaktadır. Floresan AuNC'leri hazırlamak için altın öncül maddeler olarak genellikle kloroaurik asit (HAuCl_4) ve kloro (trifenilfosfin) altın (I) tuzu kullanılmaktadır [166]. İndirgeyici ajanlar esas olarak sodyum borohidür (NaBH_4), sitrat, hidrazin hidrat, tetrakis (hidroksimetil) fosfonyum klorür (THPC) ve askorbik asidi içermektedir [167]. Stabilize edici maddeler arasında çeşitli tiyolatlar, proteinler, peptitler, DNA oligonükleotitler, dendrimerler ve polimerler bulunmaktadır.

Tiyol içeren bileşiklerin, çoğunlukla Au ve S (kükürt) arasındaki güçlü etkileşime bağlı olarak Au-S bağı oluşturmak için kimyasal indirgeme yoluyla floresan AuNC'lerin hazırlanması için sıklıkla stabilize edici ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Genel olarak, tiyol korumalı AuNC'lerin floresans emisyonu maviden NIR bölgesine ayarlanabilmektedir [154]. Yapısında tiyol içeren bir molekül olan glutatyon (GSH), Au (III) 'ün NaBH_4 gibi güçlü indirgeyici ajan ile indirgenmesi sırasında koruyucu ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır [168-170]. Ayrıca benzer bir yaklaşım ile, kaptopril [171], dihidrolipoik asit [172], dodekantol [173], D-penisillamin (DPA) [174], lipoik asit [175], merkaptopropiyonik asit [176], fenilettiltiolat [177], tiyolat a-siklodekstrin [178], tiopronin [179] ve 6-aza-2-tiyotiminden [180] gibi diğer tiyol içeren moleküller, tek katman korumalı floresan AuNC'ler hazırlamak için kullanılmıştır. Ancak tiyol korumalı AuNC'ler düşük kuantum verimine (QY) sahiptir ve nadiren % 0.1'i aşmaktadır [181]. Yüksek floresan özelliklere sahip tiyol korumalı AuNC'ler hazırlamak için GSH'nin, nötr koşullar altında AuNC oluşturmak için Au (III) 'ün Au'ya indirgenmesini gerçekleştirebilecek zayıf bir indirgenebilirliğe sahip olmasına bağlı yeni bir strateji ortaya koyulmuştur [182]. Eşzamanlı olarak, GSH ayrıca mükemmel bir kaplama ajanı olarak görev yapmaktadır. Düşük tiyol-Au oranına (1.5:1) sahip GSH kullanılarak, QY ~ % 15 olan flüoresan Au@Au (I)-tiyol kümeleri, Au (I)-tiyol kompleksinin oluşturulan Au çekirdekleri üzerinde kontrollü agregasyonu ile üretilebilir. GSH ve HAuCl_4 oranının kontrol edilmesiyle 600 nm veya 800 nm emisyonlu GSH stabilize edilmiş AuNC'ler yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir [183]. İlginç bir şekilde, 600 nm ve 800 nm floresan emisyonlu GSH-AuNC'ler, 2.5 nm'lik tutarlı bir boyuta sahiptir, bu nedenle yüzey kapsamının doğru ayarlanmasıyla 2.5 nm'lik tek bir AuNC ile birleştirilebilirler.

Dendrimerler, küçük boşlukları olan tipik tekrarlayan yapıda dallanmış moleküllerdir ve terminal grupları ayrıca floresan AuNC sentezi sırasında kullanılan ligandlarla yapılacak biyokonjugasyona uygun yapıdadır [154]. Poli (amidoamin) (PAMAM) ve poli (propilen imin) (PPI), AuNC'leri hazırlamak için kullanılan yaygın dendrimer şablonlarıdır. İndirgeyici ajan olarak kullanılan NaBH_4 ile hazırlanmış PAMAM stabilize AuNC'ler için uyarma ve emisyon dalgaboyu, % 41'e kadar bir QY ile sırasıyla sırasıyla 384 nm ve 450 nm'dir [184]. PAMAM / Au mol oranı 1:1'den 1:15'e değiştiğinde; Au_5 , Au_8 , Au_{13} , Au_{23} ve Au_{31} dahil farklı boyutlarda floresan AuNC'ler hazırlanmıştır [185]. Floresan AuNC'ler, QY'leri % 10 ila % 70 aralığında NIR'a yakın bölgede parlak UV

(Ultraviyole/mor ötesi) floresan emisyonu sergilemiştir. Poli (akrilik asit) (PAA) ve 3-merkaptopropiyonat uçlu poli (metakrilik asit) (PTMP-PMAA) gibi bol miktarda fonksiyonel gruba sahip polimerler, floresan AuNC'leri sentezlemek için ümit verici stabilizatörler olarak kullanılmıştır [186, 187]. Polimer stabilize AuNC'lerin boyutu polimerin yapısı, fonksiyonel grubun özelliği ve Au-polimerler oranı ile ilişkilidir [186, 188].

Proteinler gibi biyolojik açıdan önemli moleküller ayrıca biyoyoumlu floresan AuNC'ler hazırlamak için iskele görevi görmektedir. Hem biyolojik ligand hem de indirgeyici ajan olarak ticari olarak temin edilebilen bir protein olan sığır serum albümini (BSA) kullanılarak 37° C'de floresan AuNC'lerin hazırlanması için "yeşil" ve kolay preparatif bir yol literatürde belirtilmiştir [164]. Hazırlanan BSA-AuNC'ler, yüksek QY (~% 6), iyi biyoyoumluluk ve mükemmel fotostabilite sergileyen 25 Au atomundan (Au₂₅) oluşmaktadır. Bu yaklaşım sadece floresan AuNC hazırlamak için yeni bir alternatif yöntem değil, aynı zamanda diğer metalleri ve proteinleri incelemek için de başarılı bir protokol oluşturması adına son derece önemlidir. AuNC sentezlemek için oluşturulan bu “yeşil” yaklaşım sayesinde lizozim [189], DNaz I [190], yumurta akı [191], yaban turpu peroksidaz [192], ovalbümin [193], insülin [194], pepsin [195], ribonükleaz A [196], transferrin-aile proteinleri [197, 198], tripsin [199] ve denatüre sığır serum albümini [200], QY'leri yaklaşık % 4.3 ile % 56 arasında değişen yüksek floresan özellikli AuNC'lerin sentezi için kullanılmıştır. İlginç bir şekilde, insülin stabilize floresan AuNC'lerin in vivo çalışmada doğal insülin olarak kan glukoz regülasyonundaki biyoaktivitesini ve biyoyoumluluklarını korudukları kanıtlanmıştır [194].

DNA oligonükleotidleri ve tek nükleotid de floresan AuNC'lerin sentezi için mükemmel iskeleler olarak kullanılmıştır. İndirgeyici ajan olarak sitrat kullanılarak nötr pH'da poli-adenin DNA oligonükleotitleri ve düşük pH'ta ploy-sitozin varlığında mavi floresan AuNC'ler sentezlenmiştir [201]. Daha sonra, sap-ilmik DNA'ları, tek iplikli DNA'lar (ssDNA) ve tam olarak eşleşen DNA'lar dahil olmak üzere farklı türde DNA dizileri, floresan AuNC'lerin diziye bağlı sentezini incelemek için şablonlar olarak kullanılmıştır [202]. sap-ilmik DNA stabilize AuNC'lerin emisyon davranışı, sitozin döngüsünün AuNC'leri sentezlemek için en verimli kısım olduğu döngü dizilerine bağlıdır. Tek iplikli

DNA stabilize AuNC'lerin emisyon davranışı sap-ilmik DNA'da olduğu gibi sitozin yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Yakın zamanda, tekli sitidin birimleri varlığında çok renkli floresan AuNC'ler başarıyla sentezlenmiştir [203]. İlginç bir şekilde, mavi, yeşil ve sarı emisyonlara sahip hazırlanan AuNC'ler, çeşitli reaksiyon süreleri veya pH ortamları kullanılarak aynı anda elde edilebilmektedir. Bu yöntem, çoklu biyoetiketleme ve biyolojilama uygulamaları geliştirmek için büyük ümit vaat etmektedir.

2.5.1.2. Fotoindirgeme

Kimyasal indirgeme yaklaşımı ile karşılaştırıldığında, foto indirgeme, toksik olmayan ve çevre dostu bir yaklaşım olarak hareket etmenin yanı sıra sodyum borohidrit gibi tehlikeli indirgeyici ajanların ek kullanımını önler. Foto-indirgeme tekniği ile sentezlenen floresan AuNC çalışmaları literatürde yer almaktadır [165]. Ayrıca üç tridentat polimerin varlığında ultra küçük boyutlu, yüksek QY'ye sahip ve mavi floresan emisyonlu AuNC'lerin de sentezi gerçekleştirilmiştir [204]. Polimer-Au iyonları arasındaki molar oranın değiştirilmesiyle sentezlenen floresan AuNC'lerin boyutları ayarlanabilmektedir.

2.5.1.3. Biyoindirgeme

Biyomineralizasyon canlı organizmalarda önemli bir süreçtir ve metal elementlerin biyojeokimyasal döngülerinde önemli bir role sahiptir. Bu işleme dayanarak, biyolojik sistemler nanometre boyut aralığında çeşitli metal veya metal içeren parçacıklar üretebilirler. Yapılan çalışmalarda nanometre boyut aralığında parçacıklara rastlanmıştır. Çalışmalar; AuNP'lerin bakteri, mantar ve bitkiler tarafından sentezlenebildiğini göstermiştir [205, 206]. Metal iyonlarının nanoparçacıklara biyoindirgenmesi, organizmanın ağır metal iyonlarına karşı hayatta kalma mekanizması olarak işlev görmektedir [207]. Bununla birlikte, kompleks hücre ortamlarında geri dönüşü olmayan agregasyona bağlı olarak biyosentezlenmiş ultra küçük AuNC'leri sentezlemek zordur. Son derece önemli bir çalışma olarak, tümör görüntüleme için kanser hücrelerinde floresan AuNC'lerin biyosentezi gerçekleştirilmiştir [163]. Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda, insan hepatokarsinomu (HepG2) ve lösemi (K562) gibi farklı kanser hücrelerinin sitoplazmalarında Au (III) indirgenmesi ile hassas bir şekilde hücre görüntülemeye imkan sağlayan floresan AuNC'ler kendiliğinden biyosentezlenmiştir. Önemli ve ilginç bir şekilde, normal hücrelerde (L02) bu şekilde bir sentez meydana gelmemektedir. Bu özel olgu ile, in vivo tümör hücre görüntülemesi için umut verici yeni bir yol literatüre kazandırılmıştır. Bununla birlikte, kanserli hücrelerde floresan

europium, platin, gümüş ve çinko nanokümeler de in-situ biyosentezeleme yöntemi ile elde edilmiştir [207-211]. Biyosentezlenmiş AuNC'lerin tam metabolik yolu, gelecekteki çalışmalarda daha fazla araştırılması gereken bir araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

2.5.1.4. Floresan AuNC'lerin Fonksiyonelleştirilmesi

Hazırlanan floresan AuNC'lerin farklı ligand ajanları (örn. folik asit, proteinler) ile modifikasyonları, biyotıp alanındaki uygulamalarını genişletmek ve eşsiz özelliklerinden faydalanmak açısından son derece önemlidir. Floresan AuNC'lerin fonksiyonelleştirilmesi genellikle ligand değişimi, biyokonjugasyon ve kovalent olmayan etkileşimlere dayanmaktadır [212]. Ligand değişimi, hazırlanan AuNC'lerin işlevselleştirilmesi için çok verimli bir stratejidir. Ligand korumalı AuNC'lerin ligand değişim reaksiyonları vasıtasıyla yüzey fonksiyonelleştirilmesi, ligandların floresan AuNC'lerin optik ve elektronik özelliklerini etkilemesi nedeniyle farklı uygulamalarda kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. [213, 214]. Örneğin floresan olmayan AuNC'ler (AuNC@DDAB), spesifik bir ligand değişim reaksiyonu yoluyla parlak kırmızı floresan emisyonu sahip AuNC'lere (AuNC@DHLLA) dönüştürülebilirler [215]. Ayrıca, ligand değişimi, sentezlenen floresan AuNC'lerin boyut dağılımını değiştirebilir. Örneğin, fosfin stabilize Au₁₁ nanokümeler azot atmosferi altında su içinde GSH ile değiştirilmiş [216] ve sonucunda Au₂₅(SG)₁₈ nanokümeler, 100 mg'ın altındaki ölçekte seçici olarak elde edilmiştir. Bu strateji, tiyol stabilize AuNC'leri büyük ölçekte hazırlamak için uygun bir yöntem sunmaktadır. Ek olarak, ligand değişimi yoluyla, flüoresan AuNC'lere verilen yeni özellikler de daha sonra bazı spesifik hedefli moleküller ile daha da değiştirilebilir. Ligand değişim mekanizmasının derinlemesine anlaşılması, floresan AuNC'lerin doğasını ve reaktivitesini ortaya çıkarmak için büyük önem taşımaktadır. Tiyol korumalı floresan AuNC'ler tipik olarak SR-Au-SR monomer ve SR-Au-SR-Au-SR dimer birimleri gibi oligomerik tiyolat ligandları ile çevrilidir [217]. Özellikle Au₂₅(SR)₁₈ nanokümeler, ligand değiş tokuşlarının incelenmesi için yaygın olarak kullanılan bir çalışma modelidir [213, 214]. Au₂₅(SR)₁₈ nanokümeler üzerinde ligand değişim mekanizmasının bir dizi deneysel ve teorik çalışması gerçekleştirilmiştir [213, 218, 219]. Örneğin metaantiol (CH₃SH) ile Au₂₅(SH)₁₈ nanokümeler üzerindeki ligand değişim reaksiyonunun kinetiğini fonksiyonel yoğunluk teorisi kullanılarak incelemiş [213] ve en faydalı ligand değişiminin -SH ile Au atomları arasında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ek olarak, ω-fonksiyonel tiyollere sahip 1.5 nm trifenilfosfin (PPh₃)

korumalı AuNC'lere dayanılarak, ligand değişiminin derecesine hakim olabilmek için kullanılabilecek üç aşamalı bir mekanizma göstermişlerdir [220]. İlk aşamada, AuCl (PPh₃) serbest haldedir, ardından geri kalan fosfin ligandlarının trifenilfosfin olarak değiştirilmesi gerçekleşir, son aşama, tiol bazlı ligand kabuğunun tamamlanmasını ve yeniden düzenlenmesini içerir. Biyokonjugasyon, sentezlenen floresan AuNC'lere ilave fonksiyonellikler sağlamak için bir başka etkili yoldur. Floresan AuNC'lerin hazırlanmasından sonra, alkoller, karboksilik asitler, birincil aminler ve tiyoller gibi uygun uç fonksiyonelliğine sahip iyi bir stabilizasyon seçimi floresan AuNC'lerin karmaşık bir ortamda agregasyonunu önlemek için gereklidir. Ayrıca, kanser hücresi yüzeyi üzerinde seçici olarak hedef bölgelere bağlanabilen ve reseptör aracılı endositozu başlatabilen çeşitli moleküler hedefleme ligandları, spesifik tümör markerleri olarak tanımlanmıştır. Örneğin, folik asit (FA) bazı kanser hücrelerinin dış zarında folat reseptörlerinin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak iyi bilinen bir kanser hücresi etiketleme moleküldür [199, 221-223]. FA ile konjuge floresan AuNC'ler, hedefli kanser görüntüleme ve tedavisi için umut verici araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Ek olarak, proteinler, viral kapsidler ve DNA oligonükleotitler de fonksiyonel AuNC'lere bağlanmak için son derece kullanışlıdır. Örneğin, floresan AuNC'lerin viral yüzeylere bölgeye özgü biyokonjugasyon gerçekleştirdiği literatürde bildirilmiştir [159]. Ligand değişimi ve biyo-konjugasyon dışında, kovalent olmayan etkileşim de hazırlanan floresan AuNC'leri daha da işlevselleştirmek için etkili bir yoldur. Au (I)-tiyolat kabuğunun katılaştırılarak AuNC'lerin luminesans verimliliğini önemli ölçüde arttırmak için kullanışlı bir modifikasyon yöntemi literatürde sunulmuştur [224].

2.5.2. Floresan AuNC'lerin Biyomedikal Uygulamaları

Mükemmel biyouyumlulukları ile birlikte floresan AuNC'lerin eşsiz fizikokimyasal ve optik özellikleri nanokümelerin, hedeflenmiş kanser ilaçları, gen taşıma sistemleri ve terapötik ajanların oluşturulması için daha da geliştirilebilecek biyoetiketleme, biyoalgılama ve biyo-görüntüleme için umut verici bir platform haline gelmesini sağlamıştır.

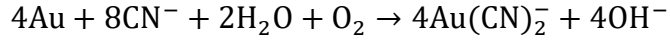
2.5.2.1. Biyoetiketleme

Organizmaların floresan etiketlenmesi, biyogörüntüleme ve hedef tedavi gibi biyomedikal çalışmalar için kritik bir adımdır. Günümüzde, floresan etiketleme çoğunlukla floresan proteinleri, organik boyalar ve yarı iletken kuantum noktalarını (QD)

içermektedir [154, 225, 226]. Güçlü floresan özellikleri, mükemmel biyouyumlulukları, düşük sitotoksiteleri, iyi QY ve iyi fotostabiliteleri nedeniyle, floresan AuNC'ler ayrıca hücre tanımlama, etkileşim, farklılaşma ve izlemede sıklıkla kullanılabilir. Genel olarak, floresan AuNC'ler, reseptör aracılı veya spesifik olmayan endositoz yoluyla hücreler tarafından içselleştirilebilir [215, 227]. İnsan aort endotel hücreleri ve endotel progenitor hücrelerinin floresan AuNC'ler kullanılarak etiketlenmesi [228], bakteri suşlarının etiketlenmesi için; çapraz bağlı proteinler ile işlevselleştirilmiş dekstran stabilize ve bakteriyel çekirdek algılayıcı floresan AuNC sinyal moleküllerinin kullanılması [229-231], ve virüslerin işlevselleştirilmiş floresan AuNC'ler tarafından etiketlenmesi [159] gibi literatürde bu konuda birçok çalışma yer almaktadır.

2.5.2.2. Biyoalgılama

Çok küçük AuNC'lerin optik ve özellikle güçlü fotoluminesans özellikler ile, AuNC'lerin ağır metal iyonları [172], inorganik anyonlar [232], küçük biyomoleküller [193], biyomakromoleküller [233], ilaç molekülleri [234] ve ayrıca biyolojik sistemlerde ve biyo-ilişkili örneklerde pH seviyesi [235] ve sıcaklık [236] gibi çeşitli analitik uygulamalar için floresan prob olarak kullanılmışlardır. Ağır metal iyonlarının tespiti, çeşitli hücresel bileşenlere bağlanabilen ve böylece disfonksiyona neden olan, insan sağlığına zarar veren yüksek toksisiteleri nedeniyle büyük öneme sahiptir. Ağır metal iyonları tarafından floresan sönmeme veya şiddeti artırma nedeniyle çok sayıda çeşitli floresan AuNC'ler, Ag^+ , As^{3+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} gibi çeşitli ağır metal iyonlarını algılamak için kullanılmıştır [154, 155, 237]. Örneğin, kırmızı floresan yayan BSA stabilize AuNC'ler, 0.5 nM'lik bir tespit limiti (LOD) ile Hg^{2+} 'nın AuNC'leri sönmemesine bağlı olarak Hg^{2+} 'yi saptamak için floresan prob olarak kullanılmıştır [238]. Ek olarak, BSA stabilize AuNC'ler 50 μ M LOD ile canlı hücrelerde Cu^{2+} 'nın seçici algılaması için kullanılmıştır [239]. Ağır metal katyonlarının belirlenmesine ek olarak, siyanür (CN^-), nitrit (NO_2^-) ve sülfür (S^{2-}) gibi zararlı anyonların algılanmasında da floresan AuNC'ler kullanılmıştır. Örneğin, BSA stabilize AuNC'ler, iyi bilinen bir hücresel solunum inhibitörü olan CN^- 'nin 200 nM'lik bir LOD ile seçici bir şekilde saptanması için kullanılmıştır [240], burada algılama mekanizması siyanür ve altın atomları arasında gerçekleşen eşsiz "Elsner Reaksiyonu" [241] sonucunda kararlı $Au(CN)_2^-$ kompleksleri oluşturmak üzere CN^- 'nin altın atomlarını nanokümler içerisinden çıkarmasına bağlı floresan sönmeye dayanmaktadır. Elsner Reaksiyonu aşağıdaki denklem ile ifade edilmektedir.



Bu yöntem son derece seçici ve hassas CN^- tayinine olanak sağlamaktadır.

ATP, glikoz, GSH, FA ve H_2O_2 gibi küçük biyomoleküller birçok hücrel biyokimyasal süreçte önemli bir rol oynamakta ve bazı hastalıklarda ve bunların tedavisinde önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Fonksiyonel floresan AuNC'ler ayrıca bu küçük biyomoleküllere karşı seçici algılama için başarıyla geliştirilmiştir [192, 242-246].

2.5.2.3. Biyogörüntüleme

Son yıllarda, floresan AuNC'lere dayanan biyogörüntüleme uygulamaları ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Çeşitli floresan AuNC'ler arasında, protein ve peptit stabilize AuNC'ler, benzersiz işlevleri, kolay biyokonjugasyonu ve mükemmel biyoyumluluklarından dolayı biyogörüntüleme için özellikle uygundur [155, 160]. GSH stabilize AuNC'ler, CAL-27 kanser hücrelerinde ve MC3T3-E1 normal hücrelerinde hücrel görüntüleme için kullanılmıştır [247]. Ayrıca in-vivo kanser biyogörüntülemesi için yeni bir kontrast floresan görüntüleme ajanı olarak ultra küçük (yaklaşık 2.7 nm) NIR (710 nm) BSA stabilize AuNC'lerin kullanılmıştır [248]. Yapılan görüntüleme çalışmalarında BSA stabilize AuNC'lerin tümör konumlarında yüksek düzeyde birikebildiklerini ortaya koymuştur. Hedeflenen hücre görüntülemesini elde etmek için, protein üzerinde yer alan amino, karboksil ve tiol grupları ile reaksiyona girerek bağlanma gerçekleştirecek tanıma elemanlarının floresan AuNC'lere konjüge edilmesi gerekmektedir. Örneğin, herceptin ve folik asit gibi kanser hücresi hedef molekülleri, BSA stabilize AuNC'leri tümör hedefli görüntüleme için konjüge etmek için kullanılmıştır [222, 249]. Ek olarak, protein stabilizatörünün biyolojik fonksiyonunu koruyan floresan AuNC'leri hazırlamak için birkaç protein kullanılmıştır. Böylece protein stabilize edilmiş AuNC'ler, herhangi bir post-reaksiyona takılmadan spesifik hücrelerin görüntülenmesini hedeflemek için doğrudan kullanılabilmiştir [197]. Tekli floresan görüntülemeye (FI) ek olarak, tümör görüntülemesi için floresan AuNC'lere dayanan multimodal görüntüleme platformları da geliştirilmiştir [250]. Floresan AuNC'ler, hibrid materyaller oluşturmak için paramanyetik maddelerle birleştirilerek FI ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ikili mod görüntüleme için de kullanılmıştır [251]. Benzer şekilde, dengeleyici olarak albümin kullanılarak üçlü modal (FI/CT (Bilgisayarlı Tomografi)/MRI) görüntüleme problemleri da hazırlanmıştır [252]. NIR'deki iki foton

floresan uyarımı olayı, dokulara nüfuz etme gücünü artıracak ve otofloresansı en aza indireceği için, geniş iki foton absorpsiyon alanı olan floresan AuNC'ler biyogörüntüleme uygulaması için kullanılmıştır [174]. Floresan yaşam boyu görüntüleme (FLIM), farklı floresan yaşam süresine bağlı olarak sinyali otofloresan ve uyarma ışık kaynağından önemli ölçüde ayırabilen hücresel görüntüleme için alternatif bir stratejidir. Bazı floresan AuNC'ler uzun bir kullanım ömrü göstermiştir ve bu sebeple hücresel FLIM için de kullanılmıştır [253].

2.5.2.4. Gen ve siRNA Taşınımı

Gen tedavisi, hastalığın nedenini genetik olarak tedavi etme konusundaki muazzam potansiyeli nedeniyle son zamanlarda özel ilgi çekmiştir, bu nedenle umut vaat edici yeni nesil terapötikler olarak kullanılmaktadır [254]. Genin sistemik olarak iletilmesinde, hücre içi nakilde görsel olarak mükemmel lüminesans özellikleri nedeniyle floresan AuNC'ler yeni bir viral olmayan vektör olarak kullanılmıştır. Floresan AuNC vektörler düşük sitotoksikite, iyi fotostabilite ve neredeyse hiçbir immün tepkiye sebep olmadıkları için hücrelerdeki transfeksiyon davranışının izlenmesinde içinde lipozom ve plazmid DNA gibi diğer gen taşıyıcılarından daha üstündür. Ayrıca, katyonik BSA şablonlu Au-Ag nanokümler ve kitosan stabilize eşzamanlı RGB (kırmızı/yeşil/mavi) yayan AuNC'ler aynı zamanda antikanser gen terapileri için gen vektörü olarak da işlev görebilmektedir [255, 256]. Buna ek olarak, floresan AuNC'ler, PAMAM dendrimerleri ile birlikte siRNA susturması ile apoptoz ile sonuçlanan siRNA transfeksiyon verimliliğini arttırmak için müdahale edici hedef RNA (siRNA) taşınımı için de kullanılmıştır [257].

2.5.2.5. İlaç Taşınımı ve Kontrollü Salım

Yüzey reaktif gruplara sahip fonksiyonelleştirilmiş floresan AuNC'ler üzerinde, ilaç taşınımı ve kontrollü salım uygulamaları için; yan etkileri azaltmak ve serbest ilaçların tıbbi etkinliklerini arttırmak için, Au-S veya amid bağları yoluyla ilaçları konjuge edebilen nanokompozit bir ön ilaç oluşturmak üzere yaygın olarak çalışılmıştır. Genel olarak ilaçlar, tiyol/disülfid değişimi yoluyla AuNCs iletim sisteminden salınabilmektedir [258]. FA fonksiyonel BSA stabilize AuNC'ler, hücre alımını önemli ölçüde hızlandırmış ve meme kanseri hücrelerinde AuNCs-Pt nano kompozitlerinin sitotoksitesini arttırmıştır. Ayrıca FA-AuNCs-Pt nanokompozitler, ortotopik olarak implante edilen 4T1 göğüs tümörlerinin büyümesini ve akciğer metastazını gözle görülür şekilde inhibe

etmiştir [259]. BSA stabilize AuNC'ler gibi işlevselleştirilmiş floresan AuNC'ler [260, 261] ve TPGS-AuNCs-transferrin [262], azaltılmış grafen oksit ve AuNCs nanokompozitleri [263] çeşitli antikanser ilaçları için hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmıştır. Ek olarak, işlevselleştirilmiş floresan AuNC'lerin taşıyıcı olarak geliştirilmesi, ilaç direnç mekanizmalarını anlamak ve tedavi sonuçlarını iyileştirmek için umut vaat edici bir alandır.

2.5.2.6. Radyasyon Tedavisi

Radyasyon tedavisi, birçok kötü huylu tümörün ortadan kaldırılmasında en etkili terapötik stratejilerinden biridir. Ancak DNA'ya doğrudan zarar verebilmekte ve böylece hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açabilmektedir. Bununla birlikte, radyasyon tedavisindeki önemli zorluklardan biri radyasyonun sağlıklı proksimal dokulara da zarar vermesidir [264]. Radyosensitizörlerin kullanımı, radyasyon tedavisinin tümör hücrelerine karşı öldürme etkinliğini artırabilen ve normal dokulara verilen zararı azaltabilen bu zorluğun üstesinden gelmenin alternatif bir yoludur. Son dönemde yapılan bazı çalışmalar, ultra küçük floresan GSH-AuNC'lerin yüksek atom numaraları ve ışınlama altında güçlü radyasyon şiddeti geliştirici etkisi nedeniyle kanser radyasyon tedavisi için umut verici bir radyosensitizör olarak uygulanabileceğini göstermektedir [265-267].

2.5.2.7. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi, kanser tedavisi için ışığa duyarlı malzemeleri kullanan klinik olarak onaylanmış alternatif bir terapötik stratejidir. Çok küçük AuNC'ler gibi sitotoksik olmayan ışığa duyarlı malzemeler, tümörlere ve kanser hücrelerine sokulabilir ve ışık kaynağı altında ışımlandığında tekli oksijen gibi reaktif oksijen ürünleri (ROS) üretme kabiliyetleri sayesinde kanser hücresi apoptozu ve tümör ablasyonu sağlayabilmektedirler [268, 269]. Ek olarak, indosiyanin yeşili ve porfirin gibi organik ışığa duyarlılaştırıcılar ile birleştirildiğinde, ultra küçük floresan AuNC'ler; kanser tedavisinde ışınlama altında tümör bölgesinde lokalize hipertermi oluşturmak için bir ısı kaynağı olarak kullanılabilirler [270, 271]. Son zamanlarda, porfirin türevleri ile kombine GSH stabilize kırmızı floresan AuNC'lerin, tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe etmek ve tümörün etkili floresan görüntüleme güdümlü fototermal tedavisini gerçekleştirmek için kullanılabileceği gösterilmiştir [271].

2.6. CD Üzeri Laboratuvar (Lab-on-a-CD/ Lab-on-a-Disk) Teknolojisi: Tam Entegre Moleküler Tanı Sistemi

Son 15 yılda santrifüjal mikroakışkan sistemler, hasta başı tanı sistemleri için gelişmiş bir tanı ve teşhis platformu olarak ortaya çıkmıştır. Santrifüjal mikroakışkan sistemli bir cihaz tipik olarak birbirine bağlı akışkan kanalları ve bölmeler (odacıklar) içeren bir kompakt disk (CD) şeklindedir. Bu mikroakışkan diskler, in-vitro teşhisten su kalitesi analizine kadar karmaşık analizler gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca, son gelişmeler, CD mikroakışkan teknolojisini giderek daha düşük maliyetli, taşınabilir ve kullanımı kolay hale getirerek hasta başı tanı uygulamaları için ideal bir sistem haline getirmiştir. Örnek hazırlama, yönlendirilmiş sıvı iletimi, DNA amplifikasyonu gibi benzersiz yaklaşımların son gelişimi, çoklu akışkan ve analitik adımların entegrasyonuna izin vererek, bir CD üzerinde mikro-toplam analiz sistemlerinin (μ TAS) tamamlanmasına yol açmıştır. Lab-on-a disk (LoCD) sistemleri olarak da adlandırılan santrifüjal mikroakışkan cihazlar, lab-on-a-chip (LoC) cihazlarının bir alt kategorisidir. LoC platformlarının avantajları arasında düşük maliyet, daha az miktarda malzeme ve reaktif kullanımı, küçük sıvı hacimleri ve difüzyon mesafeleri nedeniyle daha hızlı reaksiyon süreleri, taşınabilirlik ve programlanabilirlik sayılabilir. LoCD sistemler minyatür çip tabanlı sistemler ile aynı avantajları içerse de, üstünlükleri doğal sadeliklerinde yatmaktadır. Basit bir motor, sistem üzerinde sıvı pompası olarak hareket eden ve değişken radyal konumlarda sıvıları farklı şekilde etkileyen (yöne özgü sıvı pompalama kontrolüne izin veren “Coriolis kuvveti” ve karıştırma sırasında türbülans oluşturmak için kullanılan “Euler kuvveti”) birkaç yalancı güç üretir. LoCD sistemleri, bir numunenin bileşenlerini yoğunluğa göre ayıran, sıkışan kabarcıkları ortadan kaldıran ve sıvıların harici donanım ile doğrudan temas etmeden pompalanmasına izin veren çeşitli testlerin tek bir disk üzerinde kolayca yapılmasını sağlamaktadır. Enzime bağlı immünosorban testi (ELISA) ve kan plazması ayırma testleri gibi birçok farklı test, LoCD sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Valf sistemleri, pompalama, karıştırma, depolama, dağıtma ve hacim tanımı gibi işlemler, disk üzerindeki herhangi bir testte farklı akışkan süreçleri sıralamak için önemlidir [272].

2.6.1. LoCD Sistemlerinin Fiziksel Altyapısı

LoCD sistemler, diskteki sıvı akışını manipüle etmek için santrifüjal (merkezkaç), Coriolis ve Euler kuvvetlerini kullanmaktadır. Bu üç kuvvet dönen bir referans çerçevesine göre yalancı kuvvetlerdir. Bu yalancı kuvvetlerin her birinin kendine özgü

özellikleri ve uygulamaları olmasına rağmen, bir diskteki sıvılar için ana itici güç, CD üzerinde yer alan kanallar ve odacıklardan sıvıyı diskin kenarlarına doğru açısally olarak iten merkezkaç kuvvetidir.

Bir parçacık veya sıvı birim hacmine etki eden merkezkaç kuvveti denklemi aşağıda ifade edilmektedir.

$$\vec{F}_\omega = \rho \vec{\omega} (\vec{\omega} \times \vec{r})$$

Burada ρ sıvı yoğunluğu, $\vec{r}$ sıvının diskin merkezine olan ortalama mesafesi ve $\vec{\omega}$ rad/s cinsinden açısal hızdır.

Coriolis kuvveti, dönen diskin hız vektörüne diktir. Birim hacim başına kuvvet denklemi aşağıda ifade edilmektedir.

$$\vec{F}_C = -2\rho \vec{\omega} \times \vec{u}$$

Burada ρ sıvı yoğunluğu, $\vec{\omega}$ rad/s cinsinden açısal hız ve $\vec{u}$ disk üzerinde hareket eden partikülün hız vektörüdür. Coriolis kuvveti, partikül ayırma uygulamalarında ve akış anahtarları tekniklerinde kullanılmaktadır [273].

Euler kuvveti merkezkaç kuvvetine diktir ve açısal ivme yönünün tersidir. Bu kuvvet yalnızca diskin açısal hızı zamana göre değiştiğinde üretilir.

Birim hacim başına kuvvet denklemi aşağıda ifade edilmektedir.

$$\vec{F}_E = -\rho \frac{d\vec{\omega}}{dt} \times \vec{r}$$

Burada ρ sıvı yoğunluğu, $\frac{d\vec{\omega}}{dt}$ birim zaman başına açısal hız değişimi ve $\vec{r}$ sıvının diskin merkezine olan ortalama mesafesidir. Euler kuvveti esas olarak numune homojenizasyonunu hızlandırmak için karıştırma uygulamalarında kullanılmaktadır. Çoğu durumda, sıvının disk üzerinde ilerletilmesi için sadece merkezkaç kuvveti kullanılır. Sıvı akış karakteristikleri sıvının özelliklerine (örneğin; yoğunluk ve viskozite), disk üzerindeki konumuna, diskin açısal hızına ve mikroakışkan özelliklerin geometrisine bağlıdır.

2.6.2. CD/Disk Üretimi

LoCD sistemlerinin başarılı bir şekilde benimsenmesi ve kullanımı, tek kullanımlık CD'lerin ucuz ve güvenilir üretim çözümlerine bağlıdır. Mikroakışkan diskler için kullanılan yaygın malzemeler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, polikarbonat, poli (metil metakrilat) (PMMA), siklik olefin polimeri (COP), polidimetilsiloksan (PDMS) ve poliüretan bulunmaktadır. LoCD sistemleri ile yapılacak optik algılamalar, genellikle optik kullanıma uygun maliyetli malzemeler gerektirmektedir. Bu malzemeler kalıplama, 3D baskı, laminasyon ve bilgisayarlı sayısal kontrol makinaları ile hızlı prototipleme için kullanılabilir ve bazıları seri üretim için enjeksiyonla kalıplanabilir. Hızlı prototipleme amacıyla, mikroakışkan diskler genellikle yapışkan ve sert plastik tabakaların birleştirilmesi ile üretilir [274]. Polikarbonat, PMMA veya COP Malzemeler bir freze makinesi kullanılarak istenilen özelliklerde kesilebilir. PDMS ve poliüretan malzemeler bir balmumu veya SU-8 kalıbı kullanılarak kalıplanabilir [275, 276]. PMMA bir lazer kullanılarak kesilebilirken, COP ve diğer ince tabaka formundaki diğer polimerler de kabartma veya mikro-termoform yöntemi ile şekillendirilebilmektedir [276, 277]. CD katmanlarını bir araya getirmek için lazerle bağlama [278], çözücü ile bağlama [279] termal bağlama [280] ve ultrasonik bağlama [281] gibi teknikler seri üretim ölçeğinde kullanılmıştır. Mikroakışkan CD sistemleri için kullanılan malzemelerin çoğu, açılal frekans kontrollü vanalar olan hidroforbik vanaların kullanım için yeterince uygundur. Disk yüzeylerinin daha hidrofilik olması gerektiği bazı durumlarda, malzeme oksijen plazması veya bir yüzey aktif madde kullanılarak yüzey işleme tabi tutulmalıdır. Bununla birlikte, oksijen plazma uygulaması imalat maliyetini arttırır ve genellikle hem plazma hem de yüzey aktif madde uygulaması CD'nin kısa raf ömrüne sahip olması ile sonuçlanmaktadır [282-285]. CD'de kullanılan reaktifler ve numunelerle de uyumlu olan daha kalıcı yüzey işlemleri üretmek için yeni çözümler kullanıma sunulmaktadır. PMMA yüzeylerine döndürerek kaplama yöntemi ile polivinil alkol (PVA) ve (hidroksipropil) metil selüloz (HPMC) uygulanması, 60 günden fazla süren sırasıyla 68° ila 22° ve 27 ° arasında bir temas açısı değışikliğı göstermiştir [286] .

2.6.3. Sıvı İletimi Teknikleri

2.6.3.1. Valf Teknikleri

Etkili valf teknolojileri, örnek-cevap analizlerinin merkezinde yer alır. Örneğın; liziz ve karışırma gibi işlemler sırasında sistemin geri kalanından izole edilen bir sıvı hacminin

tutulması, doğru alikotlamaya izin verilmesi ve sıcaklık değişimleri sırasında sıvı sızıntısının önlenmesi valf sistemleri ile gerçekleştirilir. Santrifüjal mikroakışkan sistemlerde valf teknikleri pasif, aktif ve yarı aktif olarak üç farklı kategoride sınıflandırılabilir. Pasif vanalar dönen diske uygulananlar dışında herhangi bir kuvvet kullanmazlar ve diskin kendisinin dönüşüyle çalıştırılırlar. Pasif bir vananın çalıştırılması, yüzey gerilimi ile diskteki sıvıya etki eden merkezkaç kuvveti arasındaki etkileşime bağlıdır. En yaygın pasif vanalar patlama (burst) vanalarıdır [275, 287]. Açısal hız yeterince yüksek olduğunda, merkezkaç kuvveti sıvının yüzey gerilimini aşar ve bir sonraki odacığa doğru patlamasına izin verir. Bu nedenle, vananın açıldığı açısal frekansa patlama frekansı da denir. Bazı pasif (pasif pnömatik veya sifon) valfler diskin dönme hızının düşürülmesi ile çalıştırılır [288]. Başka bir tür pasif vana, Coriolis vanası'dır ve disk dönme yönünün değiştirilmesi ile çalıştırılır [273]. Pasif vanaların imal edilmesi basit olmasına rağmen, bazı çeşitleri genellikle yüzeye plazma uygulaması yapılmak üzere hidrofilik bir yüzey işleme adımı gerektirir [288]. Bu yüzey işlemi genellikle cihazın raf ömrünü 18 ila 21 gün arasında bir süre ile sınırlamaktadır, oysa mevcut teşhis cihazları kullanımdan önce aylarca rafta kalabilmektedir. Buna ek olarak, üretim sürecindeki farklılıklar patlama frekansını diskten diske değiştirerek güvenilir bir protokolün uygulanmasını zorlaştırabilmektedir [286]. Aktif valfler, pasif valflerden daha yüksek güvenilirlik ve sağlamlık sağlayan harici bir çalışma mekanizması gerektirir. Bu vanaların çalışması, diskin açısal hızından bağımsızdır veya sadece kısmen bağlıdır. Harici çalışma mekanizmalarına örnek olarak ısı kaynakları, lazerler ve mıknatıslar verilebilir. Aktif valfin ana dezavantajı, platforma karmaşıklık ve maliyet ekleyen ek donanıma duyulan ihtiyaçtır. Yarı aktif valfler, pasif valflerden daha yüksek bir kontrol seviyesi sunan açısal hıza bağlı imal edilmesi basit ve yüzey işlemlerini içermeyen valflerdir. Valf işlevini yerine getirebilmek için kağıt gibi ek ucuz malzemeler sisteme entegre edilmektedir. Valfler bağlamında, sıvı valfleri ve buhar valflerini ayırt etmek önemlidir. Sıvı pasif valfler “kapalı” olduğunda, diskin akışkan ağı içinde buhar değişimini engellemezler. Aksine, bir buhar valfi hem sıvıyı hem de buharı yalıtır, ancak açıklıktan geçmelerine izin verir. Bazı buhar vanaları, disk üzerinde sıvı reaktif depolamak için kullanılabilecek kadar uzun raf ömrüne sahiptir, bu da bir teste başlamadan önce reaktifleri manuel olarak ekleme ihtiyacını ortadan kaldırır ancak cihazın ticari değerini arttırmaktadır.

2.6.3.1.1. Pasif Valfler

Pasif valfler, basitlikleri ve imalat kolaylığı nedeniyle avantajlı bir valf tekniğidir. Kılcal valfler, LoCD platformları üzerinde araştırılan ilk pasif valf tipidir ve sıvılar ile disk malzemeleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Bir sıvı hacmine uygulanan merkezkaç kuvveti, bu sıvının etrafındaki malzemeler tarafından uygulanan kılcal kuvvetin üstesinden geldiğinde, sıvı, akışkan özelliği sayesinde diskin merkezinden dışarıya doğru itilmektedir.

Başka bir tür pasif valf olan hidrofobik valf, sıvının diskin materyalleri ile etkileşimine bağlıdır ve kanalda bir hidrofobik yama veya bir daralma kullanır. Hidrofobik vanaların avantajı, maliyetli ve etkisiz olabilen hidrofilik yüzey işlemlerine ihtiyaç duymamasıdır.

Sifon valfi, bir mikroakışkan sistemde işlem zamanlamasının doğru bir şekilde yapılması zorunluluğunu beraberinde getirmektedir. Sıvı içeren bir odacığa bağlı bir sifon valfi, yine kılcal kuvvetlerin ve merkezkaç kuvvetlerinin etkileşimini kullanır. Diskin başlangıçtaki yüksek açısız hızlarında, kanaldaki sıvı seviyesi sifonun tepesinin altında kalır. Dönme hızı yeterince azaldığında, kılcal kuvvetler baskındır ve sıvı, sifonu doldurarak valfi aşmaktadır. Açısız hız tekrar arttırıldığında, hidrostatik basınç farkı odacıktaki sıvının tamamen boşaltılmasına yardımcı olur. Sifon valflerin geliştirilen bir başka modifikasyonu mikro makara valflerdir. Bu yöntemin çalışması için, bir örnek sıvısı, sıvısının transfer edileceği bir transfer odacığına bağlanan bir yükleme odacığı içerisinde yer almaktadır. İkinci bir çalışma sıvısı, transfer odacığının üst kısmından, çalışılan sıvının doldurulduğu odacığın üst kısmına bir kanal ile bağlanan bir odacığa doldurulur. İki sıvı arasındaki kanallar ve bölme havalandırmasıdır. Yüksek merkezkaç kuvveti altında, çalışma sıvısı bir toplama odacığı içerisine akmaya başlar. Çalışan sıvı kolonu ve iki sıvı arasındaki hava, sırasıyla bir kasnak sisteminin ağırlığı ve halatı gibi davranır. Çalışma sıvısı kolon yüksekliği azaldıkça, genişleyen hava, örnek sıvısını merkezkaç kuvvetine karşı diskin merkezine doğru çeken negatif bir basınç oluşturur [289].

2.6.3.1.2. Santifüjal-Pnömatik Sifon Valfler

Bu valfler, kan gibi yoğunluk farkı bulunduran karmaşık sıvıların dışarıdan herhangi bir çalıştırma mekanizmasına ihtiyaç duyulmadan kısa bir süre içinde CD dönüş hızının

kademeli olarak ayarlanması ve CD içerisinde yer alan odacıklarda havanın sıkıştırılarak sifon sistemi ile ayrıştırılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin; tam kandan plazma ayrıştırılması, hemogloblin ve eritrositlerin inhibe edici etkilerinden dolayı hassas analiz için gereklidir. Mevcut santrifüj yöntemleri hücrelerin yeniden emilmesini önlemek için sedimantasyondan sonra uzun yavaşlama fazları ve sifonların kılcal astarlanmasını sağlamak için hidrofilik yüzey işlemi gerektirmektedir. Bir santrifüjal-pnömatik sifon kullanılarak, kan örneği sedimantasyon odasına yüklendiğinde üstte kalan kısımda hava kapatılır ve sıkıştırılır. Sedimantasyondan sonra, dönme hızı sadece hafifçe azaltılır, böylece sıkıştırılmış hava genişler ve plazmayı bitişik bir sifondan hızla diğer tarafa aktarır. Diğer yöntemlerin aksine, plazma süpernatantı yüksek santrifüj hızlarına çıkarılarak ayrıştırılır, bu da kanın tekrar süspansiyon olmasını engellemekte ve yüksek saflıkta plazmanın elde edilmesini sağlamaktadır. Sifon için belirlenen bir “güvenlik mesafesi”, yüksek dönme frekanslarına yeterince hızlı ulaşamaması durumunda, sıvının sifon ile bağlı odacığa dolması sonucu hızlıca sifona bağlı kanallarda yükselmesini ve erken sifonlama gerçekleşmesini önlemektedir [290, 291].

2.6.3.1.3. Pasif Pnömatik Valfler

Merkezkaç kuvveti, mikroakışkan bir diskin merkezinden radyal olarak dışarıya doğru etki etmekte ve sıvılar diskin merkezine geri pompalanamayacağı için daha karmaşık LoCD sistemlerinin uygulamalarını problemli hale getirmektedirler. Bu sorunun üstesinden gelmek için, sıvıları merkezkaç kuvvetine karşı merkeze geri pompalamak ve akışkan ağın yol uzunluğunu genişletmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Sıvıyı diskin merkezine doğru geri pompalamak için bir hava sıkıştırma odası kullanılmaktadır [292]. Yapılan bir çalışmada sıvı, havayı hapsetmek, sıkıştırmak ve pnömatik enerji depolamak için 7000 RPM'de santrifüj edilmiştir. Diskin açısal frekansı düşürüldüğünde, sıkışan havanın hızla genişlediği ve sıvıyı diskin merkezine doğru ittiği görülmüştür. Bu yüksek ve düşük açısal frekans döngüsü, pistonlu bir pompa olarak işlev görmek için tekrarlanabilir. LoCD analizleri, patlama frekanslarıyla ilişkili olarak ortaya çıkan güvenilirlik sorunları nedeniyle tek başına pasif valfler kullanılarak gerçekleştirilememektedir. Ek olarak, pasif valfler genellikle buhar geçirmez bariyerler değildir. Bu özellik, pasif valfleri zamanla gerçekleşen buhar kaybı veya değişimi nedeniyle reaktif depolama için uygun olmayan bir hale getirmektedir. Sonuç olarak, diğer sıvı iletimi teknikleri genellikle daha yüksek bir akışkan kontrol seviyesi elde etmek için pasif valflerle birlikte kullanılmalıdır.

2.6.3.1.4. Aktif Valfler

2.6.3.1.4.1. Parafin Mum Valfleri

Parafin mumu, biyouyumluluğu ve kullanım kolaylığı nedeniyle çip bazlı mikroakışkan sistemlerde tercih edilen bir buhar valfi yöntemidir. Bir faz değiştirme valfi olarak kullanım rahatlığı ve kullanımı literatürde yer almaktadır [293, 294]. Parafin mum vanasını açmak için sadece bir ısı kaynağının açılması gerekir. Bu tekniğin avantajı, belirlenen bir açılma konuma yerleştirilen bir ısı kaynağı ile diskin dönmesi sırasında aynı yarıçapındaki tüm vanaların çalıştırılabilmesidir [295].

2.6.3.1.4.2. Aktif Pnömatik Valfler

Aktif basınca dayalı akışkan teknikler, oluşan hava boşluğunu genişleterek disk üzerinde yerleşik bir disk pompa mekanizmasını harekete geçirmek için basit bir yöntem sunmaktadır. Pasif pnömatik valf tekniklerinin aksine, [292, 296, 297] aktif valf ve pompalama teknikleri harici çalıştırma mekanizmalarını içermekte ve sıvının iletimi konusunda daha fazla kontrol sağlamaktadır.

2.6.3.1.4.3. Lazerle Çalışan Valfler

Plastik levhalar ve lazer yazıcı kullanılarak uygulanan optofluidik valfler mevcut ticari ekipmanlar ile kolay bir şekilde imal edilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, bu valfler sıvı ve buhar geçirmez olduğundan ve bir lazer kullanılarak açılması gerektiğinden, bu teknolojinin kullanım kolaylığı ve güvenilirliği yüksektir [298]. Disk üzerinde sıvı menisküsünü aydınlatmak için lazer ışınları kullanan ve suyu sonraki kanala patlamaya zorlayan bir tür optofluidik valf geliştirilmiş ve literatürde yerini almıştır [299].

2.6.3.1.4.4. Manyetik Valfler

CD'de bir valf çözümü olarak manyetizma, güvenilirliği ve çok yönlülüğü nedeniyle son zamanlarda birkaç grup tarafından araştırılmıştır. Yumuşak silikon elastomerik bir malzeme olan PDMS'den yapılmış bir mikroakışkan CD içinde tersinir bir sıvı akışı üretmek için harici mıknatıslar kullanılmıştır [300, 301]. Bu valflerin en büyük dezavantajı, diskin malzeme seçeneklerini sınırlayan yumuşak bir malzemenin kullanılması gerekliliğidir.

2.6.3.1.5. Yarı Aktif Valfler

Yarı aktif valfler kategorisinde sadece sınırlı sayıda yaklaşım gösterilmiş olmasına rağmen, bu valfler düşük maliyetleri ve uygulama kolaylıkları nedeniyle oldukça pratik olabilmektedir. Kılcal valfler gibi pasif valfler, bir mutlak patlama frekansı yerine olası patlama frekansları spektrumuna sahip olabilir. Yarı aktif valfler, alternatif bir malzeme veya bir gecikme mekanizması kullanarak disk yüzeylerinin tekrar üretilebilirliğine olan bağımlılığı azaltmaktadır. Sıvı iletimi görevlerinin daha karmaşık hale geldiği sistemlerde, sadece pasif valf tekniklerine kıyasla daha yüksek seviyede kontrol mekanizmaları sağlayabilmek için yarı aktif valfler eklenebilirler [272].

2.6.3.1.5.1. Çözünabilir Film Valfler

Biyouyumlu çözünabilir filmler kullanılarak yapılan bu valfler 2 farklı odacığın ticari olarak temin edilebilen, çözünabilir bir film şeridi içeren bir pnömatik odacığa bağlanması ve diskin düşük hızlarda döndürülmesi ile odacıklardan birinde sıkıştırılan hava boşluğunun yüksek hızlara çıkıldığında sıvıyı iterek pnömatik odacığa dolması ve filmi çözerek valfin açılmasını sağlaması prensibine dayanmaktadır [302]. Bu valf buhar geçirmez olmasa da, kılcal valflerden çok daha fazla kontrol imkanı sunmakta ve farklı çözünme hızlarına sahip filmlerin seçilebilmesine olanak sağlamaktadır.

2.6.3.1.5.2. Kağıt Valfler

Hidrofilik sifonların işlevini yerine getirmek için CD'ye yerleştirilmiş kağıt şeritler kullanılarak bir başka yarı aktif valf tipi oluşturulabilir. Bu tip bir valf açılma hızı kontrollü olmasına rağmen, kağıdın sıvıyı emme kabiliyeti geleneksel pasif valflere göre sıvı üzerinde daha fazla kontrol sağlanmasına sebep olmaktadır. Bir CD'deki kağıt mikroakışkanlar prensibi, sıvının kağıttan emilmesine izin veren kılcal kuvvetlerin ve sıvıyı sadece diskin dış kenarına doğru iten merkezkaç kuvvetinin etkileşmesine dayanmaktadır [303].

2.7. Portatif Bir Santrifüj Cihazı İçin Temel Presipler

Portatif bir santrifüj cihazının hafif, az yer kaplayan, kullanımı kolay, düşük enerji tüketimi sunması gerekliliklerinin yanı sıra santrifüj süreleri ve hızları için istenilen şekilde ayarlanabilmesine izin veren kontrol mekanizmalarından oluşması gerekmektedir. Bu sebep ile genel anlamda hobi amaçlı kullanılan Arduino Uno devre kartlarının ve bu kartlara bağlanabilen çeşitli elektronik komponentlerin portatif bir

santrifüj cihazı üretiminde kullanılması hem uygulama hem de maliyet açısından büyük kolaylıkları beraberinde getirmektedir. Arduino Uno devre kartı üzerindeki entegre 16MHz hızında çalışır ve 2KB belleğe sahiptir. 16 MHz basit elektronik devreleri kontrol etmek için yeterlidir. Devre kartı üzerinde numaralandırılmış giriş ve çıkış pinleri yer almaktadır. Bu pinleri kontrol etmek için devre kartı, bir USB kablo ile bilgisayara bağlanarak programlanır. Devre kartı üzerinde ayrıca birkaç led ışık bulunmaktadır. Bunlardan ilki Arduino'nun açık olduğunu gösteren 'on' etiketli leddir. Diğerleri 'L' etiketli ve işlevini tamamen kendinizin belirleyebileceği bir leddir. Geri kalan iki led ise 'RX' ve 'TX' etiketli ledlerdir. Bu ledler devre kartı ile bilgisayar arasında iletişim olduğunda seri bir şekilde yanıp sönerler. RX alım, TX ise gönderim anlamına gelir. USB yanındaki mini buton ise arduino'yu yeniden başlatmaya yaramaktadır. Arduino kodları iki temel kısımdan oluşur. **“void setup”** ve **“void loop”**. **void setup** kısmı Arduino'ya pinleri ne amaçla kullanacağımızı söylediğimiz bir nevi tanımlama aşamasıdır. **void loop** kısmında ise Arduino'nun sürekli tekrar etmesi gereken eylemleri yazılmaktadır. Void setup'ın kapsamı açılan köşeli parantez {} kapanıncaya kadardır. Aynı durum void loop içinde geçerlidir. **“PinMode”** komutuyla Arduino üzerindeki pinlerin giriş mi yoksa çıkış pinleri mi olacağına karar verilir. PinMode yazdıktan sonra pin numarası yazılır ve virgöl koyulur. Eğer pin çıkış olacaksa output, giriş olacaksa input yazılır. **“Delay”** komutu ise beklemedir. Arduino parantez içinde yazdığınız süre boyunca bekleyecektir. Süre dolduktan sonra ise alt satırdaki komutu yerine getirecektir. Örneğin; **delay(1000);** de süre milisaniye (ms) cinsinden yazılmıştır. 1000 ms=1sn dir. **“digitalWrite”**, **“digitalRead”** komutlarının yanında **“analogWrite”** ve **“analogRead”** komutları mevcuttur. Analog ve Digital arasındaki fark; digital sinyaller evet veya hayır gibi kesin iki sonuç verir. Örnek vermek gerekirse, eğer çalışma gerilimimiz 5V ise, bu durumda digital sinyallerin verebileceği ya 5V ya da 0V olur. Bu durumun Arduino'ya yansımaları digital sinyalleri kullandığımızda **“HIGH”** ve **“LOW”** komutlarını kullanmak zorunda olarak görürüz. Ancak 5-0 V arasında bir güç vermek istenildiğinde analog sinyal kullanılmalıdır. Analog sinyallerin de sınırının 5-0 volt arasında olmasına karşın, analog sinyal iki değer arasında sınırsız değer alabilmektedir. Arduino Uno asıl olarak analog sinyal çıkışı sağlayamasa da PWM (Pulse With Modulation) adı verilen yöntemle analog sinyalleri taklit eden digital sinyaller gönderebilir. PWM veya Darbe Genişlik Modülasyonu, basit bir şekilde anlatmak gerekirse oluşturulan darbelerin genişliğini ayarlamak için kullanılan tekniktir. Bunu sadece belirli pinler yapabilir. Bunlar 3, 5, 6, 9, 10, 11, pinlerdir. Bu pinler ile analogWrite komutu kullanılarak PWM dalgası göndermek

mümkündür. Analog sinyal değeri 0-255 arası olmalıdır. Örneğin `analogWrite(3,255);` komutu ile 3.pine %100(5v) güç verirken, `analogWrite(3,177)` 255'in yarısı 177 %50 (2.5v) güç verilir. Bu sayısal değerleri kullanarak bileşenlere değişken miktarlarda güçler verilebilmektedir. “**digitalRead**” ve “**analogRead**” ise bileşenlerden gelen gücün okunmasını sağlamaktadır. Ayrıca “**DutyCycle**” yani görev döngüsü olarak tanımlanan bir kavram bulunmaktadır ve PWM tekniğinde de sıkça kullanılmaktadır. Görev döngüsü kavramı yapılan işlemin periyodunu belirtir. Bu döngü düşük seviyelerde ise aktarılan güç düşük olurken, döngünün yüksek seviyelerinde yüksek güç aktarılmaktadır. “**If**”, “**else if**”, “**else**” komutları ile if bloğunun içine yazılan bir koşulun test edilmesi sağlanır. Eğer koşul sağlanıyor ise if bloğunun altındaki komuta geçer ve o komut çalıştırılır. Aksi durumlarda yani koşul sağlanmamış ise program if bloğuna girmemiş gibi davranmaya devam eder ve varsa alt satıra geçer. “**LiquidCrystal_I2C lcd()**”; LCD ekran için bağlantı adresidir. Bu komut Arduino Uno devre kartı üzerinde bulunan portlardan tasarruf edilmesini, kısacası daha az bağlantı kullanarak diğer bağlantı elemanlarına daha fazla yer açılmasını sağlayan komuttur. Bu komutu verebilmek için programda, “**<LiquidCrystal_I2C.h>**” kütüphanesinin kayıtlı ve tanımlı olması gerekmektedir. Portatif santrifüj cihazı için, Arduino devre kartı üzerinde; harici olarak sürülen DC motor, lcd ekran (motor üzerinde bulunan diskin dakikada kaç tur döndüğü (RPM) bilgisini öğrenebilmek amacı ile), transistör (motorun voltaj değişimi ile hız ayarını sağlayabilmek için), dirençler (led, transistör ve kondansatörün Arduino Uno portlarından çektiği gücü sınırlamak ve böylelikle devre elemanlarına gelebilecek zararları engellemek amacı ile), dc güç kaynağı (DC motoru sürebilmek için), kondansatör (motor üzerindeki gerilimi regüle edebilmek amacı ile), diyot (motorun durması sırasında oluşan ve transistöre zarar verebilecek ters akımı engellemek amacı ile) ve Hall Effect sensöründen (motor üzerinde dönen diskin dakikada dönüş hızı (RPM) değerini hesaplayabilmek amacı ile) oluşan devre elemanları kullanılabilmektedir. Bu sensör, bir Hall sensörü ve sensöre yakın mesafede dönen cisme tutturulmuş bir mıknatıstan oluşmaktadır. Dönüş sırasında mıknatıs, sensör yakınından geçtiğinde çevresindeki manyetik alanı değiştirerek sensörün çıktısının yükselmesine veya alçalmasına neden olur. Dolayısıyla, sensörden gelen çıktı, dönen bir cismin RPM'sini hesaplamak için kolayca kullanılabilen bir kare dalga sinyali vermektedir. Bu sinyal, kodlar yardımı ile anlamlandırılarak devre kartı üzerinden cihazın LCD ekranına iletelebilmektedir. Kurulan devre için gerekli uygulamaların yazılabilmesi amacı ile Arduino firması tarafından geliştirilen açık kaynak kodlu Arduino yazılım programı

kullanılabilmektedir [304]. Yazılan kodlar sayesinde devre kartına bağlı DC motor istenilen sürelerde ve belirlenen hızlarda döndürülebilmekte veya yazılıma eklenen kodlar ile dönüş hızları istenilen şekilde kademeli olarak ayarlanabilmektedir.

2.8. Karakterizasyon Teknikleri

Çeşitli malzemelerin fiziksel veya kimyasal özelliklerini, yapılarını ve çevreleri ile olan etkileşimlerini incelemek için karakterizasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır. Yapılan tez kapsamında sentezlenen floresan AuNC'lerin boyut ve şekil analizi "Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu (HR-TEM)" ile, AuNC'lerin oluşum mekanizmaları Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi "ATR – FTIR" ile, hazırlanan çözeltilerin pH değerleri ölçümleri pH Metre ile, AuNC'ler ve çözelti içerisinde çevreleri ile etkileşimleri "UV Görünür Bölge Spektroskopisi" ve "UV Işık Kaynağı Altında Emisyon" ile AuNC'lerin siyanürle etkileşimi "Akıllı Telefon" ile çekilen resimler üzerinden "Renk Değişimleri Ölçüm Uygulaması (Color Grab)" ve "MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)" ile karakterize edilmiştir.

2.8.1. Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu (HR-TEM)

TEM, enerjik elektronların (100-200kV değerinde hızlandırma voltajı ile) numune ile etkileşimini kullanan ve morfolojik, bileşimsel ve kristalografik bilgi sağlayan bir tekniktir. Filamentten yayılan elektron, çoklu elektromanyetik merceklerden geçer ve elektronların ışığa dönüştürüldüğü ve bir görüntü elde edildiği ekranla temas eder. Elektronların hızı doğrudan elektron dalga boyuyla ilişkilidir ve görüntü çözünürlüğünü belirler. Modern TEM bir aydınlatma sistemi, kondenser mercek sistemi, objektif mercek sistemi, büyütme sistemi ve veri kayıt sisteminden oluşur. Huzmeyi numuneye odaklayan bir kondenser mercek seti ve objektif mercek, numunenin numune ve form görüntüsü ile etkileştikten sonra tüm elektronları toplar ve görüntü çözünürlüğü sınırını belirler. Son olarak, bu görüntüyü büyüten ve fosforlu bir ekrana veya bir şarj bağlı cihaza (CCD) yansıtan bir dizi ara lens. TEM, görüntüleme ve kırınım modu için kullanılabilir. Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu (HR-TEM), bir girişim görüntüsü oluşturmak için hem iletilen hem de saçılan ışınları kullanır. Bu bir faz kontrast görüntüsüdür ve kristalin birim hücresi kadar küçük olabilir. Bu durumda, çok düşük açılardan giden modüle edilmiş elektron dalgaları, objektif mercek yoluyla yayılma sırasında girişim oluşturur. Numuneden çıkan tüm elektronlar, görüntü düzlemindeki bir

noktada birleştirilir. HR-TEM, atomik çözünürlük ölçeğinde çeşitli gelişmiş malzemelerdeki kristal yapıları ve kafes kusurlarını analiz etmek için kapsamlı ve başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Nokta kusurlarının karakterizasyonu, istifleme hataları, çıkıklar, tane sınırlarını ve yüzey yapılarını çöktmek için kullanılabilir.

2.8.2. Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (ATR - FTIR)

Zayıflatılmış toplam yansıma (ATR), ilave hazırlık olmaksızın doğrudan katı veya sıvı halde gözlemlenecek numuneleri niteleyen geleneksel kızılötesi spektroskopinin yanında kullanılan bir örnekleme tekniğidir. FTIR, 'Fourier dönüşümü kızılötesi' spektroskopisini temsil eder: bir sıvı, katı veya gaz örneğinin emisyonu veya emiliminin kızılötesi spektrumunu elde etmek için kullanılabilecek bir tekniktir. Bir FTIR spektrometresi, geniş bir aralıkta yüksek spektral çözünürlüklü verileri senkronize olarak toplar. Bu yöntem çok daha küçük dalga boyu aralığında spektral yoğunluğu ölçen geleneksel dispersif spektrometre yöntemlerine göre daha avantajlıdır. "Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi" terimi, ham verileri spektrumlara dönüştürmek için gereken Fourier dönüşümü sürecini temel alır. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

2.8.3. UV Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis)

Temel mantığı, hazırlanan çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından absorblandığının bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözelti tarafından soğurulur. UV UV-Vis spektrumu, çözeltinin içinden geçebilen -çözelti tarafından absorblanmayan- ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.

2.8.4. Color Grab

LOOMATIX firması tarafından çıkarılmış ve gerçek dünyada gördüğünüz her yerde renkleri yakalamayı kolaylaştıran taşınabilir bir renk sayısallaştırıcı uygulamasıdır. Uygulama kullanımı kolay olması için inşa edilmiş ve gerçek zamanlı olarak da çalışabilmektedir. Sadece yakalamak istenilen herhangi bir renk için akıllı telefonun

kamerası ile uygulama üzerinden fotoğraf çekilmesi veya daha önce çekilmiş bir fotoğrafın galeriden seçilmesi yeterlidir.

Diğer renk yakalama çözümlerinin aksine, Color Grab, herhangi bir doğrudan temas veya harici aksesuar olmadan, tüm yüzey ve ortamlarda her türlü nesneden renk seçimi sağlamaktadır. Color Grab, fotoğraflardan renk ve paletlerin çıkarılması için uygulama içerisinde yerleşik bir araç içerir ve akıllı tanımlama ile tüm renklerin sorunsuz bir şekilde seçilmesini sağlar. Buna ek olarak, fotoğrafların oluşturduğu renk paletini (veya renk haritasını) otomatik olarak hesaplayabilir.

Hemen hemen her renk temsil modelini destekleyen (RGB, Hex, HSV, HSL, Lab, vb.) bir yazılıma sahiptir. En önemlisi ise; ticari olsun ya da olmasın her türlü kullanım için ücretsizdir.

2.8.5. MALDI-TOF-MS Spektrometre Analizleri

Analiz için kristalize hale gelen örnekler lazer bombardımanına maruz kalır ve lazerden alınan bu enerji, karışımdan iyonların buharlaşmasına ve gaz fazına geçilmesini sağlar. Serbestleşen iyonlar elektromanyetik alanda hızlandırıldıktan sonra uçuş tüpüne geçerler ve uçuş tüpünde geçirdikleri zamana göre (TOF) kütle ağırlıkları tespit edilir. MALDI ile yapılan desorbsiyon sonucunda açığa çıkan iyonlar tek yüklü iyonlar olduğundan elde edilen pikler esas olarak kütleyle bağlıdır. Tez kapsamında AuNC ve siyanür etkileşimi analizi için kullanılan matriks, DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)dir. Matriks çözeltisinin 20 mg/mL DHB (0.1% TFA içeren asetonitril/su (30/70 (v/v)) şeklinde hazırlanmıştır. Her bir numune matriks ile 1:20 (v/v) oranında karıştırıldıktan sonra karışımdan 0.5 µl alınıp plaka üzerine damlatılarak kurutulmuştur.

2.8.6. UV Işık Kaynağı Altında Emisyon

Sentezlenen floresan AuNC'ler ve farklı ağır metal iyonları ve anyonlar ile etkileşimleri UV ışık kaynağı altında incelenmiştir.

2.8.7. Akıllı Telefon

Fotoğraf çekimi sırasında cetvel çukurlar içerisinde UV ışık kaynağı üzerinde kullanılan tüm örnekler 30 µL'dir. Tüm fotoğraflar cep telefonu arka kamerası (Huawei Mate 20 Lite / 20-megapixel (f/1.8) + 2-megapixel (f/1.8)) ile AI Mod kapalı olarak çekilmiştir.

2.8.8. pH Metre

pH, elektrik sinyali üreten bir araç (elektrot) kullanılarak pH metre cihazı sayesinde bu elektriksel sinyali, pH birimine çeviren potansiyometrik bir ölçümdür. Üretilen ve ölçülen sinyal bir voltajdır. pH ölçümünü yapabilmek için iki gerilime ihtiyaç vardır, pH ölçümü için gerekli olan elektriksel sinyal bu iki gerilim arasındaki fark ile oluşur. Bu iki gerilim şunlardır:

1. Algılama elektrotu ürün içindeki hidrojen iyon aktivitesinin logaritmasına oransal bir gerilim sağlar.
2. Referans elektrot ideal olarak ürünün aktivitesinden bağımsız sabit ve sürekli bir gerilim sağlar.

Referans ve algılama elektrotu arasındaki bu gerilim farkı pH metre tarafından ölçülür ve pH değerine çevrilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasının bu kısmında, öncelikle BSA stabilize AuNC'ler sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. AuNC çözeltisi hacimce 1:1, 1:10 ve 1:100 oranlarında yapılacak deney prosedürüne göre pH 12 / 0,01 M NaOH-NaHCO₃ veya pH 7.4 / 0,01 M PBS tampon çözeltisi (kan deneyleri için) içerisinde seyreltilmiş ve derişim oranının floresan sönüm şiddeti üzerine etkileri incelenmiştir. Deneyler öncelikle insan tam kan ortamını simüle etmek için amacı ile siyanür ile birlikte farklı anyonlar ve ağır metal iyonlarının 0,01 M NaOH-NaHCO₃ pH 12 tampon çözelti içerisine eklenmesi ile mM mertebesinde derişimler elde edilmesi ve bu çözeltilerin AuNC'ler ile muamele edilerek karakterize edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda AuNC'lerin seçiciliği ve duyarlılığı analiz edilmiştir. Ek olarak siyanür kan deneylerinde pH 7.4 / 0,01 M PBS tampon çözeltisi içerisine eklenmesi ile mg/L mertebesinde olacak şekilde siyanür tartımları gerçekleştirilmiş ve UV ışık kaynağı altında AuNC'lerin floresan ışımaları arasındaki renk farkları incelenmiştir. AuNC'lerin floresan şiddeti üzerindeki pH etkileri de ayrıca incelenmiştir. Ek olarak sistemin seçiciliğini arttırmak için, şelatlama ajanı olarak 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), BSA ve Glutasyon (GSH) etkisi de araştırılmıştır. Daha sonra siyanür ile AuNC etkileşimi, lazer yardımı ile kesilerek 5 farklı katmandan oluşan (3 katman PMMA ve 2 katman yapıştırıcı bant) mikroakışkan kanallara ve odacıklara sahip ve tam kandan plazma ayırıştırma işlevini yerine getiren CD üzerinde ayırıştırılan plazma içerisinde incelenmiş ve AuNC'lerin floresan renk değişimleri akıllı telefon ve renk farkı ölçüm uygulaması ile incelenmiştir.

3.1. Materyal ve Yöntemler

AuNC'lerin hazırlanması için kullanılan tüm malzemeler; HAuCl₄.3H₂O tuzu, Sığır Serum Albumin (BSA), KCN, 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), Glutasyon (GSH) NaHCO₃, NaOH, ve kan (Blood Agar (Base)) Sigma Aldrich firmasından (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. Diğer metal iyonları tuzları ve diğer reaktiflerin hepsi (CN⁻, S²⁻, CO₃²⁻, NO²⁻, Cl⁻, NO₃⁻, EDTA²⁻, Ac⁻, N₃⁻, PO₄³⁻, Sitrat, C₂O₄²⁻ ve F⁻, SO₄²⁻, Ni²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ ve Al³⁺) Hacettepe Üniversitesi Kimya Deposu'ndan kullanım izni ile yeterli miktarlarda alınmıştır. Deneylerde kullanılan (DI) su, AquaMAX Ultra 370 Serisi cihaz ile arıtılmıştır. UV-Vis spektroskopisi verileri NanoDrop 1000 (Thermoscientific) spektrometre kullanılarak oda sıcaklığında elde edilmiştir. HR-TEM analizleri FEG elektron tabancalı, 80-200 kV

aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan JEOL marka JEM 2100F model Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. 4000 and 650 cm^{-1} arasında kızıl ötesi spektrumları ATR-FTIR (Agilent Cary 630) ile belirlenmiştir. pH değerleri pH metre (ISOLAB Laborgeräte GmbH) kullanılarak ayarlanmıştır. Siyanür varlığında ve yokluğunda AuNC'lerin moleküler ağırlıkları MALDI-TOF MS cihazı (Ultraflex extreme MALDI-TOF-MS, Bruker Daltonics) ve DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) matriks kullanılarak incelenmiştir. Deneyler boyunca elde edilen görüntüler (AuNC ve AuNC'lerin diğer malzemeler ile etkileşimleri) Huawei Mate 20 Lite (20-megapixel (f/1.8) + 2-megapixel (f/1.8)) Android işletim sistemine sahip (sürüm: 10) akıllı telefon yardımı ile eşit mesafeden 2,5x zoom ve 1,6x zoom ile çekilmiştir. Fotoğrafları çekilecek AuNC'ler UV ışık kaynağı (Biolab BTS-15.M, 312 nm) yardımı ile UV ışığa maruz bırakılmıştır. Elde edilen resimler Color Grab (Loomatix Ltd.) programı ile incelenmiştir. Portatif santrifüj cihazı ve RPM kontrolü sağlayan yazılım Arduino UNO devre kartı ve gerekli elektronik komponentler (Gözeler Elektronik (Türkiye)) kullanılarak Uğur Aydın tarafından yapılmıştır. PMMA CD tabakaları 70 watt gücünde cam tüplü CO₂ lazer (Aeon Nova 7) kullanılarak kesilmiştir. CD orta katmanı kesilmeden önce PMMA plakanın yüzeyi her iki daha sonra diğer katmanlar ile birleştirilmek üzere çift taraflı bantla 468MP (3M) kaplanmıştır.

3.2. BSA Stabilize AuNC'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Tüm cam malzemeler kullanımdan hemen önce hazırlanmış Kral Suyu (*Aqua Regia*) çözeltisi (HNO₃/HCl, hacimce 1:3) ile yıkanmış daha sonra DI su ile durulanmış ve deneylerden önce istenmeyen çekirdeklenmeleri önlemek için kurutulmuştur. 37° C'de kuvvetli karıştırma altında 5 ml 10 mM sulu HAuCl₄.3H₂O çözeltisine 5 ml 50 mg/ml BSA çözeltisi ilave edilmiştir. 2 dakika sonra, pH'yı ayarlamak ve AuNCs oluşumunu başlatmak için çözeltiye 0.5 ml 1 M NaOH eklenmiştir. Reaksiyonun 37° C sıcaklıkta 12 saat boyunca kuvvetli bir karıştırma altında devam etmesi sağlanmıştır. AuNC'lerin sentezinde BSA, stabilize edici ajan olarak görev almaktadır. AuNC'ler, BSA yüzeyinde yer alan sistein kalıntılarının (rezidülerinin) tiyol (-SH) grupları ile kovalent olarak etkileşim göstermektedir [242]. Sentez sırasında çözeltinin pH'sını ayarlamak için kullanılan NaOH, BSA'nın ikincil yapısında konformasyonel değişikliklere sebep olarak Au atomlarının BSA içerisinde bir araya toplanmasını (paketlenmesini) [164] sağlamakta ve böylelikle AuNC oluşumunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca çözeltiye eklenen NaOH ile oluşturulan yüksek alkalik pH'da Au (III) iyonları, Au (I) iyonlarına indirgenmektedir.

Au (I)'den Au (0)'a olan son indirgenme basamağı ise BSA üzerinde yer alan tirozin kalıntıları ile sağlanmaktadır. Düşük pH'larda BSA ikincil yapısı içinde işlevsel olmayan disülfid bağları, yüksek alkalın pH'da güçlü Au-S bağları oluşturmak için uygun hale gelmekte ve BSA'nın altın atomlarını sarmalayarak, AuNC'leri oluşturması ve bir arada tutmasına olanak sağlamaktadır.

Sentez sonrası çözeltinin rengi açık sarıdan koyu kahverengiye değişmiştir. BSA stabilize AuNC'lerin sentezinden sonra, çözelti 0.2 µm gözenek boyutlu bir filtreden süzölmüş ve kullanılmadığında 4° C'de saklanmıştır. Hazırlanan BSA stabilize AuNC'ler'in şekil ve boyut analizi HR-TEM, absorbans şiddeti değişimleri UV-Vis Spektroskopi, yapısal değişimleri ATR-FTIR, kümelene başına ortalama atom sayıları ve siyanür varlığında sönümlenme mekanizmaları ise MALDI-TOF-MS spektrumları ile analiz edilmiştir.

3.3. Sönümlenme Mekanizmasına pH ve Derişimin Etkisi

Tam kandan plazma örnekleri için tam kanın hemolizini ortadan kaldırmak adına siyanürün plazma içerisinde AuNC'leri sönümlenme etkisini araştırmak için pH 7,4 PBS tamponu kullanmaya karar verilmiştir. CN⁻ yokluğunda ve varlığında AuNC'lerin sönümlenme mekanizması üzerindeki pH etkisi hakkında birçok çalışma literatürde mevcuttur. Bu sebeple literatürde tarif edilen 2 farklı tampon da (pH 7,4 PBS ve pH 12 NaOH-NaHCO₃) ayrı ayrı incelenmiştir. Farklı derişimlerde CN⁻ (0.25, 1, 5, 10) x 10⁻⁶ M varlığında farklı derişimlerde AuNC'lerin (1:1, 1:10 ve 1:100) sönümlenme ile renk farkları ve UV-Vis spektroskopi çıktıları analiz edilmiştir. Ayrıca tampon çözelti içerisinde (pH 12 ve pH 7,4) ve ayrıca insan tam kanından plazma örnekleri içerisinde farklı derişimlerde CN⁻ (0.1, 1, 3, 5) mg/L derişimlerinin sönümlenme kaynaklı renk değişimleri Color Grab uygulaması ile akıllı telefon ile çekilen görüntüler üzerinden incelenmiştir.

3.4. Siyanür ve Farklı Maddelerin Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi ve Sistemin Seçiciliğinin İncelenmesi

İnsan tam kanından elde edilecek plazma örneklerinin AuNC'ler üzerindeki sönümlenme etkisini test etmeden önce; kan ortamına benzer bir ortam oluşturabilmek amacı ile 0.01 M, pH 12NaOH-NaHCO₃ tamponu içerisinde CN⁻ ve diğer metal iyon tuzları (Ni²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Al³⁺), metal iyonlarından oluşan karışım (K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ and Al³⁺) ve diğer yaygın anyonlar (S²⁻, CO₃²⁻,

NO_2^- , Cl^- , NO_3^- , EDTA^{2-} , Ac^- , N_3^- , PO_4^{3-} , Sitrat, $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ve F^- , SO_4^{2-}) ayrı ayrı hazırlanmıştır. İstenen derişimlerde KCN çözeltisi, stok çözeltisinin seri seyreltilmesiyle elde edilmiştir. CN^- çözeltileri, metal iyonları ve anyonlar 0.01 M, pH 12 NaOH- NaHCO_3 tamponunda AuNCs çözeltisine ilave edilmiş; nihai çözeltiler literatürde tarif edildiği gibi [240] ölçümlerden önce 20 dakika beklenerek (siyanür-AuNC ideal etkileşim süresi) analizler gerçekleştirilmiştir. UV-Vis spektroskopi ölçümleri, MALDI-TOF-MS spektrum analizleri ve UV ışık kaynağı altında renk farkları incelenmiştir.

3.5. AuNC-Siyanür Spesifitesinin İncelenmesi

AuNC etkileşimi için test edilecek metal iyon tuzları ve anyonların AuNC'lerin sönümlenmesine yapacakları katkıyı en aza indirmek ve sistemin siyanür spesifitesini arttırmak adına şelatlayıcı ajan olarak; 2 mM 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), 0,4 mg/mL BSA ve 0,4 mM Glutatyon'un (GSH) çözeltiye eklenmesi ile siyanür dışındaki maddelerin AuNC'lerin floresan şiddeti üzerine etkileri ayrıca UV-Vis spektroskopi ve UV ışık kaynağı altında renk farkı analizi ile incelenmiştir.

3.6. Siyanür Ölçüm Limiti ve Ölçüm Doğruluğunun İncelenmesi

Sistemin hassasiyetini anlamak için pH 12 NaOH- NaHCO_3 tamponunda artan CN^- (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10) $\times 10^{-6}$ M derişimlerinin eklenmesiyle UV-Vis spektrumlarındaki değişiklikler analiz edilmiştir. Absorbsiyon değerleri Stern-Volmer denkleminde uygulanmış ve denklemin grafiği çizdirilerek CN^- yokluğunda ve varlığında sönümlenme ve derişim arasındaki korelasyon incelenmiştir. Stern-Volmer Eşitliği aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q]$$

Burada K_{SV} Stern-Volmer sönüm katsayısıdır ve yukarıda yer alan denklemin eğimi hesaplanarak bulunmaktadır. $[Q]$ ise analit derişimidir.

3.7. Color Grab Renk Değişimi İncelenmesi

Akıllı telefon ile çekilen resimler üzerinden yapılan analizlerde renk AuNC'lerin sönümlenme mekanizmalarından kaynaklı renk derişimleri için $L^*a^*b^*$ renk sistemi üzerinden değerler sunan Color Grab uygulamasından faydalanılmıştır. $L^*a^*b^*$ renk derişimleri tıpkı coğrafik koordinat sisteminde olduğu gibi (enlem, boylam ve yükseklik)

her bir rengin tek bir nokta ile temsil edildiği koordinat sistemidir. Bu yüzden her bir rengi renk uzayında tanımlayabilmek için üç bileşen(reng koordinat değerleri) gereklidir.

L^* – Açıklık koordinatıdır, ($L^*=0$ siyahı gösterir ve $L^*=100$ beyazdır)

a^* – kırmızı/yeşil koordinatıdır, $+a^*$ kırmızıyı, $-a^*$ ise yeşili belirtir

b^* – sarı/mavi koordinatıdır ve $+b^*$ sarıyı, $-b^*$ ise maviyi belirtir.

2 resim veya obje arasında renk farkı analizi yapabilmek adına kullanılan denklem aşağıda ifade edilmektedir.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}$$

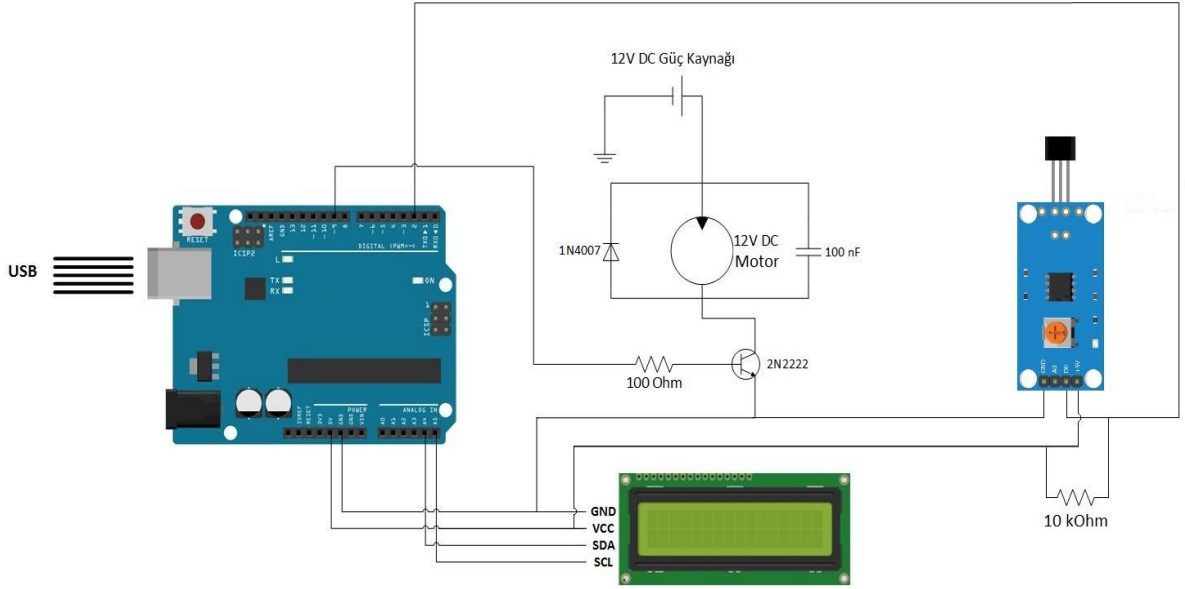
$L^*a^*b^*$ renk değerleri, ölçüm ve renk iletişimde için en çok kullanılan yöntemdir. $L^*a^*b^*$ değerleri insan gözü algılamasına yakın olarak tasarlanmıştır. İnsan gözünün algılayabildiği tüm renkleri tanımlar. Tüm dünyada, tekstil, boya, plastik, kağıt, basıklı malzeme ve benzeri cisimlerde renk kontrolü yapmak için çok sık kullanılır.

3.8. Portatif Santrifüj Cihazının Tasarımı ve Üretimi

Tez kapsamında;

- taşınabilir,
- hafif,
- az yer kaplayan,
- USB kablosu ile bilgisayara bağlanabilen ve kumanda edilebilen,
- kontrol ünitesi yardımı ile (500-6500) RPM aralığında dönüş hızı ayarlanabilen,
- programlanabilir,

bir santrifüj cihazı öncelikle 3 boyutlu olarak tasarlanmış ve Arduino UNO devre kartı kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Portatif Santrifüj Cihazı İçin Kullanılan Devre Şeması.

Geliştirilen portatif santrifüj cihazı 12.5 cm x 18 cm boyutlarındadır ve üzerinde RPM Göstergesi olarak 2x16 LED ekran içeren içermektedir. Cihazın RPM kontrolü programlaması için aşağıda yer alan kodlar kullanılmıştır.

```
#include <LiquidCrystal_I2C.h>

#include <Wire.h>

#include "HCMotor.h"

int MOTOR_PIN = 9;

int Speed;

int SpeedAct;

int i;

HCMotor HCMotor;

LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 2, 1, 0, 4, 5, 6, 7, 3, POSITIVE);

const int dataIN = 2;

unsigned long prevmillis;

unsigned long duration;
```

```

unsigned long lcdrefresh;

int rpm;

boolean currentstate;

boolean prevstate;

volatile byte rpmcount;

unsigned long timeold;

void setup() {

  pinMode(dataIN,INPUT);

  lcd.begin(16,2);

  prevmillis = 0;

  prevstate = LOW;

  HCMotor.Init();

  HCMotor.attach(0, DCMOTOR, MOTOR_PIN);

  HCMotor.DutyCycle(0, 100);

}

void loop()

{

  currentstate = digitalRead(dataIN);

  if( prevstate != currentstate)

  {

    if( currentstate == HIGH )

    {

      duration = ( micros() - prevmillis );

      rpm = (60000000/duration); // rpm = (1/ time millis)*1000*1000*60;

      prevmillis = micros();

    }

  }

}

```

```

}

prevstate = currentstate;

if( ( millis()-lcdrefresh ) >= 100 )

{

lcd.clear();

lcd.setCursor(0,0);

lcd.print("Speed of Motor");

lcd.setCursor(0,1);

lcd.print("RPM = ");

lcd.print(rpm);

lcdrefresh = millis();

i++;

if (i < 150)

Speed = 100;

else if (i < 300)

Speed = 15;

else Speed = 0;

HCMotor.OnTime(0, Speed);

}

}

void rpm_fun()

{

rpmcount++;

}

```

Yukarıda yer alan bazı kodların ne anlama geldiklerini kısaca belirtmek gerekirse;

```
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
```

#include <Wire.h>

#include "HCMotor.h" Motor, LCD ekran ve devre kartı üzerindeki bağlantıların çalışabilmesi için gerekli tanımlamaları sağlayan program kütüphanelerinin kullanılması gerektiğini devre kartına bildiren komutlardır.

int MOTOR_PIN = 9; Motor kontrolü için gerekli bağlantının devre kartı üzerinde 9 numaralı pin'e yönlendirildiğini belirten komuttur.

LiquidCrystal_I2C lcd(0x27, 2, 1, 0, 4, 5, 6, 7, 3, POSITIVE); Devre kartının LCD ekranı I2C protokolüne göre tanınması gerektiğini belirten komuttur.

const int dataIN = 2; Motor üzerinde bulunan CD'nin dakikada dönüş sayısı (rpm) değerini okuyacak olan IR Sensörün pin 2'ye yönlendirildiğini belirten komuttur.

lcd.begin(16, 2); 16x2 LCD ekranın tanımlanmasını sağlayan komuttur.

HCMotor.Init(); Motorun çalışmasını sağlayacak program kütüphanesini belirten komuttur.

HCMotor.DutyCycle(0, 100); Yapılan işlemin periyodunu belirtir. Bu döngü düşük seviyelerde ise aktarılan güç düşük olurken, döngünün yüksek seviyelerinde yüksek güç aktarılmaktadır.

Sifon sistemli CD geometrisi için, belirlenen sürelerde CD'nin hızlanması ve yavaşlaması aşağıdaki komutlar ile sağlanabilmektedir.

i++;

if (i < 150)

Speed = 100;

else if (i < 300)

Speed = 15;

else Speed = 0;

3.9. Hızlı Plazma Ayrımı için Çok Katmanlı Mikroakışkan CD/Disk Tasarımı

İnsan tam kanından plazma ayrıştırılması işleminde kullanılacak CD için birçok farklı geometri denenmiş ve en uygun sonuçları veren geometri, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir [305].

$$\omega = \sqrt{\frac{\left(\frac{V_T}{V_T - V_D} - 1\right) P_T}{\rho \bar{r} \Delta r}}$$

Burada ω açısal frekans (rad/sn), Δr sıvı seviyesi farkı ($r_i - r_o$), r_i iç yarıçap (pnömatik haznedeki sıvı seviyesinden merkeze olan mesafe), r_o dış yarıçap (sifonun ayrışma odacığına bağlandığı noktadan merkeze uzaklığı), ρ sıvı yoğunluğu (kan), V_T atmosferik basınç altında sıkıştırılmış hava hacmi, V_D pnömatik odaya doldurulan sıvı hacmi, $\bar{r}$ ortalama radyal konum ve P_T atmosferik basınçtır.

Çizelge 3.1. Pnömatik Sifon Valf İçeren Mikroakışkan CD Sistemi İçin Hesaplanan Değerler.

r_i = İç Yarıçap (mm)	r_o =Dış Yarıçap (mm)	ρ =Sıvı Yoğunluğu (kg/m ³)	Δr	V_T = Atm Basıncıta Kapalı Kalan Gaz Hacmi	V_D =Pneumatik Çembere Giren Sıvı Hacmi (μl)	P_T	ω =Açısal Frekans (rad/sn)	RPM
0,02933	0,03293	1025	0,0036	311,05	63,68	101.325	476,52268	4550,458
r_{ort}								
0,03113								
r_i = İç Yarıçap (mm)	r_o =Dış Yarıçap (mm)	ρ =Sıvı Yoğunluğu (kg/m ³)	Δr	V_T = Atm Basıncıta Kapalı Kalan Gaz Hacmi	V_D =Pneumatik Çembere Giren Sıvı Hacmi (μl)	P_T	ω =Açısal Frekans (rad/sn)	RPM
0,02933	0,03293	1025	0,0036	311,05	1	101.325	53,33836	509,344
r_{ort}								
0,03113								

CD, 1,5 mm kalınlık ve 120 mm çap boyutlarında 3 ayrı PMMA katmanı ve 130 μm kalınlık ve 120 mm çapa sahip 2 çift taraflı yapışkan bant katmanı içermek üzere toplam 5 katmandan oluşur. CD katmanlarının birleştirilmesi için çift taraflı yapışkan bantların kullanılmasının ardından en az 36 saat CD'ler preslenmiştir. PMMA'nın en alt tabakası, işlevsel kanal veya delik içermeyen (vida delikleri haricinde) destekleyici bir platform görevi görür, PMMA'nın orta tabakası; dolum, ayrıştırma, pnömatik, plazma toplama (toplamda 100 μL hacimde ve içerisinde 50 μL AuNC çözeltisi içeren) ve karşılaştırma (içerisinde toplamda 100 μL tampon çözelti ve AuNC çözeltisi karışımı (1:1) içeren) olmak üzere 5 farklı odacığa ve tam kanı yükleme odasından ayrıştırma odasına taşımak

için 200 µm genişliğinde bir kanal ile ayrıştırma işlemi sonrası plazmayı, plazma toplama odacığına iletmek amacı ile 500 µm genişliğinde bir kanala sahiptir. Karşılaştırma odacığı, plazma toplama kanalında tam kandan ayrıştırılarak elde edilen ve AuNC'ler ile karışan toplam hacmin, plazma olmadığı durumda AuNC'lerin yaydığı floresan renk ile karşılaştırılmasını (akıllı telefon ve Color Grab uygulaması) sağlamak amacı ile oluşturulmuştur. Son olarak PMMA'nın üst tabakasında kan dolumu için delikler ve gerekli basıncın ayarlanması ve dolum esnasında hava kabarcıkları oluşmasını engellemek amacı ile havalandırma delikleri bulunmaktadır.

3.10. Lab on a CD/Disk Üzerinde Siyanür Denemeleri

CD üzerinde plazma ayrıştırma işlemi için toplamda 200 µL olacak şekilde, pH 7,4 0,01 M PBS tampon içerisinde 0,1, 1, 3, 5 mg/L siyanür ile muamele edilmiş tam kan kullanılmıştır. Yükleme odalarındaki farklı derişimlerde siyanür içeren toplam 200 µL tam kan örnekleri, CD 5000 RPM'ye ulaşana kadar sedimentasyon odasına geçer. Pnömatik odacık ve plazma toplama odacığı birbirine 500 µm genişliğinde bir kanal ile bağlıdır ve bu 2 odacık arasında belirlenen yükseklikte bir santrifüjal pnömatik sifon valfi bulunmaktadır. Saniyeler içinde CD 5000 RPM'ye ulaşır ve merkezkaç kuvveti kanın sifondan kaçarak plazma toplama odacığına geçmesini önleyerek sifon üzerinde bir güvenlik aralığı oluşumunu sağlar. Sifondan geçemeyen tam kan tamamıyla ayrıştırma odacığına ilerler. Ayrıştırma odacığında ise artan kan seviyesi 200 µm genişliğindeki kanaldan pnömatik odacığa geçer ve üzerinde kalan havayı sıkıştırır. Tam kan, bileşenlerine 15 saniye içinde ayrılır. Merkezkaç kuvveti, pnömatik haznedeki hapsolmuş havanın yardımıyla kana uygulanan kuvvetten daha büyüktür. 15 saniye sonra CD dönüş hızı 500 RPM'ye düşürülür ve sıkışan havanın merkezkaç kuvvetini yenmesi sağlanır. Genişleyen hava basıncı, önceden sıkıştırılmış, ayrıştırılmış kan plazmasını itmeye başlar ve sifon, güvenlik aralığını aşarak 50 µL plazmayı 50 µL AuNC içeren plazma toplama odacığına toplam hacim 100 µL olacak şekilde doldurur. Toplam 30 saniye içerisinde işlem sonlanmaktadır ancak siyanürün AuNC'ler üzerindeki sönümleme etkisini tam olarak inceleyebilmek adına 20 dakika (siyanür-AuNC ideal etkileşim süresi) beklenmiştir. Daha sonra CD, UV ışık kaynağı üzerine alınmış ve akıllı telefon yardımı ile eşit mesafelerden (destek üzerinde) resimleri çekilerek renk farkı değerleri Color Grab uygulaması üzerinden değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan tez çalışması kapsamında BSA stabilize AuNC'ler sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. AuNC'lerin siyanüre spesifitesini ve seçiliğini ölçmek amacı ile farklı metal iyon tuzları ve anyonların siyanür ile birlikte AuNC'lere olan ilgileri izlenmiş ve sönümlleme mekanizmaları çıkarılmıştır. Tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilen ilk deneyler sonrasında plazma çalışmaları için tam kandan plazma ayırıştırmasını gerçekleştirecek mikroakışkan CD platformu ve portatif bir santrifüj cihazı tasarlanarak üretilmiş ve yine gerekli karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Son olarak akıllı telefon ve renk farkı değerlerini veren uygulama sayesinde siyanürün plazma içerisinde AuNC'ler üzerindeki sönümlleme renk farkları üzerinden ölçüm limit skalası çıkarılmıştır.

Tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilen deneylerde kullanılan siyanür ve diğer tüm malzemelere ait birimler Molar (M) cinsindendir. Bunun sebebi literatürde yer alan AuNCs-siyanür etkileşimlerinin genel olarak içme sularındaki siyanür seviyelerini belirlemeye yönelik olması ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilen ve içme sularında bulunması gereken maksimum siyanir miktarının yine Molar cinsinden belirtilmesidir. Literatüre yapılacak atıflar ve karşılaştırmaların daha rahat anlaşılabilmesi amacı ile tampon çözeltiler içerisinde gerçekleştirilen deneyler tez çalışması kapsamında da Molar cinsinden belirtilmiştir [240, 306, 307].

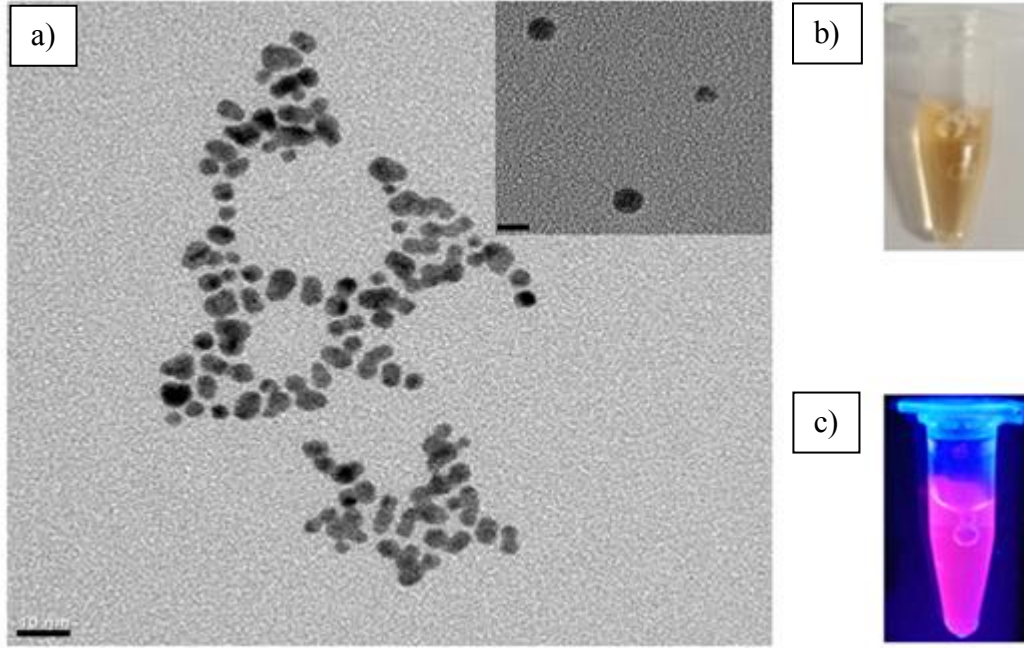
Ek olarak kan ile yapılan çalışmalarda ise yine literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda mg/L cinsinden olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple kan ile yapılan deneylerde yine literatüre yapılacak atıf ve karşılaştırmaların daha anlaşılır bir şekilde değerlendirilebilmesi için mg/L birim olarak tez kapsamında kullanılmıştır [9, 12, 15-17].

4.1. BSA Stabilize AuNC'lerin Karakterizasyonu

Sentezlenen AuNC'ler'in boyut ve şekil analizi HR-TEM ile yapılmıştır. Ayrıca ATR-FTIR ile BSA ve BSA stabilize AuNC'lerin kızıl ötesi spektrumda analizleri gerçekleştirilmiş ve BSA stabilize AuNC'lerin nasıl oluştuğu hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

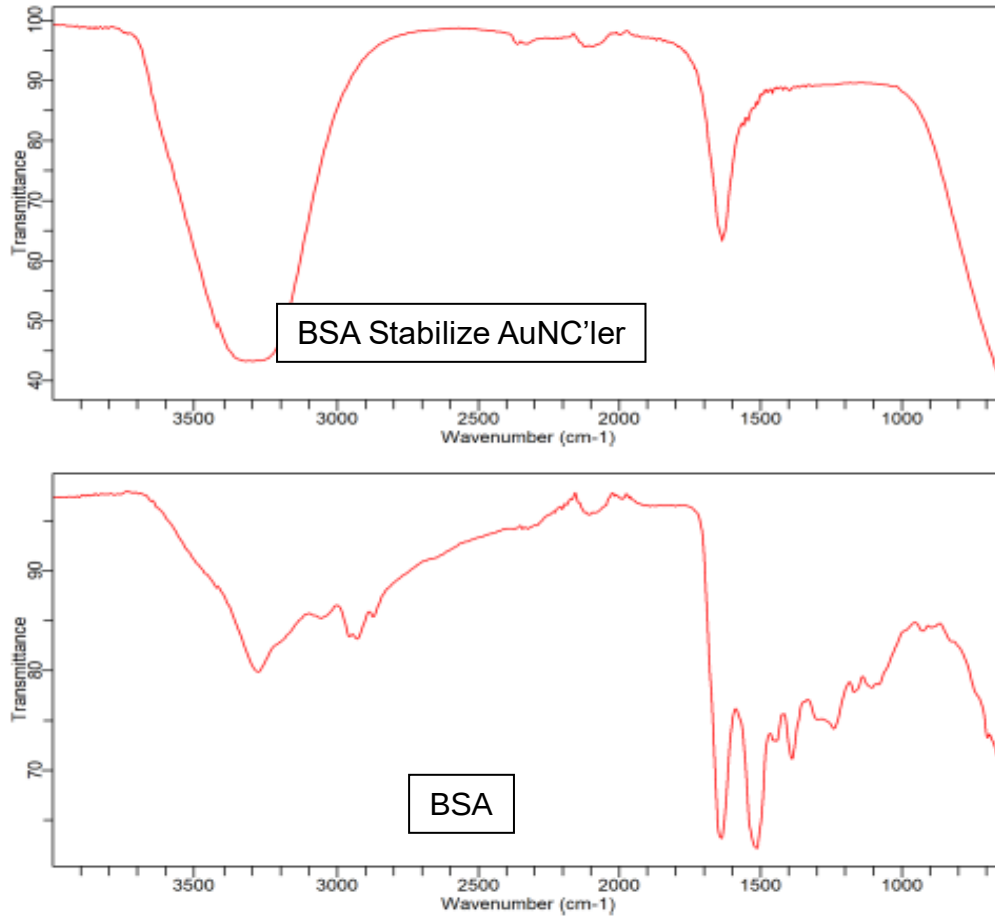
4.1.1. BSA Stabilize AuNC'lerin HR-TEM Analizleri

BSA stabilize AuNC'lerin HR-TEM analizi sonucunda 3-5 nm boyut dağılımına sahip küresel şekilde oldukları analiz edilmiştir. 10 nm skalasındaki HR-TEM görüntüsünde çoğunlukla elektron ışını altında parçacık birleşmesinden kaynaklı kümelenmeler görülürken, 5 nm skalasındaki iç resimde AuNC'lerin şekil yapısı daha net gözlemlenebilmektedir.



Şekil 4.1. BSA Stabilize Floresan AuNC'lerin a) 10 nm ve 5 nm (İç Resim) Skalalarında HR-TEM Görüntüleri İle b) Gün Işığında ve c) UV Işık Kaynağı Altında Görüntüleri.

4.1.2. BSA Stabilize AuNC'lerin ATR-FTIR Analizleri



Şekil 4.2. BSA Stabilize Floresan AuNC'lerin ATR-FTIR Spektrumları.

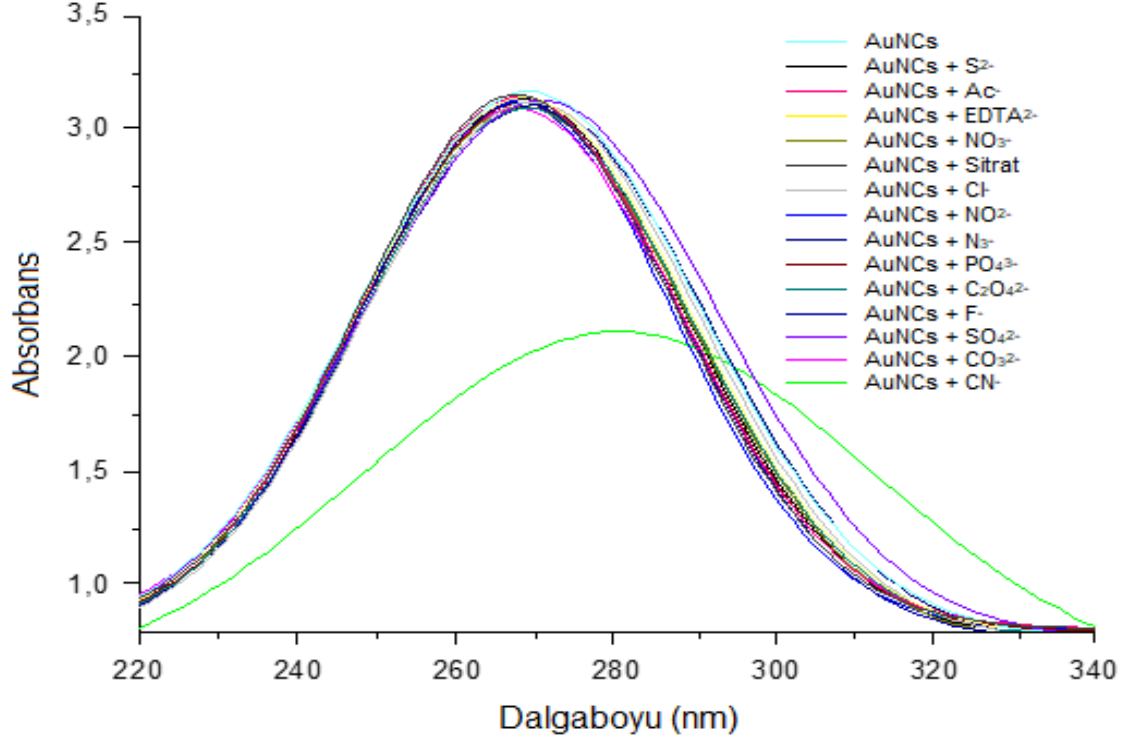
3280 cm^{-1} deki görülen bant BSA'nın O-H/N-H gerilme frekanslarıdır. BSA'nın titreşim bantları, şiddetinde bir azalma meydana gelmekle birlikte BSA stabilize AuNC'lerde hala mevcuttur. 1660 cm^{-1} 'deki pik, temel olarak C=O gerilme titreşimleri ile birlikte faz dışı C-N gerilme titreşimlerine bağlı karakteristik amid bandıdır. 1600-1700 cm^{-1} arasındaki amid I bant bölgesi, proteinin ikincil α -heliks yapısı hakkında daha fazla bilgi vermektedir. Amid I bandının hafifçe genişlemesi, BSA stabilize AuNC'lerin oluşumu sırasında meydana gelen proteinin ikincil yapısındaki değişikliği temsil etmektedir [308].

4.2 Siyanür ve 13 Farklı Anyonun Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi ve Sistemin Seçiciliğinin İncelenmesi

Deneyler pH 12 0,01 M NaOH-NaHCO₃ tampon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. AuNC'ler üzerindeki floresan sönümlenme etkilerinin net olarak gözlemlenebilmesi adına,

kullanılan tüm anyonlar, siyanür derişimine (5×10^{-6} M) göre 20 kat fazla olacak şekilde deneylerde kullanılmıştır.

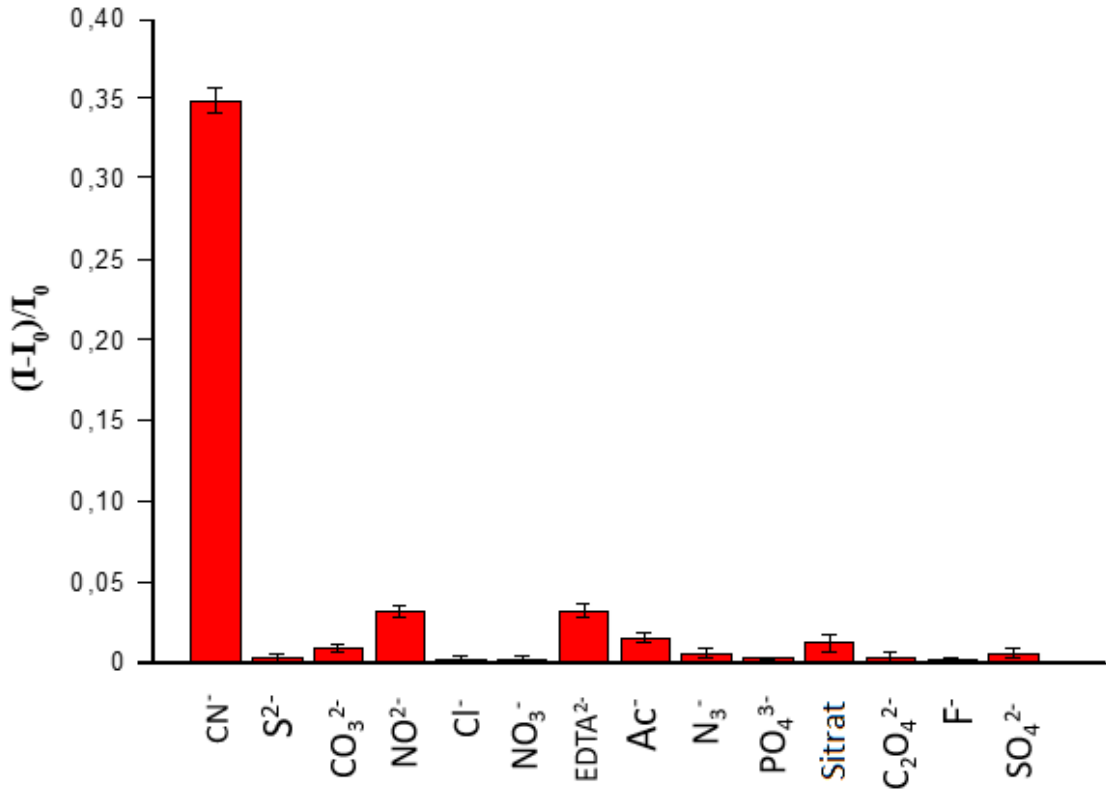
4.2.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi



Şekil 4.3. AuNC ve 100×10^{-6} M (S^{2-} , CO_3^{2-} , NO_2^- , Cl^- , NO_3^- , $EDTA^{2-}$, Ac^- , N_3^- , PO_4^{3-} , Sitrat, $C_2O_4^{2-}$ ve F^- , SO_4^{2-} Anyonları) İle 5×10^{-6} M (CN^-) (yeşil grafik) Varlığında AuNC'lere Ait UV Absorbans Spektrumları.

UV-Vis spektrumunda AuNC'ler de dahil olmak üzere toplamda 15 farklı maddeye ait veriler yer almaktadır. Grafikten görüldüğü üzere siyanür (yeşil grafik) AuNC'lerin absorbans değerinde yaklaşık 1,1 birimlik azalmaya sebep olmuştur. Siyanür dışındaki diğer 13 farklı anyonun (S^{2-} , CO_3^{2-} , NO_2^- , Cl^- , NO_3^- , $EDTA^{2-}$, Ac^- , N_3^- , PO_4^{3-} , Citrate, $C_2O_4^{2-}$ ve F^- , SO_4^{2-}) AuNC'lerin absorbans şiddeti üzerinde belirgin bir değişikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir [240].

4.2.2. Seçicilik Analizi

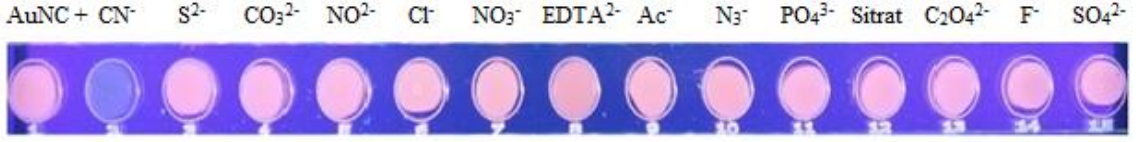


Şekil 4.4. AuNC'lerin 5×10^{-6} M Derişimde CN^- ve 100×10^{-6} M Derişimlerde 13 Farklı Anyona Karşı Seçiciliğı.

UV-Vis spektrumlarının daha açıklayıcı olması adına, AuNC'lerin ortamda bir madde olduğundaki ve başlangıçtaki absorbans şiddetleri oranlanarak seçicilik analizi yapılmıştır. Siyanürün AuNC'lerin floresan şiddeti üzerindeki değişim oranı 0,35 olarak bulunmuş siyanür dışındaki anyonların ise floresan şiddeti üzerindeki değişim oranının maksimum 0,05 seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç sistemin anyonlar karşısında son derece seçici olduğunu göstermektedir.

4.2.3. UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işıma Şiddeti Analizi

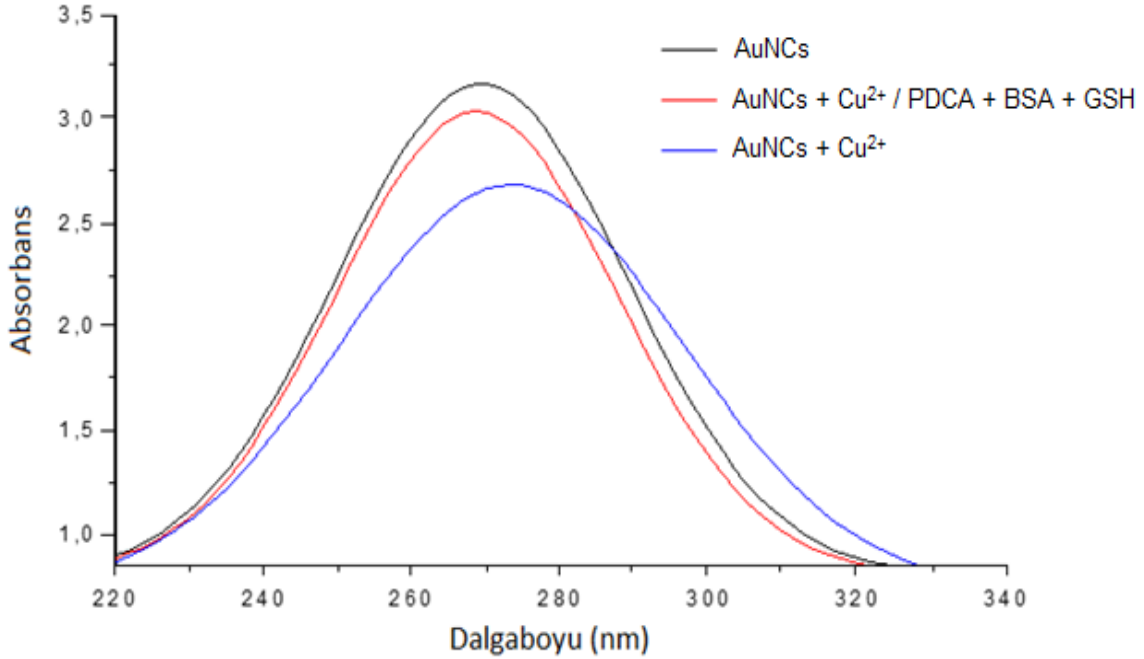
UV ışık kaynağı altında siyanür dışında diğer hiçbir anyonun, AuNC'lerin floresan ışıma şiddetleri üzerinde sönümleyici bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Siyanür eklenmesi ile AuNC'lerin sönümlemesi ve UV ışık kaynağı altında zayıf mavi bir renk görünmesi; siyanürün altın atomlarını BSA içinden sökmesi (kovalent olmayan etkileşim) sonucu, BSA'nın triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asit kalıntıları (rezidüleri) içerisindeki aromatik yan grupların karakteristik özelliklerinden kaynaklanmaktadır [164].



Şekil 4.5. AuNC ve 5×10^{-6} M Derişimde CN^- ile 100×10^{-6} M Derişimlerde 13 Farklı Anyon Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımaları.

4.3. Siyanür, 14 Farklı Metal İyonu ve Metal İyonlarından Oluşan Karışımın Floresan Sönümlenme Üzerine Etkisi

Literatürde bazı ağır metal (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} gibi) iyonlarının AuNC'lerin floresan şiddetleri üzerinde sönümlenme etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Bu sebeple öncelikle literatürde belirtilen Cu^{2+} örnek olarak ele alınmış ve pH 12 0,01 M NaOH- NaHCO_3 tampon çözeltisi içerisinde AuNC'lerin sönümlenmesine etkisi ortamda şelatlama ajanı 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), BSA ve Glutasyon (GSH) varlığında ve yokluğunda incelenmiştir.

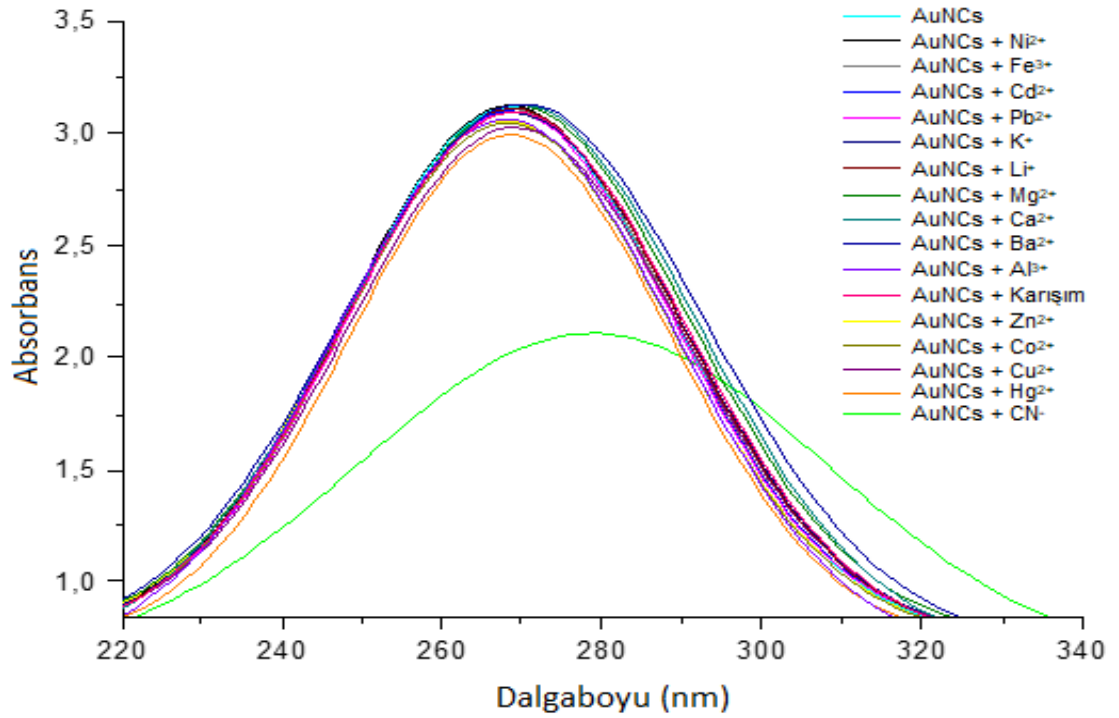


Şekil 4.6. AuNC ve PDCA (2 mM), BSA (0,4 mg/mL) ve GSH (0,4 mM) Varlığında ve Yokluğunda AuNC'ler ile 5×10^{-6} M Cu^{2+} Etkileşimi.

Ortamda şelatlama ajanı yokken Cu^{2+} iyonlarının AuNC'lerin absorbans şiddeti üzerinde 0,55 birimlik bir azalma etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu değer Şekil 4.3'de

bahsedildiği üzere siyanür etkileşimi sonrası AuNC absorbens şiddetinde meydana gelen değişimin (1,1) yarısı oranındadır. Şelatlama ajanı varlığında ise AuNC'lerin absorbens şiddetindeki azalma miktarı 0,2 birimdir. Bu sonuç şelatlama ajanı varlığında Cu^{2+} iyonunun AuNC'lerin absorbens şiddeti üzerindeki azalma etkisinin 5 kat düşürüldüğünü göstermektedir. Bu sebep ile metal iyonları ile yapılan deneylerde kullanılan pH 12, 0,01 M NaOH- NaHCO_3 tampon çözeltisi içerisine şelatlama ajanı olarak 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), BSA ve Glutasyon (GSH) eklenmiş ve sistemin siyanür spesifitesi arttırılmıştır. Metal iyonlarının AuNC'ler üzerindeki floresan sönmüleme etkilerinin incelenmesi sırasında siyanür ile aynı oranda (5×10^{-6} M) metal iyonu derişimleri kullanılmış ancak buna ek olarak metal iyonlarından oluşan karışım için (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) 10 kat fazla oranda bir derişim AuNC'ler ile muamele edilmiştir.

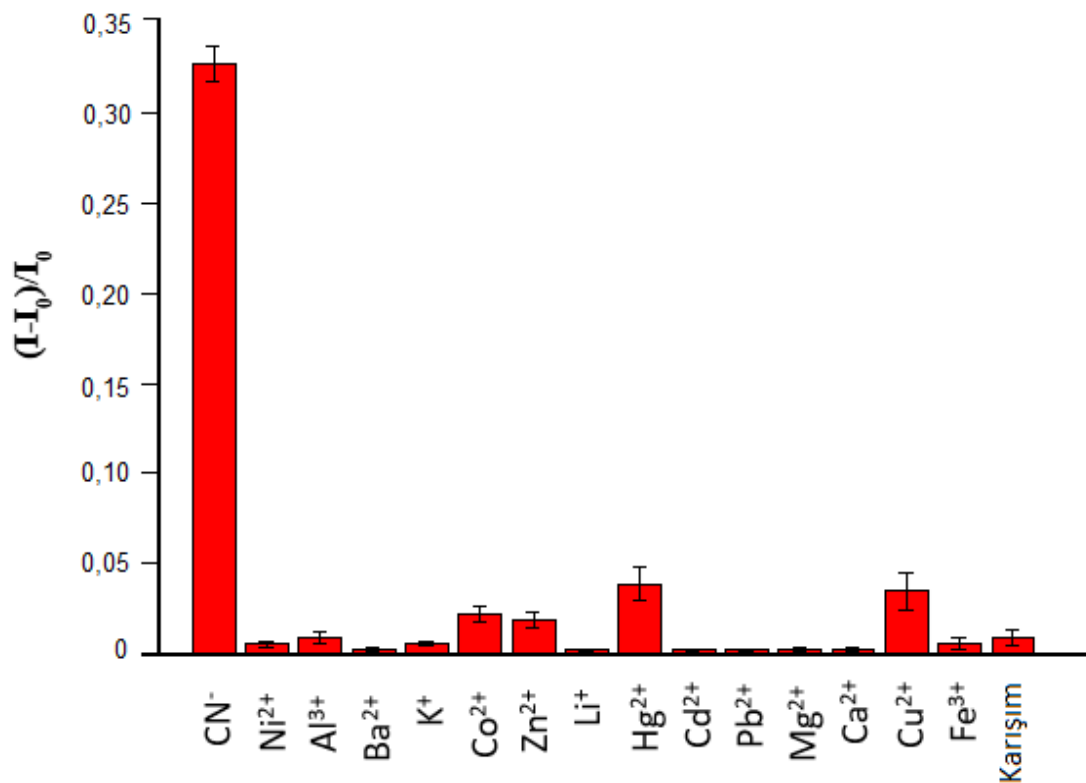
4.3.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi



Şekil 4.7. AuNC ve 5×10^{-6} M (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}), 5×10^{-5} M Metal İyonlarından Oluşan Karışım (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) ve 5×10^{-6} M CN^- (yeşil grafik) Varlığında AuNC'lere Ait UV Absorbans Spektrumları.

UV-Vis spektrumunda AuNC'ler de dahil olmak üzere toplamda 16 farklı maddeye (AuNC, Siyanür ve 14 farklı metal iyonu) ait veriler yer almaktadır. Grafikten görüldüğü üzere siyanür (yeşil grafik) AuNC'lerin absorbans şiddetinde yaklaşık 1,1 birimlik bir azalmaya sebep olmaktadır. Siyanür dışındaki diğer 14 farklı metal iyonu (Ni^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) ve metal iyonlarının karışımından (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) oluşan çözelti içerisinde ise yalnızca Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının AuNC'lerin absorbans şiddeti üzerinde 0,10 – 0,15 birimlik bir değişikliğe sebep olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan deneyde 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA), BSA ve Glutasyon (GSH) şelatlama amacı ile kullanılmıştır.

4.3.2. Seçicilik Analizi



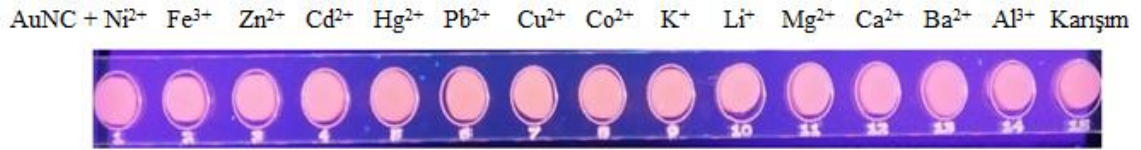
Şekil 4.8. AuNC'lerin 5×10^{-6} M Derişimlerde CN^- ve Farklı Metal İyonları ile 5×10^{-5} M Derişimde Metal İyonlarından Oluşan Karışıma Karşı Seçiciliği.

UV-Vis grafiklerinin daha açıklayıcı olması adına, yine AuNC'lerin ortamda bir madde olduğundaki ve başlangıçtaki absorbans şiddetleri oranlanarak seçicilik analizi yapılmıştır. Siyanürün AuNC'lerin floresan şiddeti üzerindeki değişim oranı 0,33 olarak bulunmuş

siyanür dışındaki anyonların ise floresan şiddeti üzerindeki değişim oranının maksimum 0,05 seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç şelatlama ajanı varlığında sistemin siyanür spesifik olduğunu göstermektedir.

4.3.3. UV Işık Kaynağı Altında Floresan Şiddeti Analizi

UV ışık kaynağı altında siyanür dışında diğer hiçbir metal iyonunun (bir önceki başlıkta yer alan “UV Işık Kaynağı Altında Floresan Şiddeti Analizi” görüntüsü ile karşılaştırıldığında), AuNC’lerin floresan ışımaya şiddetleri üzerinde sönümleyici bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

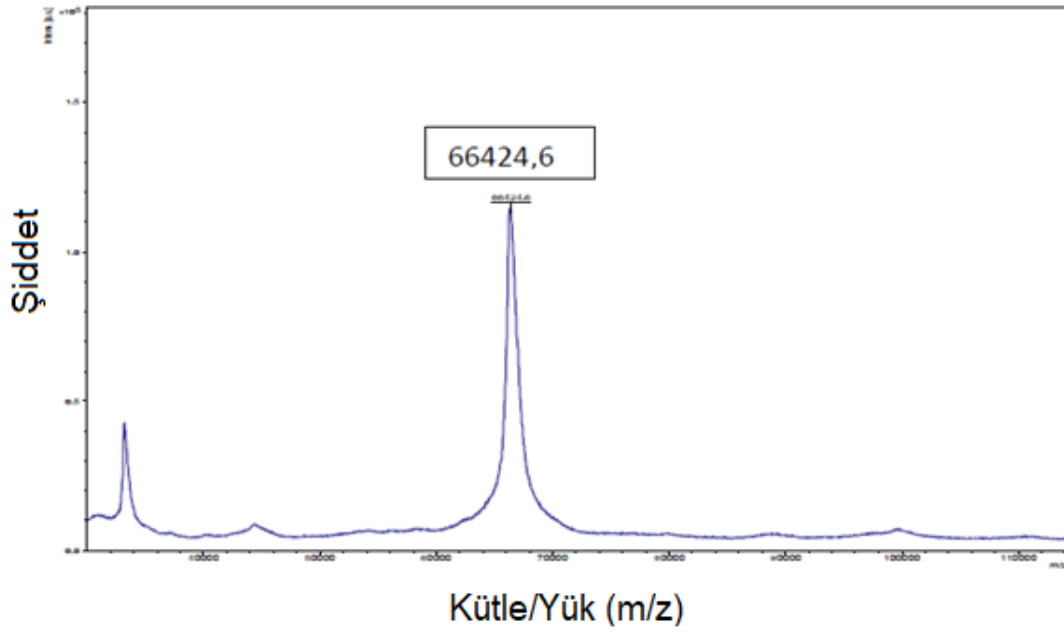


Şekil 4.9. 5×10^{-6} M Derişimlerde 14 Farklı Metal İyonu ve 5×10^{-5} M Derişimde Metal İyonlarının Karışımından (K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} and Al^{3+}) oluşan Çözeltiler Varlığında AuNC’lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.

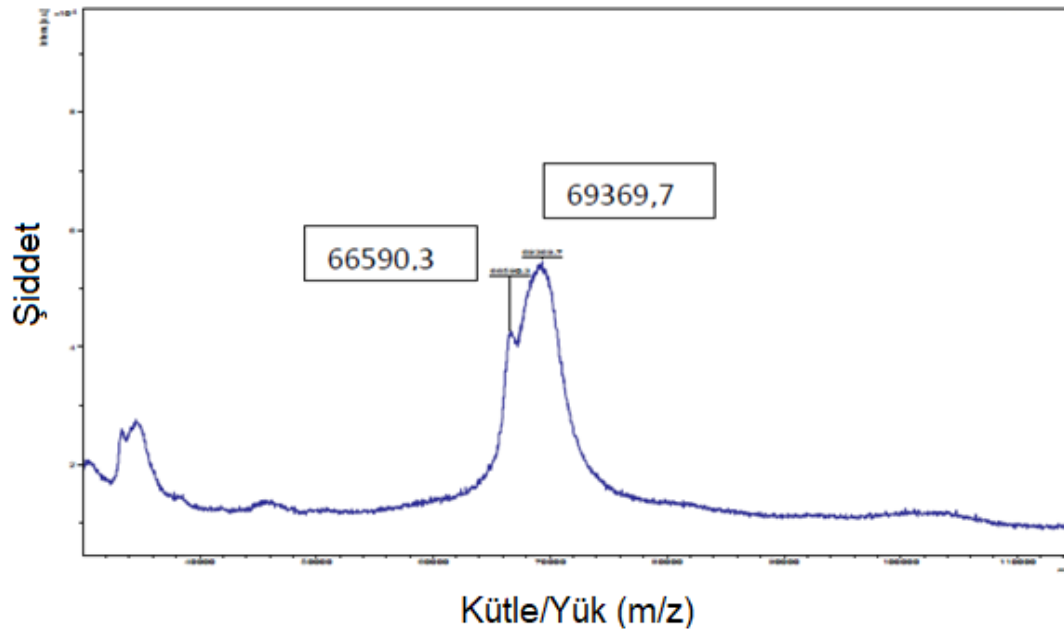
4.4. AuNC-Siyanür Etkileşimi MALDI-TOF-MS Karakterizasyonu

Hazırlanan BSA kaplı AuNC’lerin ve siyanür ile etkileşimlerinin MALDI-TOF analizleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için; hazırlanan AuNCs çözeltisi içerisinde bulunan tuzlardan arındırılmak adına 10 kDa molekül ağırlığı ayırma sınırı bulunan diyaliz membranı içerisine konulmuş ve 24 saat DI su içerisinde diyaliz edilmiştir (6 saatte bir DI su değiştirilmiştir).

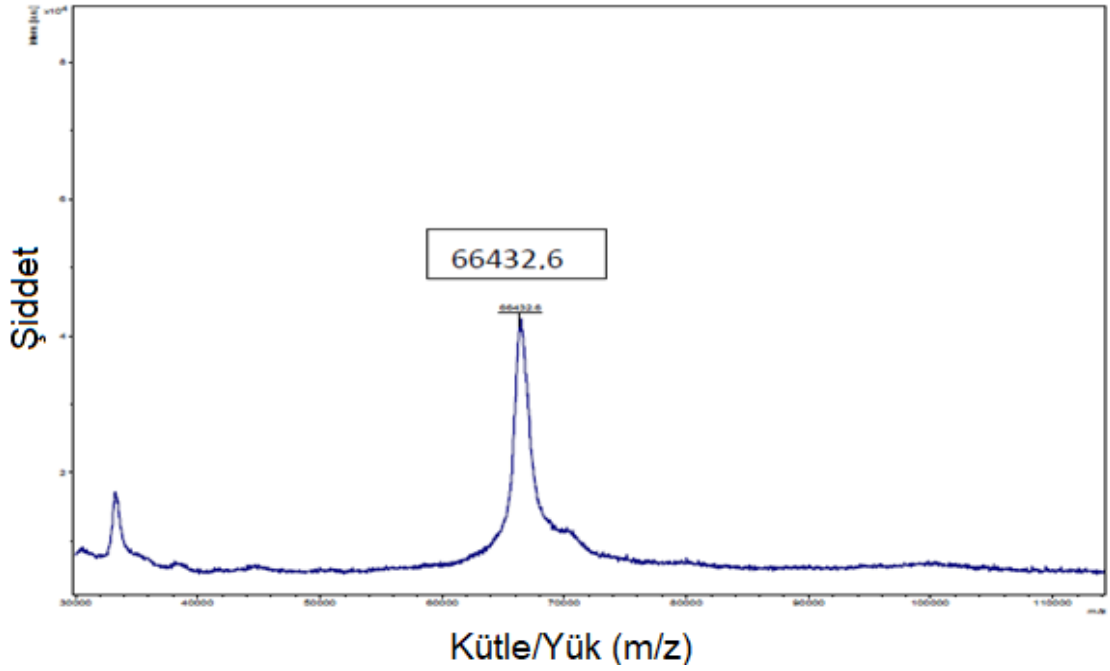
Ayrıca siyanür AuNC etkileşimini anlayabilmek adına; hazırlanan AuNC çözeltisi üzerine 5×10^{-3} M (etkileşimin daha iyi anlaşılabilmesi için deneylerde kullanılan miktardan fazladır) siyanür eklenerek yine diyaliz membranı içerisinde sönümlenme etkisi incelenmiştir. Siyanür, AuNC çözeltisi ile etkileştiğinde onları BSA içerisinden sökmektedir.



Şekil 4.10. BSA'ya Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu.



Şekil 4.11. BSA Stabilize AuNC'lere Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu (Çözelti İçerisinde Yer Alan Eser Miktarda Fazla BSA, 66,6 kDa'da Bir Omuz Oluşturmaktadır).



Şekil 4.12. Diyaliz Membranı İçerisinde Siyanür İle Etkileştirilmiş BSA Stabilize AuNC'lere Ait MALDI-TOF-MS Spektrumu.

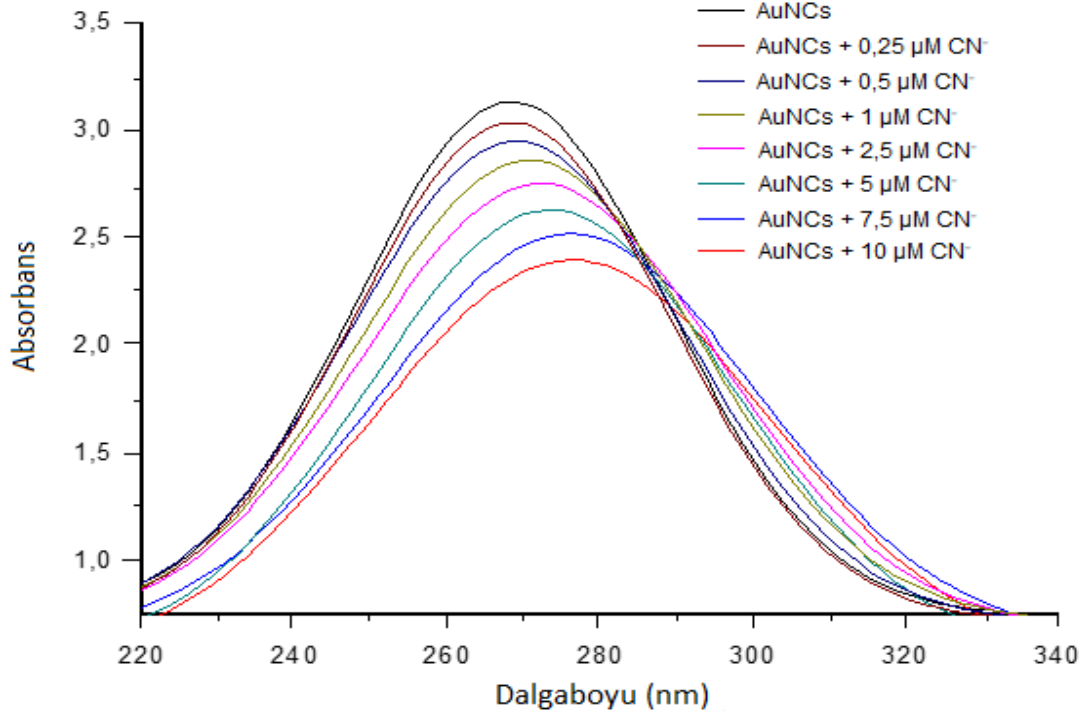
Normal şartlarda BSA içerisinde hapsolan ve diyaliz membranından geçemeyen AuNC'ler, 5×10^{-3} M siyanürün etkisi ile BSA içerisinden söküldüklerinde kendi molekül ağırlıkları gereği diyaliz membranından geçerek membran dışındaki DI suya karışırlar. Maldit-TOF-MS spektrumunda, 5×10^{-3} M siyanür etkileşiminden sonra BSA stabilize AuNC'lere ait sinyalin, neredeyse ortamda siyanür bulunmadığı ilk haline döndüğü görülmektedir. Ayrıca 66,4 kDa molekül ağırlığı bulunan BSA sinyali, AuNCs oluşumundan sonra 69,4 kDa molekül ağırlığına ulaşmış ve spektrumda 3 kDa kayma gerçekleşmiştir. Spektrumdaki bu kayma değeri Altın atomik kütle değerine (0,1969 kDa) oranlandığında her BSA stabilize AuNC'nin 15 altın atomundan oluştuğu anlaşılmaktadır.

4.5. Siyanür Ölçüm Limiti ve Ölçüm Doğruluğu Karakterizasyonu

Sistem tarafından tayin edilebilecek siyanür miktarı ve yapılan ölçümlerin doğruluğunu analiz edebilmek adına $(0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10) \times 10^{-6}$ M derişimlerde pH 12 tampon çözelti içerisinde siyanür AuNC çözeltilerine eklenmiş ve UV-Vis spektroskopi analizleri yardımı ile absorbans şiddetlerindeki değişim ölçülmüştür. Buradan elde edilen veriler

Stern-Volmer denklemine uygulanarak ölçüm doğruluğu incelenmiş ve sistemin ölçebileceği siyanür seviyesi aralığı analiz edilmiştir.

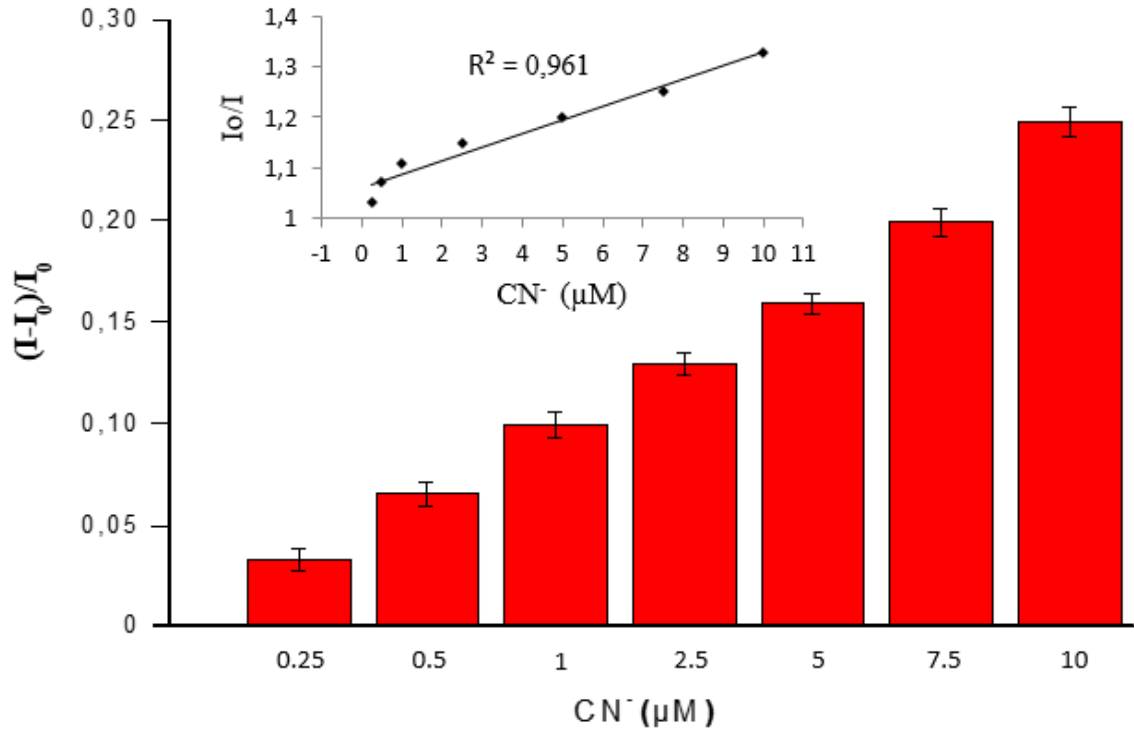
4.5.1. UV-Vis Spektroskopi Analizi



Şekil 4.13. AuNC ve (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10) $\times 10^{-6}$ M Derişimlerde Siyanür İle Etkileşen AuNC'lere ait Absorbans Spektrumları.

Siyanür derişiminin artması ile orantılı olarak AuNC'lerin absorbans şiddetinde azalmalar gözlenmiştir.

4.5.2. Stern-Volmer Analizi



Şekil 4.14. Farklı Derişimlerde Siyanür İle Etkileşen AuNC'lerin Absorbans Şiddet Değişimleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).

Stern-Volmer Eşitliği söndürücünün olduğu ve olmadığı durumda floresans şiddetleri arasındaki ilişkiyi veren ve dinamik sönmelenmeyi tanımlayan bir denklemdir.

Stern-Volmer Eşitliği aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [Q]$$

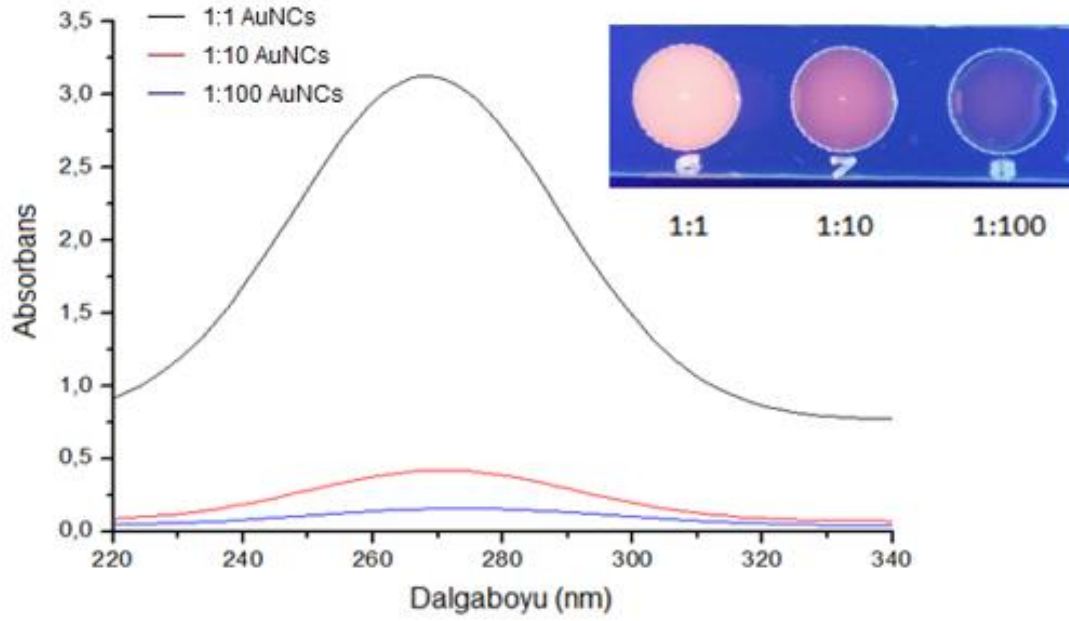
Burada K_{SV} Stern-Volmer sönm katsayısıdır ve yukarıda yer alan denklemin eğimi hesaplanarak bulunmaktadır. $[Q]$ ise analit derişimidir.

Derişim grafiğinden elde edilen veri ile ($R^2 = 0,961$); iyi bir lineer korelasyon yakalandığı ve 250×10^{-9} M ile 10×10^{-6} M derişimler arasında yüksek doğrulukta ölçüm yapılabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca verilerden yararlanarak K_{SV} 0,0271 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilen ve içme sularında bulunabilecek siyanür limiti olan $2,7 \times 10^{-6}$ M değerine göre 10 kat daha az siyanür tayeinine izin veren ($0,25 \times 10^{-6}$ M) bir sistemin geliştirildiğini de ayrıca göstermiştir.

4.6. Sönümlenme Mekanizması üzerinde pH ve Derişim Etkisi Karakterizasyonları

4.6.1. AuNC Derişim Analizleri

Herhangi bir ek malzeme içermeyen (siyanür, anyon, metal iyonu vb.) 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak UV-Vis spektroskopi analizleri yardımı ile absorbans şiddetleri ve UV ışık kaynağı altında floresan ışıma şiddetleri ölçülmüştür.

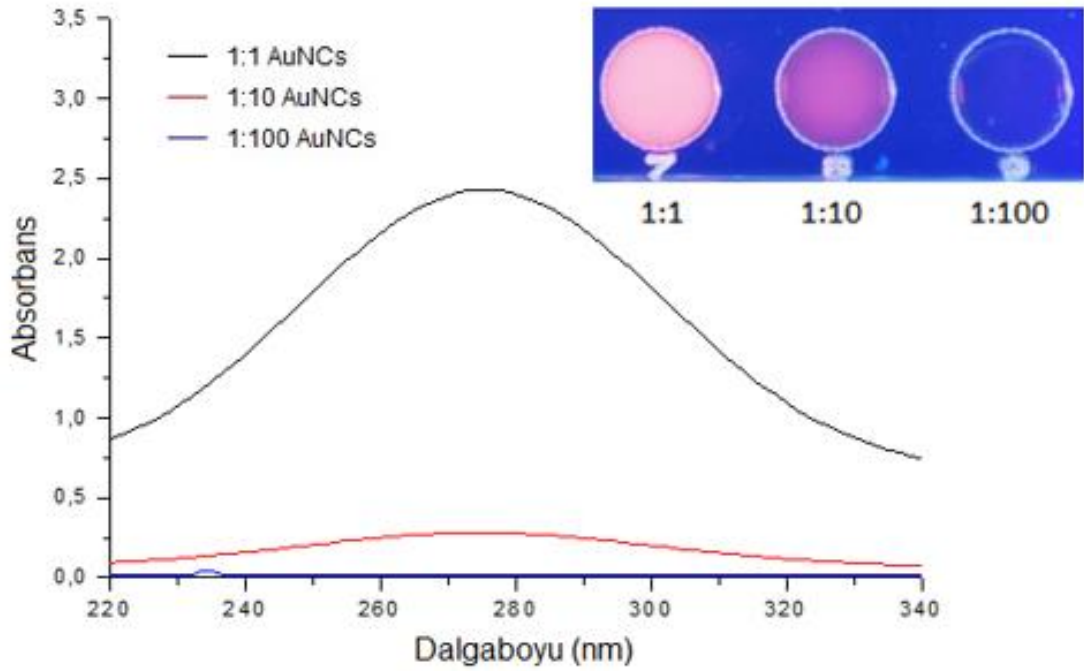


Şekil 4.15. 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC'lerin Absorbans Spektrumları ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.

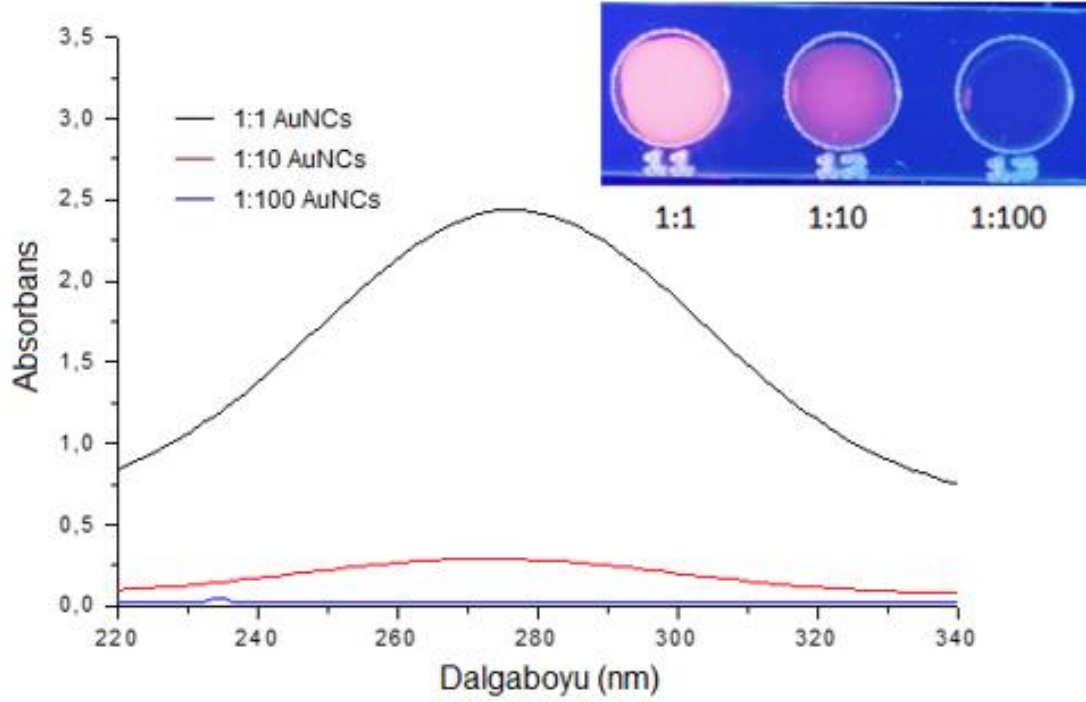
1:10 ve 1:100 AuNC derişimlerinde de floresan ışıma gözlemlenmiş ve siyanür etkileşimi sırasında maksimum sönümlenmeyi alabilmek adına kullanılabileceği görülmüştür.

4.6.2. Farklı pH değerlerinde AuNC Derişimleri ile Siyanür Etkileşimi Analizleri

Maruz kalınması halinde vücutta orta şiddette semptomlara sebep olabilecek siyanür miktarı olan 1,6 mg/L ($2,5 \times 10^{-5}$ M) [9, 12, 15-17] seçilerek pH 7,4 ve pH 12 tampon çözeltileri içerisinde, 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC çözeltileri ile etkileştirilmiş ve pH farkının AuNC siyanür etkileşimi kaynaklı sönümlenmeye etkileri; UV-Vis spektroskopi analizleri ile absorbans şiddetleri ve UV ışık kaynağı altında floresan ışıma şiddetleri incelenmiştir.



Şekil 4.16. pH: 7,4'de 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC'lerin Absorbans Spektrumları ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımaları.

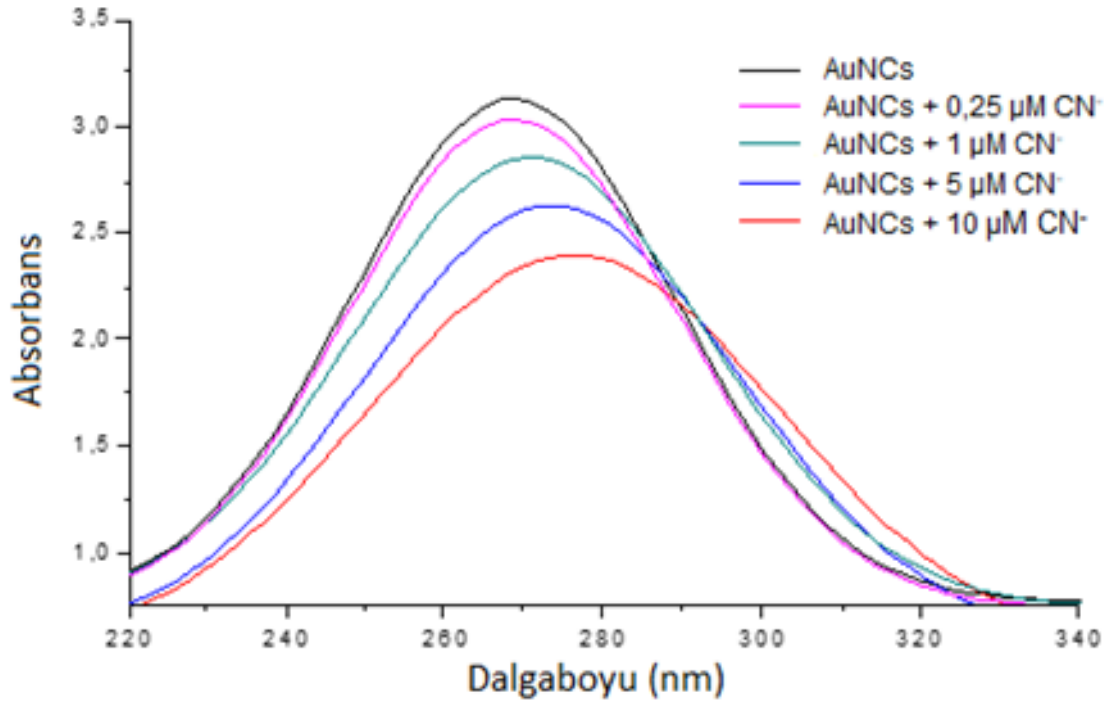


Şekil 4.17. pH: 12’de 1:1, 1:10 ve 1:100 Derişimlerde AuNC’lerin Absorbans Grafikleri ve UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımaları.

Yapılan analizler sonucunda ister pH 7,4 ister pH 12 tamponlarda çalışıldığında AuNC’lerin absorbans ve floresan ışıma şiddetlerinde herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuç ileride bahsedilecek olan ve pH 12’de hemolize uğrayan tam kan örnekleri için pH 7,4 tampon çözeltisi kullanılabileceğini ayrıca göstermiştir.

4.6.2.1. 1:1 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) $\times 10^{-6}$ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis Spektroskopi Analizi

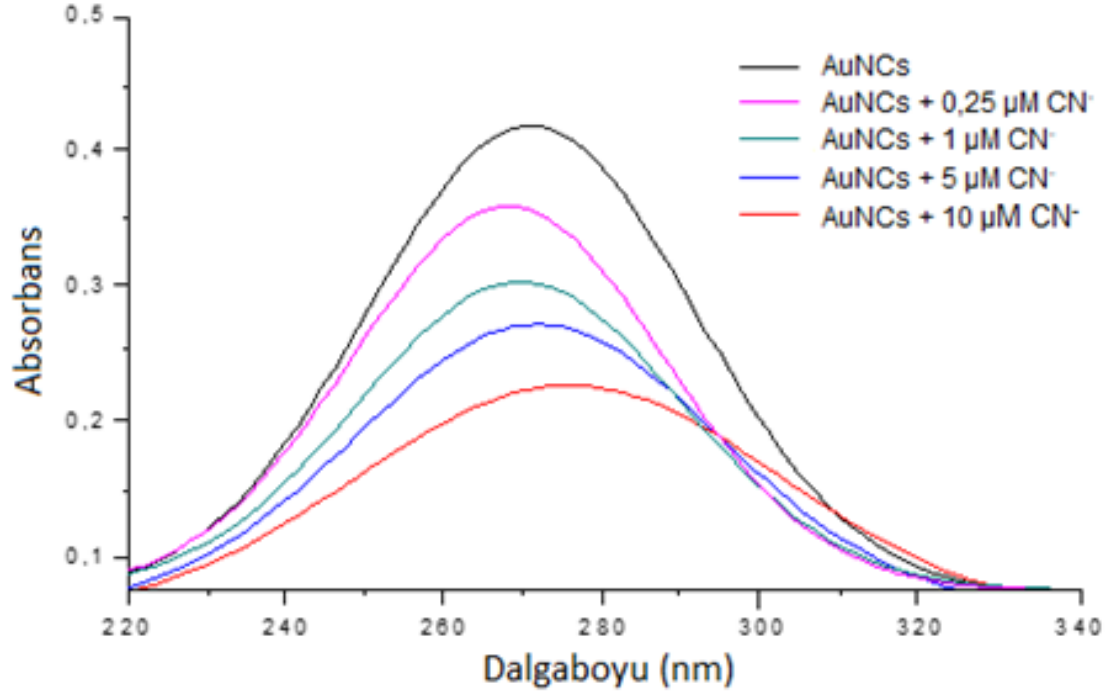
Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından içme sularında bulunması gereken maksimum siyanür miktarı $2,7 \times 10^{-6}$ M olarak belirtilmiştir. Konu ile ilgili literatürde yer alan ve AuNC’ler ile siyanür tayinine yönelik çalışmalarda da belirtilen bu miktar mertebesinde (altında veya üstünde) seçicilik ve spesifikasyon analizleri yapılmıştır [240, 306, 307]. Bu sebeple tez kapsamında hazırlanan sistemin literatürde yer alan çalışmalar ile karşılaştırılabilmesi için yine 10^{-6} M mertebesinde değerler çalışılmak üzere belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M) İle Etkileşen 1:1 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).

1:1AuNC derişimine pH 12 tampon çözeltisi içerisinde siyanür eklenmesi ile absorbans şiddetlerinde, siyanür derişimlerinin artması ile orantılı olarak sırasıyla yaklaşık 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 birimlik azalmalar gözlenmiştir. 1:1 AuNC çözeltisinin maksimum (10 x 10⁻⁶ M) siyanür derişimi eklenmesi ile absorbans oranında yaklaşık 1,5 katlık bir azalma meydana gelmiştir.

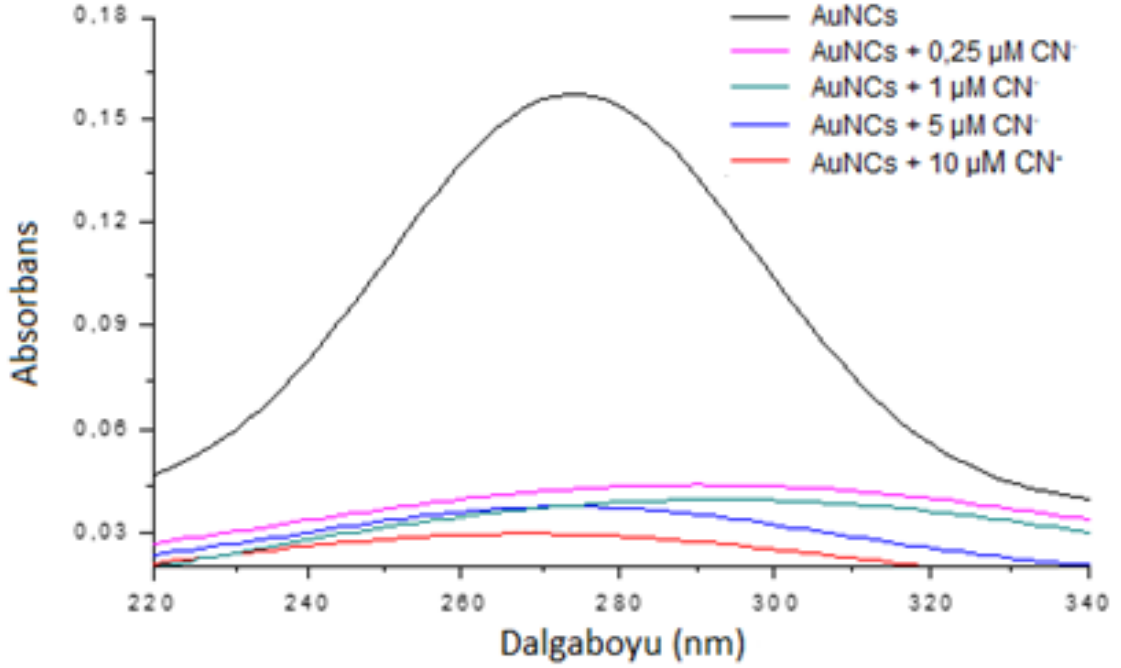
4.6.2.2. 1:10 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis Spektroskopi Analizi



Şekil 4.19. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M) İle Etkileşen 1:10 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).

1:10 AuNC için elde edilen absorbans değeri, çözelti içerisinde yer alan partikül sayısının da 1:1'lik çözeltiye oranla daha az olmasından dolayı 1:1 AuNC çözeltisine göre yaklaşık 8 katlık bir düşüş göstermektedir. Ancak çözeltinin seyreltilmesi ile aynı hacim içerisinde yer alan daha az sayıda AuNC'nin, 1:1'lik çözelti ile aynı oranda siyanür derişimlerine maruz bırakılması; çözeltideki siyanür miktarının az sayıdaki AuNC'ler ile yapısal engellemelere (steric hindrance) uğramadan daha fazla etkileşmesine olanak sağlamıştır. Bu durum siyanür derişimlerinin artması ile orantılı olarak sırasıyla yaklaşık 0.05, 0.1, 0.15 ve 0.2 birimlik daha fazla ayırt edilebilir azalmaların gözlemlenebilmesini sağlamıştır. 1:10 AuNC çözeltisine maksimum (10 x 10⁻⁶ M) miktarda siyanür derişimi eklenmesi ile absorbans değerinde 2 katlık bir azalma gözlenmiştir.

4.6.2.3. 1:100 AuNC ile (0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M Siyanür Etkileşimi UV-Vis Spektroskopi Analizi

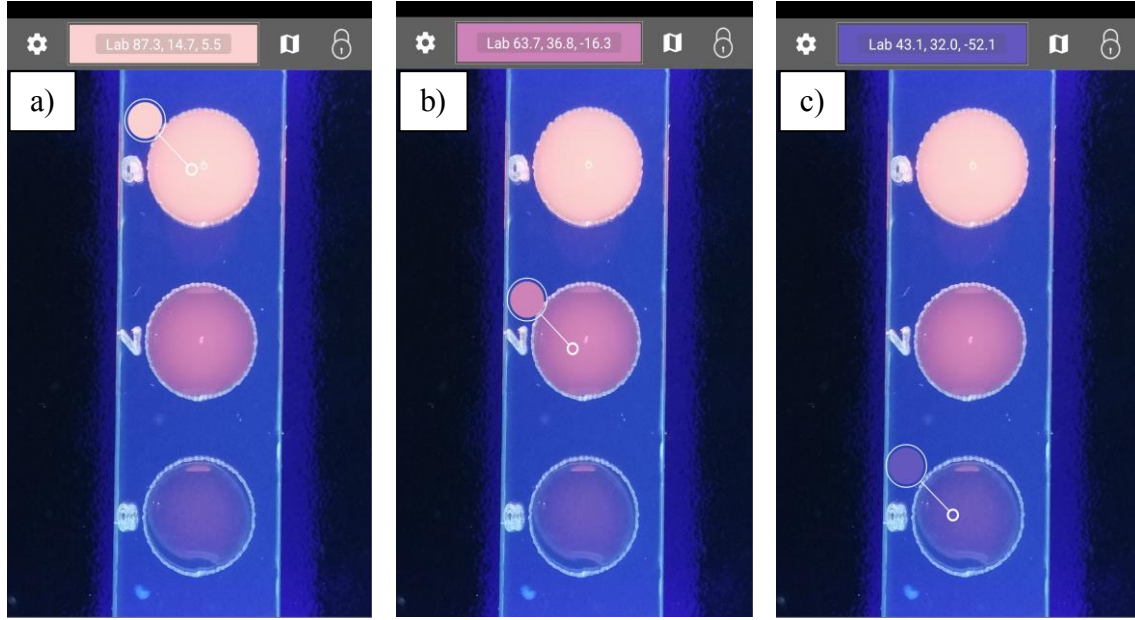


Şekil 4.20. Farklı Derişimlerde Siyanür ((0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M) İle Etkileşen 1:100 AuNC'lerin Absorbans Grafikleri ve Stern-Volmer Korelasyonu (İç Grafik).

1:100 AuNC için elde edilen absorbans değeri, çözelti içerisinde yer alan partikül sayısının da 1:1'lik çözeltiye oranla çok daha az olmasından dolayı 1:1 AuNC çözeltisine göre yaklaşık 22 katlık bir düşüş göstermektedir. Çözelti içerisinde 1:1 AuNC çözeltisine oranla daha az sayıda AuNC'nin bulunması, 1:1'lik çözelti ile aynı oranda siyanür derişimlerine maruz bırakıldığında; siyanürün yine herhangi bir yapısal engellemeye (steric hindrance) uğramadan AuNC'ler ile daha fazla etkileşmesine olanak sağlamıştır. 1:100 AuNC çözeltisine maksimum (10 x 10⁻⁶ M) miktarda siyanür derişimi eklenmesi ile absorbans değerinin 5 kat düştüğü gözlemlenmiştir. Ancak AuNC'lerin (0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M siyanür ile etkileşimleri sonucunda absorbans değerleri çok yakın çıkmaktadır ve siyanürün çözelti içerisinde tayin edilmesi sırasında güçlük oluşturmaktadır. Bu durum yine siyanür derişimlerinin artması ile orantılı olarak sırasıyla yaklaşık 0.05, 0.1, 0.15 ve 0.2 birimlik daha fazla ayırt edilebilir azalmaların gözlemlenebilmesini sağlamıştır. Ayrıca tüm absorbans grafiklerinden elde edilen veriler Stern-Volmer denklemine uygulanmış ve tüm AuNC derişimleri için eklenen siyanür derişimlerine karşılık olarak K_{sv} ; $\sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.7. Color Grab Renk Farkı Karakterizasyonu

Öncelikle siyanür içermeyen 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC çözeltilerinin akıllı telefon ile UV ışık kaynağı altında çekilen görüntüler üzerinden Color Grab uygulaması ile $L^*a^*b^*$ renk değerleri bir standart oluşturmak için çıkarılmıştır.



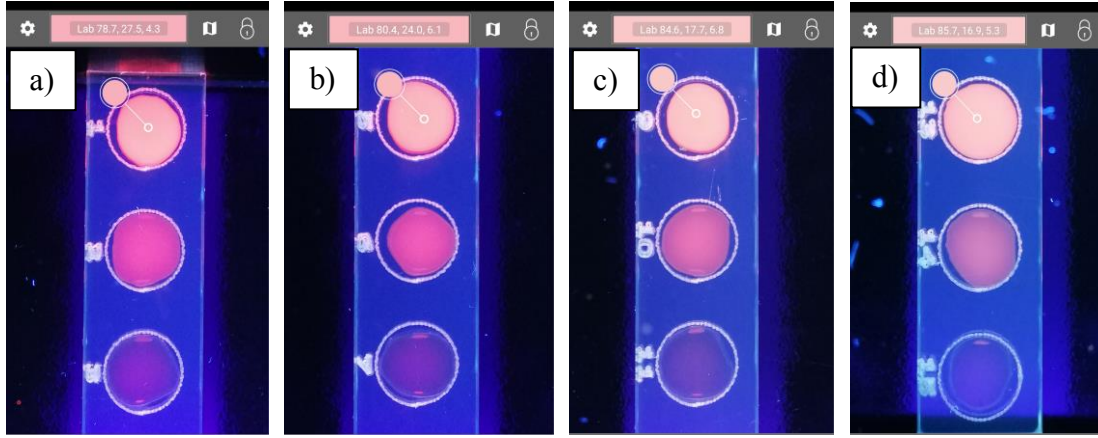
Şekil 4.21. a) 1:1, b) 1:10 ve c) 1:100 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

Baz AuNC çözeltileri standart olarak belirlendikten sonra farklı derişimlerde (0.25, 1, 5 ve 10) $\times 10^{-6}$ M siyanür ile etkileşen 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC derişimlerinin $L^*a^*b^*$ baz değerleri Color Grab yardımı ile çıkarılmış ve formülasyonda yerine koyularak “Renk Farkları” (ΔE^*) bulunmuştur.

Çizelge 4.1. 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC Çözeltileri İçin $L^*a^*b^*$ Renk Değerleri.

Derişim	$L^* / a^* / b^*$
1:1 (AuNC)	87,3 / 14,7 / 5,5
1:10 (AuNC)	63,7 / 36,8 / -16,3
1:100 (AuNC)	43,1 / 32,0 / -52,1

4.7.1. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



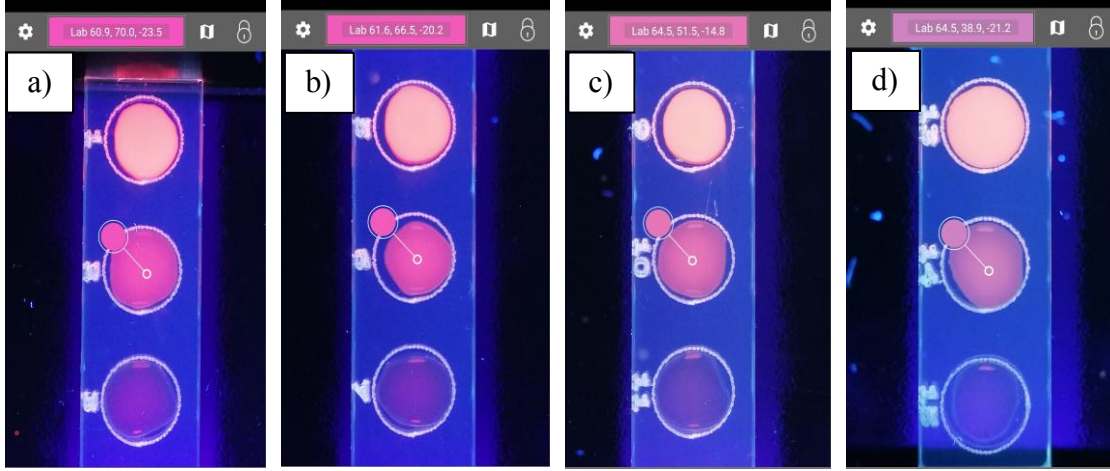
Şekil 4.22. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 x 10⁻⁶ M CN⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

(0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltilerinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiş ve siyanür içermeyen 1:1 AuNC çözeltilerinden elde edilen baz renk değerlerinden çıkarılarak renk farkları (ΔE^*) hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. 1:1 AuNC Çözeltisi İçin (0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:1 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
0,25 x 10 ⁻⁶ M	78,7 / 27,5 / 4,3	15,467
1 x 10 ⁻⁶ M	80,4 / 24,0 / 6,1	11,595
5 x 10 ⁻⁶ M	84,6 / 17,7 / 6,8	4,304
10 x 10 ⁻⁶ M	85,7 / 16,9 / 5,3	2,727

4.7.2. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile Etkileşen 1:10 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



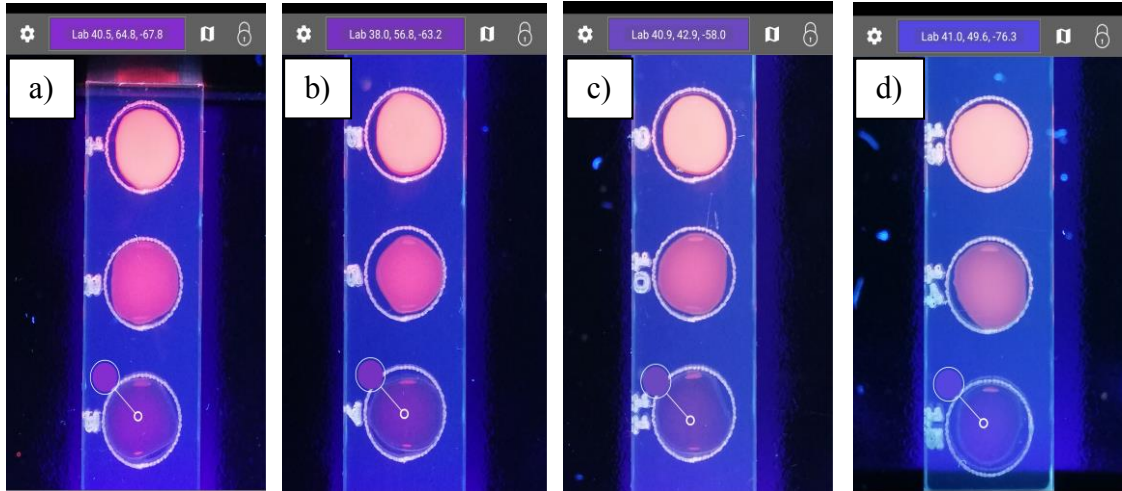
Şekil 4.23. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 x 10⁻⁶ M CN⁻ İçeren 1:10 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

(0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile etkileştirilen 1:10 AuNC çözeltilerinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiş ve siyanür içermeyen 1:10 AuNC çözeltilerinden elde edilen baz renk değerlerinden çıkarılarak renk farkları (ΔE^*) hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. 1:10 AuNC Çözeltisi İçin (0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:10 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
0,25 x 10 ⁻⁶ M	60,9 / 70,0 / -23,5	34,087
1 x 10 ⁻⁶ M	61,6 / 66,5 / -20,2	30,028
5 x 10 ⁻⁶ M	64,5 / 51,5 / -14,8	14,797
10 x 10 ⁻⁶ M	64,5 / 38,9 / -21,2	5,391

4.7.3. (0,25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile Etkileşen 1:100 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



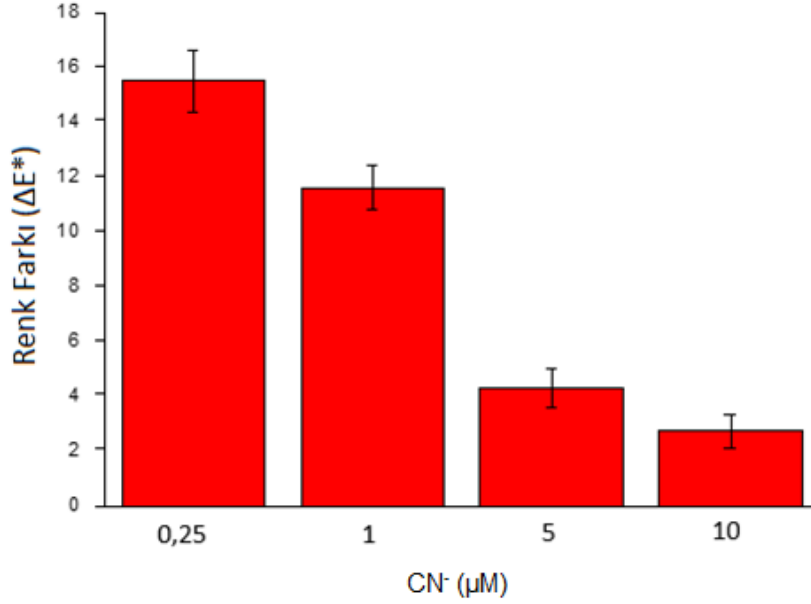
Şekil 4.24. a) 0, 25, b) 1, c) 5 ve d) 10 x 10⁻⁶ M CN⁻ İçeren 1:100 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

(0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ ile etkileştirilen 1:100 AuNC çözeltilerinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiş ve siyanür içermeyen 1:100 AuNC çözeltilerinden elde edilen baz renk değerlerinden çıkarılarak renk farkları (ΔE^*) hesaplanmıştır.

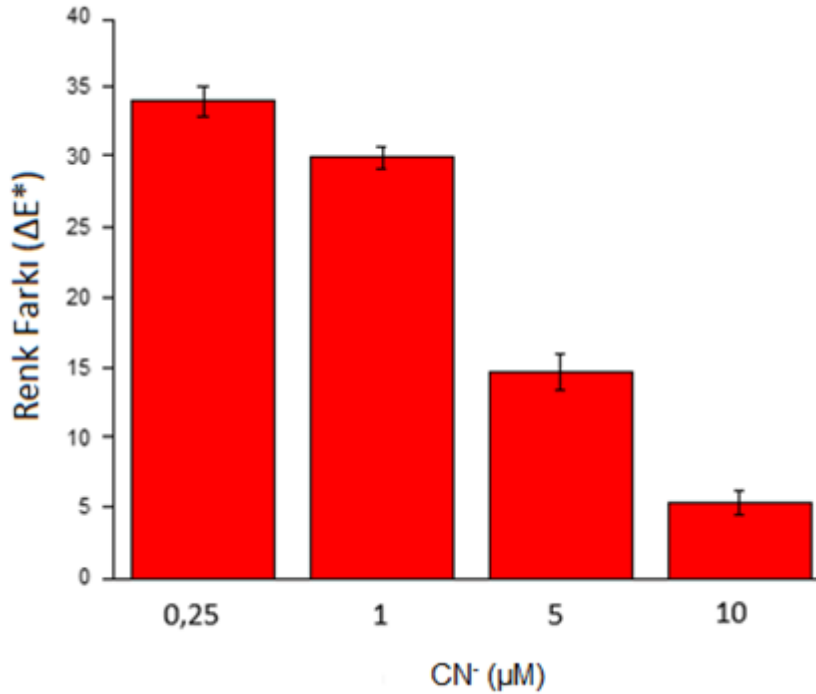
Çizelge 4.4. 1:100 AuNC Çözeltisi İçin (0.25, 1, 5 ve 10) x 10⁻⁶ M CN⁻ Derişimleri Varlığında Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:100 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
0,25 x 10 ⁻⁶ M	40,5 / 64,8 / -67,8	36,456
1 x 10 ⁻⁶ M	38,0 / 56,8 / -63,2	27,645
5 x 10 ⁻⁶ M	40,9 / 42,9 / -58,0	12,588
10 x 10 ⁻⁶ M	41,0 / 49,6 / -76,3	29,996

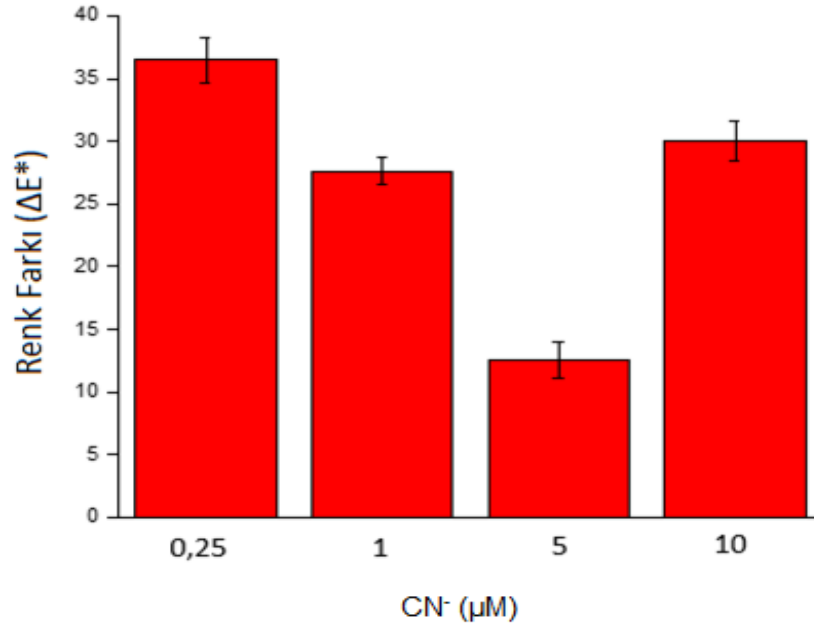
Elde edilen veriler incelendiğinde, farklı derişimlerde siyanür ($0.25, 1, 5, 10$) $\times 10^{-6}$ M eklenmesinin AuNC çözeltilerinde meydana getirdiği renk farkları (ΔE^*) aşığıdaki grafiklerde belirtilmiştir.



Şekil 4.25. 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.



Şekil 4.26. 1:10 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.



Şekil 4.27. 1:100 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.

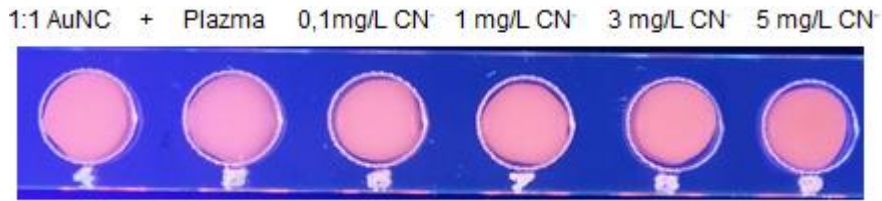
1:100 AuNC çözeltisi, siyanür eklenmesi ile gözle görülür en iyi sönümlenmeyi vermektedir. Ancak, sönümlenme o kadar şiddetlidir ki eklenen siyanür derişimlerinin AuNC'leri tamamen sönümlemesi ve altta yer alan UV ışık renk değerlerinin ölçüme etki etmesi güvenilemeyen sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

1:1 ve 1:10 AuNC çözeltilerine siyanür eklenmesi ile gözle görünür daha az bir sönüm elde edilmekte ancak program tam bir sönüm olmadığı için değerleri rahat okuyabilmektedir.

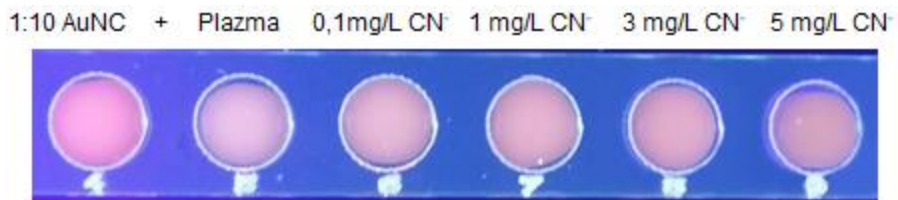
4.8. Kan Deneyleri

Kan örneklerine 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L siyanür eklendikten sonra diğer tüm deneylerde de bahsedildiği şekli ile 20 dakika (siyanür-AuNC ideal etkileşim süresi) beklenmiştir. Sonrasında siyanür içeren kan örnekleri ependorf içerisinde 5000 RPM’de 6 dakika standart bir masaüstü santrifüj cihazı ile santrifüj edilmiş ve plazma kısımları pipet yardımı ile ayrıştırılarak 1:1, 1:10 ve 1:100 AuNC çözeltileri ile ayrı ayrı etkileştirilmiştir.

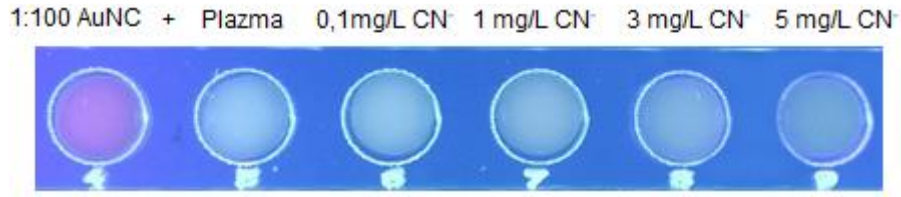
Ayrıca siyanür içermeyen kandan benzer şekilde santrifüj edilen plazmaya da belirtilen şekilde 3 ayrı derişimde AuNC eklenmiş ve UV ışık kaynağı altında çekilen resimler için baz değer (standart) olarak kullanılmıştır. Bu baz değerler (AuNC ile plazma karışımından kaynaklı renk farkı) siyanür içeren örneklerden elde edilen sonuçlardan çıkarılarak en doğru renk farkı değerleri bulunmuştur. Göz ile ayırt edilemeyen ancak “Color Grab” programı yardımı ile renk değerleri belirlenebilen siyanür içeren plazma örneklerinden elde edilen “Renk Farkı” değerleri, bu baz değerden çıkarılarak yalnızca siyanür ile değişen doğru değerlerin bulunması sağlanmıştır.



Şekil 4.28. 1:1 AuNC, 1:1 AuNC + CN⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC’lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımaları.

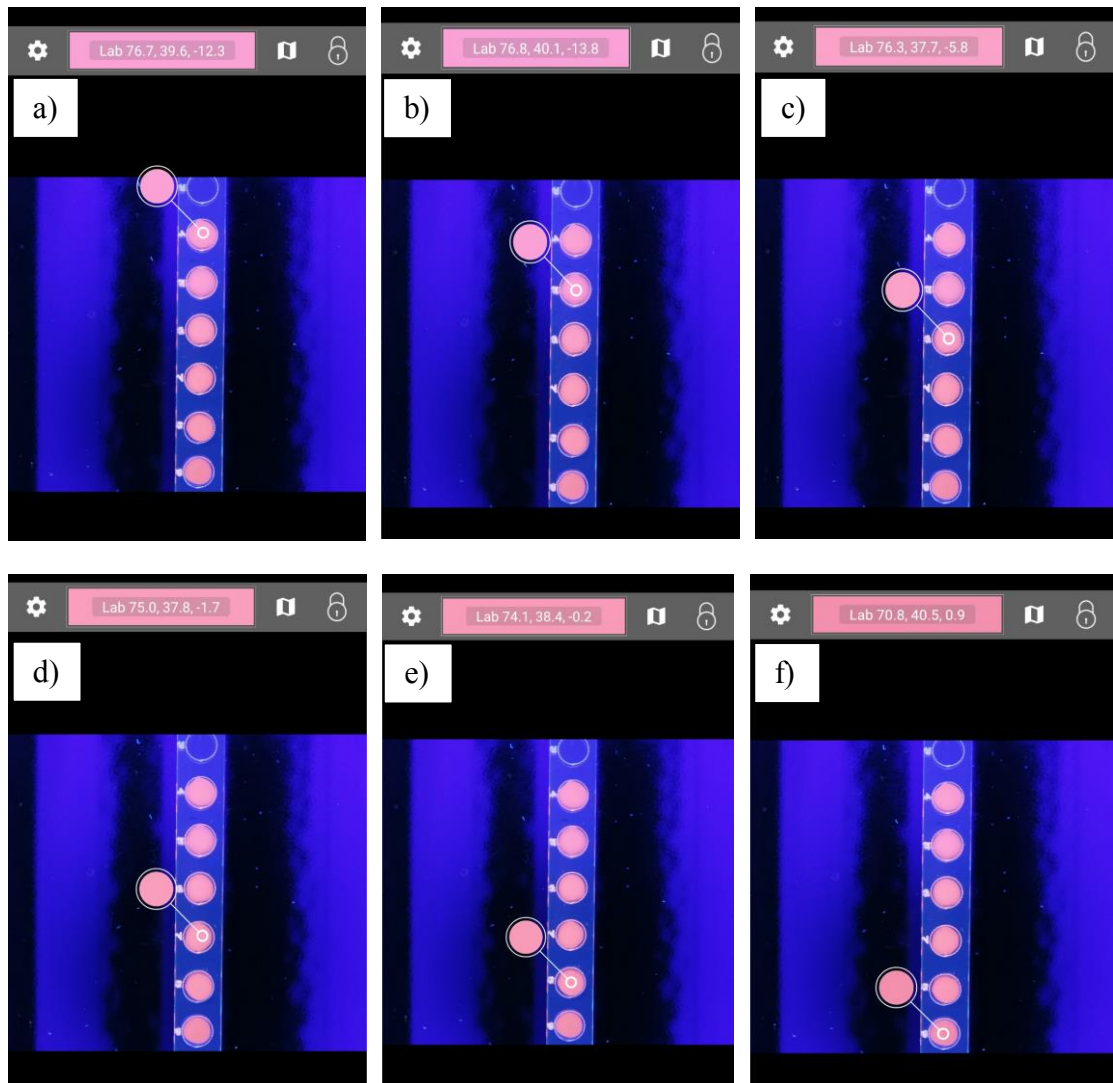


Şekil 4.29. 1:10 AuNC, 1:1 AuNC + CN⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC’lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımaları.



Şekil 4.30. 1:100 AuNC, 1:1 AuNC + CN⁻ İçermeyen Kan Plazması ve (0,1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür Varlığında AuNC'lerin UV Işık Kaynağı Altında Floresan Işımları.

4.8.1. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



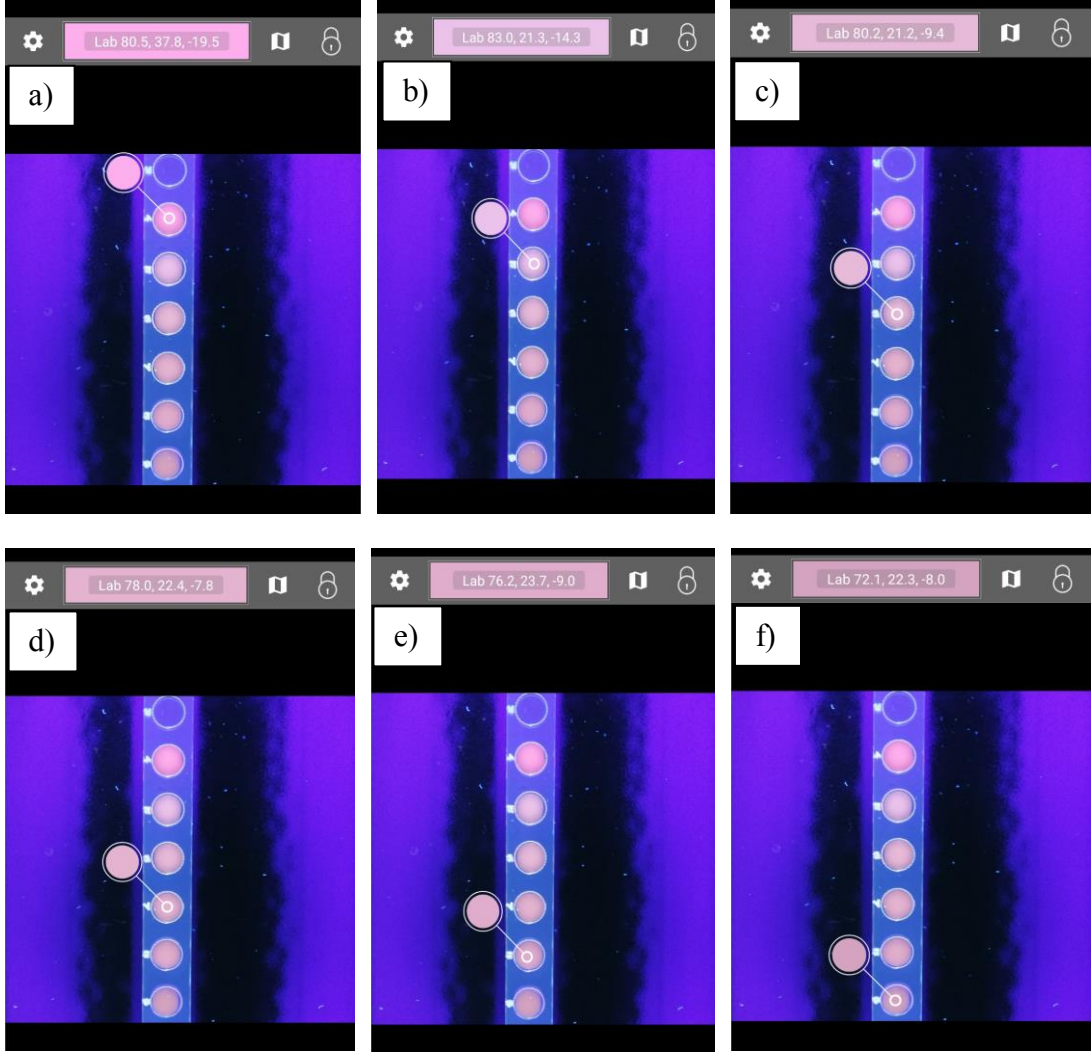
Şekil 4.31. a) 1:1 AuNC, 1:1 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN^- içeren plazma ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltilerinin $L^*/a^*/b^*$ renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:1 AuNC ve 1:1 AuNC + plazma çözeltilerinden elde edilen $L^*/a^*/b^*$ renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) hesaplanmış ve baz değer çıkarılmıştır. Siyanür içeren plazma ile etkileştirilmiş AuNC çözeltilerinden elde edilen renk farkları bu baz değerden çıkarılarak sadece siyanürün AuNC'ler üzerindeki sönmüleme etkisi doğru bir şekilde elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN^- İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

	$L^* / a^* / b^*$	ΔE^* (Renk Farkı)
1:1 (AuNC)	76,7 / 39,6 / -12,3	-
Plazma (Baz Değer)	76,8 / 40,1 / -13,8	1,58
0,1 mg/L	76,3 / 37,7 / -5,8	6,78
1 mg/L	75,0 / 37,8 / -1,7	10,8
3 mg/L	74,1 / 38,4 / -0,2	12,43
5 mg/L	70,8 / 40,5 / 0,9	14,5

4.8.2. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:10 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



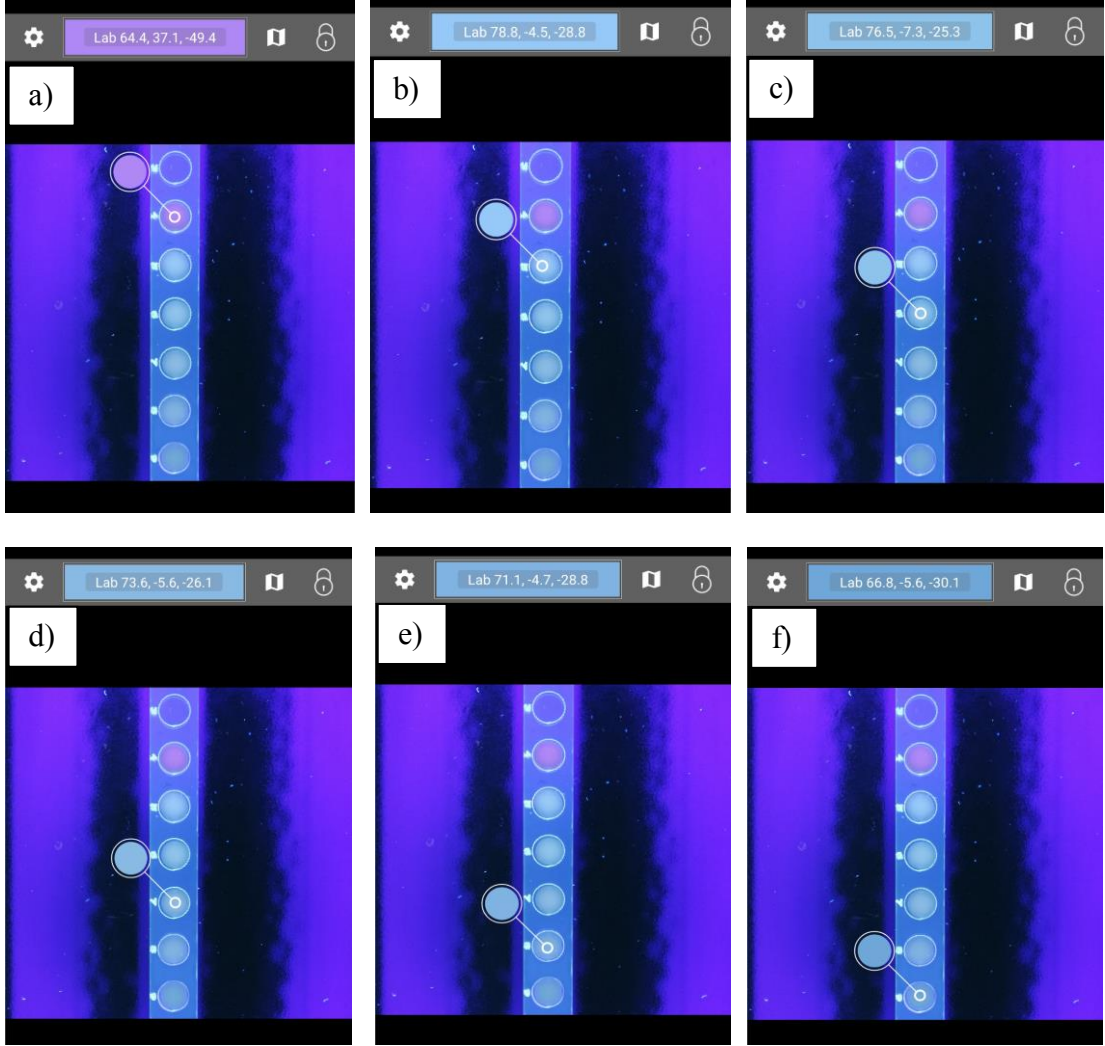
Şekil 4.32. a) 1:10 AuNC, 1:10 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:10 AuNC çözeltilerinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:10 AuNC ve 1:10 AuNC + plazma çözeltilerinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) hesaplanmış ve baz değer çıkarılmıştır. Siyanür içeren plazma ile etkileştirilmiş AuNC çözeltilerinden elde edilen renk farkları bu baz değerden çıkarılarak sadece siyanürün AuNC'ler üzerindeki sönmüleme etkisi doğru bir şekilde elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:10 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
1:10 (AuNC)	80,5 / 37,8 / -19,5	-
Plazma (Baz Değer)	80,3 / 21,3 / -14,3	17,5
0,1 mg/L	80,2 / 21,2 / -9,4	19,3
1 mg/L	78,0 / 22,4 / -7,8	19,5
3 mg/L	76,2 / 23,7 / -9,0	18,1
5 mg/L	72,1 / 22,3 / -8,0	21,05

4.8.3. Plazma ve 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:100 AuNCs Çözeltisi L*a*b* Değerleri



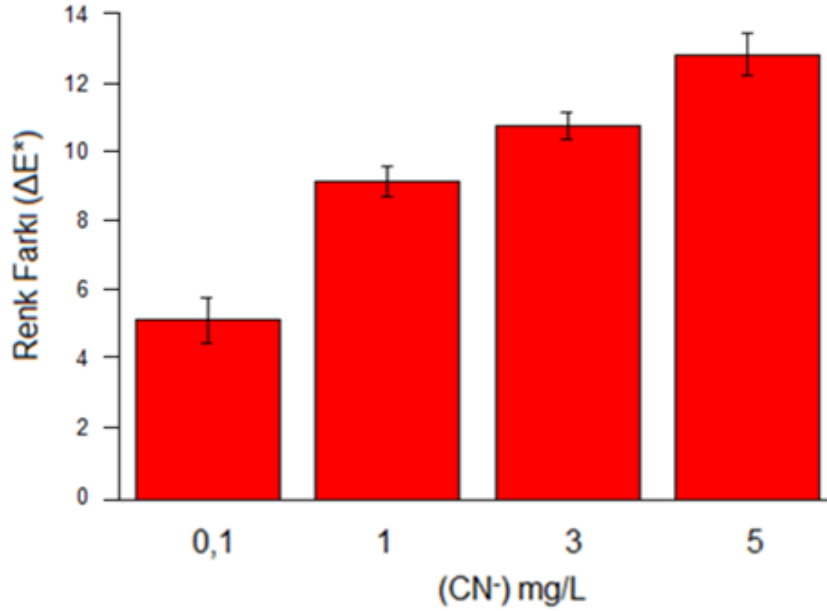
Şekil 4.33. a) 1:100 AuNC, 1:10 AuNC + b) Plazma, c) 0,1 mg/L, d) 1 mg/L, e) 3 mg/L, f) 5 mg/L CN⁻ İçeren 1:1 AuNC Çözeltileri İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüleri.

0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:100 AuNC çözeltilerinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:100 AuNC ve 1:10 AuNC + plazma çözeltilerinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) hesaplanmış ve baz değeri çıkarılmıştır. Siyanür içeren plazma ile etkileştirilmiş AuNC çözeltilerinden elde edilen renk farkları bu baz değerden çıkarılarak sadece siyanürün AuNC'ler üzerindeki sönmüleme etkisi doğru bir şekilde elde edilmiştir.

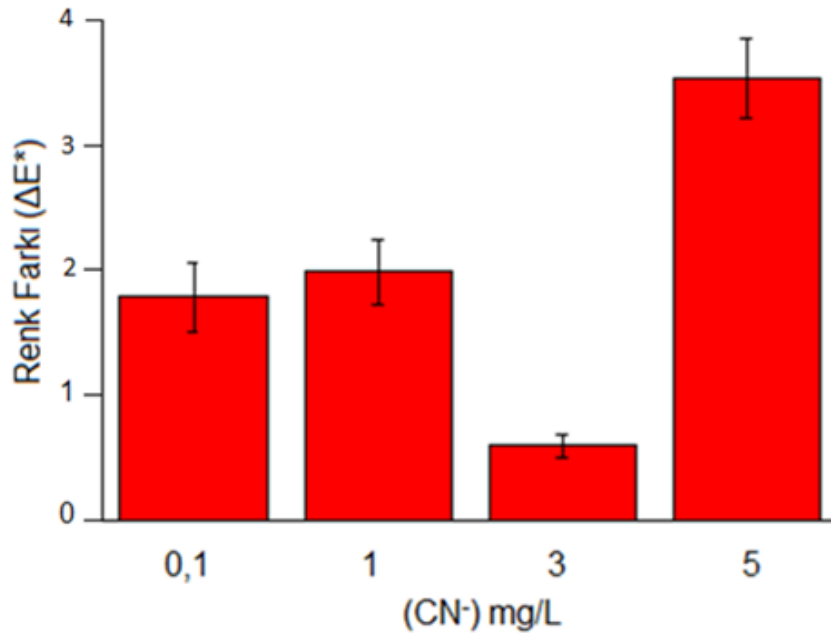
Çizelge 4.7. Plazma, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:100 AuNC Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
1:100 (AuNC)	64,4 / 37,1 / -49,4	-
Plazma (Baz Değer)	78,8 / -4,5 / -28,8	48,6
0,1 mg/L	76,5 / -7,3 / -25,3	52
1 mg/L	73,6 / -5,6 / -26,1	49,5
3 mg/L	71,1 / -4,7 / -28,8	47,1
5 mg/L	66,8 / -5,6 / -30,1	46,9

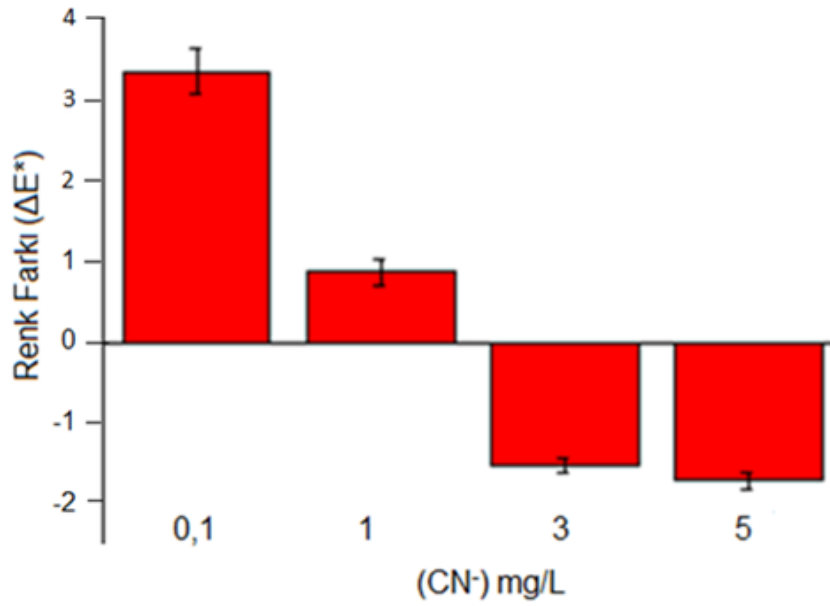
Siyanür içermeyen plazma örnekleri ve farklı derişimlerde siyanür 0,1 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L içeren plazma örneklerinin eklenmesi ile AuNC çözeltisinde meydana gelen net (plazma baz değeri çıkarıldıktan sonra) renk farkları (ΔE^*) aşağıdaki grafiklerde belirtilmiştir.



Şekil 4.34. 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.



Şekil 4.35. 1:10 AuNC’lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.



Şekil 4.36. 1:100 AuNC’lerin Farklı Derişimlerde Siyanür içeren Plazma Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.

1:1 AuNC çözeltisi farklı derişimlerde eklenen siyanürlere karşı en uygun “Renk Farkı” değerlerini vermektedir. Diğer çözeltilerde plazma sıvısının örtme etkisi ön plana çıkmaktadır.

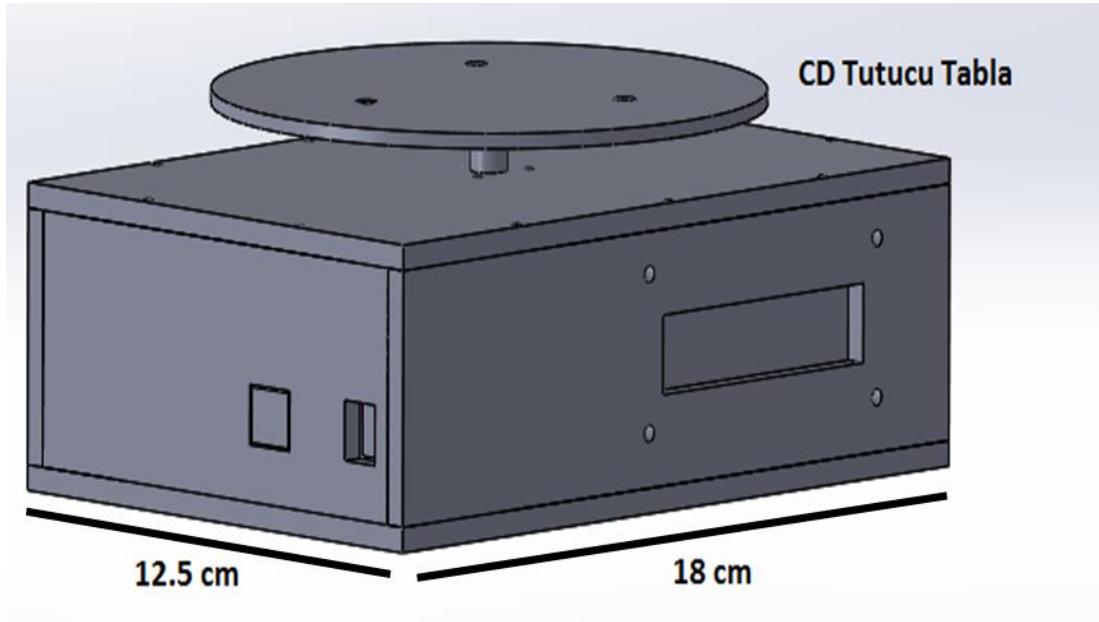
1:10 AuNC çözeltisi 3mg/L siyanür derişimine karşılık doğrusal bir sonuç vermemektedir. 0.1, 1 ve 5 mg/L derişimler için doğrusal değerler elde edilmekte ancak değerlerin birbirine çok yakın olması (0,1 ve 1 mg/L siyanür derişimlerinde) sonucun güvenilirliğini tartışmalı ve değerlendirmesini oldukça zor hale getirmektedir.

1:100 AuNC çözeltisi, her ne kadar düzgün bir lineer korelasyona sahip olsada, tampon çözelti içerisinde gerçekleştirilen örnekler için elde edilen verilere paralel şekilde, eklenen siyanür derişimlerinin AuNC'leri tamamen sönmemesi ve altta yer alan UV ışık renk değerlerinin ölçüme etki etmesi güvenilemeyen sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

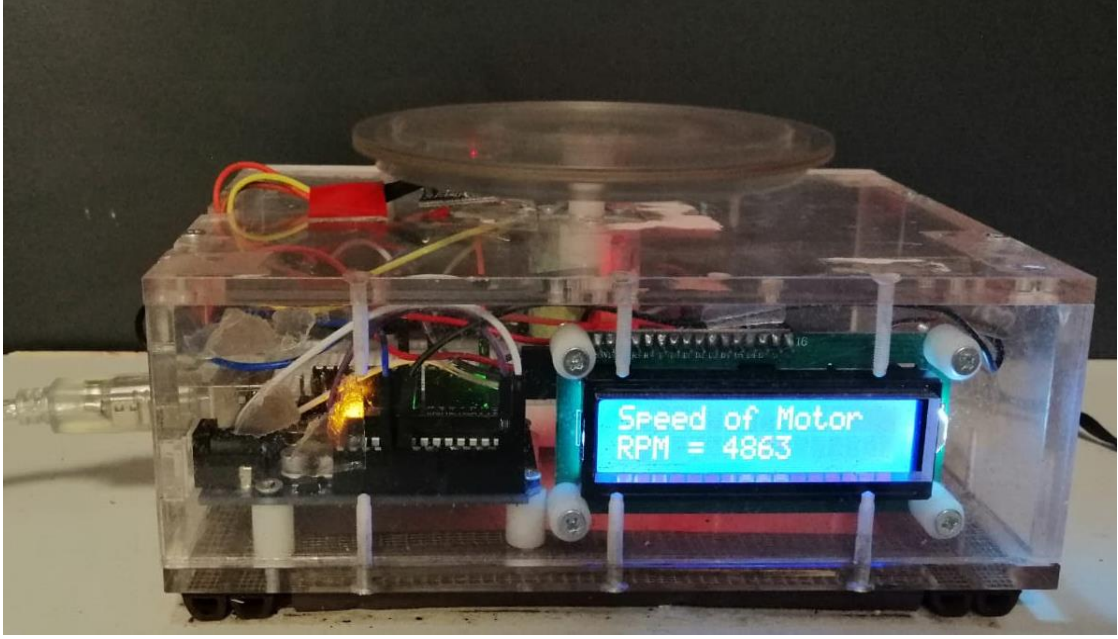
Bu bilgiler doğrultusunda tam kan plazmasından siyanür tayininin bir akıllı telefon ve Color Grab uygulaması kullanılarak floresan AuNC'ler ile yapılabileceği kanıtlanmıştır.

4.9. Tasarımı ve Üretimi Yapılan Portatif Santrifüj Cihazının Karakterizasyonu

Portatif santrifüj cihazı, kullanımı kolay, basit, hafif ve az yer kaplayacak şekilde tasarlanmıştır ve üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.37. Portatif Santrifüj Cihazının 3 Boyutlu Tasarımı.



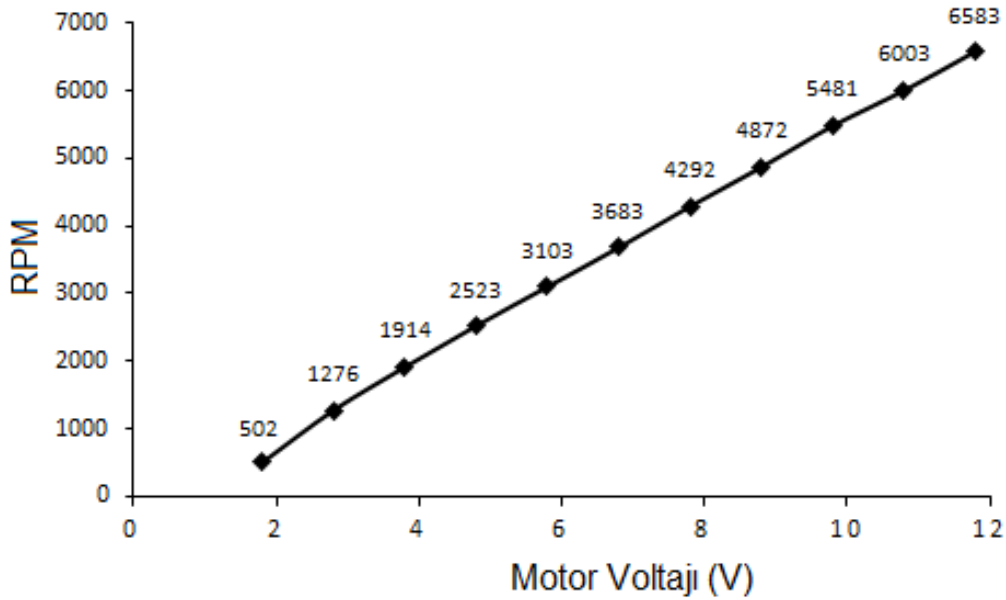
Şekil 4.38. Portatif Santrifüj Cihazının Üretim Sonrası Görüntüsü.

Üretilen portatif santrifüj cihazı için kullanılan DC Güç kaynağının, motorun verimli ve istenilen bir şekilde dönmesini sağlayıp sağlayamadığının kontrol edilmesi amacı ile programlanabilir harici bir DC Güç kaynağı ile karşılaştırması yapılmıştır.

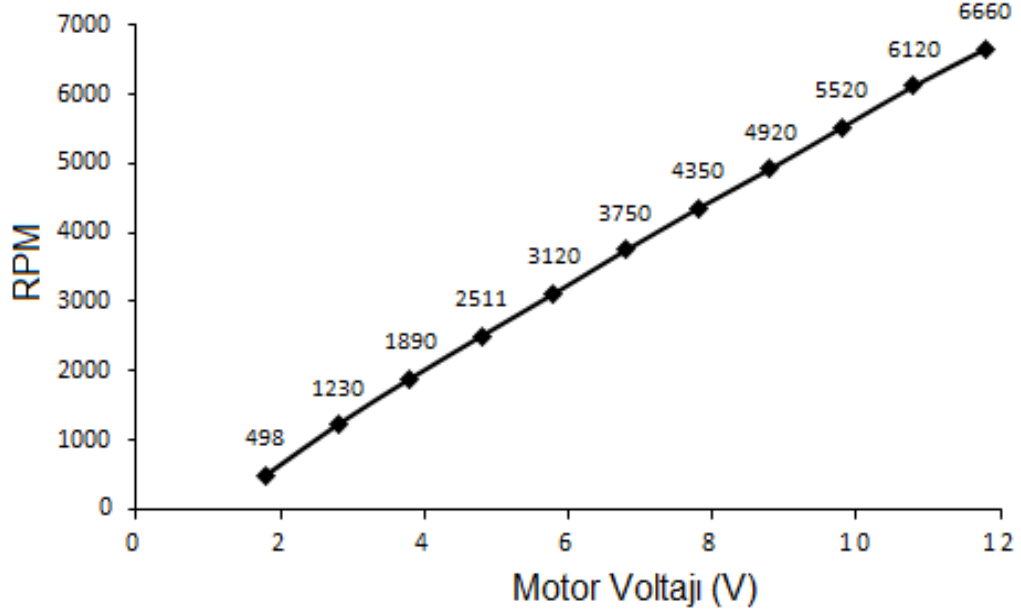


Şekil 4.39. Programlanabilir Harici Güç Kaynağı.

Programlanabilir harici güç kaynağı ve cihaz için kullandığımız DC güç kaynağı ile (potansiyometre yardımı ile) motora 1'er Volt ara ile gerilim değerleri uygulanmış ve cihazın minimum-maksimum çalışma aralığında, motor üzerindeki CD'nin verimli bir şekilde dönüp dönemediği osiloskop üzerinden incelenmiştir (uygulanan potansiyel farklara karşılık osiloskop üzerinden alınan frekans değerleri RPM'e çevrilmiştir ($1 \text{ Hz}=60 \text{ RPM}$)). Bu işlem sonucunda, üretimi gerçekleştirilen portatif santrifüj cihazı üzerinde bulunan motorun 1,8 - 11,8 V aralığında stabil bir şekilde çalıştığı gözlemlenmiş ve motora uygulanan voltaj değerine (V) karşılık, motor üzerindeki CD'nin dakikada dönüş sayısı (RPM) grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.40. Harici Güç Kaynağı ile Motora Uygulanan Voltaj Karşısında Elde Edilen RPM Değerleri.



Şekil 4.41. Portatif Santrifüj Cihazı İçin Kullanılan Güç Kaynağı ile Motora Uygulanan Voltaj Karşısında Elde Edilen RPM Değerleri.

Elde edilen verilerden, kullandığımız DC Güç kaynağının motora sağladığı dakikada dönüş sayısı (RPM) değerlerinin, harici programlanabilir DC Güç kaynağının sağladığı değerler ile uyum içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak, tasarlanan portatif santrifüj cihazı için kullanılan DC Güç kaynağının motoru verimli ve stabil bir şekilde döndürebildiği ve motorun 1,8 - 11,8 Volt aralığında sorunsuz çalışabildiği kanıtlanmıştır.

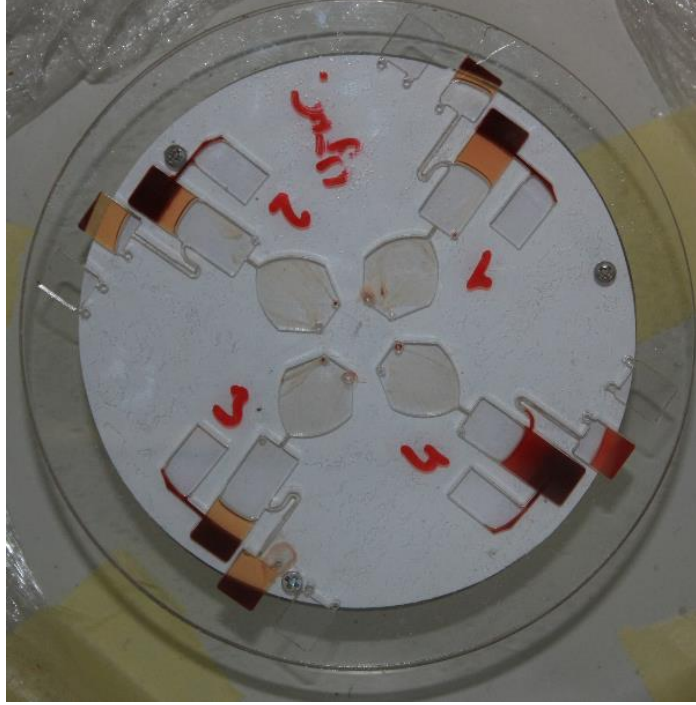
4.10. Hızlı Plazma Ayrımı için Tasarlanan ve Üretilen Çok Katmanlı Mikroakışkan CD'lerin Karakterizasyonu

CD hazırlanması kısmında birçok farklı geometride tasarımlar ve üretimler yapılmış ve kan ile denemeler yapılarak en uygun geometri bulunmuştur. Tüm deneyler kan pH değeri ile aynı olan ve hemolize sebep olamayan PBS tampon çözeltisi (pH:7,4 ve 0,01 M) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 μ L kan ve 100 μ L tampon çözelti karışımı olarak toplam 200 μ L sıvı kullanılmıştır.

4.10.1. CD Deneme - 1

Aşağıdaki şekilde yer alan CD üzerinde denemeler yapılmış ancak kan ayrıştırma odacığının genişliği sebebi ile sifon valf sistemi üzerinden plazma aktarım anında cihazın

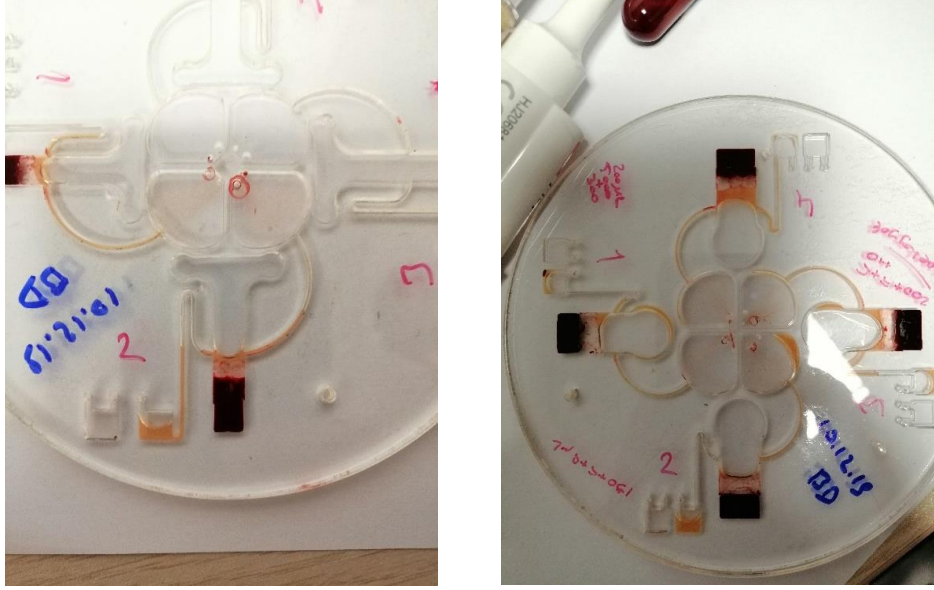
5000 RPM dönüş hızından 500 RPM dönüş hızına bir anda düşürülmesi sırasında, santrifüj cihazı kaynaklı sıvı üzerinde oluşan çalkalanma plazma ve kanın tekrar difüze olmasını ve plazmanın saf bir şekilde ayrılmasını engellemiştir.



Şekil 4.42. Geniş Ayırıştırma Odacıklı CD.

4.10.2. CD Deneme - 2

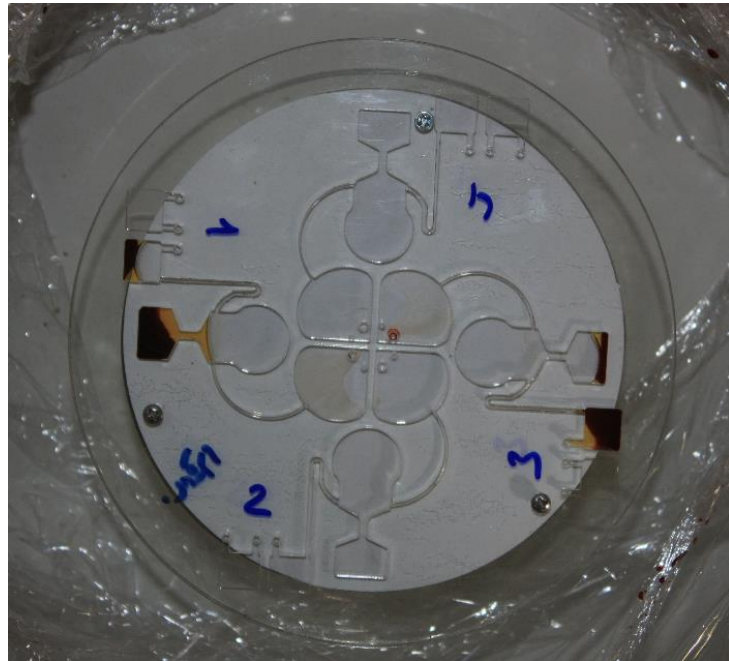
CD Deneme – 1 de sifonlama işlemi için gerekli olan CD'nin yavaşlaması sırasında oluşan difüzyonu engellemek için; ticari kan ayırma tüpleri içerisinde yer alan BD Vacutainer - Jel, tasarımı optimize edilen CD'nin kan ayırıştırma odacığı içerisinde kullanılmıştır. Jelin tiksotropik özelliği gereği yüksek hızlarda kayma hızı (shear rate) azalmakta ve viskozitesi düşmektedir. Bu sebeple plazması ayrılan kan, jel içinden geçerek ayırıştırma odacığının altına çöker. Dönme hızı yavaşlatıldığında jelin tiksotropik özelliği sebebi ile viskozitesi tekrar artar ve yoğunluğu sebebi kan ile plazma arasında kalarak karışmayı engeller. Ancak jel eklenmesi kısmında, viskoz yapısı gereği her odaya eklenen jel aynı olamamaktadır. Kan ayırıştırma işlemi sonrasında ayırıştırma odacıklarında farklı yüksekliklerde kalan jel, sifon kanalı girişinde tıkanıklığa sebep olmuştur.



Şekil 4.43. Tiksotropik Jel İçeren CD.

4.10.3. CD Deneme – 3

Yine CD Deneme – 1 de sifonlama işlemi için gerekli olan CD'nin yavaşlaması sırasında oluşan difüzyonu engellemek için; ayrıştırma odacığına kum saati benzeri bir yapıda ince bir kanal yerleştirilmiştir. Ancak dolum odacığından gelen bağlantı ince kanalın üzerine yerleştirildiği için, kanalının altında kalan kısımda havayı sıkıştırmış ve hızlanma sırasında kanın bir kısmı direk olarak plazma toplama odacığına geçmiştir.

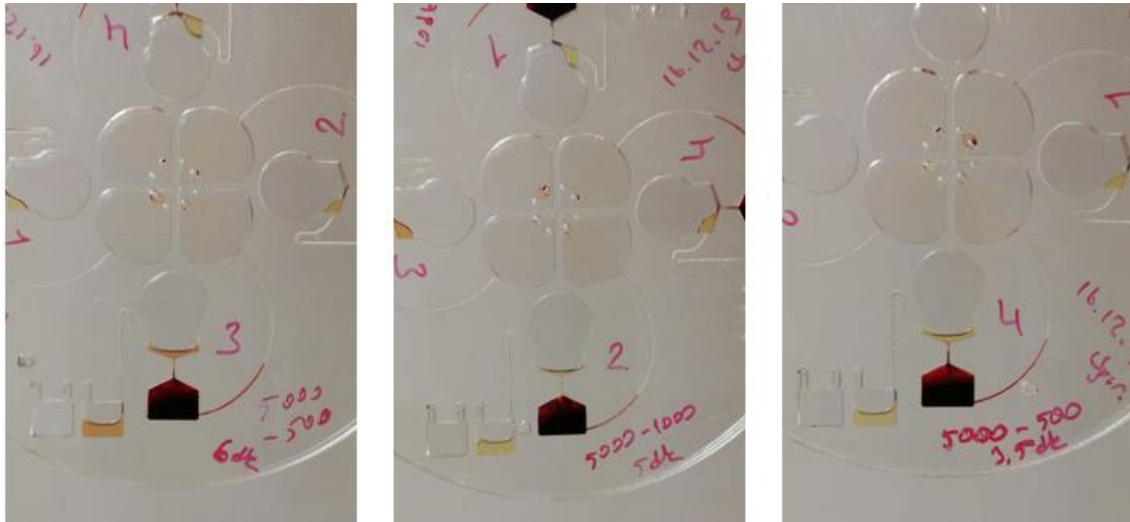


Şekil 4.44. Dolum Kanalı Pnömatik Odacığa Bağlı CD.

4.10.4. CD Deneme – 4

CD Deneme – 3’den farklı olarak yeni tasarımda kan dolum kanalı ayrıştırma odacığının alt kısmından girecek şekilde dizayn edilmiştir. Ayrım işlemi sonrası CD’nin ani yavaşlaması sırasında oluşan çalkalanma ile kırmızı kan ve plazmanın difüzyonunu engellemek adına “kum saati” benzeri bir yapı ile ayrıştırma odacığının ortası (plazmanın kaplayacağı hacim hesaplanarak) 200 mikron genişliğinde bir kanal yardımıyla kontrollü geçişe hazırlanmıştır. Ayrıştırılan plazma 500 mikron genişliğinde lazer ile taranarak oluşturulmuş sifon kanalından plazma toplama odacığına sifon valf ile aktarılmıştır.

Yapılan denemeler sonucunda, kan-siyanür deneylerinde kullanılmak üzere oluşturulan geometride kan ayrıştırılması için 5000 RPM hızda 15 saniye ve plazma aktarımı için sifonlama işleminde 500 RPM hızda 15 saniyenin yeterli olduğu görülmüştür.



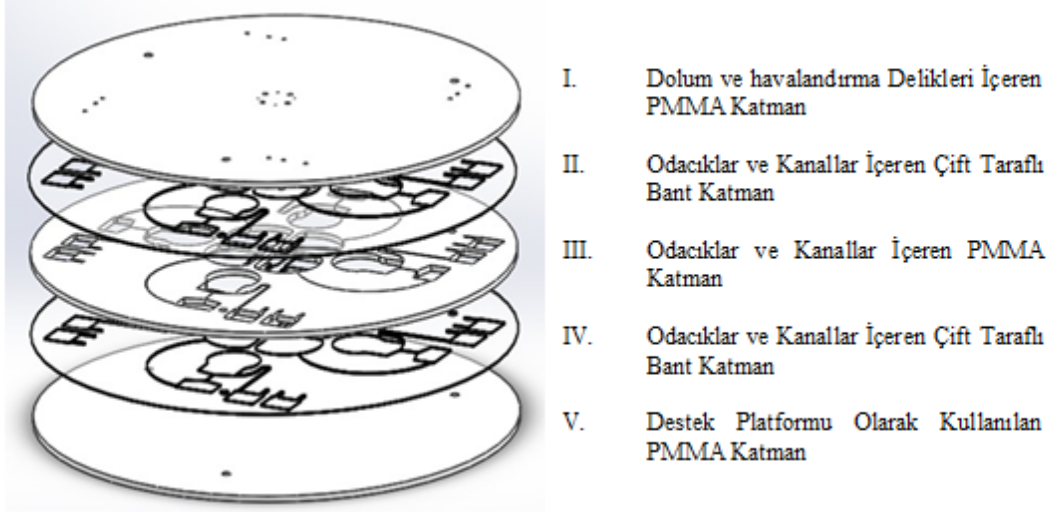
Şekil 4.45. Dolum Kanalı Ayrıştırma Odacığına Bağlı CD.

4.11. Lab on a CD/Disk Üzerinde Siyanür Denemeleri

4.8. Kan Deneyleri başlığı altında yapılan çalışmalar neticesinde; kan ve siyanür etkilişiminde 1:1 AuNC çözeltisi kullanımının en belirgin sonuçları verdiği görülmüştür. Bu sebeple; plazma dolum odacığı içerisinde (50 μ L) ve karşılaştırma odacığı içerisinde 1:1 AuNC çözeltisi (50 μ L AuNC çözeltisi + 50 μ L PBS tampon çözeltisi) kullanılmıştır. Plazma ayrıştırma işlemi için kullanılan toplam siyanürlü tam kan miktarı her bir işlem için 200 μ L’dir.

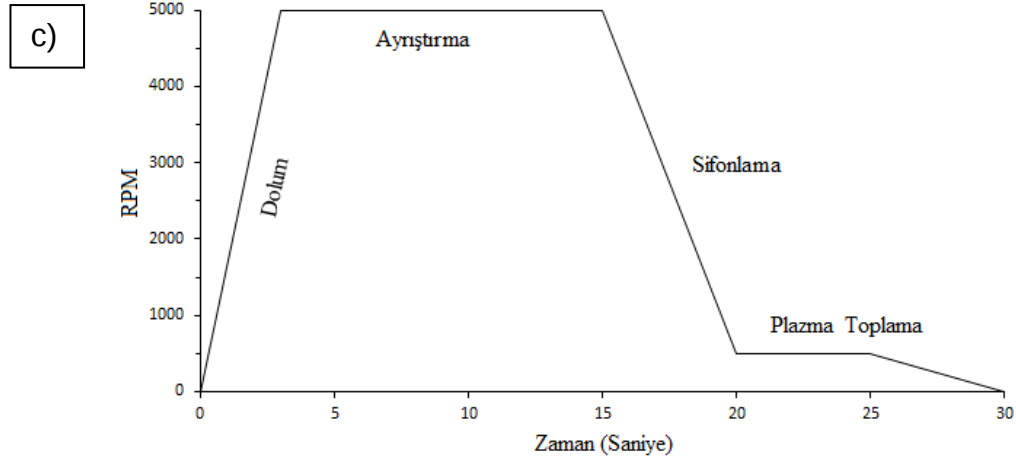
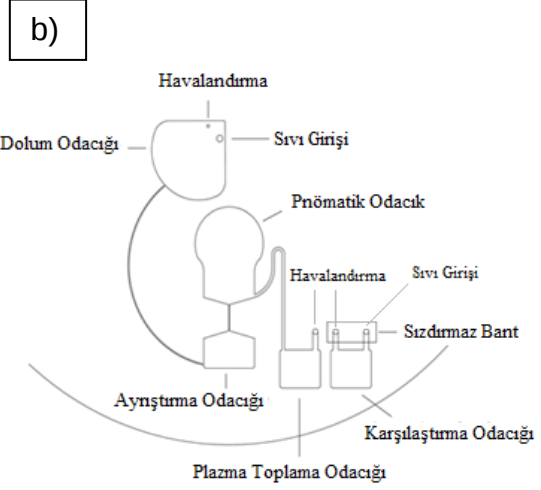
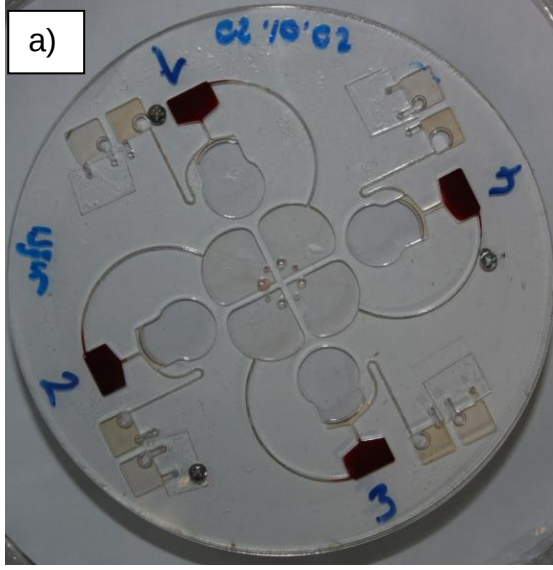
4.11.1. CD üzerinde 1:1 AuNC – Kan – Siyanür Etkileşimi

Tez kapsamında tasarımı ve üretimi yapılan portatif santrifüj cihazı ile 5 katmandan oluşan CD üzerinde otomasyona dayalı plazma ayırım işlemi gerçekleştirilmiştir.



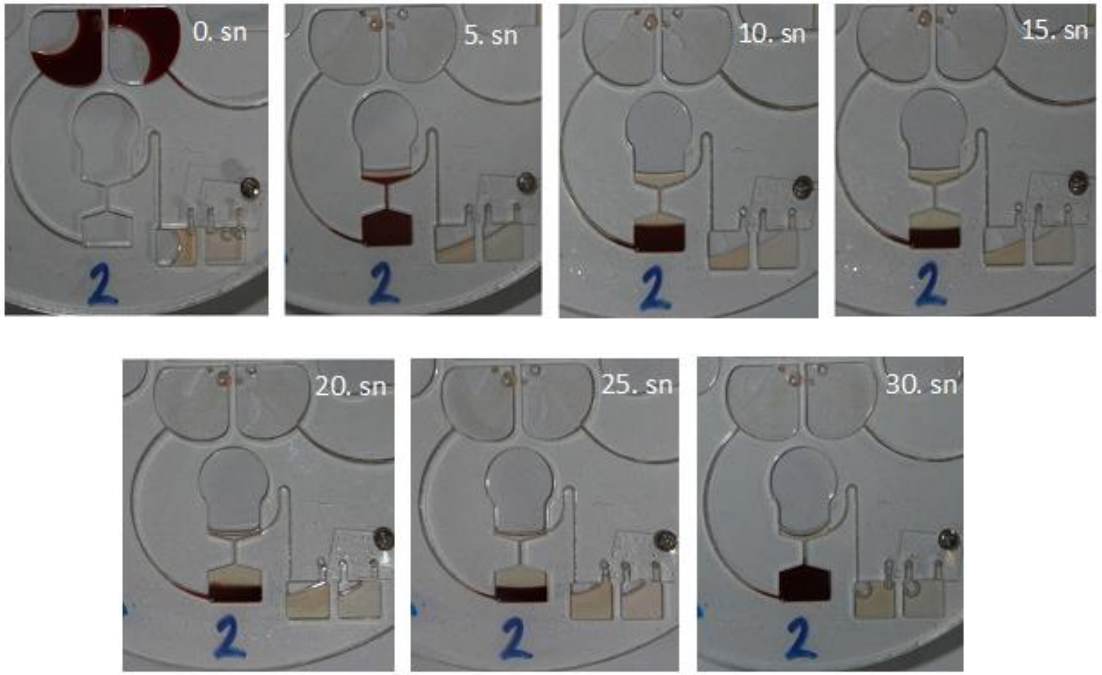
Şekil 4.46. Kullanılan 5 Katmanlı Mikroakışkan CD.

5000 RPM’de 15 saniye ve 500 RPM’de yine 15 saniye olmak üzere toplamda 30 saniye içerisinde farklı derişimlerde (0.1, 1, 3, 5) mg/L siyanür içeren tam kan örneklerinden plazma kısımları ayrıştırılmış ve plazma toplama odacığında AuNC’ler ile etkileşmesi sağlanarak UV ışık kaynağı altında etkileşim kaynaklı renk farklarının incelenmesi için sistem hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4.47. a) 1:1 AuNC ve Sırasıyla (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür İçeren Kan Örneklerinin Santrifüj Edildiği CD'nin Genel Görüntüsü, b) Kullanılan Mikroakışkan CD Üzerinde Yer Alan Alanlar ve c) Kullanılan CD üzerinde Plazma Ayrıştırma İşlemi İçin Uygulanan RPM ve Zaman Aralıkları.

CD üzerinde santrifüj işlemi gerçekleşirken 5 saniyede bir resimler çekilmiş ve pnömatik sifon sistemi ile plazmanın mikrokannallar yardımıyla ayrıştırılması gerçek zamanlı olarak izlenmiştir.

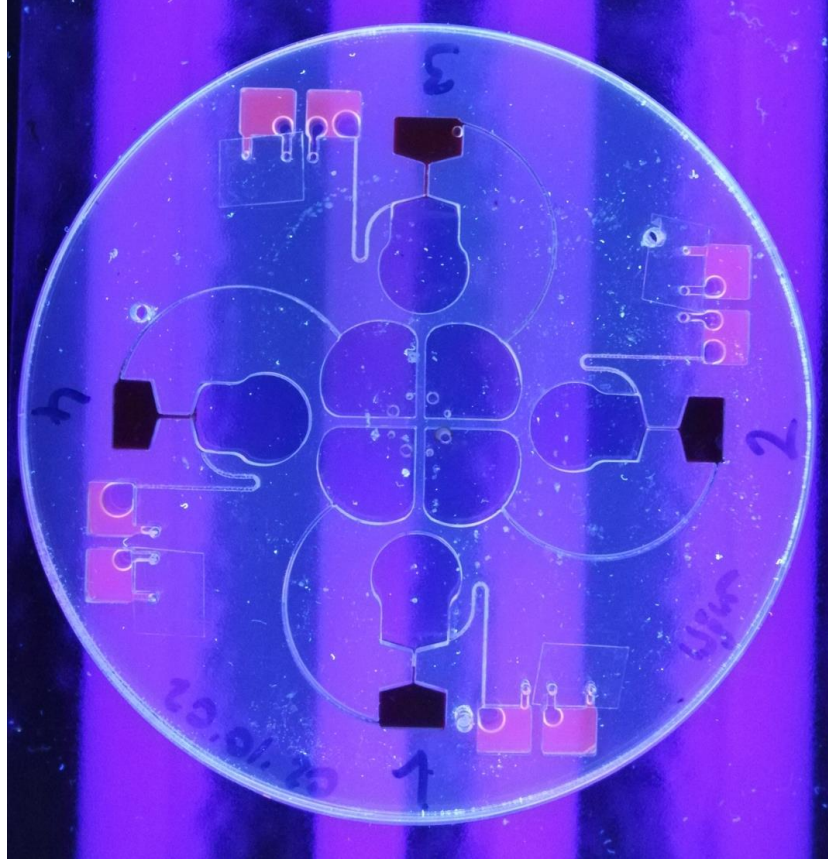


Şekil 4.48. Mikroakışkan CD Üzerinde Gerçek Zamanlı Plazma Ayırma İşlemi.

CN⁻ ile muamele edilen 200 µL tam kan örneği dolum odacığına yüklenir (0. sn). CD'nin yaklaşık 3 saniye içerisinde 5000 RPM hıza ulaşması ile dolum odacığındaki tam kan, ayrıştırma odacığına doğru santrifüjal kuvvet ile itilir (5. sn). Pnömatik odacık ve plazma toplama odacığı birbirlerine 200 µm genişliğinde bir kanal ve santrifüjal-pnömatik bir valf sistemi ile bağlıdır. CD 5000 RPM hıza çok kısa sürede çıktığından oluşan santrifüjal itme kuvveti kanın bu valften akıp gitmesini engeller ve kanı dirsek bölgesine yakın güvenli bir mesafede tutar. Ayrıştırma odacığına dolan kan, bileşenlerine ayrılmaya ve üzerinde bulunan pnömatik odacıktaki havayı sıkıştırmaya başlar (10. sn – 15. sn). 15. saniye'ye kadar 5000 RPM hız ile dönen CD üzerinde santrifüjal kuvvet, pnömatik odacıktaki sıkışan havanın altındaki bileşenlerine ayrılmış kana uyguladığı kuvvetten daha büyüktür. 15 saniye sonunda CD dönüş hızı 500 RPM'e indirilir. Bu sayede pnömatik odacıkta sıkışan hava genişlemeye ve altında bulunan kanı sifona doğru itmeye başlar (20. sn). Bileşenlerine ayrılmış kana ait 50 µL plazma sıvısının, plazma toplama odacığına tamamen dolması ve sifonlama işleminin sonlanması için 10 saniye beklenir (25. sn – 30. sn).

4.11.2. UV Işık Kaynağı Altında CD üzerinde 1:1 AuNC – Kan – Siyanür Etkileşimi Analizleri

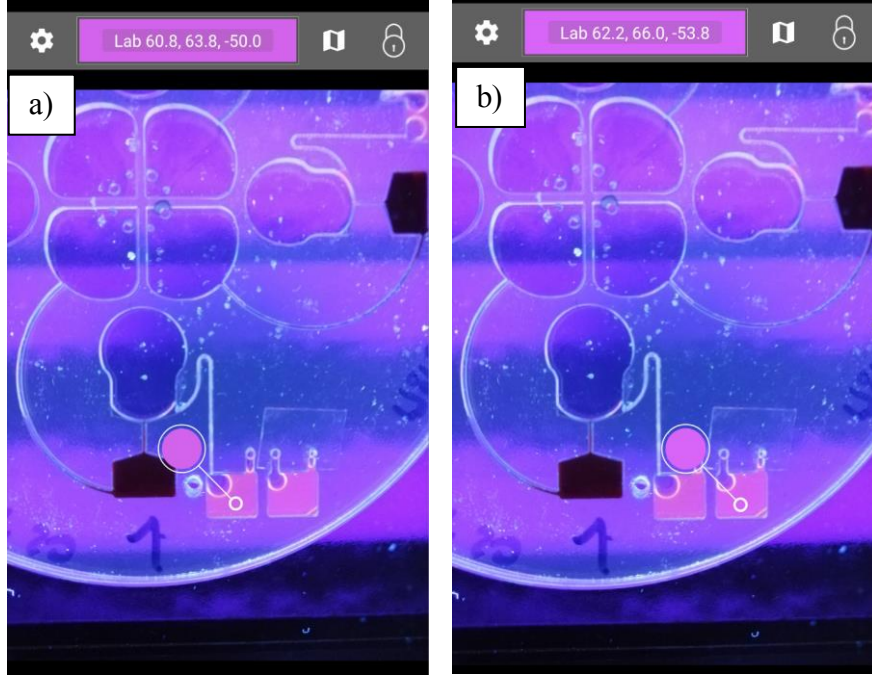
Üretilen portatif santrifüj cihazı ve CD üzerinde (5000 RPM - 15 Saniye ve 500 RPM - 15 Saniye) farklı derişimlerde (0.1, 1, 3, 5) mg/L siyanür içeren tam kan örneklerinden ayrıştırılarak AuNC'ler ile etkileşmesi sağlanan plazma sıvılarının UV ışık kaynağı altında renk farkları incelenmiştir. Plazma ayrıştırma işlemini sağlayacak geometri CD üzerinde eşit aralıklar ile 4 adet olacak şekilde tasarlanıp üretilmiş ve (0.1, 1, 3, 5) mg/L siyanür derişimleri içeren tam kan örnekleri aynı anda santrifüj edilmiştir. İşlemin tamamlanmasının ardından 4 farklı plazma toplama odacığı içerisinde yer alan toplam 100 µL, plazma-siyanür ((0.1, 1, 3, 5) mg/L)-AuNC karışımı ve yan kısımlarında bulunan karşılaştırma odacıkları içerisindeki toplam 100 µL tampon çözelti (siyanür için kullanılan ile aynı olmak üzere pH 7,4 PBS)-AuNC karışımı arasındaki renk farkları Color Grab programı ile incelenmiştir. Öncelikle 4 farklı karşılaştırma odacığındaki AuNC-PBS çözeltilerine ait L*a*b* değerleri ölçülmüştür. Tüm deneylerde olduğu gibi resimler çekilmeden önce 20 dakika (siyanür-AuNC ideal etkileşim süresi) beklenmiştir.



Şekil 4.49. 1:1 AuNC İçeren ve Sırasıyla (0.1, 1, 3, 5) mg/L Siyanür İçeren Kan Örneklerinin Santrifüj Edildiği CD'nin UV Işık Kaynağı Altında Genel Görüntüsü.

CD UV ışık üzerine yerleştirildiğinde yalnızca CD üzerinde yer alan 2 bölümde UV filamentler üzerine denk gelmektedir. Bu sebeple Color Grab uygulaması ile renk farkları analizi yapılmak üzere akıllı telefon ile resimler çekilirken CD çevirilerek tüm bölümlerin ayrı ayrı filamentler üzerinde denk gelmesi sağlanmış ve yanlış analiz yapılma ihtimali ortadan kaldırılmıştır. Ayrıca renk analizleri yapıldıktan sonra çıkan değerler siyanür içermeyen plazma sıvısının AuNC'ler ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen baz renk farkı değerinin (1,58) çıkarılması ile sadece siyanür derişimine özgü renk farkları olarak belirlenmiştir. Mikroakışkan sistem üzerinde ayrıştırılan siyanür içeren plazma örnekleri, plazma toplama odacığına dolduktan sonra UV altında resimlerin çekilmesi için diğer deneylerde de olduğu gibi 20 dakika (siyanür-AuNC ideal etkileşim süresi) beklenmiştir.

4.11.2.1. 0,1 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri



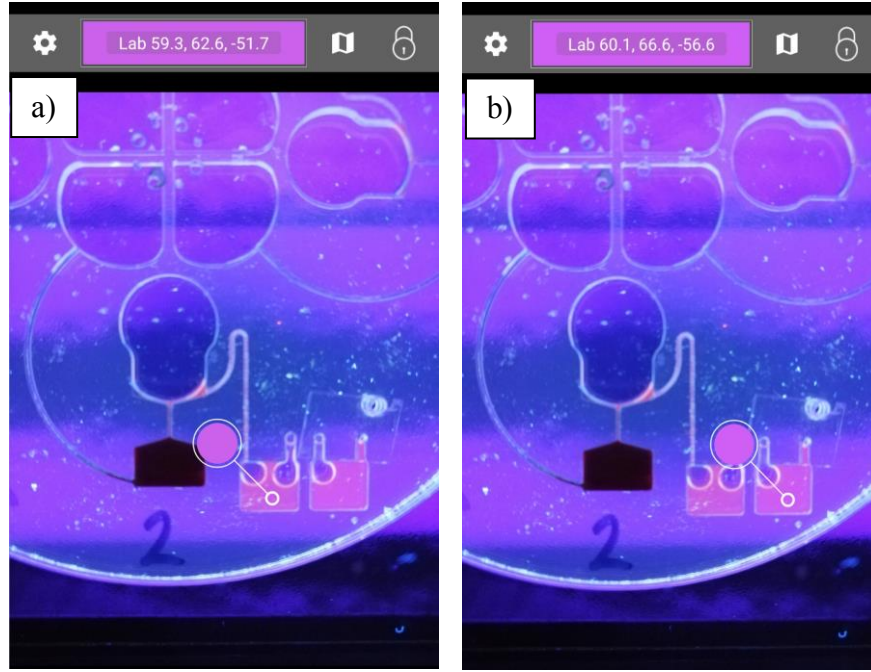
Şekil 4.50. CD Üzerinde a) 0,1 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.

0,1 mg/L, CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltisinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:1 AuNC + PBS tampon çözeltisinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) çıkarılmış ve değişim miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. 0,1 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:1 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
0,1 mg/L	60,8 / 63,8 / -50,0	4,61
PBS	62,2 / 66,0 / -53,8	-

4.11.2.2. 1 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri



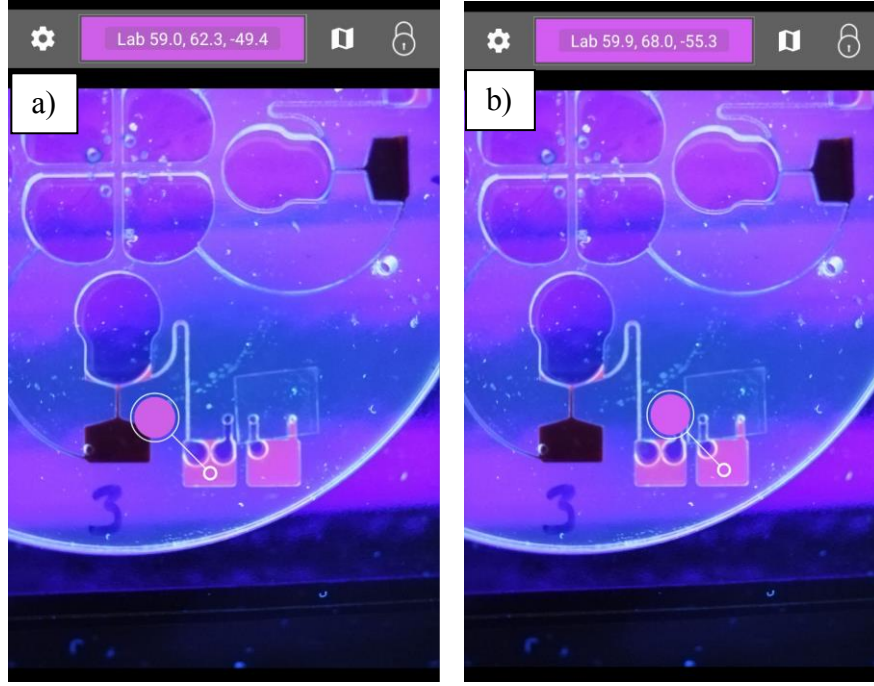
Şekil 4.51. CD Üzerinde a) 1 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.

1 mg/L, CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltisinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:1 AuNC + PBS tampon çözeltisinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) çıkarılmış ve değişim miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. 1 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:1 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
1 mg/L	59,3 / 62,6 / -51,7	6,46
PBS	60,1 / 66,6 / -56,6	-

4.11.2.3. 3 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri



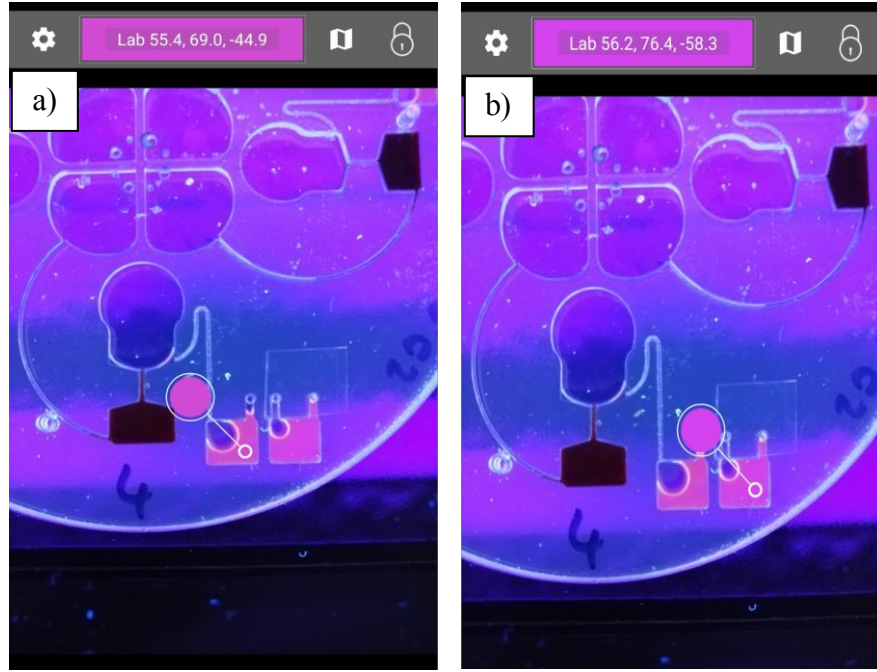
Şekil 4.52. CD Üzerinde a) 3 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.

3 mg/L, CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltisinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:1 AuNC + PBS tampon çözeltisinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) çıkarılmış ve değişim miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. 3 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:1 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
3 mg/L	59,0 / 62,3 / -49,4	8,25
PBS	59,9 / 68,0 / -55,3	-

4.11.2.4. 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNCs Çözeltisi ve Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Tampon Çözeltisi Karışımı L*a*b* Değerleri



Şekil 4.53. CD Üzerinde a) 5 mg/L Siyanür İçeren Plazma ile Etkileşen 1:1 AuNC ve b) Karşılaştırma İçin Kullanılan 1:1 AuNCs-PBS Çözeltisi İçin Color Grab Uygulaması Telefon Ekranı Görüntüsü.

5 mg/L, CN⁻ içeren plazma ile etkileştirilen 1:1 AuNC çözeltisinin L*/a*/b* renk değerleri Color Grab uygulaması ile elde edilmiştir. Siyanür içermeyen 1:1 AuNC + PBS tampon çözeltisinden elde edilen L*/a*/b* renk değerleri arasındaki renk farkı (ΔE^*) çıkarılmış ve değişim miktarı hesaplanmıştır.

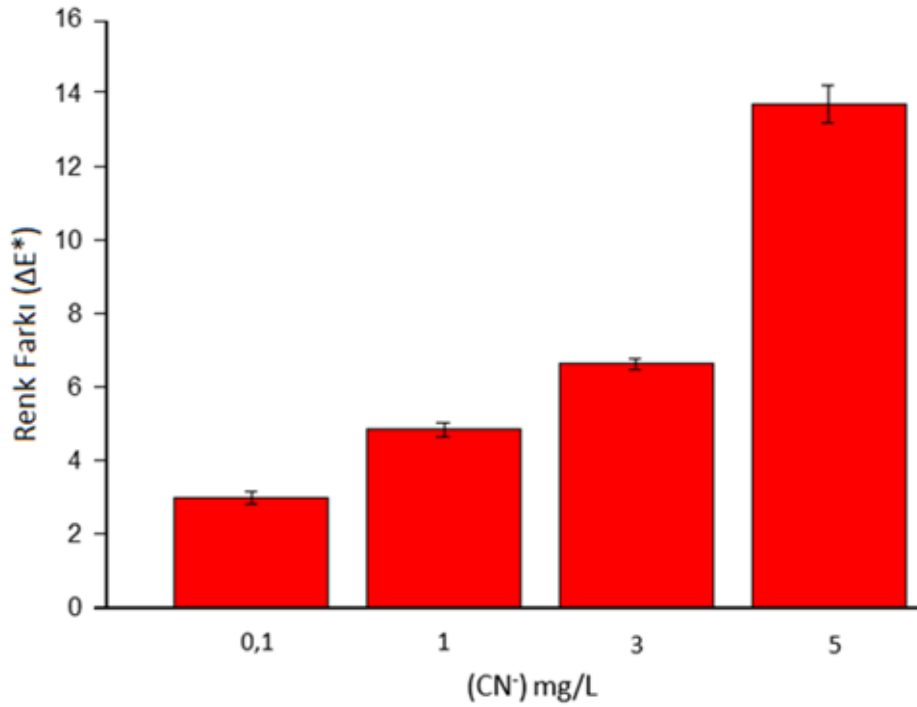
Çizelge 4.11. 5 mg/L CN⁻ İçeren Plazma Varlığında 1:1 AuNC Çözeltisi ve AuNC + PBS Tampon Çözeltisi İçin Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

1:1 (AuNC)	L* / a* / b*	ΔE^* (Renk Farkı)
5 mg/L	55,4 / 69,0 / -44,9	15,33
PBS	56,2 / 76,4 / -58,3	-

Mikroakışkan CD üzerinde ayırım işlemi yapılan farklı derişimlerde siyanür ile muamele edilmiş AuNC'lere ait Renk Farkları (ΔE^*) Color Grab programı ile çıkarılmıştır. Siyanür içermeyen plazma sıvısının AuNC'ler etkileştirilmesi sonucu elde edilen baz renk farkı değerinin (1,58) çıkarılması ile en doğru sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.12. Mikroakışkan CD Üzerinde Kullanılan Siyanür Derişimlerine Karşı Elde Edilen Renk Farkları (ΔE^*) Değerleri.

CN ⁻ (mg/L)	Renk Farkı (ΔE^*)
0,1	3,03
1	4,88
3	6,67
5	13,75



Şekil 4.54. CD üzerinde 1:1 AuNC'lerin Farklı Derişimlerde Siyanür Etkileşimi Sonrası Renk Farkları.

Literatürde yer alan bilgilere göre; kanda 0,5-1 mg/L siyanür vücutta bazı ufak çaplı semptomlara sebep olurken, 1-2 mg/L arası vücutta orta şiddette semptomlara sebep olur. Kanda 2-3 mg/L siyanür vücutta şiddetli semptomlara yol açarken, 3 mg/L'den büyük miktarlar genelde ölüm ile sonuçlanır [309].

Elde edilen sonuçlar neticesinde, standart santrifüj cihazı ile ayrıştırılan siyanür içeren plazma örneklerine göre CD üzerinde ayrıştırılan plazma örneklerinde, siyanür derişim farklarına göre daha net bir ölçüm aralığında tayin yapılabildiği ve insan sağlığı için zararsız olan / ölüme sebebiyet veren 0,5 mg/L ile 5 mg/L siyanür derişimleri arasında yüksek doğrulukta ölçüm yapılabildiği gözlemlenmiştir. Böylelikle literatürde belirtilen ve vücutta bazı ufak çaplı semptomlara sebep olan 0,5 mg/L siyanür derişiminin 5 kat altında siyanür tayinine olanak sağlayan bir sistem geliştirilmiştir.

CD üzerindeki mikroakışkan sistem ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen verilerin, 4.8. Kan Deneyleri başlığı altında anlatılan ve siyanür içeren kanın ependorflarda santrifüj edilerek pipet yardımı ile ayrıştırılması sonucunda toplanan plazma sıvısının AuNC'ler ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen verilere göre daha ayırt edici sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Mikroakışkan CD üzerinde kan ayrıştırmayı sağlayan sistemin, plazmayı elle ve pipet ile ayırmaya kıyasla daha yüksek saflıkta ayrıştırmayı sonucu AuNC'ler ile olan siyanür etkileşimin daha verimli bir şekilde gerçekleştirildiği söylenebilir. Ayrıca kan ayırma işlemleri için kullanılan ependorf tüplerin üretildiği malzeme olan Polipropilen'e (PP) kıyasla, CD sisteminde kullanılan PMMA'nın UV geçirgenliğinin çok daha fazla olduğu bilgisi kaynaklarda yer almaktadır [310]. Sonuç olarak UV ışık kaynağı altında tayin sistemleri için kullanılacak benzer mikroakışkan CD sistemleri için PMMA kullanılmasının daha verimli sonuçlar vereceği de kanıtlanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda tam kan plazmasından siyanür tayini işleminin bir akıllı telefon ve Color Grab uygulaması kullanılarak, PMMA katmanlı mikroakışkan bir CD üzerinde floresan AuNC'ler ile yapılabileceği kanıtlanmıştır.

5. YORUM

Tamamlanan doktora tez çalışması kapsamında mikroakışkan bir platform ile kombineli ve BSA stabilize floresan AuNC'lerin sönümlenmesi prensibine dayanan, insan kan plazmasından bir akıllı telefon ve bir uygulama yardımı ile UV ışık kaynağı altında seçici ve hassas siyanür tayinine kolorimetrik olarak imkan sağlayan taşınabilir bir sistem tasarlanmış ve üretilmiştir. Sistem insan için hafif çapta veya ölümcül olabilecek sırasıyla 0,5 mg/L ve 5 mg/L siyanür derişimlerine göre 5 kat daha az bir miktarda (0,1 mg/L) siyanür tayini yapılabilmesine olanak sağlamakta ve diğer metal iyonları ve tuzlara karşı yüksek seçililik göstermektedir.

Tez çalışma sonucunda ortaya çıkarılan siyanür tayin sisteminin araştırmalarımıza göre literatürde bir benzeri bulunmamakla birlikte, kandan siyanür tayini için kullanılan geleneksel spektrofotometrik, spektrofotoflorometrik ve kromatografik yöntemler ve GC-NPD (GC with Nitrogen Phosphorous Detector) ve GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) gibi geleneksel cihazlara güçlü bir alternatif oluşturacak şekilde siyanür tayinine izin verdiği gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, mikrolitre seviyesinde örnek miktarı ile çalışılabilen, geleneksel tayin yöntemlerinde sıklıkla kullanılan örneğin asitle muamele edilmesi, örnek saklama ve taşıma gibi ek işlemler gerektirmeyen kullanımı kolay ve maliyeti düşük bir siyanür tayin sistemi oluşturulmuştur. Ayrıca siyanür zehirlenmesi tedavisi için en büyük rolü oynayan analiz zamanı açısından son derece hızlı olan (30 dakika) sistem, siyanür zehirlenmelerine bağlı ölümlerin minimuma indirgenmesi için güçlü bir alternatif olacaktır.

Tez kapsamında kan ile yapılan siyanür tayini çalışmalarının öncesinde, kanda bulunan veya bulunabilecek birçok farklı metal iyonu ve anyonun sistemin seçiliğine ve hassasiyetine etkilerini incelemek adına kan ortamı simüle edilmiş ve deneyler öncelikle tampon çözelti içerisinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilen ve içme sularında bulunabilecek siyanür limitine göre ($2,7 \times 10^{-6}$ M) 10 kat daha düşük derişimlerde siyanür tayinine izin veren ($0,25 \times 10^{-6}$ M) bir

sistemin geliştirildiğini de ayrıca göstermiştir. Böylelikle tez kapsamında tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen sistem ile geleneksel analiz cihazlarına ihtiyaç duymadan içme sularında da siyanür tayini yapılabileceği ayrıca gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen cihaz ile biyomedikal sektöründe ticarileşmeye kadar gidilebilecek ve elde edilen verilere göre bu alandaki çalışmalara göre yüksek rekabet avantajı sağlanacaktır.

Geliştirilen sistemin uluslararası sağlık teknolojileri sektöründe katma değeri yüksek ve yenilikçi yönünün ön planda olmasının yanı sıra, sağlık alanında uygulama projelerine temel teşkil edecek, girdi sağlayacak teknolojik ürün ve bilgi üretimine yönelik olması son derece önemlidir.

Gerçekleştirilen doktora tez çalışmasının en önemli yenilikçi yönü ise, portatif bir santrifüj cihazı ile bir mikroakışkan CD üzerinde otomasyona dayalı kan ayırma işleminin floresan AuNCs'ler ile kombine edilmesi ve bir akıllı telefon ile kandan siyanür tayini işleminin 30 dakika gibi kısa bir sürede ve çok düşük maliyetler ile gerçekleştirilmesinin araştırmalarımıza göre literatüre ilk defa bu çalışma ile kazandırılacak olmasıdır.

Geliştirilen cihaz ile santrifüj temelli konvansiyonel ayırma yöntemlerine göre maliyet ve kolaylık açısından bariz bir üstünlük elde edilmiş, böylelikle çok yüksek ekonomik giderlerin ve zaman kaybının elemine edilmesi sağlanmıştır.

Ek olarak, gerçekleştirilen doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen strateji ve mikro yaklaşımlar sayesinde oluşturulan sistem kanser, kök hücre ve genetik araştırmaları gibi diğer sıvı örnekler içinde kullanılabilecektir. Mikrometre boyutlarındaki kanallarda akışkanların kontrol edilmesiyle gerçekleştirilen bu uygulama ile tıbbi teşhis ve kimyasal analiz için gerekli olan madde miktarı azaltılabilecek, tıp ve temel bilim uygulamalarında çığır açabilecek sonuçlar elde edilebilecektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Smith S, Med Leg J, 20 **(1952)** 153–167.
- [2] Sykes AH, Early studies on the toxicology of cyanide, In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, (Eds.), Cyanide in Biology, New York, NY, Academic Press, 1–9, **1981**.
- [3] Weider B, Georgian J Napoleonic Hist, (Jan) **(2000)** 138–139.
- [4] Maddern T, Philos Trans R Soc Lond Biol Sci, 37 **(1731)** 84–99.
- [5] Walrath J, Li FP, Hoar SK, Mead MW, Fraumeni JF, Am J Public Health, 75 **(1985)** 883–885.
- [6] Thompson RL, Manders WW, Cowan RW, J Forensic Sci, 32 **(1987)** 433–443.
- [7] Baskin SI, Zyklon, In: La Cleuer W, (Ed.), Encyclopedia of the Holocaust, New Haven, Conn, Yale University Press, **2001**.
- [8] Robinson JP, The problem of chemical and biological warfare. Vol 1. In: Robinson JP, (Ed.), The Rise of CB Weapons: A Study of the Historical, Technical, Military, Legal and Political Aspects of CBW, and Possible Disarmament Measures, New York, NY, Humanities Press, 155–156, **1971**.
- [9] Lang JS, Mullin D, Fenyvesi C, Rosenberg R, Barnes J, US News & World Report, Is the “protector of lions” losing his touch? November, 10:29, **1986**.
- [10] Medical expert reports use of chemical weapons in Iran-Iraq War. UN Chronicle, 22:24–26, **1985**.
- [11] Wolnick KA, Fricke FL, Bonnin E, Gaston CM, Satzger RD, Anal Chem, 56 **(1984)** 466A-470A.
- [12] Sidell FR, Bel Air, Md. Personal Communication, Chemical casualty consultant, May **1996**.
- [13] FJ Baud, Human & Experimental Toxicology, 26 **(2007)** 191-201.
- [14] Walrath J, Li FP, Hoar SK, Mead MW, Fraumeni JF, Am J Public Health 75 **(1985)** 883–885.

- [15] Conn EE, Introduction, In: Evered D, Harnett S, (Eds.), Cyanide Compounds in Biology. London, England, Wiley, 1–2, CIBA Foundation Symposium 140, **1988**.
- [16] Lundquist P, Rosling H, Sörbo B, Tibbling L, Clin Chem, 33 (**1987**) 1228–1230.
- [17] Baker RR, Proctor CJ, Environ Int, 16 (**1990**) 231–245.
- [18] Toxicological Profile for Cyanide, Atlanta, Ga, US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **2004**.
- [19] Cicerone RJ, Zellner R, J Geophys Res, 88 (**1983**) 689–696.
- [20] Li Q, Jacob DJ, Bey I, et al., Geophys Res Lett, 27 (**2000**) 357–360.
- [21] Vetter J. Toxicon, 38 (**2000**) 11–36.
- [22] Way JL, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 24 (**1984**) 451–481.
- [23] Towill LE, Drury JS, Whitfield BL, Lewis EB, Galyan EL, Review of the Environmental Effects of Pollutants: V. Cyanide, Washington DC, US Environmental Protection Agency, **1978**.
- [24] Solomonson LP, Cyanide as a metabolic inhibitor, In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, (Eds.), Cyanide in Biology, New York, NY, Academic Press, 11–28, **1981**.
- [25] Beasley V, Toxicants that inhibit the function of cytochromes. In: Beasley V, (Ed.), Veterinary Toxicology. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service; **1999**.
- [26] 23. Knight AP, Walter RG, Plants causing sudden death. In: Knight AP, Walter RG, (Eds.), A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America, Jackson, Wyo, Teton NewMedia, **2002**.
- [27] Conn EE, Cyanogenic glycosides. In: Neuberger A, Jukes TH, (Eds.), Biochemistry of Nutrition 1, Baltimore, Md, University Park Press, 21–43, **1979**.
- [28] Technical Report Series No. 28, Cyanogenic Glycosides in Cassava and Bamboo Shoots: A Human Health Risk Assessment, Canberra, Australia, Food Standards Australia New Zealand, **2005**.

- [29] Hall AH, Rumack BH, Schaffer MI, Linden CH, Clinical toxicology of cyanide: North American clinical experiences, In: Ballantyne B, Marrs TC, (Eds.) *Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides*, Bristol, England, Wright, Chap 12, 313–314, **1987**.
- [30] Conn EE, Introduction, In: Evered D, Harnett S, (Eds.), *Cyanide Compounds in Biology*. London, England, Wiley, 1–2, CIBA Foundation Symposium 140, **1988**.
- [31] Hibbs CM, *Vet Hum Toxicol*, 21 (**1979**) 401–403.
- [32] Honig DH, Hockridge ME, Gould RM, Rackis JJ, *J Agric Food Chem*, 31 (**1983**) 272–275.
- [33] Nartey F, Toxicological aspects of cyanogenesis in tropical foods. In: Smith RL, Bababummi ER, (Eds.), *Toxicology in the Tropics*. London, United Kingdom, Taylor & Francis, 53–73, **1980**.
- [34] Vennesland B, Castric PA, Conn EE, Solomonson LP, Volini M, Westley J, *Fed Proc*, Cyanide metabolism, 41, 2639–2648, **1982**.
- [35] Way JL, Pharmacologic aspects of cyanide and its antagonism. In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, (Eds.), *Cyanide in Biology*, New York, NY, Academic Press, 29–49, **1981**.
- [36] Alarie Y. *Crit Rev Toxicol*, 32 (**2002**) 259–289.
- [37] Keilin D, *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 104 (**1929**) 206–251.
- [38] Warburg O, *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 76 (**1911**) 331–346.
- [39] Lieske CN, Clark CR, Zoeffel LD, *J Appl Toxicol*, 16 (**1996**) 171–175.
- [40] Way JL, Gibbon SL, Sheehy M, *J Pharmacol Exp Ther*, 153 (**1966**) 381–385.
- [41] Jarabak R, Westley J, *Arch Biochem Biophys*, 185 (**1978**) 458–465.
- [42] Westley J. Cyanide and sulfane sulfur. In: Vennesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F, (Eds.), *Cyanide in Biology*. New York, NY, Academic Press, 61–76, **1981**.
- [43] Sylvester DM, Hayton WL, Morgan RL, Way JL, *Toxicol Appl Pharmacol*, 69 (**1983**) 265–271.

- [44] Porter DW, Baskin SI, J Biochem Toxicol, 11 (**1996**) 45–50.
- [45] Baskin SI, Petrikovics I, Kurcha JS, et al., Insights on cyanide toxicity and methods of treatment, In: Flora SJS, Romano JA, Baskin SI, Sekhar K, (Eds.), Pharmacological Perspectives of Toxic Chemicals and Their Antidotes, New Delhi, India, Narosa Publishing House, 105–146, **2004**.
- [46] Wood JL, Cooley SL, J Biol Chem, 218 (**1956**) 449–457.
- [47] Hall AH, Rumack BH, Ann of Emerg Med, 15 (**1986**) 1067–1074.
- [48] Way JL, Leung P, Sylvester DM, Burrows G, Tamulinas C, Methaemoglobin formation in the treatment of acute cyanide intoxication. In: Ballantyne B, Marrs TC, (Eds.), Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides, Bristol, England, Wright, 402–412, **1987**.
- [49] Ballantyne B, Toxicology of cyanides, In: Ballantyne B, Marrs TC, (Eds.), Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides, Bristol, England, Wright, 41–126, **1987**.
- [50] Ballantyne B, Bright J, Swanston DW, Williams P, Med Sci Law, 12 (**1972**) 209–219.
- [51] Baskin SI, Wilkerson G, Alexander K, Blitstein AG, Cardiac effects of cyanide, In: Ballantyne B, Marrs TC, (Eds.), Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides, Bristol, England, Wright, 138–155, **1987**.
- [52] Pitt BR, Radford EP, Gurtner GH, Traystman RJ, Arch Environ Health, 34 (**1979**) 345–349.
- [53] Haymaker W, Ginzler AM, Ferguson RL, Mil Surg, 111 (**1952**) 231–246.
- [54] Paulet G, Chary R, Bocquet P, Arch Int Pharmacodyn, 127 (**1969**) 104–117.
- [55] McNamara BP, Estimates of the Toxicity of Hydrocyanic Acid Vapors in Man, Aberdeen Proving Ground, Md, Edgewood Arsenal, Technical Report EB-TR-78023, **1976**.
- [56] Bark LS, Higson HG, Analyst, 88 (**1963**) 751.
- [57] Troup CM, Ballantyne B, Analysis of cyanide in biological fluids and tissues. In: Ballantyne B, Marrs TC, (Eds.), Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides, Bristol, England, Wright, 22–40, **1987**.

- [58] Westley AM, Westley J, *Anal Biochem*, 181 **(1989)** 190–194.
- [59] Egekeze JO, Oehme FW, *J Anal Toxicol*, 3 **(1979)** 119–124.
- [60] Ganjali MR, Yousefi M, Javanbakht MJ, et al., *Anal Sci*, 18 **(2002)** 887–892.
- [61] Casella IG, Guascito MR, De Benedetto GE, *Analyst*, 123 **(1998)** 1359–1363.
- [62] Amini MK, Shahrokhian S, Tangestaninejad S, *Anal Chim Acta*, 402 **(1999)** 137–143.
- [63] Pasciak, J. and Hurek, J, *Chemia Analityczna* (Warsaw, Poland), 29 **(1984)** 571–580.
- [64] du Cailar J, Mathieu-Daudé JC, Deschodt J, Griffé O, *Ann Anesthesiol Fr*, 17 **(1976)** 519–528.
- [65] McAnalley BH, Lowry WT, Oliver RD, Garriott JC, *J Anal Toxicol*, 3 **(1979)** 111.
- [66] Cai X, Zhao Z, *Anal Chim Acta*, 212 **(1988)** 43–48.
- [67] Bjerregaard C, Moller P, Sorensen H, *J Chromatogr A*, 717 **(1995)** 409.
- [68] Glatz Z, Novakova S, Sterbova H, *J Chromatogr A*, 916 **(2001)** 273–277.
- [69] Berlin AM, *Pediatrics*, 46 **(1971)** 793.
- [70] Bunn HF, Disorders of hemoglobin, In: Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11th (Ed.), New York, NY, McGraw-Hill, 1518–1527, **1987**.
- [71] Groff WA, Stemler FW, Kaminskis A, Froehlich HL, Johnson RP, *J Toxicol Clin Toxicol*, 23 **(1985)** 133–163.
- [72] Lundquist P, Rosling H, Sörbo B, *Clin Chem*, 31 **(1985)** 591–595.
- [73] McMillan DE, Svoboda AC, *J Pharmacol Exp Ther*, 221 **(1982)** 37–42.
- [74] Moriya F, Hashimoto Y, *J Forensic Sci*, 46 **(2001)** 1421–1425.
- [75] Ballantyne B, *J Forensic Sci Soc*, 15 **(1975)** 51–56.

- [76] US Department of the Army. Assay Techniques for Detection of Exposure to Sulfur Mustard, Cholinesterase Inhibitors, Sarin, Doman, GF, and Cyanide. Washington, DC, DA, Technical Bulletin PB-96-189295/XAB, **1996**.
- [77] Lundquist P, Sörbo B, Clin Chem, 35 (**1989**) 617–619.
- [78] Sano A, Takimoto N, Takitani S, J Chromatogr, 582 (**1992**) 131–135.
- [79] Baar S, Analyst, 91 (**1966**) 268–272.
- [80] Vesey CJ, Cole PV, Simpson PJ, Br J Anaesth, 48 (**1976**) 651–660.
- [81] Vesey CJ, Wilson J, J Pharm Pharmacol, 30 (**1978**) 20–26.
- [82] Sunshine I, Finkle B, Arch Gewerbepath Gewerbehyg, 20 (**1964**) 558–561.
- [83] Hazardous Substances Data Bank. Cyanide. Bethesda, Md, National Library of Medicine, **2004**.
- [84] Vogel SN, Sultan TR, Ten Eyck RP, Clin Toxicol, 18 (**1981**) 367–383.
- [85] Rodkey FL, Robertson RF, Clin Chem, 24 (**1978**) 2184–2185.
- [86] Pettigrew AR, Fell GS, Clin Chem, 19 (**1973**) 466–471.
- [87] Ballantyne B, Clin Toxicol, 11 (**1977**) 173–193.
- [88] Houeto P, Hoffman JR, Imbert M, Levillain P, Baud FJ, Lancet, 346 (**1995**) 605–608.
- [89] Lundquist P, Rosling H, Sörbo B, Tibbling L, Clin Chem, 33 (**1987**) 1228–1230.
- [90] Seto Y, Arch Biochem Biophys, 321 (**1995**) 245–254.
- [91] Seto Y, Anal Chem, 74 (**2002**) 134A–141A.
- [92] Liu X, Yun Z, J Chromatogr A, 653 (**1993**) 348–353.
- [93] Baskin SI, Kurche JS, Petrikovics I, Way JL, Toxicologist, 72 (**2003**) 164.
- [94] Pettigrew AR, Fell GS, Clin Chem, 18 (**1972**) 996–1000.

- [95] Vesey CJ, McAllister H, Langford RM, Ann Clin Biochem, 36 (1999) 755–758.
- [96] Goenechea S, Z Rechtsmed, 88 (1982) 97–101.
- [97] Ballantyne B, J Forensic Sci Soc, 16 (1976) 305–310.
- [98] Guilbault GG, Kramer DN, Anal Chem, 37 (1965) 1395–1399.
- [99] Lundquist P, Kagedal B, Nilsson L, Eur J Clin Chem Clin Biochem, 33 (1995) 343–349.
- [100] Wu AH, McKay C, Broussard LA, et al., Clin Chem, 49 (2003) 357–379.
- [101] Dumas P, Gingras G, LeBlanc A, J Anal Toxicol, 29 (2005) 71–75.
- [102] Calafat AM, Stanfill SB, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 772 (2002) 131–137.
- [103] Ishii A, Seno H, Watanabe-Suzuki K, Suzuki O, Kumazawa T, Anal Chem, 70 (1998) 4873–4876.
- [104] Tracqui A, Raul JS, Gerat A, Berthelon L, Ludes B, J Anal Toxicol, 26 (2002) 144–148.
- [105] Meiser H, Hagedorn HW, Schultz R, Am J Vet Res, 61 (2000) 658–664.
- [106] Kage S, Nagata T, Kudo K, J Chromatogr B Biomed Appl, 675 (1996) 27–32.
- [107] Felscher D, Wulfmeyer M, J Anal Toxicol, 22 (1998) 363–366.
- [108] Chinaka S, Takayama N, Michigami Y, Ueda K, J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 713 (1998) 353–359.
- [109] Connolly D, Barron L, Paull B, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 767 (2002) 175–180.
- [110] Chen SH, Yang Z,Y, Wu HL, Kou HS, Lin SJ, J Anal Toxicol, 20 (1996) 38–42.
- [111] Hughes C, Lehner F, Dirikolu L, et al., Toxicol Mech Methods, 13 (2003) 1–10.
- [112] Chattaraj S, Das AK, Spectrochica Acta, 47 (1992) 675–680.

- [113] Maserek WK, Rockwood GA, Platoff GE, Baskin SI, Logue BA, Toxicol Sci, 1918 (**2006**) 392.
- [114] Clark CJ, Campbell D, Reid WH, Lancet, 1 (**1981**) 1332–1335.
- [115] World Health Organization, Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspects, Geneva, Switzerland, WHO, Concise International Chemical Assessment Document 61, **2004**.
- [116] Meredith TH, Jacobsen D, Haines JA, Berger JC, van Heijst ANP, (Eds.), Antidotes for Poisoning by Cyanide, Vol 2, In: International Program on Chemical Safety/Commission of the European Communities Evaluation of Antidotes Series, Geneva, Switzerland, World Health Organization and Commission of the European Communities, Publication EUR 14280 EN, **1993**.
- [117] Kampe S, Iffland R, Korenkov M, Diefenbach C, Anesthesia, 55 (**2000**) 1189–1191.
- [118] Turrina S, Neri C, De Leo D, J Clin Forensic Med, 11 (**2004**) 264–267.
- [119] Chen KK, Rose CL, Clowes GHA, J Indiana State Med Assoc, 37 (**1944**) 344–350.
- [120] Graham DL, Laman D, Theodore J, Robin ED, Arch Intern Med, 137 (**1977**) 1051–1055.
- [121] De Busk RE, Seidl LG, Calif Med, 110 (**1969**) 394–396.
- [122] Mascarenhas BR, Geller AC, Goodman AI, NY State J Med, 69 (**1969**) 1782–1784.
- [123] Saincher A, Swirsky N, Tenenbein M, J Emerg Med, 12 (**1994**) 555–557.
- [124] Henrion J, Schapira M, Luwaert R, Colin L, Delannoy A, Heller F, Medicine (Baltimore), 82 (**2003**) 392–406.
- [125] Isom GE, Burrows GE, Way JL, Toxicol Appl Pharmacol, 65 (**1982**) 250–256.
- [126] Chen KK, Rose CL, Clowes GHA, Am J Med Sci, 188 (**1934**) 767–771.
- [127] Yen D, Tsai J, Wang LM, et al., Am J Emerg Med, 13 (**1995**) 524–528.

- [128] Barillo DJ, Goode R, Esch V, J Burn Care Rehabil, 15 **(1994)** 46–57.
- [129] Prieto I, Pujol I, Santiuste C, Poyo-Guerrero R, Diego A, Emerg Med J, 22 **(2005)** 389–390.
- [130] Johnson WS, Hall AH, Rumack BH, Am J Emerg Med, 7 **(1989)** 437–440.
- [131] Bailey B, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 67 **(2003)** 133–140.
- [132] Forootan A, Kowsar Medl L, 1 **(1996)** 2.
- [133] Andrews JM, Sweeney ES, Grey TC, Wetzel T, J Forensic Sci, 34 **(1989)** 1280–1284.
- [134] Holland MA, Kozlowski LM, Clin Pharm, 5 **(1986)** 737–741.
- [135] Mégarbane B, Delabaye A, Goldgran-Tolédano D, Baud FJ, J Chinese Med Assoc, 66 **(2003)** 193–203.
- [136] Baud FJ, Borron SW, Bavoux E, Astier A, Hoffman JR, BMJ, 312 **(1996)** 26–27.
- [137] Baud FJ, Borron SW, Megarbane B, Crit Care Med, 30 **(2002)** 2044–2050.
- [138] Levraut J, Bounatirou T, Ichai C, Intensive Care Med, 23 **(1997)** 417–422.
- [139] Sinex JE, Am J Emerg Med, 17 **(1999)** 59–67.
- [140] Rodkey FL, Collison HA, Clin Chem, 23 **(1977)** 1969–1975.
- [141] Ballantyne B, Bright J, Williams P, JForensic Sci Soc, 13 **(1973)** 111–117.
- [142] Cardozo RH, Edelman IS, J Clin Invest, 31 **(1952)** 280–290.
- [143] Logue BA, Kirschten NP, Petrikovics I, Moser MA, Rockwood GA, Baskin SI, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 819 **(2005)** 237–244.
- [144] Lundquist P, Kagedal B, Nilsson L, Rosling H, Anal Biochem, 228 **(1995)** 27–34.
- [145] Nolan CR, Hypertensive Crisis, Vol 3, Philadelphia, Pa, Current Medicine Inc, 8.1–8.30, **1999**.

- [146] Gawron O, Fernando J, Keil J, Weistman TJ, *J Org Chem*, 27 (**1962**) 3117–3123.
- [147] Deim K, Lentner C, (Eds.), *Scientific Tables*, 7th (Ed). Ardsely, NY, JR Geigy, **1970**.
- [148] Ansell M, Lewis FA, *J Forensic Med*, 17 (**1970**) 148–155.
- [149] Curry AS, *Hum Exp Toxicol*, Springfield, Ill, Thomas (**1976**) 97–98.
- [150] Bright JE, Inns RH, Tuckwell NJ, Marrs TC, *Hum. Exp. Toxicol*, 9 (**1990**) 125–129.
- [151] Chikasue F, Yashiki M, Kojima T, et al., *Forensic Sci Int*, 38 (**1988**) 173–183.
- [152] Vesey C J, Langford RM, *J Anal Toxicol*, 22 (**1998**) 176–178.
- [153] Li J, Zhu JJ, Xu K, *Trend Anal Chem*, 58 (**2014**) 90-98.
- [154] Zhang L, Wang E, *Nano Today*, 9(1) (**2014**) 132-157.
- [155] Chen LY, Wang CW, Yuan Z, et al., *Anal Chem*, 87(1) (**2014**) 216-229.
- [156] Zheng J, Nicovich PR, Dickson RM, *Annu Rev Phys Chem*, 58 (**2007**) 409-431.
- [157] Zheng J, Zhou C, Yu M, et al, *Nanoscale*, 4(14) (**2012**) 4073-4083.
- [158] Chen D, Li B, Cai S, et al., *Biomaterials*, 100 (**2016**) 1-16.
- [159] Marjomäki V, Lahtinen T, Martikainen M, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(4) (**2014**) 1277-1281.
- [160] Luo Z, Zheng K, Xie J, *Chem Commun*, 50(40) (**2014**) 5143-5155.
- [161] Zhang E, Xiang S, Fu A, *J Nanosci Nanotechnol*, 16(7) (**2016**) 6597-6610.
- [162] Gonzales BS Rodriguez MJ, Blanco C, et al, *Nano Lett*, 10(10) (**2010**) 4217-4221.
- [163] Wang J, Zhang G, Li Q, et al., 3 (**2013**) 1157.
- [164] Xie J, Zheng Y, Ying JY, *J Am Chem Soc*, 131(3) (**2009**) 888-889.

- [165] Zhang H, Huang X, Li L, et al, Chem Commun, 48(4) **(2012)** 567-569.
- [166] Hembury M, Chiappini C, Bertazzo S, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 112(7) **(2015)** 1959-1964.
- [167] Retnakumari A, Setua S, Menon D, et al., Nanotechnol, 21(5) **(2009)** 055103.
- [168] Jiang DE, Nanoscale, 5(16) **(2013)** 7149-7160.
- [169] Negishi Y, Nobusada K, Tsukuda T, J Am Chem Soc, 127(14) **(2005)** 5261-5270.
- [170] Negishi Y, Takasugi Y, Sato S, et al., J Am Chem Soc, 126(21) **(2004)** 6518-6519.
- [171] Kumar S, Jin R, Nanoscale, 4(14) **(2012)** 4222-4227.
- [172] Shang L, Yang L, Stockmar F, et al., Nanoscale, 4(14) **(2012)** 4155-4160.
- [173] Chaki NK, Singh P, Dharmadhikari CV, et al., Langmuir, 20(23) **(2004)** 10208-10217.
- [174] Shang L, Dörlich RM, Brandholt S, et al., Nanoscale, 3(5) **(2010)** 2009-2014.
- [175] Nair LV, Nazeer SS, Jayasree RS, et al., ACS Nano, 9(6) **(2015)** 5825-5832.
- [176] Shiraishi Y, Arakawa D, Toshima N, Eur Phys J E, 8(4) **(2002)** 377-383.
- [177] Lee D, Donkers RL, Wang G, et al., J Am Chem Soc, 126(19) **(2004)** 6193-6199.
- [178] Paa MC, Lo CK, Yang X, et al., J Phys Chem C, 114(38) **(2010)** 15995-16003.
- [179] Huang T, Murray RW, J Phys Chem B, 105(50) **(2001)** 12498-12502.
- [180] Deng HH, Shi XQ, Wang FF, et al., Chem Mater, 29, 3 **(2017)** 1362-1369.
- [181] Jin R, Nanoscale, 2(3) **(2010)** 343-362.
- [182] Luo Z, Yuan X, Yu Y, et al., J Am Chem Soc, 134(40) **(2012)** 16662-16670.
- [183] Liu J, Duchesne PN, Yu M, et al., Angew Chem Int Ed, 128(31) **(2016)** 9040-9044.

- [184] Zheng J, Petty JT, Dickson RM, *J Am Chem Soc*, 125(26) **(2003)** 7780-7781.
- [185] Zheng J, Zhang C, Dickson RM, *Phys Rev Lett*, 93(7) **(2004)** 077402.
- [186] Chen Y, Zheng X, Wang X, et al., *ACS Macro Lett*, 3(1) **(2014)** 74-76.
- [187] Huang X, Luo Y, Li Z, et al., *J Phys Chem C*, 115(34) **(2011)** 16753-16763.
- [188] Schaeffer N, Tan B, Dickinson C, et al., *Chem Commun*, 34 **(2008)** 3986-3988.
- [189] Chen TH, Tseng WL, *Small*, 8(12) **(2012)** 1912-1919.
- [190] West AL, Griep MH, Cole DP, et al., *Anal Chem*, 86(15) **(2014)** 7377-7382.
- [191] Yan X, Li H, Hu T, et al., *Biosens Bioelectron*, 91 **(2017)** 232-237.
- [192] Wen F, Dong Y, Feng L, et al., *Anal Chem*, 83(4) **(2011)** 1193-1196.
- [193] Wang LL, Qiao J, Qi L, et al., *Sci China Chem*, 58(9) **(2015)** 1508-1514.
- [194] Liu CL, Wu HT, Hsiao YH, et al., *Angew Chem Int Ed*, 50(31) **(2011)** 7056-7060.
- [195] Kawasaki H, Hamaguchi K, Osaka I, et al., *Adv Funct Mater*, 21(18) **(2011)** 3508-3515.
- [196] Kong Y, Chen J, Gao F, et al., *Nanoscale*, 5(3) **(2013)** 1009-1017.
- [197] Le Guével X, Daum N, Schneider M, *Nanotechnol*, 22(27) **(2011)** 275103.
- [198] Wang Y, Chen JT, Yan XP, *Anal Chem*, 85(4) **(2013)** 2529-2535.
- [199] Liu JM, Chen JT, Yan XP, *Anal Chem*, 85(6) **(2013)** 3238-3245.
- [200] Guo C, Irudayaraj J, *Anal Chem*, 83(8) **(2011)** 2883-2889.
- [201] Kennedy TAC, MacLean JL, Liu J, *Chem Commun*, 48(54) **(2012)** 6845-6847.
- [202] Liu G, Shao Y, Wu F, et al., *Nanotechnol*, 24(1) **(2013)** 015503.
- [203] Jiang H, Zhang Y, Wang X, *Nanoscale*, 6(17) **(2014)** 10355-10362.

- [204] Li L, Li Z, Zhang H, et al., *Nanoscale*, 5(5) **(2013)** 1986-1992.
- [205] Golinska P, Wypij M, Ingle AP, et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(19) **(2014)** 8083-8097.
- [206] Salunke GR, Ghosh S, Kumar RS, et al., *Int J Nanomedicine*, 9 **(2014)** 2635-2653.
- [207] Chen D, Zhao C, Ye J, et al., *ACS Appl Mater*, 7 **(2015)** 18163-18169.
- [208] Gao S, Chen D, Li Q, et al., *Sci Rep*, 4 **(2014)** 4384.
- [209] Su MN, Ye J, Li QW, et al., *Rsc Adv*, 5 **(2015)** 74844-74849.
- [210] Su MN, Ye J, Li QW, et al., *Chinese Chem Lett*, 26(11) **(2015)** 1400-1402.
- [211] Ye J, Wang JL, Li QW, et al., *Biomater Sci*, 4(4) **(2016)** 652-660.
- [212] Song XR, Goswami N, Yang HH, et al., *Analyst*, 141(11) **(2016)** 3126-3140.
- [213] Fernando A, Aikens CM, *J Phys Chem C*, 119(34) **(2015)** 20179-20187.
- [214] Hossain S, Kurashige W, Wakayama S, et al., *J Phys Chem C*, 120(45) **(2016)** 25861-25869.
- [215] Lin CAJ, Yang TY, Lee CH, et al., *ACS Nano*, 3(2) **(2009)** 395-401.
- [216] Shichibu Y, Negishi Y, Tsukuda T, et al., *J Am Chem Soc*, 127(39) **(2005)** 13464-13465.
- [217] Häkkinen H, *Nat Chem*, 4(6) **(2012)** 443-455.
- [218] Hadley A, Aikens CM, *J Phys Chem C*, 114(42) **(2010)** 18134-18138.
- [219] Niihori Y, Kikuchi Y, Kato A, et al., *ACS Nano*, 9(9) **(2015)** 9347-9356.
- [220] Woehrle GH, Brown LO, Hutchison JE, *J Am Chem Soc*, 127(7) **(2005)** 2172-2183.
- [221] Aldeek F, Muhammed MH, Palui G, et al., *ACS Nano*, 7(3) **(2013)** 2509-2521.
- [222] Chen H, Li S, Li B, et al., *Nanoscale*, 4(19) **(2012)** 6050-6064.
- [223] Qiao J, Mu X, Qi L, et al., *Chem Commun*, 49(73) **(2013)** 8030-8032.

- [224] Pyo K, Thanthirige VD, Kwak K, et al., J Am Chem Soc, 137(25) **(2015)** 8244-8250.
- [225] Jiang H, Wang X, Anal Chem, 86(14) **(2014)** 6872-6878.
- [226] Liu X, Jiang H, Ye J, et al., Adv Funct Mater, 26(47) **(2016)** 8694-8706.
- [227] Lin SY, Chen NT, Sum SP, et al., Chem Commun, 39 **(2008)** 4762-4764.
- [228] Wang HH, Lin CAJ, Lee CH, et al., ACS Nano, 5(6) **(2011)** 4337-4344.
- [229] Chiu WJ, Chen WY, Lai HZ, et al., J Nanopart Res, 16(7) **(2014)** 2478.
- [230] Liu P, Wang H, Hiltunen JK, et al., Part. Part. Syst Charact, 32(7) **(2015)** 749-755.
- [231] Mukherji R, Samanta A, Illathvalappil R, et al., ACS Appl Mater, 5 **(2013)** 13076-13081.
- [232] Zong C, Zheng LR, He W, et al., Anal Chem, 86(3) **(2014)** 1687-1692.
- [233] Qin L, He X, Chen L, et al., ACS Appl Mater, 7(10) **(2015)** 5965-5971.
- [234] Chen Z, Qian S, Chen J, et al., Talanta, 94 **(2012)** 240-245.
- [235] Yu M, Zhou C, Liu J, et al., J Am Chem Soc, 133(29) **(2011)** 11014-11017.
- [236] Shang L, Stockmar F, Azadfar N, et al., Angew Chem Int Ed, 52(42) **(2013)** 11154-11157.
- [237] Yu M, Zhu Z, Wang H, et al., Biosens Bioelectron, 91 **(2017)** 143-148.
- [238] Xie J, Zheng Y, Ying JY, Chem Commun, 46(6) **(2010)** 961-963.
- [239] Durgadas CV, Sharma CP, Sreenivasan K, Analyst, 136(5) **(2011)** 933-940.
- [240] Liu Y, Ai K, Cheng X, et al., Adv Funct Mater, 20(6) **(2010)** 951-956.
- [241] X. B. Wang, Y. L. Wang, J. Yang, X. P. Xing, J. Li, L. S. Wang, J. Am. Chem. Soc, 131 **(2009)** 16368.
- [242] Hemmateenejad B, Shakerizadeh-shirazi F, Samari, F, Sens Actuators B Chem, 199 **(2014)** 42-46.

- [243] Xia X, Long Y, Wang J, Anal Chim Acta, 772 (**2013**) 81-86.
- [244] Tian D, Qian Z, Xia Y, et al., Langmuir, 28(8) (**2012**) 3945-3951.
- [245] Li PH, Lin JY, Chen CT, et al., Anal Chem, 84(13) (**2012**) 5484-5488.
- [246] Selvaprakash K, Chen Y. C, Biosens Bioelectron, 61 (**2014**) 88-94.
- [247] Wang C, Wang Y, Xu L, et al., Small, 9(3) (**2013**) 413-420.
- [248] Wu X, He X, Wang K, et al., Nanoscale, 2(10) (**2010**) 2244-2249.
- [249] Wang Y, Chen J, Irudayaraj J, ACS Nano, 5(12) (**2011**) 9718-9725.
- [250] Zhang C, Zhou Z, Qian Q, et al., J Mater Chem B, 1(38) (**2013**) 5045-5053.
- [251] Wang C, Yao Y, Song Q, J Mater Chem C, 3(23) (**2015**) 5910-5917.
- [252] Hu DH, Sheng ZH, Zhang PF, et al., Nanoscale, 5(4) (**2013**) 1624-1628.
- [253] Shang L, Azadfar N, Stockmar F, et al., Small, 7(18) (**2011**) 2614-2620.
- [254] Kim J, Kim J, Jeong C, et al., Adv Drug Deliver Rev, 98 (**2016**) 99-112.
- [255] Dutta D, Chattopadhyay A, Ghosh SS, ACS Biomater Sci Eng, 2, 11 (**2016**) 2090-2098.
- [256] Sahoo AK, Banerjee S, Ghosh SS, et al., ACS Appl Mater Interfaces, 6(1) (**2013**) 712-724.
- [257] Chien CT, Liu CY, Wu ZW, et al., J Mater Chem B, 2(39) (**2014**) 6730-6737.
- [258] Wong PT, Choi SK, Chem Rev, 115(9) (**2015**) 3388-3432.
- [259] Zhou F, Feng B, Yu H, et al., Theranostics, 6(5) (**2016**) 679-687.
- [260] Khandelia R, Bhandari S, Pan UN, et al., Small, 11(33) (**2015**) 4075-4081.
- [261] Chen T, Xu S, Zhao T, et al., ACS Appl Mater Interfaces, 4(11) (**2012**) 5766-5774.
- [262] Muthu MS, Kutty RV, Luo Z, et al., Biomaterials, 39 (**2015**) 234-248.
- [263] Wang C, Li J, Amatore C, et al., Angew Chem Int Ed, 50(49) (**2011**) 11644-11648.

- [264] Zhang XD, Luo Z, Chen J, et al., *Sci Rep*, 5 (**2015**) 8669.
- [265] Wang JY, Chen J, Yang J, et al., *Int J Nanomed*, 11 (**2016**) 3475-3485.
- [266] Zhang XD, Chen J, Luo Z, et al., *Adv Healthcare Mater*, 3(1) (**2014**) 133-141.
- [267] Zhang XD, Luo Z, Chen J, et al., *Adv Mater*, 26(26) (**2014**) 4565-4568.
- [268] Shibu ES, Sugino S, Ono K, et al., *Angew Chem Int Ed*, 52(40) (**2013**) 10559-10563.
- [269] Zhou Z, Song J, Nie L, et al., *Chem Soc Rev*, 45(23) (**2016**) 6597-6626.
- [270] Gu W, Zhang Q, Zhang T, et al., *J Mater Chem B*, 4(5) (**2016**) 910-919.
- [271] Zhang Y, Li J, Jiang H, et al., *RSC Adv*, 6(68) (**2016**) 63331-633.
- [272] Ling X Kong, Alexandra Perebikovsky, Jacob Moebius, Lawrence Kulinsky and Marc Madou, *Journal of Laboratory Automation*, Vol. 21(3) (**2016**) 323–355.
- [273] Kim J, Kido H, Rangel RH, et al., *Sensors Actuators B Chem*, 128 (**2008**) 613–621.
- [274] Siegrist J, Gorkin R, Clime L, et al., *Microfluid Nanofluidics*, 9 (**2010**) 55–63.
- [275] Duffy DC, Gillis HL, Lin J, et al., *Anal Chem*, 71 (**1999**) 4669–4678.
- [276] Madou MJ, Lee LJ, Koelling KW, et al., *Design and Fabrication of Polymer Microfluidic Platforms for Biomedical Applications*, In *SPE/ANTEC 2001 Proceedings*, CRC Press, Boca Raton, FL, Vol 71, 2534–2538, **2001**.
- [277] Lutz S, Weber P, Focke M, et al., *Lab Chip*, 10 (**2010**) 887–893.
- [278] Kim J, Xu X, J. *Laser Appl*, 15 (**2003**) 255.
- [279] Chen D, Mauk M, Qiu X, et al., *Biomed Microdevices*, 12 (**2010**) 705–719.
- [280] Amasia M, Cozzens M, Madou MJ, *Sensors Actuators B Chem*, 161 (**2012**) 1191–1197.
- [281] Truckenmüller R, Cheng Y, Ahrens R, et al., *Microsyst Technol*, 12 (**2006**) 1027–1029.

- [282] Yun Y Il, Kim KS, Uhm SJ, et al., *J. Adhes. Sci. Technol*, 18 **(2004)** 1279–1291.
- [283] Chen R, Bayon Y, Hunt JA, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 96 **(2012)** 62–68.
- [284] Vesel A, Mozetic M, *Vacuum*, 86 **(2012)** 634–637.
- [285] Canal C, Molina R, Bertran E, et al., *J. Adhes. Sci. Technol*, 6 **(2004)** 18, 1077–1089.
- [286] Kitsara M, Nwankire CE, Walsh L, et al., *Microfluid Nanofluidics*, 16 **(2013)** 691–699.
- [287] Lai S, Wang S, Luo J, et al., *Anal Chem*, 76 **(2004)** 1832–1837.
- [288] Madou M, Zoval J, Jia G, et al., *Annu Rev Biomed Eng*, 8 **(2006)** 601–628.
- [289] Soroori S, Kulinsky L, Kido H, et al., *Microfluid Nanofluidics*, 16(6) **(2014)** 1117–1129.
- [290] S Lutz, P Lang, I Malki, D Mark, J Ducree, R Zengerle, and F von Stetten, Lab-on-a-chip cartridge for processing of immunoassays with integrated sample preparation, *Proceedings of the 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 1759 – 1761, **2008**.
- [291] Mary Amasia and Marc Madou, *Bioanalysis*, 2(10) **(2010)** 1701–1710.
- [292] Gorkin R, Clime L, Madou M, et al., *Microfluid Nanofluidics*, 9 **(2010)** 541–549.
- [293] Oh KW, Ahn CH, *J. Micromechanics Microengineering*, 16 **(2006)** R13–R39.
- [294] Zhang C, Xing D, Li Y, *Biotechnol. Adv*, 25 **(2007)** 483–514.
- [295] Abi-Samra K, Hanson R, Madou M, et al., *Lab Chip*, 11 **(2011)** 723–726.
- [296] Gorkin R, Soroori S, Southard W, et al., *Microfluid Nanofluidics*, 12 **(2011)** 345–354.
- [297] Al-Faqheri W, Ibrahim F, Thio THG, et al., *PLoS One*, 8 **(2013)** e58523.
- [298] Garcia-Cordero JL, Kurzbuch D, Benito-Lopez F, et al., *Lab Chip*, 10 **(2010)** 2680–2687.

- [299] Chen J, Kang Z, Wang G, Loo JF, Kong SK, Ho HP, Lab Chip, 15 (**2015**) 2504–2512.
- [300] Burger R, Reith P, Akujobi V, et al., Microfluid Nanofluidics, 13 (**2012**) 675–681.
- [301] Burger R, Reith P, Kijanka G, et al., Lab Chip, 12 (**2012**) 1289–1295.
- [302] Gorkin R, Nwankire CE, Gaughran J, et al., Lab Chip, 12 (**2012**) 2894–2902.
- [303] Godino N, Vereshchagina E, Gorkin R, et al., Microfluid Nanofluidics, 16 (**2014**) 895–905.
- [304] <https://www.arduino.cc/en/Tutorial/BuiltInExamples> (Erişim tarihi: **5 Kasım 2017**).
- [305] David J Kinahan, Sinéad M Kearney, Niamh A Kilcawley, Philip L Early, Macdara T Glynn, Jens Ducrée, Plos One, 11, 11(5) (**2016**) e0155545.
- [306] Dongtao Lu, Lili Liu, Fengxia Li, Shaomin Shuang, Yingfu Li, Martin M.F. Choi, Chuan Dong, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 121 (**2014**) 77–80.
- [307] Guomei Zhang, Yunyun Qiao, Ting Xu, Caihong Zhang, Yan Zhang, Lihong Shi, Shaomin Shuang and Chuan Dong, Nanoscale, Issue 29 (**2015**) 12666–12672.
- [308] B. Aswathy, G. Sony, Microchemical Journal, Volume 116 (**2014**) 151-156.
- [309] Anseeuw, K; Delvau, N; Burillo-Putze, G; De Iaco, F; Geldner, G; Holmström, P; Lambert, Y; Sabbe, M, European Journal of Emergency Medicine, 20 (1) (**2013**) 2–9.
- [310] <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/uv-light-resistance> (Erişim tarihi: **21 Temmuz 2020**).