

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NANO POLİMERLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve TOKSİK
ÖZELİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Erdem BABAARSLAN

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2014

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

18.06.2014

Erdem BABAARSLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NANO POLİMERLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve TOKSİK ÖZELİKLERİNİN İNCELENMESİ

Erdem BABAARSLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuray YILDIZ

Nanoteknolojinin gelişimiyle polimerlerin nano büyüklükte sentezi, karakterizasyonu ve işlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Morfolojileri ve büyüklüklerine bağlı olarak yığın haldeki yapılarına göre farklı toksikolojik özellikler gösterebilen nano polimerler, kullanım döngüleri boyunca canlı çevre ile etkileşim içerisindedir. Bu nedenle, polimerlerin yığın haldeki toksikolojik özellikleri yanında nano boyuttaki toksikolojik özelliklerinin de araştırılması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, poliakrilonitril (PAN) ve poliüretan (PU) polimerleri nanoparçacık ve nanolif olarak, sırasıyla miniemülsiyon polimerizasyonu ve elektro-eğirme yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Elektro-eğirme parametrelerinin optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Sentezlenen parçacıkların büyüklükleri, geçirimli elektron mikroskonu (TEM), dinamik ışık saçılması (DLS) ve diferansiyel sentrifüj çöktürmesi (DCS) yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Nanolif yapısında üretilen polimerlerin lif çapları . taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Nanopolimerlerin büyüklük ve morfolojilerindeki değişimin sitotoksisite üzerine etkisini belirlemek amacı ile vücut-dışı MTT sitotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, PAN nanolif ve nanoparçacıkların ortalama çapları sırasıyla 250 nm ve 99 nm, PU nanoparçacıkların ortalama çapı 78 nm ve nanoliflerin çapı ise 400-1000 nm aralığında bulunmuştur. Gerçekleştirilen sitotoksisite testleri, farklı yapıdaki her iki polimerin de hücre canlılığına farklı derecelerde olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermiştir. PAN nanoliflerinin, nanoparçacık yapısına kıyasla daha sitotoksik olduğu saptanmıştır. PAN nanolif yapıları için sitotoksisitenin zamanla ve ekstrakt derişimindeki artışla arttığı, hücre canlılığının %36 seviyesine düştüğü gözlenmiştir. Kullanım alanı ve miktarı hızla artan PAN nanoliflerin önemli derecede sitotoksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Polimerlerin nano büyüklükteki toksik etkilerini daha iyi belirleyebilmek için ileri seviye vücut-dışı ve vücut-içi toksisite testlerine gereksinim vardır, bu çalışma daha sonraki araştırmalar için referans oluşturacaktır.

Haziran 2014, 78 sayfa

Anahtar Kelimeler: Poliakrilonitril(PAN), Poliüretan(PU), Polimer nanolif, Polimer nanoparçacık, Miniemülsiyon, Elektro-eğirme, In vitro sitotoksisite, MTT

ABSTRACT

Master Thesis

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND TOXICOLOGICAL INVESTIGATION OF NANO POLYMERS

Erdem BABAARSLAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Nuray YILDIZ

With the development of nanotechnology, studies related to synthesis, characterization and processing of nano polymers has gain speeds. Depending on the morphology and size, nano polymers may show different toxicological behavior compared to their bulk concentrations and they are in contact with living system throughout their life-cycle. With this reason, polymer toxicity at the nano size has to be investigated besides their toxicological behavior in bulk concentration.

In this study, polyacrylonitrile (PAN) and polyurethane (PU) polymers were produced as nanoparticle and nanofiber respectively with miniemulsion polymerization and electro-spinning. Response surface methodology (RSM) was used for the optimization of electrospinning parameters. Synthesized particles sizes were characterized with transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DLS) and Differential centrifugal sedimentation (DCS). Electrospun nanofiber diameter was characterized with scanning electron microscope (SEM). To define the cytotoxicity of the nenopolymers, MTT cytotoxicity tests were carried out over L-929 fibroblast cells.

As a result, PAN nanofiber and nanoparticle average diameters was found to be 250 nm and 99 nm respectively, PU nanoparticle average diameter was found 78 nm and nanofiber diameter was between 400-1000 nm. Cytotoxicity tests showed that different structures of both polymers had varying negative effects on cell viability. It was found that PAN nanofibers had greater cytotoxic effect compared to PAN nanoparticles. PAN nanofibers cytotoxicity increased with time and extract concentration, it was found that cell viability came down to 36%. It was observed that PAN nanofibers showed significant cytotoxic effect. For an exact definition on the toxic effects of nano polymers, advanced in-vitro and in-vivo toxicity studies are needed, this study will be a reference for future toxicological investigations.

June 2014, 78 pages

Key Words: polyacrylonitrile (PAN), polyurethane (PU), polymer nanofiber, polymer nanoparticle, Miniemulsion, Electro-spinning, in-vitro cytotoxicity, MTT

TEŞEKKÜR

Üç yıl süren yüksek lisans çalışmalarına yön veren, yaptığım araştırmaların her aşamasında bilgi, öneri ve her türlü yardımı esirgemedi, fikirleriyle gelişmeye büyük katkısı olan, çalışmalarım süresince karşılaştığım bütün zorluklarda bilgisini, tecrübesini benimle paylaşan, bana değerli zamanını ayıran danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen, önemli katkılarda bulunan, yönlendiren ve değerli zamanını ayıran değerli hocam Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım süresince desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ceren ATILLA DİNÇER'e, Arş. Gör. Eda GÖZ'e, Arş. Gör. Zafer ÇIPLAK ile laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen eşim'e en derin duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının bir kısmı, Avrupa Birliği 7. Çerçeve programı kapsamında yürütülen "QualityNano" proje bursu tarafından desteklenmiştir.

Erdem BABAARSLAN

Ankara, Haziran 20014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Güvenli Nanoteknoloji.....	3
2.1.1 Malzeme ve işlemin tanımı.....	4
2.1.2 Nanomalzemenin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu.....	5
2.1.3 Nanomalzemenin toksikolojik karakterizasyonu.....	6
2.1.4 Nanomalzemelerle çalışma ve nanomalzeme etkilenmesinin belirlenmesi.....	8
2.1.5 Nanomalzeme risk değerlendirmesi.....	9
2.1.6 Sağlık ve güvenlik önlemleri.....	12
2.2 Polimer Nanomalzemeler.....	13
2.2.1 Polimer Nano-lifler.....	14
2.2.2 Polimer nano-parçacıklar.....	15
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	18
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
4.1 Materyal.....	30
4.2 Yöntem.....	31
4.2.1 Polimer nano-lif üretimi.....	31
4.2.2 Polimer nano-parçacık üretimi.....	33
4.2.3 Vücut dışı (in-vitro) sitotoksosite deneyleri.....	39
4.3 Analizler.....	43
4.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	43
4.3.2 Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM).....	43
4.3.3 Dinamik Işık Saçılması (DLS).....	44
4.3.4 Diferansiyel Santrifüz çöktürmesi (DCS).....	45

4.3.5	MTT hücre canlılığı testi için mikrokap okuyucuda absorbands analizi	46
5.	DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
5.1	PAN polimer nano-lifler.....	47
5.2	Yanıt yüzey yöntemi (RSM).....	49
5.3	PU polimer nano-lifler.....	53
5.4	PAN polimer nano-parçacıklar.....	55
5.5	PU polimer nano-parçacıklar.....	59
5.6	Vücut dışı (in-vitro) sitotoksosite deneyleri.....	61
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	66
	KAYNAKLAR.....	68
	EKLER.....	73
	EK 1 Deney numunelerinin hesaplanan % canlılık değerleri	74
	EK 2 MTT Analizi Deney Talimatı	75
	Ek 3 Kristal Viyole İle Boyama	76
	ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İnsan solunum sisteminde parçacık boyutuna göre birikim noktaları.....	6
Şekil 2.2 Fare akciğerinin karbon nanotüp (CNT) etkilenmesi sonucu görünümü.....	7
Şekil 2.3 İnsan makrofaj hücreleri.....	8
Şekil 2.4 TiO ₂ nanoparçacıklarının derideki ilerlemesi.....	9
Şekil 2.5 Elektroeğirme düzeneği.....	15
Şekil 2.6 Polimer nanoparçacıkları konu edinen yayınların yıllara göre dağılımı.....	16
Şekil 2.7 Polimer nanoparçacık üretim yöntemleri.....	16
Şekil 2.8 Miniemülsiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 3.1 Poliüretan nanoparçacığının TEM görüntüsü.....	29
Şekil 4.1 Elektro-eğirme düzeneği.....	32
Şekil 4.2 PAN nanoparçacık üretim şeması.....	34
Şekil 4.3 PU nanoparçacık üretim şeması.....	35
Şekil 4.4 Karıştırmalı 0°C buz banyosu homojenizasyon düzeneği.....	36
Şekil 4.5 Ultrasonik homojenizer.....	37
Şekil 4.6 Polimerizasyon düzeneği.....	38
Şekil 4.7 Diyaliz düzeneği.....	39
Şekil 4.8 Toplayıcı panel üzerinde kesilerek petri kaplarına alınan PAN nanolifler.....	40
Şekil 4.9 UV sterilizasyon.....	40
Şekil 4.10 MTT testi için 24 kuyucuklu kaplar ve deney numuneleri.....	42
Şekil 4.11 Işık mikroskop.....	43
Şekil 4.12 FEI Tecnai G2 20 marka TEM mikroskobu.....	44
Şekil 4.13 Malvern Zetasizer nano DLS cihazı.....	44
Şekil 4.14 CPS Disk santrifüj cihazı.....	45
Şekil 4.15 Biotek µquant marka mikropipet okuyucu.....	46
Şekil 5.1 1 ml/sa sabit besleme hızında lif çapının toplayıcı mesafesine ve voltaja bağlı değişimi.....	52
Şekil 5.2 256 nm lif çapına sahip PAN nanoliflere ait SEM görüntüleri.....	53
Şekil 5.3 PU-10 numunesine ait SEM görüntüsü.....	54
Şekil 5.4 PAN-1 ve PAN-3 örneklerinin DLS analizi.....	57

Şekil 5.5 PAN-3 örneğinin DCS analizi.....	57
Şekil 5.6 a) 1µm skala, b) 500 nm skala, c) 200 nm skala da PAN-3 numunelerinin görüntüleri.....	58
Şekil 5.7 PU-3 numunesi DCS analiz sonucu.....	60
Şekil 5. 500 nm skalada PU nanoparçacıklarının görüntüsü.....	60
Şekil 5.9 PAN nanolif %25, %50, %100 özüt ve kontrol numunesi canlılık değerleri...	62
Şekil 5.10 Üç günlük inkübasyon ardından kristal viyole ile boyanmış L929 fibroblast hücreleri (X10) (a) kontrol (%0 özüt), (b) %25 PAN nanolif özütü, (c) %50 PAN nanolif özütü, (d) %100 PAN nanolif özütü.....	63
Şekil 5.11 PAN nanoparçacık 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml ve kontrol numunesi canlılık değerleri.....	64
Şekil 5.12 PU nanoparçacık 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml ve kontrol numunesi canlılık değerleri.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Şiddet ve olasılık değerleri için belirlenen katsayılar.....	10
Çizelge 2.2 Şiddet parametreleri için belirlenen katsayılar	11
Çizelge 2.3 Risk matrisi	11
Çizelge 2.4 Risk seviyeleri.....	11
Çizelge 3.1 Literatür taraması kapsamında incelenen uluslararası raporlar	18
Çizelge 3.2 Literatür taraması kapsamında incelenen karbon ve metalik temelli nanoyapılara ait yayınlar	20
Çizelge 3.3 Literatür taraması kapsamında incelenen polimer temelli nanoyapılara ait yayınlar.....	22
Çizelge 3.4 Kullanılan in-vitro toksite metotlarının	25
Çizelge 3.5 Literatür taraması kapsamında incelenen toksisite çalışmalarına ait Yayınlar	26
Çizelge 4.1 Hazırlanan polimer çözeltilerinin derişimleri	31
Çizelge 4.2 RSM deney programı	33
Çizelge 5.1 Farklı derişimlerdeki PAN polimer nanoliflerin çapları.....	47
Çizelge 5.2 Farklı deney numaraları için belirlenen elektro-eğirme parametreleri	48
Çizelge 5.3 Farklı deney koşullarında %8 çözelti derişimindeki PAN örneğinin sonuçları	48
Çizelge 5.4 Deney Proses parametreleri ve elde edilen yanıt değerleri.....	49
Çizelge 5.5 Lif çapının belirlenmesinde kullanılan modelin ANOVA testi sonuçları.....	50
Çizelge 5.6 %12 PU/DMF çözelti derişiminde çalışılan elektro-eğirme parametreleri ..	53
Çizelge 5.7 %16-18 çözelti derişimlerinde PU polimeri elektro-eğirme parametreleri ..	55
Çizelge 5.8 PAN nanoparçacık sentezi için hazırlanan deney setleri ve DLS sonuçları ..	56
Çizelge 5.9 PU nanoparçacık sentezi için hazırlanan deney setleri ve DLS sonuçları ..	59

1. GİRİŞ

Son yıllarda nanoteknolojiye olan ilgi tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de giderek artmakta ve birçok alanda uygulama imkanı bulmaktadır (ilaç, enerji, malzeme, kozmetik, tekstil vs.). Nanoteknoloji kullanılarak üretilen ürün miktarındaki artışa bağlı olarak bu alanda çalışan insan sayısı da giderek artmaktadır. Her teknoloji büyük avantajlara sahip olduğu gibi beraberinde yeni birçok risk ve belirsizlikler getirmektedir. Teknolojilerin sürdürülebilir bir şekilde güvenli kullanımı için bu belirsizlik ve risklerin giderilmesi ya da kontrol altına alınması gerekmektedir. İnsan sağlığı, güvenliği ve çevre açısından değerlendirildiğinde nanoteknoloji kaynaklı risk ve belirsizlikler, nano yapıların insan vücudu ve çevre ile etkileşimi sonucunda oluşmaktadır (Anonymous 2004).

Doğada polimer yapıda bulunan kimyasal bileşiklerin yanı sıra yapay olarak üretilen ve kullanım amacına göre çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemlerle modifiye edilen polimerler de mevcuttur. Bu polimerlere plastik polimerler denilmektedir. Plastik polimerlerin üretim aşamasında gerekli kimyasalların birçoğu ham petrolden elde edilmektedir. Bu kimyasallardan bazıları insan sağlığı ve çevre için tehlikelidir ve polimerlerin; üretim kullanım ve atık evrelerinde ortama salınabilmektedir (Lithner vd. 2011). Nanoteknolojinin gelişimiyle, polimerler “nano” boyutta işlenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Polimerler “nano” boyutta, tekstil, ilaç taşınımı, gıda, doku mühendisliği, medikal ve kompozit teknolojisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. “Nano” boyutta, polimerler genellikle lif ve parçacık yapıda çalışılmaktadır. Bu nano-polimerler yığın haldeki yapılarından, “boyut” ve “fiziksel yapı” gibi değişkenlere bağlı olarak farklı toksikolojik özellikler gösterebilmektedir. Bu nedenle kullanım döngüleri boyunca insan ve çevre ile etkileşim içerisinde olan “nano” boyuttaki polimerlerin toksikolojik özelliklerinin incelenmesi önem taşımaktadır (Som vd. 2011).

Bu çalışmada, dünya çapında üretim ve kullanım miktarları yüksek olan poliüretan (PU) ve poliakrilonitril (PAN) polimerlerinin nano büyüklükteki toksikolojik özellikleri ve yapısal farklılıkların (lif, parçacık) bu toksikolojik özelliklere etkisi incelenmiştir. Nano-

lif yapısındaki PU ve PAN polimerleri elektro-eğirme yöntemiyle üretilmiş ve lif çapları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Nano-parçacık yapısındaki PU ve PAN polimerleri ise miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiş ve parçacık büyüklükleri Dinamik Işık Saçılması (DLS), Diferansiyel Santrifüj Çöktürmesi (DCS) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile saptanmıştır. MTT vücut-dışı sitotoksosite testi ile PU ve PAN polimerler nanolif ve nanoparçacıkların toksik özellikleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Güvenli Nanoteknoloji

En az bir boyutu 1 nm ve 100 nm ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$) arasında olan yapılara yönelik çalışmalar nanoteknolojinin uygulama alanına girmektedir. Birçok sektörde uygulamaya sahip olan (ilaç, enerji, malzeme, kozmetik, tekstil vs.) nanoteknoloji, hem var olan malzemelerin özelliklerinin iyileştirilmesini, hem de yeni ve üstün özellikli malzemelerin üretilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle nanoteknolojiye 21. Yüzyılın teknolojisi denilmektedir (Anonim 2004).

Yaşamımızdaki yerini giderek artıran nanoteknoloji birçok sektöre büyük yenilikler getirmektedir. Güçlü ve etki alanı geniş olan bu teknoloji beraberinde sorumlu ve güvenli kullanımını da gerektirmektedir. Bu konu ilk kez İngiliz bilimler akademisi “Royal Society” tarafından gündeme getirilmiştir. 2004 yılında kurumun yayınlamış olduğu “Nanoteknoloji: Fırsatlar ve belirsizlikler” adlı yayında, giderek artan nanoteknoloji uygulamalarına karşılık bu teknolojinin ürünü olan nanomalzemelerin insan sağlığı ve çevre üzerine olası olumsuz etkilerine dikkat çekilmiştir. 2009 yılında AB iş sağlığı ve güvenliği örgütü (EU-OSHA) tarafından, Avrupa’da ise uzmanlar arasında yapılan bir anket çalışması sonucunda nanoteknoloji kaynaklı risk ve tehlikeler, önümüzdeki dönemde dikkat edilmesi gereken “On temel kimyasal risk” listesinde birinci sırada gösterilmiştir (Anonymous 2011).

Nanoteknoloji kaynaklı bu risklerin kontrol edilebilmesi ve bu teknolojinin güvenli kullanımı için nanomalzemelerin olası toksik etkileri belirlenmelidir. Toksikolojik verilerin yanında nanoteknolojik son ürünlerin, üretim aşamasından son tüketici ve atık aşamasına kadar olan süreci kapsayan kullanım döngüleri de iyi analiz edilmelidir. Bu malzemelerin kullanım döngülerinin hangi aşamasında, insan ve çevre ile nasıl bir etkileşim içerisinde olduğu önemlidir. Nanomalzemeler ne tam olarak güvenli ne de tam olarak tehlikelidir. Güvenlik çalışmaları sonucunda elde edeceğimiz veriler ve

nanomalzemelerin kullanım döngüleri boyunca uygulayacağımız kontrol önlemleri bu ayrımı yapmamıza yardımcı olacaktır (Anonymous 2009b).

Güvenli nanoteknoloji çalışmaları yürütülürken izlenecek altı temel adım vardır. Bunlar; malzeme ve işlemin tanımı, malzemenin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu, malzemenin toksikolojik karakterizasyonu, olası etkilenmenin belirlenmesi, elde edilen verilerle risklerin değerlendirilmesi ve güvenli kullanım için önlemlerin belirlenmesi adımlarıdır (Anonymous 2004, Anonymous 2012).

Nanomalzemelerin güvenli kullanımını sağlamak için izlenecek bu çalışma adımları aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

2.1.1 Malzeme ve işlemin tanımı

Malzemelerin karakteristik özellikleri, yapısına ve kullanıldığı prosese göre değişkenlik göstermektedir. Gün geçtikçe artan nanomalzeme sayısı ve bu malzemelerin kullanıldığı proseslerin çeşitliliği nanomalzemelerin belirli kurallara göre sınıflandırılmasını gerektirmektedir. Güvenli nanoteknoloji çalışmaları yürütülürken bu nanoyapıların kimyasal içeriklerine göre sınıflandırılması faydalı olacaktır (Anonymous 2012). Bunlar;

Karbon temelli nanoyapılar: Temel yapıtaşı karbon olan ve C-C bağlarıyla oluşturulan nanoyapılardır. Karbon atomlarının bağlanma şekillerine göre farklı yapılarda elde edilmektedirler (CNT, Fulleren, Grafen, Karbon siyahı) (Anonymous 2009a).

Metalik temelli nano yapılar: Bu kategoride parçacıklar yığın halindeki bileşiklerinin nano yapıdaki eşdeğeridir. Nano demir(Fe) ve nano gümüşü(Ag) örnek olarak verebiliriz. Metalik nanoparçacıklar oksitleri şeklinde de nanoteknolojik uygulamalarda

kullanılmaktadır, Titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksidi (ZnO) gibi (Anonymous 2009a).

Kil temelli nanoyapılar: Kil minerali doğada nano yapıda bulunmaktadır. Yalnız yığın halindeki kil mineralini nanoteknolojik uygulamalarda kullanabilmek için birkaç ön işlem den geçirilmesi gerekmektedir (kompozitler, SiO_2 , Al_2O_3) (Anonymous 2009a).

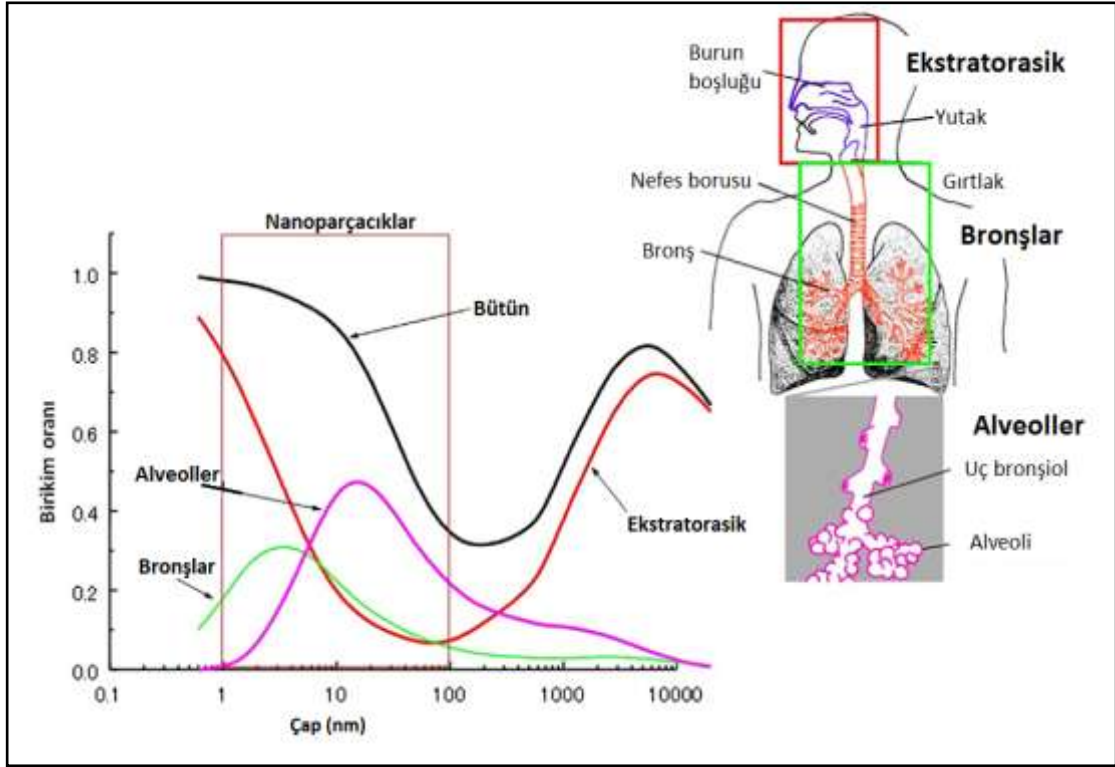
Organik nanoyapılar: Nano polimerler ve dendrimerler bu kategoriye girmektedir. Bu yapılar klasik polimerlerin nano boyuttaki eşdeğerleridir. Nanolif ve nano parçacık olarak elde edilmektedirler.

Güvenlik çalışmaları için seçilecek nanomalzeme ile kullanılacağı işlemin de belirlenmesi önemlidir çünkü malzemenin karakteristik özellikleri ortam şartlarına göre değişkenlik gösterebilmektedir. İlk basamakta belirlenen bu kıstaslar güvenlik çalışmasının malzeme ve işlem odaklı yürütülmesini sağlayacaktır, böylece nanomalzemenin kullanıldığı ortamdaki olası riskler belirlenebilecektir (Anonymous 2012).

2.1.2 Nanomalzemenin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu

Nano boyutta malzemeler, yığın halinde gösterdikleri özelliklerden çok farklı özellikler gösterebilmektedir. Nanomalzemelerle çalışılırken fiziksel ve kimyasal özelliklerin iyi belirlenmiş olması amaca uygun doğrultuda ilerlenmesini sağlayacaktır. Parçacık boyutu, yüzey alanı ve yüzey reaktivitesi ve çözünürlük güvenlik çalışmaları için önemli başlıklardan birkaçıdır. Bu özellikler çeşitli analiz yöntemleri ile belirlenmektedir. Örnek olarak; taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılması (DLS), UV spektrometresi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve fourier kızılötesi spektrometresi (FTIR) yöntemleri verilebilir.

Nanoparçacıklar büyüklüklerine göre insan vücudunda farklı etkilere sahip olabilirler. Şekil 2.1’de solunum yolu ile insan vücuduna giren nanoparçacıkların, boyutlarına göre insan solunum sisteminde birikim noktaları gösterilmektedir (Myojo 2010).



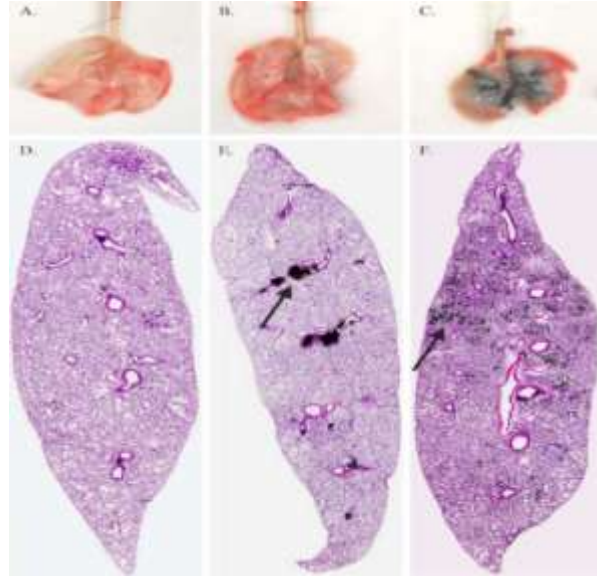
Şekil 2.1 İnsan solunum sisteminde parçacık boyutuna göre birikim noktaları (Myojo 2010)

2.1.3 Nanomalzemenin toksikolojik karakterizasyonu

Boyutla değişen özellikler parçacığın zehirlilik (toksite) miktarını da değiştirmektedir. Bu aşamada nanomalzemelerin çeşitli test ve deneylerle canlı hücrelere, dokulara ve çevreye olan toksik etkileri incelenmektedir. En basit olarak uygulanan İn-vitro yöntemi ile malzemenin çeşitli canlı hücreler üzerindeki etkileri incelenmektedir. İn-vitro testlerinin yetersiz kaldığı aşamalarda ise, organizmalar ve canlı sistemlerin kullanıldığı pahalı ve daha kompleks in-vivo testleri gerçekleştirilmektedir. Parçacığın toksikolojik karakterizasyonundaki nihai amaç çalışılan malzemenin canlı ortamlarda toksitesini belirlemek ve parçacık için bir etkilenme sınır değeri oluşturmaktır. Bu değer parçacığın

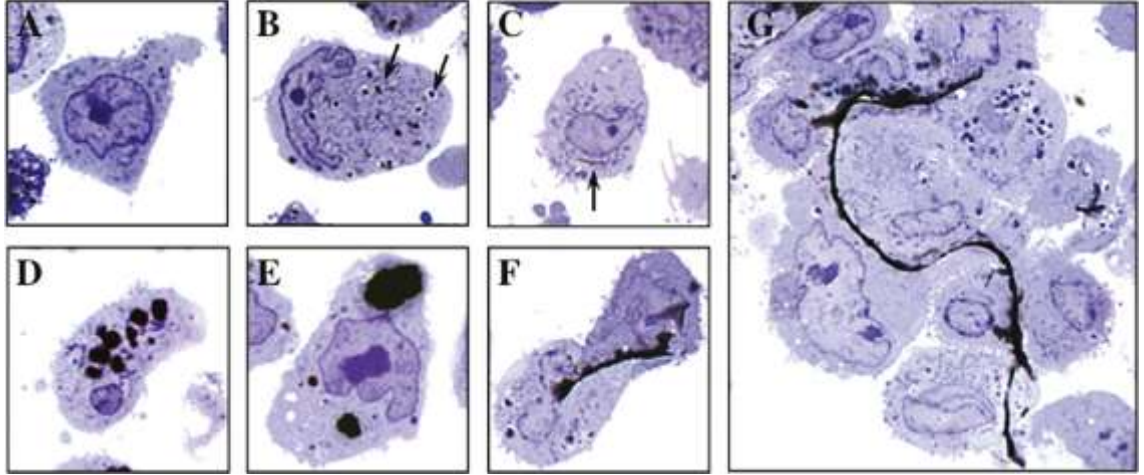
insan ve çevre ile etkileşim içerisinde olduğu aşamalarda toksik etkisini azaltmaya yönelik çalışmalarda referans oluşturacaktır (Mullera vd. 2005).

Şekil 2.2, farklı miktarlarda karbon nanotüp (CNT) etkilenmesi sonucu fare akciğerinde meydana gelen tahribatı göstermektedir. Çözünürlüğü düşük olan nanoparçacıklar etkilenme sonucu girdiği canlı vücudunda belirli hedef organda birikim gerçekleştirmektedir. Bu durum ise organda fonksiyon kaybına ya da tamamen işlevini kaybetmesine neden olmaktadır (Mullera vd. 2005).



Şekil 2.2 Fare akciğerinin karbon nanotüp (CNT) etkilenmesi sonucu görünümü (Mullera vd. 2005)

A) Etkilenmemiş akciğer, B) 5 g CNT, C) 10g CNT



Şekil 2.3 İnsan makrofaj hücreleri (Sanchez vd. 2011)

A)etkilenmemiş hücre B)karbon siyahı, C)CNT D)Grafen E)Fulleren F)MWCNT

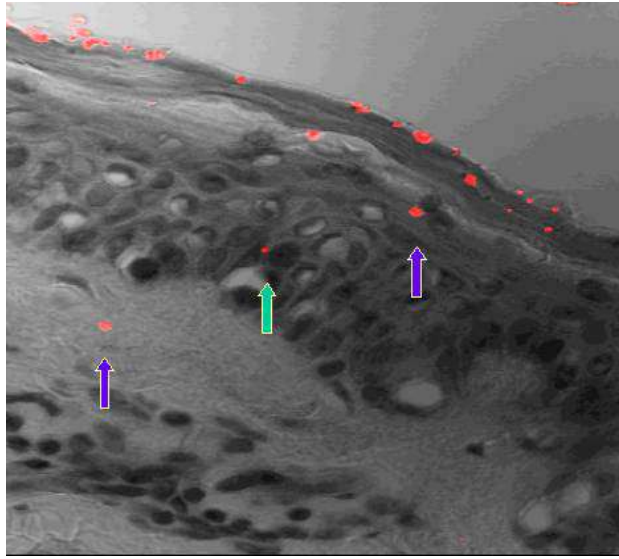
Şekil 2.3, İn-vitro testleri sonucunda, karbon temelli farklı nanoyapıların insan makrofaj hücrelerinde birikimi sonucunda meydana getirdiği tahribatı göstermektedir (Sanchez vd. 2011).

2.1.4 Nanomalzemelerle çalışma ve nanomalzeme etkilenmesinin belirlenmesi

Geniş bir kullanım alanına sahip mühendislik ürünü nanomalzemeler üretim aşamasından son tüketiciye ulaşana dek insan ve çevre ile etkileşim içerisinde. Bu aşamaların tamamı parçacığın kullanım döngüsünü oluşturmaktadır. Parçacığın, kullanım döngüsünün hangi evresinde insanla etkileşim içerisinde olduğu ve vücuda hangi yolla girdiği önemlidir. Güvenli nanoteknoloji çalışmalarında da etkilenme miktarının belirlenmesi temel hedeftir. Bu amaca yönelik nano boyutta ortam ölçümü yapabilecek cihazlar geliştirilmiştir. Bu cihazlar, ortamda bulunan ve insanın etkilendiği parçacık miktarını ve parçacıkların boyut dağılımlarını belirlemektedir. Ayrıca gerçekleştirilen klasik ortam ölçüm tekniklerine kıyasla daha karmaşık sistemler ve cihazlar da kullanılmaktadır. Bu ölçümlere ek olarak ortam verilerinden faydalanarak bilgisayar ortamında modeller ve simülasyonlar eşliğinde etkilenme senaryoları gerçekleştirip gerçeğe uygun veriler de elde edilebilir (Anonymous 2012).

Etkilenme miktarı kadar etkilenme yolu da çok önemlidir. Nanomalzemeler üç yolla insan vücuduna girmektedir, bunlar; solunum, deri ve yutmadır.

Nanoyapılar çok küçük boyutlarından dolayı, dolaşım sistemi ile taşınarak veya penetrasyonla vücuda girdiği noktadan farklı bir noktada da birikim gerçekleştirebilir. Şekil 2.4, TiO_2 nanoparçacıklarının deri üzerinde etkilediği noktadan penetrasyonla deri içerisine ilerleyişini göstermektedir (Zhu vd. 2011).



Şekil 2.4 TiO_2 nanoparçacıklarının derideki ilerlemesi (Zhu vd. 2011)

2.1.5 Nanomalzeme risk değerlendirmesi

Bu aşamada, malzeme karakterizasyonu sonucunda elde ettiğimiz verilerle, sistematik yöntemler kullanarak, nanomalzemelere olası etkilenme riski ve tehlike seviyesi belirlenmektedir. Nanomalzemelerin riskleri değerlendirilirken karşılaşılan en büyük sorun, bu malzemeler hakkındaki bilgi eksikliğidir. Kullanımı artan parçacık miktarıyla paralel olarak karakterizasyon ve tanımlama çalışmaları da gerçekleştirilmelidir. Çünkü bu çalışmalardan elde edilen veriler risk değerlendirmesi sırasında kaynak oluşturmaktadır. Veri sayısının sınırlı olduğu durumlarda nanomalzemelerin riskleri belirlenirken “Kontrol Katmanları” (Control Banding) risk değerlendirme yöntemi

uygulanmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajı; etkisi belirsiz tehlikeler karşısında güvenlik katmanlarının oluşturulması ve her bir aşamada tehlikeye özel kontrol önlemlerinin uygulanmasıdır. Bu önlemler parçacığın veya prosesin her bir aşamada güvenli kullanımını sağlamaktadır.

Çizelge 2.1 Şiddet ve olasılık değerleri için belirlenen katsayılar (Zalk vd. 2010)

Şiddet Değeri	Maksimum skor (Pilot)	Maksimum skor (Revize edilmiş)	Maksimum şiddet değeri
Yüzey kimyası	10	10	76/100
Parçacık şekli	10	10	
Parçacık çapı	10	10	
Çözünürlük	10	10	
Kanserojen	7.5	6	
Üreme toksitesi	7.5	6	
Mutajen	7.5	6	
Dermal toksite	7.5	6	
Astım	N/A	6	
Toksite	7	6	
Olasılık Değeri	Maksimum skor (Pilot)	Maksimum skor (Revize edilmiş)	Maksimum olasılık değeri
Nanomalzeme miktarı	25	25	100/100
Tozluluk/sis	30	30	
Etkilenen çalışan sayısı	15	15	
İşlemin sıklığı	15	15	
İşlemin süresi	15	15	

Bu yöntem kalitatif bir yöntemdir. Belirlenen tehlike parametrelerine (yüzey kimyası, parçacık boyutu, çözünürlük, toksite) belirli katsayılar atanmaktadır (Çizelge 2.1). Bu tehlike parametrelerine karşılık olasılık (nanomalzeme miktarı, çalışan sayısı, işin süresi) parametreleri de belirlenmekte ve aynı şekilde bu parametrelere de belirli katsayılar atanmaktadır (Çizelge 2.2). Bu iki başlık (şiddet, olasılık) altındaki parametrelerin katsayıları toplanır ve ŞiddetXOlasılık risk matrisi oluşturulur (Çizelge 2.3). Matristen şiddet değerine karşılık bir sıklık (olasılık) değeri okunarak nanomalzeme veya prosesin risk seviyesi belirlenir (Çizelge 2.4) (Zalk vd. 2010)

Çizelge 2.2 Şiddet parametreleri için belirlenen katsayılar

Şiddet Katsayıları	
Yüksek	10
Orta	5
Düşük	0
Bilinmiyor	7.5

Çizelge 2.3 Risk matrisi (Zalk vd. 2010)

		Olasılık Değeri			
		Çok Düşük Olasılık (0-25)	Düşük Olasılık (26-50)	Olası (51-75)	Yüksek Olasılık (76-100)
Şiddet Değeri	Çok Yüksek (76-100)	RL 3	RL 3	RL 4	RL 4
	Yüksek (51-75)	RL 2	RL 2	RL 3	RL 4
	Orta (26-50)	RL 1	RL 1	RL 2	RL 3
	Düşük (0-25)	RL 1	RL 1	RL 1	RL 2

Çizelge 2.4 Risk seviyeleri

Risk seviyeleri	
RL 1	Düşük
RL 2	Orta
RL 3	Yüksek
RL 4	Çok Yüksek

2.1.6 Sağlık ve güvenlik önlemleri

Bu basamak, nanomalzemelerin güvenli kullanımı için karar alma uygulama basamağıdır. Belirlenen risk seviyesi kullanılan nanomalzemenin veya prosesin tehlike sınıfını ifade etmektedir. Bu tehlike sınıfına göre, uygulanacak kontrol önlemi belirlenmektedir. Nanomalzeme özellikleri ve proses şartlarına göre değişkenlik gösterebilecek bu önlemler beş adımda sıralanmaktadır (Anonymous 2007).

Prosesin veya malzemenin uygulamadan kaldırılması: Çok yüksek riske sahip malzemeler ve prosesler mümkünse uygulamadan kaldırılmalıdır. Nanomalzemenin beraberinde getirdiği risk sağladığı faydanın önüne geçmemelidir (Anonymous 2007).

Tehlikeli kimyasalın, aynı görevi gören daha düşük tehlikeli veya tehlikesiz eşdeğer bir kimyasal ile değiştirilmesi (ikame): Risk seviyesi çok yüksek olan malzemeler daha az tehlikeli ve aynı görevi görebilecek bir başka malzemeyle değiştirilmelidir. Böylece tehlikeli olduğu belirlenen nanomalzemeler elimine edilerek daha güvenli ortamlar ve ürünler geliştirilecektir (Anonymous 2007).

Proses iyileştirme: Orta seviyedeki riskler çeşitli mühendislik önlemleri ile kontrol edilmelidir. Nanomalzemelerin kullanıldığı proseslerde; havalandırma, kapalı sistem, temiz oda gibi uygulamalar riskin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır (Anonymous 2007).

Yönetimsel iyileştirme: Nanomalzeme ile doğrudan etkileşim içerisinde olan üretici veya tüketiciler çeşitli yönetimsel uygulamalarla malzeme ve prosesin riskleri hakkında bilinçlendirilmelidir (eğitim, denetim). Bu alanda görev yapan çalışanlar için düzenli olarak sağlık taramaları gerçekleştirilebilir (Anonymous 2007).

Kişisel koruyucu donanım kullanımı: Son olarak, Nanoteknoloji alanında çalışan araştırmacı ve işçilerin, nanomalzemelerin vücuda girişini engellemek için; eldiven,

maske, koruyucu giysi gibi kişisel koruyucu donanım kullanımları önerilmektedir (Anonymous 2007).

Birçok nanomalzeme grubu üzerinde, güvenli kullanımlarına yönelik araştırmalar artarak devam etmektedir. Polimer nanomalzemeler geniş kullanım alanları ve nano boyutta kolay işlenebilmeleri açısından bu malzeme grupları arasında önemli bir yere sahiptir. Malzemelerin yığın halinde gösterdiği karakteristik ve toksikolojik özellikler nano boyutta değişebilmektedir. Yığın halinde toksik olmayan bir polimer nano boyutta toksik özellik gösterebilmektedir ya da karakteristik özelliklerinde değişimler gözlenmektedir. Üretim miktarı ve kullanım alanı giderek artan bu nano yapıların güvenli kullanımları sağlanmalıdır.

2.2 Polimer Nanomalzemeler

Polimerler, tekrar eden kimyasal yapıtaşların (“mer”) birbiri ile bağ yaparak (polimerizasyon) oluşturdukları büyük moleküllü yapılardır. Doğada polimer yapıda bulunan kimyasal bileşiklerin yanı sıra yapay olarak üretilen ve kullanım amacına göre çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemlerle modifiye edilen polimerler de mevcuttur. Bu polimerlere plastik polimerler denilmektedir. Plastik polimerlerin üretim aşamasında birçok kimyasal gerekmektedir ve bunların birçoğu ham petrolden elde edilmektedir. Bu kimyasallardan bazıları insan sağlığı ve çevre için tehlikelidir ve polimerlerin; üretim kullanım ve atık evrelerinde ortama salınabilmektedir (Lithner vd. 2011).

Polimerler, “nano” boyutta, tekstil, ilaç salımı, gıda, medikal ve kompozit teknolojisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Yığın halinde toksik özellikleri bilinen bu polimerlerin uygulama alanlarına göre “nano” boyuttaki olası toksik etkileri belirlenmelidir ve güvenli kullanımlarına yönelik önlemler alınmalıdır (Musyanovych vd. 2011).

Polimerler “nano” boyutta lif ve parçacık yapıda çalışılmaktadır. Farklı tekniklerle, lif ve parçacık yapısında elde edilen polimerler yığın halindeki yapılarından farklı fizikokimyasal ve toksikolojik özellikler göstermektedir (Musyanovych vd. 2011).

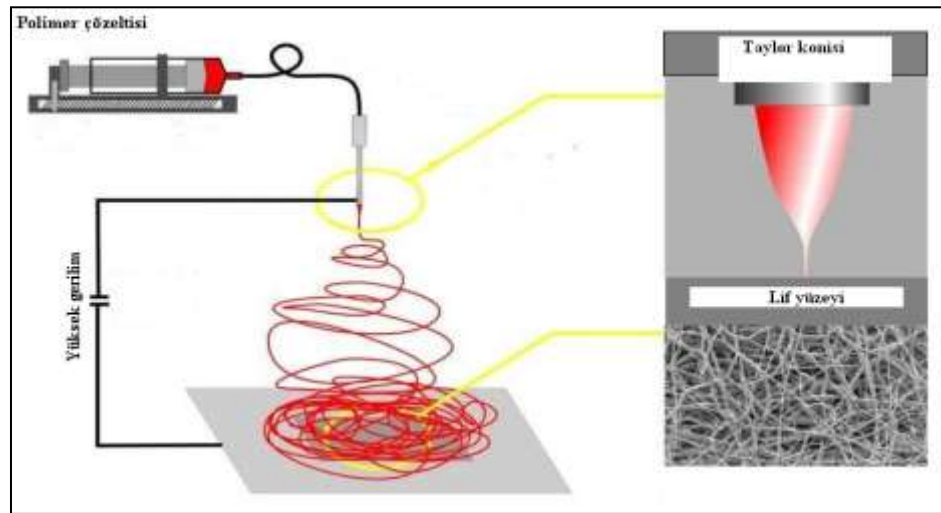
2.2.1 Polimer nano-lifler

Nanolif kavramı, özellikle son yıllarda başta A.B.D, Güney Kore ve Çin olmak üzere yoğun olarak çalışılan, çapı nano ölçekli lifleri ifade eder. Son 10 yıl boyunca mikro lif endüstrisi ipek, yün, pamuk gibi doğal lif özeliğine sahip ürünler geliştirilmiş ve endüstriyel olarak üretilmiştir. Kompozit çekim yöntemi ile ultra-ince lif eldesi (mikron) mümkün olmuştur ancak yine de nanolif teknolojisi mikro lif üretiminden çok farklıdır (Olgunsoy vd. 2009, Özdoğan vd. 2006). Nanolifler “Fibrilasyon”, “Meltblowing”, “Spunbond”, çekme, faz ayrımı, self assembly, bikomponent, kalıp sentezi ve elektroğirme (elektrospinning) gibi çok farklı yöntemlerle üretilmektedirler. Bu yöntemler arasında, proses parametrelerinin kontrol kolaylığı ve pratik olması sebebi ile elektroğirme yöntemi ön plana çıkmaktadır.

Nanolif üretim yöntemleri arasında elektrostatik yöntemle elde edilen lifler istenilen tüm özellikleri sağlayabilmekte ve lif inceliği kontrol altında tutulabilmektedir. Bu yöntemde, polimer çözeltisi yada lif eriyiğinden lif eldesi için elektrostatik kuvvet kullanılmaktadır (Olgunsoy vd. 2009, Özdoğan vd. 2006). Elektroğirme adı verilen bu yöntem son 20 yıldır üzerine yoğunlukla çalışılan bir konu olmasına karşın yöntemin tarihi çok eskidir. 1934 yılında Formhals tarafından, elektrostatik kuvvetler kullanılarak polimerlerden filament lif üretilmesi işleminin patenti alınmış ve kullanılan bu yöntem “elektrospinning” olarak tanımlanmıştır. Son dönemlerde, bu yöntem ile elde edilen polimer liflerin çaplarının mikrometre altında uzunluklarda olmaları ve bu ölçülerin filtreleme, kompozitleri güçlendirme ve biyomedikal cihazlar gibi önemli ölçüde geniş uygulama alanları için elverişli olmalarından dolayı bu yöntemle olan ilgi hızla artmaktadır (Özdoğan vd. 2006, Olgunsoy vd. 2009).

Elektroeğirme, uzun zincirli polimerlerin eriyik ya da çözelti olarak akışkan hale getirilip, elektrik alan uygulanmasıdır. Uygulanan voltaj ile viskoelastik akışkan karşıdaki topraklanmış yüzeye incelerek geçmektedir. Düze ucunda iken hemen hemen düzeyle aynı çapa sahip olan jet üzerinde yüksek derecede incelme olmakta ve karşıya nanometrik çapta lifler olarak düzensiz bir şekilde toplanmaktadır (Şekil 2.5) (Olgunsoy vd. 2009).

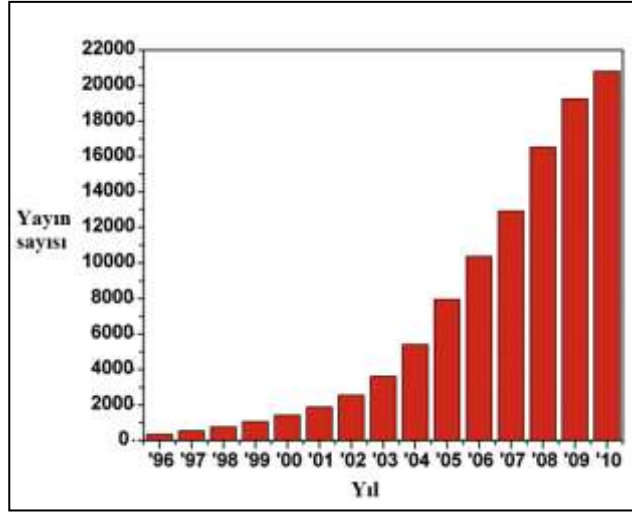
Elde edilen lif çapına birçok ortam (sıcaklık, basınç) ve proses (polimer molekül ağırlığı, çözelti çeşidi, çözelti derişimi, uygulanan voltaj, toplayıcı plaka mesafesi) parametresi etki etmektedir. Bu parametrelerin kontrolü ile istenilen çapa sahip lifler elde edilmektedir.



Şekil 2.5 Elektroeğirme düzeneği (Olgunsoy vd. 2009)

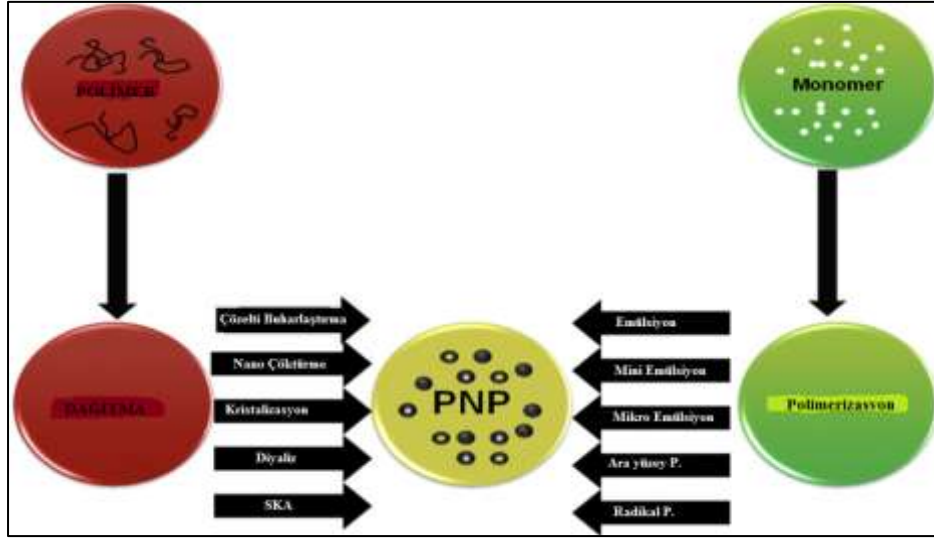
2.2.2 Polimer nano-parçacıklar

Son dönemde geniş kullanım alanları nedeniyle polimer nanoparçacıklar üzerinde yapılan çalışmalarda önemli bir artış gözlenmektedir (Şekil 2.6) (Rao vd. 2011).



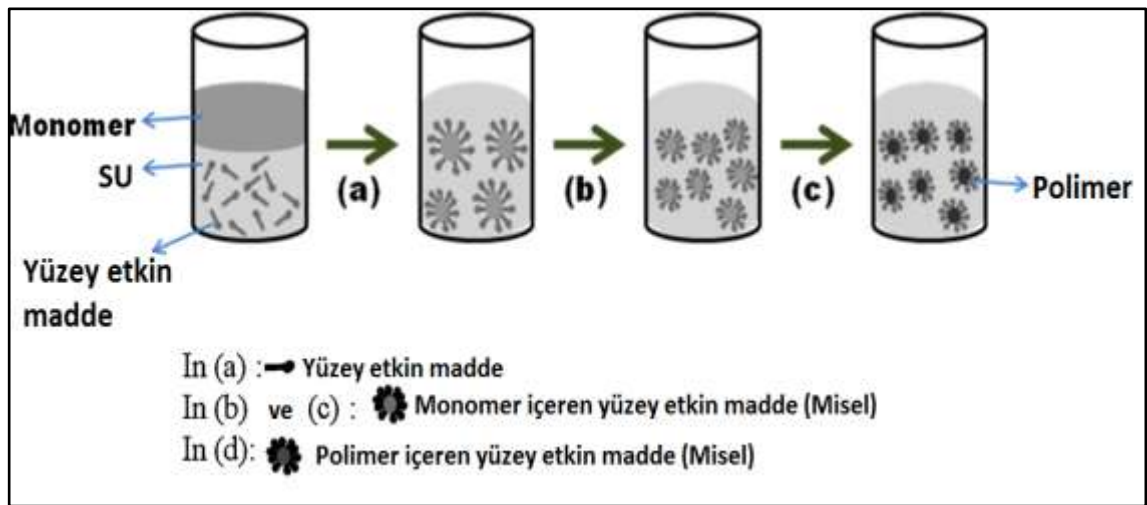
Şekil 2.6 Polimer nanoparçacıkları konu edinen yayınların yıllara göre dağılımı (Rao vd. 2011)

Nanoparçacıklar katı ve kolloid yapıda bulunan 10-1000 nm ölçü aralığındaki nanoküre veya nanokapsüllerdir (Rao vd.2011). Polimerler iki farklı yaklaşım ile nano boyutta elde edilmektedir. Birinci yaklaşımda parçacıklar yığın halindeki polimer yapısından; çözücü buharlaştırma, diyaliz, süperkritik akışkan teknolojisi gibi yöntemler kullanılarak elde edilmektedir (yukarıdan aşağıya yaklaşım (top-down)). İkinci yaklaşımda ise polimer nanoparçacıklar, monomerlerinden; miniemülsiyon, mikroemülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenmektedir (aşağıdan yukarı yaklaşımı (bottom-up)) (Şekil 2.7) (Rao vd. 2011).



Şekil 2.7 Polimer nanoparçacık üretim yöntemleri (Rao vd. 2011)

Parçacık boyut kontrolü, nano boyutta parçacık boyut dağılımı ve çözücü uzaklaştırma kolaylığı nedeniyle mini emülsiyon polimerizasyon yöntemi ön plana çıkmaktadır. Bu yöntemde yüzey etkin maddelerinin oluşturduğu “misel” yapıları polimerizasyonun gerçekleştiği kolloid yapılardır (Şekil 2.8). Parçacık boyutu misel çapıyla doğru orantılı olarak azalıp artmaktadır. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken nokta, parçacıklar sentezlendikten sonra çözücü uzaklaştırma aşamasıdır. Çünkü parçacığın karakteristik özelliklerini etkilediği için, son ürün aşamasında çözücünün bulunmaması beklenmektedir (Rao vd. 2011).



Şekil 2.8 Miniemülsiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi (Rao vd. 2011)

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu lisansüstü tez kapsamında; nanoteknoloji, nanomalzemeler, polimerler, toksisite, nanoparçacık toksisitesi, güvenli çalışma (iş sağlığı ve güvenliği), polimer nano yapılar (nano lif, nano parçacık) ve güvenli nanoteknoloji konu başlıklarında literatür taraması yapılmıştır. İnceleme yapılan kaynaklar üç gruba ayrılmıştır. Bunlar; güvenli nanoteknoloji ile ilgili yayınlanmış uluslararası raporlar, karbon ve metalik temelli nano yapılar ile yapılan çalışmalar, polimer temelli nanoyapılar ile yapılan çalışmalardır (Çizelge 3.1 - 3.5).

Çizelge 3.1 Literatür taraması kapsamında incelenen uluslararası raporlar

Yayın adı ve yılı	Kuruluş/Enstitü	İçerik	Sonuç
Nanobilim ve nanoteknoloji: fırsatlar ve belirsizlikler 2004	İngiliz bilimler akademisi (Royal Society)	- Nanoteknoloji ve nanomalzemeler - Olası sağlık ve çevre etkileri - Kullanım döngüleri - Yasal düzenlemeler	-Endüstriyel uygulamalar -Tehlike ve Riskler -Üretici ve tüketici diyalogu -Sorumluluk ve sürdürülebilirlik konuları tartışılmıştır.
Güvenli nanoteknoloji yaklaşımı 2009	Amerikan İş sağlığı ve güvenliği örgütü (NIOSH)	-Olası sağlık etkileri ve riskleri -Etkilenmenin belirlenmesi	Nanomalzemelerle güvenli çalışma ilkeleri belirlenmiştir.
Altı nanomalzemenin sağlık ve toksikolojik etkileri 2009	Avustralya hükümeti, Sağlık bakanlığı	- ZnO, TiO ₂ , CeO, CNT, Fulleren, nano gümüş	- Toksik etkileri - Hayvansal etkilenme deneyleri sonucunda bu nanoyapıların toksik potansiyele sahiptir.

Çizelge 3.1 Literatür taraması kapsamında incelenen uluslararası raporlar (devam)

Nanomalzemelerin sağlık etkileri 2011	Avrupa konseyi, Ortak araştırmalar merkezi (JRC)	-Yasal ve sosyal uygulamalar -Fırsatlar ve güvenlik ölçütleri -Belirsizlikler	- Etkilenme sınır değerleri önerilmiştir. - Sağlık etkileri belirlenmiştir.
Nanomalzemelerin ulusal kullanım döngüsü analizi 2011	Ekonomik kalkınma ve işbirliği örgütü (OECD)	-Avusturya -Finlandiya -Almanya -Kore -ABD -Birleşik Krallık	- Nanomalzeme takibinin önemi vurgulanmıştır. - Terimlerin standardizasyonunun gerekliliği vurgulanmıştır. -İyi uygulama örnekleri verilmiştir.
REACH koşullarının nanomalzemelere göre uyarlanması 2013	Avrupa komisyonu, Ortak Araştırmalar Merkezi (IHCP)	Nanomalzemelerin REACH tüzüğü kapsamına alınması ve tüzüğün revize edilmesine yönelik görüşler belirtilmiştir.	- Nanomalzemelerin endüstriyel ürünlerdeki önemi vurgulanmıştır. - Olası çevresel ve sağlık etkilerinin önemi vurgulanmıştır. - Nanomalzemelerin kullanım döngüleri boyunca fayda maliyet analizine yer verilmiştir. - Malzeme güvenlik bilgi formlarının revizyon kriterleri tartışılmıştır.

Çizelge 3.2 Literatür taraması kapsamında incelenen karbon ve metalik temelli nanoyapılara ait yayınlar

Yazar/yıl	Nanomalzeme	Amaç	Sonuç
Ahamed vd. 2010	Gümüş nanoparçacıklar	-Memeli hücrelerinde In-vitro toksite etkilerini belirlemek -Biyo-dağılım gözlemlemek	-Biyo-dağılıma doz ve boyut etkisi incelenmiştir -Farklı memeli hücrelerinde toksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. -Akciğer, karaciğer, beyin ve kas sistemi üzerine toksik olduğu belirlenmiştir.
Gahrouei vd. 2013	Kobalt-çinko ferrit nanoparçacıklar	Bizmut nanoparçacıkların insan prostat kanser hücreleri üzerine sitotoksiteleri incelenmiştir.	- Bizmut nanoparçacıkların insan prostat kanser hücrelerine düşük derecede sitotoksik etkiye sahip olduklarını gözlemlemiştir.
Luo vd. 2012	Bizmut nanoparçacıklar	Üç farklı (MTT, G6PD, calcein AM/Eth D-1) vücut dışı sitotoksitite deneyi ile bizmut nanoparçacıkların sitotoksiteleri belirlenmiştir.	- Bizmut nanoparçacıkların yığın haldeki yapılarına kıyasla daha toksik olduğu saptanmıştır. - Yüksek konsantrasyonlarda bizmut nanoparçacıkların daha toksik olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.2 Literatür taraması kapsamında incelenen karbon ve metalik temelli nanoyapılara ait yayınlar (devam)

Sanchez vd. 2011	-Grafen -Grafen Oksit	Biyolojik etkileri üzerine derleme çalışması	- Toksitenin, tabaka sayısı, bağlı grup ve yüzey alanı gibi parametrelerle değiştiği.
Som vd. 2011	-Nano TiO ₂ -Nano Al ₂ O ₃ -Nano gümüş -Nano ZnO -Nano SiO ₂	Nanomalzemelerin tekstil uygulamalarında sağlık ve çevre etkileri	-Kullanım döngüleri boyunca çevre ve sağlık üzerine etkileri belirlenmiştir.
Walker vd. 2009	-Karbon siyahı -Tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) -Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT)	İnsan Endotel hücreleri üzerine in-vitro etkisi	-Hücrede birikim gerçekleştirdiği saptanmıştır -Hücre ölümüne neden olduğu gözlenmiştir. - Ayrıca hücre morfolojisinde deformasyona sebep olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.3 Literatür taraması kapsamında incelenen polimer temelli nanoyapılara ait yayınlar

Yazar/yıl	Polimer/ başlık	Amaç	Sonuç
Boguslavsky et al. 2005	Poliakrilonitril (PAN)	PAN nanoparçacıklarının emülsiyon polimerizasyonu ile sentezi ve karakterizasyonu	PAN nanoparçacıkları 110 +- 15 nm çap aralığında sentezlenmiştir ve TEM, SEM, XRD yöntemleriyle karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. - Monomer konsantrasyonu, tepkime başlatıcı, polimerizasyon zamanı, sıcaklığı, yüzey etkin madde parametrelerinin PAN nanoparçacık sentezinde önemli parametreler olduğu saptanmıştır.
Demir vd. 2002	Poliüretan (PU)	Elektro-eğirme yöntemiyle PU nanoliflerin üretilmesi	- Voltaj, sıcaklık, iletkenlik ve çözelti derişiminin nanolif morfolojisine ve boyut dağılımına etkileri incelenmiştir. - Geniş boyut dağılım aralığında PU liflerin oluştugu gözlenmiştir. - Düşük derişimlerdeki çözeltilerde lif oluşumu gözlenmemiştir.

Çizelge 3.3 Literatür taraması kapsamında incelenen polimer temelli nanoyapılara ait yayınlar (devam)

Landfester ve Antonietti 2000	PAN	Mini-emülsiyon polimerizasyonu ile akrilonitril monomerinden PAN nanoparçacıkların sentezi.	- TEM mikroskopuyla yapılan deneylerde 100-180 nm boyut aralığında PAN nanoparçacıkların sentezlendiği gözlenmiştir.
Landfester vd. 2003	Polistiren (PS)	Makro-emülsiyon ve mini-emülsiyon polimerizasyonları ve boyut dağılımı	Mini-emülsiyon polimerizasyonunda boyut dağılımı daha düşük sapma göstermektedir
Lithner vd. 2011	Plastik polimerler	Yığın halindeki polimerlerin kimyasal içeriklerine göre toksite sıralaması	-PU ve PAN polimerleri ilk iki sırada gelmektedir -Yıllık üretim miktarı (9;3 milyon ton/yıl)
Rao vd. 2011	Polimer nanoparçacıklar	Polimer nanoparçacıkların üretim teknikleri ve büyüklük kontrol parametreleri tartışılmıştır.	- Polimer nanoparçacık üretimi için seçilecek metodun sentezlenmek istenen parçacığın boyut aralığına bağlı olduğu vurgulanmıştır. - Nano büyüklükte parçacıkların

Çizelge 3.3 Literatür taraması kapsamında incelenen polimer temelli nanoyapılara ait yayınlar (devam)

			sentezi için mini-emülsiyon tekniğinin verimliliği vurgulanmıştır.
Tiarks vd. 2001	PU	Mini-emülsiyon yöntemiyle poliüretan nanoparçacıklar sentezlenmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.	- PU nanoparçacıkların 200 nm çapında olduğu gözlenmiştir.
Yördem vd. 2008	PAN	Elektro-eğirme parametrelerinin PAN nanolif çapına etkisi incelenmiştir ve RSM yöntemiyle optimizasyon gerçekleştirilmiştir.	- Çözelti derişimi, voltaj ve toplayıcı mesafesinin lif çapına olan etkileri belirlenmiştir. - Yüksek çözelti derişiminde voltajın lif çapı üzerinde önemli etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.
Zhang vd. 2012	PU	Mini-emülsiyon polimerizasyonunda izosiyanat hidrolizi yan tepkimesinin polimerizasyon verimliliğine etkisi incelenmiştir.	- Polimerizasyon kinetiğini veren matematiksel bir model önerilmiştir. - Deneysel sonuçların istatistiksel verilerle uyduğu

Çizelge 3.3 Literatür taraması kapsamında incelenen polimer temelli nanoyapılara ait yayınlar (devam)

			gözlemlenmiştir. - İzosiyanat hidrolizi yan tepkimesinin PU mini-emülsiyon prosesinde kontrol edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.
--	--	--	---

Alexandra vd. (2009), yaptıkları çalışmada nanoparçacıkların risklerinin belirlenmesinde kullanılan mevcut in-vitro yöntemlerinin karşılaştırmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla bir çok in-vitro metodu incelenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Kullanılan in-vitro toksite metotları (Alexandra vd. 2009)

Sitotoksite protokolü	Çalışma prensibi	Belirti	Uygulanan nanoyapı
MTT	Mitokondri aktivitesinin renksel tayini	Hücre canlılığı	Karbon nanoyapılar
LDH	LDH salımının renksel tayini	Hücre ölümü	Metalik nanoyapılar
Annexin V/ propidium iodide	Florometrik tayin	Hücre ölümü	Karbon nanoyapılar
Neutral red	Renksel tayin	Hücre ölümü	Karbon nanoyapılar

Çizelge 3.4 Kullanılan in-vitro toksite metotları (Alexandra vd. 2009) (devam)

Caspase	Florometrik tayin	Hücre canlılığı	Metalik nanoyapılar
Stress response DCF	Florometrik tayin	Oksidatif stres	Karbon nanoyapılar

In-vitro toksisiteyi etkileyen nanoparçacık özelliklerinin; adsorpsiyon kapasitesi, optik özellikler, katalitik aktivite, pH, manyetik özellikler ve çözünürlük olduğunu göstermişlerdir. Farklı nanoyapılar için özel protokollerin gerekliliğine dikkat çekmişlerdir. Parçacık boyutunun toksite çalışmalarında önemli bir etken olduğuna vurgu yapılmıştır. Toksite belirleme için in-vitro testlerinin daha kompleks in-vivo testleri ile desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Çizelge 3.5 Literatür taraması kapsamında incelenen toksisite çalışmalarına ait yayınlar

Yazar/yıl	Malzeme	Amaç	Sonuç
Broichsitter vd. 2011	- polistiren (PS) - poly(D,L-lactide-co-glycolide)	Polimerik nanoparçacıkların ilaç salımına etkisinin incelenmesi	- PS ve PLGA nanoparçacıkların solunum yolu ile ilaç salımı için uygun olduğu ortaya konmuştur.
Dygai vd. 2011	Yeni dokusuz polimerik bandaj malzemesi (NPFBM)	Geliştirilen NPFBM malzemesinin bandaj malzemesi olarak uygunluğunun test edilmesi	- Gerçekleştirilen MTT sitotoksik deneyleri sonucunda NPFBM malzemesinin herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. - Tıbbi bir malzeme olarak 10993-5 metoduna uygunluk sağladığı gözlenmiştir.

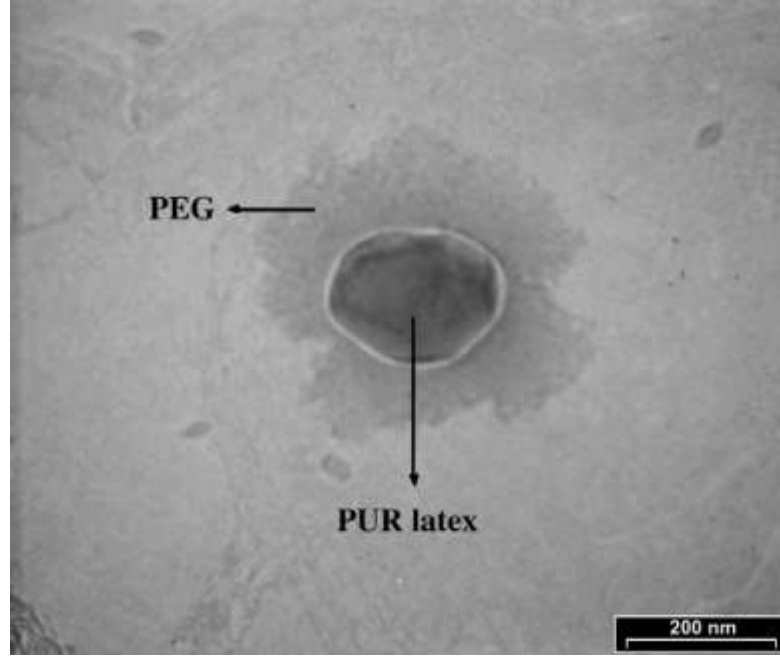
Çizelge 3.5 Literatür taraması kapsamında incelenen toksisite çalışmalarına ait yayınlar (devam)

Karakeçili ve Arıkan 2012	Kitosan-nanohidroksopatit	Süperkritik yöntemle Kitosan-nanohidroksopatit kompozit yapısının sentezi ve karakterizasyonu	- L929 fibroblast hücrelerinde gerçekleştirilen sitotoksosite testleri sonucunda herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. - Kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği ortaya konmuştur.
Musyanovych vd. 2011	- (PS) - poly(L-lactide) (PLLA) nanoparçacıklar	Akış sitometrisi yöntemiyle polimer türü ve yüzey etkin madde çeşidinin hücre sel alıma etkisinin incelenmesi	- Katyonik PLLA nanoparçacıkların daha sitotoksik olduğu saptanmıştır. - İyonik olmayan PLLA ve PS nanoparçacıkların önemli derecede sitotoksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.5 Literatür taraması kapsamında incelenen toksisite çalışmalarına ait yayınlar (Devam)

Yeganegi vd. 2010	PU	Elektro-eğrilmiş PU nanoliflerin mekanik ve sitotoksik özelliklerinin incelenmesi	- Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak PU membranların MTT test sonuçlarına göre sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir.
-------------------	----	---	---

Ramos vd. (2006), yaptıkları çalışmada, miniemülsiyon polimerizasyonu ile poliüretan (PU) nanoparçacıklarını sentezini gerçekleştirmişlerdir ve proses parametrelerinin (girdi derişimleri, yüzey etkin madde davranışı) poliüretan (PU) nanoparçacık üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada parçacık boyutu ortalama 300 nm olarak elde edilmiştir. İyi bir boyut dağılımı için; düşük su çözünürlüğüne sahip reaktanların gerekliliğine vurgu yapılmıştır. Ayrıca İzosiyanat ve alkol grupları arasındaki tepkimenin miniemülsiyon oluşumu için gerekli olan süre içerisinde gerçekleşmesi gerektiğine dikkat çekilmiştir. Elde edilen bu poliüretan nanoparçacıklarının karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Poliüretan nanoparçacığının TEM görüntüsü (Ramos vd. 2006)

Yördem vd. (2008) yaptıkları çalışmada, elektroğirme parametrelerinin (malzeme, proses) poliakrilonitril (PAN) lif çapına etkisini incelemişlerdir. İncelen parametreler arasında; polimer molekül ağırlığı, çözelti derişimi, uygulanan elektriksel alanın kuvveti ve toplayıcı panelin şırıngaya uzaklığıdır. Molekül ağırlığı ve uygulanan voltajın lif çapını etkileyen en önemli parametreler olduğu gösterilmiştir. Nano boyutta lifler düşük derişim aralığında (8-10%) ve düşük voltaj (10-20 kV) değerlerinde elde edilmiştir (83 $\pm$ 39 nm, 109 $\pm$ 65nm). Lif çapının, nanomalzemenin; mekanik, elektriksel ve optik özelliklerini etkilediğine dikkat çekilmiştir (Şekil 3.1).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

Üç temel basamakta gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan materyaller aşağıda verilmiştir.

Polimer nanolif üretiminde; Poliüretan (PU, Fluka, 81367-5G) ve Poliakrilonitril (PAN, Aldrich, 181315-50G, Mw: 150,000 g/mol) polimerleri, çözeltilerin hazırlanmasında ise N,N-Dimetilformamid (Fluka, susuz, 99.8%) kullanılmıştır.

PAN ve PU polimer nanoparçacıkların sentezinde; izoporan dizosiyanat (IPDI; Aldrich; 98%, 317624 - 250ML), 1,12-dodekandiol (Aldrich; 99%, D221309 - 100G), hegzadekan (HD; Aldrich; 99%, H6703 - 100ML), akrilonitril monomer (AN; >99%, 110213-1L), 2,2-azobis(2-metilbütironitril) V59; Aldrich; >98%, 11596-50G) kimyasalları kullanılmıştır.

Sitotoksisite testlerinin gerçekleştirilmesinde; fetal bovayn serum (FBS), penisilin (PS), DMEM besi ortamı (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium), fosfat tamponu (PBS) , MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid), izopropanol (analitik saflıkta), hidroklorik asit (analitik saflıkta) kullanılmıştır.

Hücre boyamada kullanılan, kristal viyole, aseton ve metanol (analitik saflıkta) kimyasalları hazır olarak temin edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan kimyasallara ön işlem uygulanmamıştır.

4.2 Yöntem

Polimer nanolifler elektro-eğirme, polimer nanoparçacıklar ise miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Üretim yöntemlerine ait detaylar aşağıda verilmiştir.

4.2.1 Polimer nano-lif üretimi

Polimer nanoliflerin hazırlanmasında aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

Polimer çözeltisinin hazırlanması

Polimerlerin dielektrik özellikleri dikkate alınarak uygun çözücü olarak DMF seçilmiştir. İstenilen boyut dağılımında lifler üretmek için polimerlerin çizelge 4.1’de verilen farklı derişimlerde, yeterli miktardaki çözeltileri homojen karıştırma sağlanarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1 Polimer çözeltilerinin derişimleri

	PAN	PU
Kütlece derişim %	6	7
	8	10
	10	12
	-	16
	-	18

Elektro-eğirme yöntemiyle polimer nano-lif üretimi

Hazırlanan polimer çözeltileri elektro-eğirme düzeneği ile farklı proses koşullarında (voltaj, toplayıcı mesafesi, çözelti besleme hızı) eğrilmiş ve farklı boyut dağılımlarında

polimer nanolifler elde edilmiştir. Elektro-eğirme düzeneği; kesintisiz güç kaynağı, çözelti bezleme cihazı ve toplayıcı panel olmak üzere üç temel birimden oluşmaktadır. Şekil 4.1’de elektro-eğirme düzeneği görülmektedir.



Şekil 4.1 Deneylerde kullanılan elektro-eğirme düzeneği

Yanıt yüzey yöntemiyle (RSM) optimizasyon

RSM yöntemi, Design-Expert® yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanolif sentezi için seçilen değişkenler voltaj, toplayıcı mesafesi ve besleme hızıdır. Yazılımda, voltaj 10 ve 14 kV arasında, toplayıcı mesafesi 10 ve 20 cm arasında besleme hızı ise 0,8 ve 1,2 ml/saat arasında değiştirilmiştir. Yanıt değişkeni olarak 250 nm lif çapı seçilmiştir. Yazılıma bu veriler girilmiş ve çizelge 4.2’de verilen deney programıyla nanolifler sentezlenmiştir.

Çizelge 4.2 RSM deney programı

Deney no	Voltaj (kV)	Toplayıcı mesafesi (cm)	Besleme hızı (ml/sa)	Yanıt (nm)
1	12	15	1	
2	10	10	1,2	
3	12	15	1	
4	8,6	15	1	
5	10	20	1,2	
6	12	15	1	
7	12	15	0,7	
8	14	20	1,2	
9	12	15	1,3	
10	12	15	1	
11	12	6,6	1	
12	10	10	0,8	
13	10	20	0,8	
14	14	20	0,8	
15	12	15	1	
16	12	23,4	1	
17	12	15	1	
18	15,4	15	1	
19	14	10	0,8	
20	14	10	1,2	

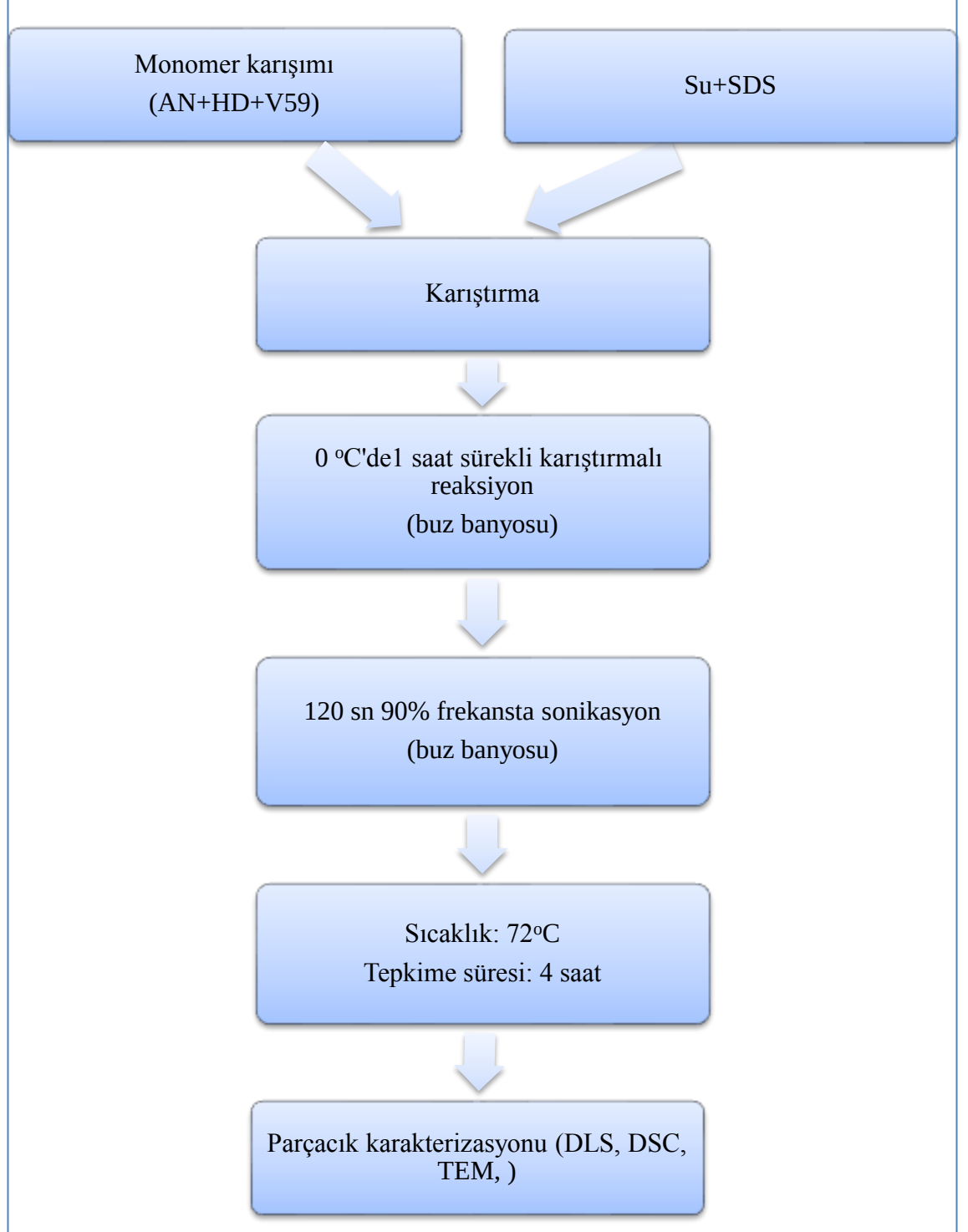
Deney numarasına karşılık gelen voltaj, toplayıcı mesafesi ve besleme hızıyla Bölüm 4.2.1’de verilen adımlarla nanolifler sentezlenmiştir.

4.2.2 Polimer nano-parçacık üretimi

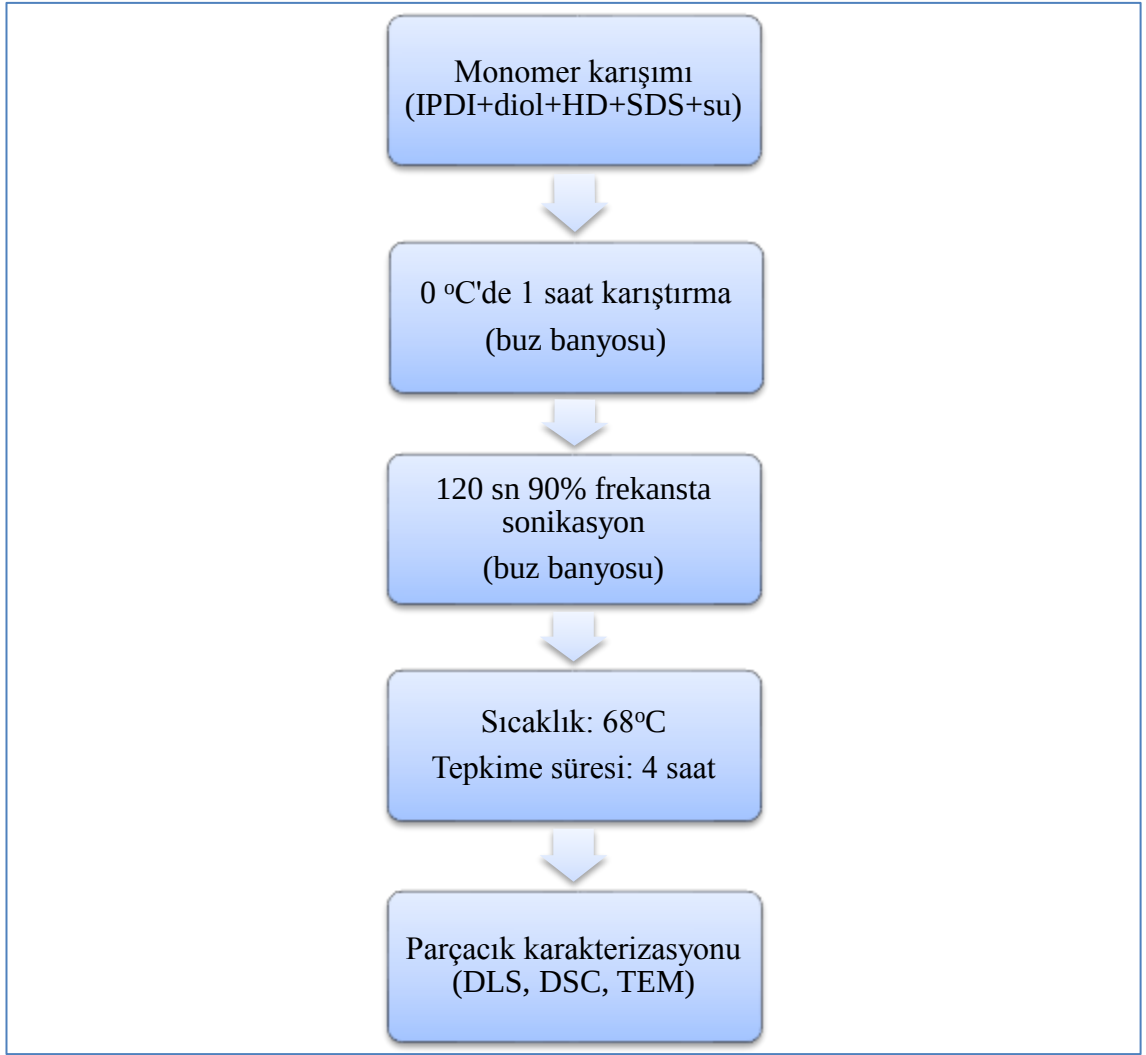
Tez çalışmasının bu basamağı Avrupa Birliği 7. Çerçeve programı kapsamında desteklenen “QualityNano” proje bursu desteğiyle yürütülmüştür.

PAN ve PU nanoparçacıkları aşağıda verildiği gibi miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir.

PAN ve PU polimer nanoparçacık üretimine ait iş akış şemaları şekil 4.2 ve 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.2 PAN nanoparçacık üretim şeması



Şekil 4.3 PU nanoparçacık üretim şeması

Polimer nanoparçacıkların elde edilmesinde izlenen basamaklar aşağıda özetlenmiştir.

I. Tepkime karışımının hazırlanması

PAN nanoparçacık üretiminde, monomer çözeltisi ve yüzey aktif maddesi (SDS) uygun miktarlarda, farklı beherlerde hazırlanır. Hazırlanan karışımlar 50ml balonjoje'de karıştırılır.

PU nanoparçacık üretiminde, gerekli monomerler ve yüzey aktif maddesi (SDS) aynı beherde, belirlenen oranlarda hazırlanır.

II. Buz banyosunda homojenizasyon

Hazırlanan tepkime karışımları tepkime öncesinde, misel oluşumu için 0°C buz banyosunda sürekli manyetik karıştırıcı ile 1 saat homojenize edilir. 0°C buz banyosu homojenizasyon düzeneği şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4 Karıştırmalı 0°C buz banyosu homojenizasyon düzeneği

III. Ultrasonikasyon

Misel oluşumunun tamamlanması için monomer karışımlarına ultrasonikasyon işlemi uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi için SONICS VIBRA CELL marka cihaz kullanılmıştır, şekil 4.5. Cihaz 20 kHz frekansta ve 130 W gücündedir. Cihazın probu karışıma daldırılarak 90% genlikte 120 saniye sürekli olarak işlem uygulanmıştır.



şekil 4.5 Ultrasonik homojenizer

IV. Polimerizasyon

Misel oluşumları tamamlanan karışımlar ısıtıcılı, sürekli manyetik karıştırıcıya alınmıştır. Balon joje içerisindeki karışımlar, yağ banyosunda gerekli sıcaklığa ısıtılarak polimerizasyonun gerçekleşmesi sağlanmaktadır (şekil 4.6).



Şekil 4.6 Polimerizasyon düzeneği

V. Diyaliz

Tepkime sonrasında polimer çözeltileri, çözelti içerisindeki yüzey aktif maddesini (SDS) uzaklaştırmak için diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz işlemi için Spectrum marka 50 nm gözenek çapına sahip 10 ml hacimli membran tüpler kullanılmıştır. Tüpler saf su içerisinde bırakılarak 24 saat diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir (şekil 4.7).



Şekil 4.7 Diyaliz düzeneği

VI. Santrifüj

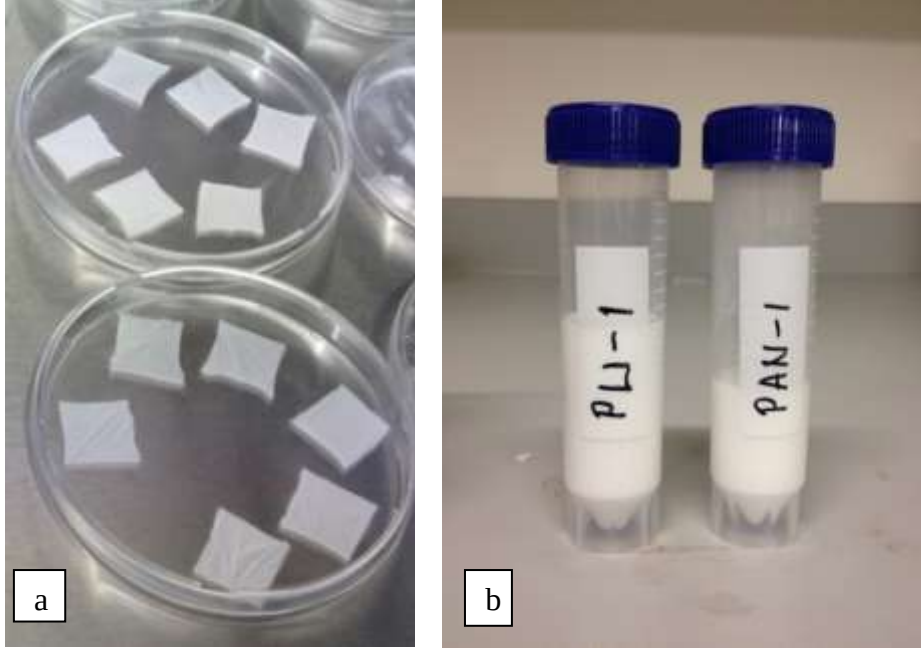
Diyaliz işlemi sonrasında PAN ve PU polimer çözeltilerine 4000 rpm de 30 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulanmıştır.

4.2.3 Vücut dışı (in-vitro) sitotoksisite deneyleri

Hazırlanan polimer örneklerinin sitotoksisite testlerinin gerçekleştirilmesinde TS EN ISO 10993-5 “Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi – Bölüm 5: Vücut Dışı Sitotoksisite Deneyleri” standardı temel referans alınmıştır. Gerçekleştirilen sitotoksisite testlerinin basamakları şu şekildedir;

I. Deney örneklerinin hazırlanması

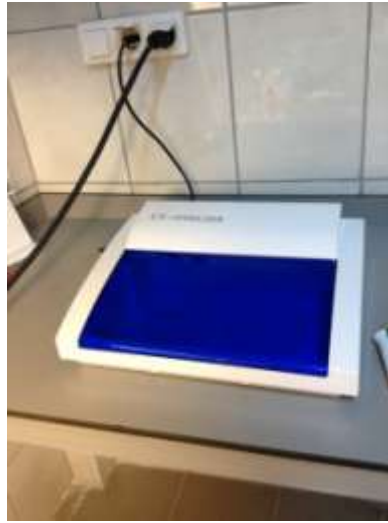
Optimize edilen proses parametrelerinde, 6 tekrarlı elektro-eğirme işlemiyle eğrilen PAN nanolifler toplayıcı panel üzerinde $6 \times 25 \text{ cm}^2$ yüzey alanına sahip olacak şekilde kesilmiştir (şekil 4.8-a).



Şekil 4.8 a)Toplayıcı panel üzerinde kesilerek petri kaplarına alınan PAN nanolifler ve b)Süspansiyon halde PU ve PAN nanoparçacıklar

Şekil 4.8-b’de görüldüğü gibi süspansiyon halde bulunan PAN ve PU nanoparçacıklar liyofilizatörde -80°C ’de 48 saat süreyle dondurularak kurutulmuştur.

Özütleme işlemi öncesinde bütün deney örnekleri UV ışık altında 1 saat süreyle sterilize edilmiştir.



Şekil 4.9 UV sterilizasyon

II. Özütleme

Daha önceden hazırlanan serumlu kültür vasatında (%10 FBS, %1 PS, %89 DMEM) PAN nanoliflerden $2.5 \text{ cm}^2/\text{ml}$ derişiminde $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat süreyle 60 ml özüt hazırlanmıştır. Özütler seyreltilerek sırasıyla 0:100, 25:75, 50:50, 100:0 (Özüt:Kültür vasatı) 4 farklı derişim elde edilmiştir.

Aynı şekilde PAN ve PU parçacıklar için ise $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ derişimlerinde 20'şer ml özütler hazırlanmıştır.

Son olarak, PAN nanolif'lere ait özütler $0.2\mu\text{m}$ gözenek çapına sahip filtre ile süzölmüştür.

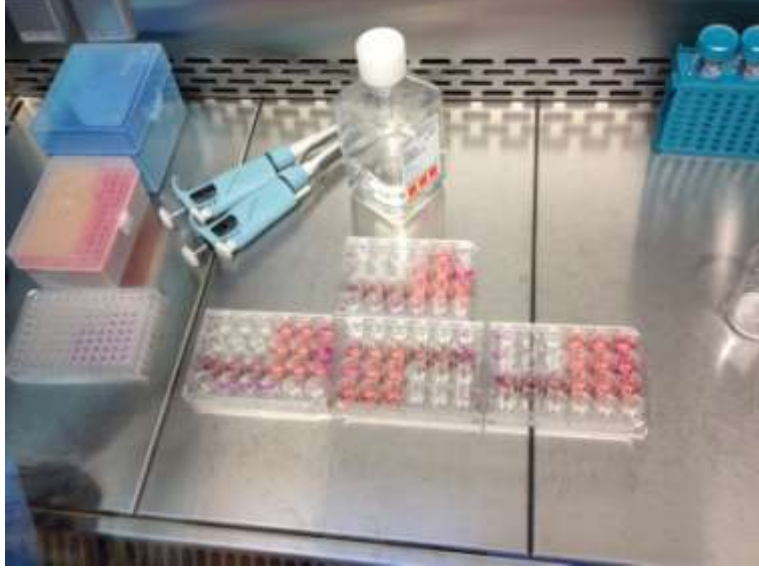
III. Hücre hatlarının hazırlanması

Daha önceden çoğaltılan L929 fibroblast hücreleri 24 kuyucuklu kaplara (1×10^4 hücre/1mL MEM kültür vasatı) ekilmiştir ve %5 CO_2 ortamda $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Deney örnekleri ve kontrolleri için üçer kopya ve kristal viyole ile boyama için birer kuyucuk kullanılmıştır.

IV. MTT sitotoksosite deneyleri

Her bir kuyucuğa özütün bir kısmı veya farklı derişimlerdeki seyreltik özüt eklenmiştir (1mL). %5 CO_2 ortamda $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra deney vasatı uzaklaştırılmıştır ve $600\mu\text{L}$ serumsuz besi ortamı ve $60\mu\text{L}$ MTT çözeltisi eklenerek %5 CO_2 ortamda $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT çözeltisi çekilerek $400 \mu\text{L}$ izopropanol (0.04M HCL içeren) çözeltisiyle yıkanmıştır. Her bir örneğin üzerinden $200 \mu\text{L}$ süpernatant alınarak 96-kuyucuklu kültür kabına konmuştur. Optik yoğunluk 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikrokap okuyucuda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Deneyler 2. ve 3.

gün için tekrarlanmıştır. Okunan absorbans değerlerinden % canlılık değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.10 MTT testi için 24 kuyucuklu kaplar ve deney örnekleri

V. Kristal viyole ile boyama

Kristal viyole ile boyama için hazırlanmış hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılır ve PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilir. Hücreler 4°C' de 20 dk. , 250 µL aseton-metanol çözeltisine tabi tutularak fiksasyon işlemi gerçekleştirilir. Fiksasyon işleminden sonra hücreler üzerine kristal viyole çözeltisi damlatılır ve 30 dk. beklenir. Boyanan yüzey yıkanır ve hücrelerin Olympus marka ışık mikroskopunda 10x ve 20x büyütmede görüntüleri alınır.



Şekil 4.11 Işık mikroskobu

4.3 Analizler

4.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elektro-eğirme yöntemiyle farklı proses koşullarında üretilen PAN ve PU polimer nanoliflerinin, FEI QUANTA 400 marka SEM mikroskobunda farklı büyütmelelerde görüntüleri alınmıştır. Görüntüleri alınan nanoliflerin, XT-Docu yazılımı yardımıyla çapları ölçülmüştür.

4.3.2 Geçirmeli Elektron Mikroskobu (TEM)

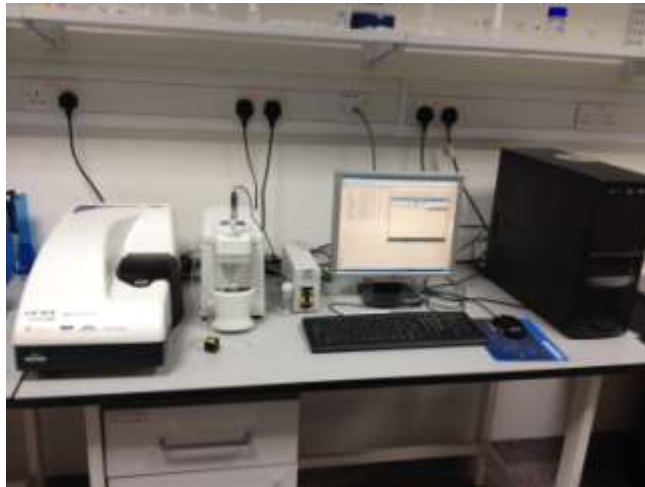
Miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen PAN ve PU nanoparçacıklarının farklı büyütmelelerde görüntüleri FEI Tecnai G2 20 marka TEM mikroskobunda alınmıştır.



Şekil 4.12 FEI Tecnai G2 20 marka TEM mikroskobu

4.3.3 Dinamik Işık Saçılması (DLS)

Sentezlenen PAN ve PU parçacıklarının büyüklükleri ve zeta potansiyelleri Malvern Zetasizer Nano marka DLS cihazı ile analiz edilmiştir. DLS genel olarak sıvı fazda çözünmüş parçacıkların moleküllerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Parçacıkların veya moleküllerin “Brownian” hareketi lazer ışığın farklı yoğunlukta yansımaya neden olmaktadır. Bu yoğunluk değişimindeki dalgalanmanın analizi “Brownian” hareketi hızını vermektedir ve buradan da Stokes-Einstein bağlantısı kullanılarak parçacığın büyüklüğü hesaplanmaktadır (Anonymous 2014a).



Şekil 4.13 Malvern Zetasizer nano DLS cihazı

4.3.4 Diferansiyel Santrifüj Çöktürmesi (DCS)

Sentezlenen PAN ve PU parçacıkların büyüklük ve boyut dağılımı karakterizasyonları CPS Disk Centrifuge marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz diferansiyel santrifüj çöktürmesi prensibiyle çalışmaktadır. Cihaz içerisinde yüksek devirde dönen disk içerisine farklı derişimlerde hazırlanan sakaroz çözeltisi gradyen oluşturmak için disk içerisine enjekte edilir. Oluşturulan gradyen içerisine süspansiyon haldeki örnek enjekte edilir ve parçacıklar büyüklük ve molekül ağırlıklarına göre disk içerisindeki merkezkaç kuvvetinin etkisiyle merkezden çeperlere doğru savrularak çöker. Bu esnada cihaz içerisindeki ışık kaynağı ve detektör ile disk çeperine yaklaşan parçacıklar sayılarak örneğin parçacık boyut dağılımı verisi elde edilir. Bu yöntem ile agrege ve büyüklükleri birbirine çok yakın parçacık içeren örneklerdeki parçacık boyutları ve boyut dağılımları çok rahatlıkla analiz edilebilmektedir (Anonymous 2014b). Şekil 4.15'te kullanılan CPS disk santrifüj cihazı verilmiştir.



Şekil 4.14 CPS Disk santrifüj cihazı

4.3.5 MTT hücre canlılığı testi için mikrokap okuyucuda absorbands analizi

96 kuyucuklu kaplara alınan MTT test örneklerinin Biotek μ quant marka mikrokap okuyucuda optik yoğunluk 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de absorbands değerleri okunmuştur. Deneyler 1, 2, 3. günler için tekrarlanmıştır. Şekil 4.15’de kullanılan mikrokap okuyucu verilmiştir.



Şekil 4.15 Biotek μ quant marka mikrokap okuyucu

5. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1 PAN polimer nanolifler

Hazır olarak temin edilen PAN polimeri DMF’de çözülerek %6, %8, %10 derişimlerde PAN/DMF çözeltileri hazırlanmıştır. PAN polimeri için %6 derişimde hazırlan çözeltilerin elektro-eğirilmesi sırasında lif oluşumunda süreklilik gözlenmemiştir. %6 çözeltilerin derişimine ait eğirme işlemi sırasında hazırlanan farklı proses parametrelerindeki deneyler esnasında toplayıcı plaka yüzeyinde lif oluşumu gözlenmemiş, lekeler gözlemlenmiştir. Bu durum düşük derişimdeki PAN çözeltilerinin elektro-eğirme için uygun olmadığını göstermektedir. %10 derişimdeki çözeltilerin elektro-eğirilmesi ile üretilen polimer membranda yüksek yoğunlukta boncuklanma gözlenmiştir. Ayrıca çizelge 5.1’de görüldüğü üzere, çözeltilerin derişiminin artması lif çapını da büyük ölçüde artırdığı için PAN nanolif üretimi ve optimizasyonu için %8 derişimdeki PAN/DMF çözeltisi çalışılmıştır.

Çizelge 5.1 Farklı derişimlerdeki PAN polimer nanoliflerin çapları

Deney no	Çözelti derişimi (%)	Uygulanan voltaj (kV)	Ortalama lif çapı (nm)		
			Çözelti besleme hızı (ml/sa)		
			0,5	1	1,5
1	6	10	-	-	-
2	6	15	-	-	-
3	6	20	-	-	-
4	8	10	324	346	385
5	8	15	311	321	348
6	8	20	298	306	337
7	10	10	687	694	704
8	10	15	624	648	673
9	10	20	509	546	572

Sürekli yayınlar ile karşılaştırmalı olarak belirlenen ilk set deneylerde farklı proses (voltaj, toplayıcı mesafesi, besleme hızı) parametrelerinde PAN lifler üretilmiştir. 12 farklı deney parametresinde üretilen PAN membran yüzeylerde boncuk oluşumu, lif çapı ve standart sapma hesapları yapılmıştır. Çizelge 5.2 ve 5.3'te farklı deney koşullarında üretilen PAN membranlarda boncuk oluşumu, lif çapı ve standart sapmanın değişimi görülmektedir.

Çizelge 5.2 Farklı deney numaraları için belirlenen elektro-eğirme parametreleri

Deney no	Derişim %	Uygulanan voltaj (kV)	Toplayıcı mesafesi (cm)	Besleme hızı (ml/sa)
Pan-1	8	20	20	1,5
Pan-2	8	20	15	1,5
Pan-3	8	15	20	1,5
Pan-4	8	20	20	1
Pan-5	8	10	10	1
Pan-6	8	20	10	1
Pan-7	8	20	20	0,5
Pan-8	8	20	10	0,5
Pan-9	8	20	15	1
Pan-10	8	10	10	0,5
Pan-11	8	10	20	1
Pan-12	8	20	10	1,5

Çizelge 5.3 Farklı deney koşullarında %8 çözelti derişimindeki PAN örneğinin sonuçları

Deney no	Boncuk sayısı	Lif çapı (nm)	Std. Sapma
Pan-1	58	307	30
Pan-2	36	311	31
Pan-3	136	283	44
Pan-4	206	268	66
Pan-5	26	251	53
Pan-6	295	271	63
Pan-7	442	298	55
Pan-8	168	336	55
Pan-9	50	334	50
Pan-10	114	324	53
Pan-11	10	337	39
Pan-12	105	334	38

İlk set deneyler sonrasında, düşük boncuk oluşumu ve üniform boyut dağılımına (düşük standart sapma) sahip Pan-11 numunesine ait elektro-eğirme parametreleri, yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon için merkez proses değişkenleri olarak belirlenmiştir.

5.2 Yanıt yüzey yöntemi (RSM)

Deneysel tasarım Design Expert-6 yazılımı ile yapılmıştır. Ön denemeler sonucunda seçilen değişkenler (voltaj, toplayıcı mesafesi, besleme hızı) ve değişim aralıklarının belirlenmesi ile matematiksel bir model önerilmiştir.

Yazılım ile yapılan tasanmda lif çaplarının yanıt değişkenleri oluşturulmuştur. Elde edilen yanıt ile birlikte kullanılan kodlanmış ve gerçek değerler çizelge 5.3'te verilmiştir. Deney programının uygulanması ile 2. derece (quadratic) model önerilmiştir. RSM modelinin kullanılan sistem için uygun olduğu belirlenmiştir. En büyük ve en küçük yanıt değerleri (lif çapı) arasındaki oran 1,34'tür. Modelde bu oran 10'dan küçük olduğundan yanıt değerleri üzerinde bir matematiksel dönüşüm yapılması gerekmemektedir.

Çizelge 5.4 Deney Proses parametreleri ve elde edilen yanıt değerleri

Deney Numarası	A	B	C	Faktör-1 A: Voltaj (kV)	Faktör-2 B: Toplayıcı mesafesi (cm)	Faktör-3 C: Besleme hızı (ml/sa)	Yanıt Lif Çapı (nm)
1	-1	-1	-1	10	10	0,8	296,91
2	1	-1	-1	14	10	0,8	232,84
3	-1	1	-1	10	20	0,8	273,39
4	1	1	-1	14	20	0,8	232,03
5	-1	-1	1	10	10	1,2	301,33
6	1	-1	1	14	10	1,2	256,60

Çizelge 5.4 Deney Proses parametreleri ve elde edilen yanıt değerleri (devam)

7	-1	1	1	10	20	1,2	280,78
8	1	1	1	14	20	1,2	277,23
9	-1,68	0	0	8,64	15	1	277,89
10	1,68	0	0	15,36	15	1	224,98
11	0	-1,68	0	12	6,59	1	282,80
12	0	1,68	0	12	23,41	1	260,33
13	0	0	-1,68	12	15	0,66	241,70
14	0	0	1,68	12	15	1,34	270,51
15	0	0	0	12	15	1	248,76
16	0	0	0	12	15	1	245,60
17	0	0	0	12	15	1	254,26
18	0	0	0	12	15	1	259,30
19	0	0	0	12	15	1	271,42
20	0	0	0	12	15	1	280,92

Yanıt yüzey yönteminin doğruluğunun test edilmesi için modelin varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Yanıt değeri için elde edilmiş modelin varyans analiz sonuçlarından önemli olanlar çizelge 5.4 ile verilmiştir. Modelde F testi değeri $F = 6.11$ olduğu saptanmıştır, bu değer kullanılan modelin önemli olduğunu belirtmektedir. $Prob > F$ değerinin 0.05'ten küçük olması ilgili model parametrelerinin yanıt değeri üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu göstermektedir. ANOVA sonuçlarına göre voltaj ve besleme hızının lif çapına etkileyen önemli parametreler olduğu saptanmıştır.

Çizelge 5.5 Lif çapının belirlenmesinde kullanılan modelin ANOVA testi sonuçları

	F	Prob>F
Model	6,11	0.0046
A	32,16	0.0002
B	2,10	0.1777
C	9,12	0.0129
A2	0,13	0.7259
B2	3,89	0.0768
C2	0,03	0.8606
AB	3,81	0.0796

Çizelge 5.5 Lif çapının belirlenmesinde kullanılan modelin ANOVA testi sonuçları (devam)

AC	3,04	0.1117
BC	0,55	0.4731
Standart Sapma		11.58
R ²		0.8462
Adj R ²		0.7077

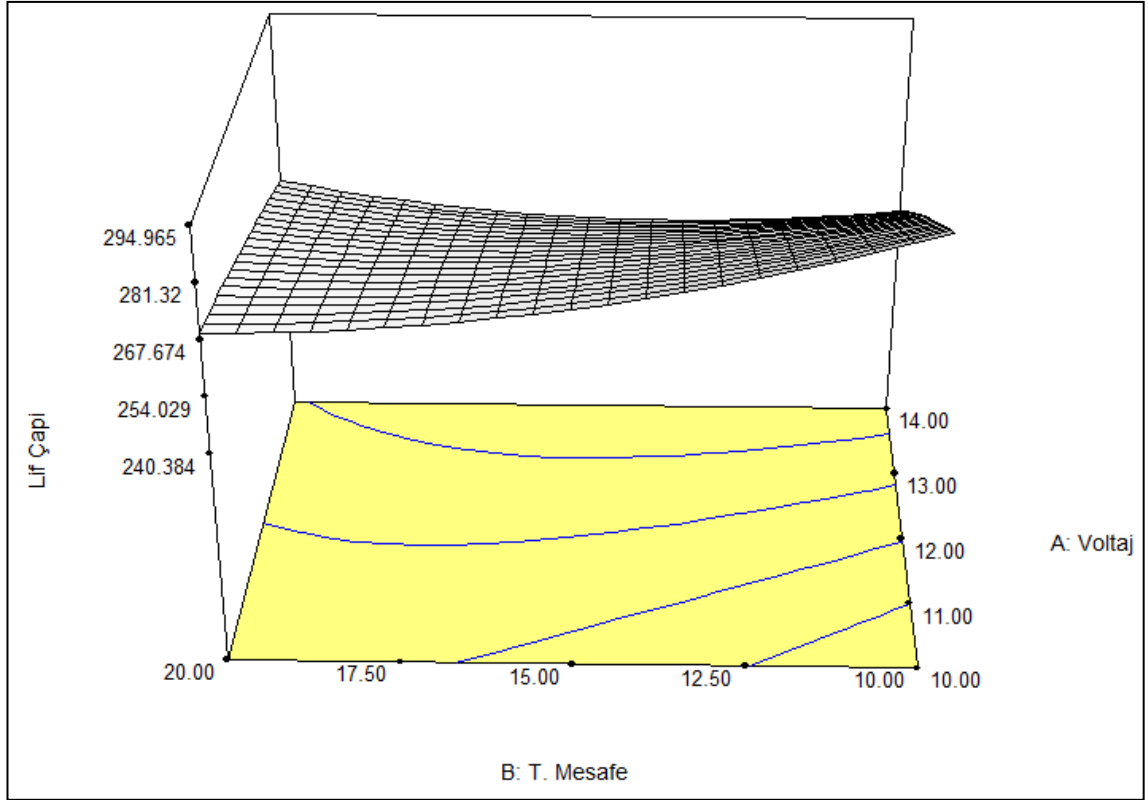
Bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin model tarafından ne şekilde ifade edildiği regresyon katsayısı olan R² değeri ile anlaşılmaktadır. Modelde R² değerinin 0.8462, R²_{adj} (ayarlanmış regresyon katsayısı) değerinin ise 0.7077 olduğu görülmüştür. Modelde doğru kesinlik (adequate precision) değeri yanıtın hataya oranını ölçmektedir ve bu değerin 4'ten büyük olması istenmektedir. Modeldeki doğru kesinlik değeri 8.488'dir.

Sonuç olarak lif çapının belirlenmesinde önerilen denklem eşitlik 1 ile kodlanmış değişkenler cinsinden verilmiştir.

$$\text{Lif Çapı} = +259.75 - 17.77*A - 4.54*B + 9.46*C - 1.10*A^2 + 6.02*B^2 + 0.55*C^2 + 7.9*A*B + 7.14*A*C + 3.05*B*C \dots\dots\dots (5.1)$$

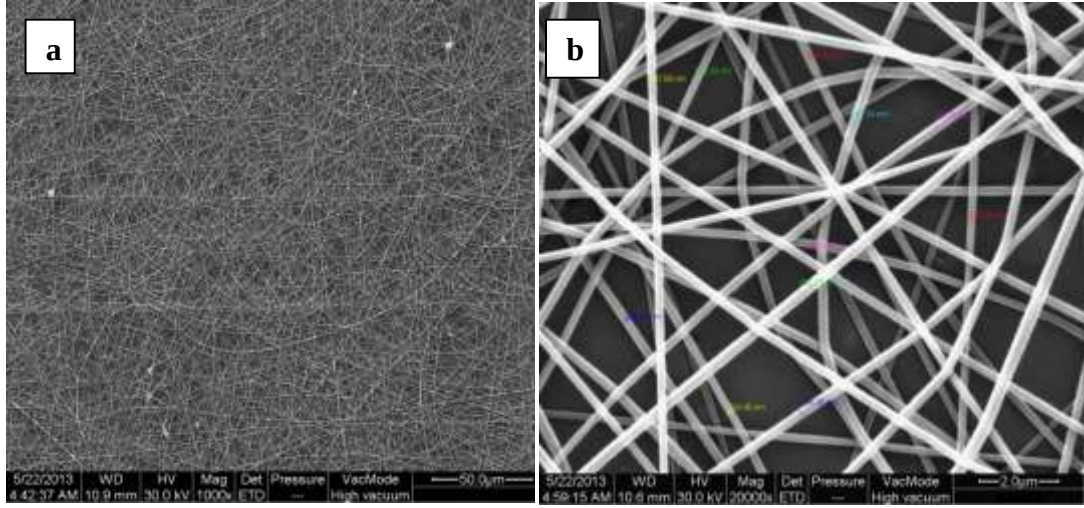
Denklem katsayılarına bakıldığında voltaj (A) ve toplayıcı mesafesinin (B) lif çapını azaltma yönünde, besleme hızının (C) ise lif çapını artırma yönünde etkisi olduğu görülmektedir.

Şekil 5.1'de, sabit besleme hızında lif çapının toplayıcı mesafesine ve uygulanan voltaja bağlı değişimini veren grafik görülmektedir.



Şekil 5.1 1 ml/sa sabit besleme hızında lif çapının toplayıcı mesafesine ve voltaja bağlı değişimi

Design Expert yazılımı ile hedef olarak belirlenen 250 nm lif çapını elde etmek amacı ile en uygun parametreler belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler voltaj, toplayıcı mesafesi ve besleme hızı için sırasıyla 13 kV, 18 cm ve 1 ml/saat değerleri kullanılmıştır. Deney tasarımıyla belirlenmiş olan yanıt değeri 250 nm dir. Deneysel yanıt değeri ise 256 nm olarak bulunmuştur. Lif çaplarının büyüklükleri 209-305 nm aralığındadır ve standart sapmaları 25.8 nm’dir. PAN nanoliflere ait SEM görüntüleri şekil 5.2’de görülmektedir.



Şekil 5.2 256 nm lif çapına sahip PAN nanoliflere ait SEM görüntüleri.

a. 1000X büyütme b. 20000X büyütme

5.3 PU Polimer Nano-lifler

Hazır olarak temin edilen PU polimeri DMF’de çözülerek %7, %10, %12, %16, %18 derişimlerde PU/DMF çözeltileri hazırlanmıştır. %7 ve %10 derişimlerde hazırlanan PU/DMF çözeltilerinin farklı proses parametrelerinde elektro-eğrilmesi sonucunda toplayıcı plaka üzerinde lif oluşumu gözlenmemiştir. Eğrilen membranlarda yüksek yoğunlukta boncuk oluşumu gözlemlenmiştir. %12 çözelti derişiminde çizelge 5.5’te görüldüğü üzere farklı elektro-eğirme parametrelerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

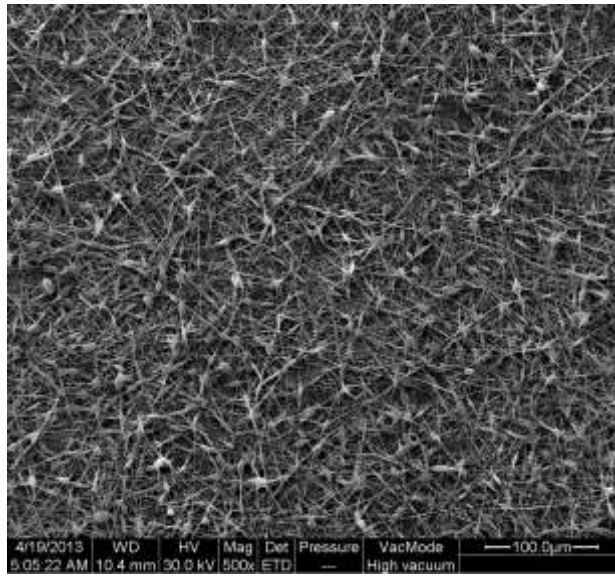
Çizelge 5.6 %12 PU/DMF çözelti derişiminde çalışılan elektro-eğirme parametreleri

Deney no	Derişim (%)	Uygulanan voltaj (kV)	Toplayıcı mesafesi (cm)	Besleme hızı (ml/sa)
PU-1	12	20	20	1
PU-2	12	20	20	2
PU-3	12	20	15	1
PU-4	12	20	15	2
PU-5	12	24	15	1
PU-6	12	24	15	2
PU-7	12	15	20	1
PU-8	12	15	20	2

Çizelge 5.6 %12 PU/DMF çözelti derişiminde çalışılan elektro-eğirme parametreleri (devam)

PU-9	12	15	15	1
PU-10	12	15	15	2
PU-11	12	24	20	1
PU-12	12	24	20	2

Çözelti derişiminin %12'ye artması sonucunda şekil 5.1'de görüldüğü üzere lif oluşumu gözlenmiştir fakat yüksek yoğunlukta boncuk oluşumu devam etmektedir.



Şekil 5.3 PU-10 numunesine ait SEM görüntüsü

Son olarak Çizelge 5.6'da verilen elektro-eğirme parametrelerinde %16 ve %18 PU/DMF derişimlerdeki çözeltiler eğirilmiştir. Üretilen PU membranlar elektron mikroskobu altında görüntülenmiştir ve %16 derişim'de 500-1400 nm aralıkta lif çapına sahip membranlar oluştuğu gözlenmiştir. Benzer şekilde %18 derişimde üretilen membranlar analiz edildiğinde ise lif çapının 1500-2600 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. Çözelti derişiminin artması lif çapını artırmıştır. Bu gözlem süreli yayınlar ile uyumludur, ancak lif çaplarının geniş bir aralıkta dağılım göstermesi PU/DMF sistemi için lif çapı optimizasyonunu zorlaştırmaktadır. Yüksek çözelti

derişimi PU lif oluşumunu sağlamıştır fakat geniş boyut dağılımı elektro-eğirme parametrelerinin lif çapına olan etkisinin incelenmesine olanak vermemiştir.

Çizelge 5.7 %16-18 çözelti derişimlerinde PU polimeri elektro-eğirme parametreleri

Deney no	Derişim (%)	Uygulanan voltaj (kV)	Toplayıcı mesafesi (cm)	Besleme hızı (ml/sa)
PU-1	16, 18	18	15	0,5
PU-2	16, 18	18	20	0,5
PU-3	16, 18	21	15	0,5
PU-4	16, 18	18	15	1
PU-5	16, 18	18	20	1
PU-6	16, 18	21	20	1
PU-7	16, 18	21	20	0,5

Sheikh vd. (2011) gerçekleştirdikleri çalışmada bakır nanoparçacık içerikli, antimikrobiyal PU nanolifleri elektro-eğirme yöntemiyle üretmişlerdir. Bakır nanoparçacıklar elektro-eğirme işlemi öncesinde PU/DMF çözeltisi içerisine yerleştirilmiştir ve bakır nanoparçacık derişiminin üretilen membranın antimikrobiyal özeliği üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, üretilen PU membranlarının benzer şekilde farklı lif çaplarında, geniş boyut dağılımında üretildiği gözlenmiştir.

5.4 PAN polimer nano-parçacıklar

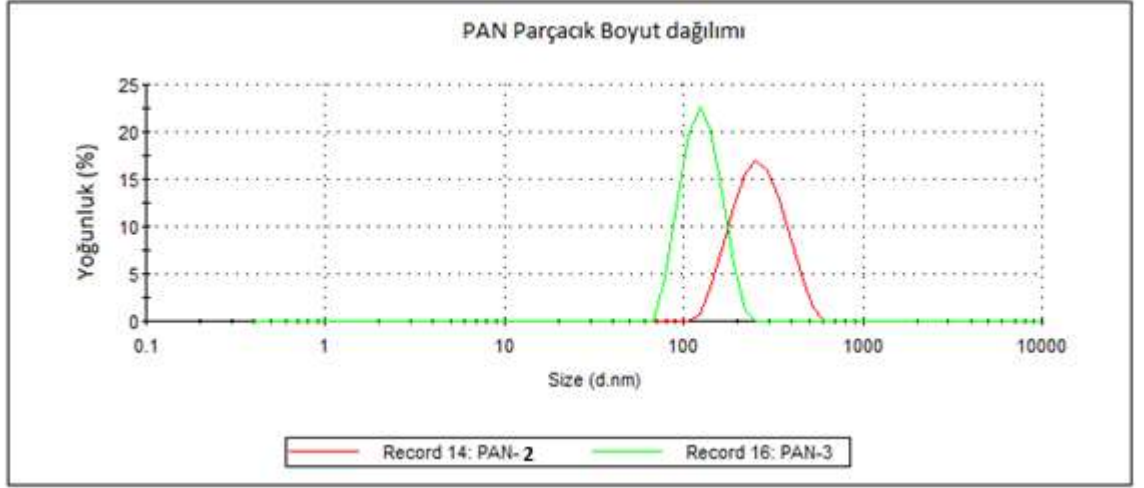
PAN polimer nanoparçacık sentezi çizelge 5.6'da görüldüğü gibi üç farklı deney koşulunda gerçekleştirilmiştir. Sabit monomer derişiminde PAN nanoparçacık sentezine yüzey aktif madde (SDS) miktarının etkisi incelenmiştir.

Çizelge 5.8 PAN nanoparçacık sentezi için hazırlanan deney setleri ve DLS sonuçları

Numune	Monomer (g)	Yüzey aktif maddesi (g)	Tepkime başlatıcı (g)	Parçacık Çapı (nm)	Parçacık boyut dağılım indeksi (PDI)	Zeta pot.
PAN-1	AN (6) HD (0,25)	SDS (0,96)	V59 (0,1)	Tepkime gözlenmedi	Tepkime gözlenmedi	
PAN-2	AN (6) HD (0,25)	SDS (0,48)	V59 (0,1)	249	0,113	9,3
PAN-3	AN (6) HD (0,25)	SDS (0,12)	V59 (0,1)	122	0,025	12,5

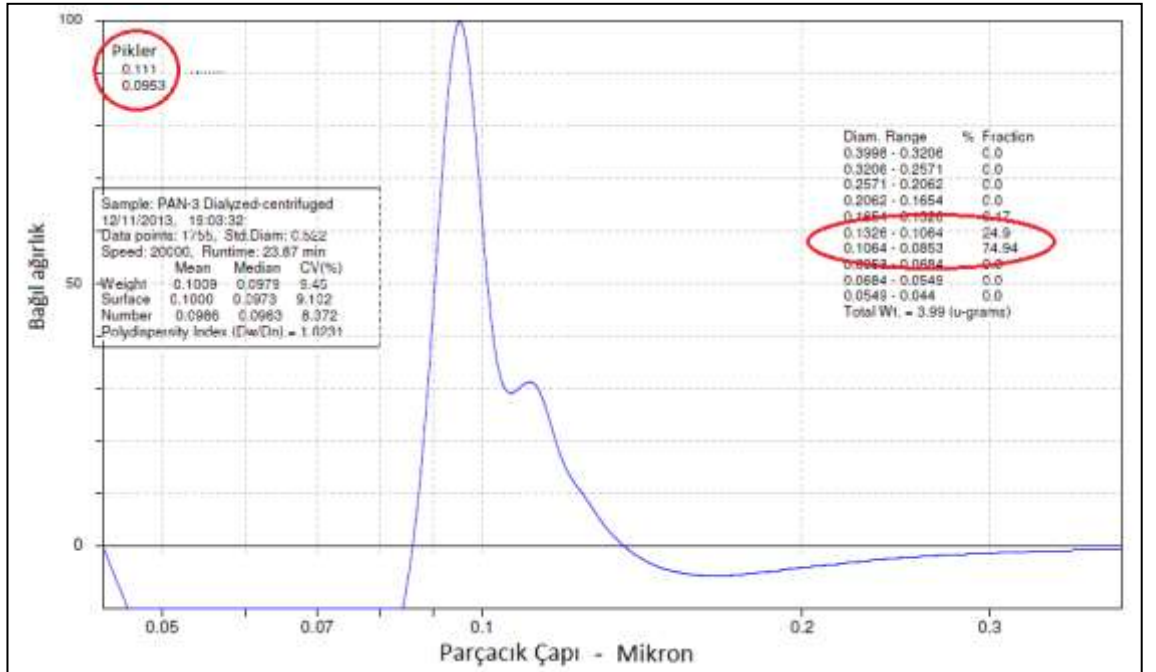
Çizelge 5.8’de görüldüğü üzere yüzey aktif madde miktarının 0,96 g olduğu deney düzeneğinde tepkime olmamıştır. Buna neden olarak, artan SDS miktarının deney karışımı içerisindeki misel oluşumunu artırması ve bu nedenle sistemin kritik misel derişimini aşarak tepkimeyi engellemesidir. Düşük derişimdeki yüzey aktif madde miktarı tepkime sonunda oluşan parçacıkların üniform boyut dağılımında olmasını sağlamaktadır. Deney sisteminde, kritik misel derişiminin altında, artan SDS miktarı miniemiülsiyon ortamda geniş boyut dağılımında misel oluşumuna neden olmaktadır. Dolayısıyla misel yapılar içerisinde tepkime sonucu oluşacak parçacıkların boyut dağılım indeksi de yüksek olmaktadır.

Şekil 5.4’te görüldüğü üzere PAN-2, PAN-3 örneğine göre daha geniş bir boyut dağılımına sahiptir.



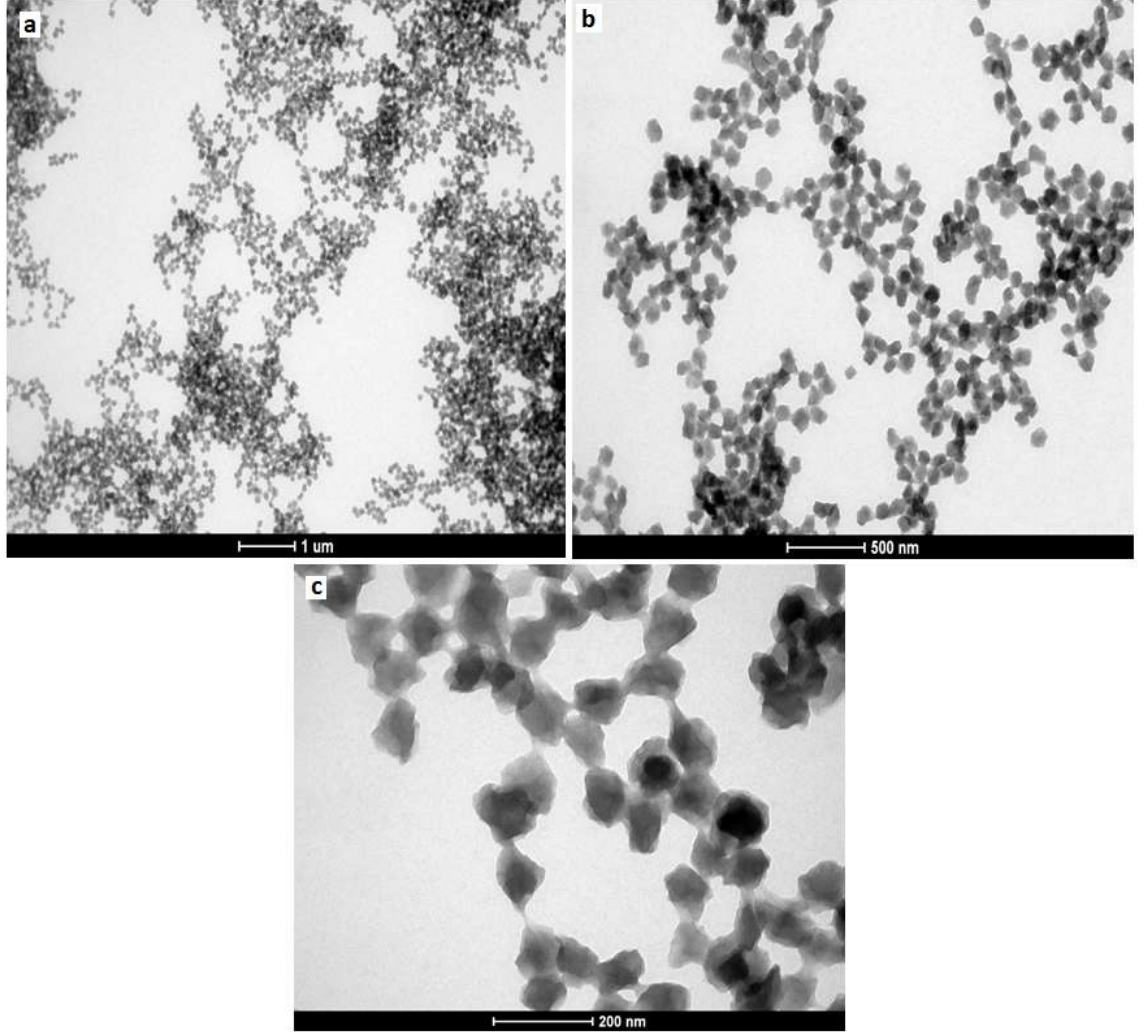
Şekil 5.4 PAN-1 ve PAN-3 örneklerinin DLS analizi

PAN-3 örneğinin boyut dağılımıyla ilgili daha güvenilir sonuçlar DCS analizi ile elde edilmiştir. Bu yöntemle agrege parçacıklar birbirinden ayrılarak parçacık boyut dağılımı ile ilgili daha detaylı veriler elde edilmektedir.



Şekil 5.5 PAN-3 örneğinin DCS analizi

DCS analizi sonuçlarından, PAN-3 örneğinin 111nm ve 95 nm olmak üzere iki temel pik verdiği görülmektedir (şekil 5.5). Örnek içerisindeki parçacıkların %75'i 95 nm ve %25'i 111 nm büyüklüktedir. Sonuç olarak PAN-3 nanoparçacıkların ortalama büyüklükleri $(0,75 \times 95) + (0,25 \times 111) = 99 \text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.6 a. 1µm skala, b. 500 nm skala, c. 200 nm skala da PAN-3 numunelerinin görüntüleri

Şekil 5.6’da farklı büyütme oranlarında PAN-3 örneklerinin TEM analiz görüntüleri verilmiştir. Ayrıca şekil 5.5’te agrega yapıdaki PAN nanoparçacıkları görülmektedir.

5.5 PU Polimer Nano-parçacıklar

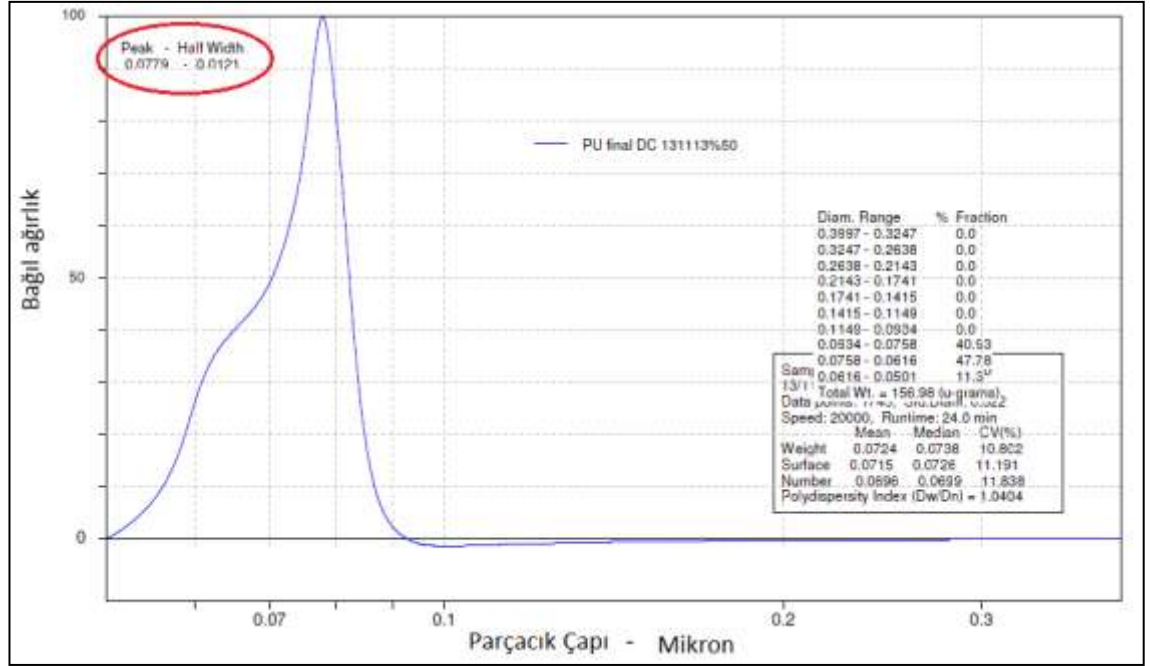
PU polimer nanoparçacık sentezi çizelge 5.9’da görüldüğü gibi üç farklı deney koşulunda gerçekleştirilmiştir. Sabit monomer derişiminde PAN nanoparçacık sentezine yüzey aktif madde (SDS) miktarının etkisi incelenmiştir.

Çizelge 5.9 PU nanoparçacık sentezi için hazırlanan deney setleri ve DLS sonuçları

Numune	Monomer (g)	Yüzey aktif maddesi (g)	Parçacık Çapı (nm)	Parçacık boyut dağılım indeksi (PDI)	Zeta pot.
PU-1	IPDI (3,4) Di-ol (3) HD (0,2)	SDS (0,5)	283	0,32	9,3
PU-2	IPDI (3,4) Di-ol (3) HD (0,2)	SDS (0,25)	312	0,24	10,6
PU-3	IPDI (3,4) Di-ol (3) HD (0,2)	SDS (0,1)	261	0,2	8,4

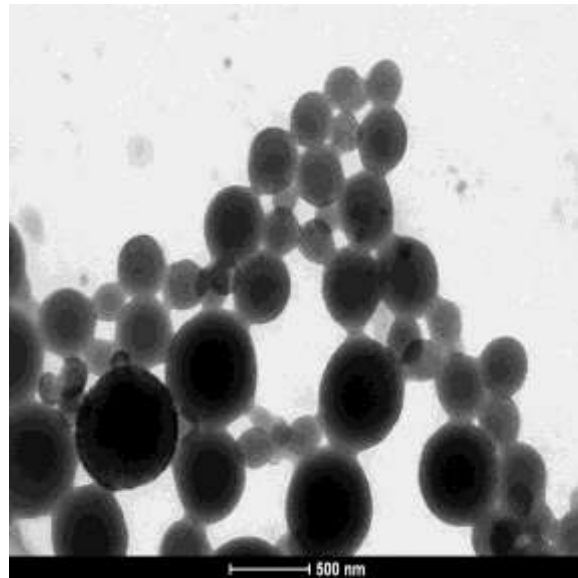
Çizelge 5.9’da görüldüğü üzere SDS miktarı arttıkça PU nanoparçacıkların boyut dağılımı da artmaktadır. Buna neden olarak artan yüzey aktif madde misel oluşumunu artırmaktadır ve dolayısıyla yüzey etkileşimleri sonucunda farklı büyüklüklerde miseller oluşmaktadır. Boyut dağılım indeksi çok büyük olduğundan, DLS sonuçlarının parçacık büyüklüğü ile ilgili verdiği bilgiler yanıltıcı olabilmektedir. Parçacık büyüklüğü ile ilgili doğru yorum DCS sonuçlarından yapılabilmektedir.

PDI değeri 0,05’ten küçük olduğu takdirde DLS sonuçları anlamlı olmamaktadır. Bu sonuçlardan PU nanoparçacıkların çok geniş bir boyut dağılımına sahip olduğu söylenebilir. Bu duruma PU nanoparçacıkların agregasyonu sebep olmaktadır. Agregat olmuş büyük yapılar DLS analizinde tek bir büyük parçacık olarak okunmaktadır.



Şekil 5.7 PU-3 numunesi DCS analiz sonucu

DCS analizinden PU-3 örneğinin ortalama parçacık çapının 78 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7). Yüksek agregasyon potansiyelleri nedeniyle PU nanoparçacıklar topaklanma göstermektedir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8 500 nm skalada PU nanoparçacıklarının görüntüsü

5.6 Vücut Dışı (in-vitro) Sitotoksosite Deneyleri

PAN nanolif, PAN nanoparçacık ve PU nanoparçacık örnekleri, TS EN ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi-Bölüm 5: Vücut Dışı Sitotoksosite Deneyleri) standardına uygun hazırlanmıştır ve MTT sitotoksosite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme işlemi sonrasında PU nanolifler toplayıcı plaka üzerine yapışmıştır ve plaka üzerinden ayrılırken membran yapısı kopmuş ve dağılmıştır. Bu nedenle PU nanolif örneklerine sitotoksosite testleri uygulanmamıştır.

MTT sitotoksosite deneyleri sonrasında her bir örnek için okunan absorbans değerleri kullanılarak % canlılık değerleri eşitlik 5.1 yardımıyla hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısındaki azalma örneğin metabolik aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır. Bu azalma, 570 nm’de optik yoğunluk olarak okunan, mavi-mor renkte oluşan formazan miktarıyla doğrudan ilişkilidir.

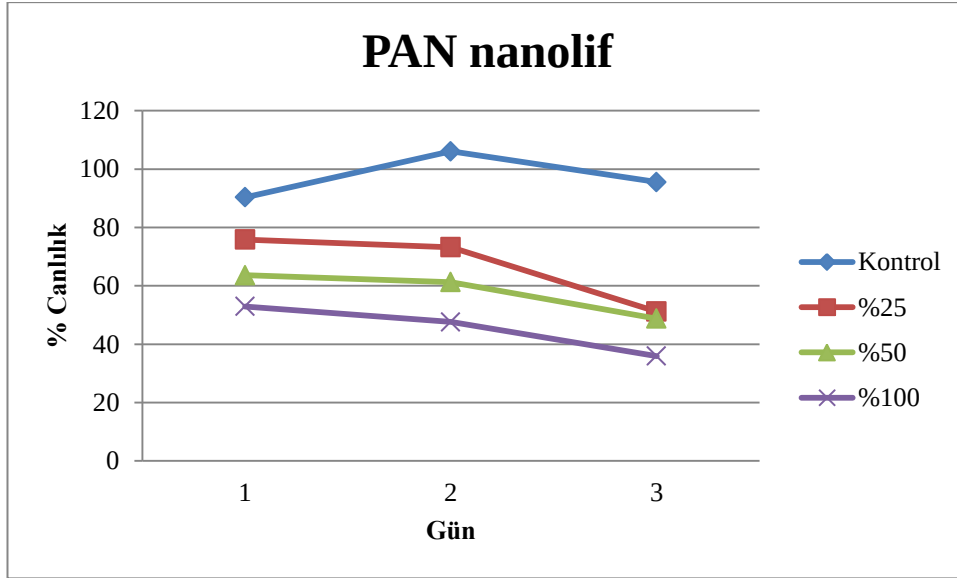
$$\% \text{ canlılık} = \frac{OD_{570e}}{OD_{570b}} \times 100 \quad (5.2)$$

Burada OD_{570e} değeri, özütlerin ölçülen optik yoğunluğunun ortalama değerini ve OD_{570b} değeri ise kontrol numunelerin ölçülen optik yoğunluğunun ortalama değerini vermektedir. Okunan absorbans değerleri ve % canlılık değeri için örnek bir hesaplama EK 1’de verilmiştir.

% canlılık değeri azaldıkça polimerin sitotoksik potansiyeli artmaktadır. Canlılık, kontrol numuneden elde edilen değerlerin %70’nin altındaysa, deney örneğinin sitotoksik potansiyelinin olduğu kabul edilmektedir. Örneğin %50 özütü, %100 özütü en azından aynı veya daha yüksek bir canlılık gösterdiğinde sonuçlar anlamlı olmaktadır (Anonim 2010).

Örnekler arasında en yüksek sitotoksosite değeri PAN nanoliflerde gözlenmiştir. Şekil 5.9’da PAN nanolif örneklerine ait % canlılık değerlerinin 1, 2 ve 3. günlerde değişimi

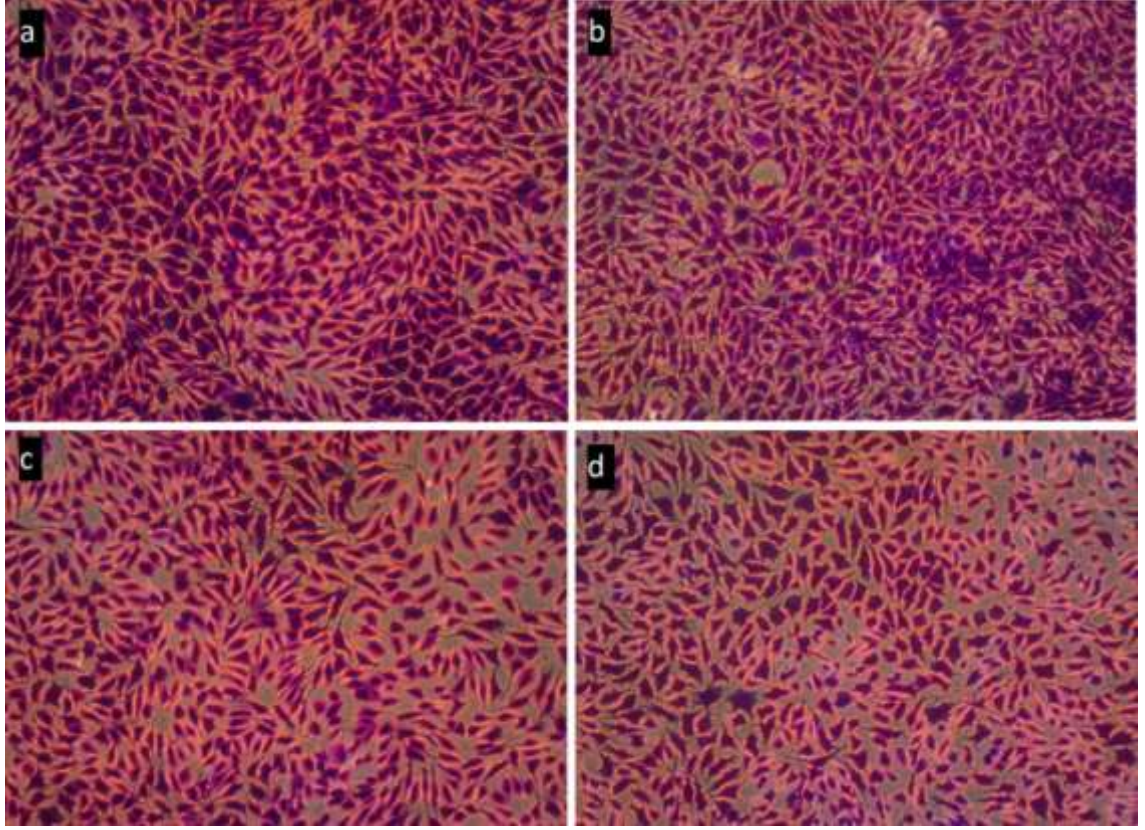
görülmektedir. 3. güne ait %100 özüt, %36 canlılık seviyesi ile en yüksek sitotoksiteye sahiptir. PAN nanoliflerin zamanla ve özüt derişiminin artmasıyla sitotoksik potansiyeli artmakta ve %50 özütü, %100 özütten daha yüksek bir canlılık göstermektedir.



Şekil 5.9 PAN nanolif %25, %50, %100 özüt ve kontrol numunesi canlılık değerleri

Bu sonuçlar PAN polimerinin nanolif yapıda yüksek sitotoksik potansiyele sahip olduğunun bir kanıtıdır.

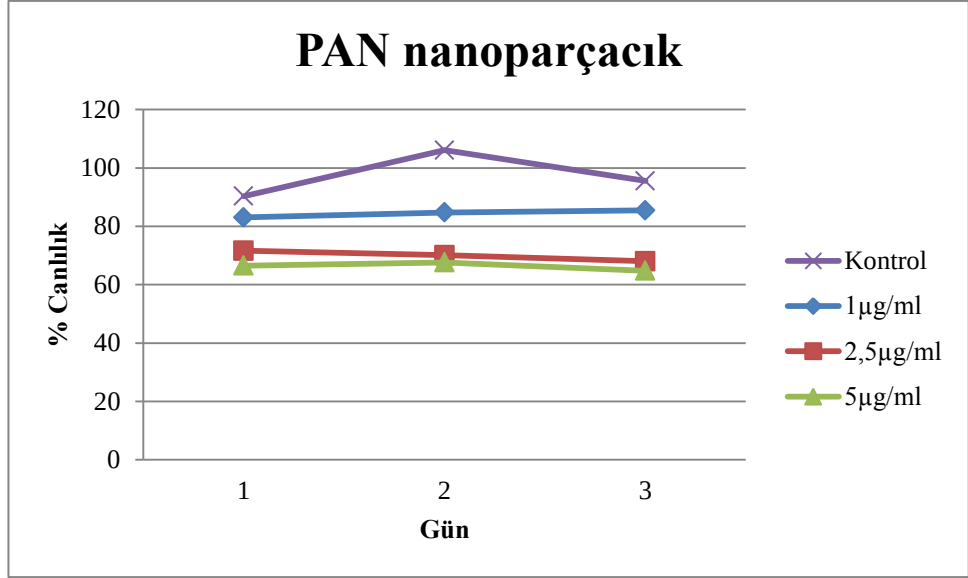
L929 fibroblast hücrelerinin ekstrakt derişimine bağılı olarak morfolojilerindeki değışim şekil 5.10'da verilmiştir. Hücre ölümünün ve morfolojik bozulmanın en fazla %100 özüt derişiminde olduğu görülmektedir.



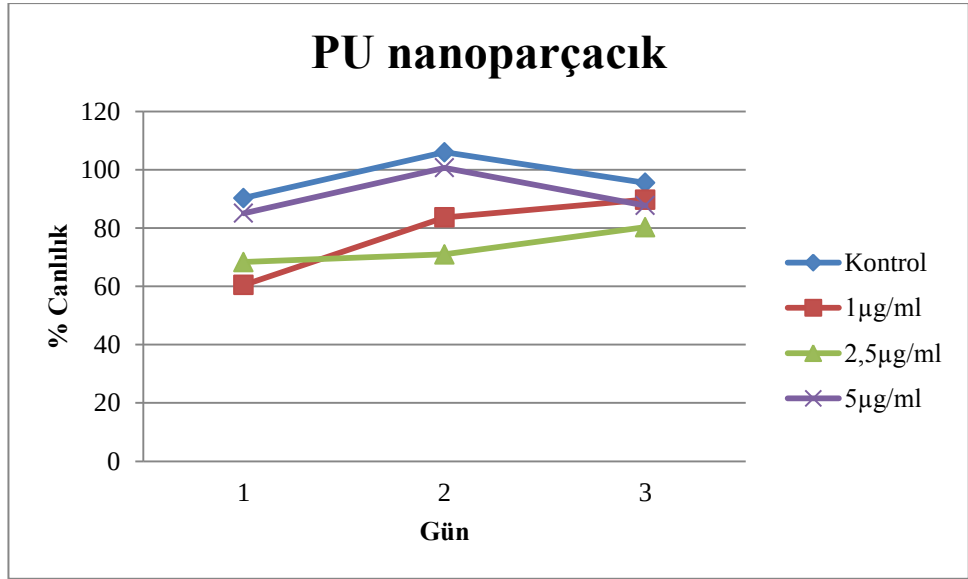
Şekil 5.10 Üç günlük inkübasyon ardından kristal viyole ile boyanmış L929 fibroblast hücreleri (X10)
a. kontrol (%0 özüt), b. %25 PAN nanolif özütü, c. %50 PAN nanolif özütü, d. %100 PAN nanolif özütü

PAN nanoparçacıklarına ait sitotoksikite sonuçları incelendiğinde, özüt derişiminin artmasıyla sitotoksik potansiyeli artmakta ve %2.5µg/ml örnek, 5µg/ml örneğe kıyasla daha düşük sitotoksik potansiyele sahiptir. Bu durum TS EN ISO 10993-5 standardı kapsamında deney sonuçlarının anlamlı olduğunu göstermektedir. Farklı günlerde % canlılık değerlerinde belirgin bir değişim gözlenmemektedir. Bu duruma neden olarak PAN nanoparçacıkların agreve olmaları gösterilebilir (Şekil 5.11).

Sonuçlar değerlendirildiğinde PAN nanoparçacıklarının nanoliflere kıyasla daha düşük sitotoksik potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durumun nedeni agreve olan PAN nanoparçacıkların topaklanarak yığınlar oluşturmaları ve “nano” büyüklüğü kaybetmesi olarak gösterilebilir.



Şekil 5.11 PAN nanoparçacık 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml ve kontrol numunesi canlılık değerleri



Şekil 5.12 PU nanoparçacık 1µg/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml ve kontrol numunesi canlılık değerleri

PU nanoparçacıklarına ait sitotoksikite sonuçları incelendiğinde, özüt derişiminin artmasıyla sitotoksik özelliklerinde genel bir artış gözlenmektedir ancak %2,5µg/ml örnek, 5µg/ml örnekten daha düşük bir canlılık göstermektedir. Bu durumda deney sonuçları PU nanoparçacıklar için anlamlı değildir. Bunun temel nedeni agrege olan PU

nanoparçacıkların büyük topaklanmalar oluşturmalarıdır. Parçacık boyut dağılımı geniş aralıkta değişmesi nedeni ile nanoparçacık yapısının sitotoksik potansiyele etkisi net bir şekilde belirlenememiştir (Şekil 5.12).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Elektro-eğirme yöntemiyle üretilen PAN nanolifler RSM yöntemiyle optimize edilerek 250 nm çap büyüklüğünde üretilmiştir.
- PU nanolifler 400-1000 nm boyut aralığında elde edilmiştir.
- PAN nanoparçacıklar mini-emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle 99 nm büyüklükte sentezlenmiştir.
- PU nanoparçacıklar 78 nm büyüklükte mini-emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir.
- Üretilen nano büyüklükteki polimerlere MTT sitotoksosite deneyleri uygulanmıştır.
- Sitotoksosite deneyleri sonucunda PAN nanolif özütlerinin uygulandığı L929 fibroblast hücre hatlarında canlılığın %36 seviyelerine düştüğü gözlenmiştir.
- PAN nanoparçacık özütünün uygulandığı hücre hatlarında canlılığın %60 seviyelerine düştüğü gözlenmiştir.
- Farklı üretim teknikleri ile üretilen PAN parçacık ve liflerin önemli derecede sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.
- Hızla gelişen nanoteknoloji uygulamaları ve bu uygulamaların ürünü nanomalzemeler güvenli kullanılmalıdır. Ancak bu sayede nanoteknolojiden sürdürülebilir ve güvenli bir şekilde faydalanabiliriz.
- Güvenli nanoteknoloji çalışmaları sonucunda elde edilen veriler çalışılan nanomalzemenin güvenli üretimi ve kullanımı için referans olacaktır. Bu sayede nanomalzemenin insan ve çevre için olası zararlı etkileri en düşük seviyeye indirilecektir ve malzemenin güvenli kullanımı sağlanacaktır.
- Nanomalzemelerin zararlı etkileri belirlenerek çalışanların ilk basamakta yer aldığı kullanım döngüleri boyunca güvenlik önlemleri alınmalıdır.
- Nanomalzemeler için kişisel maruziyet sınır değerleri oluşturulmalıdır. Bu sayede nanomalzemelerin üretim aşamasında, çalışanların sınır değer üzerinde maruziyet yaşamaması için önlemler alınabilir.

- Türkiye’de, nanomalzeme üreten veya kendi üretiminde kullanan firmalarda çalışanların maruz kaldığı riskleri değerlendirebilmek amacıyla İSGÜM bünyesinde nanoteknoloji ölçüm, test ve analiz laboratuvarı kurulmalıdır.
- Nanomalzemelere yönelik özel sağlık ve güvenlik önlemleri içeren yasal mevzuat hazırlanmalıdır.
- Dünyada büyük önem arz eden ve hızla gelişen güvenli nanoteknoloji konusu ülkemizde de gündeme getirilmeli ve işyerlerinin bu konuda bilinçlendirilmesi sağlanmalıdır.
- Güvenli nanoteknoloji; toksikoloji, mühendislik ve iş hijyenini kapsayan disiplinler arası bir konudur. Üniversiteler, enstitüler ve diğer paydaşlarla kurulacak ulusal ve uluslararası işbirlikleri bu konunun ülkemizde anlaşılması ve bu konuda bilimsel araştırmaların teşvik edilmesi adına önemlidir.
- Ülkemizde İSG alanında henüz yeni olan ve İSG açısından önemi henüz tam olarak anlaşılamayan nanoteknoloji kaynaklı risklerin araştırılması ve değerlendirilmesi gelecekte karşımıza çıkabilecek olası daha büyük İSG sorunlarının önlenmesi adına önemlidir. Asbest örneğinde olduğu gibi.
- MTT sitotoksikite deneyleri sonucunda PAN nanoliflerin sitotoksik potansiyele sahip olduğu görülmüştür.
- Literatürde yığın halde toksik olarak kabul edilen PAN polimeri nano büyüklükte de toksik potansiyele sahiptir ve biyomedikal uygulamalar için uygun değildir.

KAYNAKLAR

- Alexandra, K., Mike, P., Daniela, H., Jürgen, S. 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 370-377.
- Anonim. 2004. Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları, 2003-2023 Strateji Belgesi. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Türkiye.
- Anonymous. 2004. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties, The Royal Society, Londra.
- Anonymous. 2007. Nano Risk Framework, Environmental Defense—DuPont Nano Partnership.
- Anonymous. 2009. Approaches to Safe Nanotechnology, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), ABD.
- Anonymous. 2009. Types and uses of nanomaterials, including safety aspects. COM 572 final, Avrupa komisyonu, Brüksel.
- Anonymous. 2010. Nanotechnologies part-3: Guide to assessing airborne exposure in occupational settings relevant to nanomaterials. British Standards Institution (BSI), Kasım, 6699-3.
- Anonymous. 2011. National Activities On Life Cycle Assessment Of Nanomaterials, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).
- Anonymous. 2011. Impact of Engineered Nanomaterials on Health: Considerations for Benefit-Risk Assessment, European Commission, Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), İtalya.

Anonymous. 2012. Review of literature on toxicological and health-effects relating to six nanomaterials. Australian Centre for Human Health Risk Assessment, Australia.

Anonymous. 2013. Protecting The Nanotechnology Workforce, NIOSH Nanotechnology Research and Guidance Strategic Plan. National Institute of Occupational Health and Safety (NIOSH).

Anonymous, 2014. Web Sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aerosol>. Erişim Tarihi, 25.02.2014

Anonymous, 2014. Web Sitesi: <http://www.taek.gov.tr/malzeme-teknolojisi/595-taramali-elektron-mikroskobu-sem-nasil-calisir.html>. Erişim Tarihi, 27.02.2014

Anonymous, 2014a. Web Sitesi: http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx?gclid=CP6a2_OX2b4CFZShtAodf1IASQ. Erişim tarihi. 02.03.2014

Anonymous, 2014b. Web Sitesi: <http://www.ucd.ie/cbni/aboutus/core-technologies/cps-disc-centerfuge/>. Erişim tarihi. 02.03.2014

Asbach, C., Kaminski, H., Barany, D.V., Kuhlbusch, T.A.J, Monz, C., Dziurawitz, N., Perlzer, J., Vossen, K., Kiesling, H.J., Schierl, R., Dahmann, D. 2012. Comparability of portable Nanoparticle Exposure Monitors. Annals of Occupational Hygiene, 56,5, 606-621.

Babaarslan, E., Karabulut, M., Algan, S., Karadoğan, E.T., Ertekin, İ. 2013. Nanoteknoloji alışma Grubu Almanya İş Sağlığı Ve Güvenliği Enstitüsü (İFA)

Çalışma Ziyareti Raporu. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı/ İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitü Müdürlüğü, Türkiye.

Broouwer, D., Berges, M., Abbas, M., Fransman, W., Bello, D., Hodson, L., Gabriel, S., Tielemans, E. 2011. Harmonization of Measurement Strategies for Exposure to Manufactured Nano-Objects; Report Of Workshop. Annals of Occupational Hygine, 10.1093, 1-9.

Delosc, M., Arrasa, M., Fonsecab, A., Nagy, J.B., Lison, D. 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Toxicology and Applied Pharmacology, 207, 221– 231.

Ismail, A.F., Rahman, M.A., Mustafa, A., Matsuura, T. 2008. The effect of processing conditions on a polyacrylonitrile fiber produced using a solvent-free free coagulation process. Materials Science and Engineering, 485, 251–257.

Karakeçili, A., Arıkan, A. 2012. Preparation of Chitosan-Nanohydroxyapatite composite scaffolds by a supercritical CO₂ assisted process. Polymer Composites, 33, 1215-1223.

Lai, C., Zhong, G., Yue, Z., Chen, G., Zhang, L., Vakili, A., Wang, Y., Zhu, L., Liu, J., Fong, H. 2011. Investigation of post-spinning stretching process on morphological, structural, and mechanical properties of electrospun polyacrylonitrile copolymer nanofibers. Polymer, 52, 519-528.

Lithner, D., Larsson, A., Dave, G. 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Science of the Total Environment, 409, 3309–3324.

Milunovich, S., Roy, J.M.A. 2011. The Next Small Thing: An Introduction To Nanotechnology. Merrill Lynch & Co., 6.

- Mullera, J., Huauxa, F.O., Moreaub, N., Missona, P., Heiliera,J-F,O., Musyanovych, A., Dausend, J., Dass, M., Walther, P., Mailander, V., Landfester, K. 2011. Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia*, 7, 4160-4168.
- Myojo, T., Ogami, A., Oyabu, T., Morimoto, Y., Hirohashi, M., Murakami, M., Nishi, K., Kadoya, C., Tanaka, I. 2010. Risk assessment of airborne fine particles and nanoparticles”, *Advanced Powder Technology*, 21, 507–512
- Nataraj, S.K., Yang, K.S., Aminabhavi, T.M. 2012. Polyacrylonitrile based Nanofibers- A State of the art review. *Progress in Polymer Science*, 37, 487-513.
- Olgunsoy, S., IŞIK K. Z., Erol M. E. 2009. Bitki ve meyve kaplama amaçlı nanolif ağ (nanoweb) oluşturma sisteminin tasarlanması, uygulaması ve etkilerinin incelenmesi. Lisans bitirme projesi. İstanbul teknik Üniversitesi, Tekstil teknolojileri ve tasarımı fakültesi, İstanbul.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N., 2006a. Lotus Etkili Yüzeyler. *Tekstil Ve Konfeksiyon Dergisi*, 16(1):287-290, 2006b. Nanoteknoloji Ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil Ve Konfeksiyon*, 16(3):159-163.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.
- Sanchez, V.C., Jachak, A., Hurt, R.H., Kane A.B. 2011 Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chemical Research in Toxicology*.

- Schulte, P.A., Geraci, C.L., Murashov, V., Kuempel, E.D., Zumwalde, R.D., Castranova, V., Hoover, M.D., Hodson, L., Martinez, K.F. 2013. Occupational Safety and Health Criteria for Responsible Development of Nanotechnology. *J Nanopart Res*, 16, 2153.
- Sheikh, F.A., Kanjwal, M.A., Saran, S., Chung, W-J., Kim, H. 2011. Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials. *applied surface science*, 257, 3020-3026.
- Som, C., Wick, P., Krug, H., Nowack, B. 2011. Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings. *Environment International*, 37, 1131–1142.
- Yördem, O.S., Papila, M., Menceloğlu, Y.Z. 2008. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. *Materials and Design*, 29, 34-44.
- Yu, D.G., Williams, G.T., Gao, L.D., Bligh, S.W.A., Yang, J.H., Wang, X. 2012. Coaxial electrospinning with sodium dodecylbenzene sulfonate solution for high quality polyacrylonitrile nanofibers. *Colloids and Surfaces*, 396, 161– 168.
- Zalk, D.M., Paik, S.Y., Swuste, P. 2010. Evaluating the Control Banding Nanotool: a qualitative risk assessment method for controlling nanoparticle exposures. *J Nanopart Res*, 11, 1685–1704.
- Zhu, M-T., Wang, B., Wang, Y., Yuan, L., Wang, H-J., Wang, M., Ouyang, H., Chai, Z-F., Feng, W-Y., Zhao, Y-L. 2011. Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: Risk factors for early atherosclerosis. *Toxicology Letters*, 203, 162–171.

EKLER

EK 1 Deney numunelerinin hesaplanan % canlılık değerleri

EK 2 MTT Analizi Deney Talimatı

Ek 3 Kristal Viyole İle Boyama

EK 1 Deney numunelerinin hesaplanan % canlılık değerleri

		1. Gün						2. Gün						3. Gün					
		1. kuyu	2. kuyu	3. kuyu	Ortala ma	S. Sapm a	% Canlılı k	1. kuyu	2. kuyu	3. kuyu	Ortala ma	S. Sapm a	% Canlılı k	1. kuyu	2. kuyu	3. kuyu	Ortala ma	S. Sapm a	% Canlılı k
PAN Lif	0:100	0,672	0,735	0,703	0,7035	0,0315	90,31	0,815	0,75	0,85	0,805	0,051	106,06	0,881	0,843	0,818	0,847	0,032	95,53
	25:75	0,717	0,591	0,465	0,591	0,126	75,87	0,814	0,277	0,576	0,556	0,269	73,21	0,455	0,546	0,360 5	0,454	0,093	51,16
	50:50	0,555	0,433	0,499	0,496	0,061	63,63	0,67	0,456	0,558	0,465	0,107	61,26	0,607	0,397	0,293	0,432	0,160	48,74
	100:0	0,503	0,372	0,362	0,412	0,079	52,93	0,361	0,447	0,276	0,361	0,086	47,61	0,301	0,23	0,425	0,319	0,099	35,93
PAN Parça cık	1µg/ ml	0,72	0,642	0,578	0,647	0,071	83,01	0,804	0,812	0,674	0,643	0,077	84,72	0,673	0,764	0,837	0,758	0,082	85,46
	2,5µg/ ml	0,586	0,517	0,571	0,558	0,036	71,63	0,653	0,774	0,564	0,532	0,105	70,09	0,616	0,684	0,51	0,603	0,088	68,02
	5µg/ ml	0,464	0,497	0,594	0,518	0,0675 75	66,54	0,534	0,563	0,443	0,513	0,063	67,63	0,68	0,531	0,513	0,575	0,092	64,79
PU Parça cık	1µg/ ml	0,379	0,442	0,593	0,471	0,110	60,50	0,591	0,707	0,607	0,635	0,063	83,66	0,789	0,879	0,71	0,793	0,085	89,36
	2,5µg/ ml	0,675	0,446	0,476	0,532	0,124	68,34	0,628	0,546	0,443	0,539	0,093	71,01	0,664	0,758	0,715	0,712	0,047	80,31
	5µg/ ml	0,7	0,607	0,682	0,663	0,049	85,11	0,668	0,801	0,824	0,764	0,084	100,70	0,903	0,77	0,662	0,778	0,121	87,75
Kontr ol		0,779	0,802	0,756	0,779	0,023		0,812	0,705	0,758	0,759	0,053		0,272	0,211	0,887	0,887	0,374	

MTT Analizi Deney Talimatı

- 1) Örnekler üzerindeki besi ortamı çekilir ve yerine 600µL serumsuz besi ortamı ve 60µL MTT (2.5 mg/mL steril PBS) çözeltisi konur.
- 2) Örnekler CO₂ etüvde 3 saat inkübe edilir.
- 3) 3 saatin sonunda örnekler üzerindeki ortam çekilerek yerine 400 µL izopropanol (0.04 M HCL içeren) konur. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi beklenir.
- 4) Her bir örneğin üzerinden 200µL süpernatant alınarak 96-gözlü kültür kabına koyulur.
- 5) Optik yoğunluk 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de mikrokap okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılır, absorbans değerleri okunur.

EK 2 MTT Analizi Deney Talimatı

Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

Aseton-metanol çözeltisi:

Aseton ve metanol 1/1 oranda karıştırılarak çözelti hazırlanır.

%20'lik metanol çözeltisi:

PBS kullanılarak %20'lik (v/v) metanol çözeltisi hazırlanır.

Kristal viyole çözeltisi:

Daha önceden hazırlanan %20'lik metanol çözeltisi kullanılarak %0.1'lik (w/v) kristal viyole çözeltisi hazırlanır.

Yöntem:

- 1) Hücrelerin üzerindeki ortamı uzaklaştırılır ve PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilir.
- 2) Hücreler 4°C' de 20 dk. , 250 µL aseton-etanol çözeltisine tabi tutularak fiksasyon işlemi gerçekleştirilir.
- 3) Fiksasyon işleminden sonra hücreler üzerine kristal viyole çözeltisi (yaklaşık 500 µL) damlatılır ve 30 dk. beklenir.
- 4) Boyanan yüzey su ile yıkanır.
- 5) Hücreler ışık mikroskobu altında görüntülenir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erdem BABAARSLAN

Doğum Yeri : Sorgun

Doğum Tarihi : 15/03/1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Ali Rukye Özgören Lisesi (2004)

Lisans : Gazi Üniversitesi Müh. M,m. Fak. Kimya Mühendisliği Bölümü (2010)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
(Ocak 2011 – Haziran 2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı, İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitü Müdürlüğü
(İSGÜM) İSG Uzmanı (2011-devam)

Yayınlar, Kongreler vs.

Babaarslan, E., Karabulut, M., Algan, S., Ertekin, İ., Karadogan, E.T., “The regulation of nanomaterials under OSH legislation: Turkish case study”, 20. World Congress on Safety and Health at Work, Frankfurt, Germany, August 24-27, 2014

Babaarslan, E., Karabulut, M., Algan, S., Ertekin, İ., Karadogan, E.T., “Workplace exposure assessment to nanomaterials” 7. International occupational health and safety conference, Istanbul, Turkey, May 5-7, 2014

Babaarslan, E., Ozmen, M., Ozmen, M., Cakar, İ. “Nanotechnology: a review to risks and safety implementation”, 19. World Congress on Safety and Health at Work, Istanbul, Turkey, September 11-15, 2011.