



Grafen Oksitin Sentezlenmesi ve Sitotoksik Etkisinin *in vitro* Olarak Değerlendirilmesi

Synthesis of Graphene Oxide and *in vitro* Evaluation of Its Cytotoxic Effect

 Nural Pastacı Özsoğacı¹,  Dilek Düzgün Ergün²

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Pastacı Özsoğacı N, Düzgün Ergün D. Synthesis of Graphene Oxide and *in vitro* Evaluation of Its Cytotoxic Effect. J Acad Res Med 2023;13(2):58-62

ÖZ

Amaç: Karbon bazlı bir malzeme olan grafenoksit, sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikler nedeniyle hücre etiketleme, hücre görüntüleme, biyosensörler, ilaç salınımı çalışmaları gibi birçok biyomedikal uygulama için potansiyel bir aday olarak düşünülmektedir. Grafen oksitin sentezlenmesi birden fazla yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada sentezlediğimiz grafenoksit numunelerinin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Grafen oksitin sentezlenmesi Hummers yöntemiyle yapılmıştır. Grafen oksitin sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür testi ile insan embriyonik börek hücrelerinde (HEK293) değerlendirilmiştir. Yirmi dört saat, 48 saat ve 72 saatlik farklı dozlarda grafen oksit inkübasyonunun ardından hücrelerin %50 canlılık gösterdiği IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Bulgular: Yirmi dört saat, 48 saat ve 72 saat sonunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 206,18 µg/mL, 108,98 µg/mL, 55,54 µg/mL olarak ölçülmüştür. İnkübasyon süresi arttığında IC₅₀ değerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Sentezlenen grafen oksitin sitotoksik etkisinin maruz kalma süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Grafen, grafen oksit, HEK293, toksisite

ABSTRACT

Objective: Graphen oxide, a carbon-based material, is considered as a potential material for many biomedical applications such as cell labeling, cell imaging, biosensors, drug release studies, due to its physical and chemical properties. Graphene oxide can be synthesized by more than one method. In this study, it was aimed to evaluate the cytotoxic effects of the graphenoxide samples we synthesized.

Methods: Synthesis of graphene oxide was done by Hummers method. The cytotoxic effects of graphene oxide were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay in human embryonic kidney cells (HEK293). After 24 hours, 48 hours and 72 hours of graphene oxide incubation at different doses, the IC₅₀ values were calculated which 50% percentage of cell viability.

Results: After 24 hours, 48 hours and 72 hours, IC₅₀ values were measured as 206.18 µg/mL, 108.98 µg/mL, and 55.54 µg/mL, respectively. It was determined that the IC₅₀ value decreased as the incubation time increased.

Conclusion: It was determined that the cytotoxic effect of the synthesized graphene oxide varies depending on the exposure time.

Keywords: Graphene, graphen oxide, HEK293, toxicity

GİRİŞ

Karbon, yer kabuğunda en çok bulunan elementlerden biridir. Karbon bazlı malzemeler, yüksek kimyasal direnç kabiliyeti, verimli mekanik özellikleri, düşük ağırlıklı karakterleri ve vücutta yüksek oranda dağılıma yeteneğine sahip olmaları nedeniyle birçok farklı

uygulama alanına sahiptir. Karbon atomlarının birbirlerine farklı şekillerde bağlanmasıyla özellikleri birbirinden farklı malzemeler oluşmaktadır. Birkaç katmanlı grafenler, grafen oksit (GO), karbon nanotüpler, nano elmaslar ve indirgenmiş GO'lar biyomedikal sistemlerde kullanılan karbon türevleridir (1).

ORCID IDs of the authors: N.P.Ö. 0000-0002-9133-5695; D.D.E. 0000-0002-6245-6631.

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nural Pastacı Özsoğacı,

E-posta: n.pastaciozsobaci@iuc.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 21.02.2023 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 17.04.2023



©Telif Hakkı 2023 Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
Journal of Academic Research in Medicine, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives (CC BY-NC-ND) 4.0
Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
Makale metnine www.jarem.org web sayfasından ulaşılabilir.

Grafen ilk olarak Nobel ödüllü Andre Geim ve Konstantin Novoselov tarafından kristal grafitik filmler olarak tanımlanmıştır. İki boyutlu bir yapıya sahip olan grafen, 1 atom kalınlığında ve sp^2 hibrit karbon atomlarının bağlanmasıyla oluşan bal peteği görünümündedir. Grafenler, özgül yüzey alanı ($2630 \text{ m}^2\text{G}^{-1}$), yüksek yük mobilitesi ($200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}\text{S}^{-1}$), yüksek Young modülü ($\sim 1.0 \text{ TPa}$), yüksek termal iletkenlik ($\sim 5000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) ve yüksek optik geçirgenlik ($\sim 97,7\%$) gibi benzersiz termal, elektriksel ve mekaniksel özelliklere sahiptir (2-4). Bu özellikler nedeniyle grafen bazı malzemelerin, doku mühendisliği, biyo-algılama, gen iletimi ve kanser tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (1,5).

GO, grafenin kimyasal olarak modifiye edilmiş bir formudur ve grafen hidrofobikken, GO hidrofildir. Bu özelliği GO'nun biyolojik sistemlerde ilaç dağıtım ajanı, hücresel görüntüleme problemleri ve biosensör olarak kullanılmasını elverişli kılmıştır (1,6,7). Hem aromatik (sp^2) hem de alifatik (sp^3) alanları içermesi nedeniyle GO'nun yüzeyi elektrostatik etkileşime izin verecek şekilde daha da geniştir ve ilaç bağlanmasına olanak sağlar. Dolayısıyla ilaç salınımı çalışmalarına da uygunluk göstermektedir (5,8). GO'nun toksik veya biyoyumlu bir malzeme olarak işlevselliği, bileşimine, boyutuna, yüzeyine, şekline, fonksiyonel gruplarına, yüküne, kaplamasına ve çözünen ortama bağlıdır. Litaratürde GO'nun sentezlenmesinde birden çok yöntem kullanılmaktadır (9,10).

Bu çalışmada GO'nun sentezlenmesi ve sentezlenen GO'nun sitotoksik etkisinin embriyonik böbrek hücrelerinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Grafen Oksit Sentezi

GO sentezi modifiye Hummers yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (11). GO sentezinde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır: Sülfürik asit (H_2SO_4) (MERCK, 7664-93-9, Almanya), fosforik asit (H_3PO_4) (MERCK, 7664-38-2, Almanya), grafit, potasyum permanganat (KMnO_4) (ISOLAB, 7722-64-7, Almanya), hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30 ağırlık) (MERCK, 1085972500), hidroklorik asit (HCl) (%38 ağırlık) (ISOLAB, 7647-01-0, Almanya), susuz etanol (ISOLAB, 64-17-5, Almanya), sodyum hidroksit (NaOH) (MERCK, 106498.1000, Almanya).

GO sentezi için 360 mL H_2SO_4 ve 40 mL H_3PO_4 behere konularak sabit sıcaklıkta 200 rpm'de karıştırılmıştır. Ardından 3 g grafit ve 18 g KMnO_4 yavaşça solüsyona eklenmiştir. Bu reaksiyon 40-45 °C sıcaklıkta 16 saat boyunca karıştırılmıştır. GO sentezlenmesi için 16 saat boyunca karıştırılan süspansiyon, içinde 400 g buz olan behere aktarılmış ve karıştırılmaya devam edilmiştir. Süspansiyon buzla birlikte karışırken, içine 3 mL H_2O_2 (%30 ağırlıkça) damla damla eklenmiştir. Elde edilen karışım 3000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (asit) atık kutusuna boşaltılmıştır. Pelletlerin yıkanması ve ardından etüvede kurutulmasıyla GO elde edilmiştir.

Grafen Oksitin Karakterizasyonu

Elde edilen GO yapısında bulunan fonksiyonel grupların tespiti için Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi (Nicolet FT-IR Spektrometresi) kullanılarak 4000-400 cm^{-1} aralığında FT-IR analiz yapılmıştır. Geçirmeli elektron mikroskobu (Jeol JEM 2100 plus) ile numunelerin görüntüleri alınmıştır.

Hücre Kültürü

Ticari olarak temin edilen insan embriyonik böbrek hücreleri HEK293T (CRL-1573) (The American Type Culture Collection-ATCC; Manassas, VA, USA) %89 Dulbecco's modified eagle medium, %9 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovine serum ve %1 antibiyotik solüsyonu (100 U/mL penisilin ve 100 U/mL streptomisin) ile hazırlanan besiyerinde 37 °C, %5 CO_2 inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında önce Dulbecco's fosfat buffer saline ile yıkanmış, sonrasında %0,25 tripsin-EDTA ile flask zemininden kaldırılmıştır. Tripsin-EDTA-hücre süspansiyonu 120xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre peleti üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara (1×10^4 hücre/kuyucuk) ekilerek inkübe edilmiştir. Tüm kimyasallar ticari olarak temin edilmiştir (Euroclone S.p.A.; Via Figino-Italy).

Grafen Oksit Uygulanması ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) Testi

Hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksitesinde değerlendirilmesinde hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için MTT testi kullanılmıştır. Bu kolorimetrik test, sarı tetrazolyum tuzu olan MTT'yi mor formazan kristallerine dönüştürmek için metabolik olarak aktif hücreleri kullanır. Canlı hücrelerdeki NAD(P)H bağımlı oksidoredüktaz enzimleri MTT'yi formazana dönüştürür. Çözünmeyen formazan kristallerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak, oluşan renkli çözeltinin absorpsansı spektrofotometrede ölçülür. Daha koyu olan kuyucuklarda metabolik olarak daha aktif canlı hücreler vardır, hücre canlılığının azaldığı kuyucuklarda renk daha açıktır (12,13).

Çalışmamızda GO'nun etkin dozunun (IC_{50}) belirlenmesi amacı ile hücreler 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra kontrol grubu taze besiyeri ile deney grupları farklı konsantrasyonda GO (1000-500-250-125-62,5-31,25-15,62-7,81-3,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Deney süresi sonunda tüm kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 100 μL taze besiyeri ile 10 μL (5 mg/mL) MTT solüsyonu eklenmiş ve hücreler 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa 100 μL DMSO ilave edilmiş ve absorpsans değerleri 570 nm'de ELISA mikropilaka okuyucuda (Multiskan GO-Thermo) ölçülmüştür. Optik dansite değerleri kullanılarak GraphPad Prism 9 programı ile GO için hücre canlılığının %50 azalmasını sağlayan doz (IC_{50}) değerleri belirlenmiştir.

Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır ve sonuçlar ortalama değer olarak ifade edilmiştir, istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

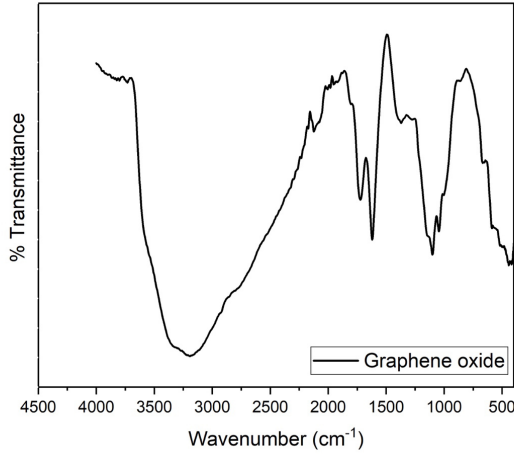
BULGULAR

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi Analizi

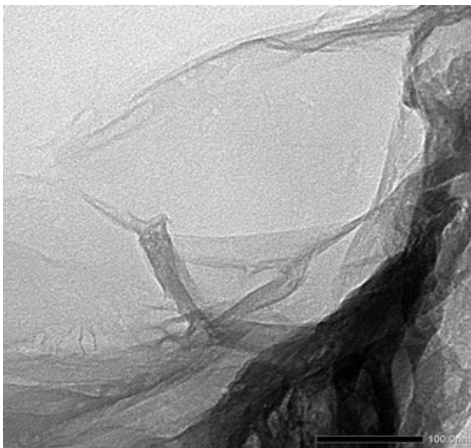
FTIR Spektremleri Şekil 1'de verilmiştir. 3000-3500 cm^{-1} arasında, GO üzerine adsorbe olan su moleküllerinin OH gruplarının gerilme ve bükülme titreşimine karşılık gelen geniş bir pik görülmektedir. Bu pik GO'nun güçlü bir hidrofilik yapıda olduğunu gösterir. 1735 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler karboksil C=O grubunu, 1630 cm^{-1} 'deki pik, aromatik C=C grubunu göstermektedir. CH_2 'nin gerilme titreşimlerine 2920 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri karşılık gelmektedir. 1200 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri, karboksilik asidin C-O bağının gerilme titreşimini göstermektedir. 2925 cm^{-1} , 2119 cm^{-1} , 1768 cm^{-1} , 1631 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 916 cm^{-1} ve 534 cm^{-1} aralığında absorpsiyon bağlarının varlığını göstermektedir.

Morfolojik Karakterizasyon

Şekil 2'ye bakıldığında GO'nun, karakteristik tek katmanlı özelliği nedeniyle kısmen tekdüze şeffaf bir morfolojiye sahip olduğu



Şekil 1. Grafen oksitin FT-IR spektroskopisi
FT-IR: Fourier transform infrared



Şekil 2. Grafen oksitin TEM fotoğrafı
TEM: geçirimli elektron mikroskobu

görülmektedir. Oksidasyon işlemi sırasında oksijenli fonksiyonel grupların oluşturduğu büyük spesifik yüzey alanı sebebiyle yüzeyde çok sayıda bükülme ve düzensiz kırışıklıklar gözlemlenmektedir (14).

MTT Sonuçları

HEK293 hücreleri farklı konsantrasyonlarda GO (1000-500-250-125-62,5-31,25-15,62-7,81-3,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile muamele edilmiştir. Süre ve doza bağlı olarak GO'nun hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3). IC_{50} değerleri $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak hesaplanarak ve Tablo 1'de verilmiştir.

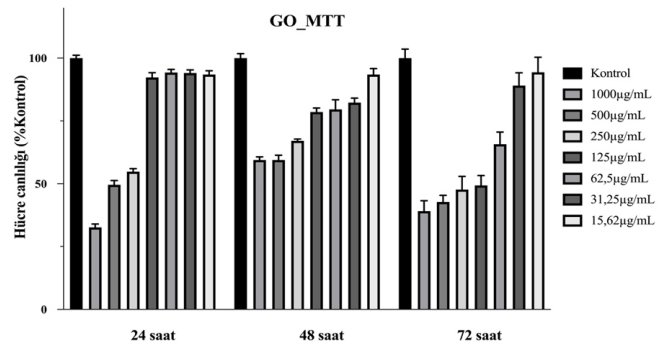
TARTIŞMA

Karbonun, doğada en yaygın bulunan elementlerden biri olmasından dolayı, karbon esaslı malzemelerin diğer inorganik malzemelere kıyasla biyoyumluluğunun daha yüksek olduğu bilinmektedir. Özellikle grafit, kritik toksisite sorunları olmadan yüzlerce yıldır günlük hayatımızda kullanılmaktadır. Tek bir grafit tabakası olan grafenin benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyolojik çalışmalarda kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (1,2,3,7).

Bu çalışmada sentezlediğimiz GO'nun insan embriyonik böbrek hücrelerinin canlılığı üzerine sitotoksik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla GO'nun 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,62-7,81-3,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarının HEK293 hücreleri üzerindeki etkisini mitokondriyel aktiviteye bağlı olarak değerlendirilen MTT analizi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde ve 125-62,5-31,25-15,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında hücre canlılığı %75'in üzerinde bulunmuştur. GO inkübasyonu 72 saat olduğunda ise 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonunun üzerindeki değerlerde hücre canlılığı %65'in altına düşmüştür. Yirmi dört, 48 ve 72 saat inkübasyonları için %50

Tablo 1. Grafen oksit uygulanan HEK293 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri

	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değeri	206,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$	108,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$	55,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Şekil 3. Grafen oksitin HEK293 hücrelerinde üzerinde zamana ve doza bağlı etkisi

canlılık konsantrasyonlarını gösteren IC₅₀ değerleri sırasıyla 206,18 µg/mL, 108,98 µg/mL, 55,54 µg/mL olarak hesaplanmıştır. GO ile inkübasyon süresi arttığında mitokondriyel hasarın artırdığı, dolayısıyla hücre canlılığı üzerine olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir.

Günümüzde farklı grafen türevlerinin biyolojik etkilerinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışma yapılmaktadır (4,6,9). Zhang ve ark. (15) PC12 hücrelerinde yaptıkları çalışmada farklı yapıya sahip grafen türevlerinin sitotoksik etkisinin grafen yapısı ile direkt ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Grafenin etkilerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada da Wu ve ark. (16) nano çinko oksitin A549 hücrelerinde oluşturduğu hücre canlılığı, oksidatif stres, mitokondriyal depolarizasyon ve membran hasarı üzerindeki toksik etkilerinin grafenle bağlandığında göstermediği tespit edilmiştir.

Grafen türevlerinden biri olan GO, hidrofilik yapısından dolayı biyolojik sistemlerde kullanımı için ilgi çekici olmaktadır. GO'nun geniş uygulama alanı nedeniyle, GO tabanlı teknolojilerin güvenli ve sürdürülebilir gelişimi için GO'nun sitotoksitesinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir (6). Biz de bu çalışmamızda modifiye Hummers yöntemi ile sentezlediğimiz GO'nun HEK293 hücrelerinde oluşturduğu etkiyi gözlemlemeyi amaçladık.

Wang ve ark. (17) modifiye Hummers yöntemi ile sentezledikleri GO'nun biyoyumluluğunu insan fibroblast hücrelerinde ve fareler üzerinde değerlendirmişlerdir. GO'nun 20 µg/mL'den daha düşük dozda uygulanması insan fibroblast hücrelerinde toksisite göstermezken, 50 µg/mL'nin üzerindeki dozlarda hücre adezyonunda azalma, apoptozu indüklemeye, lizozomlara, mitokondriye ve hücre çekirdeğine girme gibi belirgin sitotoksik etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir. Fareler üzerinde ise düşük ve orta doz uygulanan GO'nun belirgin toksisite göstermediği, fakat yüksek dozlarda (0,4 mg) karaciğer, dalak ve böbrekte birikim ile birlikte akciğer granülomu gibi kronik toksisite sergilediği tespit edilmiştir. İnsan eritrositleri üzerinde yapılan bir çalışmada GO'nun doza bağlı hemolitik aktivite gösterdiği, ayrıca GO numunelerinin parçacık boyutunun da hemolitik aktivitede kritik rol oynadığı bildirilmiştir (18). Kardiyomyoblast hücre hattı üzerine nanoGO'nun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL nano-GO ile 24 saat inkübasyonun mitokondriyal hiperpolarizasyona, sebest radikal üretimine ve 40, 60, 80, 100 µg/mL konsantrasyonlarda DNA hasarına sebep olduğu gözlemlenmiştir (19). Lammel ve ark. (20), GO'nun oluşturduğu sitotoksik etkinin plazma zarı hasarı yoluyla doza bağımlı olarak gerçekleştirdiğini, GO'nun fosfolipid çift tabakası ile güçlü bir fiziksel etkileşim kurarak plazma zarının yapısal bütünlüğüne zarar verdiğini göstermişlerdir. Ayrıca, GO'nun plazma zarına nüfuz edebildiğini, bunun da değişmiş hücre morfolojisi ve artan sayıda apoptotik hücre ile sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir (20).

Ünal ve ark. (4) farklı grafen türevlerinin kanser hücrelerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; A549 insan akciğer epitelyal karsinoma hücrelerinde GO'nun 1000 µg/mL'lik en yüksek dozunun dahi %17 oranında ölüme yol açtığını, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde en

fazla etkiyi gösteren test edilen en düşük doz olan 1,96 µg/mL'lik dozun %11 oranında ölüme yol açtığını tespit etmişlerdir. Fakat aynı grafen türevlerinin sağlıklı 293-T insan embriyonik böbrek epitel hücrelerinde anlamlı sitotoksik bir etki göstermediği rapor etmişlerdir (4). Fakat Hu ve ark. (21), GO'nun etkisinin, %10 fetal bovin serumu ile inkübasyon yoluyla büyük ölçüde zayıflatıldığını, bunun nedeninin ise GO'nun son derece yüksek protein adsorpsiyon kabiliyetine sahip olması olarak belirtmişlerdir (21). *In vitro* yapılan bir başka çalışmada da düşük doz GO'nun A549 hücre hattının morfolojisine, canlılığına ve membran bütünlüğüne etkisinin olmadığı, ancak doza bağımlı bir oksidatif strese neden olabileceğini ve yüksek dozlarda hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (22). Yapılan çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda da HEK293 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlarda GO'nun hücre canlılığını süre ve doza bağlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

GO'nun sitotoksik etkisinin belirlenmesinde ve hücre ile etkileşiminin aydınlatılmasında moleküler düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu anlamda, çalışmamız GO'nun etkisinin araştırılması için bir ön çalışma olarak kabul edilebilir.

SONUÇ

Farklı metotlarla sentezlenen grafen türevlerinin biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğini artırmak ve uzun vadeli toksisite/biyoyumluluk verilerini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Hasta Onamı: Bu çalışma hasta onamı gerektirmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Yazar Katkıları: Konsept - N.P.Ö., D.D.E.; Dizayn - N.P.Ö., D.D.E.; Veri Toplama veya İşleme - N.P.Ö., D.D.E.; Analiz veya Yorumlama - N.P.Ö., D.D.E.; Literatür Arama - N.P.Ö., D.D.E.; Yazan - N.P.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Ethics Committee Approval: This study does not require ethics committee approval.

Informed Consent: This study does not require patient consent.

Peer-review: Internally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - N.P.Ö., D.D.E.; Design - N.P.Ö., D.D.E.; Data Collection and/or Processing -N.P.Ö., D.D.E.; Analysis and/or Interpretation - N.P.Ö., D.D.E.; Literature Search - N.P.Ö., D.D.E.; Writing - N.P.Ö.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Rajakumar G, Zhang XH, Gomathi T, Wang SF, Ansari MA, Mydhili G, et al. Current Use of Carbon-Based Materials for Biomedical Applications—A Prospective and Review. *Processes* 2020; 8 :355.

2. Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Adv Mater* 2010; 22: 3906-24. Erratum in: *Adv Mater* 2010; 22: 5226.
3. Gonçalves G, Vila M, Portolés MT, Vallet-Regi M, Gracio J, Marques PA. Nano-graphene oxide: a potential multifunctional platform for cancer therapy. *Adv Healthc Mater* 2013; 2: 1072-90. Erratum in: *Adv Healthc Mater* 2014; 3: 956.
4. Ünal O, Ünal A, Çetin SA, Aydemir E, Bayram E, Kızıl Ç. Investigation of The Anticancer Effects of Graphene Oxide (GO), Nitrogen Doped Graphene Oxide (NGN-OXIDE) and Nitrogen Doped Graphene (NGN). *Erciyes University Journal of Institute Of Science and Technology* 2020; 36: 193-203.
5. Zhang Q, Wu Z, Li N, Pu Y, Wang B, Zhang T, et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 77: 1363-75.
6. Gies V, Zou S. Systematic toxicity investigation of graphene oxide: evaluation of assay selection, cell type, exposure period and flake size. *Toxicol Res (Camb)* 2017; 7: 93-101.
7. Chung C, Kim YK, Shin D, Ryoo SR, Hong BH, Min DH. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc Chem Res* 2013; 46: 2211-24.
8. Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Durán N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 159-68.
9. Gurunathan S, Kim JH. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 1927-45.
10. Bedeloğlu A, Taş M. Graphene And Its Production Methods. *AKU J Sci Eng* 2016; 16: 544-54.
11. Jiříčková A, Jankovský O, Sofer Z, Sedmidubský D. Synthesis and Applications of Graphene Oxide. *Materials (Basel)* 2022; 15: 920.
12. Slater T, Sawyer B, Sträuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 383-93.
13. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 474-82.
14. Hadki AE, Ulucan-Altuntas K, Hadki HE, Ustundag CB, Kabbaj OK, Dahchour A, et al. Removal of oxytetracycline by graphene oxide and Boron-doped reduced graphene oxide: A combined density function Theory, molecular dynamics simulation and experimental study. *FlatChem* 2021; 27: 100238.
15. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano* 2010; 4: 3181-6.
16. Wu B, Wu JL, Liu S, Shen ZY, Chen L, Zhang XX, et al. Combined effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticle on human A549 cells: bioavailability, toxicity and mechanisms. *Environ. Sci: Nano* 2019; 6: 635-45.
17. Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Res Lett* 2011; 6: 8.
18. Liao KH, Lin YS, Macosko CW, Haynes CL. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011; 3: 2607-15.
19. Arbo MD, Altknecht LF, Cattani S, Braga WV, Peruzzi CP, Cestonaro LV, et al. In vitro cardiotoxicity evaluation of graphene oxide. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2019; 841: 8-13.
20. Lammel T, Boisseaux P, Fernández-Cruz ML, Navas JM. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 27.
21. Hu W, Peng C, Lv M, Li X, Zhang Y, Chen N, et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. *ACS Nano* 2011; 5: 3693-700.
22. Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol Lett* 2011; 200: 201-10.