



**BORİK ASİT, ÇİNKO BORAT VE KATKILI GRAFEN  
HİDROJELLERİN L929 FARE FİBROBLAST HÜCRE  
HATTINDA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SİTOTOKSİSİTESİNDE  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fatih TUNÇ**

**Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Yasin BAYIR**

**Yüksek Lisans Tezi-2024**



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

**BORİK ASİT, ÇİNKO BORAT VE KATKILI GRAFEN  
HİDROJELLERİN L929 FARE FİBROBLAST HÜCRE  
HATTINDA H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SİTOTOKSİSİTESİNDE  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fatih TUNÇ**

**Eczacılık Biyokimya Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Yasin BAYIR**

**ERZURUM**

**2024**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>5</b>
2.1. Bor'un Biyokimyasal Özellikleri ve Etkileri .....	5
2.2. Çinko ve Çinko Borat'ın Özellikleri ve Etkileri .....	6
2.3. Grafen Hidrojeller'in Özellikleri ve Etkileri .....	6
2.4. Biyouyumluluk .....	8
2.5. Yara iyileşmesinde Mikrobiyolojik Yaklaşım .....	9
2.6. Hücre Kültürü .....	10
2.7. L929 Fibroblast Hücre Hattı .....	11
2.8. MTT Yöntemi .....	11
2.9. Hücre Canlılığı/Proliferasyon .....	12
2.10. Sitotoksosite.....	13
2.11. İn Vitro Toksikite Testlerini Avantaj ve Dezavantajları .....	14
2.12. Yara İyileşmesinde Migrasyon .....	15
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>17</b>
3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	17
3.2. Aletsel Analiz Metodları.....	18

3.3. Grafen aerojellerin sentezi .....	18
3.3.1. Modifiye Mummer Methodu ile Grafit Oksit Sentezi .....	19
3.3.2. Grafen Oksit Kullanılarak Yapılan Grafen Hidrojel Sentezi.....	20
3.3.3. Grafen Hidrojellere Borik Asit ve Çinko Borat Emdirilmesi .....	20
3.4. Mikrobiyolojik Analizler .....	21
3.4.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması.....	21
3.4.2. Sentezlenmiş Grafen Hidrojel, BA ve ÇB katkılı Grafen Hidrojeller'in Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi .....	22
3.5. Sentezlenmiş Grafen Hidrojel, BA ve ÇB katkılı Grafen Hidrojeller'in Biyoyumluluk Testi .....	22
3.5.1. EPI-200-SIT Testi.....	23
3.6. Hücre Kültürü H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oksidatif Stres Proliferasyon Testi .....	24
3.6.1 Hücre Kültürü Optimizasyonu.....	24
3.6.2. Hücre kültürü H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oksidatif Stres Testi.....	24
3.6.3. Hücre Migrasyon Testi .....	25
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
4.1. Sentez Analizleri.....	27
4.1.1. Grafen Hidrojellerin Sentezi .....	27
4.1.2. Sentezlenen Malzemelerin Yapısal Tanımlamaları .....	27
4.2. Mikrobiyoloji Testler .....	30
4.3. İn-vitro Epiderm Tm Deri İritasyon Testi (SIT) Biyoyumluluk Testleri .....	31
4.4. Hücre Kültürü Proliferasyon ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Oksidatif Stres Testleri .....	32
4.5. Migrasyon Test Sonuçları .....	41
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>52</b>

<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>63</b>
<b>EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....</b>	<b>63</b>
<b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>64</b>



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yasin BAYIR'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tübitak 119S510 nolu proje ile desteklenen bu tez çalışmasında proje ekibinde yer alan tüm araştırmacı hocalarıma ve bursiyer arkadaşlarıma, grafen hidrojellerin sentezlenmesinde, katkılanmasında ve karakterizasyon analizlerinde desteklerini esirgemeyen aynı zamanda proje danışmanı hocamız Doç.Dr. Önder METİN, Tıbbi Farmakoloji laboratuvarının tüm imkanlarının esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Elif ÇADIRCI, Prof. Dr. Zekai HALICI çok teşekkür ederim. Bu tez çalışması 119S510 Nolu Tübitak 1001 proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlemizi sunarız.

Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.

**Fatih TUNÇ**

## ÖZET

### **Borik Asit, Çinko Borat ve Katkılı Grafen Hidrojellerin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sitotoksisinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

**Amaç:** Bu çalışmada Borik Asit (BA), Çinko Borat (ÇB) ve katkılı grafen hidrojellerin (GH)'lerin sentezi, karakterizasyonu, mikrobiyolojik, biyouyumluluk analizleri ve hücre kültürü analizleri araştırıldı.

**Materyal ve Metot:** Grafen hidrojellerin sentezi modifiye Hummers metodu kullanılarak indirgenmiş grafen oksitten sentezlenerek borik asit ve çinko borat katkılanmasıyla yapılmıştır. GH, GH-BA ve GH-ÇB'lerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile belirlendi. Grafen hidrojel, BA ve ÇB içeren katkılanmış grafen hidrojellere mikrobiyolojik disk difüzyon testi, in-vitro epiderm tm deri iritasyon testi, L929 fare fibroblast hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücrede oluşturduğu oksidatif stres ve in-vitro yara iyileşme aktivitesi testi yapıldı.

**Bulgular:** Grafen hidrojel, BA ve ÇB içeren katkılanmış grafen hidrojellerin sentez ve karakterizasyonu başarı ile yapıldı. Anti-bakteriyal ve iritasyon etkisi göstermediği belirlenmiştir. L929 hücre hattı üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesinde doza ve zamana bağlı olarak koruyucu etki göstermiştir. Migrasyon testinde ise GH, BA ve ÇB katkılı grafen hidrojel partiküller mikroskopta siyah fiziksel bariyerler oluşturmasından dolayı ölçüm alınamamıştır.

**Sonuç:** Bu çalışmada BA, ÇB katkılı GH'lerin sentezi ve biyoaktivite seviyeleri tespit edilmistir. BA ve ÇB katkılı GH'lerin antimikrobiyal etkileri belirlemez iken iritasyona neden olmadığı tespit edilmistir. L929 hücrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanan oksidatif strese karşı GH, GH-BA ve GH-CB uygulamalarının hücre proliferasyonunu artırdığı tespit edilmistir. GH-ÇB ve GH-BA'nın in-vitro deneylerinde görülen potansiyel etkisi in-vivo olarak araştırılmasının önünü açmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Borik Asit, çinko borat, grafen hidrojeller, hücre kültürü, L929 hücre hattı, migrasyon.

## ABSTRACT

### **Evaluation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Cytotoxicity Efficacy of Boric Acid, Zinc Borate and Doped Graphene Hydrogels in L929 Mouse Fibroblast Cell Line (In-Vitro)**

**Aim:** In this study, the synthesis, characterization, microbiological, biocompatibility analyzes and cell culture analyzes of Boric Acid (BA), Zinc Borate (ÇB) and doped graphene hydrogels (GH) were investigated.

**Material and Method:** Graphene hydrogels were synthesized from reduced graphene oxide using the modified Hummers method and doped with boric acid and zinc borate. The morphology of GH, GH-BA and GH-ÇBs was determined by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Microbiological disk diffusion test, in-vitro epiderm tm skin irritation test, oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cell in L929 mouse fibroblast cell line and in-vitro wound healing activity test were performed on graphene hydrogel, BA and WB-containing doped graphene hydrogels.

**Results:** Synthesis and characterization of doped graphene hydrogels containing graphene hydrogel, BA and WB were successfully carried out. It has been determined that it does not have anti-bacterial and irritating effects. It showed a dose- and time-dependent protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity on the L929 cell line. In the migration test, measurements could not be taken because GH, BA and ÇB-doped graphene hydrogel particles formed black physical barriers under the microscope.

**Conclusion:** In this study, the synthesis and bioactivity levels of BA and ÇB-doped GHs were determined. It has been determined that BA and ÇB added GHs do not cause irritation, while they do not have antimicrobial effects. It was determined that GH, GH-BA and GH-CB applications increased cell proliferation of L929 cells against oxidative stress caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The potential effect of GH-ÇB and GH-BA seen in in-vitro experiments paves the way for in-vivo investigation.

**Keywords:** Boric acid, zinc borate, graphene hydrogels, cell culture, L929 cell line, migration.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µg</b>	: Mikro gram
<b>µl</b>	: Mikro litre
<b>2ZnO.B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	: Çinko borat
<b>ATCC</b>	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BA</b>	: Borik asit
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>C</b>	: Doğal grafit
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon dioksit
<b>ÇB</b>	: Çinko borat
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>FBS</b>	: Fetal bovine serum
<b>GAJ</b>	: Grafen areo jel
<b>G-BA</b>	: Grafen katkılı borik asit
<b>GBN</b>	: Grafen bazlı nanomalzemeler
<b>G-ÇB</b>	: Grafen katkılı çinko borat
<b>GH</b>	: Grafen hidrojel
<b>GO</b>	: Grafen oksit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	: Borik asit

<b>KMnO<sub>4</sub></b>	: Potasyum permanganat
<b>mg</b>	: Mili gram
<b>mL</b>	: Mili litre
<b>MTT</b>	: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	: Sodyum nitrat
<b>nm</b>	: Nano metre
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	: Fosfor pentaoksit
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon çözeltisi
<b>rGO</b>	: Radikal grafen oksit
<b>ROS</b>	: Radikal oksijen türleri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1. Liyofilizatörde kurutma sonrası grafen hidrojel	27
Şekil 4.2. Borik asit, çinko borat katkılanmış grafen hidrojel SEM görüntüleri	28
Şekil 4.3. Borik asit, çinko borat katkılanmış grafen hidrojel TEM görüntüleri	29
Şekil 4.4. Disk difüzyon testi sonuçlarından bir örnek	30
Şekil 4.5. Hidrojellerin antimikobiyal etkinlik çalışması sonuçlarından bir örnek	31
Şekil 4.6. İn-vitro epiderm tm deri irritasyon testi (SIT) biyouyumluluk testi	32
Şekil 4.7. Saf grafen hidrojinin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi	33
Şekil 4.8. Saf grafen hidrojinin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi	34
Şekil 4.9. Saf grafen hidrojinin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 72. saat koruyucu testi	35
Şekil 4.10. Borik asit katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi	36
Şekil 4.11. Borik asit katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi	37
Şekil 4.12. Borik asit katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 72. saat koruyucu testi	38
Şekil 4.13. Çinko borat katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi	39
Şekil 4.14. Çinko borat katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi	40

**Şekil 4.15.** Çinko borat katkılı grafen hidrojenlerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 72. saat koruyucu testi..... 41

**Şekil 4.16.** Migrasyon testinde %1.5 borik asit katkılı grafen hidrojenlerin görüntüleri 42



## TABLolar DİZİNİ

**Tablo No**

**Sayfa No**

<b>Tablo 3.1.</b> Bileşiklerin sentezinde, saflaştırılmasında ve kimyasal analizlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	18
--	----



# 1. GİRİŞ

Bor elementi, ülkemizde geniş ve zengin yataklara sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde bor ürünlerine olan yoğun ilginin kullanım alanlarına göre önemi giderek arttığı, özellikle sağlık alanında büyük bir kullanım potansiyeline sahip olan bor ürünlerine son yıllarda yatırımların giderek desteklendiği dikkat çekmektedir. Bor, hem etkin ilaçta koruyucu grup hem de etkin ilaç bileşeni olarak kullanılmaya başlanmıştır (Messner ve ark., 2022a). Bor'un fonksiyonel türevlerinin ilaçlara dahil edilmesini daha kolay erişilebilir ve uyarlanabilir hale getirdiği ayrıca farmakolojik alanda borun artan önemi son yıllarda bor içeren bileşiklerin başarılı bir şekilde gelişmesine yol açmıştır (Messner ve ark., 2022b).

İnsan metabolizmasında özel bir öneme sahip olan bor, kabuklu meyveler, baklagiller, meyve, sebzeler ve bor kimyasallarından suda çözülmüş borik asitten sağlanmaktadır (Tombuloglu ve ark., 2020). Bor'un beslenme, çeşitli hormonal, metabolik ve sağlık açısından insanlar ve hayvanlar üzerinde işlevsel bir özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Aysel ve ark., 2019). Bor vücutta en çok kemik, saç, el ve ayak tırnaklarında bulunur (Hadrup ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından günlük diyetle alınan borun 1-2 mg/gün alınması normal sınırlar içerisinde kabul edilmektedir. Diyetle alınan borun kronik arter hastalığı riskini azalttığı ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir (Deliboran, 2020). Ayrıca, diyet dışında bor içeren ilaçları fazla tüketmenin bu nedenle yüksek miktarda bor maruziyeti sonucunda toksisiteye, gastrointestinal rahatsızlıklar, deri dökülmesi ve sperm sayısında azalma gibi olumsuz etkilere sebep olabileceği rapor edilmektedir (Ergün & Soyocak, 2021).

Bor bileşiklerinin son yıllarda yapılan çalışmalarda neticesinde insan fizyolojisi ve biyolojik önemi üzerinde olası yararlı etkilerinden bahsedilmektedir. Bor, çeşitli çalışmalarda hücre poliferasyonunda ve yara iyileşmesinde kilit bir rol oynadığı

görülmüştür (Hayal, 2020). Bor ürünlerinin hücre proliferasyonu, sitotoksisite, bağışıklık, yara iyileştirme ve kanser tedavilerinde her geçen gün kullanımı artmakta olup ve araştırmaların bu doğrultuda önem kazanmakta olduğu görülmektedir (Atakisi ve ark., 2020). Borun antioksidan bir ajan olarak yara iyileşmesinde, oksidatif hasara karşı koruyuculuğu ve immün bağışıklık sistemde önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Ergün & Soyocak, 2021). Küçükkurt ve ark. tarafından yapılan araştırmada neticesinde bor bileşiklerinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı ve lipid peroksidasyonunu önlediği böylece hücrel hasarı korumada hastalıklara ve yaralanmalara karşı antioksidan bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Kucukurt ve ark., 2015). Aynı çalışmada insülin salınımı ve bağışıklık sisteminde etkin rol oynadığı görüldüğü aynı zamanda serin proteazlarını veya oksiredükteazlarını kullanan yolakları kontrol edebilmek için gerekli olabileceği, pentozfosfat yolunda anahtar iki enzim olan Glukoz-6P dehidrogenaz ve GPD'nin aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Hadrup ve ark., 2021). Bor'un steroid hormonlarla ile de etkileşebildiği gösterilmektedir (Hakki ve ark., 2010). Bor'un vücuttaki önemli bir görevde kalsiyum ve D vitaminini düzenlemesinde etkin rol oynadığı, böylece kalsiyum ve magnezyum miktarının azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu ve gelişimine katkı sunduğu belirlenmiştir (YakıncıI & Mediha, 2016). Borun kalsiyum hemostazı üzerindeki etkisi, hücre zarı aktivitesi üzerindeki etkisiyle kontrol edildiği bildirilmiştir (Devirian & Volpe, 2003a). Bor bileşiklerinin kanser, osteoporoz ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere bir çok hastalıkta koruyucu etkileri potansiyel olarak rol oynayan yolak serbest radikal hasarı üzerinden ilişkilendirilmiştir (Celikezen ve ark., 2016).

İnsan sağlığı açısından etkin bir öneme sahip olan çinko'nun bağışıklık sistemi, merkezi sinir sistemi, büyüme, gelişme ve yara iyileşme sürecinde rol oynadığı bir kofaktör olduğu belirtilmektedir. Vücutta çinko eksikliği büyüme geriliği, bağışıklık

sisteminde ve yara iyileşmesinde aksaklıklara neden olduğu görülmüştür. MTT yöntemi ile L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak Çinko boratın sitotoksik etkisi belirlenmiştir (Aysel ve ark., 2019). Çinko borat nispeten düşük suda çözünürlük ve yüksek dehidrasyon sıcaklığı içerir (Aysel ve ark., 2019). Vücutta çinko'nun toksik etkisini azaltmak için bor ile etkileşime girebildiği düşünülmektedir (Oancea ve ark., 2018). Borik asit ve Çinko borat ile vücuda alınan borun %90'dan fazlası idrar yolu, yaklaşık %2 kadarı dışkı, daha az miktarda ise ter ve solunum yolu ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Çakır & Eren, 2016).

Bor ve diğer bileşikler ile yapılan kombinasyonların özellikle sağlık alanında popüler olmaya başlamıştır. Bu tez çalışması içerisinde yeni nesil bir malzeme olan grafen hidrojenlerde kullanım alanın gün geçtikçe artan önemli bir taşıyıcı madde olarak değerlendirilmektedir (Bedeloğlu & Mahmut, 2016). Grafen, tek atom inceliğinde olduğundan iki boyutlu kabul edilen, kovalent-kovalent bağlı ile bağlı karbon atomlarının altıgen formda balpeteği görüntüsüne sahip bir nanomateryal olarak tanımlanır (Bedeloğlu & Mahmut, 2016; Ökçesiz & Bucurgat, 2017). Grafen hidrojenler son yıllarda doku rejenerasyonunda umut verici bir materyal olarak dikkat çekmiştir (Lasocka ve ark., 2018). Bazı araştırmalar grafen bakteriyel inhibisyon, ilaç ve hastalık tedavilerinde büyük bir potansiyele sahip olabileceği belirtilmektedir. Bor içeren bileşiklerden borik asit, çinko borat'ın grafen hidrojel gibi yeni malzemelerle katkılanması çeşitli hastalıklardaki terapötik potansiyel etkisi büyük ilgi uyandırabilir. Bor kaynaklı temel çalışmaları incelemek için birçok araştırmacı tarafından borik asit veya çinko borat kullanıldığı belirlenmiştir (Tombuloglu ve ark., 2020). Bu kapsamda bu çalışmanın amacı;

Borik asit ve çinko borat ile katkılanmış grafen hidrojenlerin yapısal karakterizasyonlarının tanımlanması,

Borik asit, çinko borat ve katkılı grafen hidrojellerin antimikrobiyal etkinliğinin ve biyouyumluluğunun gösterilmesi,

Son olarak borik asit, çinko borat ve katkılı grafen hidrojellerin L929 fare fibroblast hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkinliğinde sitotoksisite etkinliğinin belirlenmesi ve hücre iyileşmesinde rolünün migrasyon yara iyileşme testi ile gösterilmesidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bor'un Biyokimyasal Özellikleri ve Etkileri

Bor, önemli bir mineral olup birçok biyolojik süreçte rol oynar. Bor, bitkilerin, hayvanların ve insanların büyümesi için gereklidir (Khaliq ve ark., 2018). Son yıllarda bor ile ilgili yapılan çalışmaların odak noktasında borun, toksik etkisi ve diyet önerilerinden daha çok borun vücuttaki biyokimyasal mekanizmalarını anlamak üzerine olmuştur (Nielsen, 2008).

Yer kabuğundaki her yerde bulunan bor, çoğu toprak türünde, tatlı ve tuzlu suda bulunabilir. Bor (B), atom numarası 5 olup Periyodik tabloda 3A grubunda bulunan yarı metal ve yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Özellikleri karbona çok yakındır ancak yörüngesinde daha az değerlikli bir elektrona sahiptir. Küçük boyutlu ve yüksek iyonlaşma enerjisi nedeniyle, borda metalik bağlanma yerine kovalent bağlanma mevcuttur (Kot, 2009). Doğada saf element şeklinde mevcut değildir. Borik asit, borat, boraks, kolemanit ve uleksit şeklinde moleküler yapıda bulunur (Simmons & Ahsian, 2015). Bor bileşikleri özellikle borik asit ve boraks şeklinde endüstriyel sektörde ve ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Ince ve ark., 2010).

Bor bileşiklerinin hücre ve canlı organizmalar üzerinde kanserojenik aktiviteye sahip olmadığı ayrıca borik asidin antioksidan enzim aktivitelerini desteklediği ve hücre kültürlerine genotoksik olmadığı görülmüştür (Aysel ve ark., 2019). Borik asidin DNA hasarını ve oksidatif stresi azaltması yanı sıra yara iyileşme sürecinde etkili olduğu öngörülmüştür (Tepedelen ve ark., 2016). Borik asidin yara iyileşmesininin uyarılması, büyüme faktörlerini ve hücre dışı matriks döngüsünün artması gibi biyolojik etkilere neden olduğu ve in-vitro olarak borik asit solüsyonunun hücre dışı matriks üzerindeki etkisi nedeniyle yara iyileşmesini gerçekleştirdiği saptanmıştır (Hakki ve ark., 2010).

## **2.2. Çinko ve Çinko Borat'ın Özellikleri ve Etkileri**

Çinko (Zn), hücrel fonksiyonlarda yaygın olarak bulunan önemli eser bir elementtir. Çinko yapısal düzenleyici veya katalitik iyon olarak süreçler için gerekli olduğu belirlenmiştir (Oancea ve ark., 2018). Çinko'nun bor ile yaptığı bileşiklerin çeşitli hastalık ve yara iyileşme sürecindeki terapötik etkisi son yıllarda büyük ilgi uyandırmıştır (Tombuloglu ve ark., 2020).

Çinko yaraların iyileşmesi için gerekli bir element olup, enfeksiyonlara karşı direnç oluşmasında da çinkonun katkısı bulunmaktadır. Çinko'nun bu etkilerinin özellikle hücre rejenerasyonunda ve immun sistem fonksiyonlarında önemli rol oynadığı ve çinko eksikliğinin pek çok enfeksiyonun gelişiminde bir risk oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca biyolojik membran stabilitesinde etkinliği, enzim aktive etme yeteneği gibi fonksiyonları nedeni ile direkt olarak verimi ve kaliteyi etkileyen bir elementtir (Akdeniz ve ark., 2016).

Çinko, çok çeşitli metabolik mekanizmalarda görev alan çok sayıda enzim aktivitesi için hayati önem arz eden bir metaldir (Oancea ve ark., 2018). Boratların koruyucu etkileri kanser dahil olmak üzere bir çok hastalıkta rol oynayan serbest radikal hasarına karşı rapor edildi. Boratların hücre replikasyonunda, kemik metabolizması, D vitamini biyo sentezinde ve beyin fonksiyonu üzerinde olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (Akdeniz ve ark., 2016). Çinko borat ise antioksidan ve antimutajenik özellikleri nedeniyle oksidanların neden olduğu hasarı azaltmada tıbbi amaçlı kullanım potansiyeline sahip etken madde olduğu görülmüştür (Aysel ve ark., 2019).

## **2.3. Grafen Hidrojeller'in Özellikleri ve Etkileri**

Grafen,  $sp^2$  bağlı olan karbon atomlarından oluşan tek atom kalınlığında düzgün altıgen formda düzenlenen bir karbon şeklidir. Grafenin benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı nanomalzeme olarak tıbbi alanlarda tedavi maksatlı kullanımda

büyük bir potansiyele sahip olabileceği bildirilmektedir (Lasocka ve ark., 2018). Özellikle grafen oksit sulu işlenebilirliği (hidrofilik), amfibiliği ve yüzeysel işlevselleştirilebilirliği nedeniyle biyotıp uygulamaları için umut verici bir malzeme olarak kabul edilir (Chung ve ark., 2013).

Radikal grafen oksit'in nano duvarlarının antibakteriyel etkisi Grafen oksit'inkine oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Grafen türevlerinin antibakteriyel etkisi membran bozulmasından kaynaklanan oksidatif stresten türetildiği ve grafen yüzeyinde bakteri büyümesinin inhibe edilmesinden ziyade arttığı görülmüştür (Chung ve ark., 2013).

Grafen hidrojellerin üretiminde ilk etapta Hummers metodu kullanılarak doğal grafit'in kuvvetli oksitleyiciler olan sülfürik asit( $H_2SO_4$ ), sodyum nitrat ( $NaNO_3$ ) ve potasyum permanganat ( $KMnO_4$ ) işlenmesiyle tek katmanlı grafit oksit tabakaları hazırlanmış olur (Hummers Jr & Offeman, 1958; Zhang & Shi, 2011). Grafen oksit katmanların sulu halleri hidrotermal içerisinde indirgenmesi ile GH-H oluşmaktadır. Üç boyutlu GH-H ve indirgenmiş GO tabakaları biyolojik uygulamalarda yüksek potansiyel sahip olduğu tespit edilmiştir (Li ve ark., 2010; Seger & Kamat, 2009).

Grafenin özellikleri bakımından yaraya uygulanabilirliği iyileştirme sürecini hızlandırdığı ve fibroblast hücreleri için potansiyel bir aday olarak belirlenmiştir (Lasocka ve ark., 2018). Grafen hidrojellerin yapışması ve çoğalması nedeniyle çeşitli yapışık hücreler ve doku mühendisliğinde kullanılabilir olduğu Kalbacova ve ark. (2014), tarafından hidrojen ile muamele edilmiş grafenin hidrofobik yüzeyinin oksijen ile muamele edilmiş grafenin hidrofilik yüzeyine oranla hücre canlılığı/poliferasyonuna daha çok olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (Kalbacova ve ark., 2014).

## 2.4. Biyouyumluluk

İnvitro biyouyumluluk değerlendirmelerinde en yaygın kullanılan yöntemlerinden biri de sitotoksisite testleridir. Hücre canlılığı testleri, test edilecek materyalin uygun hücre kültürü ortamında negatif ve pozitif kontrol materyali kullanılarak hücre büyüme veya hücre ölümü esas alınarak yapılan yöntemdir. Hücre-materyal temasında materyalin kendisi ile hücrenin aynı ortamda kullanılması ile yürütölmektedir (Craig & Hanks, 1990; Hanks ve ark., 1996).

İnvitro testlerin, invivo testlere oranla ortam şartlarının aynı olmamasıyla beraberinde test sonuçlarını tam yansıtamaması ve insan uygulanması zor olması, ayrıca insanlarda klinik kullanımının etik ve yasal problemleride beraberinde getirmektedir. Bu sebeple materyalin sitotoksisitelerinin değerlendirilmesinin ilk basamağını invitro testler oluşturmaktadır (Craig & Hanks, 1988; Naji & Harmand, 1990). İnvitro deneylerin kısa süreli olması önerilmektedir. Uzun süreli olduğunda ise materyalin biyolojik ortamda mikroorganizmalarla kontaminasyon ve ortam bileşenlerinde azalma gibi sonuçlar doğuracağından kültüre edilmiş hücrelerle ilgili sınırlamalardan dolayı literatürdeki çalışmalar göze alınarak çalışmanın 24., 48. ve 72. saatler sonunda değerlendirmeler yapılması hücre kültürünün özelliklerini koruması bakımından önem arz etmektedir (Heil ve ark., 2002; Nelson ve ark., 1999). MTT bileşiğinin toksisitesi muhtemelen hücrelere eklenen konsantrasyonla alakalı ve konsantrasyonun optimize edilmesi daha düşük toksisiteye neden olabilir. MTT'nin sitotoksik olması göz önüne alındığında, tahlil yönteminin bir son nokta tahlili olarak düşünölmeli gerekir. Yapılan araştırmalar sonucunda, formazan kristallerinin ekzositoz sırasında zarları delerek hücrelere zarar vermesine katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür (Riss ve ark., 2016).

## 2.5. Yara iyileşmesinde Mikrobiyolojik Yaklaşım

Yanık yada diğer yaralanmaların tedavisindeki en güncel yaklaşımlardan biri deri bütünlüğünün yeniden sağlanmasına kadar geçen sürede deriden enfeksiyon kaynaklarının organizmaya geçmemesini, sıvı ve elektrolit kaybının önlenmesini sağlayacak deri yerini tutabilecek materyallerin yada antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesidir. Özellikle yanık tedavisinde temel prensip yaranın temiz ve mikroorganizmalardan uzak tutulmasını sağlayacak örtülerle örtülmesidir. Lokal antibakteriyel uygulamalar yeterince olumlu sonuçlar doğuramamıştır. Çünkü bu maddelerin iyileşmekte olan dokulara özellikle de hassas olan deride iz bırakma gibi yan etkileri bulunmaktadır. Ayrıca sistemik antibiyotik kullanılması ise deride yeterli etkinlik gösterememektedir. Günümüzde yara örtüleri ile ilgili yeni yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yeni yaklaşımlardaki temel ilke ise deri iyileşmesini bozmayacak, azaltmayacak ve yanık tedavisindeki yanık pansumanlarında dokulara zarar vermeyecek yeni sistemleri geliştirilmesidir. Yaranın fizyolojik özelliklerine bağlı olarak (evre, derinlik, salgı miktarı, bakteriyel kontaminasyon) yara bantları ve örtüleri tek başlarına ya da kombinasyonları halinde uygulanabilmektedir. Kalsiyum alginat örtüler, poliüretan filmler, hidrokoloid örtüler ve köpükleri kapsayan çok sayıda yara örtüsü geliştirilmektedir. Bu tür ürünlerin amacı, enfeksiyonları engelleyerek ve iyileşme sürecine katkıda bulunarak tedavi sürecini hızlandırmaktır (Altay P, 2010). Gerçekleştireceğimiz bu çalışmada; borik asit ve çinko borat katkılı grafen hidrojel bazlı yara örtülerinin avantajlarını kullanarak yara iyileşmesi sürecinde iyileşmeyi hızlandıran, enfeksiyonları engelleyen, yaralarda iz bırakmayı en aza indiren ve böylece hastalara maksimum konforu sağlayan bor bileşiklerini içeren yeni yanık bant geliştirmesine yol açacak materyallerin in-vitro ön deneylerin yapılması planlanmıştır.

## 2.6. Hücre Kültürü

Canlı organizma dışı hormonal ve sinirsel tonusun olmadığı izole ortamlarda, canlı organizma mikro- ve makro-çevresi taklit edilerek hücrelerin belirli bir besi yerinde çoğaltılması prensibi ile yürütülen in-vitro çalışmalar olup klinik öncesi ilaç araştırmalarında tarama testleri de dahil olmak üzere bir çok alanda uygulanabilirliği olan bir yöntemdir. Bu yöntem aynı zamanda bilimsel araştırmalarda deney hayvanı kullanımını azaltmaktadır.

Johns Hopkins Üniversitesinde 1951'de Dr. George Gey agresif serviks adenokarsinomlu kadın hastadan tanı amaçlı alınan biyopsi örneğinden ilk defa insan kaynaklı ölümsüz (immortal) hücre hattını oluşturmayı başarmıştır ve ölen hastanın ismine ithafen (Henrietta Lacks) "HeLa" ismi verilerek tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda Çin hamster hücrelerinin elde edilmesi ile devam etmiş ve 1970'lerde güvenlik kabinlerinin geliştirilmesi ile hücre kültürü çalışmaları daha disipline hale gelmiştir. Bilimsel çalışmalar için oldukça avantaja sahip hücre kültürü çalışmaları in-vivo çalışmalara alt yapı niteliği taşımakta ve araştırılacak konunun ön çalışma bulgularının elde edilebileceği temel teknikler barındırmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları sırasıyla hücre çözme, besiyeri değiştirme (beslenme), alt kültürleme (pasajlama) ve hücre dondurma olmak üzere dört aşama uygulanmaktadır.

Hücre kültürü işlemleri steril oda içerisinde gerçekleştirilir. Hücre kültürü genel olarak; temel hücre biyolojisi ve ilaç etkileşimlerinin araştırılması, ilaç toksisite testleri, kimyasal veya bitkisel ajanların kanser hücreleri üzerinde etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda, aşı üretimi, ticari protein üretimi gibi geniş bir araştırma olanağı sunmaktadır (İplik & Çakmakoğlu, 2020).

## **2.7. L929 Fibroblast Hücre Hattı**

Fibroblastlar; kas lifi, bağ doku ve cilt gibi birçok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Fibroblastlar, pek çok hücre dışı matriks bileşeninin birincil kaynağı olduğu ve kollajen üreten hücreler olarak tanımlanırlar. Bu hücrelerin hücre dışı matriks bileşenlerinin salgılanmasında ve yara iyileşmesinde önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Evans ve ark., 2003; Theerakittayakorn & Bunprasert, 2011). Fibroblastlar, doku onarımı ve dokunun yeniden şekillenmesi için çok önemlidir, yara bölgesine göç eder ve çoğalırlar (Lasocka ve ark., 2018).

L929 hücre hatları genellikle madde malzeme biyoyumluluğu, sitotoksisite testleri ve hücre biyolojisi sistemleri gibi pek çok alandaki deneylerin gerçekleştirilmesinde ve standart testlerde çoğunlukla kullanılmaktadır. L929 hücreleri, sitotoksisite testlerinde ilk ve en yaygın kullanılan hücrelerden biridir. Bu hücreler, invitro kültürünün ve alt kültürlerinin kolay yapılabilmesi, hızlı üreme ve kolay saklanma özellikleri nedeniyle birçok maddenin sitotoksisite değerlendirmesinde kullanılan hücrelerdir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan fare fibroblast (L929) hücre hatları, sitotoksisite testlerinde kullanılacak standart hücre kültürü hattı olarak önerilmiştir (Theerakittayakorn & Bunprasert, 2011).

## **2.8. MTT Yöntemi**

Hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksisite belirleme yöntemlerinin başında günümüzde en yaygın kullanılan MTT testi gelmektedir. 1983'te Mosmann tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre canlılığı testlerinin "altın standardı" olarak adlandırılmaktadır. MTT testi invitro olarak sadece hücre değil doku kültürlerinde de kullanıma olanak sağlamaktadır. Deri korozyon, deri irritasyon ile göz irritasyon testlerinde de hücre canlılığı/proliferasyonu ölçümü için de kullanılmaktadır. Hücrelerin

fizyolojik durumu ve mitokondriyal dehidrogenazın farklı hücre tiplerindeki aktivite varyantlarını belirlemektedir (Erkekoğlu & Baydar, 2021).

MTT yönteminin avantajlı yanları şu şekilde; güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Ayrıca hem sitotoksitenin hem de hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılabilir. MTT yönteminin dezavantajları yönleri ise; MTT formazanlar suda çözülmez ve hücrelerde iğne şeklinde kristaller oluşturur. Bu nedenle, ölçümden hemen önce bu kristalleri çözmek gereklidir. İyi çözülme gerçekleşmezse ciddi absorbans farklılıkları görülebilir. MTT formazan kendisinde sitotoksiktir. MTT formazanlar nedeniyle gözlenen hücre ölümü için mutlaka kontrol kullanmak gereklidir ve böylece yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar önlenmiş olur. Hücreler MTT ile 2-4 saat kadar inkübe edilirler ve bekletildikleri süre içinde MTT'nin hücre canlılığını ne kadar etkileyebileceği bilinmemektedir. Özellikle ölen hücrelerin hücre kültüründen uzaklaştırılması MTT formazan kristalleri nedeniyle zorlaşabilir. MTT testinde kullanılan ürünün herhangi bir bileşeni ve uygulanan kimyasal madde MTT ile reaksiyona giriyorsa veya MTT'yi kendi indirgeyebiliyorsa, hücre canlılığının tespiti için farklı bir yöntemin belirlenmesi gereklidir (Erkekoğlu & Baydar, 2021). MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi metabolik aktivite potansiyelleriyle hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki değişikliklerin araştırıldığı sitotoksite yöntemlerinden biridir (José Ruiz ve ark., 2006).

## **2.9. Hücre Canlılığı/Proliferasyon**

Canlılık, yaşayan hücrelerin sayısını temsil eder. Canlı hücre sayısını doğrudan ölçen herhangi bir yöntem ve metabolik aktiviteyi veya toplam protein içeriğini ölçen yöntemler, canlılık için yeterli olarak kabul edilmiştir (Özkaya & Geyik, 2022).

MTT yöntemi hücre canlılığını ölçmede etkili bir yöntemdir. Mitokondride bulunan dehidrogenazların aktivitesini belirlemede yardımcı olur. Prolife olan

hücrelerin tetrazolyum ile formazan ürünlerinin renk değişimi absorban ölçümü ile belirlenir. Hücre canlılığı azaldığında mitokondriyal dehidrogenazların tetrazolyum tuzunu formazyaya çevirebilme yetenekleri azalır. Hücre sayısı ile formazan miktarı orantılı değişir. Bu değişim miktarı ile hücre canlılığı belirlenir (Ökçesiz & Bucurgat, 2017).

## **2.10. Sitotoksisite**

Canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Sitotoksisite testleri, toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre çoğalma oranı ve hücre üzerindeki toksik etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere denir. Toksik bir ajanın en yaygın olarak kabul edilen kapasitesi öldürme olduğundan bunu canlılığın azalması yerine hücre ölümü olarak da değerlendirilir ve hücre ölümünü gösteren kanıtları sitotoksisiteyi kanıtlamak için yeterli olarak kabul edilir (Özkaya & Geyik, 2022). Sitotoksisite testleri farklı biyomalzemeler üzerindeki sitotoksik etkiyi değerlendirmek ve biyoyumluluğu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitotoksisite tesleri biyoyumluluk testlerinin ilk adımı olarak belirlenmiştir. L929 hücreleri ile doğrudan temas yöntemi sitotoksisiteyi değerlendirmek için en çok başvurulanlardan biridir ve sitotoksisitenin in-vitro olarak değerlendirilmesinde bir tarama modelini temsil edebilir (Lasocka ve ark., 2018).

Son yıllarda oksidatif stresin hem savunma sisteminde hem de yara iyileşmesinde etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir.  $H_2O_2$  bir radikal değildir fakat hücrede önemli hasarlara yol açabilir (Aksoy & Özakpınar, 2014). Oluşan hasarın kardiyo vasküller, kanser, ateloskleroz ve yara iyileştirme süreçlerinde etkin bir rol oynadığı bilinmektedir (Çakır & Eren, 2016). Ayrıca  $H_2O_2$  kullanmak bir hücreyi tedavi etmede ve hücre hasarını etkin bir şekilde önlemede oksidatif strese bağlı hasar modelini oluşturmada yararlanılan en yaygın yöntemlerden biridir.  $H_2O_2$  ile oksidatif stresten kaynaklı sitotoksisiteyi araştırmak için en yaygın olarak kullanılan hücrelerden biride L929 fibroblast

hücreleridir. Ayrıca yara iyileşme sürecinde proliferatif fazı başlatmak için önemli bir etken olduğu düşünülür. (Çınar, 2020).

Sitotoksikite Yöntemleri;

1. **MTT yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]:** Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan mor renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir.
2. **Tripan mavisi yöntemi:** hücre canlılığının/sitotoksikitenin belirlenmesi için en sık kullanılan boyalardandır. Tripan mavisi, eozin, Kongo kırmızısı, eritrosin B testleri.
3. **Sülforodamin B yöntemi:** Kiton kırmızısı kullanılarak yapılan bir fluoresan boyama yöntemidir.
4. **WST yöntemi (2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu):** Bu yöntemde hücre proliferasyonu ve yaşama oranını kolorimetrik olarak tayin edilir.
5. **Klonojenik yöntem:** Mikrobiyolojik bir yöntemdir. Genellikle kanser araştırma laboratuvarlarında ilaçlar veya radyasyonun, tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılır.

### 2.11. İn Vitro Toksikite Testlerini Avantaj ve Dezavantajları

İn vitro toksisite testleri yeni bir ilaç etkin maddesinin toksisite potansiyelini belirlemek için izole edilmiş doku ve organ örnekleri ya da hücre kültürleri modelleri kullanılarak yapılan testlerdir (Borenfreund & Borrero, 1984).

İn vitro sistemlerin avantajları;

- Bu testlerin uygulanması kolaydır ve hızlı sonuç alınır.
- Daha az miktarda test maddesi gerektirir.
- Kontrollü test koşulları sağlanabilir ve sistematik etkiler azaltılabilir.

- Deneyleler arasındaki değişkenliğin azaltılması,
- Zamana bağlı çalışmalar yapılabilir ve numuneler alınabilir.
- Sınırlı miktarda zehirli atık üretiliyor.
- Hayvanlar üzerinde yapılan testlerin azaltılması,
- Maliyetleri düşüktür.
- Bu testlerle insan ve hayvanlardan izole edilmiş doku, hücre ve insan geni taşıyan transgenik hücreler kullanılabilir.
- Aynı dozlardaki test maddesinin etkisi farklı doku ve hücrelerde araştırılabilir (Spielmann ve ark., 2008).

İn vitro sistemlerin dezavantajları ise;

- Test maddelerinin farmakokinetik özellikleri tam olarak değerlendirilemez.
- İlaç metabolizması hakkında bilgi sınırlıdır.
- Sistemik etkiler ve yan etkiler değerlendirilemez.
- Kronik etkiler test edilemez.
- Doku ve organlar arası etkileşimler ve spesifik organ duyarlılığı değerlendirilemez (Spielmann ve ark., 2008).

## **2.12. Yara İyileşmesinde Migrasyon**

Migrasyon, yara iyileşmesi testi olarak bilinir. Hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir hücre kültürü tekniğidir. Bu teknik aynı zamanda çizik deneyi olarak da adlandırılır. Genellikle L929 hücre hattı, %10 FBS içeren DMEM besiyeri bulunan T75cm<sup>2</sup> flasklara ekilir, standart hücre sayısına ulaştırılır ve hücre sayımı yapılır, steril pipet ucu ile kuyucuk (well) tabanında bir çizik oluşturularak ve bu çiziklerin belirli periyotlarda Inverted Mikroskop'un merceği kullanılarak görüntüsü alınarak yapılır (ınar, 2020). Hücre göçü yara bölgesine göç eden hücrelerin çizici

kapatma oranı ölçülerek değerlendirilir (Lasocka ve ark., 2018). Yara iyileşmesi için standart bir test olarak kabul edilir.



### 3. MATERYAL VE METOT

Bu yüksek lisans tezi kapsamında aşağıdaki başlıklarda yapılacaktır.

Borik asit ve çinko borat ile katkılanmış grafen hidrojenlerin sentezi ve yapısal karakterizasyonlarının tanımlanması,

Borik asit, çinko borat ve katkılı grafen hidrojenlerin antimikrobiyal etkinliğı ve biyoyumluğunun gösterilmesi,

Son olarak borik asit, çinko borat ve katkılı grafen hidrojenlerin L929 fare fibroblast hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkinliğinde sitotoksikite etkinliğinin belirlenmesi ve hücre iyileşmesinde rolünün migrasyon yara iyileşme testi ile gösterilmesidir.

“Borik Asit ve inko Borat Katkılı Grafen Hidrojenlerin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sitotoksitesinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi” (İn-vitro) araştırma alışması Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Etik Kurulu tarafından 07 Haziran 2022 tarih ve 22001170302 sayılı yazısı ekleri ile görüşüldü ve 28 Haziran 2022 tarihinde etik kurallarına uygunluğı onaylanmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Grafen aerogellerin sentezi için (projede hidrojel olarak ifade edilmiştir) modifiye Hummers metodu kullanılarak indirgenmiş grafen oksit sentezlendi. Modifiye Hummers metodunda kullanılan kimyasallar ticari olarak satın alındı. Grafen aerogellerin sentezi için kullanılan kimyasallar (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KMnO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, doğal grafit tabakaları (325 mesh), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Alfa Aesar® firmasından ve diğeri tüm kimyasal ve çözeltiler standart grade kimyasallar kullanılmıştır. Ayrıca, grafen aerogellere emdirilen çinko borat ve borik asit ise T.C. Eti Maden İşletmeleri A.Ş.’den temin edildi.

**Tablo 3.1.** Bileşiklerin sentezinde, saflaştırılmasında ve kimyasal analizlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasalın Adı	Menşei	Kimyasalın Adı	Menşei
Fosfor Pentoksit ( $P_2O_5$ )	Merck	Doğal Grafit (C)	Merck
Potasyum Permanganat ( $KMnO_4$ )	Merck	Borik Asit ( $H_3BO_3$ ) Çinko Borat ( $2ZnO.3B_2O_3.3,5H_2O$ )	Merck
Sodyum Nitrat ( $NaNO_3$ )	Merck		Merck
Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )	Merck		

### 3.2. Aletsel Analiz Metodları

Projede sentezi gerçekleştirilen grafen hidrojel, belirtilen borik asit dozları %1,5 ve %3 ile katkılanan grafen hidrojel ve belirtilen çinko borat dozları %4,5 ve %9 ile katkılanan grafen hidrojel sentezleri gerçekleştirilerek, elde edilen malzemelerin yapısal karakterizasyonu ileri analitik yöntemler ile gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen tüm analizler Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde bulunan cihazlar ile hizmet karşılığında yapıldı. Sentezlenen grafen oksit, grafen hidrojelleri, grafen/polimer hidrojelleri, bor katkılı hidrojellerin yapısal tanımlamaları, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) yapıldı. Sentezi gerçekleştirilen grafen hidrojellerin aerojel yapısına dönüşmesi için CHRIST marka Alpha 1-4 Ldplus (liyofilizator) cihazı kullanıldı.

### 3.3. Grafen aerojellerin sentezi

Grafen hidrojeller (aerojel) ticari olarak satın alınan doğal grafit tabaklarından başlanarak 3 basamaklı bir metot ile sentezlendi. Sentezin ilk aşamasında doğal grafit

tabakalarının ön oksitlenmesi gerçekleştirildi. Kullanılan metotta doğal grafit tabakaları sülfirik asit içerisinde  $P_2O_5$  ve  $Na_2S_2O_8$  çözeltisinde 6 saat boyunca  $80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de karıştırma işlemi yapıldı. Karıştırma sonunda ön oksidasyona maruz bırakılan grafit tabakaları saflaştırılıp, ikinci oksidasyon basamağı gerçekleştirildi. Bu aşamada ise ön oksitlenmiş grafit yine sülfirik asit içerisinde dispers edilip  $NaNO_3$  ve  $KMnO_4$  ile buz banyosunda 3 saat boyunca karıştırıldıktan sonra yine buz banyosu içerisinde oluşan karışımın üzerine  $H_2O_2$  eklendi. Daha sonra 50 ml su ilavesi yapıldıktan sonra oluşan grafen oksit vakum altında süzme işlemi ile saflaştırıldı. Modifiye edilmiş Hummers methodu ile elde edilen grafen oksit kullanılarak yüksek sıcaklık ve basınca karşı dayanıklı olan teflon astarlı paslanmaz çelik bir reaktör içerisinde grafen oksitin sulu çözeltisinin hidrotermal olarak indirgenmesi yolu ile grafen hidrojenlerin sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen grafen hidrojenlerin liyofilizatör yardımı ile kurutulması ile grafen hidrojenler hazırlandı. Aşağıda gerçekleştirilen sentezlerin deneysel detayları sunulmaktadır (Yuxi ve ark., 2010).

### **3.3.1. Modifiye Mummer Methodu ile Grafit Oksit Sentezi**

5,0 g doğal grafit tabakaları (325 mesh parçacık boyutunda), 2,5 g  $K_2S_2O_8$  and 2,5 g  $P_2O_5$  12 ml derişik  $H_2SO_4$  içerisinde karıştırıldı. Oluşan karışım  $80\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ısıtıldı ve bu sıcaklıkta 5 saat bekletildi. Süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutuldu ve 500 mL distile su ile seyreltildi ve bir gece boyunca bekletildi. Elde edilen katı kısım vakum filtrasyonu yolu ile karışımdan ayrıldı ve havada kurutuldu. Böylece ön-oksitlemeye uğratılmış grafit tabakaları elde edildi. Daha sonra elde edilen ön-oksitlenmiş grafit tabakalarından 1.0 g alındı, 1.0 g  $NaNO_3$  ilavesinden sonra 50 ml  $H_2SO_4$  içerisinde dipsers edilerek karışımın sıcaklığı buz banyosu yardımı ile  $2-3\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye düşürüldü. Bu sıcaklıkta 6,0 g  $KMnO_4$  karışım üzerine yavaş yavaş eklenerek, karışımın aynı sıcaklıkta şiddetli bir şekilde manyetik karıştırıcı vasıtasıyla karıştırılması sağlandı. Daha sonra

karışımın sıcaklığı 35 °C'ye çıkartıldı ve bu sıcaklıkta 3 saat karıştırıldı. Süre sonunda 100 ml su karışım üzerine kontrollü bir şekilde ilave edildi. Oluşan karışım üzerine 8 ml %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Karışımın rengi açık parlak sarı renge dönüştü. Son olarak oluşan katı madde vakum filtrasyonu ile süzüldü ve 1:10 HCl çözeltisi ve takip eden su ilavesiyle yıkandı. Elde edilen katı vakum altında kurutuldu (Göksu ve ark., 2014; Meral & Metin, 2014; Metin ve ark., 2014).

### **3.3.2. Grafen Oksit Kullanılarak Yapılan Grafen Hidrojel Sentezi**

0.2 g grafit oksit 80 ml saf su içinde sonikasyon yardımıyla çözülerek homojen grafen oksit çözeltisi hazırlandı. Oluşan çözelti hidrotermal reaktör içerisine konularak 180 oC'de, 18 saat boyunca otoklav içerisinde muamele edildi. Grafen oksit çözeltisinin başlangıç parlak sarı rengi, grafen hidrojel oluşumu nedeniyle siyah silindirik yapılar elde edildi. Sentezlenen grafen hidrojellerin, arojel yapısına dönüşmesi için -80°C'de bir gece boyunca dondurulma işlemi yapılarak liyofilizatör cihazında vakumlama işlemine hazır hale getirildi. Liyofilizatör cihazında 0.630 mbar vakum ortamında gece boyu (12 saat) kurutma işlemi yapılarak grafen hidrojeller hazır hale getirildi.

### **3.3.3. Grafen Hidrojellere Borik Asit ve Çinko Borat Emdirilmesi**

Sentezi gerçekleştirilen grafen hidrojellerin %1,5 ve %3 borik asit içeren sulu çözeltileri hazırlandı. Borik asit çözeltilerinde %1,5 borik asit içeren çözelti için hazırlanma işlemi ise 10 ml saf su içerisine 150 mg borik asit eklendi ve çözünme yapıldıktan sonra grafen arojeler emdirilme işlemi yapılarak kurutuldu. %3 borik asit içeren çözeltilerde ise 10 ml saf su içerisine 300 mg borik asit ilave edilerek çözünme işlemi yapıldıktan sonra grafen arojeler emdirildi. Ayrıca %4.5 ve %9 çinko borat içeren sulu çözeltiler hazırlandı. Hazırlanma aşamasında çinko borat'ın suda çözünürlüğü olmadığı için zayıf asit olan asetik asit, eser miktarda kullanılarak seyreltik asetik asit sulu çözeltisi hazırlandı. Çinko borat'ın çözünmesi sağlandıktan sonra grafen arojellere emdirilme

işlemi yapıldı. %4,5 çinko borat çözeltisi için, 10 ml %4,5'lik asetik asit çözeltisi içinde 450 mg çinko borat çözündürüldü ve grafen aerojellere emdirildi. %9 çinko borat çözeltisi için, 10 ml %9'luk asetik asit çözeltisi içinde 900 mg çinko borat çözündürüldü ve grafen hidrojellere emdirildi.

### **3.3.4. Sentezlenen Malzemelerin Yapısal Tanımlamaları**

Proje kapsamında sentezlenen grafen oksit, grafen hidrojelleri, grafen/polimer hidrojelleri, bor katkılı hidrojellerin yapısal tanımlamaların Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde yapılacaktır. DAYTAM'da yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (HR-SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile yapısal tanımlamalar yapıldı.

### **3.4. Mikrobiyolojik Analizler**

#### **3.4.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması**

Sentezlenmiş grafen hidrojel, BA ve ÇB katkılı grafen hidrojeller'in antimikrobiyal etkinlikleri 11 farklı mikroorganizma ile belirlendi. Antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16888 standart mikroorganizma suşları ve bir klinik izolat olan *Serratia mercenscens* ile gerçekleştirildi. Öncelikle çalışma vakti gelinceye kadar -80 °C'de saklanan tüm mikroorganizmaların canlandırmaları yapıldı. Bunun için mikroorganizmalar Triptik Soy Broth besiyerine ekilip 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. Ardından her bir mikroorganizma çoğalmasına uygun katı besiyerine aktarılarak (Eosin

Methylen Bule agar, koyun kanlı agar, Sabouraud Dextrose agar) 37 °C’de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

### **3.4.2. Sentezlenmiş Grafen Hidrojel, BA ve ÇB katkılı Grafen Hidrojeller’in Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi**

Hidrojellerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için ilk planlanan yöntem kuyucuk difüzyon yöntemi idi. (Bu yöntem besiyeri yüzeyinde açılan kuyucuklara etkinliği araştırılacak maddenin doldurulması ve tıpkı disk difüzyon testindeki gibi maddenin besiyeri içine difüze olarak mikroorganizma üremesini inhibe etme esasına dayanan bir testtir) Ancak çalışmalar esnasında hidrojellerin yapısının kuyucuk difüzyon yöntemi için uygun olmadığı ve ayrıca disk difüzyon testi neticesinde BA ve ÇB’nin agara difüze olmadığı anlaşıldığından dolayı hidrojellerin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi için yeni bir yöntem tasarlandı. Tasarlanan bu yeni yöntemde hidrojellerle belli süre aynı besiyerinde bekletilen mikroorganizmaların sayısında azalma olup olmayacağını tespiti amaçlandı. Bu yöntemde %3’lük ve %1.5’lik BA, %9 ve %4.5 ÇB emdirilmiş hidrojellerden ve kontrol için madde emdirilmemiş hidrojellerden 5’er mg tartılarak sıvı besiyerinde (bakteriler için Mueller Hinton Broth besiyeri, mantarlar için RPMI medium) süspanse edildi. Ardından her mikroorganizma için ayrı tüplere aktarılan süspanسیونların üzerine 0.5 MC Farland bulanıklığa ayarlanmış mikroorganizmalardan ( $1 \times 10^8$  colony-forming unit (CFU)/mL) 50 µL eklendi. Etüvde 35°C’de inkübe edilen her bir tüpten 0. ve 24. saatlerde ölçülü öze ile eşit miktarlarda katı besiyerlerine ekimler yapılarak mikroorganizma sayılarında azalma olup olmadığı kontrol edildi.

### **3.5. Sentezlenmiş Grafen Hidrojel, BA ve ÇB katkılı Grafen Hidrojeller’in Biyoyumluluk Testi**

Yeditepe Üniversitesi YÜEF-İKTAL hücre kültürü laboratuvarlarına iletilen Katkısız/Boş/Saf Grafen Hidrojel, %1.5 borik asit katkılı grafen hidrojel, %3 borik asit

katkılı grafen hidrojel, %4.5 çinko borat katkılı grafen hidrojel ve %9 çinko borat katkılı grafen hidrojel numuneleri için, OECD 439: İn-vitro Deri Tahrişi: Yeniden Oluşturulmuş İnsan Epidermisi Deney Yöntemi (İN-vitro Skin friction: Reconstructed Human Epidermis Test) rehberine göre deri iritasyon testi yapılmıştır.

### 3.5.1. EPI-200-SIT Testi

Epiderm SIT hayvan deri iritasyon testine alternatif olarak geliştirilmiş ve Avrupa Alternatif Yöntemlerin Tasdiki Merkezi (ECVAM) tarafından valide edilmiş bir modeldir. Bu testte doku kültürü ile elde edilen çok tabakalı yüksek farklılaşmış üç boyutlu yapay epiderma da testler yapılmaktadır (Kandarova ve ark., 2009). Numunelerin analizi EPI-200-SIT kit prosedürüne göre laboratuvar ortamında yeniden yapılandırılmış üç boyutlu insan deri modeli üzerinde her numune için 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. Analize başlamadan önce, numunelerin MTT ile girişim yapıp yapmadığı kontrol edildi. 25 mg numune 300 ul distile su ile çözüldükten sonra  $37\pm 1$  °C'de 60 dakika boyunca inkübe edilip renk oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bir diğer kontrolde ise, 25 mg numune 1 ml MTT solüsyonu ile  $37\pm 1$  °C'de 60 dakika boyunca inkübe edilerek mor/mavi renk oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

İnsan deri modeli üzerinde yapılan bu çalışmada, test edilen numunenin hücrelerin canlılığına etkisi negatif (DPBS) ve pozitif kontrol (SDS) ile eş zamanlı ölçüldü. Hücre canlılığı ölçümü için, mitokondride bulunan dehidrojenaz enzimi aracılığıyla MTT [(3,4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil tetrazolium bromür] maddesi mor renkte olan formazan tuzuna dönüştürüldü ve dokudan izopropil alkol aracılığıyla ekstre edildikten sonra kantitatif olarak spektrofotometrede 96 kuyucuklu plak okuyucu ile 570 nm'de ölçüldü. İncelenen numunelerde canlı hücre sayısı negatif kontroldeki canlı hücre sayısına oranlandı. Numunenin testi geçebilmesi için numuneye maruziyet sonucu

ölçülen canlı hücre sayısının negatif kontroldeki canlı hücre sayısına oranının >50% olması gerekir.

### **3.6. Hücre Kültürü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidatif Stres Proliferasyon Testi**

Grafen hidrojel (GH), %1.5 ve %3 katkılı borik asit (GH-BA %1.5 ve %3), %4.5 ve %9 katkılı çinko borat (GH-ÇB %4.5 ve %9)'in 2 mg/ml'den 0.062 mg/ml arasındaki konsantrasyonunda yüzde olarak sunulduğunda (GH için % 0.2-0.013, BA için yüzde olarak %3 - % 0.094, ÇB için %9 - %0.28) ve steril edilerek hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile oluşturulmuş hücre proliferasyon ve oksidatif strese karşı testi yapıldı.

#### **3.6.1 Hücre Kültürü Optimizasyonu**

American Type Culture Collection (ATCC, USA)'dan temin edilen ve Cryotube de bulunan L929 hücre hattı, sıvı azot tankından çıkarılarak %10 FBS içeren DMEM besiyeri bulunan T75 cm<sup>2</sup> flaska ekildi ve 37°C'te , %90 nemlilikte %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Hücreler ard arda pasajlanarak dördüncü pasajdan sonra hücre sayımı yapıp 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5x10<sup>3</sup> hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi için 24 saat boyunca CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda ilaç ekimi yapılarak 24, 48, 72. saatler için MTT yöntemi ile mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi.

#### **3.6.2. Hücre kültürü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidatif Stres Testi**

L929 hücreleri tekrar pasajlandıktan sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücrede oluşturduğu oksidatif strese karşı Borik Asit ve Çinko Borat'ın koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacı ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mM) konsantrasyonları ile GH %0.2, GH-BA %1.5 ve %3, GH-ÇB %4.5 ve %9 oranlarındaki katkılanmış ve katkılanmamış grafenler ön denemeler sonucu hücrelerde görünüme en az girişim yapacak dilüsyon olan

2 mg/ml'den 0.062 mg/ml'ye kadar ve 6 konsantrasyonda (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062) L929 hücreleri üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile incelendi. 96 kuyucuklu plakaya ekim yapıldı. 24 saat sonra, hücreler farklı konsantrasyonlardaki Borik Asit ve Çinko Borat'a maruz bırakıldı ve 3 saat sonra da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mM) ortama ilave edildi. Sonrasında 24, 48 ve 72 saatlerde hücelere MTT yöntemi ile mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi.

### 3.6.3. Hücre Migrasyon Testi

Migrasyon (yara iyileşmesi) testi, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir hücre kültürü tekniğidir. Bu teknik aynı zamanda çizik deneyi olarak da adlandırılır. Kuyucuk (well) tabanında bir çizik oluşturularak ve bu çiziklerin belirli periyotlarda görüntüsü alınarak yapılır.

American Type Culture Collection (ATCC, USA)'dan temin edilen ve Cryotube'de bulunan L929 hücre hattı, sıvı azot tankından çıkarılarak %10 FBS içeren DMEM besiyeri bulunan T75cm<sup>2</sup> flaslara ekildi ve 37°C'te, %90 nemlilikte, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Dördüncü pasajdan sonra hücre sayımı yapılarak yirmi dört kuyucuklu flaslara her kuyucuğuna 20.000 hücre olacak şekilde yirmi dört kuyucuklu flaslara ekildi. Hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi için 24 saat boyunca CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilerek kuyucuk tabanında boşluk kalmayacak şekilde yerleştiği gözlemlendi. Daha sonra steril pipet ucu ile tabanda çap oluşturacak şekilde boş bir hat oluşturuldu. Deneyin 0. (sıfırıncı) saati olarak belirtilen bu sürede Leica Inverted Mikroskop'un (Leica, DMIL LED) 10X merceği kullanılarak her bir kuyucuğun görüntüleri çekildi.

Borik asit ve çinko boratın, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testinde kullanılan GH, GH-BA %1.5 ve %3 ve GH-ÇB

%4.5 ve %9 oralarındaki katkılanmış ve katkılanmamış grafenler daha önce ön denemeler sonucu hücrelerde görünümüne en az girişim yapacak dilüsyon olan 2 mg/ml'den 0.062 mg/ml'ye kadar 6 konsantrasyonda (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062) migrasyon testinde de kullanıldı. Sıfırıncı saat görüntüleri alındıktan hemen sonra her bir konsantrasyondaki BA ve ÇB uygulaması L929 hücrelerinin bulunduğu her bir kuyucuğa yapıldı. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla da yine L929 hücrelerinin bulunduğu iki kuyucuğa hiçbir uygulama yapılmadı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Sentez Analizleri

#### 4.1.1. Grafen Hidrojellerin Sentezi

Grafen oksitlen hidrotermal işleme tabi tutulması sonunda reaktörden siyah ve silindirik grafen hidrojelleri elde edildi. Vakumla dondurarak kurutmadan sonra, ortaya çıkan grafen hidrojellerin boyutlarında veya şekillerinde Şekil 4.1. görüldüğü gibi herhangi bir değişiklik görülmedi. Elde edilen silindirik grafen aerojeller 1,3 cm eninde ve 2,8 cm boyundadır. Daha sonra grafen aerojellere sıvı faz emdirme metodu ile ağırlıkça farklı oranlarda borik asit ve çinko borat katkılanması yapıldı.

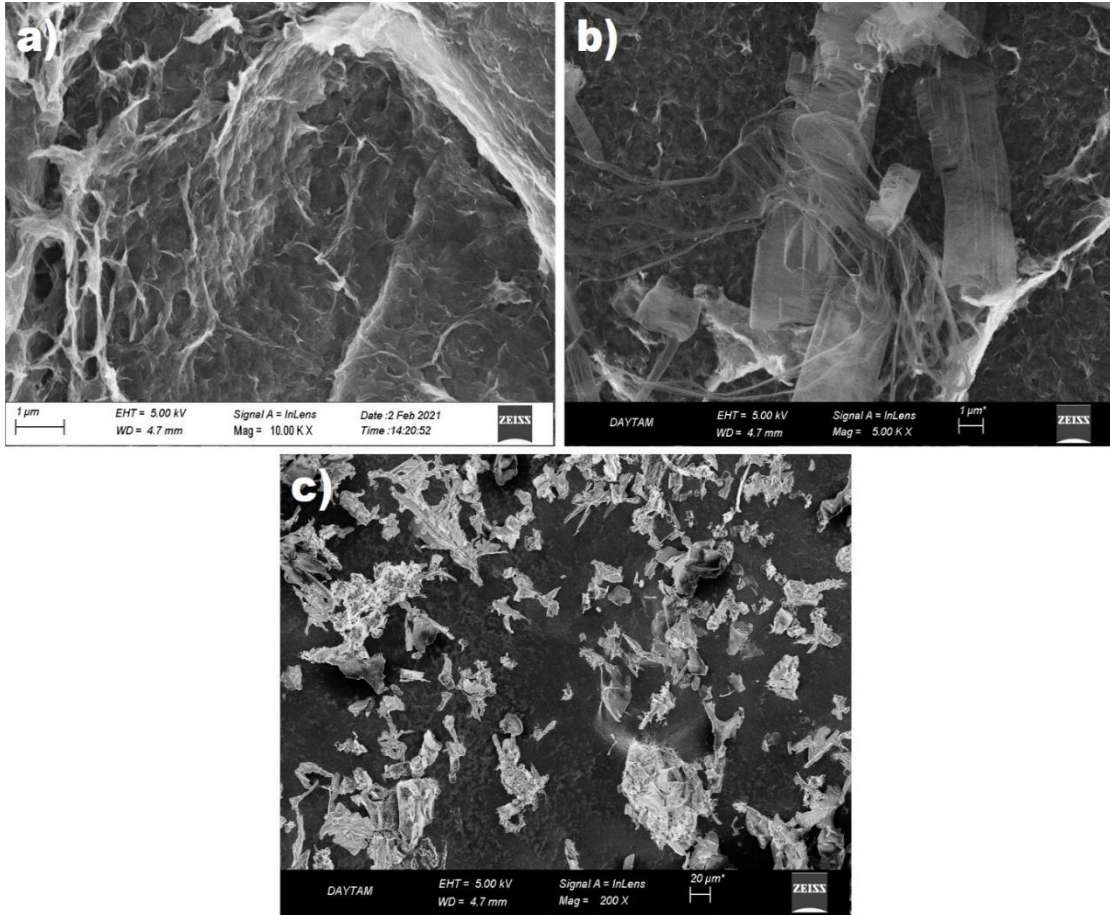


Şekil 4.1. Liyofilizatörde kurutma sonrası grafen hidrojeller

#### 4.1.2. Sentezlenen Malzemelerin Yapısal Tanımlamaları

Boş grafen hidrojeller ile borik asit ve çinko borat katkılanmış grafen hidrojellerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelendi. Şekil 4.2.'de hazırlanan malzemelere ait SEM görüntüleri gösterilmektedir. Şekil 4.2.-A'da grafitten başlanarak sentezlenen grafen hidrojellerin ince bükülmüş grafen yapraklarına ve mezo-gözeneklere sahip ağımsı bir yapıda olduğu görülmektedir. Şekil 4.2.-B'de ise borik asit katkılanmış grafen hidrojelde, borik asit katkılanması sonrasında grafen hidrojellere ait gözenekli yapısının kaybolduğu ama ağımsı yapının korunduğu ve borik asit kristallerinin grafen hidrojel ince yaprakları arasına başarıyla katıldığı görülmektedir. Ancak katkılanan borik asit kristallerinin

düzensiz şekillere sahip mikron boyutunda oldukları görülmektedir. Diğer taraftan Şekil 4.2.-C’de ise çinko borat katkılanması sonucu grafen hidrojel başlangıç yapısının gözenekleri haricinde korunduğu ve çinko borat kristallerinin grafen aerojel yapısına başarıyla entegre edildiği anlaşılmaktadır. Katkılanan çinko borat kristallerinin de borik asit kristalleri gibi mikron boyutunda oldukları net bir biçimde görünmektedir.

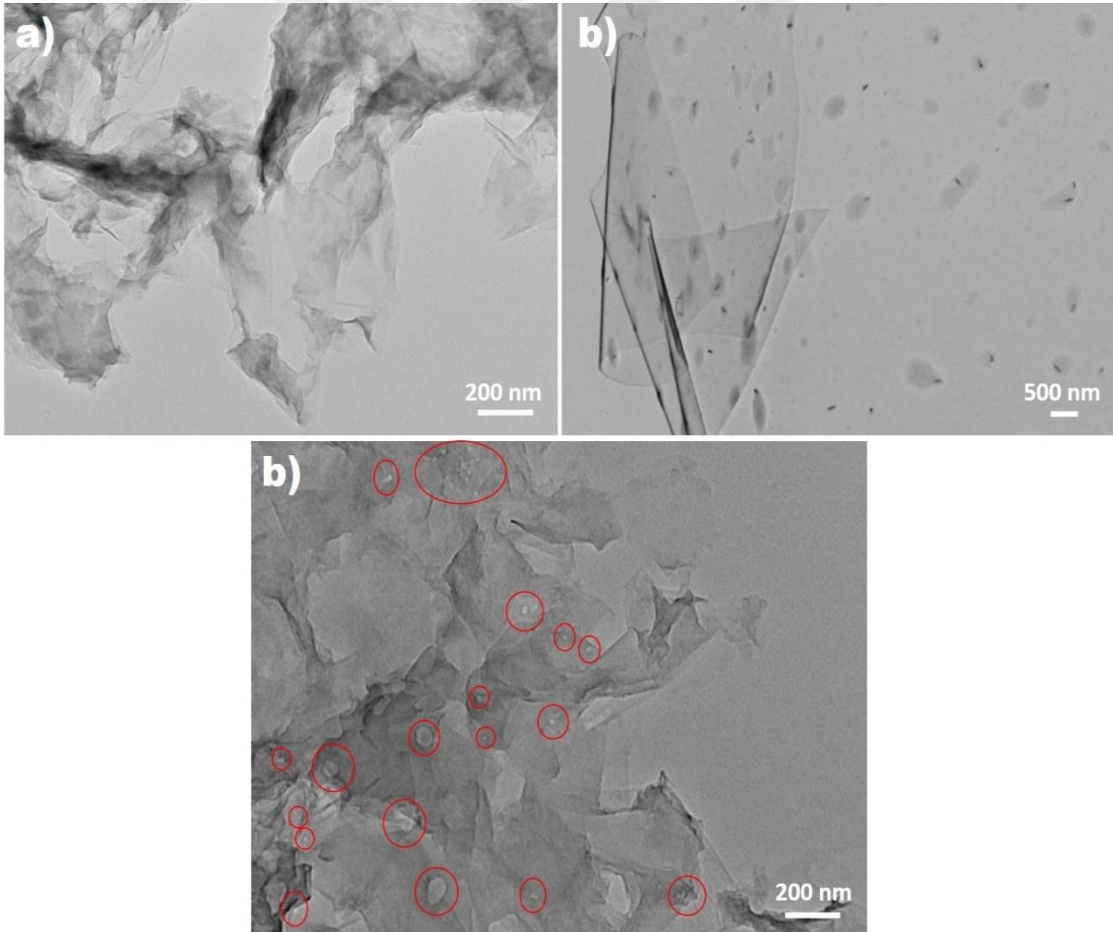


(a) Boş grafen hidrojel, b) ağırlıkça %1,5 borik asit katkılanmış grafen hidrojel ve c) ağırlıkça %3 çinko borat katkılanmış grafen hidrojellere ait SEM görüntüleri)

#### Şekil 4.2. Borik asit, çinko borat katkılanmış grafen hidrojel SEM görüntüleri

Yukarıda SEM görüntüleri sunulan ve açıklamaları verilen üç malzemenin TEM görüntüleri Şekil 4.3.’de sunulmaktadır. Şekil 4.3.-A’den boş grafen hidrojellerin kıvrımlı grafen filmlerden oluştuğu, kıvrılmış filmin yarı saydam yapısı, filmin nispeten ince olduğunu ve dolayısıyla grafen katmanlarının sayısının az olduğunu göstermektedir.

Bu kıvrılmış ince filmler arasındaki boşluk mikrometre kanallarını oluşturmakta ve bu da son derece makro gözenekli yapının ve grafen hidrojellerin ultra hafif ağırlıkta olmasını sağlamaktadır. Borik asit katkılanması Şekil 4.3.-B’de sunulan TEM görüntüsünden net olarak anlaşılmaktadır. Borik asit kristalleri grafen aerojel ince yapraksı tabakaları arasında düzgün bir şekilde dağılmışlardır. Borik asit kristallerini parçacık boyutları 0,5-2  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. Çinko borat katkılanmış grafen aerojel yapısında mevcut durum söz konusudur. Ancak çinko borat kristallerinin ince kıvrılmış grafen yaprakları arasında daha düzgün dağılmış, borik asit kristallerine göre çok daha küçük parçacık boyutlarında oldukları görülmektedir (Kırmızı daire içerisine alınmış parçacıklar çinko borat kristalleridir).



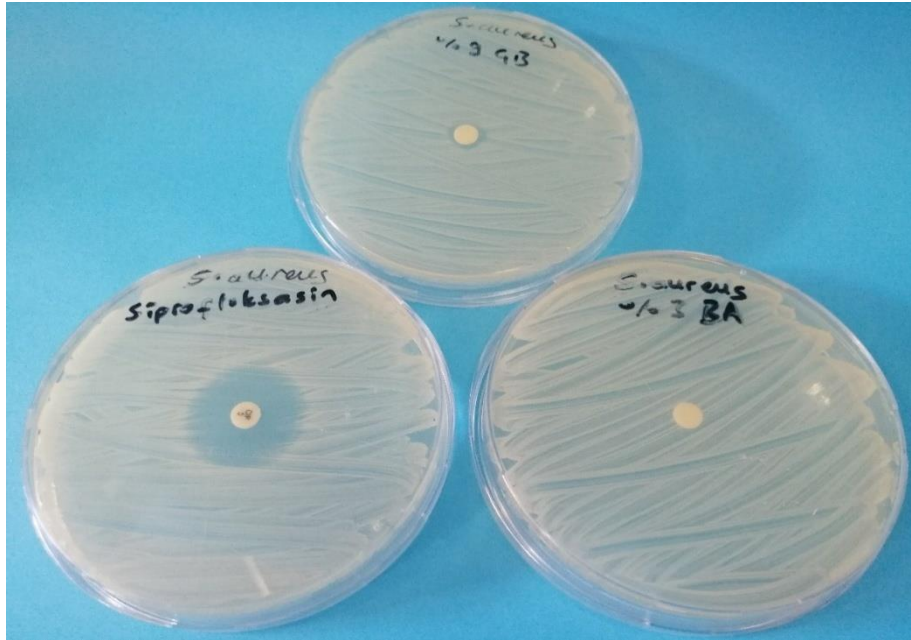
(a) Boş grafen hidrojel, b) ağırlıkça %1,5 borik asit katkılanmış grafen hidrojel ve c) ağırlıkça %3 çinko borat katkılanmış grafen hidrojellere ait TEM görüntüleri

**Şekil 4.3.** Borik asit, çinko borat katkılanmış grafen hidrojel TEM görüntüleri

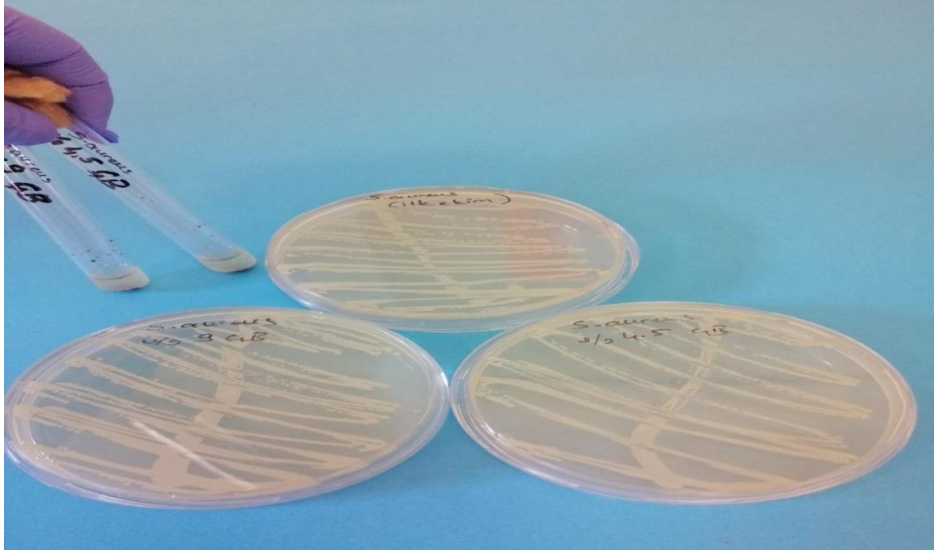
## 4.2. Mikrobiyoloji Testler

Tekrar edilen borik asit ve çinko boratın antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için yapılan testlerden biri olan disk difüzyon testinde hiçbir diskin etrafında zon çapı oluşmadığı, siprofloksasin antibiyotik diskleri etrafında ise zon çaplarının oluştuğu gözlemlendi. Disklere emdirilen maddelerin agar içine difüze olarak disklerin etrafında mikroorganizmaların üremesinin inhibisyonuna dayanan bu testin tekrarında da sonucun değişmemiş olması BA ve ÇB'nin agar içine difüze olamamasına dair yorumumuzu güçlendirdi. Şekil 4.4.'de disk difüzyon testi sonuçlarından bir örnek görülmektedir.

Hidrojellerin etkinliğini belirlemek için yapılan test sonuçları da grafen hidrojel ve BA ve ÇB katkılanmış hidrojellerin bakteri sayısını azaltıcı bir etki göstermediği dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik göstermediği sonucuna varıldı. Şekil 4.4. ve Şekil 4.5'de hidrojellerin antimikrobiyal etkinlik çalışması sonuçlarından bir örnek görülmektedir.



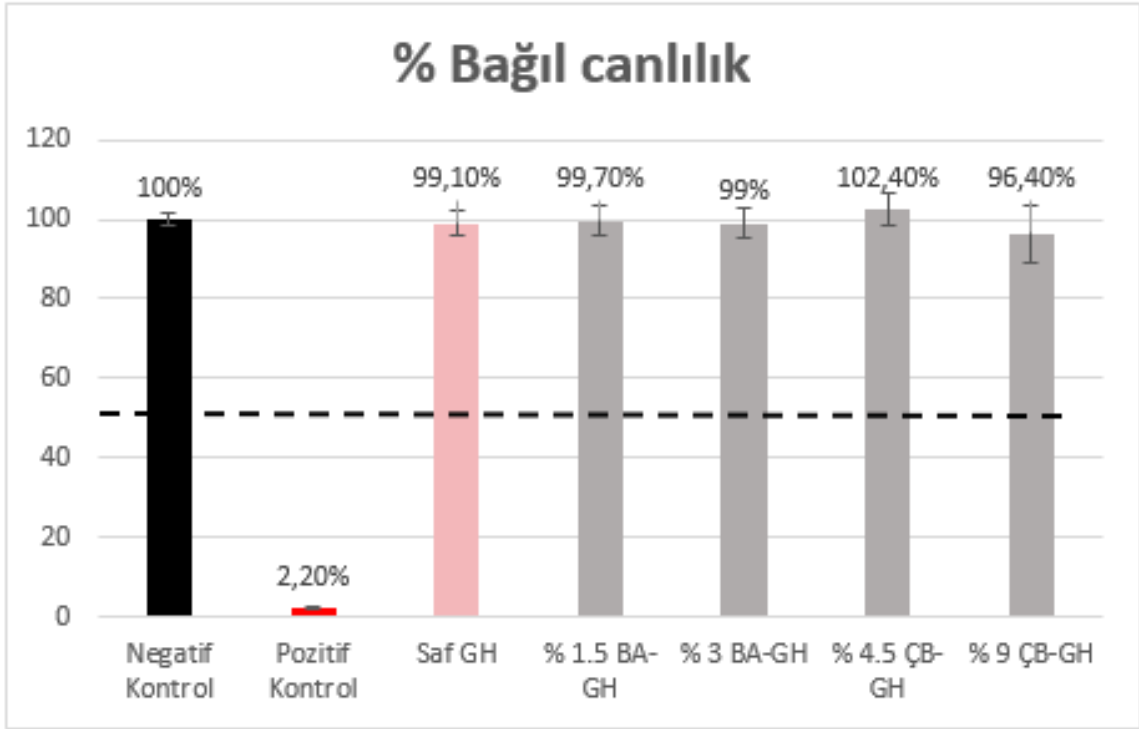
Şekil 4.4. Disk difüzyon testi sonuçlarından bir örnek



**Şekil 4.5.** Hidrojellerin antimikobiyal etkinlik çalışması sonuçlarından bir örnek

### **4.3. İn-vitro Epiderm Tm Deri İrritasyon Testi (SIT) Biyouyumluluk Testleri**

Elde edilen test sonuçlarına göre, test edilen GH, GH-BA % 1.5, GH-BA % 3, GH-ÇB % 4.5 ve GH-ÇB % 9 beş hidrojel formülasyonlarının hiçbir iritasyona neden olmadı. Hidrojellere maruz kalma nedeniyle ortalama bağıl canlılık, negatif kontrollerin ortalama canlılığının %50'sinin altına düşmediği belirlenmiştir (Şekil 4.5.). Pozitif kontrol (%5 SDS) de üreticinin protokolüne göre kabul edilen aralık (%20'nin altında bağıl canlılık) kriterindeydi. Sonuç olarak, her iki hidrojel formülasyonunun da cilt tahrişine neden olmadığı ve yara iyileşmesinde güvenle kullanılabileceği bu testin sonucuna göre ifade edilebilir (Kandarova ve ark., 2018; OECD. Test No.439, 2021).

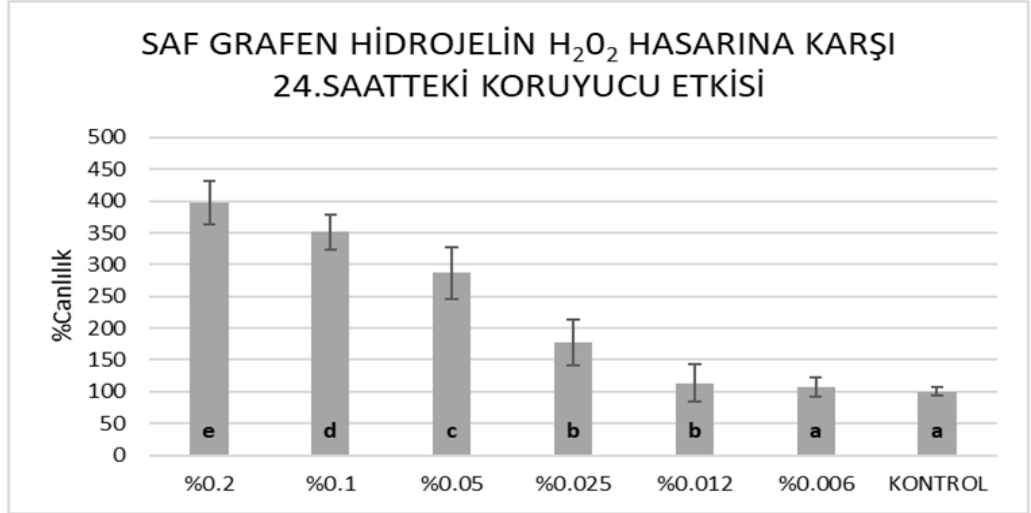


Sonuçlar, üç ayrı dokunun ortalama + SD'sini temsil eder. NC: negatif kontrol (DPBS); PC: pozitif kontrol (%5 SDS); 1: Boş grafen hidrojel; 2: %1,5 grafen hidrojel içeren borik asit; 3: %3 grafen hidrojel içeren borik asit; 4: %4,5 grafen hidrojel içeren çinko borat; 5: %9 çinko borat içeren grafen Hidrojel.

**Şekil 4.6.** İn-vitro epiderm tm deri irritasyon testi (SIT) biyoyumluluk testi

#### 4.4. Hücre Kültürü Proliferasyon ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oksidatif Stres Testleri

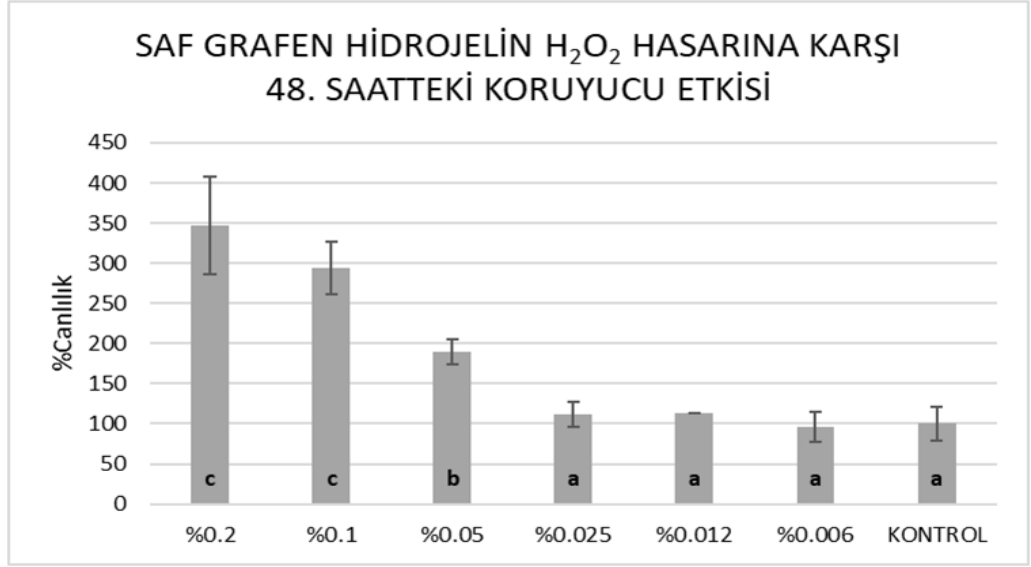
Borik asit ve çinko borat'ın L929 (fare fibroblast) hücre hattı üzerine proliferasyon etkisini ve migrasyon testi GH, BA ve ÇB katkılı grafen hidrojellerin analizleri yapılmıştır. Grafen hidrojel, BA ve ÇB katkılı grafen hidrojeller steril edilerek, boş GH için % 0.2-0.013, BA için yüzde olarak %3 - % 0.094, ÇB için %9 - %0.28) ve steril edilerek hücre proliferasyon ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı profilaktik testleri yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçları görüntüleri takip eden kısımda sunuldu.



Veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.7.** Saf grafen hidrojelini L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi

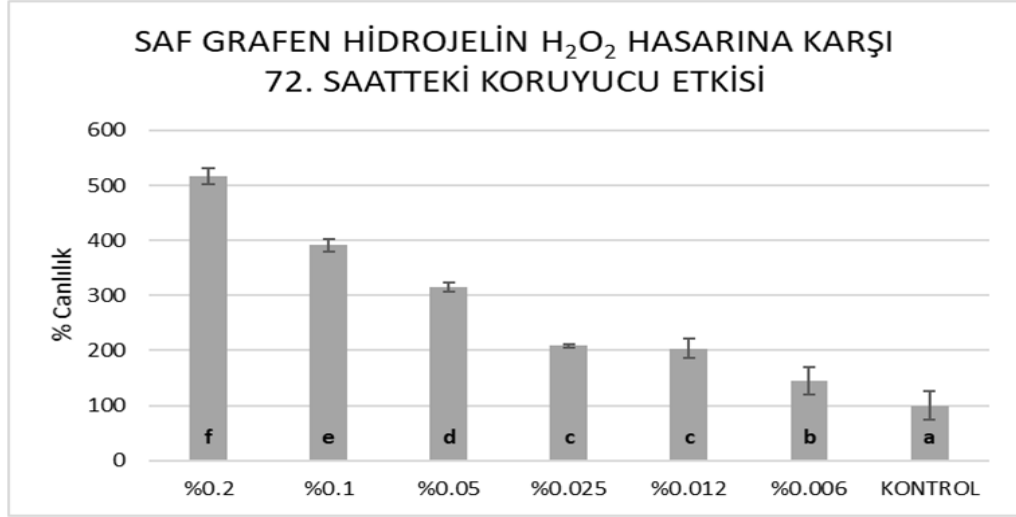
L929 hücreleri üzerine saf grafen hidrojellerin (GH) 24. saatte etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%0.2-%0.006) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G %0.006 grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. GH gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir. % 0.006 grubunu hariç tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla koruyuculuk elde edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla en yüksek dozdan en düşük doza doğru ilaçların hücre oksidatif hasarına karşı koruyucu etkileri azalmıştır (Şekil 4.7).



Veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.8.** Saf grafen hidrojinin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi

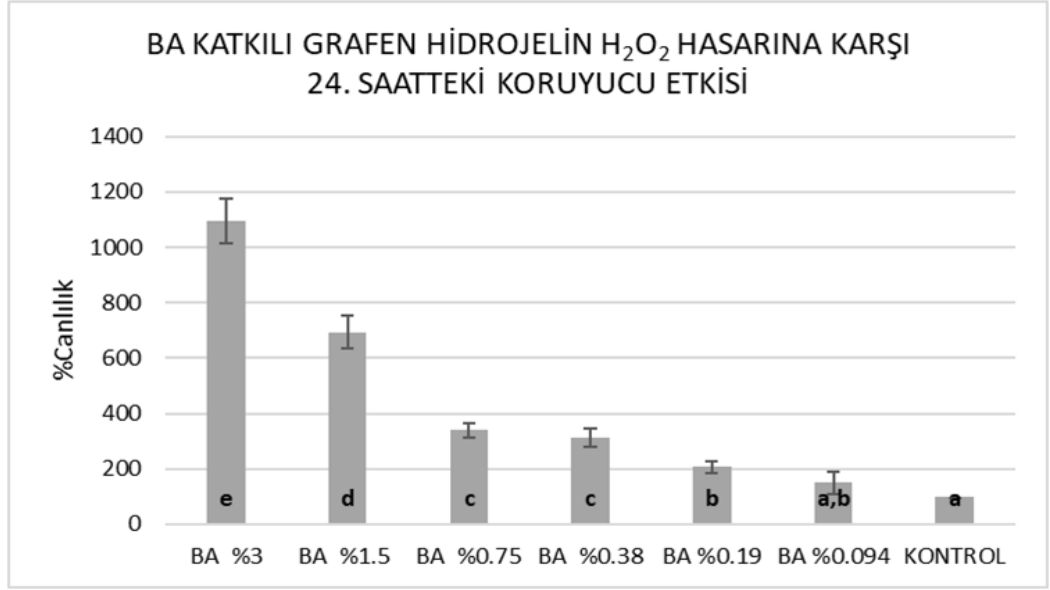
L929 hücreleri üzerine saf grafen hidrojinin (GH) 48. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%0.2-%0.006) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G % 0.006-0.025 grupları hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla koruyuculuk elde edilmiştir. GH gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması (%0.006 ve % 0.012 hariç) ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir. Kontrol grubuna kıyasla en yüksek dozdan en düşük doza doğru ilaçların hücre oksidatif hasarına karşı koruyucu etkileri azalmıştır (Şekil 4.8).



Veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.9.** Saf grafen hidrojelini L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 72. saat koruyucu testi

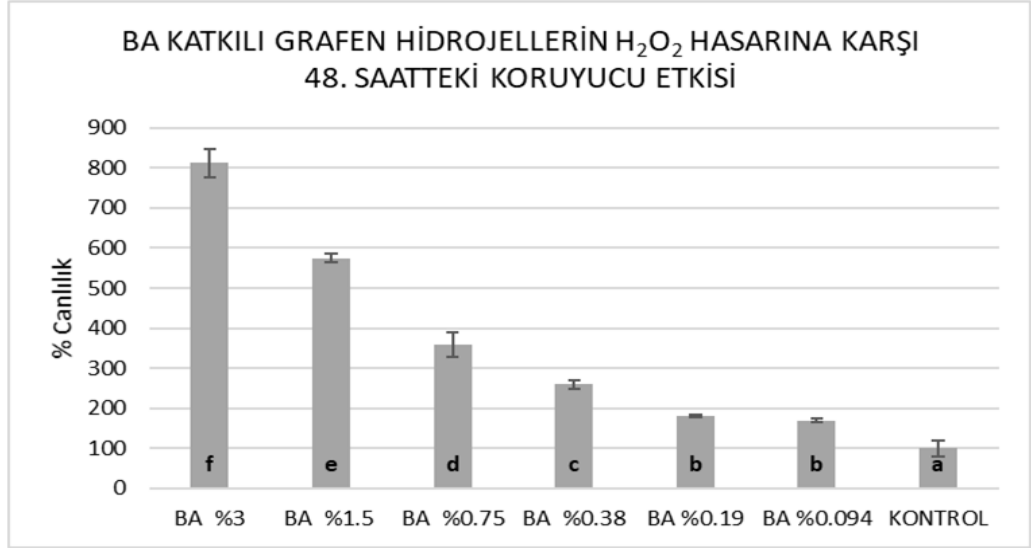
L929 hücreleri üzerine saf grafen hidrojellerin (GH) 72. saatte etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%0.2-%0.006) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücre oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla kolerasyonlu bir şekilde koruyuculuk elde edilmiştir. GH gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir. Kontrol grubuna kıyasla en yüksek dozdan en düşük doza doğru ilaçların hücre oksidatif hasarına karşı koruyucu etkileri azalmıştır (Şekil 4.9).



BA: borik asit katkıli grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.10.** Borik asit katkıli grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi

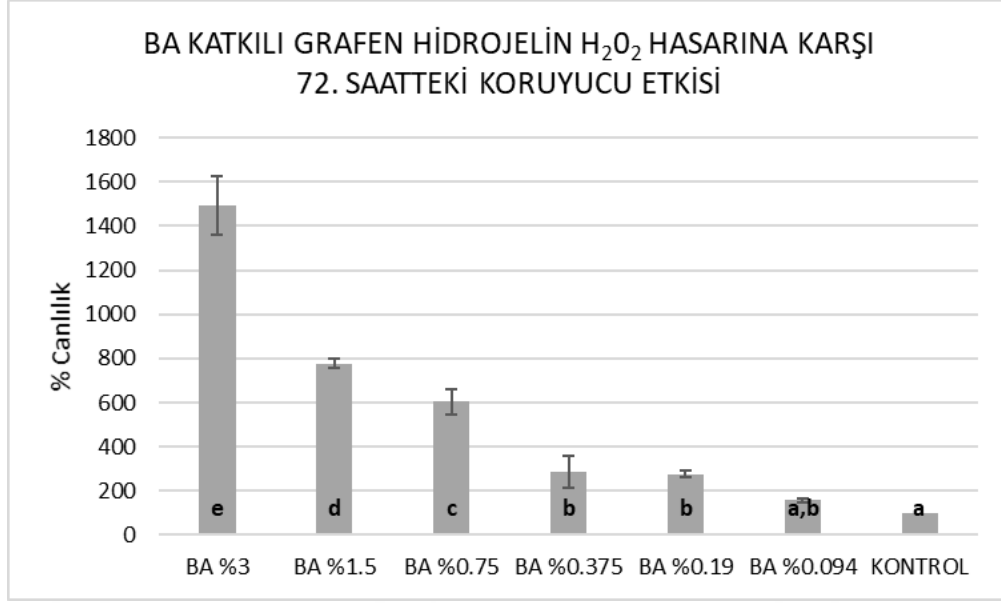
L929 hücreleri üzerine borik asit katkıli grafen hidrojellerin (G-BA) 24. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%3-%0.19) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. % 0.094 grubu hariç tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla koruyuculuk elde edilmiştir. G-BA gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise % 0.19 grubundan itibaren küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.10).



BA: borik asit katkılı grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.11.** Borik asit katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi

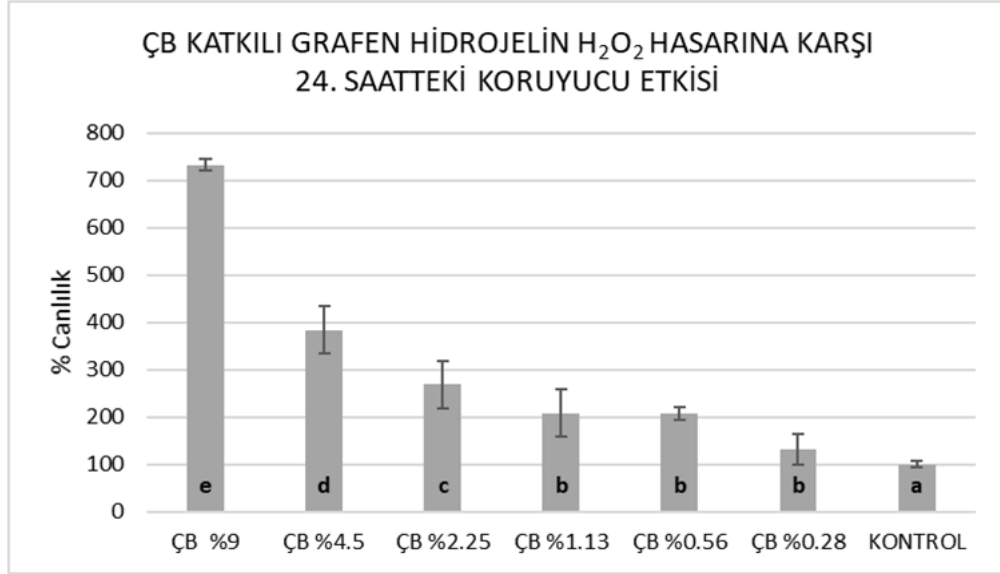
L929 hücreleri üzerine borik asit katkılı grafen hidrojellerin (G-BA) 48. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%3-%0.094) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla koruyuculuk elde edilmiştir. G-BA gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.11).



BA: borik asit katkılı grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.12.** Borik asit katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 72. saat koruyucu testi

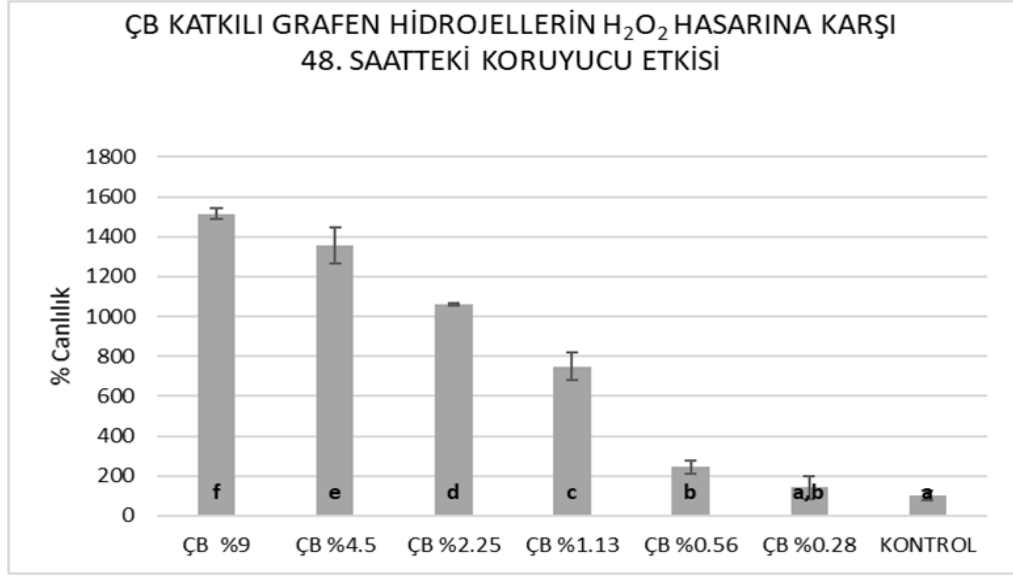
L929 hücreleri üzerine borik asit katkılı grafen hidrojellerin (G-BA) 72. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%3-%0.094) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BA % 0.094 grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla koruyuculuk elde edilmiştir. G-BA gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.12).



ÇB: çinko borat katkılı grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.13.** Çinko borat katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 24. saat koruyucu testi

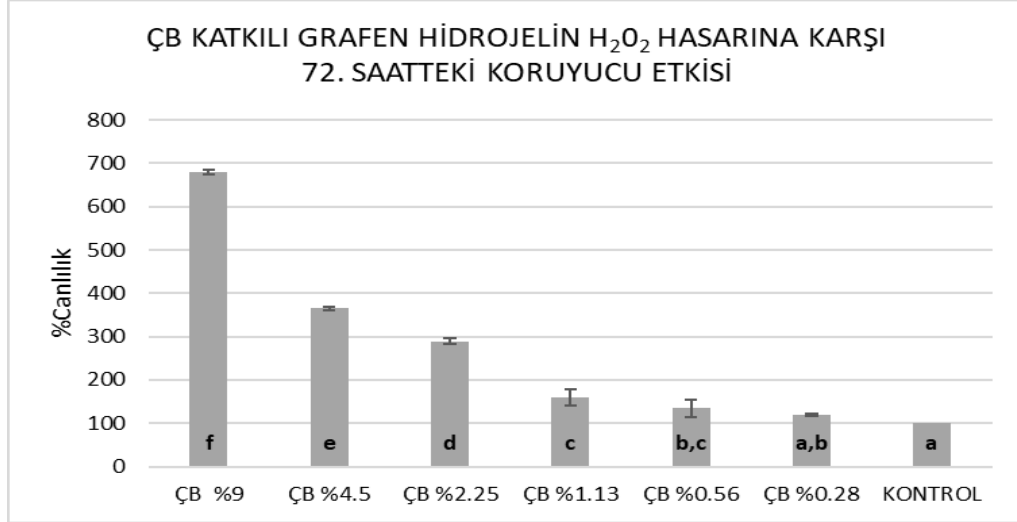
L929 hücreleri üzerine çinko borat katkılı grafen hidrojellerin (G-ÇB) 24. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%9-%0.28) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla kolerasyonlu bir şekilde koruyuculuk elde edilmiştir. G-ÇB gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.13).



ÇB: çinko borat katkılı grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

**Şekil 4.14.** Çinko borat katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasarına karşı 48. saat koruyucu testi

L929 hücreleri üzerine çinko borat katkılı grafen hidrojellerin (G-ÇB) 48. saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%9-%0.28) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G-ÇB %0.28 grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla kolerasyonlu bir şekilde koruyuculuk elde edilmiştir. G-ÇB gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.14).



ÇB: çinko borat katkılı grafen hidrojel, Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $p < 0.05$  aralığında yapılmıştır. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

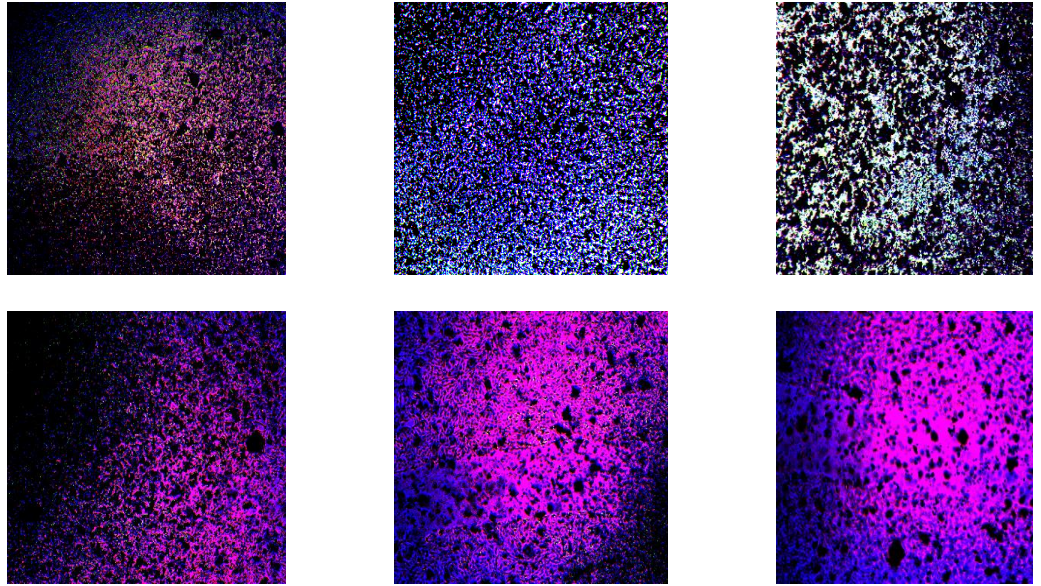
**Şekil 4.15.** Çinko borat katkılı grafen hidrojellerin L929 hücreleri üzerine  $H_2O_2$  hasarına karşı 72. saat koruyucu testi

L929 hücreleri üzerine çinko borat katkılı grafen hidrojellerin (G-ÇB) 72. Saatte koruyucu etkisi değerlendirildiğinde, tüm konsantrasyonlardaki (%9-%0.28) gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G-ÇB %0.28 grubu hariç istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. Tüm gruplarda hücresel oksidatif hasara karşı artan konsantrasyonla kolerasyonlu bir şekilde koruyuculuk elde edilmiştir. G-ÇB gruplarının tamamı kendi arasında değerlendirildiği zaman ise küçükten büyüğe doğru dozların artması ile proliferasyon artışı gözlemlenmektedir (Şekil 4.15).

#### 4.5. Migrasyon Test Sonuçları

Migrasyon testlerinde grafen hidrojel, BA ve ÇB katkılı grafen hidrojeller partiküllerin mikroskop önünde siyah bariyerler oluşturmak üzere iyileşmenin takibi ölçülemez hale getirmişti. Hücre kültüründe denenen dozların aynı migrasyon testlerinde de kullanıldı. Migrasyon testlerinde % 0.2 grafen hidrojel (GH), %1.5 ve %3 katkılı borik asit (GH-BA %1.5 ve %3), %4.5 ve %9 katkılı çinko borat (GH-ÇB %4.5 ve %9)'in 2 mg/ml'den 0.062 mg/ml arasındaki konsantrasyonunda yüzde olarak

sunulduğunda ise (GH için % 0.2-0.013, BA için yüzde olarak %3 - % 0.094, ÇB için %9 - %0.28) ve steril edilerek hücre migrasyon testleri yapıldı. Gerekli dozlar verildikten sonra 0.saat görüntüleri kaydedilmek üzere mikroskop görüntüleri alınmak istendi fakat görüldü ki grafen hidrojellerin partiküllü fiziksel yapısı, siyah rengi ve çözünmeyen bir madde olmasından dolayı grafen hidrojel partikülleri en düşük konsantrasyonlarda dahi mikroskop görüntüsü almaya engel olduğu için istenilen fotoğraflar çekilememiştir. Hücre kültürü için en uygun ilaç şekli olan çözelti formu grafen hidrojelde oluşturulamayacağından ve kuyucuğu çepeçevre saran ve kaplayan grafen hidrojeller hem görüntü alınmasını engelleyeceğinden hem de bu partiküller kuyucuk tabanına yapışık olan hücelere gaz geçişini büyük oranda engelleyecek olmasından görüntü alınabilse dahi deneyin sağlıklı bir sonuç veremeyeceği saptanmıştır ve aşağıda sunulan mikroskop görüntülerinde görüldüğü üzere hücreler dahi gözükmemektedir (Şekil 4.13.). Gözükken birkaç fotoğrafta şartlar zorlanarak, görünen o kısımlar aranarak çekilmiştir.



**Şekil 4.16.** Migrasyon testinde %1.5 borik asit katkılı grafen hidrojellerin görüntüleri

Migrasyon testinde %1.5 borik asit katkılı grafen hidrojellerin görüntüleri yukarıda verilmiştir. Diğer resimlerin boyut olarak fazla yer kaplaması adına sadece %1.5 borik asit katkılı grafen hidrojellerin mikroskop görüntüleri verilmiştir. Düşük borik asit konsantrasyonun bile görüntü alınamadığı için yüksek konsantrasyon görselleri sunulmamıştır.



## 5. TARTIŞMA

Yanık yaralanmaları ısı veya radyasyon, radyoaktivite, elektrik, sürtünme veya kimyasallarla temas nedeniyle ciltte veya diğer organik dokularda meydana gelen bir travmalardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün son raporlarına göre her yıl 11 milyon insan trajik kazalar olan yaralanmalar için tıbbi yanık bakımı gerektiren ciddi yanık yaralanmalarına maruz kalmaktadır. Dünya çapında düşük ve orta gelirli çoğu bölgede ve ülkelerde yaklaşık 200.000 ölüm yanıklardan kaynaklanmaktadır. Düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek prevalansa sahip olan ölümcül olmayan yanıklar, Engelliliğe Ayarlanmış Yaşam Yıllarının kaybedilmesinin önde gelen nedenleri arasındadır. Ölümcül olmayan yanık yaralanmaları, açık bir şekilde ısı, sürtünme, elektrik, radyoaktivite veya kimyasallarla temastan kaynaklanan yanık yaralanmaları olan hasta morbiditesinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Termal yanıklar, doku alev yanığı yaralanmaları (alevler), sıcak katılarla temas yanıkları, su ısıtıcıları ve buharlaşan sıcak sıvılardan kaynaklanan haşlanmalar nedeniyle tahrip olduğunda korkunç yaralanmalara ve ölüme neden olabilir (Hughes ve ark., 2021). Bu yüzden Dünya Sağlık Örgütü Acil Tıp Ekibi girişiminin öncülüğünde, afetten etkilenen topluluklar için bakımın profesyonelleşmesine ve standardizasyonu kurularak yanık bakımı ve tedavisi için kılavuzlar hazırlanmıştır (Hughes ve ark., 2021).

Yanık yaralanmaları termal zarardan sonra başlangıçta sterildir, ancak gram-pozitif organizmalar ve daha sonra gram-negatif organizmalar tarafından kolonize olur. Termal yaralanmanın doğası ve boyutu yanık yarasında kolonize olan mikroorganizmaların türleri ve miktarlarının yanı sıra invaziv bir yara enfeksiyonu riskini etkiliyor olabilir (Erol ve ark., 2004). Ter bezlerinin ve kıl foliküllerinin derinlerinde bulunan stafilokoklar gibi termal hasardan sağ kurtulan gram-pozitif bakteriler, topikal antimikrobiyal ajanlar kullanılmadığı takdirde ilk 48 saat içinde yara yüzeyini yoğun bir

şekilde kolonize eder (Gibson & Thompson, 1955). Sonunda (ortalama 5 ila 7 gün sonra), bu yaralar daha sonra gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakteriler ve konağın normal gastrointestinal ve üst solunum yolu florasından ve/veya hastaneden türetilen mayalar dahil olmak üzere diğer mikroplarla kolonize olur. Bazı popülasyonlar, ilaca dirençli organizmalar tarafından ilk veya sonraki kolonizasyona karşı özellikle hassastır. Kolonizasyonun enfeksiyondan sepsise doğru doğal ilerlemesini ve bu bulaşıcılardan kaynaklanan morbidite ve mortaliteyi sınırlamak için yara bakımına multidisipliner yaklaşım şarttır (Ladhani ve ark., 2021). Yanık tedavisindeki en güncel yaklaşımlardan biri deri bütünlüğünün yeniden sağlanmasına kadar geçen sürede deriden enfeksiyon kaynaklarının organizmaya geçmemesini, sıvı ve elektrolit kaybının önlenmesini sağlayacak deri yerini tutabilecek örtülerin geliştirilmesidir. Özellikle yanık tedavisinde temel prensip yaranın temiz ve mikroorganizmalardan uzak tutulmasını sağlayacak örtülerle örtülmesidir. Lokal antibakteriyel uygulamalar yeterince olumlu sonuçlar doğuramamıştır. Çünkü bu maddelerin iyileşmekte olan dokulara özellikle de hassas olan deride iz bırakma gibi yan etkileri bulunmaktadır. Ayrıca sistemik antibiyotik kullanılması ise deride yeterli etkinlik gösterememektedir. Günümüzde yara örtüleri ile ilgili yeni yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yeni yaklaşımlardaki temel ilke ise deri iyileşmesini bozmayacak, azaltmayacak ve yanık tedavisindeki yanık pansumanlarında dokulara zarar vermeyecek yeni sistemleri geliştirilmesidir. Yaranın fizyolojik özelliklerine bağlı olarak (evre, derinlik, salgı miktarı, bakteriyel kontaminasyon) yara bantları ve örtüleri tek başlarına ya da kombinasyonları halinde uygulanabilmektedir. Kalsiyum alginat örtüler, poliüretan filmler, hidrokolooid örtüler ve köpükleri kapsayan çok sayıda yara örtüsü geliştirilmektedir. Bu tür ürünlerin amacı, enfeksiyonları engelleyerek ve iyileşme sürecine katkıda bulunarak tedavi sürecini hızlandırmaktır (Altay P, 2010). Gerçekleştireceğimiz bu çalışma; borik asit ve çinko borat katkılı grafen

hidrojel bazlı yara örtülerinin avantajlarını kullanarak yara iyileşmesi sürecinde iyileşmeyi hızlandıran, enfeksiyonları engelleyen, yaralarda iz bırakmayı en aza indiren ve böylece hastalara maksimum konforu sağlayan bor bileşiklerini içeren yeni yanık bant geliştirmesine yönelik invitro deneylerin planlanmasıdır.

Su tutabilen gözenekli yapıya sahip özellikleri ile belirtilen türde yara iyileşmesinde biyouyumlu yapıya sahip hidrojellerin kullanılması avantaj sağlayacaktır. Hidrojeller yapılarında %95-99 oranında su tutabilen gözenekli yapıya sahip oldukları için yara ile örtü arayüzeyinde nemli bir ortam sağlar, hava/gaz alışverişini gerçekleştirir, dışarıdan mikroorganizmaların içeri girmesini önler ve en önemlisi yaranın iyileşmesi sürecinde vücuttan salgılanan sıvıların uzaklaştırılması yardımcı olarak yaranın iyileşme sürecini hızlandırabilir (Kokabi ve ark., 2007). Ayrıca hidrojellerin diğer malzemelere kıyasla gösterdikleri yara yüzeyine yapışmaması, ağrı dindirici özelliği ve yara ısısını düşürme gibi avantajlı özellikleri nedeniyle, ilaç salınımından biyomedikal uygulamalara kadar geniş bir spektrumda kullanıldığı bilinmektedir. Geleneksel hidrojeller doğal veya sentetik polimerlerden oluşur ve genellikle zayıf elastik ve şekillendirilebilir özelliklerinden dolayı pratik uygulamaları sınırlıdır (Gao & Heimann, 1993; Razzak ve ark., 2001). Grafen hidrojellerin sıvı tutma kapasitesi ve sıkıştırılabilirliği 38 kat su çekme kapasitesi materyalimiz yanıklarda oluşan nemi giderebilmesi mümkün olacaktır. Daha öncede belirttiğimiz gibi ortamda GH'nin nemi gidermesi ile oluşabilecek enfeksiyonu önleyebilmesi adına avantaj sağlayacağını göstermektedir. Sentezlenen grafen hidrojellerin yapısal özellikleri belirlendikten sonra in-vitro deneylerde kullanılmak üzere silindirik halde borik asit ve çinko borat katkılı grafen hidrojel sentezleri gerçekleştirildi.

Biyolojik kimyasal ömrün değerlendirilmesine yönelik in-vitro test yöntemlerinin kullanılabilirliğinde önemli bir artış yaşanmaktadır. Hayvan testlerinin in-vitro alternatiflerine olan güveni artırmak için, kayıtlı olan test yöntemleri ve koşulları, elde

edilen verilerin kesin ve tekrarlanabilirliğinin sağlanması amacıyla belirlenmeli ve uygun olmalıdır (OECD, 2018). Bu yüksek lisans projesi içerisinde yer alan Tübitak 119S510 projesi ile değerlendirilmeler sonucunda borik asit, çinko borat katkılı grafen hidrojellerin bir araya getirmeden önce antimikrobiyal aktiviteleri ve hücre kültürü analizleri değerlendirildiğinde borik asit ve çinko borat'ın yanıklarda çok görülen mükroorganizmalara yönelik özellikle *S. pyogenes* ve *C. albicans* ve *A. niger*'e çok düşük konsantrasyonlarda bile inhibitör etki ettiği gözlenmiştir (Bayir, 2020). Literatürde incelendiğinde özellikle borik asidin antimikrobiyal etkinliğine dair olumlu sonuçlara rastlanmış ve çalışma sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur. (İlhan Z, 2019; Tutulescu ve ark., 2018; Zan R, 2013) Çinko borat'ın antimikrobiyal etkisine yönelik çok az da olsa bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda genellikle çinko borat geliştirilmiş bir malzemenin bir parçası olarak yer almıştır (Duymaz ve ark., 2016; Kumar ve ark., 2022; Yildirim ve ark., 2022). Bizim proje kapsamındaki çalışmalarda da ilk kez saf çinko borat'ın antimikrobiyal aktivitesi yanıktaki önemli patojenlere karşı koruyucu etkisi ifade edilmiştir. Elde edilen bu sonuç çinko borat'ın sanayide her türlü yeni malzemede kullanılmasında da avantaj sağlayacaktır (Bayir, 2020). Hidrojellerin etkinliğini belirlemek için yapılan test sonuçları da grafen hidrojel ve BA ve ÇB katkılanmış hidrojellerin bakteri sayısını azaltıcı bir etki göstermediği dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik göstermediği sonucuna varıldı. Ancak grafen hidrojellerin uçucu, çözünmeyen hafif yapısında dolayı antibakteriyel etkinliği belirlemede etkin sonuç vermediği görüşüdeyiz. İn-vivo deneylerde grafen hidrojeller, BA ve ÇB deriye direkt temas ederek yapılacak sürüntü analizlerinde antimikrobiyal etkinliği daha anlamlı ve asıl etkinliğini göstereceği kanaatindeyiz.

Bu çalışmada grafen hidrojellerin iritasyon potansiyeli, valide edilmiş alternatif in-vitro EpiDerm SIT testi ile değerlendirildi. Test edilen tüm grafen hidrojelleri, Avrupa

Birliđi (AB) ve Küresel Uyumlařtırılmıř Sistem (GHS) sınıflandırmasına göre iritanolmadıđı belirlenmiřtir. Biyoyumluluk verilerine göre, test edilen tüm formülasyonlarının negatif kontrole göre hićbir iritasyona neden olmadıđı bađıl canlılık, negatif kontrollerin ortalama canlılıđının %50'sinin altına düřmediđi belirlenmiřtir. Bu test kozmetikler ve farmasötik bileřenler gibi kimyasalların iritasyon potansiyelini in vitro deđerlendirebilmek ićin valide edilmiřtir (Kandarova ve ark., 2018; OECD. Test No.439, 2021). Bizim ćalıřmamızda hidrojeller yara iyileřtirme ićin sentezlenmiřtir ve dermal dokunun biyolojik ve fiziksel dođasını etkilemeden biyoyumlu olmalıdır. EpiDerm SIT test sonućları bize yara iyileřtirme ićin geliřtirilen bu materyallerin yaranın günlük bakımı ve biyomedikal uygulamalar ićin dermal iritasyona neden olmadan potent antimikrobiyal aktivitesi ile kullanılabileceđini bize göstermiřtir. ćinko borat ve borik asit katkılı süper hafif grafen hidrojeller cilt tahriřine neden olmadıđı ve yara iyileřmesinde güvenle kullanılabileceđi bu testin sonucuna göre ifade edilebilir. Literatürde insan sađlıđında farklı alanlarda kullanılmak üzere geliřtirilen pek ćok hidrojel temelli tıbbi cihaz bulunmaktadır (Fusco ve ark., 2020; Li ve ark., 2021; Liang ve ark., 2019). Bu materyallerin artan kullanımı bunların etkililik, güvenlilik ve biyoyumluluđu ile soruları da beraberinde getirmiřtir. Liang ve ark.larının ćalıřmasında yapıřkan hemostatik iletken enjekte edilebilir kompozit hidrojeller yara tedavisi ićin geliřtirilmiřtir (Liang ve ark., 2019). L929 hücrelerinde yapılan ćalıřmalarla deđerlendirilen bu materyalin biyoyumlu olduđu gösterilmiřtir (Liang ve ark., 2019). Farklı bir ćalıřmada ise Yeni Zellanda beyaz tavřanlarının deri iritasyon ptansiyeli ićin deđerlendirildiđi in vivo bir ćalıřma yapılmıř olup lidokain yüklü indirgenmiř grafen oksit hidrojel ve bu grafen oksit bazlı topikal hidrojellerin güvenli olduđu ve tavřanlara uygulama alanlarında herhangi bir iritasyona neden olmadıđı gösterilmiřtir (Li ve ark., 2021). Bařka bir ćalıřmada ise Fusco ve ark.ları OECD TG 439 rehberine göre

SkinEthic™ Deri İritasyon Testi Test-42bis (42 dk maruziyet + 42 saat post inkübasyon) testini kullanarak grafen temelli materyalleri değerlendirmişlerdir. Birkaç katmanlı grafen (FLG), grafen oksit (GO), indirgenmiş GO ve CVD-grafen iritan olmayan olarak sınıflandırılırken, sodyum dodesil sülfat veya sodyum dodesilbenzensülfonat hazırlanan FLG'nin deri için iritan olduğu bulunmuştur (Fusco ve ark., 2020). Bu çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, grafen bazlı materyaller çalışmamızda da gördüğümüz gibi genel olarak iritan değildir ancak bu malzemelerin bazı farklı geliştirme yöntemleri, muhtemelen farklı geliştirme adımları veya kullanılan malzemeler nedeniyle bu malzemelerin tahriş olma potansiyeli artabilmektedir. Malzeme geliştirmeyi takiben her zaman valide edilmiş biyoyumluluk testleri ile değerlendirme yapmak önemlidir.

Yeni bir ilaç, molekül veya model araştırılırken çalışmaların birinci basamağını hücre kültürü çalışmaları oluştururken ikinci basamak ise hayvan deneyleridir. Birinci basamakta hücre kültürü çalışmaları ile canlı hücrelerin sayısını ölçen yöntemler canlılığın belirlenmesi için uygundur ve sitotoksikite veya hücre ölümü iddialarını öne sürmek için ölmekte olan ölü hücreleri tespit eden yöntemler gereklidir. Öte yandan proliferasyon değişikliği iddiası için hücre ölümü dikkate alınarak canlı hücre sayısındaki değişimin belirlenebilmesi gerekir (Geyikoglu & Turkez, 2008; Turkez, 2008). Bu kapsamda grafen hidrojele emdirilmiş borik asit ve çinko boratın, L929 fare fibroblast hücrelerinde MTT hücre profirasyon testi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulmuş oksidatif strese bağlı hücre ölümünü önleme testi ve migrasyon (yara iyileşme) kapasitesi değerlendirildi. Bulgularda da açıkça ortaya konulduğu gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulmuş oksidatif hücre hasarına karşı GH, G-BA ve G-ÇB etkileri incelenmiş olup her üçünün de artan konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücre hasarına karşı koruyucu etkisi artmakta olduğu belirlenmiştir. GH, L929 hücreleri üzerinde proliferatif etkisi gözükse de kontrol gruplarına oranla G-BA ve G-ÇB gruplarındaki proliferasyondan BA ve ÇB'nin sorumlu

olduğu aşıkârdır. Literatür incelendiğinde de BA' nın serbest radikal hasarına karşı birçok patolojik durumda koruyucu etkisinin ve ÇB' nin ise antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Barranco & Eckhert, 2006; Geyikoglu & Turkez, 2008; Tábăcaru A, 2020). GH, G-BA' nın artan dozlarında 24, 48 ve 72. saatlerinde MTT hücre proliferasyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesi genel olarak kontrol grubuna göre değerlendirdiğinde hücre proliferasyonunu proliferatif olumlu olarak etkilediği belirlenmiş literatüre uygun olduğu görülmüştür. Koruyucu etkinin ise serbest radikalleri üzerine etkinliğinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

GH, GH-BA ve GH-ÇB çözünürlük sorunları nedeniyle migrasyon testine uygun bir ölçüm imkanı tanınmasa da bizim çalışma materyalimizin L929 hücre hatlarında toksik veya koruyucu rolünü gösterilememiştir. Çalışma protokolümüze uygun bir şekilde grafen yüzdesi artırıldığında ise mikroskop ölçümünde çok ciddi bir şekilde girişim olduğu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında borik asit in-vitro koşullarda yapılan farklı hücre hatlarında da yapılan çalışmalarda borik asit ve çinko boratın koruyucu rol gösterdiği ve bizim hidrojen peroksik toksisitesi ile ilgili bulgularla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir (Rowe ve ark., 1998; Yılmaz ve ark., 2016). Ayrıca yapılan çalışmalarda borik asitin büyüme üzerindeki etkisinin hücre tipine bağımlı olduğu da bildirilmektedir (Bennett ve ark., 1999; Park ve ark., 2004). Her ne kadar migrasyon testinde grafen kaynaklı görsellerde sorun yaşansada in-vivo koşullarda klinikte yara iyileşmesinde borik asit ve grafen hidrojel kullanılmasının ve bugüne kadar toksik etki bildirilmemesi de sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Devirian & Volpe, 2003b; Pawa & Ali, 2006). Ayrıca migrasyon testinde ummadığımız bir şekilde karşımıza çıkan bu sonuç invitro ortamda yapılacak olan Skin Epiderm iritasyon testi ile toksik olup olmama noktasında anlamlı bir veri sağlamıştır. Burada elde edilen datalar in-vivo ortamla ile bağlantısı olmayan sonuçlardır. Epiderm SIT hayvan deri iritasyon testi in-vitro ortamdaki GH, GH-BA ve

GH-ÇB katkılanmış grafen hidrojellerin biyouyumluluğunu göstermesi adına irritan olmaması biyouyumlu olması çalışmalarımızı doğru bir şekilde gittiğini göstermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sitotoksitenin belirlenmesi fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların toksik etkilerinin değerlendirilmesi aşamasında ilk basamak olan in-vitro araştırmalar toksikolojik verilerin elde edilmesini sağlar. Bir çok hücre kültürü çalışmasında kimyasal ajanların ilk olarak sitotoksite etki potansiyelleri değerlendirilmektedir.

Hücre canlılığı/proliferasyonu ve sitotoksite etkisinin belirlenmesinde farklı yöntemler vardır. Bu yöntemlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları mevcut olup güvenilirliği yüksek, hızlı ve tekrarlanabilirliği olan spektrofotometrik yöntemlerdir. Hücre kültürü çalışmalarında in-vitro çalışmalar klinik öncesi çalışmalar için kritik öneme sahiptir. Çalışmamızdaki in-vitro deneysel çalışmalar başarıyla tamamlanmış olup son gelişmelerde elde ettiğimiz olumlu sonuçlar umut vericidir. İn-vitro deneylerin beklenen sonuçların olumlu çıkması bizler için in-vivo deneyler öncesinde ışık tutmaktadır. Özellikle ileride yapacağımız yanık bandı olarak kullanacağımız grafen hidrojenlerin yapılarının aydınlatılmış olması, bazı dozlarda antimikrobiyal aktivite göstermesi, iritan olmaması, yüksek konsantrasyonlarda grafen hidrojel ve katkılanmış borik asit ve çinko borat'ın hidrojen peroksit hasarına karşı koruyucu etki göstermesi bizim yanık modelinde elde edeceğimiz sonuçlar noktasında umutlandırmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Akdeniz, V., Kınık, Ö., Yerlikaya, O., & Ecem, A. (2016). İnsan sağlığı ve beslenme fizyolojisi açısından çinkonun önemi. *Akademik Gıda*, 14(3), 307-314.
- Aksoy, H., & Özakpınar, Ö. B. (2014). Yara iyileşmesi ve oksidatif stres. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18(3), 153-158.
- Altay P, B. G. (2010). Yara Örtüleri *Electronic Journal of Textile Technologies*, 4, 109-121.
- Atakisi, O., Dalginli, K. Y., Gulmez, C., Kaya, R., Ozden, O., Kart, A., & Atakisi, E. (2020). Boric acid and Borax Supplementation Reduces Weight Gain in Overweight Rats and Alter L-Carnitine and IGF-I Levels. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 90(3-4), 221-227.
- Aysel, U., Ceylan, O., Boran, R., Ayrikçil, S., Saraç, N., & Yılmaz, D. (2019). A new approach for prevention the oxidations and mutations: Zinc borate. *Journal of Boron*, 4(4), 196-202.
- Barranco, W. T., & Eckhert, C. D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 94(6), 884-890.
- Bayir, Y. (2020). Sıçanlarda İkinci Derece Yanık İyileşmesinde Borik Asit ve Çinko Borat Katkılı Grafen Hidrojellerin Etkilerinin Araştırılması. *Tübitak 1001*, 119S510.
- Bedeloğlu, A., & Mahmut, T. (2016). Grafen ve grafen üretim yöntemleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(3), 544-554.
- Bennett, A., Rowe, R. I., Soch, N., & Eckhert, C. D. (1999). Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *Journal of Nutrition*, 129(12), 2236-2238.

- Borenfreund, E., & Borrero, O. (1984). In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biol Toxicol*, 1(1), 55-65.
- Celikezen, F. C., Togar, B., Ozgeris, F. B., Izgi, M. S., & Turkez, H. (2016). Cytogenetic and oxidative alterations after exposure of cultured human whole blood cells to lithium metaborate dehydrate. *Cytotechnology*, 68(4), 821-827.
- Chung, C., Kim, Y.-K., Shin, D., Ryoo, S.-R., Hong, B. H., & Min, D.-H. (2013). Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of chemical research*, 46(10), 2211-2224.
- Craig, R. G., & Hanks, C. T. (1988). Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 17(7), 341-347.
- Craig, R. G., & Hanks, C. T. (1990). Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *Journal of dental research*, 69(8), 1539-1542.
- Çakır, S., & Eren, M. (2016). Bor'un Oksidatif Stres ve Dna Hasarı Üzerine Etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 25(2), 88-91.
- Çınar, İ. (2020). Gossypin'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Hidrojen Peroksit Hasarına Karşı Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 10(1), 15-23.
- Deliboran, A. (2020). Neden bor? Borun çevre ile insan, hayvan ve bitki sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 49(2), 127-141.
- Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003a). The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(2), 219-231.
- Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003b). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219-231.
- Duymaz, B., Yigit, Z. V., Seker, M. G., & Dundar, F. (2016). Antibacterial Properties of Sol-Gel Derived TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Acta Physica Polonica A*, 129(4), 872-874.

- Ergün, D. D., & Soyocak, A. (2021). Borik Asidin Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Sitotoksosite Etkinliğinin in vitro Olarak Değerlendirilmesi. *Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science*, 16(2), 390-396.
- Erkekoğlu, P., & Baydar, T. (2021). Güncel in vitro sitotoksosite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
- Erol, S., Altoparlak, U., Akcay, M. N., Celebi, F., & Parlak, M. (2004). Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns*, 30(4), 357-361.
- Evans, R. A., Tian, Y. C., Steadman, R., & Phillips, A. O. (2003). TGF- $\beta$ 1-mediated fibroblast–myofibroblast terminal differentiation—the role of smad proteins. *Experimental cell research*, 282(2), 90-100.
- Fusco, L., Garrido, M., Martin, C., Sosa, S., Ponti, C., Centeno, A., . . . Pelin, M. (2020). Skin irritation potential of graphene-based materials using a non-animal test. *Nanoscale*, 12(2), 610-622.
- Gao, D., & Heimann, R. B. (1993). Structure and mechanical properties of superabsorbent poly(acrylamide)-montmorillonite composite hydrogels. *Polymer Gels and Networks*, 1(4), 225-246.
- Geyikoglu, F., & Turkez, H. (2008). Boron compounds reduce vanadium tetraoxide genotoxicity in human lymphocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(3), 342-347.
- Gibson, C. D., Jr., & Thompson, W. C., Jr. (1955). The response of burn wound staphylococci to alternating programs of antibiotic therapy. *Antibiot Annu*, 3, 32-34.
- Göksu, H., Ho, S. F., Metin, Ö., Korkmaz, K., Mendoza-Garcia, A., Gültekin, M. S., & Sun, S. (2014). Monodisperse NiPd Alloy Nanoparticles Catalyzed Reduction Of

- Nitro And Nitrile Compounds via a Tandem Reaction of Hydrolysis of Ammonia Borane/Hydrogenation. *ACS Catalysis*, 4, 1777-1782.
- Hadrup, N., Frederiksen, M., & Sharma, A. K. (2021). Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 121, 104873.
- Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243-250.
- Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 12(3), 186-193.
- Hayal, T. B. (2020). Boron Increases the Viability of Human Cancer and Murine Fibroblast Cells After Long Time of Cryopreservation. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 21(2), 115-122.
- Heil, T., Volkmann, K., Wataha, J., & Lockwood, P. (2002). Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *Journal of oral rehabilitation*, 29(5), 401-407.
- Hughes, A., Almeland, S. K., Leclerc, T., Ogura, T., Hayashi, M., Mills, J. A., . . . Potokar, T. (2021). Recommendations for burns care in mass casualty incidents: WHO Emergency Medical Teams Technical Working Group on Burns (WHO TWGB) 2017-2020. *Burns*, 47(2), 349-370.
- Hummers Jr, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the american chemical society*, 80(6), 1339-1339.
- İlhan Z, E. İ., Gülaydın Ö. (2019). Antimicrobial Activity of Boric Acid Solution Against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Van Vet J.*, 30(3), 163-166.

- Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 24(3), 161-164.
- İplik, E. S., & Çakmakoğlu, B. (2020). Hücre Kültürü Temel Teknikleri. *ÜCD Güncelleme Serileri*, 21.
- José Ruiz, M., Festila, L. E., & Fernández, M. (2006). Comparison of basal cytotoxicity of seven carbamates in CHO-K1 cells. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88(2), 345-354.
- Kalbacova, M. H., Verdanova, M., Broz, A., Vetushka, A., Fejfar, A., & Kalbac, M. (2014). Modulated surface of single-layer graphene controls cell behavior. *Carbon*, 72, 207-214.
- Kandarova, H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., & Sheasgreen, J. (2009). An in vitro skin irritation test (SIT) using the EpiDerm reconstructed human epidermal (RHE) model. *J Vis Exp*(29).
- Kandarova, H., Willoughby, J. A., De Jong, W. H., Letasiova, S., Milasova, T., Bachelor, M. A., . . . Coleman, K. P. (2018). Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm. *Toxicol In Vitro*, 50, 407-417.
- Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological trace element research*, 186, 31-51.
- Kokabi, M., Sirousazar, M., & Hassan, Z. M. (2007). PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*, 43(3), 773-781.
- Kot, F. S. (2009). Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8, 3-28.

- Kucukkurt, I., Ince, S., Demirel, H. H., Turkmen, R., Akbel, E., & Celik, Y. (2015). The Effects of Boron on Arsenic-Induced Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Male and Female Rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 29(12), 564-571.
- Kumar, P., Mathpal, M. C., Ghosh, S., Inwati, G. K., Maze, J. R., Duvenhage, M. M., . . . Swart, H. C. (2022). Plasmonic Au nanoparticles embedded in glass: Study of TOF-SIMS, XPS and its enhanced antimicrobial activities. *Journal of Alloys and Compounds*, 909, Article 164789.
- Ladhani, H. A., Yowler, C. J., & Claridge, J. A. (2021). Burn Wound Colonization, Infection, and Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 22(1), 44-48.
- Lasocka, I., Szulc-Dąbrowska, L., Skibniewski, M., Skibniewska, E., Strupinski, W., Pasternak, I., . . . Kowalczyk, P. (2018). Biocompatibility of pristine graphene monolayer: Scaffold for fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 48, 276-285.
- Li, W., Zhang, G., & Wei, X. (2021). Lidocaine-loaded reduced graphene oxide hydrogel for prolongation of effects of local anesthesia: In vitro and in vivo analyses. *J Biomater Appl*, 35(8), 1034-1042.
- Li, Y., Gao, W., Ci, L., Wang, C., & Ajayan, P. M. (2010). Catalytic performance of Pt nanoparticles on reduced graphene oxide for methanol electro-oxidation. *Carbon*, 48(4), 1124-1130.
- Liang, Y., Zhao, X., Hu, T., Chen, B., Yin, Z., Ma, P. X., & Guo, B. (2019). Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing. *Small*, 15(12), e1900046.
- Meral, K., & Metin, O. (2014). Graphene oxide--magnetite nanocomposite as an efficient and magnetically separable adsorbent for methylene blue removal from aqueous solution. *Turkish Journal of Chemistry*, 38(5), 775-782.

- Messner, K., Vuong, B., & Tranmer, G. K. (2022a). The Boron Advantage: The Evolution and Diversification of Boron's Applications in Medicinal Chemistry. *Pharmaceuticals*, 15(3), 264.
- Messner, K., Vuong, B., & Tranmer, G. K. (2022b). The boron advantage: the evolution and diversification of boron's applications in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals*, 15(3), 264.
- Metin, O., Aydogan, S., & Meral, K. (2014). A new route for the synthesis of graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (GO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanocomposites and their Schottky diode applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 585, 681-688.
- Naji, A., & Harmand, M. F. (1990). Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *Journal of biomedical materials research*, 24(7), 861-871.
- Nelson, S. K., Wataha, J. C., & Lockwood, P. E. (1999). Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. *The Journal of prosthetic dentistry*, 81(6), 715-720.
- Nielsen, F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition reviews*, 66(4), 183-191.
- Oancea, C. N., Cimpean, A., Ion, R., Neamtu, J., Bitu, A., Scorei, I. R., . . . Birkenmeier, G. (2018). In Vitro Cytotoxicity of Zinc Fructoborate, a Novel Zinc-Boron Active Natural Complex. *Curr Health Sci J*, 44(2), 113-117.
- OECD. (2018). *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP)*. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>
- OECD. Test No.439, O. (2021). In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing.


- Ökçesiz, A., & Bucurgat, Ü. Ü. (2017). Sitotoksosite Çalışmalarında Kök Hücre. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 41(2), 1-14.
- Özkaya, A. B., & Geyik, C. (2022). From viability to cell death: Claims with insufficient evidence in high-impact cell culture studies. *Plos one*, 17(2), e0250754.
- Park, M., Li, Q., Shcheynikov, N., Zeng, W. Z., & Muallem, S. (2004). NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Molecular Cell*, 16(3), 331-341.
- Pawa, S., & Ali, S. (2006). Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 160(2), 89-98.
- Razzak, M. T., Darwis, D., Zainuddin, & Sukirno. (2001). Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry*, 62(1), 107-113.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay guidance manual [Internet]*.
- Rowe, R. I., Bouzan, C., Nabili, S., & Eckhert, C. D. (1998). The response of trout and zebrafish embryos to low and high boron concentrations is U-shaped. *Biological trace element research*, 66(1-3), 261-270.
- Seger, B., & Kamat, P. V. (2009). Electrocatalytically active graphene-platinum nanocomposites. Role of 2-D carbon support in PEM fuel cells. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(19), 7990-7995.
- Simmons, R., & Ahsian, N. (2015). *The book of stones: Who they are and what they teach*. North Atlantic Books.

- Spielmann, H., Grune, B., Liebsch, M., Seiler, A., & Vogel, R. (2008). Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(2-3), 225-233.
- Tăbăcaru A, K. R., Lupidi G, Pettinari C. . (2020). Characterization and Assessment of the Antioxidant Activity of Cu(II), Zn(II) and Cd(II) Complexes Derived from Scorpionate Ligands. *Molecules*, 13(22), 5298.
- Tepedelen, B. E., Soya, E., & Korkmaz, M. (2016). Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological trace element research*, 174, 309-318.
- Theerakittayakorn, K., & Bunprasert, T. (2011). Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast. *International Journal of Medical and Health Sciences*, 5(2), 51-54.
- Tombuloglu, A., Copoglu, H., Aydin-Son, Y., & Guray, N. T. (2020). In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory concentration. *J Trace Elem Med Biol*, 62, 126573.
- Turkez, H. (2008). Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 28(5), 658-664.
- Tutulescu, F., Mogosanu, G. D., Bită, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Rau, G., . . . Neamtu, J. (2018). Effect of boric acid and calcium ascorbatoborate esters against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(6), 14212-14216.
- YakıncıI, Z. D., & Mediha, K. (2016). Borun Sağlık Alanında Kullanımı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 4(1), 36-44.

- Yildirim, N., Ozen, E., Ergun, M. E., & Dalkilic, B. (2022). A Study on Physical, Morphological and Antibacterial Properties of Bio Polymers Reinforced Polyvinyl Acetate Foams. *Materials Research-Ibero-American Journal of Materials*, 25, Article e20210579.
- Yılmaz, S., Ustundag, A., Ulker, O. C., & Duydu, Y. (2016). Protective effect of boric acid on oxidative DNA damage in Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(4), 748.
- Yuxi, X., Kaixuan, S., Chun, L., & Gaoquan, S. (2010). Self-assembled graphenehydrogel via a One-Step Hydrothermal Process *ACS Nano*, 4, 4324-4330.
- Zan R, H. I., Ozdemir AK, Tunc T, Sumer Z, Alici O. (2013). Antibacterial effect of different concentration of boric acid against *Enterococcus faecalis* biofilms in root canal. *Marmara Den J*(2), 76-80.
- Zhang, L., & Shi, G. (2011). Preparation of highly conductive graphene hydrogels for fabricating supercapacitors with high rate capability. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(34), 17206-17212.

## EKLER

### EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	<b>SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ</b> Graduate School of Health Sciences	
<b>ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU<sup>1</sup></b>		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Fatih Tunç	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	<b>Biyokimya</b>	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans	
<p>Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.</p>		
<b>Bölümler</b>	<b>Benzerlik Oranı</b>	<b>Maksimum Benzerlik Oranları</b>
<b>I. Giriş</b>	%4	% 15
<b>II. Genel Bilgiler</b>	%33	% 35
<b>III. Materyal ve Metod</b>	%29	% 35
<b>IV. Bulgular</b>	%3	% 15
<b>V. Tartışma</b>	%2	% 20
<p><i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i></p>		

## EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı  
Birim Etik Kurulu

Sayı : 93722986.12/  
Konu: Birim Etik Kurul Kararı

28/06/2022

Sayın: Prof. Dr. Yasin BAYIR

İlgi: 07.06.2022 tarih ve 2200170302 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 28.06.2022 tarihinde 10 numaralı kararı ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Fatih TUNÇ'un yürüteceği "Borik Asit, Çinko Borat ve Katkılı Grafen Hidrojellerin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sitotoksitesinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi" (In vitro) başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

**Karar -10-** Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yasin BAYIR'ın danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Fatih TUNÇ'un Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürüteceği "Borik Asit, Çinko Borat ve Katkılı Grafen Hidrojellerin L929 Fare Fibroblast Hücre Hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sitotoksitesinde Etkinliğinin Değerlendirilmesi" (In Vitro) başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 07.06.2022 tarih ve 2200170302 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.