

## Grafen Oksitin Ksantin Oksidaz Aktivitesi Üzerine *In Vitro* Etkisinin İncelenmesi

Sevtap BAKIR<sup>1</sup>, Veysel Kenan ÇELİK<sup>1</sup>, İsmail SARI<sup>\*1</sup>, Serpil ERŞAN<sup>2</sup>, Duygu ANAKLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 5800, Sivas

<sup>2</sup> Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 5800, Sivas

(Alınış / Received: 25.04.2016, Kabul / Accepted: 24.10.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 13.11.2016)

### Anahtar Kelimeler

Grafen oksit,  
Ksantin oksidaz,  
Enzim,  
Enzim aktivitesi

**Özet:** Grafen karbon atomlarının altıgen bir kafes şeklinde düzenlenmesi ile oluşan iki boyutlu bir yapıdır ve biyolojik sistemlerin de dahil olduğu çeşitli uygulama alanlarına sahiptir. Bu çalışmada grafen oksitin (GO) pürin katabolizmasında rol alan ksantin oksidaz (KO) enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. GO' nun KO aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla 0.50, 1.00, 5.00 ve 10.00 ppm olmak üzere 4 farklı derişimde GO çözeltisi KO tepkime ortamına ilave edilmiş ve 5 farklı substrat (hipoksantin) derişiminde aktivite değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri saptanmıştır. KO' nun  $V_{max}$  değeri 0.83  $\mu\text{M}$  Ürat/mgProtein/dakika,  $K_m$  değeri 138.95  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Tepkime ortamına 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 ppm GO eklendiğinde KO enzimin sırasıyla %36.1, 72.3, 77.1 ve 84.3 oranında inhibe olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, GO derişimi arttıkça enzimin hem  $K_m$  hem de  $V_{max}$  değerlerinde dikkate değer bir azalma olduğu ve substrat derişimi artırsak da enzim inhibisyonunun devam ettiği tespit edilmiştir. Bu da inhibisyon tipinin unkompetitif olduğunu göstermektedir.

## Investigation of the *In Vitro* Effects of Graphene Oxide on the Xanthine Oxidase Activity

### Keywords

Graphene oxide,  
Xanthine oxidase,  
Enzyme,  
Enzyme activity

**Abstract:** Graphene is a two-dimensional structure which consists of carbon atoms arranged in a hexagonal lattice and has various application fields including biological systems. In this study the *in vitro* effects of graphene oxide (GO) on the activity of xanthine oxidase (XO) enzyme which plays a role in purine catabolism was aimed to investigate. In order to examine the effect of GO on XO activity, 4 different concentrations GO solution including 0.50, 1.00, 5.00 and 10.00 ppm were added to the XO reaction medium and activity values were determined spectrophotometrically at 5 different substrate concentrations (hypoxanthine).  $K_m$  (Michaelis-Menten equation) and  $V_{max}$  values were determined.  $V_{max}$  and  $K_m$  (Michaelis-Menten equation) values were calculated as 0.83  $\mu\text{M}$  urate/mg protein/min and 138.95  $\mu\text{M}$ , respectively. When 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 ppm GO were added to the reaction medium, it was found that 36.1, 72.3, 77.1 and 84.3 percent of the XO enzyme activity was inhibited, respectively. In conclusion, a remarkable reduction was determined in both  $V_{max}$  and  $K_m$  values of the enzyme as the concentration of GO goes up and it was found that enzyme inhibition remain unchanged even if we increase the substrate concentration. It showed that the inhibition type is uncompetitive inhibition.

### 1. Giriş

Karbon materyaller inorganik materyallere göre çevresel ve biyolojik açılarından daha az zararlı olarak kabul edildiğinden karbon ekosistemde en yaygın elementlerden biridir. Karbon materyalleri arasında önemli bir toksisite problemi olmayan grafit günlük hayatımızda yüzlerce yıldır kullanılmaktadır. Bu nedenle grafitin tek katmanı olan grafenin de

biyolojik amaçlar için güvenilir ve kullanışlı bir karbon materyali olabileceği düşünülmüştür [1]. Grafen, karbon atomunun bal peteği örgüsü şeklindeki yapılarından bir tanesine verilen isimdir ve bilinen ilk iki boyutlu malzemedir. Bu özelliğiyle teknolojik uygulamalar hususunda oldukça ilgi çekmektedir [2]. Grafen eşsiz elektronik ve optik özelliklerinden dolayı ultra yüksek hızlı transistörler, saydam iletkenler gibi yeni elektronik materyallerin

geliştirilmesinde araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır. Grafenin son zamanlarda elektronik ve kimyasal kullanım alanlarının dışında biyomedikal alanlarda da kullanımı yaygınlaşmaktadır [1]. Grafenin okside bir türevi olan grafen oksit (GO) oldukça büyük spesifik yüzey alanına (iki boyutlu yapı) sahip olması, epoksit, hidroksil ve karboksil grupları gibi bir çok işlevsel grubu içermesi ve suda yüksek düzeyde çözünür olmasından dolayı biyoaygıtlar, mikrobiyal saptama, hastalık teşhisi, ilaç taşıyıcı sistemler gibi biyolojik sistemlerde potansiyel kullanım alanına sahiptir [3]. Bunlara ek olarak GO' nun enzim immobilizasyonu için de ideal bir matriks olduğu bildirilmekte ve bu konu ile ilgili son zamanlarda artan sayıda çalışmalar yapılmaktadır [4, 5]. Buna rağmen çok az sayıda çalışma grafen ve GO' nun enzimler, proteinler gibi biyomakromoleküller üzerine etkisini incelemiştir.

Ksantin oksidaz (KO) hipoksantinin ksantine ve daha sonra ksantin de ürik aside dönüşümünü katalize ederek pürin katabolizmasında rol alan bir enzimdir [6]. KO memelilerde karaciğer, ince barsak mukozasında ve böbreklerde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Ayrıca, sütte de bol miktarda bulunduğundan KO saflaştırılmasında ve bu enzimle ilgili çalışmalarda süt, en çok tercih edilen enzim kaynağıdır [7-9]. Hidroksilaz ailesinin bir üyesi olan ve molibden içeren bir falvoenzim olan KO, pürin yıkımının son iki basamağını katalizlemesinin yanı sıra hız belirleyici enzim olması nedeni ile pürin metabolizmasında oldukça önemli bir yere sahiptir [9, 10]. Geniş substrat spesifitesine sahip bu enzim katalizlediği tepkime üzerinden oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksit, süperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturabilmektedir. KO' nun nitriti indirgeyerek nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türleri (RNT) oluşumuna neden olduğu da bilinmektedir. KO enziminin ROT ve RNT oluşturma özelliği nedeni ile anti-mikrobiyal savunmada rol aldığı ileri sürülmektedir. Arıca KO' nun süt sekresyonunda da rol aldığı bildirilmektedir [11]. KO' nun eksojen ve endojen zenobiyotiklerin katabolizmasında da rol aldığı bilinmektedir [12]. Canlı sistemlere dışarıdan alınan yabancı kimyasal maddeler, ilaçlar ve metabolizma sırasında endojen olarak meydana gelen zenobiyotikler, toksik bileşikler olduğundan zenobiyotik metabolizması aracılığı ile toksik olmayan forma dönüştürülerek vücuttan atılımları son derece önemlidir. KO enzimi hem zenobiyotiklerin hem de pürin katabolizmasında rol alması nedeni ile biyolojik sistemler için önemli bir yere sahiptir. Bu enzimin aktivitesindeki değişiklikler metabolizmada da çeşitli olumsuz değişikliklere neden olacağından oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda pürin ve zenobiyotik katabolizması ve süt oluşumu gibi canlı sistemler için hayati öneme sahip olaylarda rol alan KO aktivitesine son zamanlarda biyolojik sistemlerde kullanımı gündemde olan GO' nun *in vitro* etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan sodyum fosfat Merck (Darmstadt, Germany), hipoksantin Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)' den temin edilmiştir. Bu çalışmada KO aktivite tayini için enzim kaynağı olarak sığır sütünden izole edilen saf KO enzimi de Sigma Aldrich (Steinheim, Germany; X4875-40 UN)' den tedarik edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler analitik olarak uygun saflıktadır.

### 2.1. GO sentezi

Bu çalışmada kullanılan GO, Marcano ve ark. tarafından önerilen iyileştirilmiş Hummers yöntemine uygun şekilde sentezlendi [13]. Bu kapsamda geliştirilmiş Hummers' yöntemiyle GO sentezi için, 9:1 oranında konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (360:40 mL) karışımı, grafit pulcukları (3.0 g) ve KMnO<sub>4</sub> (18.0 g) karışımına eklendi ve 35-40°C'a kadar oldukça az bir sıcaklıkta yaklaşık 5 saat boyunca sonifikasyona tabi tutuldu. Tepkime yeniden 50°C' a kadar ısıtılarak 12 saat boyunca karıştırıldı. Ardından tepkime oda sıcaklığına getirilerek % 30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mL) ile birlikte buz üzerine döküldü. Filtre edilen madde 4000 rpm'de yaklaşık 4 saat boyunca santrifüj edildi ve ardından da süpernatant dekantasyonla uzaklaştırıldı. Arda kalan katı materyalin yıkanması için sırasıyla en az 2 kez 200 ml su, 200 ml % 30 HCl ve 200 ml etanol kullanıldı, her bir yıkamada, karışım U.S. Standart test eleğinden geçirildi ve santrifüj edilen (4000 rpm'de 4 saat boyunca) filtrat ile polyester fiberden fitrelendi. Süpernatant dekant edilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan materyal 0.45 µm gözenek boyutundaki bir PTFE membran üzerinden filtrelendi. Filtre üzerinde elde edilen katı oda sıcaklığında gece boyunca vakum altında kurutularak malzeme elde edildi.

Elde edilen GO' den 5 mg tartılarak üzerine 100 mL deiyonize su ilave edildi ve bu karışımı çözünür hale getirilmek üzere ultrasonik banyoda, oda sıcaklığında 3-5 saat inkübe edildi. Böylece 50 ppm derişiminde GO stoku elde edildi.

### 2.2. Grafen oksitin karakterizasyonu

Elde edilen GO yapısı içerisindeki fonksiyonel grupların tespiti için Bruker Alpha Model 1003271/06 FTIR-ATR cihazı ile 400-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında analiz yapılmıştır. Grafit yapıdan GO yapıya geçişteki düzenli düzensiz yapıları, tabaka sayılarını ve kusurları incelemek için Raman spektroskopisi analizi, numuneler çözücü kullanmadan toz halinde lama yüklenerek elde edilmiştir. Grafit, GO ve grafen plakalarının grafitik yapılarının karakterize edilmesinde Raman spektroskopisinde yararlanılmaktadır. Raman spektroskopisi sp<sup>2</sup> hibritleştirilmiş karbon ve allotroplarının tabaka sayıları, kusur tipleri ve yapıları hakkında eşsiz bir şekilde bilgi veren hızlı bir tekniktir [14]. Raman

spektrası 532 nm/100 nW Nd. YAG lazer ile Renisaw InVia marka Dispersive Raman mikroskobunda, 100-3500 cm<sup>-1</sup> spektrum aralığında gerçekleştirilmiştir. Sentez öncesi ve sonrası kristalin atomik ve moleküler yapıdaki değişiklikleri incelemek için X-ışını kırınımı difraksiyonuyla (XRD) analiz edilmiştir. XRD analizleri dalga boyu  $\lambda=0,154$  nm olan CuK $\alpha$  radyasyonu ile 40kV ve 30 mA altında Rigaku marka cihaz ile incelenmiştir.

Grafite plakalarının XRD şekilleri  $2\theta=26.5^\circ$ 'de şiddetli ve güçlü bir pik vermektedir, bu pik plakalar arasında normal grafit boşluğuna denk gelen 0.334 nm aratabaka boşluğu ( $d=0,334$  nm) olduğunu vurgulamaktadır [15]. GO halinde ise iyi tanımlanmış, çizgileri belli olan  $26.5^\circ$  yerine  $2\theta=10^\circ$ 'de pik açığa çıkmaktadır, böylece ara tabaka boşluğunun ( $d=1.186$  nm'ye) genişlediği görülmektedir. Ara tabaka boşluğu yani  $d$  mesafesi arttıkça pik yayvanlaşmakta, yayvanlaşan pikin şiddeti düşmekte ve kristal boyutu da azalmaktadır.

Hazırlanan GO nanomalzemenin kalitesini daha iyi tanımlamak için ise Ultraviyole-görünür (UV-vis) absorpsiyon spektrasında UV-Vis spektroskopisi ölçümleri Shimadzu marka UV-2600 Spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

UV-vis absorpsiyon spektrasında 2 çeşit karakteristik pik açığa çıkmaktadır. Bunlardan ilki karbonil gruplarının  $n-\pi^*$  geçişlerine karşılık gelen  $\sim 300$  nm'de bir omuzdur. Diğer bir karakteristik özellik  $\sim 230$  nm'de açığa çıkmakta ve bir  $\pi-\pi^*$  plazmon pike karşılık gelmektedir [16, 17].  $\pi-\pi^*$  plazmon piki 2 çeşit konjüge etkiye bağlı olmaktadır: bir tanesi nanometre-skalasındaki  $sp^2$  kümelerle ilgilidir ve bir diğeri de C=C, C=O ve C-O bağları gibi bağlayıcı kromofor birimlerinden kaynaklanmaktadır [16, 18]. GO'ların UV-vis spektrallerindeki 230 nm'deki şiddetli pik ile tabaka sayısı ayırt edilebilmektedir. Az tabaka GO (1-3 tabaka) tek bir pik gösterirken, çok tabaka GO (4-10 tabaka) bir omuz sergilemektedir. Tabaka sayısı arttıkça, çok tabakalı GO'nun omuzunun şiddeti azalmaya eğilim göstermektedir. Kalın tabakalı GO için ( $>10$  tabaka) bir pik ya da omuz açığa çıkmamaktadır [16].

### 2.3. KO aktivite tayini

Worthington metoduna göre hipoksantinden oluşan urat absorpsiyonunun 290 nm dalga boyunda okunmasıyla spektrofotometrik olarak tayin edildi [19]. pH 7.5 ve 25°C' de dakikada oluşan 1  $\mu$ mol urat bir ünite aktivite olarak belirlendi. KO enziminin spesifik aktivite değerleri aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplandı.

$$\text{Ünite/mg protein} = \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot C_{\text{protein}}} \Delta E / \Delta t \quad (1)$$

$\varepsilon$  : Ürik asitin Molar Soğurma Katsayısı: 1.22 X 10<sup>4</sup> cm<sup>-1</sup>  
 V: Son hacim  
 Cprotein: Enzim derişimi (mg/ml)  
 $\Delta E / \Delta t$ : Birim zamanda (1 dk.) absorpsiyon farkı  
 v: XO enzimin hacmi  
 d: Işık yolu (cm)

GO' nun KO enziminin kinetik davranışına karşı etkisi incelemek üzere 5 farklı substrat derişimine karşılık aktivite değerleri hesaplandı. Daha sonra 1/Aktivite 'ye karşı 1/derişim grafiği olan Lineweaver-Burk grafiği çizildi. 0.50, 1.00, 5.00 ve 10.00 ppm düzeyinde 4 farklı derişimde GO çözeltisi KO tepkime ortamına ilave edilerek yine 5 farklı substrat derişimine karşılık aktivite değerleri elde edildi. Aktivite deneyleri üçer kez tekrarlandı. Buradan elde edilen verilerin ortalaması alınarak Lineweaver-Burk grafiğine eklendi (Bkz. Şekil 5). Enzimin maksimum hız ( $V_{\text{max}}$ ) ve Michaelis Menten sabit ( $K_m$ ) değerleri saptandı (Bkz. Tablo 1). Bu bulgular yardımıyla GO' nun, KO enziminin aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi değerlendirildi. Ayrıca, KO' nun 4 farklı GO derişimindeki hesaplanan  $V_{\text{max}}$  değerlerinin GO yokluğundaki (inhibitörsüz) tepkime ortamına göre elde edilen  $V_{\text{max}}$  değerinden ne kadar oranda azaldığı % cinsinden hesaplanarak enzim aktivitesinin % inhibisyon değerleri belirlendi (Bkz. Tablo 1).

## 3. Bulgular

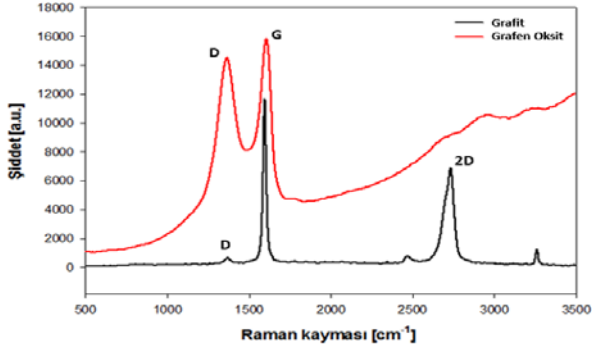
GO' nun biyolojik sistemlerde de kullanılabilmesi amacıyla daha az kimyasal ve zehirli gaz açığa çıkaran bir yöntem olan geliştirilmiş Hummers' yöntemiyle üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanomalzemenin GO olduğunu kanıtlamak amacıyla Raman, XRD, UV-Vis ve FTIR analizleriyle karakterizasyonu yapılmıştır.

### 3.1. Raman analizi

Şekil 3'de Raman spektrumunda, grafit levhacıklar, sırasıyla E<sub>2g</sub> vibrasyon modunun birinci derece dağılımına ve ikinci derece 2 fonon modu dağılımına denk gelen 1583 cm<sup>-1</sup>'de şiddetli bir G bandı ve 2723 cm<sup>-1</sup>'de bir 2D bandı sergilemektedir. Ayrıca 1356 cm<sup>-1</sup>'de açığa çıkan zayıf bir D-bandı da daha az yapısal kusurlara bağlı olarak indüklenen düzensizliğe atfedilmektedir. Ancak, geliştirilmiş Hummers' yöntemiyle hazırlanmış GO sırasıyla 1356 cm<sup>-1</sup> ve 1596 cm<sup>-1</sup>'de güçlü ve geniş bir D-bandı ve G-bandı sergilemektedir.

D ve G bandlarının şiddet oranı  $I_D/I_G$ ,  $sp^3/sp^2$  karbon oranıyla temsil edilmekte ve bu orandaki bir artış,  $sp^2$  alanları sayısında bir artışa ancak hazırlanan GO' ların grafitik alanlar olarak  $sp^2$  kümelerinin oranlarında bir azalmaya işaret etmektedir [20, 21]. Başka bir deyişle oksidasyondan kaynaklanan düzlem içi  $sp^2$  karbon atomlarının indirgenmesine bağlı

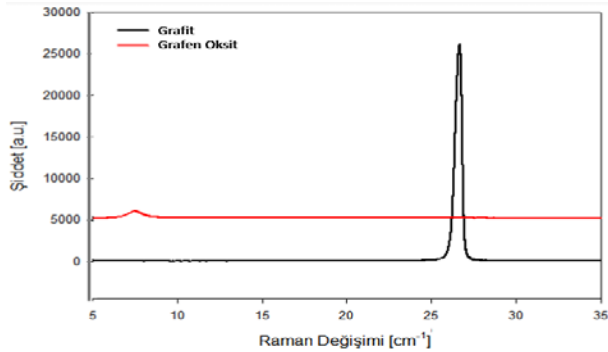
olarak grafitik yapısal simetrisinin yıkılmasını ve bağların bozunmasını belirtmektedir. Spektumdan bu oran grafit plakaları için 0.05 olarak açığa çıkarken GO için 0.913'e doğru bir artış göstermiştir, bu da GO'daki karbon kafesinin oksidasyon sürecine dayalı olarak bir derecede amorf bir karakter sergilediği gerçeğine dayandırabilmektedir [22, 23].



Şekil 1. Grafite ve Hummers' GO için Raman spektrumları

### 3.2. XRD analizi

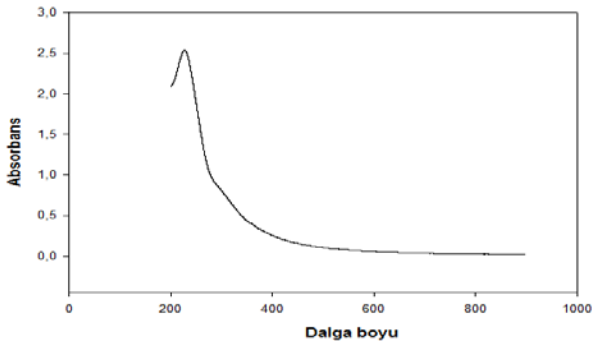
XRD analiz sonucuna göre grafitten GO'ya geçerken pikin şiddeti azalmış, d-mesafesi değeri artmıştır, yani literatürle uyumlu olarak kristal boyutunun azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlardan grafitik plakaların başarılı bir şekilde GO olarak az-tabakalı istiflenmiş plakalar olarak ekfoliyeye edildiği doğrulanmaktadır [22].



Şekil 2. Grafite ve GO'nun XRD Spektrumları

### 3.3. UV-Vis analizi

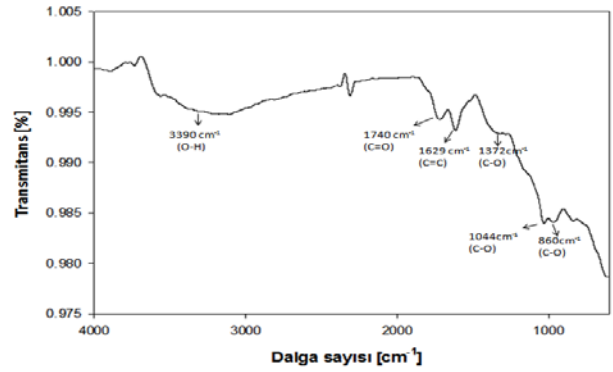
Şekil 3'de görülen örneğin gösterdiği ancak çok şiddetli olmayan omuzla, sentezlenen Hummers' GO'nun çok tabakalı GO olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir.



Şekil 3. GO'nun UV-Vis Spektrumu

### 3.4. FTIR analizi

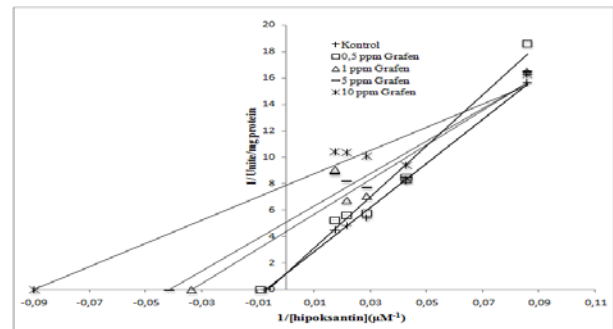
Yansıması Azaltılmış Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR), kullanılarak alınan GO'nun FTIR absorpsiyon spektrumu Şekil 4'de görülmektedir. GO'nun spektrumunda, O-H gerilme titreşimi ve absorplanmış su moleküllerine bağlı olarak  $\sim 3390 \text{ cm}^{-1}$  civarında da geniş bir absorpsiyon bandı gözlenmektedir [24, 25]. C=O ve C-O gerilme titreşimine bağlı olarak da  $1740 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1372 \text{ cm}^{-1}$ 'de absorpsiyon bantları açığa çıkmışlardır [14, 24].  $\sim 1629 \text{ cm}^{-1}$ 'de çıkan absorpsiyon bandı ise oksitlenmemiş  $\text{sp}^2$  CC bağlarından C=C fonksiyonel gruplarına atfedilmektedir [19, 26].  $1044 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise C-O bağına (alkoksi fonksiyonel grubu) denk gelmektedir [27].  $\sim 860 \text{ cm}^{-1}$ 'de açığa çıkan ve epoksi gruplarının varlığını belirten ve deformasyon titreşimlerine uyan karakteristik bir bant da görülmektedir [24, 25].



Şekil 4. GO'nun FTIR Spektrumu

### 3.5. GO'nun ko aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi

KO enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini hesaplamak amacıyla 11.70, 23.40, 35.00, 46.70, 58.30  $\mu\text{M}$  üzere 5 farklı hipoksantin derişiminde, enzim aktivitesi ölçülerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten KO'nun  $V_{max}$  değeri  $0.83 \mu\text{M}$  Ürat/mgProtein/dakika,  $K_m$  değeri  $138.95 \mu\text{M}$  olarak belirlendi. GO'nun KO aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla bu beş substrat derişiminde (11.70, 23.40, 35.00, 46.70, 58.30  $\mu\text{M}$ ) tepkime ortamına 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 ppm GO eklenerek her bir GO derişimi için KO aktivitesi ölçülüp Lineweaver-Burk eğrileri elde edildi (Bkz. Şekil 5).



Şekil 5. KO aktivitesinin 5 farklı substrat (hipoksantin) ve 4 farklı GO derişimine bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk grafiği ile incelenmesi

Bu eğriler yardımı ile her bir GO derişimi için enzimin görünür  $K_m$  değeri (inhibitör varlığındaki  $K_m$  değeri) ve  $V_{max}$  derleri belirlendi (Bkz. Tablo 1). Tablo 1' de de görüldüğü gibi artan GO derişiminde enzimin hem  $K_m$  hem de  $V_{max}$  değerlerinde dikkate değer bir azalma tespit edildiğinden GO' nun, enzimi unkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır (Bkz. Şekil 5).

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Grafenin bir türevi olan GO iki boyutlu yeni bir karbon nanomateryaldir. Oldukça sıra dışı yapısal, kimyasal mekanik, elektronik özelliklere sahip olmasından dolayı son zamanlarda dikkatleri çekmekte ve birçok alanda farklı uygulamalar için büyük bir umut vaat etmektedir [26-28]. Grafen ve GO vücut içerisinde bulunan iyonik sıvılarda bozulmayan ve amfilik karakterde olmalarından dolayı biyonomik göz ve kulak vb. organ teknolojilerinin geliştirilmesi gibi amaçlar için de gelecek yıllarda kullanılabilecekleri iddia edilmektedir [29, 30]. GO hücre görüntüleme ve ilaç taşıyıcı sistemlerin, antibakteriyel etkiye sahip kompozitlerin oluşturulmasına yönelik de yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [31-33]. Buna rağmen canlı sistemlere grafen ve GO uygulamalarının, biyoyumumluluk ve biyolojik makromoleküller üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda insanların da dahil olduğu bazı türlerde pürin katabolizmasında önemli bir role sahip olan KO enziminin kinetik özelliklerine GO' nun etkisi incelenmiştir. Bilgilerimize kadar şu ana kadar bu konuda herhangi bir çalışma bulunmadığından araştırmamıza ait bulgular bu konuda ilk verileri oluşturmaktadır.

GO, yüzeyinde farklı işlevsel grupları içermesi nedeni ile, bu grupların ilaç molekülüne yüksek bir ilgi ile bağlanması için kullanılabileceğinden, son zamanlarda potansiyel bir ilaç taşıyıcı aday olarak da görülmektedir [34, 35]. Fakat ilaç taşıyıcı bu sistemlerin oluşturulmasında ilk aşama grafen ve GO' nun nükleik asitler, proteinler ve amino asitler gibi biyolojik moleküller ile nasıl etkileştiği ve bu moleküller üzerinde bir etki oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi olmalıdır.

GO' nun aminoasitler, DNA/RNA bazları ile etkileşimi sadece bazı teorik çalışmalarla incelenmiştir. Bu çalışmalarda GO' nun proteinler ve nükleobazlar ile nankovalent olarak etkileşime girebileceği iddia edilmiştir [36-39]. Bizim çalışmamızda da bu iddiayı destekler şekilde artan GO derişiminin KO enzimini unkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır (Bkz. Şekil 5). Artan GO derişiminde enzimin hem  $K_m$  hem de  $V_{max}$  değerlerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Bkz. Tablo 1). GO' nun KO enzimi üzerine etkisi ile ilgili çalışmamız dışında başka bir veri bulunmasa da GO' nun katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisini inceleyen Wei ve ark. tarafından elde edilen veriler bulgularımızla uyumludur. Wei ve ark. tarafından

tepkime ortamına eklenen 1  $\mu\text{g/ml}$ ' den 100  $\mu\text{g/ml}$ ' ye kadar artan GO derişimi ile korale bir şekilde katalaz enzim aktivitesinin gittikçe azaldığı saptanmıştır [3]. Bizim çalışmamızda da 0.5 ppm gibi düşük bir GO derişiminde bile KO enzim aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ve GO derişimi arttıkça (1, 5, 10 ppm) enzim aktivitesinde giderek daha büyük bir azalma tespit edildi. Wei ve ark. ayrıca GO' nun zamana ve derişime bağlı olarak katalaz enziminde konformasyonel değişime neden olduğunu göstermişlerdir. GO' nun katalaz  $\alpha$ -heliks içeriğinde azalmaya neden olurken  $\beta$ -tabaka yapısından artışa neden olarak enzimin ikincil ve üçüncül yapısından değişime yol açtığı saptanmıştır.

Öte yandan GO neden olduğu katalaz aktivitesindeki azalmanın tamamen enzimin üç boyutlu yapısındaki değişimden kaynaklanmadığı bildirilmiştir [3]. Wei ve ark. yaptıkları çalışma ve bizim çalışmamıza ait veriler göz önüne alındığında GO proteinler üzerine negatif etkilere sahip olabilir ve biyolojik sistemlere uygulanmalarının çeşitli olumsuz etkileri olabilir. Ayrıca KO' nun pürinlerin ve canlılar için toksik bileşikler olan zenobiyotiklerin katabolizmasında rol alması nedeni ile GO' nun bu enzim üzerinde oluşturacağı inhibitör etki bu gibi metabolik olayların da sekteye uğramasına neden olabilir. Özellikle zenobiyotik metabolizmasındaki aksaklıklar, bu bileşiklerin vücuttan atılamayarak birikmesine ve toksik etkilerinin artmasına sebep olabilir. Nitekim konuyu farklı açıdan ele alan bazı çalışmalarda GO' nun hücre kültürlerinde ve deney hayvanlarında doza ve zamana bağlı olarak toksik etkiler yarattığı [40, 41], insan eritrosit hücrelerinde hemolitik etki gösterdiği belirlenmiştir [41]. Bununla birlikte, GO' nun hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. [42, 43].

Ayrıca, KO katalizlediği tepkime sonucu süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olduğundan, KO inhibitörleri ROT' ların rol aldığı hastalıklarda oksidatif hasarı baskılamak amacıyla da tedavide kullanılmaktadır [44]. Bu bilgiler ışığında GO' nun antioksidan etki yaratarak hücreler için oksidatif hasara karşı olumlu yönde etkiler oluşturabileceği de düşünülebilir. Bu görüşle uyumlu olarak GO' nun antioksidan özelliğe sahip olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır [45]. Fakat, GO' nun KO aktivitesini inhibe ederek antioksidan etki yaratarak oksidatif hasara karşı olumlu etki oluşturmasının organizma lehine olabilmesi için bu molekülün spesifik olarak sadece bu enzimi inhibe etmesi ile daha mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. GO' nun proteinler ve enzimlerin üç boyutlu yapılarına kümülatif etkisi dikkate alındığında spesifik bir etkinin pek mümkün olmadığı anlaşılmaktadır. GO' nun organizmaya etkilerini inceleyen ilave çalışmalara gerektiğini düşünmekteyiz.

**Tablo 1.** KO enziminin 4 farklı GO derişiminde ve GO içermeyen aktivite ortamındaki elde edilen  $K_m$ ,  $V_{max}$  değerleri ve inhibisyon yüzdeleri

GO yokluğunda		GO varlığında			
$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu M$ Ürat/mg Protein/dakika)	[GO] (ppm)	Görünür $K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ ( $\mu M$ Ürat/mg Protein/dakika)	% inhibisyon
138.95	0.83	0.50	107.37	0.53	36.1
		1.00	29.70	0.23	72.3
		5.00	24.01	0.19	77.1
		10.00	11.16	0.13	84.3

Sonuç olarak GO, KO enzimini unkompetetif olarak inhibe etmektedir. KO enzim aktivitesinde 0.50 ppm gibi küçük bir GO derişimde bile dikkate değer bir azalma görülmektedir. Bu nedenle GO' nun proteinler ve hatta diğer bazı makromoleküller üzerine olumsuz etkileri olabilir. Dolayısıyla grafen ve GO' nun biyolojik sistemlere uygulanmadan önce, daha ileri çalışmalarla etkileri değerlendirilmelidir.

#### Kaynakça

- [1] 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.
- [2] Grafen. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Grafen> (Erişim Tarihi: 20. 04. 2016).
- [3] Wei, X. L., & Ge, Z. Q. 2013. Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase. *Carbon*, 60, 401-409.
- [4] Liu, Y., Li, Q., Feng, Y. Y., Ji, G. S., Li, T. C., Tu, J., & Gu, X. D. 2014. Immobilisation of acid pectinase on graphene oxide nanosheets. *Chemical Papers*, 68(6), 732-738.
- [5] Zhang, J., Zhang, F., Yang, H., Huang, X., Liu, H., Zhang, J., Guo, S. 2010. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir*, 26(9), 6083-6085.
- [6] Battelli, M. G., Polito, L., Bolognesi, A. 2014. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis*, 237(2), 562-567.
- [7] Massey, V., Brumby, P. E., Komai, H., & Palmer, G. 1969. Studies on milk xanthine oxidase Some spectral and kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 244(7), 1682-1691.
- [8] Dikmen, N., Özgünen, T. ed.1996. Harper' in *Biyokimyası*, Barış Kitabevi, İstanbul, 124s.
- [9] Kenan, T.W., Patton, S. 1995. The structure of milk: implications for sampling and storage. ss 5-50s. Jensen, R.G., ed. 1995. *Handbook of Milk Composition*, New York, Academic Pres, U.S.A, 5-50s.
- [10] Parks, D. A., Granger, D. N. 1986. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 548, 87.
- [11] Harrison, R. 200). Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, 16(6), 546-554.
- [12] Roles of the enzyme xanthine oxidase and its products. <http://flipper.diff.org/app/pathways/3895> (Erişim Tarihi: 22.04.2016).
- [13] Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Tour, J. M. 2010. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*, 4(8), 4806-4814.
- [14] Sahoo, S. K., & Mallik, A. 2015. Simple, fast and cost-effective electrochemical synthesis of few layer graphene nanosheets. *Nano*, 10(02), 1550019.
- [15] Liu, C., Hu, G., Gao, H. 2012. Preparation of few-layer and single-layer graphene by exfoliation of expandable graphite in supercritical N<sub>2</sub>, N-dimethylformamide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 99-104.
- [16] Lai, Q., Zhu, S., Luo, X., Zou, M., & Huang, S. 2012. Ultraviolet-visible spectroscopy of graphene oxides. *AIP Advances*, 2(3), 032146.
- [17] Peng, S., Fan, X., Li, S., Zhang, J. 2013. Green synthesis and characterization of graphite oxide by orthogonal experiment. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(4), 2213-2217.
- [18] Thema, F. T., Moloto, M. J., Dikio, E. D., Nyangiwe, N. N., Kotsedi, L., Maaza, M., Khenfouch, M. 2012. Synthesis and characterization of graphene thin films by chemical reduction of exfoliated and intercalated graphite oxide. *Journal of chemistry*, 2013.
- [19] Worthington-Enzyme Manual. 1972. *Enzymes, Enzyme Reagents, related Biochemicals, Xanthineoxidase*, Worthington Biochemical Corporation in Freehold, New Jersey, U.S.A. s. 216.
- [20] Pei, S., & Cheng, H. M. 2012. The reduction of graphene oxide. *Carbon*, 50(9), 3210-3228.

- [21] Dang, T. T., Pham, V. H., Hur, S. H., Kim, E. J., Kong, B. S., & Chung, J. S. 2012. Superior dispersion of highly reduced graphene oxide in N, N-dimethylformamide. *Journal of colloid and interface science*, 376(1), 91-96.
- [22] Feng, H., Wang, X., Wu, D. 2013. Fabrication of spirocyclic phosphazene epoxy-based nanocomposites with graphene via exfoliation of graphite platelets and thermal curing for enhancement of mechanical and conductive properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(30), 10160-10171.
- [23] Kim, S. G., Park, O. K., Lee, J. H., Ku, B. C. 2013. Layer-by-layer assembled graphene oxide films and barrier properties of thermally reduced graphene oxide membranes. *Carbon letters*, 14(4), 247-250.
- [24] Oh, J., Lee, J. H., Koo, J. C., Choi, H. R., Lee, Y., Kim, T., ... & Nam, J. D. 2011. Graphene oxide porous paper from amine-functionalized poly (glycidyl methacrylate)/graphene oxide core-shell microspheres. *Journal of Materials Chemistry*, 20(41), 9200-9204.
- [25] Stankovich, S., Piner, R. D., Nguyen, S. T., Ruoff, R. S. 2006. Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets. *Carbon*, 44(15), 3342-3347.
- [26] Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R., Ruoff, R. S. 2010. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. *Advanced materials*, 22(35), 3906-3924.
- [27] Compton, O. C., Nguyen, S.T. 2010. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *small*, 6(6), 711-723.
- [28] Rao, C. E. E., Sood, A. E., Subrahmanyam, K. E., Govindaraj, A. 2009. Graphene: the new two-dimensional nanomaterial. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(42), 7752-7777.
- [29] Vovusha, H., Sanyal, S., Sanyal, B. 2013. Interaction of nucleobases and aromatic amino acids with graphene oxide and graphene flakes. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(21), 3710-3718.
- [30] Şenel, M. C., Gürbüz, M., Koç, E. 2015. Grafen Takviyeli Alüminyum Matrisli Yeni Nesil Kompozitler. *Engineer & the Machinery Magazine*, (669).
- [31] Chen, F., Liu, S., Shen, J., Wei, L., Liu, A., Chan-Park, M. B., Chen, Y. 2011. Ethanol-assisted graphene oxide-based thin film formation at pentane-water interface. *Langmuir*, 27(15), 9174-9181.
- [32] Feng, L., Liu, Z. 2011. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 6(2), 317-324.
- [33] Kuila, T., Bose, S., Khanra, P., Mishra, A. K., Kim, N. H., Lee, J. H. 2011. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(12), 4637-4648.
- [34] Chi, F. L., Guo, Y. N., Liu, J., Liu, Y. L., Huo, Q.S. Size-Tunable and Functional Core-Shell Structured Silica Nanoparticles for Drug Release. 2010. *J. Phys. Chem.* 114, 2519-2523.
- [35] Ferrari, M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161-171.
- [36] Varghese, N., Mogera, U., Govindaraj, A., Das, A., Maiti, P. K., Sood, A. K., Rao, C. N. R. 2009. Binding of DNA nucleobases and nucleosides with graphene. *ChemPhysChem*, 10(1), 206-210.
- [37] Gowtham, S., Scheicher, R. H., Ahuja, R., Pandey, R., Karna, S. P. 2007. Physisorption of nucleobases on graphene: Density-functional calculations. *Physical Review B*, 76(3), 033401.
- [38] Cazorla, C. 2010. Ab initio study of the binding of collagen amino acids to graphene and A-doped (A= H, Ca) graphene. *Thin Solid Films*, 518(23), 6951-6961.
- [39] Cazorla, C., Rojas-Cervellera, V., Rovira, C. 2012. Calcium-based functionalization of carbon nanostructures for peptide immobilization in aqueous media. *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), 19684-19693.
- [40] Wang, K., Ruan, J., Song, H., Zhang, J., Wo, Y., Guo, S., Cui, D. 2011. Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett*, 6(8), 1.
- [41] Liao, K. H., Lin, Y. S., Macosko, C. W., Haynes, C. L. 2011. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS applied materials & interfaces*, 3(7), 2607-2615.
- [42] Hu W., Peng C., Luo W., Lv M., Li X., Li D., Fan C. 2010. Graphene-based antibacterial paper. *ACS nano*, 4(7), 4317-4323.
- [43] Chang Y., Yang S.T., Liu J.H., Dong E., Wang Y., Cao A., Liu Y., Wang H. 2011. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letters*, 200(3), 201-210.
- [44] Fang J., Yin H., Liao L., Qin H., Ueda F, Uemura K., Eguchi K., Bhrate G., Maeda H. 2016. Water soluble PEG-conjugate of xanthine oxidase inhibitor, PEG-AHPP micelles, as a novel therapeutic for ROS related inflammatory bowel diseases. *Journal of Controlled Release*, 223, 188-196.
- [45] Qiu Y., Wang Z., Owens A. C., Kulaots I., Chen Y., Kane A. B., Hurt R. H. 2014. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale*, 6(20), 11744-11755.