T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BİTKİ EKSTRELERİ VE KİMYASAL MADDELERİN LAKTOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Burak ALMAS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

İSTANBUL-2021

Bu çalışma, [23.08.2021] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Refiye YANARDAĞ](Danışman)
[İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Özlem SAÇAN]
[İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa]
[Mühendislik Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Ayşegül PEKSEL]
[Yıldız Teknik Üniversitesi]
[Fen-Edebiyat Fakültesi]

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FLY-2018-32861 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğreninim boyunca engin bilgilerinden istifade ettiğim, her türlü maddi ve manevi desteği olan, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini gördüğüm hocam Sayın Dr. Öğr. Ü. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Özlem SAÇAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, hocam Sayın Prof. Dr. Sevim TUNALI'ya, Dr. Öğretim Üyesi Bertan Boran BAYRAK'a, Arş. Gör. Onur ERTİK ve Arş. Gör. Eda DAĞSUYU'na ve diğer çalışma arkadaşlarıma bana gösterdikleri ilgi ve alakadan dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu günlere gelmemi sağlayan sevgili AİLEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ağustos 2021 Burak ALMAS

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **2**
2.1. ENZİMLER 2
2.2. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI 3
2.3. ENZİM İNHİBİSYONU 6
2.3.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon Türleri 6
2.3.1.1. Yarışmalı İnhibisyon 6
2.3.1.2. Yarı Yarışmalı İnhibisyon 7
2.3.1.3. Yarışmasız İnhibisyon 8
2.3.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon Türü 8
2.4. PEROKSİDAZLAR 8
2.4. LAKTOPEROKSİDAZ SİSTEMİ 10
2.4.1. Laktoperoksidaz 11
2.4.2. Tiyosiyanat Anyonu 13
2.4.3. Hidrojen Peroksit 13
2.4.4. Laktoperoksidaz Sisteminin Antimikrobiyal Rolü 14
2.4.5. Laktoperoksidaz'ın Fizyolojik ve Patolojik Koşullar Altında Salgılanması 14
2.4.6. Laktoperoksidaz'ın Biyosidal Etkisi 15
2.4.7. Laktoperoksidaz'ın Dental Plak ve Organik Asit Oluşumunun İnhibe Edilmesindeki Rolü 16
2.4.8. Laktoperoksidaz'ın Nanoteknolojide Kullanımı 16
2.4.9. Astım Hastalığı ve Laktoperoksidaz Aktivitesi 16

2.4.10. Göğüs Kanserinde Heterosiklik Aminlerin Rolü ve Laktoperoksidaz ile Aktivasyonları....17
2.5. BİTKİLER VE BİTKİLERİN ENZİM İNHİBİSYONLARINDAKİ ROLLERİ....18
3. MALZEME VE YÖNTEM....22
3.1. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN CİHAZ VE ALETLER....22
3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER....22
3.3. DENEYDE KULLANILAN BİTKİ EKSTRELERİ....23
3.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması....24
3.4. ENZİM İNHİBİSYON DENEYİNİN YAPILIŞI....25
4. BULGULAR....27
4.1. SULU BİTKİ EKSTRELERİNİN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİ....27
4.2. KİMYASAL MADDELERİN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİ....29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....43
KAYNAKLAR....48
EKLER....57
ÖZGEÇMİŞ....58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Enzim-substrat ilişkisi (www.monolib.net). 2

Şekil 2.2: Enzimlerin sınıflandırılması (www.byjus.com)..... 3

Şekil 2.3: Glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 3

Şekil 2.4: Aspartat aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 4

Şekil 2.5: Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 4

Şekil 2.6: Okzalat dekarboksilaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 5

Şekil 2.7: Fosfoglukomutaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 5

Şekil 2.8: Glutamin sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org). 6

Şekil 2.9: Yarışmalı inhibisyon şeması ve Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017). 7

Şekil 2.10: Yarı yarışmalı inhibisyon şeması ve Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017). 7

Şekil 2.11: Yarışmasız inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017). 8

Şekil 2.12: Peroksidaz enzimleri (Passardi ve diğ., 2007). 9

Şekil 2.13: Memeli peroksidazlarında hem halkası ile amino asitler arasındaki etkileşim (Gumiero ve diğ., 2010). 10

Şekil 2.14: Laktoperoksidaz sisteminin reaksiyonları (Gürsel, 2004). 11

Şekil 2.15: Laktoperoksidaz enzim yapısı (Sharma ve diğ., 2013)..... 12

Şekil 2.16: Hem grubu ile laktoperoksidaz arasındaki etkileşim (Sharma ve diğ., 2013) 13

Şekil 2.17: Glikoliz reaksiyonlarının anahtar enzimlerinin tiyol grupları ile hipotiyosiyanit iyonunu arasındaki reaksiyon zinciri (Magacz ve diğ., 2019)..... 15

Şekil 2.18: 2-Amino-3-metilimidazo-[4,5-f]kinolin bileşiği ile laktoperoksidaz enziminin etkileşimi (Sheikh ve diğ., 2017).....18

Şekil 3.1: Laktoperoksidaz reaksiyon şeması (Koksal, 2018). 25

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Enzim inhibisyon tayininde kullanılan bitki materyallerinin Latince adları ve bitkinin kullanılan kısımları. 24

Tablo 4.1: Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 27

Tablo 4.2: Bazı metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 30

Tablo 4.3: Bazı vitaminlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 33

Tablo 4.4: Bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 35

Tablo 4.5: Bazı asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 37

Tablo 4.6: Bazı şekerlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 39

Tablo 4.7: Bazı amino asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri. 41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

Da : Dalton
g : Gram
mL : Mililitre
mM : Milimolar
μM : Mikromolar

Kısaltmalar **Açıklama**

ABTS : 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AChE : Asetilkolin esteraz
DNA : Deoksiribo nükleik asit
EPO : Eozinofil peroksidaz
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
LPO : Laktoperoksidaz
MPO : Miyeloperoksidaz
NADPH : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
PO : Peroksidaz
SCN^- : Tiyosiyanat
SOD : Süperoksit dismutaz
TPO : Tiroit peroksidaz
U : Ünite

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BİTKİ EKSTRELERİ VE KİMYASAL MADDELERİN LAKTOPEROKSİDAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Burak ALMAS

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ

Laktoperoksidaz (LPO, EC 1.11.1.7), sütte, tükürükte, gözyaşında, yeni doğanların sindirim sisteminde bulunan, prostetik grup olarak hem grubu içeren bir glikoprotein olup, oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir. Çalışmamızda LPO enzim aktivitesi üzerine bazı bitki ekstreleri ile kimyasal maddelerin inhibitör etkileri araştırıldı. Çalışmamızda kullanılan bitki ekstreleri ile kimyasal maddelerin tümü LPO enzimi üzerine inhibitör etki gösterdi. Bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin LPO enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi, konsantrasyon artışı ile artış gösterdi.

Çalışmamızda, kullandığımız bitki ekstreleri içinde LPO enzimini en yüksek oranda brüksel lahanasının inhibe ettiği bulundu. Kimyasal maddelerin metal tuzlarından $CuSO_4$, vitaminlerden C vitamini, kimyasal maddelerden adrenalin hidroklorür, asitlerden kafeik asit, şekerlerden maltoz, amino asitlerden ise sisteinin LPO enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

Yüksek oranda LPO inhibitör aktivitesi gösteren bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin LPO inhibitörü olarak sağlık alanında ve gıda sanayinde kullanımının uygun olacağı sonucuna varıldı.

Ağustos 2021, 72 sayfa.

Anahtar kelimeler: [Laktoperoksidaz, Enzim İnhibisyonu, Bitki Ekstreleri, Kimyasal Maddeler]

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECTS OF SOME PLANT EXTRACTS AND CHEMICAL COMPOUNDS ON LACTOPEROXIDASE ACTIVITY

Burak ALMAS

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ismet Burcu TURKYILMAZ

Lactoperoxidase (LPO, EC 1.11.1.7) is one of the class oxidoreductase enzyme, which exists in milk, salivary, tear, digestive system of newborn infants and which is also a glycoprotein including heme moiety as prosthetic group. In our study, the inhibitory effects of some plant extracts and chemical substances on LPO enzyme activity were investigated. The all plant extracts and chemical substances used in our study showed inhibitory effect on LPO enzyme. The inhibitory effect of plant extracts and chemical substances on LPO enzyme showed an enhancement following the increase of concentrations.

In this study, brussels sprouts was found to inhibit LPO enzyme at a highest ratio among all the plant extracts. It was determined that $CuSO_4$ as metal compounds of chemical substances, Vitamin C as vitamins, adrenaline hydrochloride as chemical substances, caffeic acid as acidic substances, maltose as sugar compounds, cysteine as amino acids were found to inhibit LPO enzyme at highest ratios.

It was concluded that usage of the plant extracts and chemical substances which showed highest LPO inhibition would be convenient in health area and food industry.

August 2021, [72] pages.

Keywords: [Lactoperoxidase, Enzyme Inhibition, Plant Extracts, Chemical Substances]

1. GİRİŞ

İnsanoğlu için bitki türlerine olan ilgi gitgide artmış olup, arkeolojik olarak yapılan kazı ve buluşlar incelendiğinde insanların bitkileri ya sağlık sorunları ya da besin kaynağı olarak kullandıkları anlaşılmıştır. İnsanoğlu hastalıklardan kurtulmak ve korunmak için bitkilerden çeşitli karışımlar elde etmiş ve ürettikleri ürünleri ise bitkisel ilaç olarak nitelendirmiştir. Bitkiler sağlıktan gıdaya, ekolojiden tarıma kadar birçok alanda kullanım alanına sahiptir.

Enzimler, biyolojik sistemlerin katalizörleridir. Kimyasal dönüşümleri sağlayan moleküller olarak da tanımlanan enzimlerin en önemli özellikleri, katalitik güçleri ve özgül olmalarıdır. İnsan genomunun %25'i enzimleri şifrelemek için ayrılmıştır. Bundan dolayı enzimlerin yaşamın devamlılığının sağlanmasında çok önemli bir rolü vardır (Berg ve diğ., 2014).

Peroksidaz enzimlerinden biri olan laktoperoksidaz (LPO), meme, tükürük bezleri ve mukozadan salgılanan antibakteriyel bir ajandır. Birçok organik ve inorganik substratın hidrojen peroksit ile oksidasyonunu katalizler. LPO, gıda, kozmetik ve oftalmik solüsyonların korunmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, ortamda bulunan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tiyosiyanat (SCN^-) ile birlikte bir sistem oluşturarak, çiğ sütün raf ömrünü uzatır (Asaah ve diğ., 2007). LPO sisteminin diş eti iltihabı ve paradontoz tedavisi için uygun olduğu tespit edilirken, ağızdaki bakterilerin azaltılması için de diş macunlarında ve gargaraların içeriklerine eklenmektedir (Magacz ve diğ., 2019).

Çalışmamızda bazı bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir.

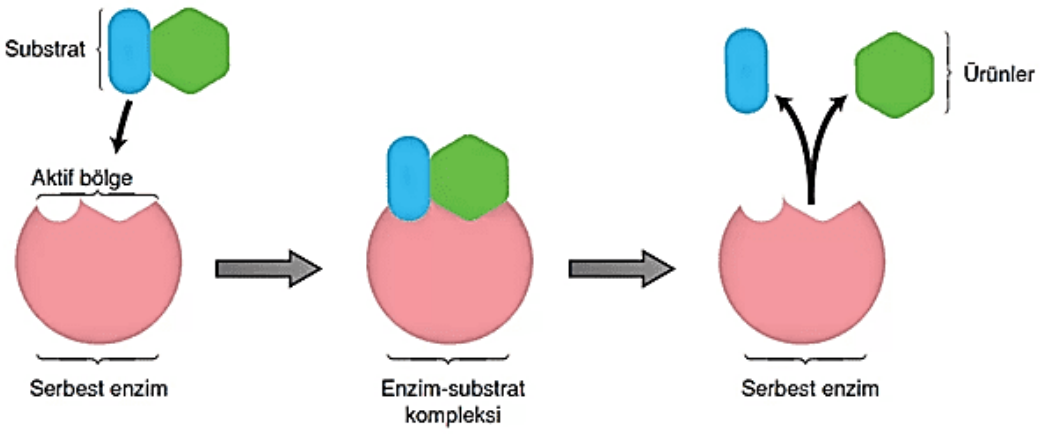
2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENZİMLER

Enzimler, yaşayan organizmalarda biyokimyasal reaksiyonların hızını arttırmak suretiyle görev yapan biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerden de elde edilebilen enzimler, ticari olarak da geniş bir alanda birçok önemli işlemde kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin modifikasyonunda, besinsel olarak tatlandırıcı bileşenlerin üretiminde, deterjan ve birçok temizlik ürününün içerisinde olmak üzere birçok alanda enzimler tercih edilmektedirler.

Enzim kelimesi ilk olarak 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından tanımlanmıştır. Kühne bu tanımı yaparken, mayalarda şekerden alkol üretimi reaksiyonunu temel alarak, Yunanca kökenli "en" (içinde, beraberinde) ve "zume" (maya) kelimelerini kullanmıştır. 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın başları itibariyle, enzimlerin ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve ticari alanda tüketimlerinde hızlı bir ilerleyiş söz konusu olmuştur. Yapılan araştırmalar, enzimlerin katalitik aktivitelerinin protein molekülleri ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.

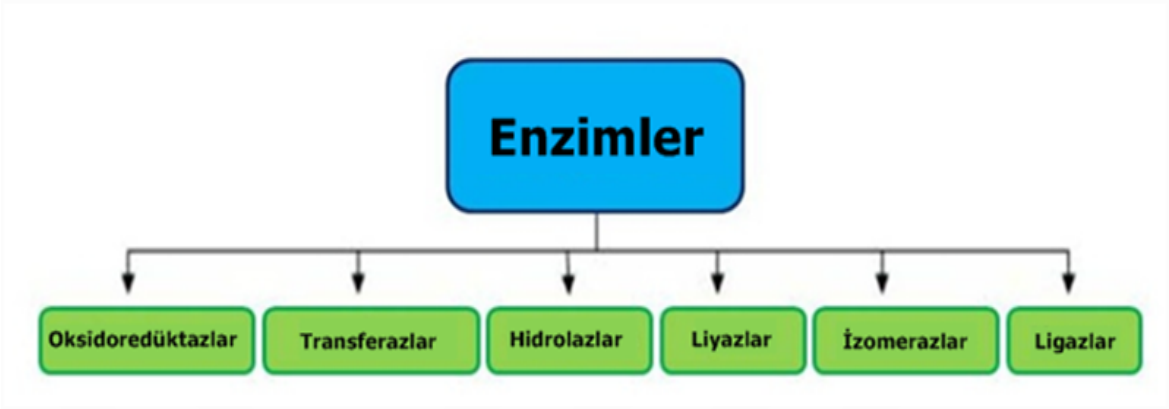
Reaksiyonlarda biyolojik katalizör görevi gören enzimler, çok düşük konsantrasyonlarda dahi işlev görebilmektedirler. Enzimlerin etki ettikleri maddeye de substrat adı verilmektedir. Şekil 2.1'de enzim ve substrat ilişkisi görülmektedir (Robinson, 2015).



Şekil 2.1: Enzim-substrat ilişkisi (www.monolib.net).

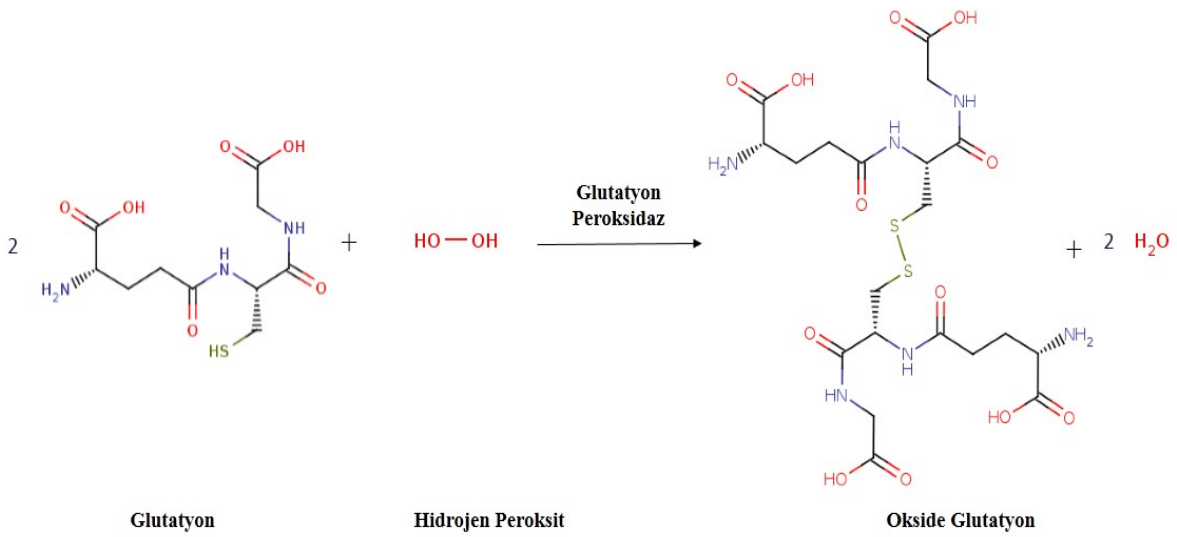
2.2. ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Enzimler genel olarak 6 ana sınıfta toplanırlar (Şekil 2.2.).



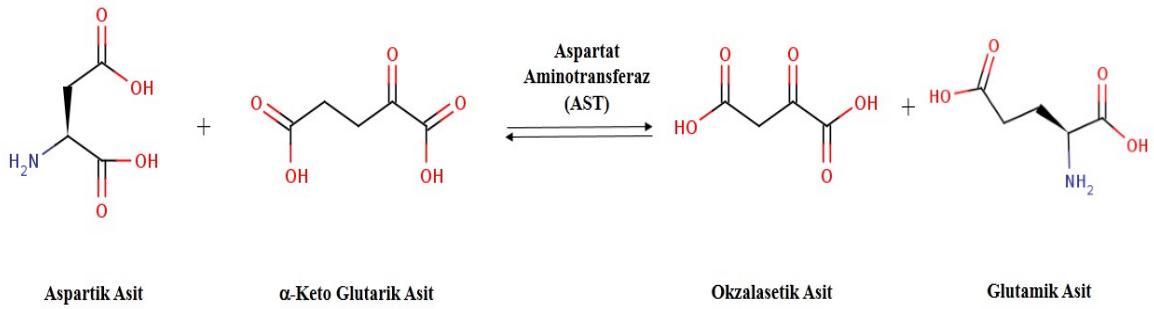
Şekil 2.2: Enzimlerin sınıflandırılması (www.byjus.com).

Oksidoredüktazlar; yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında görevli enzimlerdir. Laktoperoksidazda, peroksidaz sınıfı bir enzim olarak bu gruba dahildir. Dehidrojenaz ve oksidazlar gibi enzimler, substrat olarak, elektron ve hidrojen vericileri bu sınıfta kullanılmaktadır (Şekil 2.3).



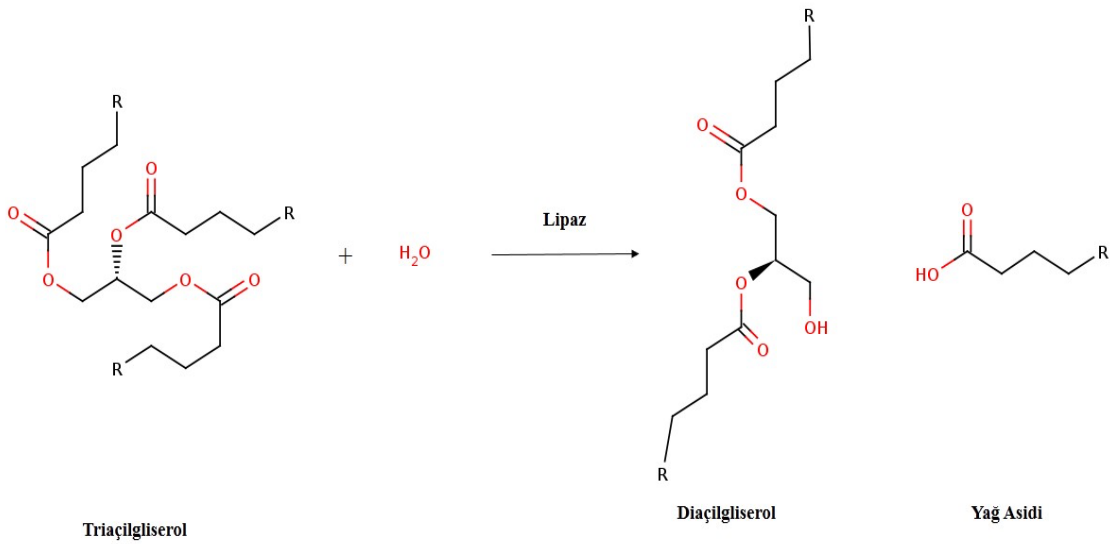
Şekil 2.3: Glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

Transferazlar: Kimyasal bileşikteki fonksiyonel grupların bir molekülden başka bir moleküle taşınması işleminde görevli enzim sınıfıdır. Fosfat, açil, glikozil vb. birçok grubun aktarılmasından sorumludurlar (Şekil 2.4).



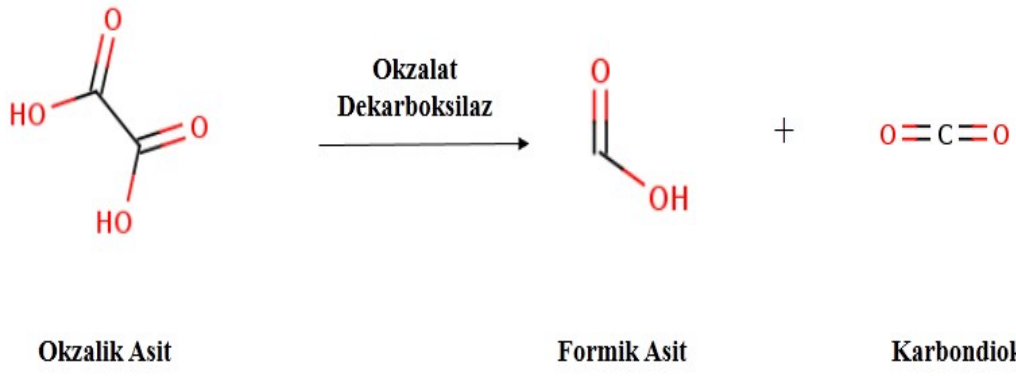
Şekil 2.4: Aspartat aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını, suyun yapısındaki H^+ ve OH^- gruplarının yardımıyla gerçekleştiren ve böylece moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Bu sınıf enzimler, ester ve eter bağları, peptit bağları vb. bağlara etki ederek hidroliz işlemini gerçekleştirirler (Şekil 2.5).



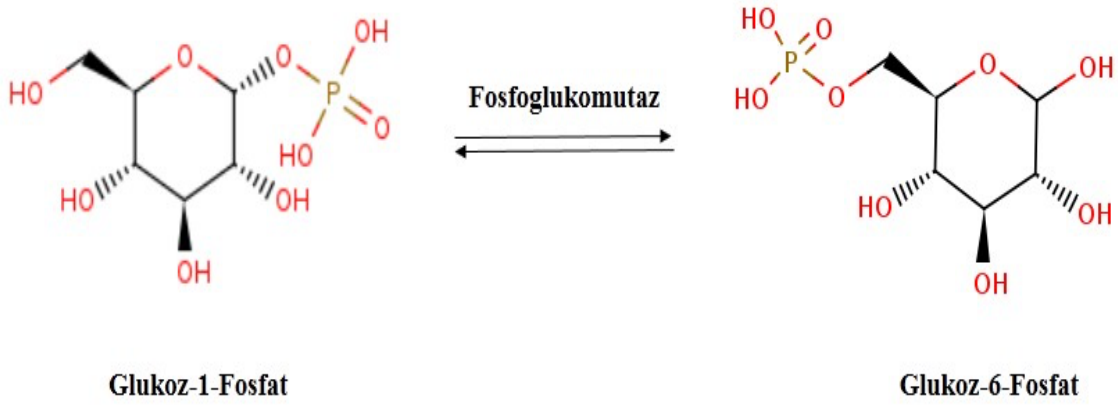
Şekil 2.5: Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

Liyazlar: C-C, C-O, C-N ve C-S gibi gruplar arasında çifte bağların oluşumunu sağlayarak substrattan bazı grupların ayrılmaları reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Şekil 2.6).



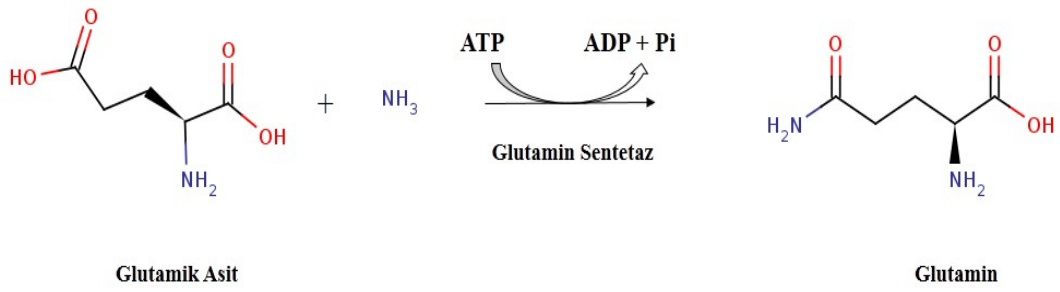
Şekil 2.6: Okzalat dekarboksilaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

İzomerazlar: Substratların molekül düzenlerindeki değişikliklerin katalizlenmesinde görev alıan enzimlerdir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Fosfoglukomutaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

Ligazlar: İki molekülün birleşmesini katalizleyen bu sınıf enzimler, reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ATP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerine ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Glutamin sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyon (https://www.brenda-enzymes.org).

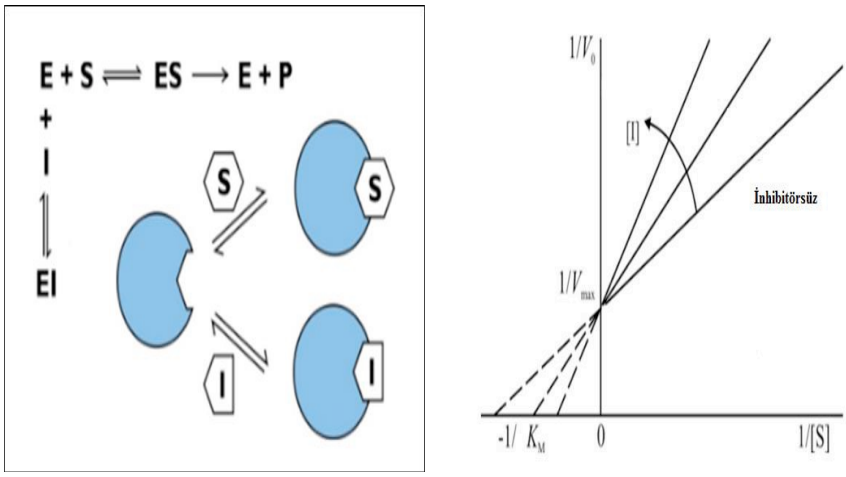
2.3. ENZİM İNHİBİSYONU

Enzim inhibisyonu, enzimlerin *in vivo* veya *in vitro* ortamda aktivitelerinin azaltılması veya durdurulması olayıdır. Bu durumu oluşturan maddelere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler, genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlar olabilmektedir. Biyolojik sistemler söz konusu olduğunda, enzim inhibisyonu büyük bir önem taşımaktadır. Bir kontrol mekanizması olarak da sayılan enzim inhibisyonu, pek çok ilaç veya zehirli bileşiklerin metabolizmaya hangi tür yollarla etki ettiğinin kanıtlanmasında etkili olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2018). Enzim inhibisyonları, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır.

2.3.1. Geri Dönüşümlü İnhibisyon Türleri

2.3.1.1. Yarışmalı İnhibisyon

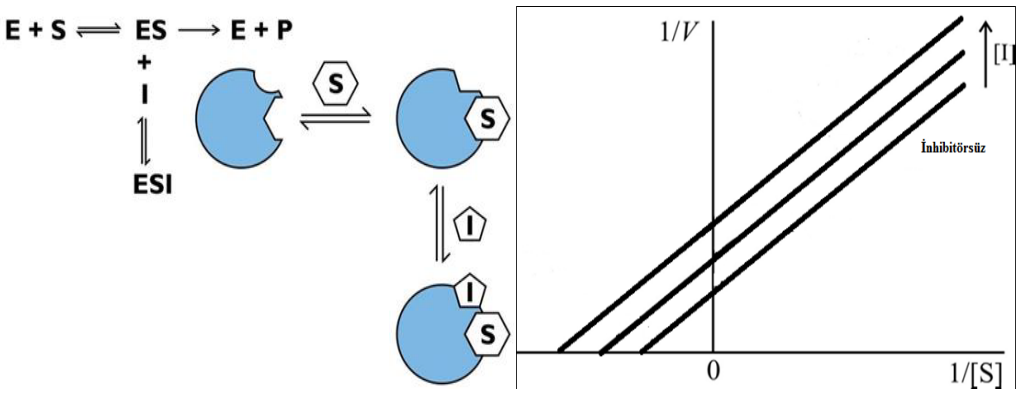
Bu tip dönüşümlü inhibisyonda, inhibitör yapı olarak substrata çok benzemektedir. İnhibitör, substratla yarışarak enzimin aktif merkezine bağlanmaktadır. Enzimin substratına göstermiş olduğu affinite azaldığı için Km değeri artmaktadır. Vmax değerinde ise bir değişiklik olmamaktadır (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017). Şekil 2.9'da yarışmalı inhibisyon şeması ile Lineweaver-Burk grafiği gösterilmektedir.



Şekil 2.9: Yarışmalı inhibisyon şeması ve Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017).

2.3.1.2. Yarı Yarışmalı İnhibisyon

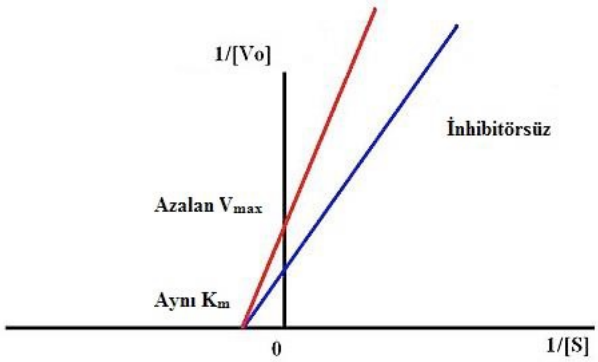
Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör madde serbest enzime bağlanmaz. İnhibitör madde, enzim-substrat kompleksine bağlanmaktadır. Neticede enzim-substrat-inhibitör kompleksi meydana gelir. Km ve Vmax değerlerinin ikisi de azalma göstermektedir (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: Yarı yarışmalı inhibisyon şeması ve Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017).

2.3.1.3. Yarışmasız İnhibisyon

Bu inhibisyon çeşidinde ise inhibitör enzimin aktif bölgesinin dışındaki bir bölgeden enzime bağlanmaktadır. Substratın enzimin aktif merkezine bağlanması engellenmemektedir, bununla birlikte enzimin konformasyonel yapısında değişiklik meydana geleceği için reaksiyon hızında değişmeler söz konusudur (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017). Şekil 2.11'de yarışmasız inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Yarışmasız inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017).

2.3.2. Geri Dönüşümsüz İnhibisyon Türü

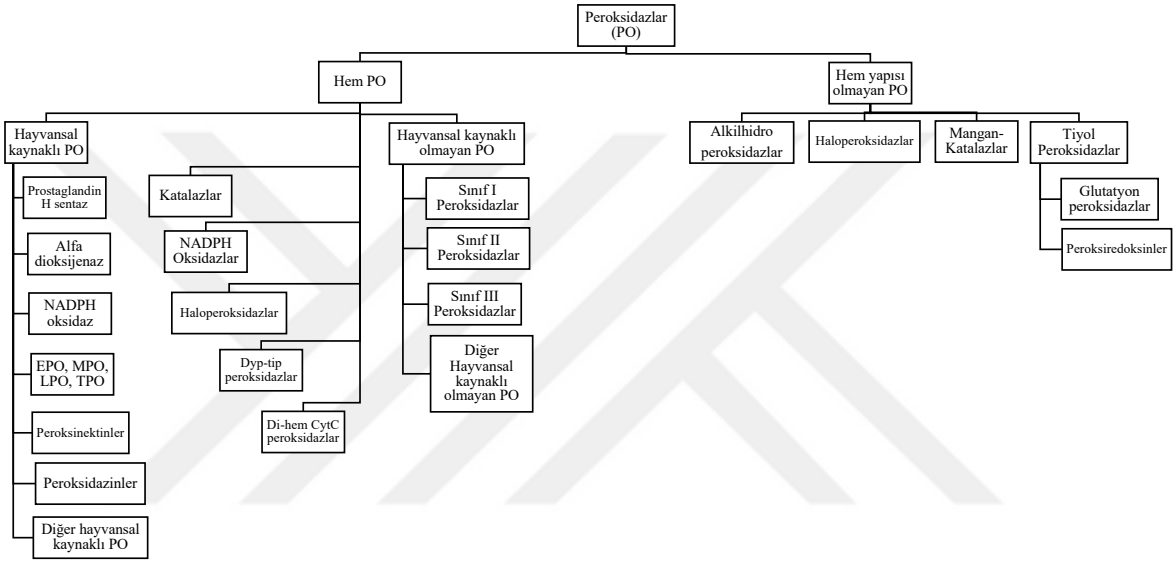
Geri dönüşümsüz inhibitörler, gerek kovalent gerekse kovalent olmayan etkileşimler ile enzime çok sıkı bir biçimde bağlanmaktadırlar. Bazı önemli ilaçlar, geri dönüşümsüz inhibitör olarak enzim inhibisyonu gerçekleştirmektedir (Berg ve diğ., 2014, Gürdöl, 2017).

2.4. PEROKSİDAZLAR

Peroksidazlar, H_2O_2 varlığında ksenobiyotiklerin oksidasyonundan sorumlu olan enzimlerdir (Saunders, 1973). Endüstriyel ve biyomedikal alanda birbirinden farklı birçok uygulamada peroksidazlar tercih edilmektedir. Bu alanlarda kullanılan peroksidazların daha çok bitki ve mantar oldukları olarak literatürde belirtilmektedir. Bu uygulamalara örnek olarak, antibiyotik üretimi, organik ve polimer madde sentezleri ile ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesi verilebilir (Le Roes-Hill ve diğ., 2011).

Bu sınıfta yer alan enzimlerin büyük bir çoğunluğu yapısında protoporfirin IX bileşiği içermektedir. 4 Adet pirol halkası Fe^{3+}'e bağlı durumdadır. Hem, halkanın proksimal

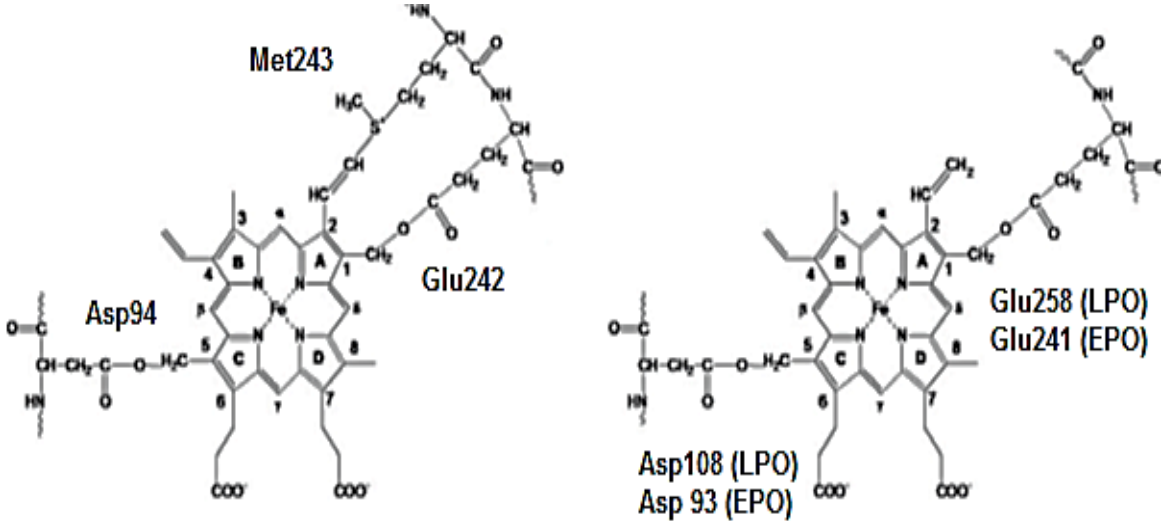
kısmındaki beşinci koordinasyon merkezine histidin amino asidinin imidazol yan zinciri bağlanmış durumdadır. Altıncı koordinasyon merkezi ise hem halkasının distal kısmında ve boş olarak bulunmaktadır (O'Brien, 2000). Bununla birlikte, yapılarında hem grubu içermeyen bazı peroksidaz enzimleri de tanımlanmıştır. Peroksidaz enzimleri ile ilgili genel şema Şekil 2.12'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12: Peroksidaz enzimleri (Passardi ve diğ., 2007).

Aralarında eozinofil peroksidaz (EPO), miyeloperoksidaz (MPO), tiroit peroksidaz (TPO) ve laktoperoksidazın da (LPO) yer aldığı hem grubu içeren bu peroksidazlar, ilk olarak memelilerde tanımlanmalarından dolayı memeli peroksidazları olarak da bilinmektedir. Bu enzimlerin bromür, klorür gibi küçük anyonları, tiyosiyanatı ve nitriti okside ettiği ve böylece doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli bir rol üstlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından literatürde bildirilmiştir (Singh ve diğ., 2008, 2009). Bu peroksidazların yapılarının aydınlatılması için yapılan çalışmalarda, aspartat ve glutamat amino asitleri ile hem halkası arasında oluşan ester bağlarının önemli rolü olduğu belirlenmiştir (Gumiero ve diğ., 2010). Şekil 2.13'te hem halkası ile amino asitler arasındaki etkileşim gösterilmektedir. Ayrıca, DePillis ve diğ. (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-

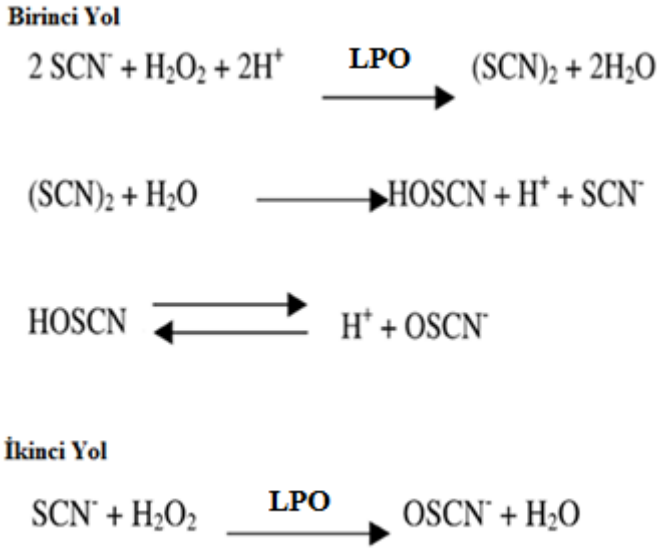
sulfonik asit) (ABTS) kullanılmış ve bu enzimlerin oksitleme aktivitelerinin artmasının hem-kovalent bağlanma derecesinin doğru orantılı olduğu belirtilmiştir.



Şekil 2.13: Memeli peroksidazlarında hem halkası ile amino asitler arasındaki etkileşim (Gumiero ve diğ., 2010).

2.4. LAKTOPEROKSİDAZ SİSTEMİ

Laktoperoksidaz sistemi (LPO sistemi), doğal antimikrobiyal sistemlerden biri olup, üç komponentten oluşmaktadır. Bu sistemde laktoperoksidaz (LPO), tiyosiyanat (SCN^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bulunmaktadır. LPO sistemi, bu üç komponentin tümünün varlığında aktiftir. Sütte doğal olarak bulunan LPO enzimi, H_2O_2 varlığında, SCN^-'ın oksidasyonunu katalize eder ve oluşan hipotiyosiyanat ve hipotiyosiyanöz asit gibi ürünler antimikrobiyal aktivite gösterir. Oluşan bu ürünler, bakteri, küf ve virüslere karşı geniş bir antimikrobiyal etki göstermektedir (Hogg ve Jago, 1970; Barrett ve diğ., 1999; Seifu ve diğ., 2005). Bu sistemin çiğ sütün korunmasında etkin rol oynadığı, düşük konsantrasyon değerlerinde insan sağlığı üzerinde herhangi bir yan etkisinin olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (Asaah ve diğ., 2007). Enzimin asidik pH değerlerinde daha aktif olduğu da literatürde belirtilmektedir (Wever ve diğ., 1982). Bu sisteme ait reaksiyonlar Şekil 2.14'te gösterilmiştir.



Şekil 2.14: Laktoperoksidaz sisteminin reaksiyonları (Gürsel, 2004).

2.4.1. Laktoperoksidaz

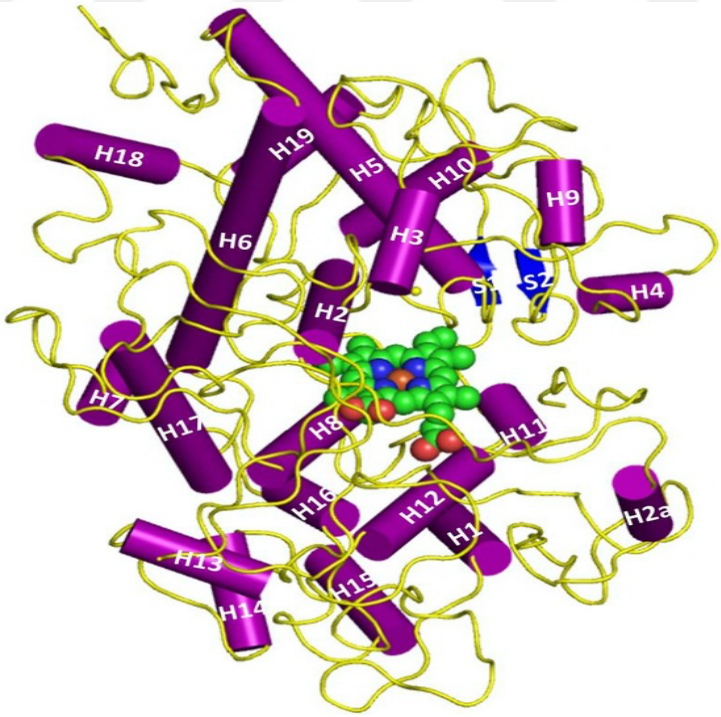
Peroksidaz ailesinin bir üyesi olan laktoperoksidaz (E.C. 1.11.1.7, LPO), sığır, manda, keçi, inek ve insan sütünün normal bir bileşenidir. Memelilerin tükürük, süt ve gözyaşı bezleri ile bunlara ait salgılarda bulunmaktadır. Kimyasal ve immünolojik olarak bu salgılarda benzer özellik göstermektedirler. Patojen mikroorganizmalara karşı yeni doğanların bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini korumada önemli bir role sahiptir (Kumar ve diğ., 1995).

LPO enziminin biyolojik önemi, mikroorganizmaların istilasına karşı doğal bir koruma sistemi içermesi ve hayvan hücrelerini çeşitli zarar ve peroksidatif etkilere karşı korumasıdır (Reiter ve Härnulv, 1984; Wolfson ve Sumner, 1993). LPO enzimi, yeni doğan bebeklerin sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalara karşı savunma sisteminde rol oynar. LPO enziminin aktivitesinin azalması, laktasyon periyodunda ve sütün taşınması sırasında önemlidir. LPO enziminin inhibe olması, immün sistemin zayıflaması anlamına gelmektedir.

LPO enzimi özellikle süt işleme tesislerinde nakil ve depolama esnasında sütün muhafaza edilmesi amacı ile kullanılmaktadır (Barrett ve diğ., 1999). Ayrıca kozmetiklerde ve oftalmik solüsyonlarda, antitümör ve antiviral ajan olarak (Bjoerck ve diğ., 1979), çiçek ve meyvelerin gelişiminin korunmasında kullanılır (Touch ve diğ., 2004). Laktoperoksidaz geniş bir antifungal aktiviteye sahiptir (Jacob ve diğ., 1998; Sisecioğlu ve diğ., 2009). Bakteriyel

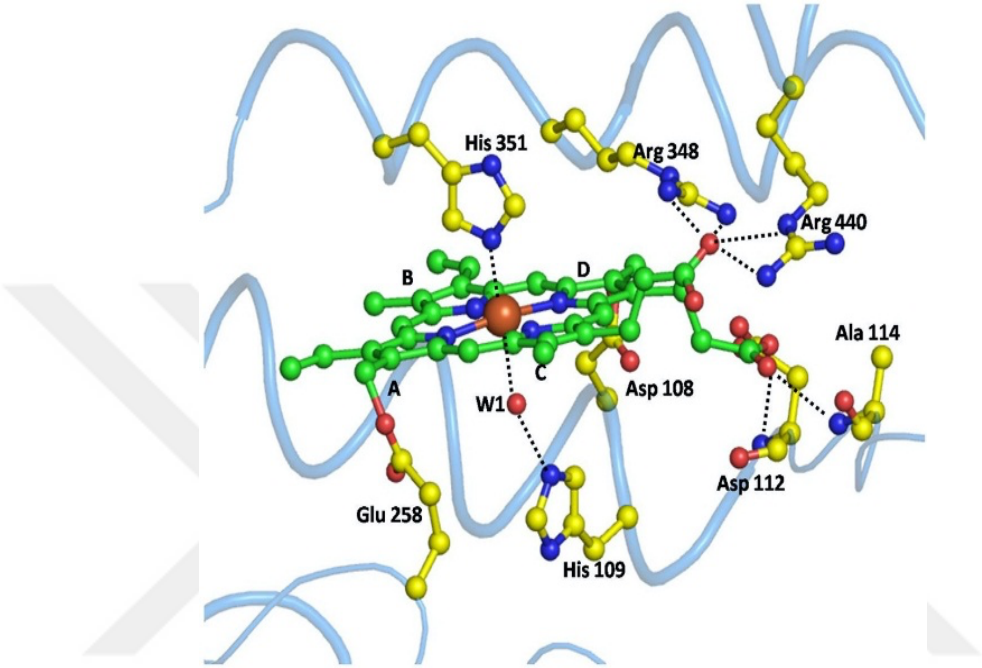
büyümeyi hücre zarlarına zarar vererek ve çeşitli sitoplazmik enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek azaltabilirler. LPO'nun çocuk felci virüsü ve ineklerde çiçek hastalığı virüsunun her ikisini de öldürdüğü Yılmaz ve Tosun (2013) tarfından bildirilmiştir.

Hem insan hem de sığır LPO enziminin tek zincirli ve monomerik glikopeptit yapıda olduğu, insan LPO enziminin 80 kDa, sığır LPO enziminin ise 78 kDa ağırlığında olduğu bilinmektedir (Borzouee ve diğ., 2016; Gnanesh Kumar ve diğ., 2018). Birçok peroksidaz enziminde olduğu gibi, Asp227 ile etkileşen kalsiyum atomu, enzimin yapısının, termal kararlılığının ve aktivitesinin korunmasında önemli bir role sahiptir (Magacz ve diğ., 2019). Buna ek olarak, insan LPO enziminin 16 adet sistein kalıntısı içermekle birlikte toplam 632 amino asit kalıntısına sahip olduğu ve sığır LPO enziminin 15 sistein kalıntısı ile birlikte toplam 612 amino asit kalıntısı içerdiği literatürde belirtilmektedir. Yapısında %8-10 oranında karbohidrat içermekte olan LPO, bazik bir proteindir ve enzimin izolektik pH'ı 9.2 olarak bilinmektedir (Kussendrager ve Van Hooijdonk, 2000; Banerjee ve diğ., 2011; Sharma ve diğ., 2013). LPO enzimi, bir demir molekülü içerir ve demirin oranı % 0.07'dir (Booth ve diğ., 1989).



Şekil 2.15: Laktoperoksidaz enzim yapısı (Sharma ve diğ., 2013).

Şekil 2.15'te LPO enzim yapısı gösterilmektedir. Mor ile belirtilen yapılar α-heliks yapısını, mavi ile belirtilen kısımlar β-tabakasını işaret etmektedir. Hem grubu, merkezde ve yeşil renkte belirtilmiştir. Hem grubunun enzim ile olan etkileşimi Şekil 2.16'da detaylı olarak gösterilmektedir. Hem demiri turuncu renkli olarak işaretlenmiştir.



Şekil 2.16: Hem grubu ile laktoperoksidaz arasındaki etkileşim (Sharma ve diğ., 2013)

2.4.2. Tiyosiyanat Anyonu

Mide ve böbreklerde, tiroit bezi, memede, tükürükte, bunların salgılarında ve hayvan dokularında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Konsantrasyonu, hayvan türüne, laktasyon dönemine, yem kompozisyonuna ve yemleme şekline bağlı olarak değişmektedir. LPO sisteminin antibakteriyel aktivitesinden sorumludur.

2.4.3. Hidrojen Peroksit

LPO sisteminin üçüncü bileşenidir. Normalde çiğ sütte bulunmaz. Polimorfonükleer lökositler ve bazı mikroorganizmalar tarafından üretilir. Ayrıca askorbik asidin, glukoz oksidaz, hipoksantinin ksantin oksidaz tarafından oksidasyonları yoluyla üretilebilir. Çoğu laktobasil, laktokok ve streptokoklar, aerobik şartlarda LPO sistemini aktive etmek için yeterli miktarda

H_2O_2 üretirler. H_2O_2 sisteme dışardan ilave edildiği gibi, sodyum perkarbonat, glukoz oksidaz gibi H_2O_2 üreten sistemler ilavesiyle de sağlanabilir (Seifu ve diğ., 2005).

2.4.4. Laktoperoksidaz Sisteminin Antimikrobiyal Rolü

LPO sisteminin antimikrobiyal etkisi, enzimin hipotiyosiyanit iyonlarını oluşturması temeline dayanmaktadır. Hipotiyosiyanit iyonları bakteriyel membranlar ile etkileşime girer ve bazı metabolik enzimlerin de fonksiyonlarını engellerler. Bazı ülkeler, üretim konusunda direkt H_2O_2 eklenmesini yasaklamışlardır. Bunun yerine ortama glukoz oksidaz eklenmesi ve bu yolla H_2O_2 oluşması hedeflenmektedir. Tiyosiyanat anyonu ise doğal yollardan alınabileceği gibi ortama eklenmiş olan sodyum veya potasyum tiyosiyanat tuzları ile de alınabilmektedir. Bu enzim sistemi, Gram-pozitif bakterilerin büyümesini engellerken, Gram-negatif bakteriler üzerinde ise direkt öldürücü etkiye sahiptir (Seifu ve diğ., 2005).

2.4.5. Laktoperoksidaz'ın Fizyolojik ve Patolojik Koşullar Altında Salgılanması

Süt, gözyaşı, servikal ve solunum sistemi mukus tabakası ile tükürükte bulunan LPO salgılanması, miyeloperoksidaz gibi diğer peroksidazların aksine inflamasyon koşullarından etkilenmemektedir. Fakat, H_2O_2 üretiminin artması LPO enziminin peroksidasyon döngüsüne katılmasına sebep olmaktadır (Gau ve diğ., 2018).

Sirkadiyen ritim sürecinde LPO salgılanması değişmektedir. Gece saatlerinde maksimum konsantrasyona ulaşan LPO, artan fiziksel aktiviteler ile de ilişkilendirmektedir. Gün içinde yoğun olarak aktivitelere bağlı olarak kalp ve iskelet kasındaki mitokondrilerde süperoksit anyonunun oluşumu gerçekleşir. Oluşan süperoksit anyon radikali gerek kendiliğinden gerekse süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler ile katalitik olarak H_2O_2'e dönüştürülür. Buna ek olarak H_2O_2 oluşumu, NAD(P)H oksidaz ve ksantin oksidaz gibi bazı enzimler ile de gerçekleştirilir. Sonuç olarak LPO enziminin aktivitesi, toksik olan H_2O_2'in ortamdan uzaklaştırılması için artış göstermektedir (Powers ve Jackson, 2008; Damirchi ve diğ., 2010; Arazi ve diğ., 2016; Memarzadeh Zahedani ve diğ., 2017).

Tükürük LPO konsantrasyonu, menstrüel siklusta değişiklik göstermekte ve ovulasyonu izleyen birkaç gün içerisinde sekresyon pik yapmaktadır. Hamileliğin son üç aylık döneminde enzimin aktivitesinin arttığı gözlenmektedir. Bu artışın tükürük bezlerinde bulunan asinar ve duktal hücrelerin östrojen reseptörlerinin ekspresyonlarının artışı ve dolayısıyla tükürük

bezlerinde östrojen hassasiyetinin oluşmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Laine ve diğ., 1988; Leimola-Virtanen ve diğ., 2000; Välimaa ve diğ., 2004).

Goi ve diğ. (2007) sigara kullanan bireylerdeki LPO aktivitesinin sigara kullanmayan bireylere göre daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum, sigarada bulunan hidrojen siyanürün LPO enzimini inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (Klein ve diğ., 2003; Reznick ve diğ., 2003).

Alkol tüketen bireylerde, alkol tüketiminden kaynaklanan ve hızlanan etanol metabolizması sonucunda oluşan süperoksit radikali ve H_2O_2 miktarının LPO aktivitesini arttırmakta olduğu da literatürde bildirilmektedir (Waszkiewicz ve diğ., 2012).

2.4.6. Laktoperoksidaz'ın Biyosidal Etkisi

LPO sisteminin önemli bir bileşeni olan hipotiyosiyanit iyonları, mikroorganizmalardaki glikoliz reaksiyonlarının anahtar enzimlerinin tiyol grupları ile reaksiyona girerek oksidasyon işlemini gerçekleştirmektedirler (Love ve diğ., 2016). Reaksiyon Şekil 2.17'de gösterilmiştir.

Reaksiyonda tiyol gruplarının oksidasyon sonucu, R-S-SCN oluşur. Daha sonra bu ürün, su ile reaksiyona girerek hidroksi tiyol (R-S-OH) oluşturmak üzere parçalanır. Oluşan bu ürünler, yeniden oksitlenebilen ve tiyol grupları ile daha ileri reaksiyona girebilen tiyosiyonat ürünlerini oluşturur. -SH gruplarının oksidasyonu bakteriyel sitoplazmik zarın glukoz, potasyum iyonları, amino asitler ve peptidleri taşıma yeteneğini kaybetmesine neden olur. R-S-OH ve R-S-SCN ürünleri, geri dönüşümü olmayan inhibisyon etkisine sahiptirler (Love ve diğ., 2016; Koksal, 2018).

$$R\text{-}SH + OSCN^{-} \rightarrow R\text{-}S\text{-}SCN + OH^{-}$$

$$R\text{-}S\text{-}SCN + H_2O \rightarrow R\text{-}S\text{-}OH + SCN^{-} + H^{+}$$

Şekil 2.17: Glikoliz reaksiyonlarının anahtar enzimlerinin tiyol grupları ile hipotiyosiyanit iyonunu arasındaki reaksiyon zinciri (Magacz ve diğ., 2019).

2.4.7. Laktoperoksidaz'ın Dental Plak ve Organik Asit Oluşumunun İnhibe Edilmesindeki Rolü

Periodontit gibi hastalıklarda, plak veya biyofilm oluşumların etkisi büyüktür. LPO enzimi, plak/biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir (Cooper, 2013). Cawley ve diğ. (2019) LPO enzim sisteminin laktoferrin, lizozim ve sütte bulunan immünoglobülinler ile birlikte koordineli bir şekilde *Streptococcus mutans* türü biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini yayınlamışlardır.

Ortamdaki mikroorganizmalar tarafından diş yüzeyindeki demineralizasyonun, hızlanan karbohidrat metabolizmasının bir sonucu olan organik asit oluşumundan kaynaklandığı bilinmektedir. LPO sistemi, hekzokinaz, 3-fosfogliseraldehit dehidrojenaz, aldolaz ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (Mickelson, 1977; Hawkins, 2009) enzimlerini inhibe etmektedir. Buna ek olarak LPO sistemi, hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarını (GLUT transporter) etkileyerek glukoz taşınmasını da engellemektedir (Reiter ve Härnulv, 1984).

2.4.8. Laktoperoksidaz'ın Nanoteknolojide Kullanımı

Nanopartiküller, hacimlerine oranla geniş bir yüzeye sahip olmaları ile karakterize edilen yapılardır. Çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, bir taşıyıcı gibi davranarak ilaçların hücre içine iletilmesinde, ilaçların kontrollü salınımlarının düzenlenmesinde etkin rol oynarlar. Çeşitli metaller ile oluşturulan nanopartiküllerin LPO enzimi ile etkileşimleri incelenmiştir. Gümüş nanopartikül yapılarının LPO enziminin stabilizasyonunu sağladığı ve LPO'ın bakterisidal özelliğinin gümüş nanopartikül yapıları ile korunduğu literatürde belirtilmiştir (Sheikh ve diğ., 2018). LPO'ın kozmetik ve farmasötik alanlardaki kullanımında enzimin stabilizasyonunun sağlanmasında gümüş nanopartiküllerin yanı sıra grafen oksit ve bakır nanopartikül yapılarının da kullanıldığı Altinkaynak ve diğ. (2016) ile Shariat ve diğ. (2018) tarafından yayınlanmıştır.

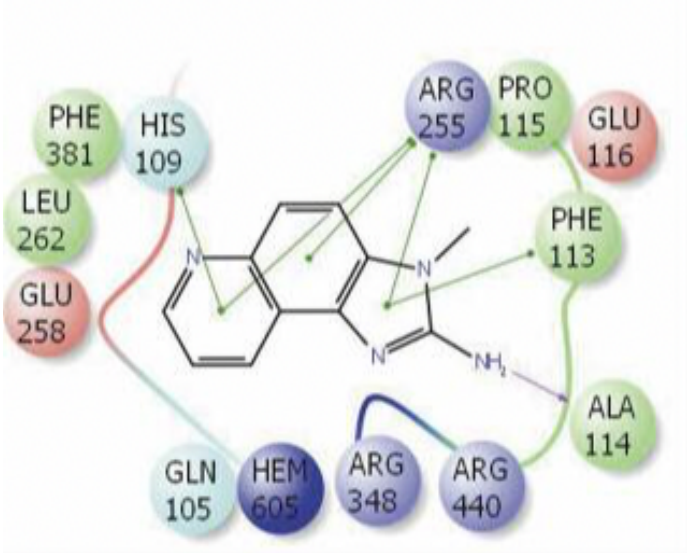
2.4.9. Astım Hastalığı ve Laktoperoksidaz Aktivitesi

Solunum sistemi, inhalasyon yoluyla alınan toksin ve partiküllere karşı bir savunma sistemine sahiptir. Bu savunma sistemi, epitelyal hücreler ve mukusa salgılayan hücreleri kapsayan fiziksel bir bariyer sistemi, silya gibi mekanik temizleyici yapılar, immünoglobülinler ve kimyasal-biyosidal etkili bileşenlerden oluşmaktadır (Ratner ve Prince, 2000). Bu sisteme ek olarak, solunum yolu epitel yapısının H_2O_2 vb. ajanlar tarafından oluşturulan oksidatif hasardan

korunmasında, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerinin de çok önemli bir rolü vardır (Bowler, 2004). LPO, sağlıklı bireylerde solunum yolu salgılarında en önemli H_2O_2 yakalayıcısı olarak görev yapmaktadır. Oksidatif stres, astım hastalarında çok kritik bir rol oynamakta olup, hastalığın seyrinde ilerlemeye neden olmaktadır (Dohlman ve diğ., 1993; Montuschi ve diğ., 1999). Solunum yollarındaki pH değerinin herhangi bir sebepten dolayı düşmesi, artan H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak laktoperoksidazın aktivitesinin artmasına ve dolayısıyla bu enzimin antibakteriyel özelliğinin ortaya çıkmasına neden olur (Wijkstrom-Frei ve diğ., 2003).

2.4.10. Göğüs Kanserinde Heterosiklik Aminlerin Rolü ve Laktoperoksidaz ile Aktivasyonları

Göğüs kanseri, kadınlarda en sık rastlanan ve kanser bağlantılı ölümlerde ikinci sırada yer almakta olan bir kanser türüdür (Tracy ve diğ., 2017). Göğüs kanserinin birçok faktöre bağlı olarak gelişen bir kanser türü olduğu ve bu faktörler arasında çevresel faktörlerin ve besinsel karsinojenlerin rolü olduğu bilinmektedir (Henderson, 1993). Et gibi hayvansal kaynaklı bazı gıdalarda, çok yüksek ısıda pişirme işlemi sonucunda amino asitler, bazı karbohidrat birimleri ve kreatinin, heterosiklik aminlerin oluşumunda etkili konumdadırlar. Besinsel karsinojen niteliği taşıyan bu heterosiklik aminler, vücutta mutajenik etki göstererek kanser oluşumunu tetiklemektedir. Heterosiklik aminlerin insan ve hayvan organizmalarındaki biyoaktivasyonu, oksidaz ve peroksidazlar gibi oksidasyon enzimleri ile gerçekleştirilir ve sonuçta daha reaktif bileşikler meydana gelir. LPO enzimi de heterosiklik aminlerin de içinde bulunduğu bazı mutajenik ve karsinojenik kimyasal bileşiklerin oksidasyon ve aktivasyonlarında görev yapmaktadır. Sonuçta meydana gelen ürünler çok daha reaktif özellik kazanmakla beraber, DNA yapısında hasar oluşturmaktadır (Williams ve diğ., 2000). Sheikh ve diğ. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek ısıda pişirilmiş olan olan et içinde bulunan bazı heterosiklik amin bileşiklerinin LPO ile etkileşiminin olduğu kanıtlanmıştır. Şekil 2.18'de 2-amino-3-metilimidazo-[4,5-f]kinolin bileşiği için LPO ile etkileşimi gösterilmiştir.



Şekil 2.18: 2-Amino-3-metilimidazo-[4,5-f]kinolin bileşiği ile laktoperoksidaz enziminin etkileşimi (Sheikh ve diğ., 2017).

2.5. BİTKİLER VE BİTKİLERİN ENZİM İNHİBİSYONLARINDAKİ ROLLERİ

Günümüzde insan sağlığının korunması, yaşam kalitesinin sürdürülebilmesi için büyük önem arz etmektedir (Menezes ve Diederich, 2021). Son yıllarda bu konu ile ilgili olarak yapılan araştırmaların büyük bir çoğunluğu, bitkiler, sebze-meyve gibi doğal ürünler ve antioksidan içeriği yüksek olan yiyecekler üzerine yürütülmektedir (Hostetler ve diğ., 2017, Menezes ve Diederich, 2019). Bilhassa bitkilerden elde edilen doğal bileşenler, günümüzde birçok ilacın etken maddesi olarak da kullanılmaktadır (Gu ve diğ., 2014, Menezes ve Diederich, 2019).

Bitkiler, tedavi amaçlı olarak oral yolla alınmak suretiyle iki şekilde tercih edilmektedir. Bunlardan birincisi, bitkilerin direkt olarak tüketimi şeklinde olabilirken diğeri ise bitkilerden hazırlanan ekstrelerin alınması şeklinde olabilmektedir. Bitkilerin bu şekilde kullanılmaları hem kolaydır hem de ekonomik açıdan uygundur. Ayrıca, bitkisel preparatların kullanımı, hastalar için tedavi esnasında güvenilirlik arz etmekte olup herhangi bir enjeksiyon veya invasiv prosedüre ihtiyaç duyulmaması da hastalar için bir avantaj sağlamaktadır (Buyel, 2018).

Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, fitokimyasal olarak adlandırılmaktadır. Fitokimyasallar, bitkilerde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Dolayısıyla fitokimyasallar, yeni üretilen ilaçlar için de son derece önem arz etmektedirler (Liang ve diğ., 2021). Bununla birlikte, günümüzde gerek değişen yaşam şartları gerekse buna bağlı birçok faktöründe etki etmesinden

dolayı, başta Alzheimer hastalığı, diyabet ve kanser gibi birçok hastalık, gittikçe artan bir oranla yayılma göstermektedir. Bu sebepten dolayı, bu hastalıkların tedavilerinde kabul gören bir yaklaşım da enzimlerin inhibisyonudur (Uysal ve diğ., 2016). Bu yaklaşıma göre bir hastalığa ve/veya hastalıkla beraber gelişebilecek komplikasyonların azaltılabilmesi için anahtar görevi olan enzimlerin inhibe edilmesi yoluyla istenmeyen etkilerin azaltılması sağlanacaktır (Uysal ve diğ., 2016). Bitkisel kökenli bileşiklerin gerek metabolizma üzerindeki yararlı etkilerinden dolayı gerekse enzim inhibitörleri olarak tercih edildiği alanlar şu şekilde sıralanabilir:

i. Anti-kanser ilaçları: Yüksek kalitede ve yeterli miktarda anti-kanser ilaçlarının üretimi, maalesef talep edilen miktarı karşılamakta yetersiz kalmaktadır. Özellikle küçük molekül yapılı bazı anti-kanser ilaçlarının kimyasal sentezlerinin zor ve karmaşık olması, düşük reaksiyon verimi elde edilmesi ve ekonomik zorluklar gibi bazı sebeplerden dolayı fitokimyasallar tercih edilmektedir (Siddiqui ve Rajkumar, 2012; Buyel, 2018). Buna ek olarak, bu doğal bileşenler, NF-κB hedef alınması yoluyla anti-kanser özellik gösterebilmektedir (Padmavathi ve diğ., 2015).

ii. Peptik ülser tedavisi: Gastrointestinal sistemde mide ve duodenum gibi kısımlarda mukozal yapının bozulması ile meydana gelen kronik rahatsızlıkların bütünü olarak adlandırabileceğimiz peptik ülser, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, alkol tüketimi, nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar gibi birçok faktör nedeni ile oluşabilmektedir. Günümüzde proton pompa inhibitörleri (lansoprazol, omeprazol vb.), antasitler (sodyum bikarbonat, alüminyum hidroksit vb.) gibi ilaçlar ile tedavi sürdürülmekte olsa da, yapısında flavonoid, tannin, kumarik asit, karotenoid içeren bitkilerin de peptik ülser tedavisinde kullanılmakta olduğu literatürde bildirilmektedir (Gupta ve diğ., 2021).

iii. Yaşa bağlı olarak gerçekleşen bazı nörolojik rahatsızlıklar: Beyin, gerek nöronlar gerekse astrositler, oligodendrositler ve mikroglialar gibi birçok hücre tipini bünyesinde barındıran, vücudun toplam oksijen ihtiyacının %20'sini ve enerjisinin %25'ini kullanan önemli bir organdır (Schubert, 2005; Bélanger ve diğ., 2011). Oksijen ve enerji metabolizması arasındaki bağlantı göz önünde bulundurulduğunda, mitokondride meydana gelebilecek fonksiyon bozukluklarının Alzheimer ve Parkinson gibi birçok beyin hastalığını da beraberinde getirdiği

söylenebilir (Liang ve diğ., 2021). Bu hastalıkların tedavisinde kaemperol, luteolin, ferulik asit, A ve E vitamini gibi önemli fitokimyasalların ve vitaminlerin tercih edilme nedenleri, hem bu bileşenlerin serbest radikal kaynaklı oksidatif stresi önleyebilmeleri hem de asetilkolin esteraz (AChE) enziminin inhibitörü olarak görev yapmalarından dolayıdır (Ahmed ve diğ., 2021; Liang ve diğ., 2021). Sacan ve Yanardag (2010), pazı bitkisinin AChE enzimini etkili bir biçimde inhibe ettiğini kanıtlanmışlardır.

iv. Obezite tedavisi: Obezite, beraberinde kardiyovasküler komplikasyonlar, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet ve kanser gibi birçok hastalığı da getiren ve günümüzde en çok karşılaşılan hastalıklardan biridir. Bu hastalığın birçok metabolik mekanizma ile bağlantısı olmakla beraber, son yıllarda yapılan araştırmalar, pankreatik lipazın inhibe edilmesinin lipit metabolizması üzerinde olumlu sonuçlar elde edildiğini göstermiştir (Liu ve diğ., 2020).

v. Diyabet tedavisi: Diyabet, insülin salgılanmasında ve metabolizmanın insülinden faydalanmasında meydana gelen fonksiyon bozukluklarının karbohidrat, lipit ve protein metabolizmalarını etkilemesi ile bir bütün olarak değerlendirilen bir rahatsızlıktır (Sales ve diğ., 2012). Günümüzde bu hastalığın tedavisi için sülfonilüre ve biguanid yapılı bileşikler ilaç etken madde olarak kullanılmakta olup alfa-glukozidaz ve alfa-amilaz inhibitörü etkisi gösteren bazı bileşiklerin de glukoz absorbsiyonunu azaltması yönünde olumlu etkileri olduğu literatürde belirtilmektedir (Chakrabarti ve Rajagopalan, 2002; Inzucchi, 2002).

vi. Deri rahatsızlıkları: Tirozinaz enzimi, melanin sentezinde rol oynamaktadır ve enzimin inhibisyonu deri hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Kim ve Uyama, 2005; Göktaş, 2012).

vii. Antimikrobiyal etki: Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin birçoğunun antimikrobiyal etkisinin olduğu ve bakteri kaynaklı enfeksiyonların önlenebildiği, Wallace (2004) tarafından literatürde yayınlanmıştır.

viii. Antiviral etki: 2019 yılı Aralık ayında Wuhan, Çin'de ortaya çıkması ile birlikte tüm dünya genelinde hızlı bir şekilde yayılmak suretiyle etkisini gösteren SARS-CoV-2 virüsünün metabolizmada yol açtığı birçok komplikasyonun etkilerinin azaltılması için favipiravir vb. birçok antiviral kaynaklı ilaç kullanılmaktadır (Chauhan ve diğ., 2021). Ancak kullanılan ilaçların hastalar üzerinde oluşturmuş olduğu olumsuz etkilerden dolayı, araştırmacılar çalışmalarını fitokimyasallar üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Lektin, flavonoid, klorojenik asit gibi doğal bileşenleri içeren bitkilerin koronavirüs enfeksiyonlarının oluşturmuş olduğu etkileri azaltıcı etkilerinin olduğu Alsenani (2021) tarafından yayınlanan bir derleme çalışmasında belirtilmektedir.

Çalışmamızda, laktoperoksidaz enzimi üzerine bazı bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin inhibisyon etkisi incelenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN CİHAZ VE ALETLER

Buzdolabı : Arçelik

Derin Dondurucu : Beko

Destile Su Cihazı : Brand MonoDest 3000

Etüv : Memmert

Evaporatör : Bibby Rotary Evaporatör RE100

Isıtıcı : Electromantle

pH Metre : Hanna HI2211

Terazi : Radwag AC 220/C/2 ve Radwag XA 60/220/X

Spektrofotometre : Shimadzu UV-VIS Spektrofotometre-Mini 1240

Ultrasonik Su Banyosu : Bandelin Sonorex

Vorteks : Fisons Whirlimixer

3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Deneyimizde kullandığımız kimyasallar; alüminyum sülfat (Riedel de Haën, 404480, $Al_2(SO_4)_3$), askorbik asit (Merck, 100127), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (Sigma, 11557), B_1 vitamini (Fluka 95160), B_2 vitamini (Merck, 500257), B_3 vitamini (Sigma, 72340), B_6 vitamini (Fluka 82870), B_7 vitamini (Sigma, B5768), bakır (II) sülfat (Panreac, 122726, $CuSO_4$), benzoik asit (Merck, 130), çinko sülfat (Merck, 8881, $ZnSO_4$), civa (II) sülfat (Fluka, 83384, $HgSO_4$), demir (II) sülfat (Merck, 3967, $FeSO_4$), 3,5-dinitrobenzoik asit (Fluka, 41950), L-Dopa (Sigma, D9628), dopamin (Sigma, H8502), E vitamini (Sigma, T3376), elaidik asit (Sigma, E4637), epigallokateşin gallat (Sigma, E4143), epinefrin hidroklorür (Sigma, E4642), fenil alanin (Sigma, P2126), fruktoz (Merck, 5321), galaktoz (Merck, 4060), glukoz (Merck, 108337), hidrojen peroksit (Merck, 108600), indometazin (Fluka, 57413), 2-

iyodobenzoik asit (Fluka 57730), kadmiyum sülfat okta hidrat (Merck, 2026, $CdSO_4.H_2O$), kafeik asit (Fluka 60018), katekol (Fluka, 15880), p-kloromerkuribenzoik asit (Fluka, 25010), kobalt (II) sülfat (Merck, 2555, $CoSO_4$), krom (III) sülfat (Fluka, 21185, $Cr_2(SO_4)_3$), ksiloz (Fluka, 95730), laktoperoksidaz (Sigma, L2005), laktoz (Merck, 7656), lityum sülfat (Riedel de Haën, 13029, $LiSO_4$), mangan (II) sülfat (Merck, 5961, $MnSO_4$), magnezyum sülfat (Merck, 5886, $MgSO_4$), maltoz monohidrat (Merck, 5911), melatonin (Sigma, 444300), metiyonin (Fluka 64382), nikel sülfat (Merck, 6726, $NiSO_4$), pirogallol (Merck, 100612), potasyum sülfat (Merck, 5150, K_2SO_4), serotonin hidroklorür (Sigma, H9523), sistein monohidrat (Merck, 2839), sistin (Merck, 2836), sitrik asit (Sigma, C7254), sodyum sekonder fosfat (Fluka, 71642), sodyum sülfat (Merck, 106649, Na_2SO_4), L-tirozin (Fluka, 93829), triptofan (Merck, 8397), vanadyum IV oksit sülfat (Riedel de Haën, 14229, $VOSO_4$)

3.3. DENEYDE KULLANILAN BİTKİ EKSTRELERİ

Çalışmamızda laktoperoksidaz enziminin inhibisyon çalışmasında bitkilerin sulu ekstreleri kullanıldı. Kullanılan bitki ekstrelerinin latince adları ve bitkinin kullanılan kısımları Tablo 3.1'de gösterildi. Bu bitkiler aktar ve semt pazarlarından temin edildi. Temin edilen bitkilerin deneylerde kullanılacak kısımları ayrıldı, yıkandı ve distile sudan geçirildi. Oda temperatüründe ve gölgede kurutuldu. Çiğ meyveler ise önce oda temperatüründe bekletildi, daha sonra 37ºC'lik etüvde 2-3 gün süre ile bekletilerek kurutuldu. Kurutulan bitkiler, ekstreler hazırlanıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1: Enzim inhibisyon tayininde kullanılan bitki materyallerinin Latince adları ve bitkinin kullanılan kısımları.

Bitki Materyalinin Türkçe Adı	**Latince Adı**	**Bitkinin Kullanım Alanı**
Beyaz Lahana	*Brassica oleracea var. capitata f. alba*	Yaprak
Brüksel Lahanası	*Brassica oleracea var. gemmifera*	Yaprak
Elma	*Malus domestica*	Meyve
Havuç	*Daucus carota*	Sebze
Kabak	*Cucurbita pepo*	Sebze
Kara Lahana	*Brassica oleracea acephala*	Yaprak
Limon	*Citrus limon*	Meyve
Mandalina	*Citrus reticulata*	Meyve
Pazı	*Beta vulgaris* L. *var cicla*	Yaprak
Portakal	*Citrus sinensis*	Meyve
Salatalık	*Cicumis sativus*	Sebze

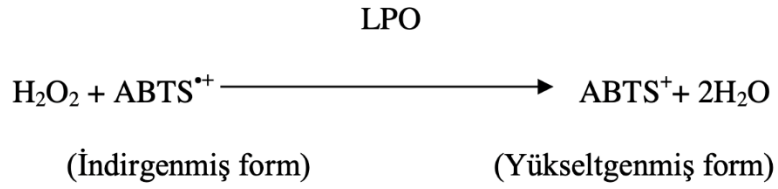
3.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması

Bir cam balona 10 g bitki numunesi konulduktan sonra üzerine 100 mL distile su ilave edildi. Geri soğutucu altında mevcut cam balon içindeki karışım 8 saat boyunca reflüks işlemine tabi tutuldu. Karışım soğuduktan sonra süzme işlemine geçilerek süzgeç kağıdı ile süzme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen süzüntü ağırlığı önceden tartılmış cam balona aktarıldı. Balon, rota

evaporatöre yerleştirilerek karışımın suyu düşük basınç altında uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre önceden darası alınmış kroze içinde 1 hafta 37°C de etüv içinde suyu tamamen uzaklaşıncaya kadar bekletildi. Ependorf tüpleri içine konuldu ve -20°C de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.4. ENZİM İNHİBİSYON DENEYİNİN YAPILIŞI

Laktoperoksidaz enzim aktivitesinin tayininde Shindler ve Bardsley (1975) metodu, modifiye edilerek kullanıldı. Bu metodda aktivite ölçümü, H_2O_2 tarafından 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) kromojenik substratın yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbansın 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Laktoperoksidaz reaksiyon şeması (Koksal, 2018).

Çözeltilerin Hazırlanması:

0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisi (pH = 6.0): 1.42 g Na_2HPO_4 tartıldı, belli bir miktar distile suda çözüldü. pH değeri 6.0'ya ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1 mM ABTS çözeltisi: 13.7 mg ABTS, 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisi (pH = 6.0) içerisinde çözüldü ve son hacim bu çözelti ile 25 mL'ye tamamlandı.

3.2 mM H_2O_2: 6.9 μL H_2O_2 (%35) alındı ve son hacim distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

LPO enzim çözeltisi: LPO enzimi, 20 U/mL olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden, 0.2 U/mL olacak şekilde 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisi (pH = 6.0) kullanılarak seyreltme yapıldı. Bu enzim çözeltisi, taze olarak hazırlandı.

Çözeltiler	Kör Tüpü	Kontrol Tüpü	Örnek Tüpü
1mM ABTS çözeltisi	80 µL	80 µL	80 µL
0.1 M Na_2HPO_4 (pH = 6.0) çözeltisi	210 µL	200 µL	190 µL
3.2 mM H_2O_2 çözeltisi	10 µL	10 µL	10 µL
LPO enzimi (0.2 U/mL)	-	10 µL	10 µL
İnhibitör	-	-	10 µL

Kör, kontrol ve örnek tüplerinin absorbansları 412 nm'de 3 dakika boyunca her 15 saniyelik süre zarfında kaydedilerek ölçümler yapıldı. Son okunan absorbans değerinden ilk okunan absorbans değeri çıkartılarak farklar alındı.

İnhibisyon etki gösteren bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin IC_{50} değerleri hesaplandı. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı.

% İnhibisyon = ((Kontrol absorbansı-Örnek absorbansı) / Kontrol absorbansı) x 100

4. BULGULAR

Bu çalışmada bazı bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelendi.

4.1. SULU BİTKİ EKSTRELERİNİN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİ

Tablo 4.1'de çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Bitki Ekstresinin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (µg/mL)*
Beyaz Lahana	1	19.47±6.09	34.82±0.67
	10	32.58±1.96	
	20	34.56±0.27	
	30	48.26±0.00	
	40	53.33±0.02	
Brüksel Lahanası	1	35.49±0.14	4.73±0.09
	5	52.15±0.87	
	7.5	53.00±0.86	
	10	75.15±0.00	
	12.5	98.15±0.00	
Elma	750	15.49±4.83	1841.60±56.57
	1000	17.92±3.41	
	1500	34.89±7.57	
	2000	58.44±2.60	
	3000	90.03±2.42	
Havuç	500	28.35±4.61	928.68±50.61
	750	45.73±2.33	
	1000	54.40±2.32	
	1250	66.28±0.32	
	1500	68.96±1.99	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.1(devam): Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Bitki Ekstresinin Adı	**Konsantrasyon (µg/mL)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (µg/mL)***
Kabak	500	25.18±4.26	978.59±78.94
	750	43.27±4.71	
	1000	50.61±4.01	
	1250	64.13±4.95	
	1500	66.09±1.97	
Kara Lahana	100	32.80±0.66	553.87±80.83
	500	36.50±4.48	
	750	64.13±3.07	
	1000	84.83±5.08	
	1250	94.05±0.00	
Limon	500	19.35±6.47	1201.60±181.69
	750	43.07±0.75	
	1000	46.31±3.03	
	1750	78.77±0.87	
	2000	90.12±1.82	
Mandalina	500	3.76±2.74	3071.46±181.47
	750	13.90±3.79	
	1000	22.67±3.57	
	1500	32.05±2.19	
	3000	45.56±3.00	
Pazı	250	35.19±2.86	521.14±33.54
	500	49.09±0.41	
	750	59.47±0.44	
	1000	80.91±7.91	
	1250	92.49±0.43	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.1(devam): Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Bitki Ekstresinin Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (µg/mL)*
Portakal	500	3.81±2.07	1685.93±174.78
	750	12.61±1.65	
	1000	22.23±1.26	
	1250	31.02±4.15	
	1500	45.04±7.11	
Salatalık	750	40.40±7.52	843.46±90.01
	1000	52.29±2.90	
	1250	73.96±5.52	
	1500	78.03±2.08	
	2000	83.14±1.38	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.1'e göre;

Bitki sulu ekstrelerinin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerinin konsantrasyon artışı ile arttığı bulundu. Düşük IC_{50} değeri yüksek enzim inhibisyon değerini göstermektedir. Sulu bitki ekstreleri içinde en düşük IC_{50} gösteren ve en yüksek oranda laktoperoksidaz enzimini inhibe eden sulu ekstrenin brüksel lahanası (4.73±0.09 µg/mL) olduğu görüldü. Brüksel lahanasını takiben beyaz lahana (34.82±0.67 µg/mL), pazı (521.14±33.54 µg/mL), kara lahana (553.87±80.83 µg/mL) ve salatalık (843.46±90.01 µg/mL) ekstrelerinin laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı (Tablo 4.1).

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında bitkiler arasında en yüksek laktoperoksidaz inhibitörü sıralaması; Brüksel lahanası, beyaz lahana, pazı, kara lahana, salatalık, havuç, kabak, limon, portakal, elma, mandalina şeklindedir (Tablo 4.1).

4.2. KİMYASAL MADDELERİN LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİTÖR ETKİLERİ

Tablo 4.2'de bazı metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerindeki IC_{50} değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Bazı metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Metal Tuzlarının Adı	**Konsantrasyon (mM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (mM)***
$Al_2(SO_4)_3$	1	20.43±6.47	20.00±0.33
	10	39.78±4.06	
	20	50.00±0.81	
	30	63.70±2.42	
	40	71.23±2.03	
$CdSO_4$	1	36.26±0.05	1.26±0.05
	2.5	59.25±0.00	
	5	60.00±0.01	
	40	70.32±0.04	
	50	88.33±0.38	
$CoSO_4$	1	20.41±1.81	25.61±0.55
	10	33.49±5.06	
	20	39.71±4.86	
	30	54.23±4.70	
	40	69.54±5.51	
$Cr_2(SO_4)_3$	0.01	29.33±0.50	0.51±0.00
	0.05	29.74±0.14	
	0.1	39.43±0.41	
	0.25	44.58±0.73	
	0.5	47.23±0.06	
$CuSO_4$	0.01	19.93±0.66	0.24±0.01
	0.1	49.12±0.57	
	0.25	57.14±0.00	
	0.5	72.09±1.41	
	1	94.41±1.66	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.2(devam): Bazı metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Metal Tuzlarının Adı	Konsantrasyon (mM)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (mM)*
$FeSO_4$	0.01	17.78±5.04	0.37±0.04
	0.05	28.47±8.74	
	0.1	35.42±4.11	
	0.25	43.89±6.07	
	0.5	57.92±7.12	
$HgSO_4$	1	24.74±3.02	2.95±0.40
	2	49.98±6.11	
	4	64.96±1.56	
	6	74.24±0.52	
	8	79.64±0.51	
K_2SO_4	1	24.03±10.13	16.73±4.31
	10	44.90±5.23	
	20	60.23±1.03	
	30	66.51±3.27	
	40	72.30±1.37	
Li_2SO_4	1	16.72±5.14	61.81±7.79
	10	28.59±5.14	
	20	32.31±3.63	
	30	34.60±2.85	
	40	37.89±3.63	
$MgSO_4$	1	9.09±5.34	38.85±1.94
	10	27.27±5.34	
	20	39.39±6.06	
	30	45.45±3.03	
	50	55.21±1.54	
$MnSO_4$	1	35.02±0.01	9.84±0.05
	10	54.17±0.14	
	20	67.00±0.00	
	40	74.10±0.05	
	50	93.06±0.00	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.2(devam): Bazı metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Metal Tuzlarının Adı	Konsantrasyon (mM)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (mM)*
Na_2SO_4	1	15.48±0.17	100.90±5.71
	10	23.30±0.38	
	20	24.94±1.06	
	40	34.73±1.06	
	100	48.25±1.85	
$NiSO_4$	10	13.65±3.79	73.80±4.46
	20	22.04±0.61	
	30	23.81±0.59	
	50	43.19±7.67	
	100	61.89±1.09	
$VOSO_4$	0.01	8.54±1.61	0.66±0.11
	0.05	20.08±8.11	
	0.1	28.84±1.11	
	0.25	33.97±1.28	
	0.5	38.88±3.03	
$ZnSO_4$	1	16.06±5.37	24.91±4.41
	10	35.99±2.03	
	20	46.89±6.81	
	30	61.33±12.71	
	40	62.65±4.17	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.2'ye göre;

Metal tuzlarının laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerleri konsantrasyon artışı ile arttığı bulundu. Metal tuzları içinde en düşük IC_{50} gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden metal tuzunun $CuSO_4$ (0.24±0.01 mM) olduğu görüldü. $FeSO_4$ (0.37±0.04 mM), $Cr_2(SO_4)_3$ (0.51±0.00 mM) ve $VOSO_4$ (0.66±0.11 mM) tuzlarının laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında metal tuzları arasında en yüksek laktoperoksidaz inhibitörü sıralaması; $CuSO_4$, $FeSO_4$, $Cr_2(SO_4)_3$, $VOSO_4$, $CdSO_4$, $HgSO_4$, $MnSO_4$, K_2SO_4, $Al_2(SO_4)_3$, $ZnSO_4$, $CoSO_4$, $MgSO_4$, Li_2SO_4, $NiSO_4$, Na_2SO_4 şeklindedir (Tablo 4.2).

Tablo 4.3'de bazı vitaminlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4.3: Bazı vitaminlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Vitaminlerin Adı	**Konsantrasyon (µM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (µM)***
B_1 vitamini	0.001	16.66±1.28	11.07±0.79
	0.01	24.35±1.29	
	0.1	30.34±1.48	
	1	42.30±1.48	
	10	46.15±1.48	
B_2 vitamini	0.001	25.45±1.82	10.66±1.22
	0.01	33.02±1.05	
	0.1	35.45±0.91	
	1	39.55±0.52	
	10	48.18±1.89	
B_3 vitamini	0.001	13.55±0.64	124.50±12.31
	0.01	19.78±1.10	
	0.1	23.80±0.64	
	10	40.13±1.12	
	100	43.80±2.12	
B_6 vitamini	0.1	4.16±1.74	1264.06±85.04
	1	22.35±2.36	
	10	32.57±0.66	
	100	38.64±1.14	
	1000	43.76±1.15	
B_7 vitamini	0.0001	32.93±0.64	0.028±0.00
	0.001	49.63±1.70	
	0.1	57.40±1.28	
	1	65.11±2.28	
	10	88.00±0.00	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.3(devam): Bazı vitaminlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Vitaminlerin Adı	Konsantrasyon (μM)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (μM)*
C vitamini	0.0001	32.99±1.76	0.023±0.001
	0.001	38.07±3.52	
	0.01	39.08±1.02	
	0.05	69.54±0.00	
	0.1	98.38±0.52	
E vitamini	0.1	8.06±0.47	7.99±0.41
	1	45.52±1.64	
	10	62.72±3.11	
	100	84.95±2.15	
	1000	91.40±1.08	
U vitamini	10000	30.33±1.77	68292.22±5049.27
	25000	39.58±1.44	
	50000	46.25±2.17	
	75000	56.67±1.44	
	100000	60.00±1.25	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.3'e göre;

Vitaminlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı bulundu. Vitaminlerin içinde en düşük IC_{50} gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden vitaminin C vitamini (0.023±0.001 μM) olduğu görüldü. Bu vitamini takiben, B_7 vitamini (0.028±0.00 μM), E vitamini (7.99±0.41 μM) ve B_2 vitamininin (10.66±1.22 μM) laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı (Tablo 4.3).

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında vitaminler arasında en yüksek laktoperoksidaz inhibitörü sıralaması; C vitamini, B_7 vitamini, E vitamini, B_2 vitamini, B_1 vitamini, B_3 vitamini, B_6 vitamini ve U vitamini şeklindedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.4'de bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	**Konsantrasyon (μM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (μM)***
Adrenalin hidroklorür	0.00005	4.44±2.22	0.000944±0.00
	0.0001	19.62±2.32	
	0.0010	52.98±1.70	
	0.0025	62.96±3.20	
	0.0050	71.48±0.64	
Dopamin	0.1	5.23±0.82	5.39±0.41
	0.5	31.42±2.86	
	1	36.66±1.65	
	7	56.42±5.01	
	10	75.71±2.98	
Epigallokateşin gallat	1	21.60±2.14	87.88±4.92
	10	42.59±1.85	
	50	47.52±1.07	
	100	71.30±1.85	
	500	90.74±2.83	
İndometazin	0.1	7.92±1.91	677.45±41.96
	1	19.17±1.91	
	10	31.67±1.44	
	100	48.00±0.58	
	1000	58.75±2.50	
Katekol	0.05	9.33±7.57	36.45±5.81
	0.1	30.00±5.29	
	1	38.67±2.31	
	10	44.00±3.06	
	100	84.00±2.30	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.4(devamı): Bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	**Konsantrasyon (μM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (μM)***
L-Dopa	1	11.90±4.12	4.01±0.08
	2	47.14±6.23	
	5	62.85±3.78	
	7	78.57±1.65	
	10	83.57±2.98	
Melatonin	0.01	6.82±1.84	57.62±5.05
	0.1	18.07±3.61	
	1	29.71±2.78	
	10	42.16±0.70	
	100	68.07±3.18	
Pirogallol	0.1	16.00±4.00	30.46±1.61
	1	29.33±3.06	
	10	44.67±1.15	
	50	75.00±3.06	
	100	92.00±1.15	
Serotonin hidroklorür	1	13.33±2.18	4.54±0.17
	2	34.28±2.86	
	5	61.42±1.43	
	7	72.14±2.97	
	10	84.28±1.43	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.4'e göre;

Bazı kimyasal maddelerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı bulundu. Bazı kimyasal maddeler içinde en düşük IC_{50} gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden kimyasal maddenin adrenalin hidroklorür (0.000944±0.00 μM) olduğu görüldü. Bu kimyasal maddeyi takiben L-Dopa (4.01±0.08 μM), serotonin hidroklorür (4.54±0.13 μM), dopamin (5.39±0.41 μM) ve pirogallol (30.46±1.61 μM) laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında kimyasal maddeler arasında en yüksek laktoperoksidaz inhibitörü sıralaması; adrenalin hidroklorür, L-dopa, serotonin hidroklorür, dopamin, pirogallol, katekol, melatonin, epigallokateşin gallat ve indometazin şeklindedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.5'te bazı asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Bazı asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	**Konsantrasyon (mM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (mM)***
Benzoik asit	1	9.17±3.60	6.51±0.34
	2.5	19.58±2.60	
	5	38.75±1.25	
	7.5	58.75±1.25	
	10	78.75±6.61	
Elaidik asit	1	3.33±2.60	4.88±0.13
	2.5	40.83±4.73	
	5	61.25±1.25	
	7.5	73.13±1.25	
	10	84.38±1.25	
Kafeik asit	$5x10^{-5}$	11.11±1.85	$4.27x10^{-3}±4.5x10^{-4}$
	10^{-4}	25.92±1.85	
	10^{-3}	39.50±3.86	
	$4x10^{-3}$	47.22±1.85	
	10^{-2}	84.26±4.66	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.5(devam): Bazı asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Kimyasal Maddelerin Adı	Konsantrasyon (mM)	İnhibisyon (%)*	IC_{50} Değeri (mM)*
p-Klorobenzoik asit	1	42.36±1.95	9.93±1.87
	10	51.40±1.87	
	20	55.45±0.54	
	30	70.09±2.86	
	40	75.23±0.94	
Sitrik asit	1	9.38±5.75	37.37±1.53
	10	13.70±4.16	
	20	24.27±1.71	
	30	40.02±3.73	
	40	56.41±2.45	
2-İyodobenzoik asit	1	22.73±4.42	31.23±0.67
	10	30.86±0.90	
	20	38.62±0.54	
	30	48.60±2.86	
	40	58.41±1.95	
3,5-Dinitrobenzoik asit	10	21.12±1.41	51.99±2.80
	25	31.92±2.94	
	50	43.66±3.73	
	75	59.86±2.44	
	100	95.07±5.10	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.5'e göre;

Bazı asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı saptandı. Asitler içinde en düşük IC_{50} değeri gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden asidin kafeik asit ($4.24x10^{-3} \pm 4.5x10^{-4}$ mM) olduğu görüldü. Bu asidi takiben, elaidik asit (4.88 ± 0.13 mM) ve p-klorobenzoik asidin (9.93±1.87 mM) laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında asitler arasında en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden asit sıralaması; kafeik asit, elaidik asit, benzoik asit, p-klorobenzoik asit, 2-iyodobenzoik asit, sitrik asit ve 3,5-dinitrobenzoik asit şeklindedir (Tablo 4.5).

Tablo 4.6'da bazı şekerlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Bazı şekerlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Şeker Adı	**Konsantrasyon (mM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (mM)***
Fruktoz	0.01	2.81±1.39	74.78±5.45
	0.1	10.84±3.19	
	1	23.29±5.70	
	10	33.73±6.06	
	100	59.03±2.78	
Galaktoz	0.01	28.10±1.13	4.33±0.43
	0.1	45.42±2.83	
	5	55.55±1.13	
	10	70.09±2.47	
	20	77.45±3.53	
Glukoz	0.01	19.91±2.70	27.93±0.63
	0.1	32.46±2.60	
	5	42.42±1.99	
	10	48.05±1.30	
	100	93.50±2.24	
Ksiloz	0.01	29.82±2.01	3.80±1.52
	0.1	39.91±0.76	
	5	62.71±0.76	
	10	67.76±3.48	
	100	94.74±1.52	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.6(devam): Bazı şekerlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Şeker Adı	**Konsantrasyon (mM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (mM)***
Laktoz	0.01	4.00±2.00	36.78±1.41
	0.1	17.67±3.21	
	1	26.67±3.06	
	10	44.50±4.73	
	50	58.00±2.65	
Maltoz	0.001	6.00±2.00	0.26±0.02
	0.01	43.00±1.00	
	0.1	46.33±1.53	
	0.5	81.00±3.46	
	1	96.50±1.00	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.6'e göre;

Bazı şekerlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerlernin konsantrasyon artışı ile arttığı görüldü. Bazı şekerler içinde en düşük IC_{50} gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden şekerin maltoz (0.26±0.02 mM) olduğu görüldü. Maltozu takiben, ksiloz (3.80±1.52 mM) ve galaktozun (4.33±0.43 mM) laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında şekerler arasında en güçlü laktoperoksidaz inhibitör sıralaması; maltoz, ksiloz, galaktoz, glukoz, laktoz ve fruktoz şeklindedir (Tablo 4.6).

Tablo 4.7'de bazı amino asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Bazı amino asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC_{50} değerleri.

Amino Asit Adı	**Konsantrasyon (μM)**	**İnhibisyon (%)***	**IC_{50} Değeri (μM)***
Fenil alanin	10	2.83±1.62	2731.77±43.36
	100	40.35±0.61	
	1000	46.31±1.05	
	5000	85.26±1.21	
	10000	92.10±0.61	
Metiyonin	1000	7.97±4.53	12188.25±458.76
	2500	22.06±2.15	
	5000	28.63±0.81	
	7500	33.80±1.41	
	10000	42.25±2.15	
Sistein	1	13.14±1.63	7.40±0.32
	5	26.75±4.88	
	8	51.17±0.81	
	10	78.17±1.41	
	15	91.55±3.54	
Sistin	0.1	12.16±4.68	531.48±74.26
	1	34.23±2.06	
	10	40.09±0.79	
	100	46.62±0.78	
	1000	62.84±4.05	
Tirozin	0.01	5.26±1.76	58.09±3.82
	0.1	11.11±2.03	
	1	38.59±4.64	
	10	48.24±2.68	
	100	67.54±1.76	
Triptofan	0.1	20.00±2.64	1406.30±266.10
	1	31.00±1.00	
	10	34.67±2.08	
	100	39.50±0.58	
	1000	45.00±2.64	

*Ortalama ± standart sapma

Tablo 4.7'e göre;

Bazı amino asitlerin laktoperoksidaz enzimi üzerine % inhibisyon değerinin konsantrasyon değeri artışı ile arttığı saptandı. Bazı amino asitler içinde en düşük IC_{50} değeri gösteren ve en yüksek laktoperoksidaz enzimini inhibe eden amino asidin sistein (7.40±0.32 µM) olduğu görüldü. Sisteini takiben tirozin (58.09±3.82 µM) ve sistinin (531.48±74.26 µM) laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği saptandı.

En düşük IC_{50} değerleri göz önüne alındığında asitler arasında en yüksek laktoperoksidaz inhibitörü sıralaması; sistein, tirozin, sistin, triptofan, fenilalanin ve metiyonin şeklindedir (Tablo 4.7).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlaç, gıda ve kozmetik gibi daha birçok kullanım amacı bulunan tıbbi bitkilerin uygarlık tarihi boyunca pek çok kültürde görev aldığı bilinmektedir. Tedavi amacıyla kullanılan bitkiler doğrudan kaynağını doğadan alırlar. Bu bitkilerin bir kısmı da doğada yaygın olarak üretilmektedir. Bitkilerle tedavilere M.Ö.5000'li yıllarda Mezopotamya uygarlıklarının kayıtlarında rastlanmıştır (Demirezer, 2010).

Peroksidaz ailesinin bir üyesi olan olan laktoperoksidaz enzimi insan, sığır, manda, keçi, deve sütlerinde, tükürükte ve gözyaşında bulunur. Patojen mikroorganizmalara karşı yeni doğanların bağırsak sistemlerini ve meme bezlerini korur. Memeli sütlerinden elde edilen LPO bakterilerin büyümesinde, baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde oldukça önemlidir (Jacob ve diğ., 1998; Shah, 2000). LPO enzimi kimya ve süt endüstrisinde sütün nakil işlemleri sırasında muhafaza edilmesinde önemli bir rol oynar (Uguz ve Ozdemir, 2005). Sığır sütlerinde bulunan LPO enziminin bakteriyel büyümeyi inhibe etmesi, hidrojen peroksit ve tiyosiyanat içeren peroksidaz sistemi ile ilgilidir (Jacob ve diğ., 1998). Bu sistemin antimikrobiyal etkisi sütte doğal olarak oluşur. LPO enzimi inek ve insan sütlerinin normal bir bileşenidir. Gıda ve sağlık bakım ürünlerinde bazen bakterileri kontrol etmek için laktoperoksidaz sisteminin eklenmesi veya arttırılması gereklidir. LPO sistemi DNA'ya saldırmazken, mutajenik olmamakla birlikte, belirli koşullar altında, laktoperoksidaz sistemi oksidatif strese sebep olabilir. Bunun yanında laktoperoksidaz, serbest radikal ara ürünler üretilmesini sağlayan östrojenik hormonları oksitler ve meme kanserinin başlamasına katkıda sunabilir (Ghibaudi ve diğ., 2000). LPO enzimi yüksek etkili antimikrobiyal bir maddedir. LPO enzimi özellikle süt işleme tesislerinde nakil ve depolama esnasında sütün muhafazası amacıyla süt endüstrisinde (Barrett ve diğ., 1999), kozmetiklerde, diş ve oftalmik solüsyonlarda, antitümör ve antiviral ajan olarak (Bjoerck, 1979), ayrıca çiçeklerin, meyvelerin gelişiminin korunmasında kullanılmaktadır (Touch ve diğ., 2004).

Çeşitli bitkiler ile hazırlanan ekstrelerden olan havuç özütü ile yapılan bir çalışmada havuç ekstresinin, laktoperoksidaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur (Hayashi ve diğ., 2012). Çalışmamızda da hazırladığımız havuç ekstresinin laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu inhibisyonun havuç'un yapısında bulunan β-karoten'den kaynaklandığı ileri sürülebilir.

Laktoperoksidaz sistemi, memelilerde bütün dış salgısal yapılarda bulunan ve immün olmayan bir sistem olup, enzimatikdir. Tiyosiyanatın glukozinolatlar ve siyanojenik glukozitler olmak üzere 2 önemli diyetsel kaynağı vardır. Beyaz lahana, kara lahana, brüksel lahanası, karnabahar ve şalgam gibi *Brassica* (Cruciferae familyası) cinsine ait sebze türleri tiyosiyanat veren glukozinolatlar bakımından özellikle zengindir. Siyanojen glikozitler ise patates, mısır, bezelye, fasulye ve şeker kamışında bulunmaktadır (Seifu ve diğ., 2005). Brüksel lahanası antioksidan açısından zengin bir bitkidir. Bağışıklık sistemini güçlendirir. Faydalı bağırsak bakterilerinin beslenmesine yardımcı olur. Yapısında kükürtlü bileşiklerde bulunan Brüksel lahanasının kan şekerini düşürdüğü ve insülin seviyesine olumlu katkı sağladığı da bilinmektedir. Beyaz lahana ise kan basıncını düzenleyen, toksinleri arındıran akne oluşumunu engelleyen, göz sağlığını güçlendiren, zayıflamaya yardımcı olan, bağırsak sağlığını koruyan, hazmı kolaylaştıran C vitamini deposu ve güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip bir sebzedir. İçeriğinde A, C, B ve E vitamini, potasyum, demir ve magnezyum, kuarsetin ve kükürtlü bileşikleri içermektedir. Çalışmamızda beyaz lahana ve Brüksel lahanasının LPO enzimini yüksek oranda inhibe ettikleri bulunmuştur. Lahana türlerinin yapısında bulunan kükürtlü bileşikler, flavonoidler ve vitaminlerin LPO enzimini enzimini yüksek oranda inhibe etmeleri nedeni iledir.

Sisecioğlu ve diğ. (2009) yapmış oldukları çalışmada askorbik asit (C vitamini), menadion sodyum bisülfat (vitamin K_3) ve folik asidin laktoperoksidaz (LPO) üzerindeki inhibisyon etkisini incelemişler ve C vitamininin laktoperoksidazı inhibe ettiğini belirtilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız limon ekstresinin, sitrik asitin ve C vitamininin laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu inhibisyonun limon ekstresinde bulunan askorbik asit ve sitrik asitten kaynaklandığı öne sürülebilir.

Fenolik bileşikler en önemli doğal bileşiklerdendir (Gulcin ve Beydemir, 2013). Bu maddeler antiviral, antikanserojen, antioksidan gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir (Sarikaya ve diğ., 2015). Fenolik bileşiklerin yapısındaki hidroksi grubu aromatik halkaya bağlıdır ve bu nedenle fenolik bileşikler biyolojik ve farmasötik olarak çok reaktif maddelerdir (Gülçin, 2011 ve 2012). Antioksidan özellik gösteren maddelerin bazı çalışmalarda çeşitli zararlı etkileri olduğu belirtilmiştir (Koksal, 2018). Fenolik bileşiklerin zararlı etkileri de bulunmaktadır. Fenolik asidleri içeren besinlerin farklı enzimler üzerinde aktive veya inhibe edici özellikleri bulunmaktadır. Fenolik maddeleri içeren bileşiklerin LPO enzimini inhibe ettiği Sarikaya ve diğ. (2015) tarafından bulunmuştur. Bu fenolik bileşikler inek sütünden saflaştırılan LPO

enzimini yüksek oranda inhibe etmiştir. Fenolik bileşiklerin yapısında bulunan hidroksi gruplarının LPO enziminin aktif merkezine bağlanarak enzimi inhibe ettiği ileri sürülmektedir (Koksal ve diğ., 2016; Koksal, 2018; Koksal ve diğ., 2020).

Vitaminler organizma için gerekli olan maddelerdendir. Organizmada birçok metabolik reaksiyonda bazı vitaminler koenzim olarak görev yaparlar. Bazı vitaminlerin LPO enzim aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmada askorbik asit, menadion sodyum bisülfat ve folik asidin LPO enzimini inhibe ettiği Sisecioğlu ve diğ. (2009) tarafından öne sürülmüştür.

Çalışmamızda B_1, B_2, B_7, C ve E vitaminlerinin LPO enzimini yüksek oranda inhibe ettikleri bulunmuştur. Çalışmamızda Sisecioğlu ve diğ.'nin (2009) çalışmasına benzer bir şekilde askorbik asidin LPO enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz B_1, B_2, B_6 ve B_7 (H) vitaminlerinin laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu inhibisyonun nedeni vitaminlerin yapılarında bulunan hidroksi gruplarından dolayıdır.

Sayıt (2015)'ın yapmış olduğu bir çalışmada afinite kromatografisi yöntemi ile laktoperoksidaz enzimi saflaştırılmış ve sırasıyla $CoCl_2$, $CuSO_4$, $MgSO_4$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$, metal tuzları ile laktoperoksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiş olup, tuzlardan $CoCl_2$, $CuSO_4$, $CdCl_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_3$ laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiğini bildirmiştir. *İn vitro* ortamda yapmış olduğumuz çalışmamızda $CdSO_4$, Na_2SO_4, $HgSO_4$, K_2SO_4, Li_2SO_4, $Al_2(SO_4)_3$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $VOSO_4$, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $Cr_2(SO_4)_3$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, çalışılmış olup, tüm çalışılan metal tuzlarının LPO enzimini yüksek oranda inhibe ettikleri saptanmıştır. Metal tuzları içinde enzimi en yüksek oranda inhibe eden metal tuzlarının $VOSO_4$, $FeSO_4$, $Cr_2(SO_4)_3$, $CuSO_4$, $CdSO_4$ olduğu bulunmuştur. Bu metal iyonları enzimin aktif merkezine bağlanarak enzimi inhibe etmektedirler. Bu metal tuzlarını içeren kaplarda bulunan sütlerin nakliye edilmesi sırasında sütte bulunan LPO enziminin inhibe olması nedeni ile sütün kalitesinin azalacağı ileri sürülebilir.

Shariat ve diğ., (2015) liyofilizasyon sırasında sığır sütünden elde edilen LPO üzerine şekerlerin koruyucu etkisi ile ilgili yaptığı bir çalışmada, tek başına ve kombine halde farklı konsantrasyonlarda sukroz, laktoz, maltoz ve trehalozu kullanarak şekerlerin LPO üzerine koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 500µM konsantrasyonda trehalozun enzim aktivitesini koruduğu öne sürülmüştür. Bunun nedeni trehalozun indirgen özellik göstermeyen

bir şeker olması nedeni ile enzim aktivitesini inhibe etmemesidir. Çalışmamızda kullandığımız şekerlerde LPO enzimini inhibe etmektedirler. Kullanılan şekerler indirgen özellik gösteren şekerlerdir. Bu nedenle LPO enzimini inhibe etmektedirler.

Çalışmamızda fenilalanin, metiyonin, sistein, sistin, tirozin, triptofan amino asitlerinin LPO enzim üzerine etkileri incelenmiştir. Tüm amino asitler LPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Sistein, amino asitler içerisinde en yüksek oranda enzim inhibisyona neden olmuştur. Sistein amino asidinin yapısında bulunan –SH gruplarının LPO enzimini inhibe etmesi nedeni ile bu amino asit en yüksek oranda inhibisyona neden olmuştur.

İyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılan LPO aktivitesi üzerine katekol, epinefrin, p-fenilendiamin ve pirogallolun etkileri incelenmiş, katekol, epinefrin ve pirogallol'un LPO enzimini inhibe ettiği saptanmıştır (Ozdemir ve diğ., 2001; Şişecioglu ve diğ., 2012). Ueda ve diğ,. (2001) yapmış olduğu araştırmada ise kuarsetin ve gallik asitin laktoperoksidaz enzimi üzerine oksidasyon kabiliyetini arttırdığı tespit etmişlerdir. Benzoik asit, kuarsetin ve epigallokateşinin de aralarında bulunduğu otuz farklı aromatik yapılı kimyasal maddenin laktoperoksidaz substratı olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Gau ve diğ., 2015). Çalışmamızda adrenalin hidroklorür (epinefrin hidroklorür), epigallokateşin gallat, indometazin, katekol, pirogallol, benzoik asit, elaidik asit, kafeik asit, p-klorobenzoik asit, 2-iyodobenzoik asit ve 3,5-dinitrobenzoik asidin laktoperoksidaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Kafeik asit, asitler içerisinde en yüksek oranda LPO enzimini inhibe etmiştir. Bu durumun nedeni kafeik asidin fenolik özelliğinden kaynaklanabilir. Kimyasal maddeler içerisinde ise en iyi sonucu epinefrin hidroklorür vermiştir. Çalışmamız Şişecioglu ve diğ. (2012) çalışması ile uygunluk göstermektedir.

Epifiz bezinin salgı ürünü olan ve serotoninden enzimatik olarak sentezlenen melatonin bir indolamin türevidir, gerek serotonin ve gerekse de melatonin oksidatif hasarın önlenmesi için gereklidir. Bu maddelerin LPO enzimini inhibe ettiği Şişecioğlu ve diğ., (2010) tarafından ileri sürülmüştür. Bu maddelerin LPO enzimini inhibe etmesi ile laktasyon periyodunda bazı yan etkiler meydana gelebilir (Şişecioğlu ve diğ., 2010). Benzer bir çalışmada ise; Köksal ve diğ. (2017a) tarafından dijoksin, L-dopa, dopamin, izolikuiritijenin gibi bazı kimyasal maddelerin LPO enzimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Nörotransmitter madde olan L-dopa, seratonin hidroklorür, dopamin ve melatonin yukarıdaki çalışmalar ile paralellik göstererek çalışmamızda da LPO enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

Literatürde sülfamat türevlerinin (Usanmaz ve Atmaca, 2020), sulfonamidlerin (Köksal ve diğ., 2017b), antibiyotiklerin, katekolaminlerin, kortikostereoidlerin (Sheikh ve diğ ., 2018; Kalin ve diğ., 2020a), anestezik maddelerin (Ozdemir ve Uğuz, 2005), indazol türevlerinin (Köksal ve Alim, 2020) sentetik antioksidanların (Kalin ve diğ., 2020b), pestisitlerin (Koksal ve diğ., 2018) LPO enzimini inhibe ettikleri belirtilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda bazı bitki ekstreleri, kimyasal maddeler, vitaminler, amino asit ve şekerlerin LPO enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. LPO enziminin aktivitesi süt veren canlılarda laktasyon döneminde önemlidir. Bu enzim yeni doğanların bağışıklık sisteminde büyük rol oynamaktadır. LPO enziminin aktivitesinin azalması immun sistemin zayıflamasına neden olur. Ayrıca süt endüstrisinde sütün nakledilmesi sırasında bu enzimin aktivitesinin korunması gereklidir.

İlaçlar, bitkisel kaynaklı gıdalar, vitaminler, amino asitler, fenolik bileşikler enzimi inhibe ettikleri için bu maddeleri kullanan kişilerin laktasyon döneminde bu maddeleri alırken dikkat etmesi gerekir. Ayrıca sütün nakil işlemleri sırasında ortamın bu kimyasal maddelerden uzak olması gereklidir. LPO enzimi antimikrobiyal özelliğinden dolayı ilaç, gıda ve kozmetik gibi alanlarda kullanılabilmesi için aktivitesinin artmasında hangi maddelerin etkili olduğunun bilinmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

Ahmed, S., Khan, S.T., Zargaham, M.K., Khan, A.U., Khan, S., Hussain, A., Uddin, J., Khan, A., Al-Harrasi, A., 2021, Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with: Reference of acetylcholinesterase, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139:111609.

Alsenani, F., 2021, Potential natural candidates in the treatment of coronavirus, *Saudi Journal of Biological Sciences*, DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.06.008.

Altinkaynak, C., Yilmaz, I., Koksal, Z., Özdemir, H., Ocsoy, I., Özdemir, N., 2016, Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 402–409.

Arazi, H., Simaei, E., Taati, B., 2016, Comparison of responses of salivary antioxidant markers to exhaustive aerobic exercise in smoker and non-smoker young girls, *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 56, 1132–1138.

Asaah, N.O., Fonteh, F., Kamga, P., Mendi, S., Imele, H., 2007, Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities, *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 7, 1-15.

Banerjee, S., Furtmüller, P.G., Obinger, C., 2011, Bovine lactoperoxidase – a versatile one- and two-electron catalyst of high structural and thermal stability, *Biotechnology Journal*, 6, 231-243.

Barrett, N.E., Grandison, A.S., Lewis, M.J., 1999, Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk, *The Journal of Dairy Research*, 66, 73-80.

Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011, Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metabolism*, 14, 724-738.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014, *Enzimler: Temel Kavramlar ve Enzim Kinetiği*, Biyokimya, Ed: Denizli, A., Özden, A.K., Palme Yayıncılık, Yedinci Baskı, ISBN: 978-1-4292-2936-4.

Bjoerck, L.. Claesson, O., Schulthess, W., 1979, The Lactoperoxidase / thiocyanate / hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries, *Milchwissenschaft*, 34, 726-729.

Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikeda-Saito, M., Caughey, W.S., 1989, Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160, 897-902.

Borzouee, F., Mofid, M.R., Varshosaz, J., Samsam Shariat, S.Z., 2016, Purification of lactoperoxidase from bovine whey and investigation of kinetic parameters, *Advanced Biomedical Research*, 5, 189.

Bowler, R.P., 2004, Oxidative stress in the pathogenesis of asthma, *Current Allergy and Asthma Reports*, 4, 116–122.

Buyel, J.F., 2018, Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents, *Biotechnology Advances*, 36, 506-520.

Cawley, A., Golding, S., Goulsbra, A., Hoptroff, M., Kumaran, S., Marriott, R., 2019, Microbiology insights into boosting salivary defences through the use of enzymes and proteins, *Journal of Dentistry*, 80, S19–S25.

Chakrabarti, R., Rajagopalan, R., 2002, Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and the therapy, *Current Science*, 83, 1533-1538.

Chauhan, D.S., Yadav, S., Quraishi, M.A., 2021, Natural products as environmentally safe and green approach to combat Covid-19, Current Research in Green and Suitainable Chemistry, 4:100114.

Cooper, R.A., 2013, Inhibition of biofilms by glucose oxidase, lactoperoxidase and guaiacol: the active antibacterial component in an enzyme alginogel, *International Wound Journal*, 10, 630-637.

Damirchi, A., Kiani, M., Jafarian, V., Sariri, R., 2010, Response of salivary peroxidase to exercise intensity, *European Journal of Applied Physiology*, 108, 1233-1237.

Demirezer, L.Ö, 2010, *Bitkilerin tıpta kullanılması konusundaki sorumluluklarımız*, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 87-88, 5-6 Haziran 2010.

DePillis, G.D., Ozaki, Si, Kuo, J.M., Maltby, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., 1997, Autocatalytic processing of heme by lactoperoxidase produces the native protein-bound prosthetic group, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 8857e8860.

Dohlman, A.W., Black, H.R., Royall, J.A., 1993, Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma, *The American Review of Respiratory Disease*, 148, 955-960.

Gau, J., Furtmüller, P.G., Obinger, C., Arnhold, J., Flemmig, J., 2015, Enhancing hypothiocyanite production by lactoperoxidase - mechanism and chemical properties of promotors, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4, 257-267.

Gau, J., Arnhold, J., Flemmig, J., 2018, Reactivation of peroxidase activity in human saliva samples by polyphenols, *Archives of Oral Biology*, 85, 70-78.

Ghibaudi, E.M., Laurenti, E., Beltramo, P., Ferrari, R.P., 2000, Can estrogenic radicals, generated by lactoperoxidase, be involved in the molecular mechanism of breast carcinogenesis?, *Redox Reports*, 5, 229-235.

Gnanesh Kumar, B.S., Mohan Reddy, P., Kottekad, S., 2018, Comparative site-specific n-glycosylation analysis of lactoperoxidase from buffalo and goat milk using RP-UHPLC-MS/MS reveals a distinct glycan pattern, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 11492-11499.

Goi, N., Hirai, Y., Harada, H., Ikari, A., Ono, T., Kinae, N., Hiramatsu, M., Nakamura, K., Takagi, K., 2007, Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers, *The Journal of Toxicological Sciences*, 32, 121–127.

Göktaş, H., 2012, *Elastaz enzim inhibitörleri*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Gu, R., Wang, Y., Long, B., Kennelly, E., Wu, S., Liu, B., Li, P., Long, C., 2014, Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37, 903-915.

Gulcin, I., Beydemir, S., 2013, Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 408-430.

Gumiero, A., Murphy, E.J., Metcalfe, C.L., Moody, P.C., Raven, E.L., 2010, An analysis of substrate binding interactions in the heme peroxidase enzymes: a structural perspective, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500, 13-20.

Gupta, M., Kapoor, B., Gupta, R., Singh, N., 2021, Plants and phytochemicals for treatment of peptic ulcer: An overview, *South African Journal of Biology*, 138, 105-114.

Gülçin, İ., 2011, Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study, *Journal of Medicinal Food*, 14, 975-985.

Gülçin, İ., 2012, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.

Gürdöl, F., 2017, *Tıbbi Biyokimya* , Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, sayfa 116-123.

Gürsel, A., 2004, Sütün laktoperoksidaz – tiyosiyanat – hidrojenperoksit sistemi I. antibakteriyel etkisi, *Gıda*, 29, 159-167.

Hawkins, C.L., 2009, The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems, *Free Radical Research*, 43, 1147–1158.

Hayashi, M., Supaporn, N., Shigeru, H., Masahiro, O., Ni'matulah, A.A., 2012, Enhancement of antimicrobial activity of a lactoperoxidase system by carrot extract and β-carotene, *Food Chemistry*, 130, 541-546.

Henderson, I.C., 1993, Risk factors for breast cancer development, *Cancer*, 71, 2127-2140.

Hogg, D.M., Jago, G.R., 1970, The oxidation of reduced nicotinamide nucleotides by hydrogen peroside in the presence of lactoperoxidase and thiocyanate, iodide or bromide, *Biochemical Journal*, 117, 791-797.

Hostetler, G.L., Ralston, R.A., Schwartz, S.J., 2017, Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity, *Advances in Nutrition*, 8, 423-435.

Inzucchi, S.E., 2002, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes, *JAMA*, 287, 360-372.

Jacob, B.M., Manoj, N.K., Haridas, M., 1998, Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase, *Indian Journal of Experimental Biology*, 36, 808-810.

Kalin, R., Köksal, Z., Bayrak, S., Gerni, S., Ozyürek, I.N., Usanmaz, H., Karaman, M., 2020a, Atasever A, Özdemir H, Gülçin İ. Molecular docking and inhibition profiles of some antibiotics on lactoperoxidase enzyme purified from bovine milk, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-10, DOI: 10.1080/07391102.2020.1814416.

Kalin, R., Koksal, Z., Kalin, P., Karaman, M., Gulcin, İ., Ozdemir, H., 2020b, In vitro effects of standard antioxidants on lactoperoxidase enzyme-A molecular docking approach, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(1):e22421.

Keha, E., Küfrevioğlu, İ., 2018, *Biyokimya*, 12. Baskı, Aktif Yayınevi, Erzurum, ISBN: 975-6755-20-02.

Klein, I., Nagler, R.M., Toffler, R., van Der Vliet, A., Reznick, A.Z., 2003, Effect of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: Role of hydrogen cyanide, *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1448–1452.

Kim, Y.J., Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1707-1723.

Koksal, Z., Alim, Z., Beydemir, S., Ozdemir, H., 2016, Potent inhibitory effects of some phenolic acids on lactoperoxidase, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30, 533-538.

Koksal, Z., 2018, Laktoperoksidaz enziminin farklı kaynaklardan saflaştırılması: Kapsaisin ve Pirogallol'ün inhibisyon profili, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8, 159-165.

Koksal, Z., Kalin, R., Gulcin, I., Ozdemir, H., 2018, Inhibitory effects of selected pesticides on peroxidases purified by affinity chromatography, *International Journal of Food Properties*, 21, 385-394.

Koksal, Z., Kalin, R., Kalin, P., Karaman, M., Gulcin, İ., Ozdemir, H., 2020, Lactoperoxidase inhibition of some natural phenolic compounds: Kinetics and molecular docking studies, *Journal of Food Biochemistry*, 44:e13132.

Köksal, Z., Kalın, R., Gerni, S., Gülçin, İ., Özdemir, H., 2017a, The inhibition effects of some natural products on lactoperoxidase purified from bovine milk, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e21939.

Köksal, Z., Kalin, R., Camadan, Y., Usanmaz, H., Almaz, Z., Gülçin, İ., Gokcen, T., Gören, A.C., Ozdemir, H., 2017b, Secondary sulfonamides as effective lactoperoxidase inhibitors, *Molecules*, 22, 793.

Köksal, Z., Alim, Z., 2020, Lactoperoxidase, an antimicrobial enzyme, is inhibited by some indazoles, *Drug and Chemical Toxicology*, 43, 22-26.

Kumar, R., Bhatia, K.L., Dauter, Z., Betzel, C., Singh, T.P., 1995, Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk, *Acta Crystallographica Section D*, 51, 1094-1096.

Kussendrager, K., Van Hooijdonk, A., 2000, Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications, *British Journal of Nutrition*, 84, 19-25.

Laine, M., Tenovuo, J., Lehtonen, O.P., Ojanotko-Harri, A., Vilja, P., Tuohimaa, P., 1988, Pregnancy-related changes in human whole saliva, *Archives of Oral Biology*, 33, 913–917.

Leimola-Virtanen, R., Salo, T., Toikkanen, S., Pulkkinen, J., Syrjänen, S., 2000, Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands, *Maturitas*, 36, 131–137.

Le Roes-Hill, M., Khan, N., Burton, S.G., 2011, Actinobacterial peroxidases: an unexplored resource for biocatalysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 681-713.

Liang, Z., Currais, A., Soriano-Castell, D., Schubert, D., Maher, P., 2021, Natural products targeting mitochondria: emerging therapeutics for age-associated neurological disorders, *Pharmacology & Therapeutics*, 221, 107749.

Liu, T.T., Liu, X.T., Chen, Q.X., Shi, Y., 2020, Lipase Inhibitors for Obesity: A Review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110314.

Love, D.T., Barrett, T.J., White, M.Y., Cordwell, S.J., Davies, M.J., Hawkins, C.L., 2016, Cellular targets of the myeloperoxidase-derived oxidant hypothiocyanous acid (HOSCN) and its role in the inhibition of glycolysis in macrophages, *Free Radical Biology and Medicine*, 94, 88–98.

Magacz, M., Kędziora, K., Sapa, J., Krzyściak, W., 2019, The significance of lactoperoxidase system in oral health: application and efficacy in oral hygiene products, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1443.

Memarzadeh Zahedani, M., Schwahn, C., Baguhl, R., Kocher, T., Below, H., Welk, A., 2017, Association of salivary peroxidase activity and concentration with periodontal health: A validity study, *Journal of Clinical Periodontology*, 44, 803-812.

Menezes, J.C., Diederich, M., 2019, Translational role of natural coumarins and their derivatives as anticancer agents, *Future Medicinal Chemistry*, 11, 1057-1082.

Menezes, J.C.J.M.D.S, Diederich, M.F., 2021, Bioactivity of natural biflavonoids in metabolism-related disease and cancer therapies, *Pharmacological Research*, 167, 105525.

Mickelson, M.N., 1977, Glucose transport in Streptococcus agalactiae and its inhibition by lactoperoxidase thiocyanate- hydrogen peroxide, *Journal of Bacteriology*, 132, 541–548.

Montuschi, P., Corradi, M., Giabattoni, G., Nightingale, J., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 1999, Increased isoprostan a marker of oxidative stress in exhaled condensate of asthma patients, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 216-220.

O'Brien, P.J., 2000, Peroxidases, *Chemico-Biological Interactions*, 129, 113-139.

Ozdemir, H., Aygul, I., Küfrevioglu, O.I., 2001, Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 31, 125-134.

Ozdemir, H., Uğuz, M.T., 2005, In vitro effects of some anaesthetic drugs on lactoperoxidase enzyme activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 491-495.

Padmavathi, G., Rathnakaram, S.R., Monisha, J., Bordoloi, D., Roy, N.K., Kunnumakkara, A.B., 2015, Potential of butein, a tetrahydroxychalcone to obliterate cancer, *Phytomedicine*, 22, 1163-1171.

Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., Dunand, C., 2007, PeroxiBase: the peroxidase database, *Phytochemistry*, 68, 1605-1611.

Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008, Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production, *Physiological Reviews*, 88, 1243–1276.

Ratner, A.J., Prince, A., 2000, Lactoperoxidase. New recognition of an "old" enzyme in airway defenses, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22, 642-644.

Reiter, B., Härnulv, G., 1984, Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications, *Journal of Food Protection*, 47, 724–732.

Reznick, A.Z., Klein, I., Eiserich, J.P., Cross, C.E., Nagler, R.M., 2003, Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: In vivo and in vitro studies, *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 377–384.

Robinson, P.K., 2015, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41.

Sacan, O., Yanardag, R., 2010, Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla), *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1275-1280.

Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Silveira, D., 2012, α-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 15, 141-183.

Sarikaya, S.B., Sisecioğlu, M., Cankaya, M., Gulcin, İ., Ozdemir, H., 2015, Inhibition profile of a series of phenolic acids on bovine lactoperoxidase enzyme, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 479-483.

Saunders, B.C., 1973, *Peroxidases and catalases*, In: G.L. Eichhorn (Ed.), Inorganic Biochemistry, Elseiver, Amsterdam, pp. 988-1021.

Sayıt, H.E., 2015, *Laktoperoksidaz enziminin saflaştırılması glutaraldehit ile immobilizasyonu ve bazı ağır metallere karşı ilgisinin araştırılması*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Schubert, D., 2005, Glucose metabolism and Alzheimer's disease, *Ageing Research Reviews*, 4, 240-257.

Seifu, E., Buys, E.M., Donkin, E.F., 2005, Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 16, 137–154.

Shah, N.P., 2000, Effects of milk-derived bioactives: an overview, *The British Journal of Nutrition*, 84 (Suppl 1), S3-S10.

Shariat, S.S., Jafari, N., Tavakoli, N., Najafi, R.B., 2015, Protection of lactoperoxidase activity with sugars during lyophilization and evaluation of its antibacterial properties, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10, 152-160.

Shariat, S.Z.A.S., Borzouee, F., Mofid, M.R., Varshosaz, J., 2018, Immobilization of lactoperoxidase on graphene oxide nanosheets with improved activity and stability, *Biotechnology Letters*, 2018, 40, 1343–1353.

Sharma, S., Singh, A.K., Kaushik, S., Sinha, M., Singh, R.P., Sharma, P., Sirohi, H., Kaur, P., Singh, T.P., 2013, Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition, *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4, 108-128.

Sheikh, I.A., Jiffri, E.H., Kamal, M.A., Ashraf, G.M., Beg, M.A., 2017, Lactoperoxidase, an antimicrobial milk protein, as a potential activator of carcinogenic heterocyclic amines in breast cancer, *Anticancer Research*, 37, 6415-6420.

Sheikh, I.A., Yasir, M., Khan, I., Khan, S.B., Azum, N., Jiffri, E.H., Kamal, M.A., Ashraf, G.M., Beg, M.A., 2018, Lactoperoxidase immobilization on silver nanoparticles enhances its antimicrobial activity, *Journal of Dairy Research*, 85, 460–464.

Shindler, J.S., Bardsley, W.G., 1975, Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 1307-1312.

Siddiqui, M., Rajkumar, S.V., 2012, The high cost of cancer drugs and what we can do about it, *Mayo Clinic Proceedings*, 87, 935–943.

Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Singh, S.B., Kaur, P., Bhushan, A., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2008, Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 A resolution, *Journal of Molecular Biology*, 376, 1060–1075.

Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Shin, K., Takase, M., Kaur, P., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2009, Inhibition of lactoperoxidase by its own catalytic product: crystal structure of the hypothiocyanate-inhibited bovine lactoperoxidase at 2.3-A resolution, *Biophysical Journal*, 96, 646–654.

Sisecioğlu, M., Cankaya, M., Ozdemir, H., 2009, Effects of some vitamins on lactoperoxidase enzyme activity, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79, 188–194.

Şişecioğlu, M., Çankaya, M., Gülçin, İ., Özdemir, H., 2010, Interactions of melatonin and serotonin with lactoperoxidase enzyme, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25, 779-783.

Şişecioglu, M., Gülçin, İ., Çankaya, M., Ozdemir, H., 2012, The inhibitory effects of L-adrenaline on lactoperoxidase enzyme purified from bovine milk, *International Journal of Food Properties*, 15, 1190-1199.

Touch, V., Hayakawa, S., Yamada, S., Kaneko, S., 2004, Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on Salmonella enteritidis in animal or vegetable foods, *International Journal of Food Microbiology*, 93, 175-183.

Tracy, J.C., Mildenhall, N.R., Wein, R.O., O'Leary, M.A., 2017, Breast cancer metastases to the head and neck: Case series and literature review, *Ear, Nose & Throat Journal*, 96, E21-E24.

Ueda, J., Tsuchiya, Y., Ozawa, T., 2001, Relationship between effects of phenolic compounds on the generation of free radicals from lactoperoxidase-catalyzed oxidation of NAD(P)H or GSH and their DPPH scavenging ability, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 49, 299-304.

Uguz, M.T., Ozdemir, H., 2005, Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 397–401.

Usanmaz, H., Atmaca, U., 2020, Laktoperoksidaz enziminin sülfamat türevleri bileşikleri üzerine inhibisyon profili, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 20, 746-750.

Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y., Aktümsek, A., 2016, Centaurea pterocaula özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20, 232-242.

Välimaa, H., Savolainen, S., Soukka, T., Silvoniemi, P., Mäkelä, S., Kujari, H., Gustafsson, J. A., Laine, M., 2004, Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands, *Journal of Endocrinology*, 180, 55–62.

Wallace, R.J., 2004, Antimicrobial properties of plant secondary metabolites, *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 621-629.

Waszkiewicz, N., Zalewska, A., Szajda, S.D., Szulc, A., Kępka, A., Minarowska, A., Wojewódzka-Żelezniakowicz, M., Konarzewska, B., Chojnowska, S., Supronowicz, Z.B., Ladny, J.R., Zwierz, K., 2012, The effect of chronic alcohol intoxication and smoking on the activity of oral peroxidase, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50, 450-455.

Wever, R., Kast, W.M., Kasinoedin, J.H., Boelens, R., 1982, The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 709, 212–219.

Wijkstrom-Frei, C., El-Chemaly, S., Ali-Rashidi, R., Gerson, C., Cobas, M.A., Forteza, R., Salathe, M., Conner, G.E., 2003, Lactoperoxidase and human airway host defense, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29, 206-212.

Williams, J.A., Stone, E.M., Millar, B.C., Hewer, A., Phillips, D.H., 2000, Pathways of heterocyclic amine activation in the breast: DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) formed by peroxidases and in human mammary epithelial cells and fibroblasts, *Mutagenesis*, 15, 149-154.

Wolfson, L.M., Sumner, S.S., 1993, Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: A review, *Journal of Food Protection*, 56, 887-892.

Yılmaz, B., Tosun, H., 2013, Sütte bulunan doğal antimikrobiyal sistemler ve bunların gıda sanayiinde kullanımı, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9, 11-20.

https://www.brenda-enzymes.org. Ziyaret Tarihi: 29.07.2021.

https://www.byjus.com. Ziyaret Tarihi: 29.07.2021.

https://www.monolib.net. Ziyaret Tarihi: 29.07.2021.

EKLER