

D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri

Işıl Nihan ÖZYÜREK¹, Ramazan KALIN^{2*}, Hasan ÖZDEMİR¹

ÖZET: Meme, tükürük ve diğer mukoza bezlerinden salgılanan laktoperoksidaz (LPO, E.C.1.11.1.7); antibakteriyel özelliğe sahip bir peroksidaz enzimidir. D-Penisilamin; Wilson hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan tiyol yan zincirine sahip bir amino asittir. Bu çalışmanın amacı, sığırlaktoperoksidaz enzimine karşı D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in *in vitro* inhibisyon profillerini belirlemektir. LPO enzimi, % 62,25 verimle 357,92 kat afinite kromatografisi (Sephrose 4B-L-tirozin-sülfanamid) kullanılarak sığırlaktütünden saflaştırıldı. LPO; D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin tarafından etkili bir şekilde inhibe edildi. Bu moleküllerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,584, 0,207 ve 0,552 µM olarak bulundu. D-Penisilamin ve D-Penisilamin disülfid için yarışmalı inhibisyon gösterirken, N-Asetil-D-penisilamin için yarışmasız inhibisyon gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Laktoperoksidaz, penisilamin, saflaştırma, inhibisyon

The Inhibition Effects of D-Penicillamine, D-Penicillamine disulfide and N-Acetyl-D-Penicillamine on Lactoperoxidase Enzyme Activity

ABSTRACT: The lactoperoxidase (LPO, E.C.1.11.1.7) secreted from the breast, saliva and other mucous glands is a peroxidase enzyme with antibacterial properties. D-penicillamine is an amino acid with a thiol side chain, used in the treatment of many diseases such as Wilson disease. The aim of this study was to determine *in vitro* inhibition profiles of D-Penicillamine, D-Penicillamine disulfide and N-Acetyl-D-penicillamine against bovine lactoperoxidase enzyme. LPO enzyme was isolated from bovine milk using affinity chromatography (Sephrose 4B-L-tyrosine-sulphanamide) 357.92 fold with a yield of 62.25%. LPO was effectively inhibited by D-Penicillamine, N-Acetyl-D-penicillamine and D-Penicillamine disulfide. IC₅₀ values of these molecules were found as 0.584, 0.207 and 0.552 µM, respectively. D-Penicillamine, and D-Penicillamine disulfide exhibited competitive inhibition, and N-Acetyl-D-penicillamine showed noncompetitive inhibition.

Keywords: Lactoperoxidase, penicillamine, purification, inhibition

¹ Işıl Nihan ÖZYÜREK (Orcid ID: 0000-0003-4896-5226), Hasan ÖZDEMİR (Orcid ID: 0000-0002-4059-0442), Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

² Ramazan KALIN (Orcid ID: 0000-0002-5917-1299), Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ramazan KALIN, e-mail: ramazan.kalin@erzurum.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 02-01-2020

Kabul tarihi / Accepted: 01-02-2020

GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Bileşenleri nedeniyle süt, insanların sağlığına büyük katkılar sağlamaktadır (Seifu ve ark., 2005). Süt kendi içeriğini zararlı mikroorganizmalardan koruyan çeşitli bileşenleri içerir. Bu bileşenlerden bir tanesi de laktoperoksidaz (LPO) sistemidir (Köksal ve ark., 2017a).

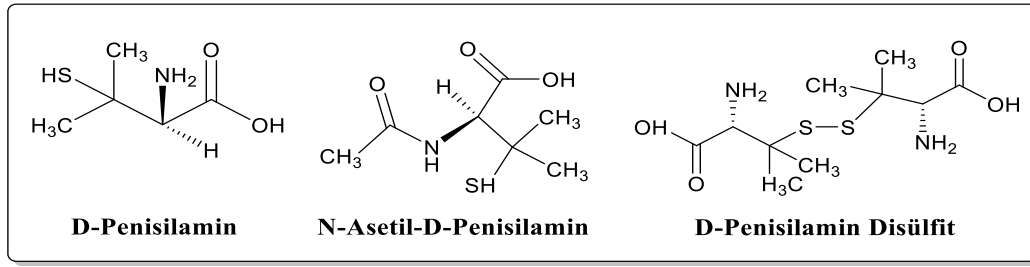
Laktoperoksidaz (LPO; EC 1.11.1.7), doğada yaygın olarak insanlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan peroksidaz ailesinin bir üyesidir (Kussendragar ve Van Hooijdonk, 2000). LPO; memelilerin meme, tükürük ve gözyaşı bezlerinin salgılarında, yani süt, tükürük ve gözyaşlarında bulunur (Wolfson ve Sumner, 1993). Süt içerisinde bol miktarda bulunan LPO, emzirme döneminde yeni doğan bebeklerin bağırsak yollarının patojenik mikroorganizmalara karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Özetle istilacı mikroorganizmalara karşı laktoperoksidaz sistemi doğal bir savunma sistemi olarak görev yapmaktadır (Reiter, 1978). LPO sistemi üç bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; LPO, tiyosiyanat ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'dir. Sadece bu üç bileşenin varlığında LPO sistemi aktivitesini gösterir. LPO enzimi H_2O_2 varlığında tiyosiyanatın (SCN^{-1}) hipotiyosiyanite ($OSCN^{-1}$) oksidasyonu gerçekleştirir. Oluşan bu yeni iyon; gram negatif ve gram pozitif bakteri, mantar ve virüslere karşı güçlü bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahiptir (Seifu ve ark., 2005; Köksal ve ark., 2017a).

Oksidoredüktaz enzim sınıfında olan LPO; 612 amino asit kalıntısı içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 78 kDa olan bir glikoproteindir. LPO aktif merkezinde bir heme grubu (protoheme 9) ve yaklaşık % 10 oranında karbohidrat içerir. LPO molekülünün katalitik merkezindeki heme grubu, bir ester bağıyla polipeptit zincirine kovalent olarak bağlanmış bir protoporfirin IX'dan oluşmaktadır (Björck ve Claesson 1980; Colas ve ark., 2002).

Penisilamin yapısal olarak, bir tiyol yan zincirine sahip bir amino asittir. Penisilinin hidrolitik bozulması ile veya kimyasal bir proses ile sentezlenerek hazırlanabilmektedir. Sisteinin ikinci karbon atomuna bağlı iki hidrojen atomunun yerine iki metil grubuna sahip penisilamin, sisteinin yapısal bir analogu olarak karşımıza çıkmaktadır. α -Karbon atomuna bir amino, bir karboksil, bir sülfidril ve iki metil grubunun bağlanmasıyla oluşan penisilamin, üç fonksiyonlu bir amino asittir. Bu üç fonksiyonel grup sayesinde karakteristik kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirilmektedir (Munro ve Capell, 1997; Bhushan ve Kumar, 2009).

Asetillenmiş bir D-penisilamin analogu olan N-Asetil-D-penisilamin, klinik olarak metal toksisitesine karşı bir panzehir olarak kullanılan şelatlama ajanlarından biridir. Ağır metallerin çevrede her yerde bulunmasından dolayı Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıkları içeren ciddi sağlık etkileriyle ilişkilendirilmektedir. Şelatlama tedavisi, bu toksik etkileri azaltmak için klinik olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Özellikle cıva zehirlenmelerinin tedavisinde N-Asetil-D-penisilamin kullanıldığı bilinmektedir (Kark ve ark., 1971; Budimir, 2011; Chipiso ve ark., 2019).

Sunulan bu çalışmada, aminoasit türevi olan D-Penisilamin, N-Asetil-D-Penisilamin ve D-Penisilamin disülfid (Şekil 1) bileşiklerinin *in vitro* şartlar altında LPO enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle LPO enzimi sığır sütünden saflaştırılmıştır. Daha sonra *in vitro* şartlarda yapılan inhibisyon çalışmaları ile her bir molekül için IC_{50} ve K_i değerleri ile inhibisyon tipleri belirlenmiştir.



Şekil 1. Moleküllerin kimyasal yapıları

MATERYAL VE YÖNTEM

Kimyasallar

Sığır sütü Erzurum ilindeki yerel mandıralardan satın alınarak LPO enzimi bu süttten saflaştırıldı. Afinite kolonu ve saflaştırma için kullanılan kimyasallar, Amberlit CG-50-NH₄⁺ reçinesi, 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), L-tirozin, CNBr-aktifleştirilmiş sefaroze 4B, sülfanilamid, bovin serum albümin (BSA), hidrojen peroksit, D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid, N-Asetil-D-penisilamin ve elektroforez için kullanılan kimyasalların tamamı Almanya devletine kayıtlı Sigma-Aldrich şirketinden ticari olarak satın alındı.

LPO Aktivitesinin Ölçümü

LPO aktivitesi, Shindler ve Bardsley'in uyguladığı deneysel prosedürü üzerinde yapılan küçük değişikliklerle ölçülmüştür. Bu deney prosedürü kromojenik bir substrat olan ABTS molekülünün yükseltgenmesi sonucu oluşan yeşil renkli bileşiğin 412 nm'de absorbansta yapmış olduğu artışın belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Shindler ve Bardsley 1975). Bir enzim ünitesi (E.Ü.); 298 K'da 1 µmol ABTS'nin 1 dakikada oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (ϵ :32.600 M⁻¹ cm⁻¹).

Protein Tayini

Protein miktarları, önceki çalışmalarımızda detaylı bir şekilde açıklanmış olan Bradford yöntemine göre belirlendi. Sığır serum albümini standart bir protein olarak kullanarak protein miktarlarını belirlemek için standart bir grafik çizildi (Bradford, 1976; Kalın ve ark., 2014).

LPO'nun Saflaştırılması

LPO, Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Hazırlanan afinite kolonu fosfat tamponu (10 mM, pH 6.8) ile dengelendikten sonra hazırlanan homojenat kolona yüklendi. Daha sonra afinite jeli fosfat tamponu (400 mL, 25 mM, pH 6.8) ile iyice yıkandı. Son olarak kolona tutunmuş olan LPO enzimi NaCl/Na₂HPO₄ çözeltisi (1 M/0,25 M, pH:6.8) ile elüe edildi.

Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Saflaştırılan LPO enziminin saflığını kontrol etmek için, önceki çalışmalarda detaylı olarak anlatılmış olan Laemmli yöntemine göre SDS-PAGE yapıldı (Laemmli, 1970).

In Vitro İnhibisyon Çalışmaları

Penisilamin ve türevlerinin inhibisyon etkileri (IC₅₀) LPO enzimi üzerine en az beş farklı inhibitör konsantrasyonunda çalışılarak çizilen grafiklerden belirlendi. Çizilen grafiklerden IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra üç farklı inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonlarında yapılan aktivite ölçümleri sonucunda elde edilen değerlerden Lineweaver ve Burk eğrileri çizildi. Bu grafiklerden de her bir inhibitörün K_i değeri ve inhibisyon tipi ayrı ayrı belirlendi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Süt, tüm memeli türlerinin meme bezlerinden salgılanan hayati bir sıvıdır. Hayati öneme sahip olan bu sıvı, memeli yavrularının beslenme, bağışıklık ve koruyucu ihtiyaçlarını desteklemek için çok önemli bir rol oynamaktadır. Süt ve ürünleri özellikle insan yaşamındaki beslenmede önemli bir yer tutmaktadır. Bu yüzden de insanlar için tam olarak fayda sağlayan bir besin kaynağıdır (Özdemir ve Uğuz, 2005). Süt; proteinler, enzimler, yağlar, mineraller ve vitaminler gibi birçok farklı madde bakımından oldukça zengindir. Laktoferrin, lizozim, glikomakropeptit ve LPO gibi bileşenleri içerisinde bulunduran insan sütü enzim içeriği açısından çok önemlidir (Özdemir ve ark., 2001). İnsan sütü inek sütüne kıyasla düşük bir LPO aktivitesine sahiptir. Ancak her iki LPO çeşidi de aynı özelliklere ve molekül ağırlığına sahiptir. Çiğ sütte doğal olarak bulunan LPO; tiyosiyanat ve peroksit ile birlikte LPO sistemini meydana getirir. Bu sistem çiğ süt içerisindeki en önemli mikrobiyal inhibitördür (Sarıkaya ve ark. 2015).

D-Penisilamin: farmakolojik olarak oldukça aktif bir bileşiktir. Farmakolojik olarak D-Penisilamin; Wilson hastalığı (Walshe, 1956), sistinüri (Stephens, 1989) ve ağır metal zehirlenmelerinin (Gooneratne ve Christensen, 1997) tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak özellikle romatoid artrite (Jaffe, 1983) ve skleroderma (LeRoy ve ark., 1991) hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir. Romatoid artrit hastalığının yanı sıra hepatit tedavisinde ve bebeklerin retina hastalığının önlenmesinde kullanılmıştır (Phelps ve ark., 2001).

Enzimler, biyolojik sistemlerde kimyasal reaksiyonları hızlandırarak katalize eden biyolojik makromoleküllerdir. Düşük konsantrasyonlarda, bazı kimyasallar veya ilaçlar spesifik enzim inhibisyonlarına sebep olarak enzim aktivitelerinde değişmelere neden olmaktadır (Köksal ve ark. 2017a). Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan D-Penisilamin bileşiğinin hastaları iyileştirme özelliğine sahip olmasına rağmen toksisitesinin de olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. D-Penisilamin ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiği zaman enzimler üzerine inhibisyon parametrelerinin belirlenmesine yönelik çok fazla çalışmanın olmadığını görebilmekteyiz. Buradan yola çıkarak D-Penisilamin ile bunun türevleri olan N-Asetil-D-penisilamin ve D-Penisilamin disülfid moleküllerinin sığır sütünden saflaştırılan LPO üzerine inhibisyon parametreleri belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Moleküllerin LPO üzerine inhibisyon sonuçları

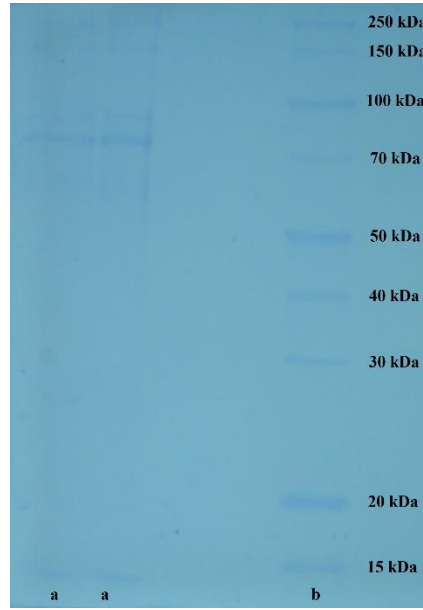
Molekül	IC ₅₀ (µM)	K _i (µM)	İnhibisyon Tipi
D-Penisilamin	0,584	1,422±0,288	Yarışmalı
N-Asetil-D-penisilamin	0,552	1,061±0,462	Yarışmasız
D-Penisilamin Disülfid	0,207	0,136±0,069	Yarışmalı

D-Penisilamin ve türevlerinin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkilerini belirlemek için öncelikle sığır sütünden LPO enzimi ligant olarak sülfanilamitin kullanıldığı bir afinite kromatografisi tekniği ile tek kademedede % 62,25 verim ile 357,92 kat saflaştırıldı (Çizelge 2). Saflaştırılan LPO enziminin saflığı yapılan SDS-PAGE ile kontrol edildi ve molekül kütlesi yaklaşık 78 kDa olduğu belirlendi (Şekil 2).

Çizelge 2. Sığır sütü LPO enziminin sülfanilamit afinite kolonu ile saflaştırma sonuçları

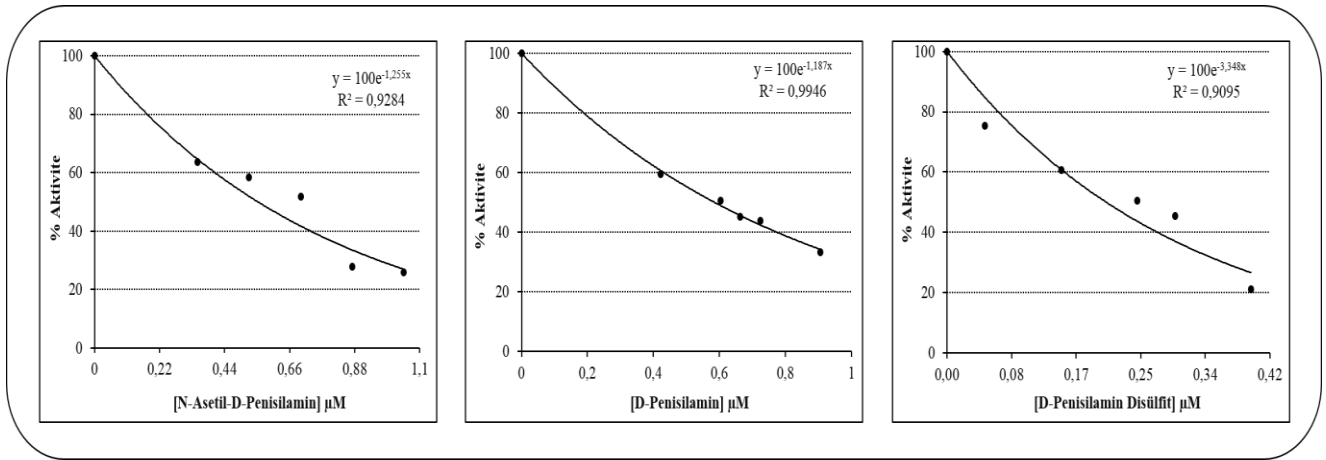
Saflaştırma Basamakları	Toplam Hacim (ml)	Aktivite (EÜ.ml ⁻¹)	Protein (mg.ml ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ.mg ⁻¹)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	50,0	1,12	10,3	51,0	56,0	0,1087	100	1
Afinite Kromatografisi	7,0	4,98	0,128	0,896	34,86	38,906	62,25	357,92

D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri



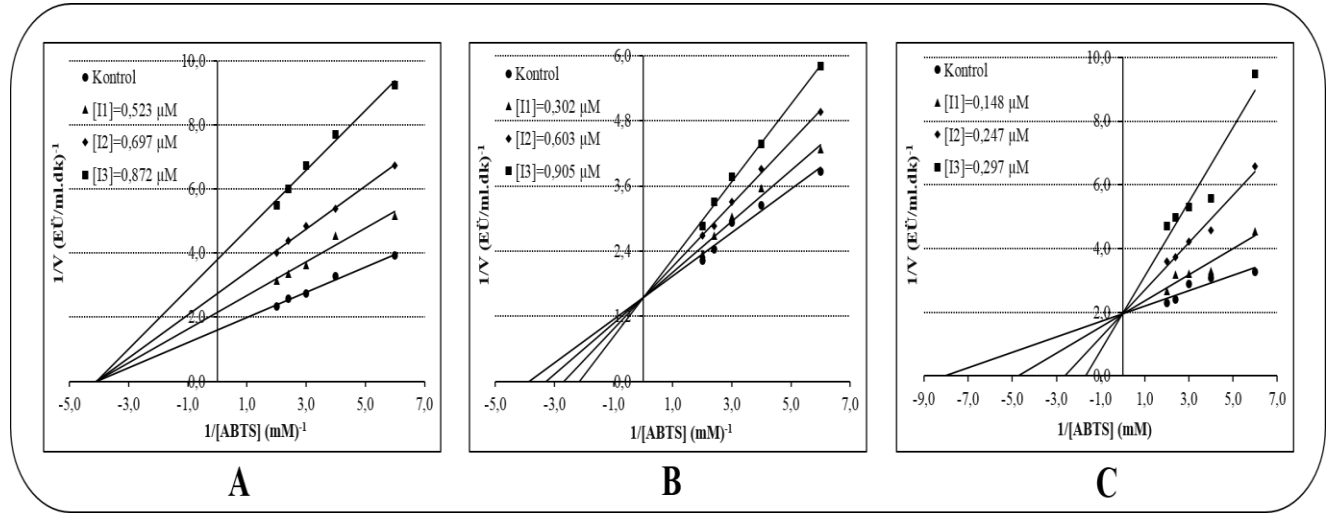
Şekil 2. LPO için SDS-PAGE fotoğrafı. a kolonları saf LPO bantlarını gösterirken b kolonu ise standartları göstermektedir

D-Penisilamin, N-Asetil-D-penisilamin ve D-Penisilamin disülfid moleküllerinin 5 farklı konsantrasyonunda yapılan aktivite ölçümleri sonucunda çizilen grafiklerden IC_{50} değerleri belirlendi (Şekil 3). Bu değerler D-Penisilamin, N-Asetil-D-penisilamin ve D-Penisilamin disülfid molekülleri için sırasıyla 0,584, 0,552 ve 0,207 μM olarak hesaplandı.



Şekil 3. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak moleküller ile elde edilen Aktivite(%)-[İnhibitör] grafikleri

Moleküllerin K_i değerleri ve inhibisyon tipleri; 5 farklı substrat konsantrasyonuna karşı 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda yapılan aktivite ölçümleri sonucunda çizilen ayrı ayrı Lineweaver Burk grafiklerinden belirlendi (Şekil 4). K_i değerleri D-Penisilamin, N-Asetil-D-penisilamin ve D-Penisilamin disülfid molekülleri için sırasıyla $1,422 \pm 0,288$, $1,061 \pm 0,462$ ve $0,136 \pm 0,069$ μM olarak hesaplandı. İnhibisyon tipleri ise D-Penisilamin ve D-Penisilamin disülfid molekülleri için yarışmalı iken N-Asetil-D-penisilamin için yarışmasız inhibisyon olduğu belirlendi.



Şekil 4. Sığır sütü LPO enzimi için ABTS substratına bağlı olarak moleküller ile elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ grafikleri (A: N-Asetil-D-penisilamin; B: D-Penisilamin; C: D-Penisilamin disülfid için Linewear Burk grafikleri)

Yapılan çalışma sonuçlarından da görüleceği üzere bütün moleküller LPO enzimini inhibe etmiştir. Sonuçlar kendi içerisinde kıyaslandığında bu bileşiklerden en güçlü inhibisyona D-Penisilamin disülfid molekülünün sahip olduğu bulunmuştur. D-Penisilamin ve D-Penisilamin disülfid molekülleri inhibisyon özelliklerini LPO enziminin aktif merkezine bağlanarak gösterirken, N-Asetil-D-penisilamin ise aktif merkezden farklı bir noktaya bağlanarak inhibisyona sebep olmuştur.

Literatürde farklı bileşiklerin LPO enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini belirlemek için yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Şişecioğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine L-adrenalinin (Melda ve ark., 2012), melatonin ve seratoninin (Melda ve ark., 2010a), bazı vitaminlerin (Melda ve ark., 2009a), norepinefrinin (Melda ve ark., 2010b), propofolun (Melda ve ark., 2009) ve bazı antibiyotiklerin (Melda ve ark., 2011) inhibisyon parametreleri belirlenmiştir. Aynı şekilde Köksal ve arkadaşları tarafından LPO üzerine yapılmış çalışmalarda bazı avermektinlerin (Köksal ve ark., 2016a), bazı tiofen türevlerinin (Köksal, 2019), sekonder sülfanamid türevlerinin (Köksal ve ark., 2017a), bazı doğal moleküllerin (Köksal ve ark., 2017b) ve fenolik asitlerin (Köksal ve ark., 2016b) inhibisyon parametreleri kapsamında IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlenerek literatüre kazandırılmıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak LPO enzimi öncelikle sığır sütünden saflaştırıldı. Daha sonra *in vitro* şartlarda D-Penisilamin ve türevlerinin inhibisyon etkileri detaylı bir şekilde araştırıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda bütün moleküllerin LPO enzimini μM seviyede inhibe ettiği belirlendi. Bilindiği üzere LPO, süt ve mukozal sekresyonlarda bulunan bakterileri uzaklaştırdığı için doğuştan gelen bağışıklık sistemi için çok hayati bir aktiviteye sahiptir. Eğer enzim aktivitesi azalır, bu bağışıklık sisteminin zayıfladığı anlamına gelir. Ancak bu özellikle istenmeyen bir durumdur, çünkü bu bebeklerin bağışıklık sistemini oldukça fazla etkiler. Bu yüzden her ne kadar bazı hastalıkların tedavisinde D-Penisilamin kullanılsa da penisilamin ve türevlerinin özellikle laktasyon döneminde kullanımına toksik etkisinden dolayı dikkat edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Bhushan R, Kumar R, 2009. Enantioresolution of DL-Penicillamine. *Biomedical Chromatography*, 24: 66-82.
- Björck L, Claesson O, 1980. Correlation Between the Concentration of Hypothiocyanate and Antibacterial Effect of the Lactoperoxidase System Against Escherichia Coli. *Journal of Dairy Science*, 63: 919-922.
- Bradford, MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-251.
- Budimir A, 2011. Metal İons, Alzheimer's Disease and Chelation Therapy, *Acta Pharmaceutica*, 61: 1-14.
- Chipiso K, Duc T, Simoyi RH, 2019. Kinetics and Mechanism of Oxidation of N-Acetyl-D-Penicillamine in Acidified Iodate and Aqueous Iodine. *South African Journal of Chemistry*, 72: 1-9.
- Colas C, Ku JM, Ortiz De Montellano PR, 2002. Asp-225 And Glu-375 in Autocatalytic Attachment of the Prosthetic Heme Group of Lactoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 7191-7200.
- Gooneratne SR, Christensen DA, 1997. Effect of Chelating Agents on the Excretion of Copper, Zinc and İron in the Bile and Urine of Sheep. *Veterinary Journal*, 153: 171-178.
- Jaffe IA, 1983. Penicillamine: An Anti-Rheumatoid Drug. *American Journal of Medicine*, 75: 63-68.
- Kalın R, Atasever A, Özdemir H, 2014. The Single-Step Purification of Peroxidase by 4-Aminobenzohydrazide from Turkish Blackradish (*Raphanus Sativus L.*) and Turnip (*Brassica Rapa L.*) Roots. *Food Chemistry*, 150: 335-340.
- Kark RAP, Poskanze DC, Bullock JB, Boylen G, 1971. Mercury Poisoning and its Treatment with N-Acetyl-D,L-Penicillamine, *The New England Journal of Medicine*, 285: 10-14.
- Köksal Z, 2019. Inhibition Effects of Selected Thiophene-2-Sulfonamides on Lactoperoxidase. *Drug and Chemical Toxicology*, In Press. DOI: 10.1080/01480545.2019.1600532.
- Köksal Z, Alım Z, Beydemir Ş, Özdemir H, (2016b). Potent Inhibitory Effects of Some Phenolic Acids on Lactoperoxidase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30 (11): 533-538.
- Köksal Z, Kalın R, Camadan Y, Usanmaz H, Almaz Z, Gülçin İ, Gökçen T, Gören AC, Özdemir H, 2017a. Secondary Sulfonamides as Effective Lactoperoxidase Inhibitors. *Molecules*: 22: 793-802.
- Köksal Z, Kalın R, Gerni S, Gülçin İ, Özdemir H, 2017b. The Inhibition Effects of Some Natural Products on Lactoperoxidase Purified from Bovine Milk. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31 (9): E21939.
- Köksal Z, Kalın R, Gülçin İ, Özdemir H, Atasever A, 2016a. The Impact of Some Avermectins on Lactoperoxidase in Bovine Milk. *International Journal of Food Properties*, 19 (6): 1207-1216.
- Kussendrager KD, Van Hooijdonk ACM, 2000. Lactoperoxidase: Physico-Chemical Properties, Occurrence, Mechanism of Action and Applications. *British Journal of Nutrition*, 84 (1): 19-25.
- Laemmli DK, 1970. Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-683.
- Leroy EC, Trojanowska M, Smith EA, 1991. The Pathogenesis of Scleroderma (Systemic Sclerosis, Ssc). *Clinical and Experimental Rheumatology*, 9: 173-177.
- Munro R, Capell HA, 1997. Disease-Modifying Drugs Series: Penicillamine. *British Journal of Rheumatology*, 36 (1): 104-109.
- Özdemir H, Aygöl İ, Küfrevioğlu Öİ, 2001. Purification of Lactoperoxidase From Bovine Milk And Investigation of the Kinetic Properties. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 31: 125-134.
- Özdemir H, Uguz MT, 2005. *In Vitro* Effects of Some Anaesthetic Drugs on Lactoperoxidase Enzyme Activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20: 491-495.
- Phelps DL, Lakatos L, Watts JL, 2001. Penicillamine for Preventing Retinopathy of Prematurity in Preterm İnfants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9: 1-26.
- Reiter B, 1978. Review of the Progress of Dairy Science: Antimicrobial Systems in Milk. *Journal of Dairy Research*, 45: 131-147.

- Sarikaya SBO, Şişecioglu M, Çankaya M, Gülçin İ, Ozdemir H, 2015. Inhibition Profile of A Series of Phenolic Acids on Bovine Lactoperoxidase Enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(3): 479-483.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF, 2005. Significance of the Lactoperoxidase System in The Dairy Industry and its Potential Applications: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 137-154.
- Shindler JS, Bardsley W, 1975. Steady-State Kinetics of Lactoperoxidase With ABTS as Chromogens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67: 1307-1312.
- Stephens AD, 1989. Cystinuria and Its Treatment: 25 Years Experience At St. Bartholomew's Hospital. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 12: 197-209.
- Şişecioglu M, Çankaya M, Gülçin İ, Özdemir H, 2009b. The İnhibitory Effect of Propofol on Lactoperoxidase. *Protein and Peptide Letters*, 16: 46-49.
- Şişecioglu M, Çankaya M, Gülçin İ, Özdemir H, 2010a. Interactions of Melatonin and Serotonin to Lactoperoxidase Enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25 (6): 7797-83.
- Şişecioglu M, Çankaya M, Özdemir H, 2009a. Effects of Some Vitamins on Lactoperoxidase Enzyme Activity. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79 (3): 188-194.
- Şişecioglu M, Gülçin İ, Çankaya M, Atasever A, Özdemir H, 2010b. The Effects of Norepinephrine on Lactoperoxidase Enzyme (LPO) . *Scientific Research and Essays*, 5 (11): 1351-1356.
- Şişecioglu M, Gülçin İ, Çankaya M, Özdemir H, 2012. The İnhibitory Effects of L-Adrenaline on Lactoperoxidase Enzyme Purified from Bovine Milk. *International Journal of Food Properties*, 15 (6): 1190-1199.
- Şişecioglu M, Uğuz MT, Çankaya M, Özdemir H, Gülçin İ, 2011. Effects of Ceftriaxone Pentahydrate, Prednisolone, Amikacin Sulfate, Ceftriaxone Sodium and Teicoplanin on Bovine Milk Lactoperoxidase Activity. *International Journal of Pharmacology*, 7: 79-83.
- Walshe JM, 1956. Penicillamine, A New Oral Therapy for Wilson's Disease. *American Journal of Medicine*, 21: 487-495.
- Wolfson LM, Sumner SS, 1993. Antibacterial Activity of the Lactoperoxidase System: A Review. *Journal of Food Protection*, 56: 887-892.