

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI ÇEVRE SAĞLIĞI ANABİLİM DALI



**Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin,
Budesonid, Linezolid, Kaspofungin Diasetat Üzerine
Miyeloperoksidaz Enziminin İnhibisyonu**

NEZAKET ARSLANOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HANDE USANMAZ

SİNOP-2024

TEZ KABUL

Nezaket ARSLANOĞLU tarafından hazırlanan “Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin Diasetat Üzerine Miyeloperoksidaz Enziminin İnhibisyonu” başlıklı bu çalışma, 09.02.2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak, jürimiz tarafından **YÜKSEK LİSANS tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Demet KOCATEPE Sinop Üniversitesi/ Su Ürünleri Fakültesi	İmza
---------------	---	------

Üye (Danışman)	Dr. Öğr. Üyesi Hande USANMAZ Sinop Üniversitesi/ Sağlık Hizmetleri M. Y. O	İmza
---------------------------------	---	------

Üye	Doç. Dr. Ufuk ATMACA Atatürk Üniversitesi / Fen Fakültesi	İmza
------------	--	------

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Fadime DİRİK

.....

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FAVİPİRAVİR, LEVOFLOKSASİN, SEFTİRİAKSON, LEVODROPROPİZİN, BUDESONİD, LİNEZOLİD, KASPOFUNGİN DİASETAT ÜZERİNE MİYELOPEROKSİDAZ ENZİMİ İNHİBİSYONU

NEZAKET ARSLANOĞLU

SİNOP ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DİSİPLİNLERARASI ÇEVRE SAĞLIĞI ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ HANDE USANMAZ

Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7) oksidoredüktaz olup, memeli nötrofillerindeki başlıca antimikrobik sistem enzimlerinden biridir. İnsan MPO' su ve aktif NADPH oksidaz tarafından üretilmiş H_2O_2 ' in nötrofiller ve kupffer hücrelerinde antimikrobiyal işlevleri olduğu düşünülmektedir. Miyeloperoksidazın katalitik etkisi sırasında oluşan reaktif türler normal biyomoleküller ile de tepkimeye girdiklerinden, miyeloperoksidaz enzimi çeşitli enflamatuvar hastalıklardaki hücre ve doku hasarına katkıda bulunur. MPO aterosklerozun, merkezi sinir sistemindeki hasar sonucu görülen rahatsızlıkların ve bazı tümör türlerini içeren farklı enflamatuvar hastalıkların sebeplerinden biri olarak görülmektedir. Miyeloperoksidaz enzimi üzerine Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat moleküllerinin IC_{50} değeri sırasıyla 53,31 μM , 53,31 μM , 36,48 μM , 43,32 μM , 43,32 μM , 49,51 μM , 86,64 μM , olarak hesaplanırken, K_i değerleri ise sırasıyla 0,30 nM, 0,73 nM, 0,63 nM, 0,14 nM, 540 nM, 740 nM, 122 nm olarak tespit edilmiştir. Bu antioksidan enzim ile Favipiravir, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat yarışmalı inhibisyon ve Levofloksasin yarışmasız inhibisyon göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Miyeloperoksidaz; Kinetik; İnhibisyon; Spektro

Şubat 2024, 63 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

MYELOPEROXIDASE ENZYME INHIBITION ON FAVIPIRAVIR, LEVOFLOXACIN, CEFTRIAZONE, LEVODROPROPIZINE, BUDESONIDE, LINEZOLID, CASPOFUNGIN DIACETATE

NEZAKET ARSLANOĞLU

SINOP UNIVERSITY INSTITUTE OF GRADUATE PROGRAMS

DEPARTMENT OF INTERDISCIPLINARY ENVIRONMENTAL HEALTH

SUPERVISOR: DR. ÖĞR.ÜYESİ HANDE USANMAZ

Myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.7) is an oxidoreductase and a major antimicrobial system enzyme in mammalian neutrophils. It is believed that human MPO and H_2O_2 produced by the active NADPH oxidase have antimicrobial functions in neutrophils and Kupffer cells. Due to the reactive species generated during the catalytic action of myeloperoxidase, which can react with normal biomolecules, the enzyme also contributes to cell and tissue damage in various inflammatory diseases. MPO is considered a factor in the etiology of inflammatory diseases, including atherosclerosis, disorders resulting from damage to the central nervous system, and certain types of tumors. The IC_{50} values for Favipiravir, Levofloxacin, Ceftriazone, Levodropropizine, Budesonide, Linezolid, and Caspofungin diacetate on the myeloperoxidase enzyme were calculated as 53.31 μM , 53.31 μM , 36.48 μM , 43.32 μM , 43.32 μM , 49.51 μM , and 86.64 μM , respectively. The K_i values were determined as 0.30 nM, 0.73 nM, 0.63 nM, 0.14 nM, 540 nM, 740 nM, and 122 nM, respectively. These compounds exhibited competitive inhibition with the antioxidant enzyme for Favipiravir, Ceftriazone, Levodropropizine, Budesonide, Linezolid, and Caspofungin diacetate, while Levofloxacin showed non-competitive inhibition.

KEYWORDS: Myeloperoxidase, Kinetics; Inhibition, Spectro

February 2024, 63 Page

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, faydalı olabilmek adına elinden geleni yapan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hande USANMAZ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında maddi, manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nezaket ARSLANOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzim	1
1.2. Enzimlerin Özellikleri.....	2
1.3. Enzimlerin Çalışmasını Etkileyen Faktörler	3
1.4.Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
1.5.Enzimolojiden Tıp Alanında Yararlanılması	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Peroksidazlar (POD:H ₂ O ₂ -Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7).....	6
2.2. Miyeloperoksidaz enzimi (MPO) (EC: 1, 11, 1, 7)	8
2.3. Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Yöntemler	13
2.3.1. Spektroskopi	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal	15
3.1.1.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	15
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Miyeloperoksidaz Aktivite Tayini	17
3.3. MPO Enzimi Üzerine Sülfanilamid Türevlerinin İnhibisyon Çalışmaları	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Miyeloperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	21
4.1.1. Favipiravir MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar	21
4.1.3. Seftriakson MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar	26
4.1.4. Levodropropizin MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar	28

4.1.5. Budesonid MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar	31
4.1.6. Linezolid MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar..	33
4.1.7. Kaspofungin diasetat MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49



TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1 Favipiravir MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	21
Tablo 4.2 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Favipiravir için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	22
Tablo 4.3 MPO enzimini üzerine Favipiravir inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	23
Tablo 4.4 Levofloksasin MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	23
Tablo 4.5 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Levofloksasin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	24
Tablo 4.6 MPO enzimini üzerine Levofloksasin inhibitörünün inhibisyon etkisi.....	25
Tablo 4.7 Seftriakson MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	26
Tablo 4.8 MPO enzimini üzerine Seftriakson inhibitörünün inhibisyon etkisi	27
Tablo 4.9 Levodropropizin MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	28
Tablo 4.10 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Levodropropizin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	29
Tablo 4.11 MPO enzimini üzerine Levodropropizin inhibitörünün inhibisyon etkisi ...	30
Tablo 4.12 Budesonid MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	31
Tablo 4.13 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Budesonid için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	32
Tablo 4.14 MPO enzimini üzerine Budesonid inhibitörünün inhibisyon etkisi	33
Tablo 4.15 Linezolid MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	33
Tablo 4.16 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Linezolid için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	34
Tablo 4.17 MPO enzimini üzerine Linezolid inhibitörünün inhibisyon etkisi	35
Tablo 4.18 Kaspofungin diasetat MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	36

Tablo 4.19 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Kaspofungin diasetat için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	37
Tablo 4.20 MPO enzimini üzerine Kaspofungin diasetat inhibitörünün inhibisyon etkisi	38
Tablo 4.21 MPO enzimini üzerine tez kapsamında çalışılan inhibitörlerin kinetik çalışması sonuçları	39



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Tepkime hızı-Enzim derişimi grafiğı	3
Şekil 1.2 Tepkime hızı-Substrat konsantrasyonu grafiğı	4
Şekil 2.1 Peroksidazların katalize ettiğı tepkimenin bilimsel gösterimi	7
Şekil 2.2 Myeloperoksidase'un katalitik döngüsü	11
Şekil 2.3 MPO'nun kimyasal yapısı	11
Şekil 2.4 Doğal homodimerik insan miyeloperoksidazının tam yapısı	12
Şekil 2.5 Miyeloperoksidazın monomer yapısının şematik olarak gösterilmesi	12
Şekil 2.6 Spektrofotometre dalga boyu grafiğı	14
Şekil 3.1 MPO enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılan moleküller.....	20
Şekil 4.1 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağı olarak Favipiravir ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	21
Şekil 4.2 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Favipiravir eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiğı	22
Şekil 4.3 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağı olarak Levofloksasin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	24
Şekil 4.4 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Levofloksasin eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiğı	25
Şekil 4.5 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağı olarak Seftriakson ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	26
Şekil 4.6 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Seftriakson eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiğı	27
Şekil 4.7 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağı olarak Levodropropizin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	28
Şekil 4.8 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Levodropropizin eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiğı.....	30
Şekil 4.9 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağı olarak Budesonid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	31
Şekil 4.10 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Budesonid eşliğinde elde edilen 1/V-1/[S] grafiğı	32

Şekil 4.11 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Linezolid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	34
Şekil 4.12 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Linezolid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	35
Şekil 4.13 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Kaspofungin diasetat ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu	36
Şekil 4.14 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Kaspofungin diasetat eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	38



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar;

ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Transaminaz
Br ⁻	: Bromür
Ca ⁺²	: Kalsiyum
Cl ⁻	: Klorür
CRP	: C-Reaktif Protein
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
E	: Enzim
E.C	: Enzim Kod Numarası
EI	: Enzim-İnhibitör
ES	: Enzim-Substrat
ESI	: Enzim-Substrat-İnhibitör
F ⁻	: Florür
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
I	: İnhibitör
I ⁻	: İyodür
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Derneği
K _i	: Antagonstin disosiyasyon sabitesi
K _M	: Maksimum tepkime hızının yarisına ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonu
LPO	: Laktoperoksidaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
O ₂ ⁻	: Süperoksit
pH	: Power of hydrogen

PMN	: Polimorfonükleer Lökositler
POD	: Peroksidaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
S	: Substrat
V_0	: İlk Hız
vd	: ve diğerleri
$V_{\max}$	: Katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeri



1. GİRİŞ

1.1. Enzim

Organizmalarda kimyasal tepkimeleri katalize eden (hızlandıran) enzimler protein yapısındaki biyolojik moleküllerdir. “Maya” anlamına gelen enzim terimini ilk kez W. Kühne kullanılmıştır. Şarap, ekmek, yoğurt yapımı gibi birçok olay enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleşmektedir. (Bingöl, 1977).

İnsan gen haritasının büyük çoğunluğu enzimlerin kodlarını barındırır (Lehninger, 2005). Enzimlerin bilinen en belirgin özellikleri özgün olmaları ve tepkimeleri katalizlemeleridir. Yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada faaliyet gösterir, bir kısmıysa hücre içinde sentez edildikten sonra hücre dışına atılır ve etkinliklerini burada gösterir. Hücre içi enzimlere “intraselüler”, hücre dışı enzimlere ise “ekstraselüler” enzimler denilmektedir (Köse, 2015). Tepkimelerde enzimler substrat (reaktan) adlı maddeleri etkileyerek fonksiyon gösterirler. Yapı bakımından reaktanlar küçük, enzimler görece daha büyük moleküllerdir. Reaktanın dışındaki maddelerin tutunduğu yere allosterik bölge denir (Ersoy, 2003).

Enzimin substratla birleştiği bölgeye katalitik bölge veya aktif merkez adı verilir. Enzimlerin katalizleme olayının meydana geldiği alan olan aktif bölge, enzimin reaktanını varsa kofaktörünü bağlayarak bağ oluşturabilme ve yok etme gücü olan bölgeler barındırır. Enzimler bulundurduğu katalitik özellikten faydalanarak tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını gözle görülür biçimde yükseltir (Berg vd., 2014).

Katalizlenen tepkime, ona denk gelen ve katalizlenmeyen reaksiyondan çok daha hızlıdır. Enzimler hem katalize ettikleri tepkimeye spesifik hem de reaksiyon anında kullandıkları substratlarına karşı çok özgüdür. Enzimler protein yapısında olup substratlarını katalizledikten sonra tepkime sonunda yok olmaz ve özelliklerini aynen korurlar. Substratları uygun şekilde bir araya getiren enzimler kimyasal bağların oluşumunu, kırılımını sağlarlar (Gilbert, 1992).

Özgül moleküllerin ve iyonların bağlanmasıyla pek çok enzimin aktivasyon özelliği düşürülür. Enzimlerdeki inhibisyon özelliği aynı zamanda tepkimelerdeki uyarı sistemidir. Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz

(irreversible) olarak iki kola ayrılır. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzime sıkıca bağlanırlar ve enzimden ayrılmaları zordur. Yarışmalı (kompetitif) ve yarışmasız (unkompetitif) olarak iki kısımda incelenen geri dönüşümlü inhibisyonda ise inhibitörün enzimden ayrılması daha kolaydır (Berg vd., 2014). Yarışmalı inhibisyonda yarışmasız inhibisyondan farklı olarak (ES) kompleksi veya (EI) kompleksi oluşur, (ESI) kompleksi oluşmaz. Yarışmasız inhibisyonda substrat konsantrasyonunun artırılması inhibisyondaki değeri düşürmez (Gilbert, 1992).

Hücrelerde metabolik tepkimelerin devam edebilmesi, hücrelerin serbest radikallere ve zararlı etkilere karşı önlem alınmasına bağlıdır. Bu önlem, antioksidan moleküller (katalaz, süperoksitdismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, proteazlar, fosfolipaz ve peroksidazlar adı verilen enzimler ve tokoferol, ubikinon gibi) tarafından sağlamaktadır (Usanmaz ve Atmaca, 2020). Antioksidan moleküller ile enzimler, aerobik hücrelerde yağ peroksidasyonu yaparak ve serbest radikallerin aracılık ettiği tepkimeleri pasif duruma getirerek hücrelerde oksidatif strese karşı bariyer görevi görürler. Antioksidanlar, yağ peroksidasyonu vb. yaparak birçok müzmin hastalığın ileri seviyelere ulaşmasını engellerler (Gülçin vd., 2010a).

1.2. Enzimlerin Özellikleri

Enzimlerin kendilerine özgü özellikleri şu şekilde açıklanabilir.

Etki şartları sınırlıdır: Hücre içindeki etkinlikler ve koordinasyonun bütünü olan yaşam, sıcaklık, pH (power of hydrogen), gibi birçok faktörden etkilenecek meydana gelen bir süreçtir.

Katalitik etkinlik: Kimyasal katalizörlere kıyasla kat ve kat yüksektir. Sabit olmayan bu etkinlik, metabolizmanın hızına göre değişkenlik göstermektedir.

Yan ürünler meydana gelmez: Oran değişmekle birlikte organik kimyasal reaksiyonlarda mutlaka yan ürün oluşmakta iken enzimlerin katalizlediği tepkimelerdeyse hiç yan ürün oluşmaz.

Enzim ve substrat moleküllerinin oranı: Substrat, enzimlerle reaksiyon veren enzimlerden çok daha küçük moleküller maddelerdir. Enzimler nükleik asit tarzındaki molekül ağırlığı fazla olan polimerleri de etkisi altına alabilir. Etki altına alınan kısım polimerin az bir bölümüdür.

Özgüllük (Spesifiklik): Enzimler birçok substrata karşı faaliyet gösterirler. Hücrede aynı anda birden çok biyokimyasal tepkime oluşur. Bu nedenle hücrenin çok sayıda farklı enzim bulundurması olağandır.

Bağlanma yeri ve aktif merkez: Substrat, enzim molekülünün aktif merkezine bağlanır ve tepkime burada gerçekleşir.

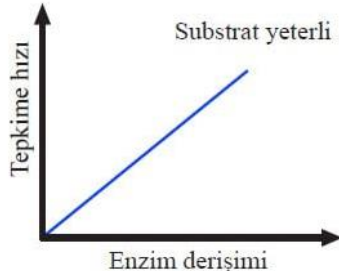
Aktif merkezdeki enzim ve substratın yapıları birbiri ile uyumludur (Develioğlu vd., 2012).

1.3. Enzimlerin Çalışmasını Etkileyen Faktörler

Enzimler çalışırken birtakım çevresel faktörlerden etkilenirler. Enzimleri test etmek için dikkate alınması gereken ana faktörler, sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve substratlar ve enzimler gibi temel bileşenlerin uygun konsantrasyonlarıdır. Enzim-substrat reaksiyonunu etkileyen başlıca faktörler şunlardır (Bisswanger, 2014).

Substrat konsantrasyonu

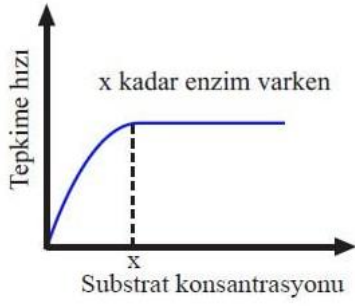
Reaktanın fazla olduğu bir tepkimede en uygun şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_0), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılıdır (Altınışik, 2009).



Şekil 1.1 Tepkime hızı-Enzim derişimi grafiği

Enzim konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar ve belirli bir V_{max} (Katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeri) düzeyinde sabit kalır (Altınışik, 2009).



Şekil 1.2 Tepkime hızı-Substrat konsantrasyonu grafiği

Sıcaklığın Etkisi

37 °C'lik vücut sıcaklığı deney sıcaklığı olarak işlev görse de genellikle deneysel nedenlerden kaynaklı 25 °C tercih edilmektedir (Bisswanger, 2014).

Kinetik molekül hareketlerini artıran sıcaklık ile enzimlerin çalışma hızı doğru orantılıdır. Sıcaklık arttıkça kimyasal reaksiyonların da hızı artmaktadır. Sıcaklığın 10° artmasıyla, reaksiyon hızları yaklaşık olarak 2 kat artar.

pH'in Etkisi

Enzimlerin yaklaşık ph değerleri 3 ila 8 arasında olmakla birlikte pek çok enzimin pH'ı, 7 civarındadır. Birçok enzim 7.5'a yakın bir optimum pH'a sahiptir. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim molekülünün yapısı bozulacağından reaksiyon hızı sıfıra düşmektedir. Canlı hücrelerde ortamın pH değeri nötrale yakındır fakat biyokimyasal reaksiyonlar sırasında her enzimin yerel pH değerini tayin etmek mümkün değildir. Bu yerel pH değerlerinde küçük değişikliklerin meydana gelerek bu yolla da reaksiyon hızlarının ayarlandığı düşünülmektedir.

Zaman

Enzimin katalize ettiği tepkimelerde, tepkime hızının zaman geçtikçe düşmesinde reaksiyon sonucu ortaya çıkan ürünlerin kendi aralarında birleşerek tam tersi yönde bir tepkime oluşturmaları, enzimin aktivasyonunu kaybetmesi, reaksiyonu engelleyen maddelerin meydana gelmesi, substratın bitmesi gibi birden fazla faktör etkili olmaktadır.

1.4.Enzimlerin Sınıflandırılması

Kısa adı IUBMB olan Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği, enzimlerin her birinin birçok alt grup içeren, altı ana sınıfa ayrıldığı bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir (Champe vd., 1997).

Oksidoredüktazlar, yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerini kataliz eden enzimler bu gruptandır. Bu grup enzimlerin reaktanları büyük çoğunlukla hidrojen ve elektron vericileridir. Dehidrogenazlar oksidoredüktaz grubuna girmektedir. Eğer ki, oksijen elektron alıcısı olarak rol alıyorsa oksidazlar da oksidoredüktazlar grubuna dahil olmaktadır. Laktatın pirüvik asite dönüştürülmesi reaksiyonu örnek olarak verilebilir. *Transferazlar*, fonksiyonel bir grubu, bir vericiden bir alıcıya transportunu sağlayan enzimlerdir.

Hidrolazlar, bazı bağların hidrolizini katalizlemektedirler.

Liyazlar (Sentazlar), adı verilen enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler. Sistematik adlandırması substrat-grup-liyaz şeklinde olup, pratik adlandırmada dekarboksilaz, aldolaz ve dehidrataz şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

İzomerazlar, moleküldeki yapısal ve geometrik değişiklikleri katalizlemektedirler (Korkmaz vd., 2012).

1.5.Enzimolojiden Tıp Alanında Yararlanılması

Hastalık tanılarının tespitinde biyokimyasal süreçlerin merkezini oluşturan enzimler önemli belirteçlerdir. İlaçların birçoğu enzimlere etki ederek tedavi edici özelliklerini gösterirler. Tedavide daha çok ekzoenzimlerden yararlanılmaktadır. Enzimler spesifik etkilerini yalnızca belli substratlar üzerinde gösterirler (Sözbilir vd., 2008).

Pek çok enzim sayesinde kalıtsal anomalilerin ve hastalıklara tanı konulabilmekte ayrıca hastalığın prognozu hakkında bir yoruma sahip olunabilmektedir. (Bingöl, 1977). Örneğin, karaciğer hastalıklarının tanısında AST (aspartat aminotransferaz), ALT (alanin aminotransferaz), ALP (alkalen fosfataz), GGT (gama glutamil transferaz) enzimleri önemli parametrelerdir (Ersoy, 2012).

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen COVID-19 pandemisinde de hastaların büyük çoğunluğunda Laktat dehidrogenaz ve kreatinin kinaz yüksekliği görülmekle birlikte ALT ya da AST değerlerinde de artış gözlenmiştir. CRP (C-reaktif protein) düzeyleri ise hastaların çoğunda normal aralığın üzerindedir (Yeşil vd., 2021).

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Peroksidazlar (POD:H₂O₂-Oksidoredüktaz E.C.1.11.1.7)

Enzimler sayesinde metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türleri zararsız moleküllere dönüşmektedir (Davies, 1995). Oksidoredüktazlar sınıfına ait peroksidazlar antioksidan özellik göstererek elektron alıcısı olarak hidrojen peroksiti kullanan organik ve inorganik substratların aralarında gerçekleşen oksidasyonu katalizlerler (Hussain vd., 1995).

Yaygın olarak bitkilerde, hayvanlarda bakterilerde ve funguslarda bulunan peroksidazlar organizmalardaki dağılımından ve çoklu fizyolojik rollerinden dolayı oldukça önemlidir (Öztekin, 2019). Enzimoloji, biyokimya, tıp, genetik, fizyoloji gibi araştırma dallarının çeşitli konularında çalışılan peroksidazlar oluşumu ve tepkimelerdeki rolleri dikkate alındığında; bitki peroksidazları, hayvan peroksidazları ve katalazlar olarak 3 ana sınıfta toplanabilir (Köse, 2015). Endüstriyel üretimde ve uygulamalarda, güçlü oksidasyon-redüksiyon katalizörü olmalarından dolayı kullanılan peroksidaz enzimi, hücre duvarı oluşumunda, oksin metabolizmasında, lignifikasyonda, reaktif oksijen türlerinin giderilmesinde, meyve olgunlaşmasında ve bitki savunma sisteminde de önemli rol oynar (Passardi vd., 2005). Bitkilerdeki ısıya en dayanıklı enzim peroksidazlar olarak bilinmektedir (Keleş, 1986).

Pek çok bitki türünden, farklı peroksidaz izoenzimleri de (POD) analiz edilmektedir. POD; reaktan ilgisi, inhibitör faktörlere duyarlılık, kofaktörler ve en uygun pH gibi farklı biyokimyasal özellikte olan pek çok izoenzimi bulundurur (Van Huystee, 1987; Fric, 1976). Hücre duvarındaki moleküllerin bağlanması (Fry, 1986), savunma sistemleri (Bartonek-Roxa vd., 1991), çimlenme (Morohashi, 2002), lignin biyosentezi (Duarte vd., 2000), oksidatif stres (Hiraga vd., 2001) ve hormonal etkinlik (Wakamatsu ve Takahama, 1993) gibi pek çok fonksiyonda bitki peroksidazları rol almaktadır.

Memelilerde bulunan peroksidaz enzimleri; gözyaşında ve sütte tükürük bezlerinde laktoperoksidaz (LPO) (Kumar ve Bhatla, 1995), trombositlerde, lökositlerde, dalakta ve karaciğerde MPO, akciğer duvarlarında, uterus, mitokondri ve sitoplazmada glutatyon peroksidaz, lizozomlar ve mikrozomlarda peroksidaz şeklinde yerleşmiştir (Usanmaz ve Atmaca, 2020).

Vücutta peroksidazın önce protein bölümü sentezlenmekte olup, bu enzimin işlevsel özelliği yoktur. Holoenzim, hem grubu ile apoproteinin birleştirilmesi ile etkinlik

gösterir. (Van Huystee, 1987; Fric, 1976). Protohem peroksidazlarda ilk prostetik grup olarak karşımıza çıkmaktadır. Prothemler apoproteine gevşek biçimde bağlı olmak zorundadır (Rousset ve Doumonted, 1983). Peroksidazların katalize ettiği tepkimelerde H_2O_2 (hidrojen peroksit); elektron alıcısı olarak harekete geçen kinonlar, askorbat, ve sitokrom C gibi pek çok maddeyi olumsuz etkileyerek redükte edilir (Rousset ve Doumonted, 1983). H_2O_2 'nin oksitleme özelliği nedeniyle bulunduğu tepkimeden arındırılması gerekir. Hücrelerden uzaklaştırılması görevini önemli antioksidan enzimler olan peroksidaz ve karalaz enzimleri meydana getirir (Robert vd., 1993; Haliwell, 1989). Antioksidan enzimler, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak biyolojik oksidatif hasarlara karşı koyduğu bildirilmiştir (Harris, 1992).

Peptid zinciri üstündeki prostetik gruplardan ikincisi glikozid dallanmış yapısıdır. Birçok peroksidaz izoenzimi, biyolojik ağırlıklarının %15-17 oranlarında karbohidrat ihtiva ederler (Van Huystee, 1987). Glikozidik grup ve hem grubuna ek olarak kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları da peroksidaz salgılanımı ve yapısal sürekliliği açısından gerekli olmaktadır (Van Huystee, 1987; Fric, 1976). Yapılan araştırmalarda at turpu (horseradish) peroksidazın 31-33,8 kD ağırlığına sahip olduğu ve hem grubu yanı sıra ek olarak bir glikozid prostetik grubu içerdiğini kaydetmiştir (Van Huystee, 1987).



Şekil 2.1 Peroksidazların katalize ettiği tepkimenin bilimsel gösterimi

Aktivitelerinin kolay ölçülebilmesi, sıcaklığa karşı dayanıklı olmaları özelliklerinden dolayı, metabolik tepkimelerin, enzimlerin işlevi ve protein yapı deneylerinde peroksidazlar sıklıkla tercih edilmektedir (Hiraga vd., 2001). POD deneysel tanı çalışmaları ve mikroanalitik uygulamalarla beraber gıda sanayisi ve ilaç endüstrisinde en çok tercih edilen enzimlerden biri olarak dikkat çekmektedir (Kwak vd., 1996).

2.2. Miyeloperoksidaz enzimi (MPO) (EC: 1, 11, 1, 7)

1940 yılında Agner tarafından ilk kez saflaştırılan miyeloperoksidaz enzimi (EC: 1, 11, 1, 7) lökositlerden salgılanan (Tay vd., 2013) bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunan sitotoksik etkisi ile enfeksiyonları kontrol eden ürettiği bakterisidal ve fungusidal (mantar öldürücü) oksijen türleri ile mikropları öldürme ve inflamasyon tepkisini düzenleme özelliklerine sahip bir enzimdir (Devecioğlu, 2009).

Yalnızca nötrofillerde ve monositlerde bulunan MPO enziminin (Arnhold, 2004), antimikrobiyal özelliği, hipoklorür asidi ve diğer toksinlerin üretiminden kaynaklanmaktadır.

Periferik dokularda ve sıvılarda fagosit aktivasyonu ile birlikte MPO, solunum sırasında hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilirken, hem ekstrasellüler çevreye hem de fagolizozom içine salgılanır. Özellikle plazma seviyelerinde, klorür (Cl^-) varlığında, MPO, H_2O_2 'yi kullanarak sitotoksik oksidan olan hipokloröz asit (HOCl) üretir (Alkaya, 2022). HOCl'nin mikrobisidal özellikleri, aminlerin ve doymamış lipidlerin klorlanması, hem gruplarının ve demir-sülfür merkezlerinin oksidatif beyazlatılması dahil olmak üzere kimyasal reaktivitesinden kaynaklanır (Davies vd., 2008; Podrez vd., 2008; Albrich vd., 1981).

MPO, doğrudan proteinlerin, lipidlerin ve diğer biyolojik moleküllerin oksidasyonu ile ilişkilendirilen çeşitli reaktif oksidan türlerini üretebilir (Tay ve Tamam, 2013). Faydalı rolüne rağmen, MPO'nun doğrudan inflamatuvar doku hasarına ve çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunabileceğini yani, MPO'nun bakterisidal, fungusidal ve virisidal fonksiyonlarını yerine getirmek için oluşturduğu reaktif kimyasal türlerden kaynaklanır, ki bunlar aynı zamanda normal konak dokularına zarar verebilecek kapasitededir (Klebanoff vd., 1980; Albrich vd., 1981).

Birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynayan, güçlü antimikrobiyal özelliklere sahip MPO enziminin eksikliğinde kişilerin nötrofilleri normal olarak çalışmaz ve enfeksiyonlara karşı savunmasız hale gelirler (Tay vd., 2013).

Memelilerde bağışıklık sisteminin savunma mekanizmasında rol oynayan MPO enziminin inhibisyonu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu etkilediğinden oldukça önemlidir (Kirit ve Işık, 2020). ROS, oksidatif strese ve hücrelere zarar verebilir, bu da kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir (Çetintaş, 2011).

Miyeloperoksidaz enziminin aktivitesindeki aşırı artış veya bu enzimin düzensiz inhibisyonu da bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı etkisiz hale gelmesine neden olmaktadır (Fiedler vd., 2000).

Pekçok hastalığın kaynağını bulmada yardımcı, bu hastalıkların oluşmadan önlenmesinde, tanı ve tedavisinde etkili olan miyeloperoksidaz enzimi özellikle akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Başaran, 2007). Otoimmün hastalıkların patogeneğinde, enfeksiyonlara karşı bağışıklık savunmasında da önemli bir rol oynayan MPO' nun, ateroskleroz (damar sertleşmesi) ve koroner arter hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıklarda aktivitesinde artış gözlenmiştir. (Set, 2020).

Sağlıklı bir bağışıklık sistemi işlevi için miyeloperoksidaz enziminin inhibisyonunun dengelenmesi ve düzenlenmesi, önemlidir (Çetintaş, 2011).

Yapılan çeşitli araştırmalara göre MPO'nun, hücrenin kuru ağırlığının %1 ile %5 arasında olduğu düşünülmektedir (Olsson vd., 2004). Memeli peroksidaz ailesinin bir üyesi olan MPO enziminin MPO I, MPO II ve MPO III şeklinde üç izoenzimi bulunmaktadır (Wright vd., 1990; Miyasaki vd., 1987). MPO azurofilik granüler lökositlerin önemli proteinlerinden olup, sindirim enzimleri ve diğer antimikrobiyal proteinlerle azurofilik granüllerin sitoplazmasında bulunur (Olsson vd., 2004). İçeriğinde glukoz barındıran moleküler ağırlık olarak 144 kD olan MPO, iyon bakımından katyonik özellik gösteren bir enzimdir. İki benzer dimerin disülfid bağıyla bağlanması sonucu oluşup, disülfid bağının seçici biçimde parçalanması enzimin spektral ve katalitik özelliklerinden çok da farkı bulunmayan hemi-enzimi (yarı-enzimi) verir.

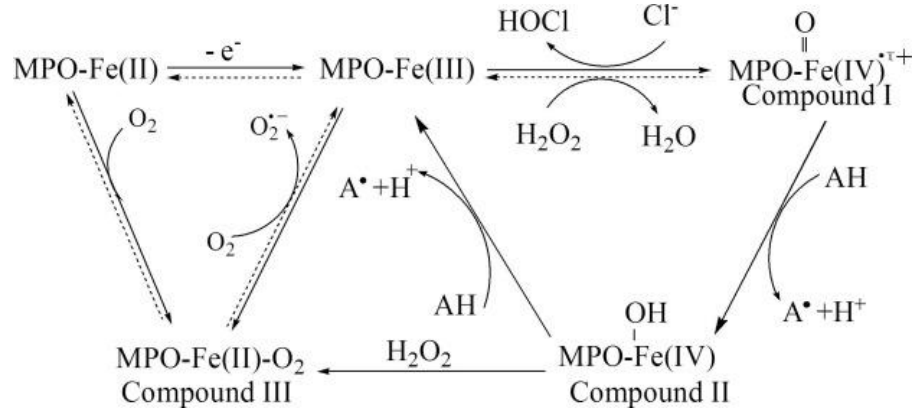
MPO her bir dimer yapıda, merkezi demir atomu içeren protoporfirin IX grubu bulunduran bir hafif bir de ağır alt ünitelerden (herbiri 108 ve 466 amino asitten oluşmaktadır. MPO'nun her iki hem grubu fonksiyonel olarak aynıdır. Hem grupları apoprotein ile iki ester bağı ve bir sülfonyum iyon bağı ile bağlanmıştır. Hemin bu üçlü bağlanış şekli diğer hem proteinleri ile karşılaştırıldığında kendine özgü olmaktadır. Bu da porfirin halkasının biraz da olsa eğilmesine ve Soret bandının MPO için 428 nm'ye kaymasının "red shift" yapmasının sebep olduğu gösterilmektedir (Arnhold vd., 2004). Bu kayma da enzimin karakteristik yeşil renginden sorumlu olan UV bölgede güçlü bir absorpsiyon bandı vermektedir (Fiedler vd., 2000).

Dimerik enzimin ikiz yarı enzimleri birbirine non-kristallografik çiftli eksen ve Cys153'teki kovalent disülfid köprüsüyle bağlanmıştır. İkincil yapı çoğunlukla Heliks yapısında ve çok az da olsa katlanmış yaprak yapısı bulunmaktadır. Her bir yarı enzim

beş tane heliksli merkezi bir çekirdekten ve kovalent olarak bağlı bir hem grubundan meydana gelmiştir (Fiedler vd., 2000).

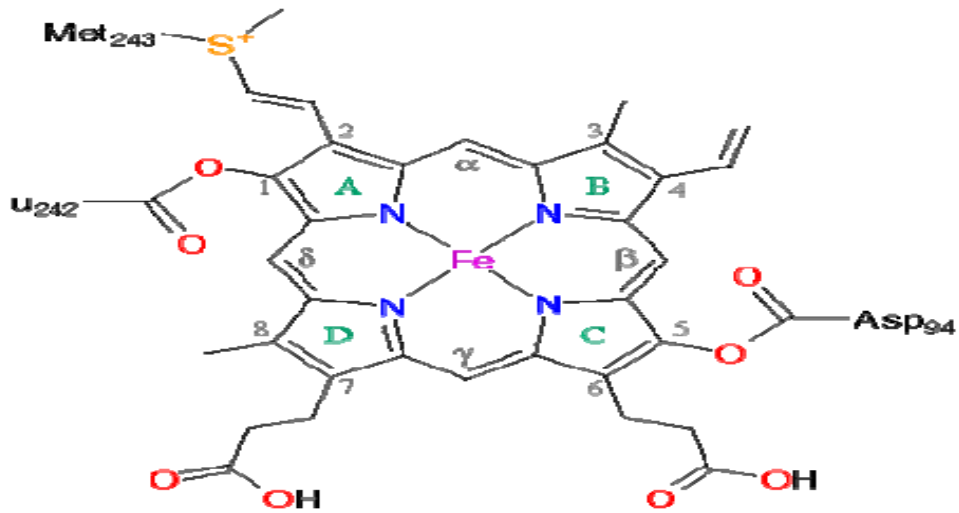
Lökositler, fagositoz olayı ile antimikrobiyal etkilerini gösterirler. Fagozom zarında yerleşen NADPH oksidaz vasıtyla solunum patlaması (respiratory burst) olarak adlandırılan, oksijen kullanımının çabuk bir şekilde arttığı ve sonucunda süperoksit (O_2^-) radikalinin oluştuğu bir dizi olay gerçekleşir. Fagositoz anında çok fazla oksijen tüketimi sonrasında; süperoksit ve hidrojen peroksit meydana gelir. Serbest radikal olan süperoksit, oksijen molekülünün bir elektron kaybetmesi sonucunda oluşur (Hampton vd., 1998). Miyeloperoksidaz enzimi H_2O_2 ve halojenleri (Cl-(Klorür) , F-(Florür) , Br-(Bromür) ve I-(İyodür)) katalize ederek hipohalozları meydana getirir. Örnek olarak; MPO enziminin H_2O_2 ile Cl- iyonunu katalizleyerek bakteri öldürme özelliği olan hipoklorür ve Brile hipobromürün oluşması gösterilebilir. Oluşan bu kimyasal ajanlar bakteriler, mantarlar ve memeli hücrelerine karşı toksik özellik gösterir (Klebanoff, 1968).

MPO için gözlemlenen klasik peroksidaz parçacıklarının kinetik modeli, MPO'nun farklı protez gruplarını ve imidazol nitrojen enzimi aracılığıyla bağlı olduğunu belirtmektedir. Serbest bırakılan dinlenme halindeki enzim (MPO-Fe(III)), H_2O_2 ile bileşikleri oluşturmak için hızlı ve geri dönüşümlü bir reaksiyona girer; bu, $Fe(IV)=O$ grubu ve rezonansla stabilize olup oksitlenmiş bir ara üründür. Enzimin dinlenmesi (MPO-Fe(III)) ve hipohalous asitleri oluşturan mekanistik bir yol oluşturur. Fizyolojik koşullar altında, MPO için tercih edilen oksidan olan iyonu, halojenasyon teknikleri olarak bilinen mekanistik bir yol oluşturur. Bileşik I, ardışık iki elektron adımıyla Bileşik II ve MPO-Fe(III) oluşturmak için birden fazla karakteristik substratı okside edebilir. Süperoksitin MPO-Fe(III) ile birleşmesi, Bileşik III olarak bilinen MPO-Fe(II)- O_2 oluşturulur. MPO'nun katalitik kaybının önemli bir özelliği, elastikiyet dokularına zarar veren ve çeşitli sorunların başlangıcına ve ilerlemesine katkı sağlayan hipokloröz asit (HOCl) üreten oldukça reaktiftir. HOCl, aynı zamanda oksidatif stresi artıran reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumunda doğrudan ilişkilidir. Nötrofillerde bulunan süperoksit, MPO'nun katalitik döngüsünü önemli ölçüde etkiler. MPO-Fe(III) ile reaksiyona girer ve onu hızla Bileşik III'e çevirir. Süperoksit, Bileşik II ile reaksiyona girer ve enzimin klorlama aktivitesini yükseltir (Kettle vd., 1988).

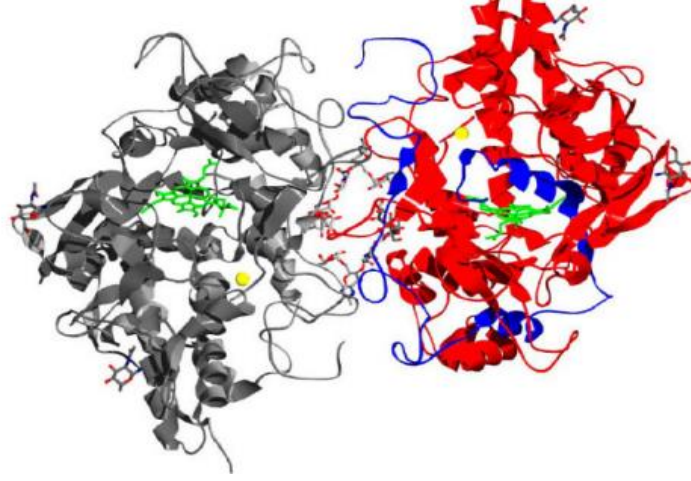


Şekil 2.2 Myeloperoxidase'un katalitik döngüsü

MPO katalitik döngüsünün substrat veya mekanizma temelli inhibitörleri olarak araştırılır. Melatonin, triptofan ve serotonin gibi maddeler anti-inflamatuvar aktivite sergiler ve bunun büyük bir kısmı serbest radikal çekimleyici olarak işlev görürler. Melatonin H_2O_2 tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu ve lipojen modifikasyonunu engelleyebildiğini gösterir ve en etkilisidir. Antioksidan özelliklerine ek olarak, kinetik çalışmalar melatoninin MPO tarafından geniş bir konsantrasyon aralığında H_2O_2 tüketimini önemli ölçüde inhibe eder (Galijasevic vd., 2008; Allegra vd., 2001).

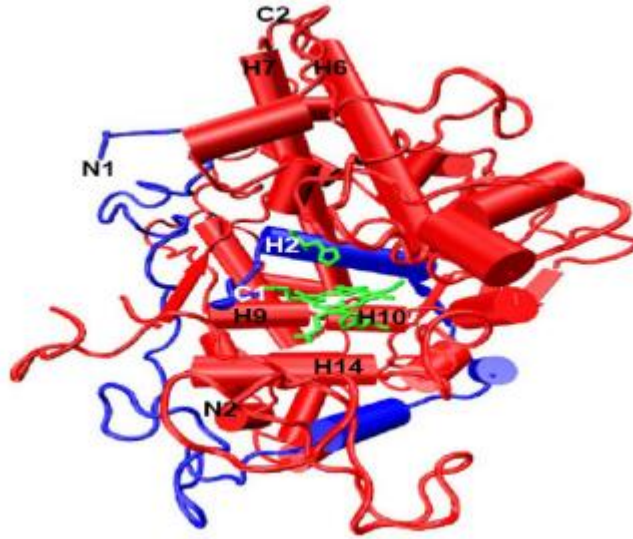


Şekil 2.3 MPO'nun kimyasal yapısı



Şekil 2.4 Doğal homodimerik insan miyeloperoksidazının tam yapısı

Her alt ünite bir hafif zincir (mavi), bir ağır zincirden (kırmızı) oluşmakta ve modifiye bir hem grubu (yeşil) içermektedir. Ek olarak kalsiyum iyonları (sarı küreler) ve glikozlanmış bölgeler gösterilmiştir (Furtmüller vd., 2006).



Şekil 2.5 Miyeloperoksidazın monomer yapısının şematik olarak gösterilmesi

Hafif zincirin sarmalları mavi, ağır zincirin sarmalları ise kırmızı renktedir. Küçük polipeptidin terminalleri N1 ve C1, büyük polipeptidin terminalleri ise N2 ve C2 simgeleri ile verilmiştir (Furtmüller vd., 2006).

2.3. Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Yöntemler

Spektrofotometrik yöntem,

Bir enerji düzeyinden diğerine geçiş yapan atom, molekül veya iyonların geçişleri esnasında emilen ya da yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi şeklindedir.

Monometrik yöntem, bir komponenti gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemdir. Örneğin; oksidazlarla oksijen alınımı ve dekarboksilazlarla karbon dioksit salınımı bu yöntemle ölçülür.

Thunberg yöntemi, çok sayıda dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak ölçülür.

Elektrot yöntemi, cam elektrotlarla oluşan ürünlerin ölçülmesi esasına dayanır.

Polimerik yöntem, pek çok enzimin substratı optikçe aktiftir. Eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır.

Kromatografik yöntem, diğer yöntemlerle bir ölçme yapılamadığında bu yönteme başvurulur.

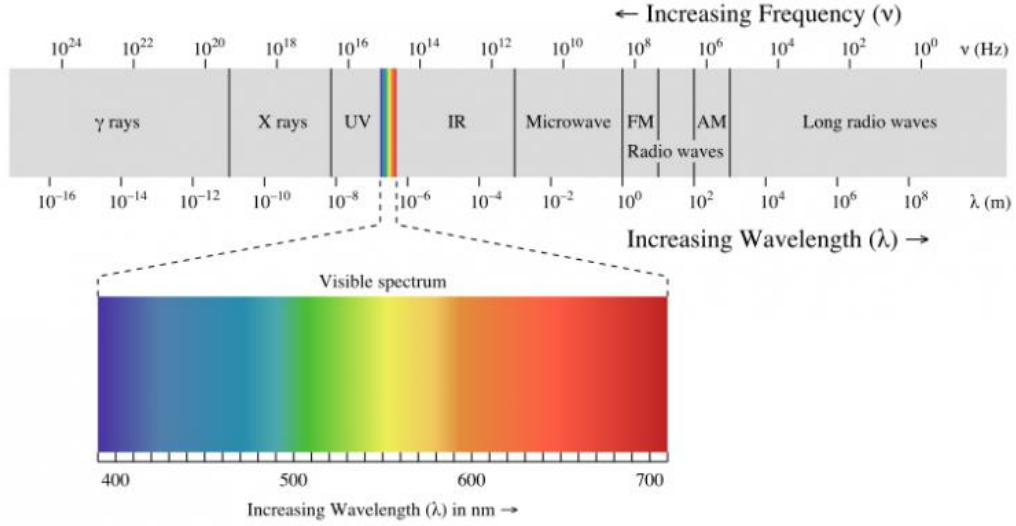
Kimyasal tayin yöntemi, birçok enzim reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alıp, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir (Cansaran, 2018).

2.3.1. Spektroskopi

Işın-madde etkileşimini inceleyen bir bilim dalı olan spektroskopi; molekül, atom veya iyonların enerji seviyeleri arasındaki geçişleri esnasında emilen ya da etrafa saçılan elektromanyetik ışımının tespit edilmesi metodudur (Ahmadova, 2019).

Renklerin bandı anlamına gelen spektro sözcüğünün ışık ve ölçüm terimleri ile bir araya gelmesiyle oluşan spektrofotometre ise ışığın iki çeşit özelliğini karşılaştıran bir ölçüm cihazıdır (Erkuş ve Yüce, 2012).

Organik ve inorganik sistemlere uygulanabilirlik, hata düzeyinin az olması, veri toplama kolaylığı ve elverişliliği yönleri spektrofotometrik yöntemlerin en önemli özelliklerindendir (Onur, 2019).



Şekil 2.6 Spektrofotometre dalga boyu grafiği

Miyeloperoksidaz enzimi hakkında yapılan çoğu araştırmada hastalıkların patogenezindeki rolüne odaklanılması, miyeloperoksidaz enziminin tedavi amaçlı kullanımı hakkında yeterli bilgi bulunmaması nedeniyle tez kapsamında MPO enzimi çalışılmıştır.

Çalışmada Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat molekülleri üzerine ilk defa kinetik çalışma yapılması ve MPO enziminin yeni inhibitörlerini bulmak amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda bulunan inhibitör değerleri, ilaçların kullanım dozajlarının ayarlamasında önemli bir şekilde katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1.Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında Sülfirik asit, O-dianisidin, Hidrojen peroksit, Sodyum Fosfat, Sodyum klorür, Etanol, Metanol, Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, DMSO kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıda marka ve modelleri verilen cihazlar kullanılmıştır.

Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Lo

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Çözelti İçerikleri

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve içerikleri aşağıda verilmiştir.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M Na_2HPO_4 pH=6,8 (O-dianisidin hazırlanmasında ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan tampon): 7,8g (0,1 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 500 ml distile suda çözülmüştür. 1N HCl ile pH>6,8'e kadar titre edilecek, daha sonra toplam hacim distile suyla 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 6 M H_2SO_4 (Sülfürik Asit) çözeltisi için 31,45 ml H_2SO_4 alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
3. 5mM O-dianisidin çözeltisi (O-dianisidin substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, MPO aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi) : 0,122 g O-dianisidin ile içine birkaç damla HCl (Hidroklorik Asit) ilave edilerek 100 ml 0,1 M Na_2HPO_4 pH=6,8 içinde çözülmüştür.
4. 3,2 mM H_2O_2 çözeltisi (O-dianisidin substratına bağlı olarak yapılan çalışmalarda, MPO aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti): %30'luk yoğunluğu 1,11 g/ml olan H_2O_2 'den 32 μL alınarak distile suyla 100 ml 'ye tamamlanmıştır.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

1. 0,0063 Mm Favipiravir: 1 mg favirpiravir tartılıp DMSO (Dimetil Sülfoksit) ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 157.1 g/mol
2. 0,0027 mM Levofloksasin: 1 mg Levofloksasin tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 361.37 g/mol
3. 0,0018 mM Seftriakson: 1 mg Seftriakson tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 554.58 g/mol
4. 0,0033 mM Levodropropizin: 1 mg Levodropropizin tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 297.38 g/mol
5. 0,0023 mM Budesonid: 1 mg Budesonid tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 430.54 g/mol
6. 0,0029 mM Linezolid: 1 mg Linezolid tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 337.35 g/mol
7. 0,00067 mM Kaspofungin diasetat: 1 mg Kaspofungin diasetat tartılıp DMSO ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1488.69 g/mol

3.2. Yöntemler

3.2.1. Miyeloperoksidaz Aktivite Tayini

Dimerik MPO'nun her monomeri, hem grubuna bağlı bir demir ve bir kalsiyum içerir. Kalsiyum iyonunun bağlanma merkezi pentagonal bipiramid yapıdadır. Yapı tüm memeli peroksidazlarında iyi korunmuş benzer sekans içerir. İki uçta Ser174 ve Phe170 ve merkez düzlemde ise Asp96, Thr168, Asp172, bulunmaktadır. Bu aminoasitlerden distal His95'e komşu olan Asp96 küçük polipeptid üzerinde bulunur; bu da kalsiyum iyonunun distal histidinin doğru yerleşmesinin yanı sıra iki zincirin bir arada tutulmasında etkili olduğunu gösterir. Kalsiyumun uzaklaştırılması proteinin çökmesine neden olur (Booth, 1989). Bu ise kalsiyum iyonunun üçüncü yapıyı düzenlediğini gösterir. Natif MPO'da hem grubu beş bağ ihtiva eden Fe^{3+} içerir. Bu bağlardan dördü porfirinin pirol halkalarının azot atomuna, beşincisi ise proksimal histidinin (His336) ϵ azotuna bağlıdır. Bu histidinin δ azotu ise Asn421'in NH_2 grubuna hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu yapı ayrıca su molekülleriyle de hidrojen bağı aracılığıyla bağlanır. Bu yapı bir kompleks halinde MPO'nun peroksidaz aktivitesini sağlamaktadır (Fiedler vd., 2000; Zederbauer vd., 2007).

K_M (Maksimum tepkime hızının yarısına ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonu) ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; O-dianisidin kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçülmüştür. Bu amaçla O-dianisidin'nin stok çözeltisinden sırasıyla 0,25 ile 1,5 ml aralıklarında alınmıştır. Her bir O-dianisidin konsantrasyonunun uygulandığı deney için, enzim aktivitesinin ölçüldüğü tampon çözeltisiyle toplam hacim 2,8 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra her bir tüpe 0,1 ml enzim çözeltisi ve son olarak 0,1 ml H_2O_2 katılarak, spektrofometrede O-dianisidin için 460 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Her ölçüm 3 defa tekrarlanmıştır. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Grafiklerin çizimlerinde en küçük kareler regresyon doğru denklemi kullanılmıştır. K_M ve V_{max} değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplanmıştır.

MPO enzimi üzerine ilaçlar için inhibisyon kinetiklerine bakılmıştır. Bu amaçla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek IC_{50} (Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) ve K_i değerleri ve inhibisyon tipleri ilk defa çalışılmıştır. Amlodipin maleat'ın aril türevlerinin MPO enzimin K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, amlodipin maleat ve amlodipin maleat'ın aril türevlerinin O-dianisidin substratına bağlı olarak oda sıcaklığında ve optimum pH'da, doygun olmayan 0.53 mM O-dianisidin konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde inhibitör çözeltisi ilave edilerek, % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilmiştir. K_i değerlerinin tespit edilmesi ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla, oda sıcaklığında optimum pH'da 5 farklı O-dianisidin substrat konsantrasyonunda ve her bir amlodipin maleat ve amlodipin maleat'ın aril türevlerinin için 3 farklı sabit konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulunmuştur.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad c = A / \epsilon \cdot b \quad V = c \cdot D_f$$

A = Absorbans (1 dakika sonunda okunan absorbans)

b = Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c = Konsantrasyon (μmol/ml)

ε = Ekstinksiyon kat sayısı (11300 M⁻¹ x cm⁻¹)

D_f = Seyreltme katsayısı

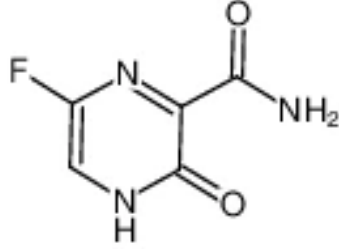
V = Reaksiyon hızı (μmol x dak. /ml)

Enzim saflaştırılması işlemlerinde substrat olarak O-dianisidin kullanılacağından, saflaştırma basamaklarının enzim aktivite ölçümü sonuçları için; 1 enzim ünitesi "20°C'de 1 dakikada 1 μmol O-dianisidin'in oksidasyonunu katalizleyen enzim miktarı" olarak tanımlanmıştır.

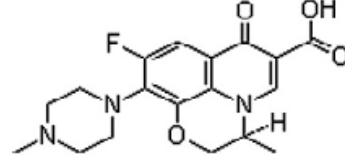
3.2.2. MPO İçin Kullanılan İnhibitörler

Miyeloperoksidaz'ın (MPO) inhibitörleri, MPO'nun katalitik aktivitesini azaltan veya engelleyen bileşiklerdir. Bu inhibitörler, çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkileri modüle etmek veya nötrofillerin mikrobisidal aktivitesini düzenlemek amacıyla araştırılmaktadır. MPO inhibisyonu, anti-enflamatuar ve antioksidan özellikler gösteren hastalıkların tedavisi veya önlenmesi amacıyla potansiyel bir strateji olabilir. MPO inhibitörlerinde biri AZD3421 yapısal formülü, 1-(2-izopropoksietil)-2-tiokso-1,2,3,5-tetrahidropirrol(3,2-d)pirimidin-4-on'dur. (Jucaite vd.,2015) Benzoik asit hidrazitleri, flavonoidler ve polifenoller, melatonin, NSAID'ler de MPO inhibitörlerine örnek verilebilirler. MPO inhibitörleri hakkın çok fazla araştırma yoktur ve çalışmalar devam etmektedir. Buradan yola çıkarak bu tezde Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson,

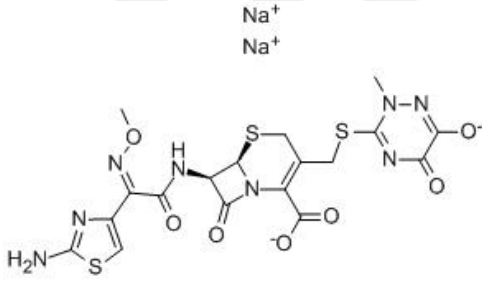
Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat moleküllerinin MPO üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.



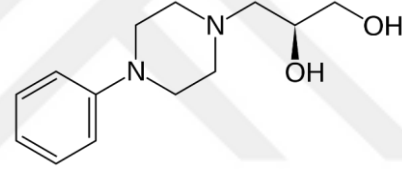
Favipiravir



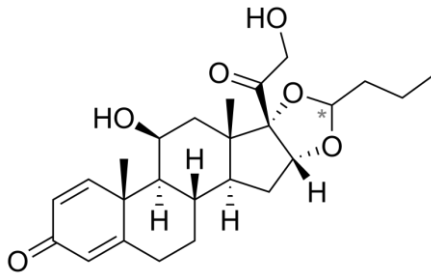
Levofloksasin



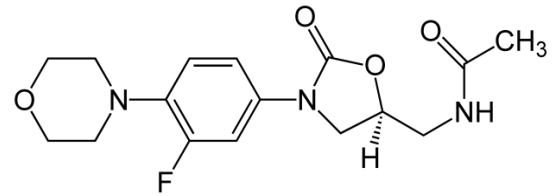
Seftriakson



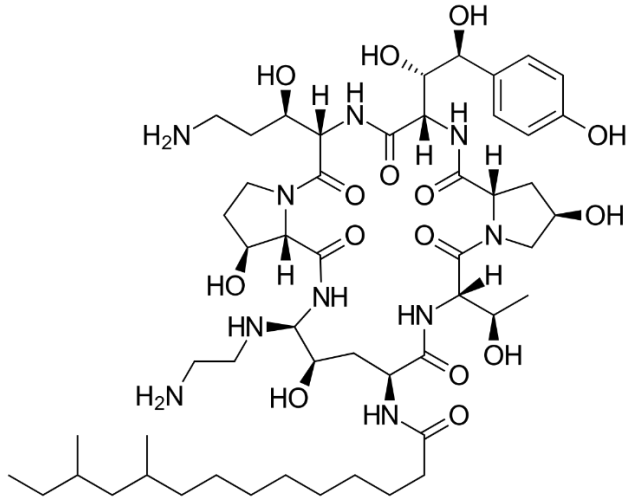
Levodropropizin



Budesonid



Linezolid



Kaspofungin diasetat

Şekil 3.1 MPO enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılan moleküller

3.3. MPO Enzimi Üzerine Sülfanilamid Türevlerinin İnhibisyon Çalışmaları

MPO enzimi üzerine ligand olarak kullanılması planlanmış Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat molekülleri için inhibisyon kinetiklerine bakılmıştır. Bu amaçla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek IC_{50} ve K_i (Antagonistin disosiyasyon sabitesi) değerleri ve inhibisyon tipleri ilk defa çalışılmıştır. Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid ve Kaspofungin diasetat molekülleri MPO enzimin K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

IC_{50} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat moleküllerinin O-dianisidin substratına bağlı olarak % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilmiştir. K_i değerlerinin tespit edilmesi ve inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla, oda sıcaklığında optimum pH değerinde 5 farklı O-dianisidin substrat konsantrasyonunda ve her bir Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat molekülleri için 3 farklı sabit konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bu aktivite değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i değerleri bulunmuştur.

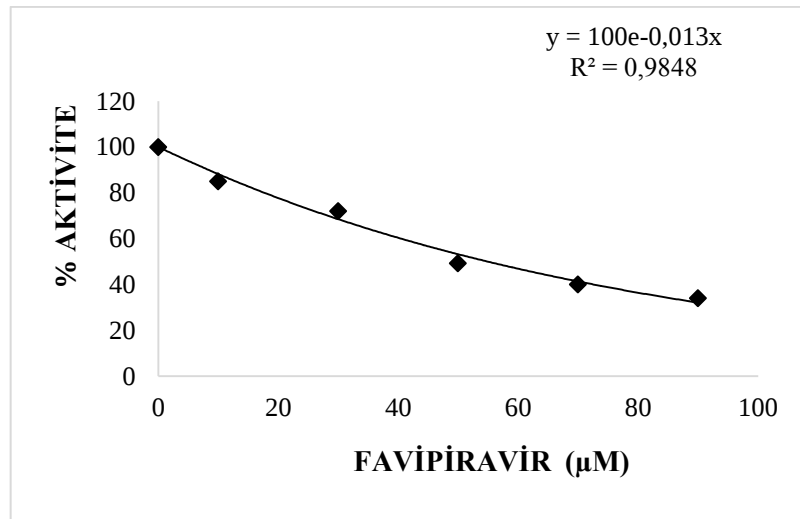
4. BULGULAR

4.1. Miyeloperoksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Favipiravir MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.1 Favipiravir MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

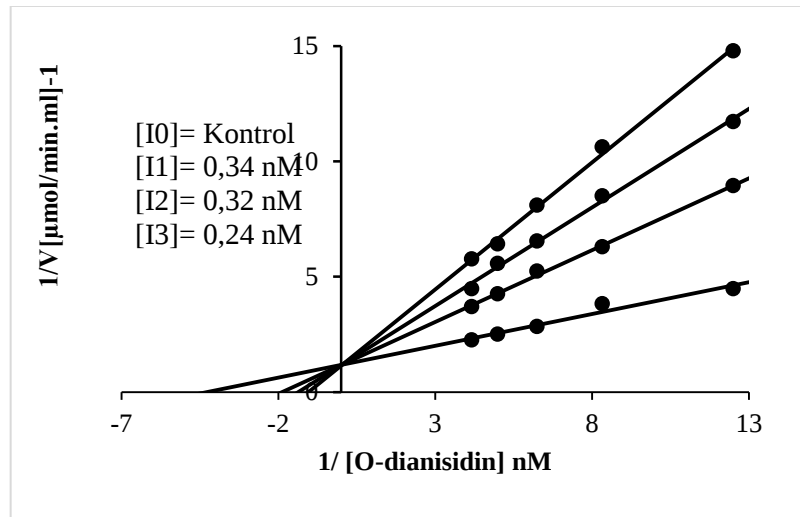
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	
Favipiravir	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,39	0,1	0,01	1,5	1,0	0,34	0,1	0,01	0,05	85
	1,5	1,0	0,37	0,1	0,03	1,5	1,0	0,33	0,1	0,03	0,05	72
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	49,2 1
	1,5	1,0	0,33	0,1	0,07	1,5	1,0	0,28	0,1	0,07	0,05	40
	1,5	1,0	0,31	0,1	0,09	1,5	1,0	0,26	0,1	0,09	0,05	34



Şekil 4.1 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Favipiravir ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.2 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Favipiravir için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,37	0,1	0,03	0,50	1,0	1,32	0,1	0,03	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,12	0,1	0,03	0,75	1,0	1,07	0,1	0,03	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,87	0,1	0,03	1,00	1,0	0,82	0,1	0,03	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,62	0,1	0,03	1,25	1,0	0,57	0,1	0,03	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,37	0,1	0,03	1,50	1,0	0,32	0,1	0,03	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,05	0,75	1,0	1,05	0,1	0,05	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,05	1,00	1,0	0,80	0,1	0,05	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,05	1,25	1,0	0,55	0,1	0,05	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,35	0,1	0,05	1,50	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,33	0,1	0,07	0,50	1,0	1,28	0,1	0,07	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,08	0,1	0,07	0,75	1,0	1,03	0,1	0,07	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,83	0,1	0,07	1,00	1,0	0,78	0,1	0,07	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,58	0,1	0,07	1,25	1,0	0,53	0,1	0,07	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,33	0,1	0,07	1,50	1,0	0,28	0,1	0,07	0,05	0,4



Şekil 4.2 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Favipiravir eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

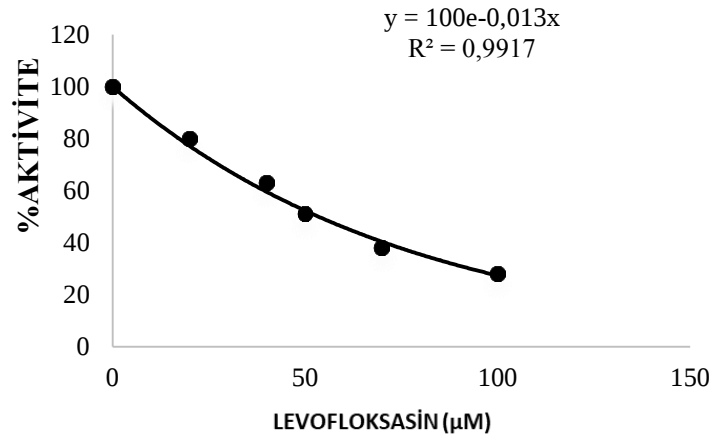
Tablo 4.3 MPO enzimini üzerine Favipiravir inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μ M)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Favipiravir	53,31	$\pm 0,30$	Yarışmalı

4.1.2. Levofloksasin MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.4 Levofloksasin MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

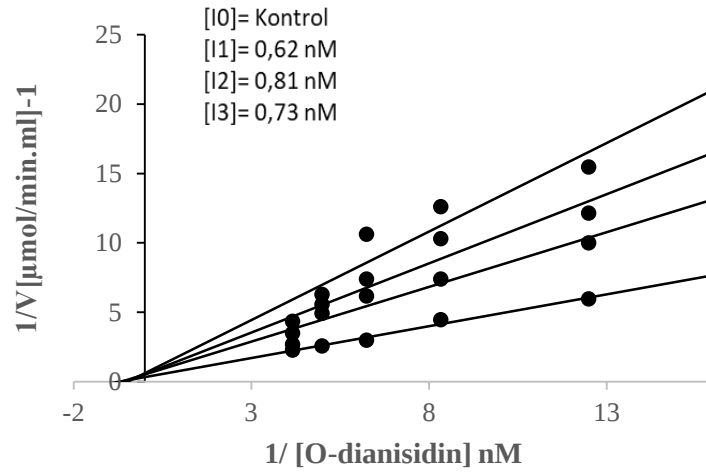
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	
Levofloksasin	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,38	0,1	0,02	1,5	1,0	0,33	0,1	0,02	0,05	80
	1,5	1,0	0,36	0,1	0,04	1,5	1,0	0,31	0,1	0,04	0,05	63
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	51
	1,5	1,0	0,33	0,1	0,07	1,5	1,0	0,28	0,1	0,07	0,05	38
	1,5	1,0	0,30	0,1	0,1	1,5	1,0	0,25	0,1	0,1	0,05	28



Şekil 4.3 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Levofloksasin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.5 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Levofloksasin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,38	0,1	0,02	0,50	1,0	1,33	0,1	0,02	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,13	0,1	0,02	0,75	1,0	1,08	0,1	0,02	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,88	0,1	0,02	1,00	1,0	0,83	0,1	0,02	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,63	0,1	0,02	1,25	1,0	0,58	0,1	0,02	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,38	0,1	0,02	1,50	1,0	0,33	0,1	0,02	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,05	0,75	1,0	1,05	0,1	0,05	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,05	1,00	1,0	0,80	0,1	0,05	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,05	1,25	1,0	0,55	0,1	0,05	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,35	0,1	0,05	1,50	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,30	0,1	0,1	0,50	1,0	1,25	0,1	0,1	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,05	0,1	0,1	0,75	1,0	1,0	0,1	0,1	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,80	0,1	0,1	1,00	1,0	0,75	0,1	0,1	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,55	0,1	0,1	1,25	1,0	0,5	0,1	0,1	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,33	0,1	0,1	1,50	1,0	0,3	0,1	0,1	0,05	0,4



Şekil 4.4 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Levofloksasin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

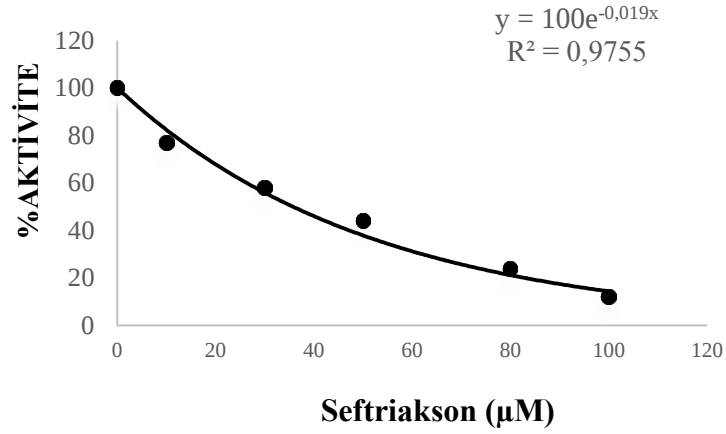
Tablo 4.6 MPO enzimini üzerine Levofloksasin inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Levofloksasin	53,31	± 0,73	Yarışmasız

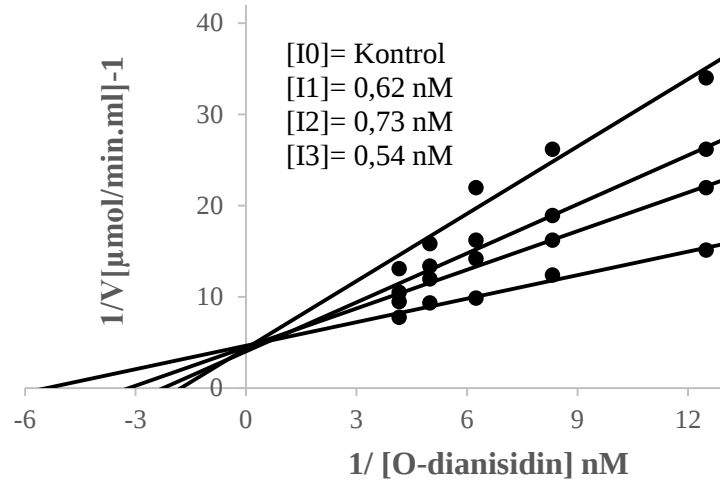
4.1.3. Seftriakson MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.7 Seftriakson MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

İnhibitör	Kör Tüpü					İnhibitör	Numune Tüpü					%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)		O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)
Seftriakson	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,39	0,1	0,01	1,5	1,0	0,33	0,1	0,01	0,05	77
	1,5	1,0	0,37	0,1	0,03	1,5	1,0	0,31	0,1	0,03	0,05	58
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	44
	1,5	1,0	0,32	0,1	0,08	1,5	1,0	0,28	0,1	0,08	0,05	24
	1,5	1,0	0,30	0,1	0,1	1,5	1,0	0,25	0,1	0,1	0,05	12



Şekil 4.5 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Seftriakson ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu



Şekil 4.6 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Seftriakson eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

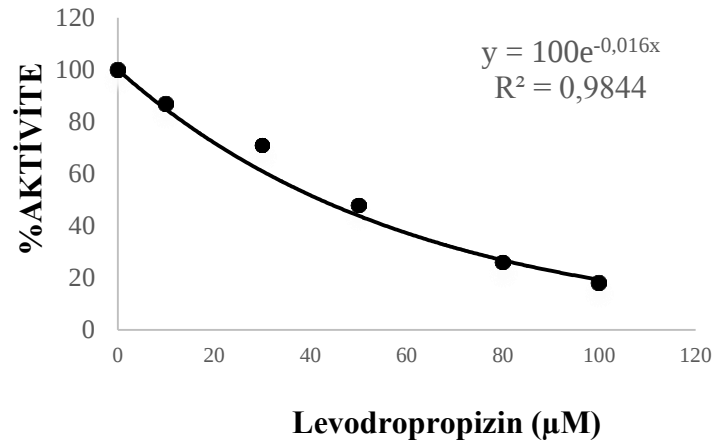
Tablo 4.8 MPO enzimini üzerine Seftriakson inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Seftriakson	36,48	± 0,63	Yarışmalı

4.1.4. Levodropropizin MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.9 Levodropropizin MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

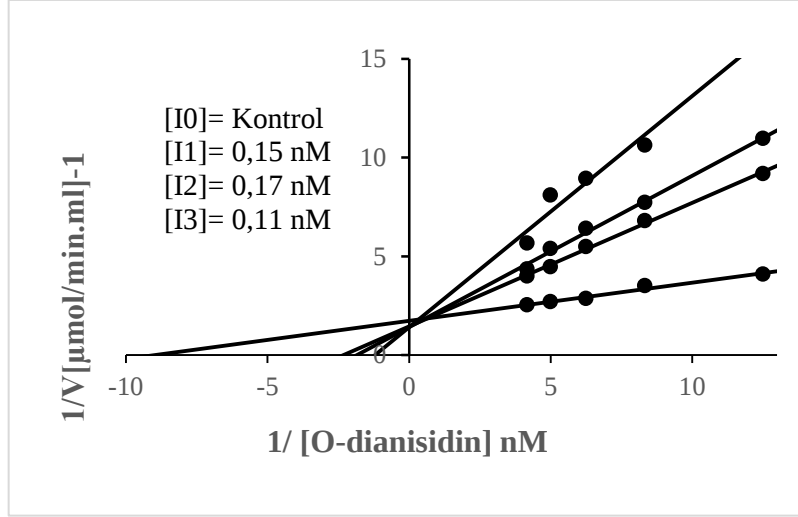
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	
Levodropropizin	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,39	0,1	0,01	1,5	1,0	0,34	0,1	0,01	0,05	85
	1,5	1,0	0,37	0,1	0,03	1,5	1,0	0,33	0,1	0,03	0,05	72
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	49,21
	1,5	1,0	0,32	0,1	0,08	1,5	1,0	0,27	0,1	0,08	0,05	40
	1,5	1,0	0,30	0,1	0,1	1,5	1,0	0,25	0,1	0,1	0,05	34



Şekil 4.7 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Levodropropizin ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.10 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Levodropropizin için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,36	0,1	0,02	0,50	1,0	1,31	0,1	0,02	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,13	0,1	0,02	0,75	1,0	1,08	0,1	0,02	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,88	0,1	0,02	1,00	1,0	0,83	0,1	0,02	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,63	0,1	0,02	1,25	1,0	0,58	0,1	0,02	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,38	0,1	0,02	1,50	1,0	0,33	0,1	0,02	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,35	0,1	0,04	0,50	1,0	1,30	0,1	0,04	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,04	0,75	1,0	1,05	0,1	0,04	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,04	1,00	1,0	0,80	0,1	0,04	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,04	1,25	1,0	0,55	0,1	0,04	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,35	0,1	0,04	1,50	1,0	0,30	0,1	0,04	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,32	0,1	0,08	0,50	1,0	1,27	0,1	0,08	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,07	0,1	0,08	0,75	1,0	1,02	0,1	0,08	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,82	0,1	0,08	1,00	1,0	0,77	0,1	0,08	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,57	0,1	0,08	1,25	1,0	0,53	0,1	0,08	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,32	0,1	0,08	1,50	1,0	0,27	0,1	0,08	0,05	0,4



Şekil 4.8 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Levodropropizin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

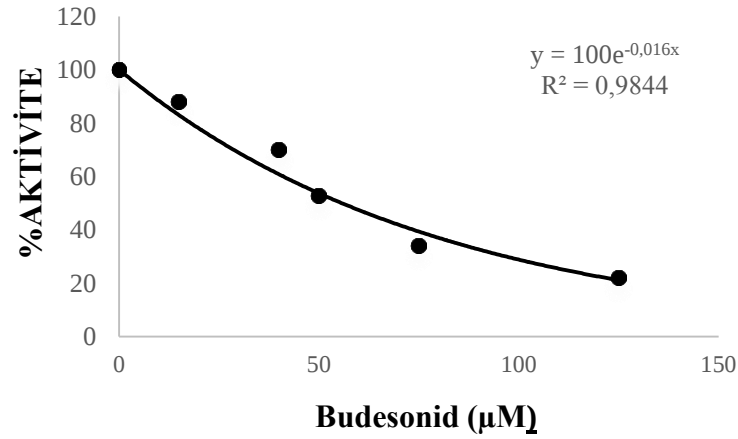
Tablo 4.11 MPO enzimini üzerine Levodropropizin inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC_{50} (μM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Levodropropizin	43,32	$\pm 0,14$	Yarışmalı

4.1.5. Budesonid MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.12 Budesonid MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

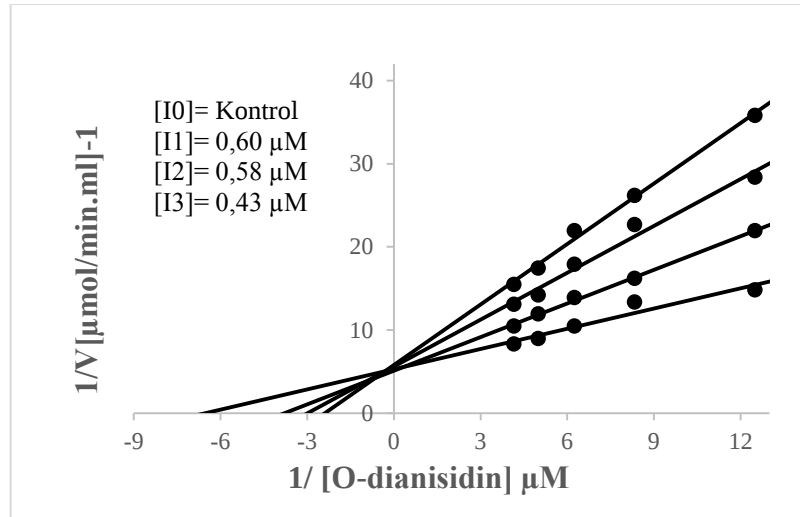
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	%Aktivite
Budesonid	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,35	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,385	0,1	0,015	1,5	1,0	0,335	0,1	0,015	0,05	88
	1,5	1,0	0,36	0,1	0,04	1,5	1,0	0,31	0,1	0,04	0,05	70
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	53
	1,5	1,0	0,325	0,1	0,075	1,5	1,0	0,285	0,1	0,075	0,05	34
	1,5	1,0	0,275	0,1	0,125	1,5	1,0	0,225	0,1	0,125	0,05	22



Şekil 4.9 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Budesonid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.13 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Budesonid için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,36	0,1	0,02	0,50	1,0	1,31	0,1	0,02	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,13	0,1	0,02	0,75	1,0	1,08	0,1	0,02	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,88	0,1	0,02	1,00	1,0	0,83	0,1	0,02	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,63	0,1	0,02	1,25	1,0	0,58	0,1	0,02	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,38	0,1	0,02	1,50	1,0	0,33	0,1	0,02	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,35	0,1	0,04	0,50	1,0	1,30	0,1	0,04	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,04	0,75	1,0	1,05	0,1	0,04	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,04	1,00	1,0	0,80	0,1	0,04	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,04	1,25	1,0	0,55	0,1	0,04	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,35	0,1	0,04	1,50	1,0	0,30	0,1	0,04	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,30	0,1	0,07	0,50	1,0	1,25	0,1	0,07	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,05	0,1	0,07	0,75	1,0	1,0	0,1	0,07	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,80	0,1	0,07	1,00	1,0	0,75	0,1	0,07	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,55	0,1	0,07	1,25	1,0	0,5	0,1	0,07	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,33	0,1	0,07	1,25	1,0	0,3	0,1	0,07	0,05	0,4



Şekil 4.10 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Budesonid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

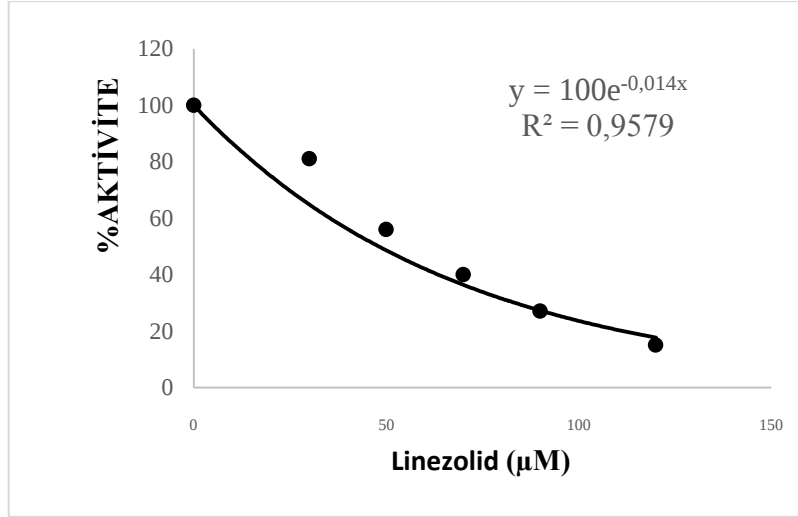
Tablo 4.14 MPO enzimini üzerine Budesonid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon türü
Budesonid	43,32	± 0,54	Yarışmalı

4.1.6. Linezolid MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.15 Linezolid MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

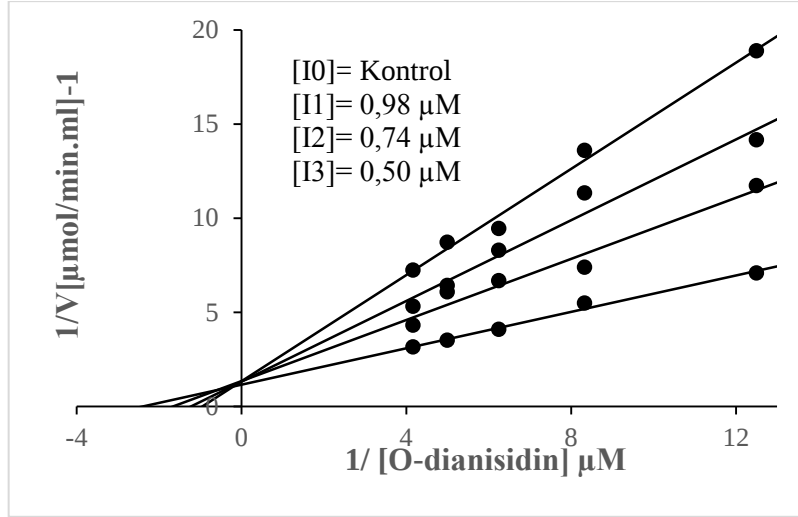
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	
Linezolid	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,39	0,1	0,01	1,5	1,0	0,34	0,1	0,01	0,05	85
	1,5	1,0	0,37	0,1	0,03	1,5	1,0	0,33	0,1	0,03	0,05	72
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	49,2 1
	1,5	1,0	0,33	0,1	0,07	1,5	1,0	0,28	0,1	0,07	0,05	40
	1,5	1,0	0,31	0,1	0,09	1,5	1,0	0,26	0,1	0,09	0,05	34



Şekil 4.11 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Linezolid ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.16 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Linezolid için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,37	0,1	0,03	0,50	1,0	1,32	0,1	0,03	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,12	0,1	0,03	0,75	1,0	1,07	0,1	0,03	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,87	0,1	0,03	1,00	1,0	0,82	0,1	0,03	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,62	0,1	0,03	1,25	1,0	0,57	0,1	0,03	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,37	0,1	0,03	1,50	1,0	0,32	0,1	0,03	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,05	0,75	1,0	1,05	0,1	0,05	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,05	1,00	1,0	0,80	0,1	0,05	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,05	1,25	1,0	0,55	0,1	0,05	0,05	0,48
	1,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,30	0,1	0,07	0,50	1,0	1,25	0,1	0,07	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,05	0,1	0,07	0,75	1,0	1,0	0,1	0,07	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,80	0,1	0,07	1,00	1,0	0,75	0,1	0,07	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,55	0,1	0,07	1,25	1,0	0,5	0,1	0,07	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,33	0,1	0,07	1,50	1,0	0,3	0,1	0,07	0,05	0,4



Şekil 4.12 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Linezolid eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

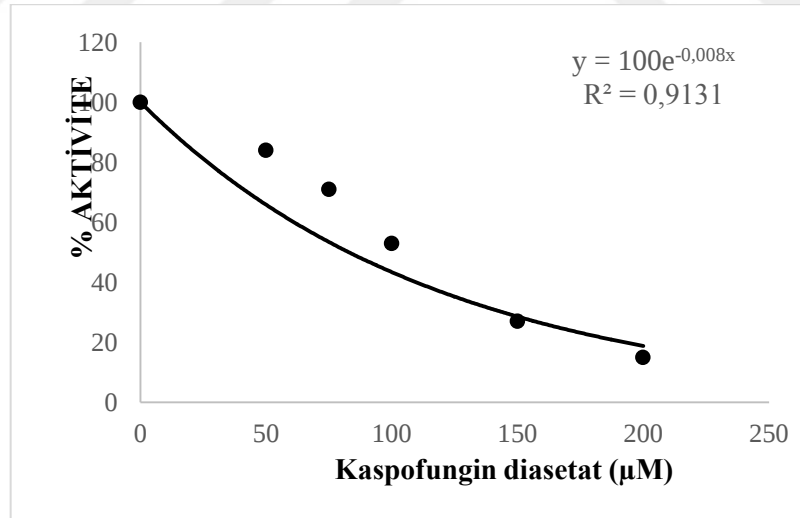
Tablo 4.17 MPO enzimini üzerine Linezolid inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon türü
Linezolid	43,51	± 0,74	Yarışmalı

4.1.7. Kaspofungin diasetat MPO Üzerine O-dianisidin Substratıyla Yapılan Kinetik Çalışmalar

Tablo 4.18 Kaspofungin diasetat MPO üzerine O-dianisidin substratıyla yapılan % Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

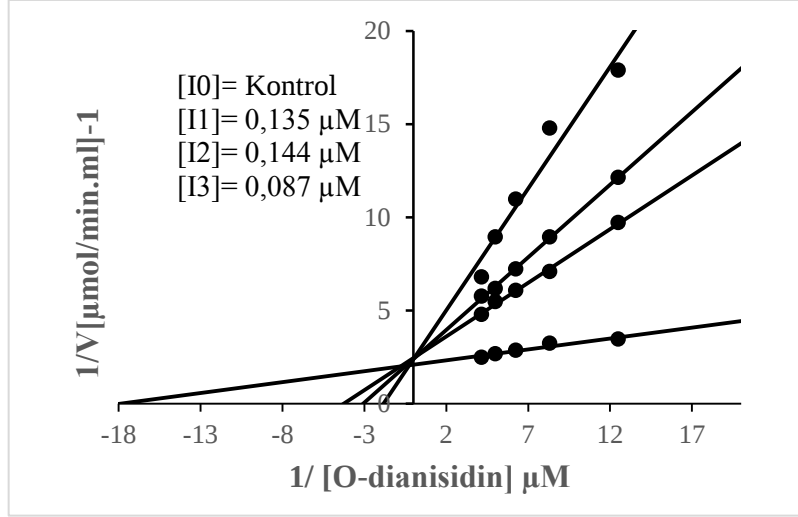
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						%Aktivite
	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	
Favipiravir	1,5	1,0	0,4	0,1	-	1,5	1,0	0,85	0,1	-	0,05	100
	1,5	1,0	0,39	0,1	0,01	1,5	1,0	0,34	0,1	0,01	0,05	85
	1,5	1,0	0,37	0,1	0,03	1,5	1,0	0,33	0,1	0,03	0,05	72
	1,5	1,0	0,35	0,1	0,05	1,5	1,0	0,30	0,1	0,05	0,05	49,21
	1,5	1,0	0,33	0,1	0,07	1,5	1,0	0,28	0,1	0,07	0,05	40
	1,5	1,0	0,31	0,1	0,09	1,5	1,0	0,26	0,1	0,09	0,05	34



Şekil 4.13 MPO enzimi için O-dianisidin substratına bağlı olarak Kaspofungin diasetat ile elde edilen % Aktivite-Konsantrasyonu

Tablo 4.19 MPO enzimi için O-dianisidin substratı ile Kaspofungin diasetat için elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

	Kör Tüpü					Numune Tüpü						
İnhibitör	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	O-dianisidin (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Fosfat Tamp(ml)	H ₂ O ₂ (ml)	İnhibitör (ml)	MPO (ml)	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	0,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,10	0,1	0,05	0,75	1,0	1,05	0,1	0,05	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,85	0,1	0,05	1,00	1,0	0,80	0,1	0,05	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,60	0,1	0,05	1,25	1,0	0,55	0,1	0,05	0,05	0,48
	1,50	1,0	1,35	0,1	0,05	0,50	1,0	1,30	0,1	0,05	0,05	0,4
[I] ₂	0,50	1,0	1,32	0,1	0,08	0,50	1,0	1,27	0,1	0,08	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,07	0,1	0,08	0,75	1,0	1,02	0,1	0,08	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,82	0,1	0,08	1,00	1,0	0,77	0,1	0,08	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,57	0,1	0,08	1,25	1,0	0,52	0,1	0,08	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,32	0,1	0,08	1,50	1,0	0,27	0,1	0,08	0,05	0,4
[I] ₃	0,50	1,0	1,25	0,1	0,15	0,50	1,0	1,20	0,1	0,15	0,05	1,2
	0,75	1,0	1,00	0,1	0,15	0,75	1,0	0,95	0,1	0,15	0,05	0,8
	1,00	1,0	0,75	0,1	0,15	1,00	1,0	0,70	0,1	0,15	0,05	0,6
	1,25	1,0	0,50	0,1	0,15	1,25	1,0	0,45	0,1	0,15	0,05	0,48
	1,50	1,0	0,25	0,1	0,15	1,50	1,0	0,20	0,1	0,15	0,05	0,4



Şekil 4.14 MPO enzimi için O-dianisidin substratıyla Kaspofungin diasetat eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Tablo 4.20 MPO enzimini üzerine Kaspofungin diasetat inhibitörünün inhibisyon etkisi

İnhibitör	IC_{50} (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon türü
Kaspofungin diasetat	86,64	$\pm 0,122$	Yarışmalı

Tablo 4.21 MPO enzimini üzerine tez kapsamında çalışılan inhibitörlerin kinetik çalışması sonuçları

İnhibitör	IC₅₀ (μM)	Ortalama K_i (nM)	Standart sapma	İnhibisyon türü
Favipiravir	53,31	0,30	0,050	Yarışmalı
Levofloksasin	53,31	0,73	0,099	Yarışmasız
Seftriakson	36,48	0,63	0,099	Yarışmalı
Levodropropizin	43,32	0,14	0,030	Yarışmalı
Budesonid	43,32	540	0,090	Yarışmalı
Linezolid	43,51	740	0,242	Yarışmalı
Kaspofungin diasetat	86,64	112	0,031	Yarışmalı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sülfamat bileşikleri, sülfon grubuna ait bir amino ve bir -OR grubunun bağlı olduğu biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Hartwig, 1998). İhtiva ettikleri bu gruplar ilaç olma özelliği kazandırmakta ve günümüzde anti-kanser tedavisinde, antienflamatuar, antibakteriyel, antiviral vb. kullanılan ilaçların yapılarında bulunduğu bilinmektedir (Goddard-Borger ve Stick, 2007; Usanmaz ve Atmaca, 2020).

Bu sebeple sülfamat bileşikleri hem sentetik farmasötik kimya alanında hem de kullanım alanları bakımından mekanistik organik kimya alanında oldukça önemli bir yere sahiptirler (Daryadel vd., 2018). Bununla birlikte, sülfamat türevi bileşikler MPO enzim aktivitesi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada MPO üzerine bu maddelerin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

MPO aktivitesi ve oksidan ürünleri, nörodejeneratif bozukluklar, kanser oluşumu, romatoid artrit, böbrek ve solunum yolu hastalıkları, diyabetes mellitus, sepsis ve ateroskleroz gibi bir dizi hastalığın inflammatuar olaylarının başlatılması ve ilerlemesinde rol oynamaktadır.

MPO'nun eylemlerinin açıkça çelişkili doğası hem konak savunmasındaki çift rolünü hem de inflammatuar doku hasarı potansiyelini vurgular, bu da onu çeşitli patolojik durumlarda önemli bir faktör haline getirir. (Tay ve Tamam, 2013).

MPO enzimi sadece nötrofillerde ve monositlerde bulunmaktadır (Arnhold, 2004). MPO'nun antimikrobiyal özelliğinin hipoklorür asidi ve diğer toksik ajanların üretiminden kaynaklandığı ve bunun da nötrofil fagolisosomlarının içindeki mikrop inhibisyonu veya öldürücü özelliği yaratan ortamı oluşturuğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır.

Vücuttaki toksisite desteği ile tirozil radikali oluşumu, klorlandırma, tirozin peroksid üretimi ve serum lipoproteinlerinin oksidasyonu gibi MPO-katalizli modifikasyonlarının varlığı bilinmektedir.

MPO pek çok hastalığın oluşumuyla ilgili bilgi sağlamakta, bu hastalıkların önlenmesinde, tanı ve tedavisinde görev almaktadır (Fiedler vd. 2000).

Bu çalışmada K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla; O-dianisidin kullanılarak optimum pH değerinde ve optimum sıcaklıkta 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçülmüştür. Bu yöntem O-dianisidin kromojenik

substratın H_2O_2 tarafından yükseltgenmesi ve oluşan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 460 nm’de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Kromatografik işlemler sonucunda elde edilen elüatlarda MPO enziminin aktivitesinin belirlenmesinde bu yöntemin tercih edilmesinin sebebi, literatürde enzimin bilinen en iyi substratı olması ve molar ekstinksiyon katsayısının literatürde verilmesidir ($\epsilon_{460nm}=11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Bu çalışmada MPO enzimi üzerine Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat inhibitörleri için detaylı kinetik çalışma yapılmıştır. O-dianisidin substratına bağlı olarak inhibisyon etkisini incelemek amacıyla, doygun olmayan O-dianisidin reaksiyon ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitör ilave edilerek aktivite değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerlerle % Aktivite- Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulunmuştur. MPO için elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri Favipiravir için; 53,31 μM , Levofloksasin için; 53,31 μM , Seftriakson için; 36,48 μM , Levodropropizin için; 43,32 μM , Budesonid için; 43,32 μM , Linezolid için; 43,51 μM , Kaspofungin diasetat için; 86,64 μM olarak bulunmuştur.

MPO enzimi için 5 farklı O-dianisidin substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak, inhibitör konsantrasyonları üzerine Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon çeşitleri ve K_i değerleri bulunmuştur.

MPO için bu grafikler Şekil 10.’dan Şekil 23.’e kadar gösterilmiştir. Tablo 1’den 21’e kadar olan tablolarda görüldüğü gibi, Favipiravir için 0,30 nM, Levofloksasin için 0,73 nM, Seftriakson için 0,63 nM, Levodropropizin için 0,14 nM, Budesonid için 540 nM, Linezolid için 740 nM, Kaspofungin diasetat için 112 nM ortalama K_i bulunmuştur.

Levofloksasin yarışmasız diğer moleküller yarışmalı inhibisyon göstermiştir. Bu çalışmada özellikle Levodropropizin nanomolar seviyede inhibisyon göstermesi, MPO enziminin güçlü inhibitörü olduğunu göstermiştir. Böylece moleküllerin detaylı kinetik parametreleri K_i , IC_{50} ve inhibisyon tipleri de ilk kez tespit edilmiştir.

Tez kapsamında MPO enziminin yeni inhibitörleri bulunmuş ve bu moleküllerin nano molar seviyede inhibe ederek bu enzimlerin güçlü inhibitörleri olduğunu göstermiştir. Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetat bu moleküller üzerine ilk defa MPO enzimlerinin kinetik çalışması yapılmıştır.

MPO enzimi, lökoferez ile elde edilen insan lökositlerinden saflaştırıldıktan sonra kinetik özellikleri belirlenmiştir. Miyeloperoksidaz enzimi hakkında yapılan araştırmaların çoğu, hastalıkların patogeneziindeki rolüne odaklanmaktadır ve miyeloperoksidazın tedavi amaçlı kullanımı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Favipiravir içeren ilaçlar, yeni veya yeniden ortaya çıkan influenza tipi virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda, diğer influenza virüs enfeksiyonlarına karşı kullanılan ilaçların yetersiz veya etkisiz kaldığı durumlarda kullanılır. SARS hastalığı için kullanılan bir ilaç ham maddesidir. Günümüzde ise COVID-19 hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır.

Levofloksasin içeren ilaçlar, bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Akciğer, sinüs, deri ve idrar yolu enfeksiyonunun tedavisinde kullanılır.

Seftriakson içeren ilaçlar, bakterilerin tam olarak gelişimini durdurmada etkilidir. Bakterilerin yol açtığı tüm hastalıkların tedavisinde özellikle akciğer enfeksiyonlarında kullanılır.

Levodropropizin içeren ilaçlar, öksürüğün giderilmesinde kullanılır.

Budesonid içeren ilaçlar, akciğerdeki iltihabı azaltmak için ve solunum yollarını açık tutarak astım belirtilerini azaltır.

Linezolid içeren ilaçlar, zatürre ve deri üzerindeki veya deri altındaki bazı enfeksiyonların tedavisi için kullanılır.

Kaspofungin diasetat içeren ilaçlar ise dokularda veya organlarda bulunan ciddi fungal enfeksiyonlarda kullanılır.

Buradan yola çıkarak şu ana kadar bu kapsamda yapılmayan, çoğunlukla akciğer hastalıklarının tedavi edilmesinde önemli etkiye sahip ilaçların etken maddeleri olan Favipiravir, Levofloksasin, Seftriakson, Levodropropizin, Budesonid, Linezolid, Kaspofungin diasetatın MPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi ilk kez incelenmiştir.

Seçilen bu ilaç etken maddelerinin akciğerden saflaştırılan enzim olan MPO üzerine yapılan kinetik çalışma sonuçları akciğer hastalıklarında kullanılan ilaçların kullanım dozajlarının ayarlamasında önemli bir şekilde katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L. (2000). Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 275, 5425-5430. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5425>
- Ahmadova, G. (2019). N-Metilmorfolin Betain Fosfat Molekülünün Geometrik, Elektronik ve Spektroskopik Özelliklerinin Teorik Olarak İncelenmesi (Yayın No. 546455) [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi]
- Albrich, J.M., McCarthy, C.A., Hurst, J.K. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci*, 78, 210-214. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.210>
- Alkaya, E. (2022). Farklı Tuzlardan Elde Edilen Hipokloröz Asitin Keratinosit ve Fibroblast Hücrelerine Etkisi [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi] <https://hdl.handle.net/11499/45787>
- Allegra, M., Furtmüller, P.G., Regelsberger, G. (2001). Mechanism of reaction of melatonin with human myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(2), 380-386. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4582>
- Altınışık M.(2009). Proteinler 1, [PowerPoint slides]. <https://slideplayer.biz.tr/slide/2795820/>
- Arnhold, J. (2004). Properties, Functions and Secretion of Human Myeloperoxidase. *Biochemistry* (Moskova), 69, 4-9. <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000016344.59411.ee>
- Barrett, N.E., Grendison, A.S., Lewis, M.J (1999). Contribution of the lactoperoxidase systto the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 73-80. <https://doi.org/10.1017/S0022029998003252>
- Bartonek-Roxa, E., Ericksson, H., Mattiasson, B. (1991). The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et biophysica açta (BBA)*, 1088(2), 245-250. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90060-Y](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90060-Y)
- Başaran, Y. (2007). Miyeloperoksidaz Enziminin Lösemi Tedavisinde Kullanılan Doksorubisine Etkisinin İncelenmesi (Yayın No. 213337) [Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi]
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2014). *Biyokimya*. Palme Yayıncılık, <https://palmekitabevi.com/Biyokimya-6>
- Bingöl, G. (1977). Vitaminler ve Enzimler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi*, <https://docplayer.biz.tr/888333-Ankara-universitesi-eczacilik-fakultesi-yayinlari-ders-kitabi-serisi-no-46-pr.html>
- Biswanger, H.(2014). *Interfaculty Institute for Biochemistry*. University of Tübingen.
- Booth, K.S., Kimura, S., Lee, H.C., Ikeda-Saito, M., Caughey, W.S. (1989). Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity binding site for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160(2), 879-902. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92519-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92519-9)
- Cansaran, D. (2018). Enzim Aktivite Tayinleri. [PowerPoint slides]. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/189452/mod_resource/content/1/Fungus%2011.%20hafta.pdf
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R. (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevleri.

- Çetintaş, D. (2011). Suprarenal Kros Klemp Altında Gerçekleştirilen Abdominal Aort Cerrahisinde, İskemik Önkoşullanmanın Ve Karnitinin Böbrek İskemi-reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkisinin, Rat Modelinde Araştırılması. (Yayın No. 298774) [Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi]
- Daniel, R., Rao, L.D., Mona, I.C. (1997). Identification of colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem.*, 250(1), 10-17. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2191>
- Daryadel S, Atmaca U, Taslimi P, Gulcin I, Celik M. (2018). Novel sulfamate derivatives of menthol: Synthesis, characterization, and cholinesterases and carbonic anhydrase enzymes inhibition properties. *Archiv Der Pharmazie*, 351(11). <https://doi.org/10.1002/ardp.201800209>
- Davies, KJ. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61, 1–31. <https://doi.org/10.1042/bss0610001>
- Davies, M.J., Hawkins, C.L., Pattison, D.I., Rees, M.D. (2008). Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid Redox Sig*, 10(7), 1199-1234. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.192>
- Devocioğlu, L. (2009). İnsan Lökosit Myeloperoksidazının Saflaştırılması. (Yayın No. 243212) [Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi]
- Develioğlu, H., Taner, L. (2012). Myeloperoksidazın özellikleri ve periodontal hastalığındaki önemi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 22(3), 306-316. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/27203>
- Doerge, D.R. (1986). Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogenes. *Biochemistry*, 16, 4724-4728. <https://doi.org/10.1021/bi00364a041>
- Doumonted, C., Rousset B. (1983). Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *J. Biological Chem*, 258(23), 14166-14172. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)43839-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43839-7)
- Duarte-Vazquez, M.A., García-Almendarez, B., Regalado, C., Whitaker, J.R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var *esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1574–1579. <https://doi.org/10.1021/jf990454j>
- Elagamy, E., Ruppanner, R., Ismail, A., Champagne, C.P., Assal, R. (1992). Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 169-175. <https://doi.org/10.1017/S0022029900030417>
- Erkuş, L., Yüce, K. (27 Ağustos – 1 Eylül 2012). Yıldızların Spektrofotometrisi. [Kongre Sunumu] <https://kitap.uak.info.tr/2012/2012UAK..2012..533E>.
- Ersoy, D. (2003). *Türkiye Klinikleri Biyokimya Ders Notları*, Türkiye Klinikleri.
- Ersoy, O. (2012). Karaciğer Enzim Yüksekliğinin Değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 12(3), 129-135. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/19757>
- Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. (2000). “X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoksidase at 1.8 Å Resolution”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11964–11971. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11964>
- Frič, F. (1976). Oxidative enzymes. *Physiological plant pathology*, Springer Berlin Heidelberg, (4), 617-631. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66279-9_22
- Fry, S.C. (1986). Cross-Linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Plant Biology*, 37, 165-186. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.37.060186.001121>

- Galijasevic, S., I., Abdulhamid, Abu-Soud, H.M. (2008). Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase . *Biochemistry*, 47 (8), 2668–2677. <https://doi.org/10.1021/bi702016q>
- Gilbert, H.F. (1992). *Basic concepts in biochemistry*. Mc Graw-Hill Inc. Germany.
- Goddard-Borger ED, Stick RV. (2007). An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Organic Letters*, 9(19), 3797-800. <https://doi.org/10.1021/ol701581g>
- Gülçin, İ., Kireci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O. (2010). Antioxidant and Antimicrobial Activities of an Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(2), 175-188. <https://doi.org/10.3906/biy-0806-7>
- Haddain, M.S., İbrahim, S.A., Robinson, R.K. (1996). Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7(3), 149-152. [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(96\)00023-0](https://doi.org/10.1016/0956-7135(96)00023-0)
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, 22-85.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *The Journal of The American Society of Hematology*, 92(9), 3007-3017. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.9.3007>
- Harris, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.*, 6(9), 2675-2683. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.9.1612291>
- Hartwig JF. (1998). Carbon-heteroatom bond-forming reductive eliminations of amines, ethers, and sulfides. *Accounts of Chemical Research*, 31(12), 852-60. <https://doi.org/10.1021/ar970282g>
- Hiraga, S., Sasaki, K. (2001). A large family of class-III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 42(5), 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Hussain, S., Slikker, W., Ali, S. F. (1995). Age related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different region of Mouse brain. *Int.J. Devl. Neuroscience*. 13(8), 811-817. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(95)00071-2)
- Huystee, R. V. (1987). Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annual review of plant physiology*, 38(1), 205-219. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.38.060187.001225>
- Jacob, B.M., Monoj, N.K., and Haridas, M. (1998). Antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. *Indian J. Exp. Biology*. 36(8), 808-810. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9838883/>
- Jucaite, A., Svenningsson, P., Rinne, J.O. (2015). Effect of the myeloperoxidase inhibitor AZD3241 on microglia: a PET study in Parkinson's disease Brain. 138(9), 2687-2700. <https://doi.org/10.1093/brain/awv184>
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2000). Biyokimya, *Aktif Yayınları*.
- Keleş, F. (1986). Gıda İşlemede Peroksidazlar. 11(2). <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/77625>
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1988). Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem J*, 252(2), 529-536. <https://doi.org/10.1042/bj2520529>
- Kirmit A. , Işık M. (2020). Serum Katalaz, Miyeloperoksidaz ve Paraoksonaz 1 Üzerine Bazı Bitki Ekstraktlarının In Vitro Etkisi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(1), 127-132. <https://doi.org/10.35440/hutfd.686810>

- Klebanoff, S.J. (1968). Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of Bacteriology*; 95(6), 2131-2138. <https://doi.org/10.1128%2Fjb.95.6.2131-2138.1968>
- Korkmaz, H., Tinkılıç, N., Güder, A., Özen, T. (2012). *Biyokimya-1*. On Dokuz Mayıs Üni.Yayınları No:138
- Köse, E. (2015). Yapısında Birden Fazla Fonksiyonu Barındıran Hetero Nano-enzim Yapılar Ve Elisa Uygulamaları. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. (Yayın No. 386852) [Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Üniversitesi]
- Kumar, R., Bhatla, K.L. (1995). Purification, crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of lactoperoxidase from buffalo milk. *Acta Cryst*, D51, 1094-1096. <https://doi.org/10.1107/S0907444995004422>
- Kussendrager, K.D., van Hooijdonk, A.C.M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84(21), 19-25. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002208>
- Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Liu, J.R. (1996). Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry*, 43(3), 565-568. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00315-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00315-9)
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). *Principles of biochemistry* .Palme Yayıncılık.
- Metodiewa, D., Reszka, K., and Dunfurd H.B., 1989. Oxidation of the substituted catechols dihydroxyphenylalanine methyl ester and trihydroxyphenylalanine by lactoperoxidase and its compounds. *Arch. Biochem. and Biophy*, 274(2), 601-608. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90475-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90475-X)
- Miyasaki, K.T., Zambon, J.J., Jones, C.A., Wilson, M.E. (1987). Role of high-avidity binding of human neutrophil myeloperoxidase in the killing of actinobacillus citinomycetemcomitans. *Infection and Immunity*; 55 (5). 1029-1036. <https://doi.org/10.1128/iai.55.5.1029-1036.1987>
- Morohashi, Y. (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany*, 53(374), 1643-1650. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf012>
- O'Brien, P.J. (2000). Peroxidases. *Chem Biol Interact*, 129(1-2), 113-39. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00201-5).
- Olsson, I., Bulow, E., Hansson, M. (2004). Biosynthesis and sorting of myeloperoxidase in hematopoietic cells. *Jpn J Infect Dis.*, 57(5), 13-4.
- Onur, C. (2019). İlaç numunelerinde amoksisilin spektrofotometrik tayini. (Yayın No. 574421) [Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Üniversitesi]
- Öztekin, A. (2019). Determination of some flavonoid derivatives inhibitory effect on bovine milk lactoperoxidase enzyme. *Turkish journal of science*, 4(1), 15-21. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/715247>
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*, 24(5), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Paul, K. G., Ohlsson, P. I. (1985). The lactoperoxidase system. *The Lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance*, 15-29.

- Podrez, E.A., Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L., 2008. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 28(12), 1717-2172. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00229-X)
- Prummel, M.F., Wiersinga, W.M. (2005). Hyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. *View in Scopus(Professor of Endocrinology and Head of Department)*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2004.11.003>
- Pütter, J., Becker, R. (1987). *Methods of Enzymatic Analysis: Peroxidases* Bergmeyer, third edition, VCH, New York, 286.
- Reiter, B., HaÈrnulv, G. (1984). Lactoperoxidase antibacterialsystem: natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*, 47(9), 724-732. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.9.724>
- Robert, K.M., Petter, A.M., Darly, K.G., Victor, W.R. (1993). *Harper'ın Biyokimyası*. Barış Kitabevi.
- Ruf, J., Carayon, P. (2006). Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*, 445 (2), 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.06.023>
- Sarkaratı, B. (2013). Lökosit Miyeloperoksidaz enziminin saflaştırılması, kinetik özellikleri ile reaktif türlerin oluşumundaki etkilerinin araştırılması. (Yayın No. 347884) [Yayınlanmış Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi]
- Set A. (2020). Koroner arter hastalığında serum myeloperoksidaz, prolidaz aktivitesi ve iskemi modifiye albümin (ima) düzeyinin belirlenmesi ve aralarındaki ilişkinin incelenmesi. (Yayın No. 632485) [Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi]
- Shindler, J.S., Bardsley, W.G. (1975). Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochem. and Biophys. Res. Comm*, 67(4), 1307-1312. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90169-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90169-2)
- Sisecioglu, M., Gulcin, I., Cankaya, M., Atasever, A., Ozdemir, H. (2010). The effects of norepinephrine on lactoperoxidase enzyme. *Scientific Research and Essays*, 5(11), 1351-1356. <https://www.researchgate.net/publication/228626665>
- Sözbilir Baysu, N., Baysu, N. (2008). *Enzimler*, Biyokimya, (1 Baskı), Öncü Basım Evi.
- Tay, A., Tamam, Y. (2013). Arşiv Kaynak Tarama Dergisi . *Archives Medical Review Journal*; 22(1), 1-11. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/25335>
- Thanabal, V., La Mar, G.N. (1989). A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. *Biochemistry*, 28(17), 7038-7044. <https://doi.org/10.1021/bi00443a039>
- Usanmaz, H., Atmaca, U. (2020). Laktoperoksidaz Enziminin Sülfamat Türevleri Bileşikleri Üzerine İnhibisyon Profili. *Avrupa Bilim Ve Teknoloji Dergisi*(20), 746-750. <https://doi.org/10.31590/ejosat.767395>
- Wakamatsu, K., Takahama, U. (1993). Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, 88(1), 167-171. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01774.x>
- Wright, J., Bastian, N., Davis, T.A., Zuo, C., Yoshimoto, S., Orme-Johnson, W.H., Tauber, A.I. (1990). Structural characterization of the isoenzymatic forms of human myeloperoxidase. *Evaluation of the Iron-Containing Prosthetic Group Blood*, 75, 238-241. <https://doi.org/10.1182/blood.V75.1.238.238>

- Yeşil, E., Cengiz, N., Acar, Ş. (2021). Türkiye’de COVID-19 Tedavisinde Kullanılan Ajanlar. *Sakarya Tıp Dergisi*, 11(2), 452-457. <https://doi.org/10.31832/smj.798697>
- Zederbauer, M., Furtmüller, P.G., Brogioni, S., Jakopitsch, C., Smulevichb, G., Obinger, C. (2006). Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Nat. Prod. Rep.*, 24(3), 571-584. <https://doi.org/10.1039/b604178g>



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nezaket ARSLANOĞLU

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Turgut Işık Sağlık Meslek Lisesi, 2010

Lisans : Atatürk Üniversitesi, Sağlık Yönetimi, 2019

Mesleki Deneyim

İşyeri : Sinop Atatürk Devlet Hastanesi, 2017-Halen