



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ASETİLKOLİNESTERAZIN FARKLI POLİMERİK YÜZEYLERE İMMOBİLİZE EDİLMESİ

KHADIJA KHALED ALI
(520615921)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Khadija Khaled Ali
“ASETİLKOLİNESTERAZIN FARKLI POLİMERİK YÜZEYLERE
İMMOBİLİZE EDİLMESİ” başlıklı tez çalışması, 04 Temmuz 2018 tarihinde
savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ayşe OGAN (Danışman)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Prof. .Dr. Ayşegül PEKSEL (Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA).....

Doç. Dr. Serap DEMİR (Üye)

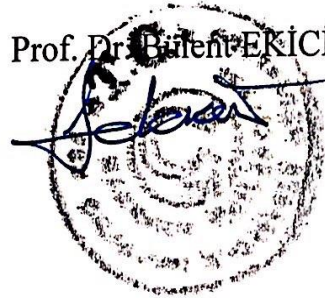
Marmara Üniversitesi(İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 9.7.2018 tarih ve
2018/16.0.2 sayılı kararı ile Khadija Khaled Ali' nin Kimya Anabilim Dalı/ Biyokimya
Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenci hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez konumun seçilmesinde, hazırlanmasında ve tüm aşamasında maddi-manevi büyük ilgi ve desteğini gördüğüm değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a, ve tezimde kullandığım organik polimerin temininde, büyük ilgi ve yardımlarını gördüğüm ikinci danışmanım Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI'ya,

Laboratuvardaki tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve tez yazımı aşamasında ve her konuda sabırla yardımcı olan bana en büyük desteği veren Doç. Dr. Serap DEMİR'e, tezimin yazımında ve formatında bana yardımcı olan Biyokimya Anabilim Dalı doktora öğrencileri Pelin Muhsir ve Lalehan Özalp'a, Tüm hayatım boyunca her ne olursa olsun her türlü maddi ve manevi desteği benden esirgemeyen, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan her zaman yanımda olacaklarını bildiğim canım anneme ve canım babama, aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	2
1.1.1. Enzimin kataliz mekanizması ve enzimatik reaksiyon süreci	3
1.1.2. Enzim kinetiği	4
1.1.3. Enzim aktivitesinin ölçümü.....	5
1.1.4. Enzim aktivitesi ölçümlerinde kontrol edilecek faktörler	6
1.1.5. Enzim İnhibisyonu	7
1.1.5.1. Geri Dönüşümsüz Enzim İnhibisyonu.....	8
1.1.5.2. Geri dönüşümlü İnhibisyon	8
1.2. Asetilkolinesteraz Enzimi	9
1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması.....	10
1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	11
1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri	12
1.2.3.1. Geri dönüşümlü AChE inhibitörleri	13
1.2.3.2. Geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri	15
1.2.4. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi	18
1.3. Enzim İmmobilizasyonu	18
1.3.1. İmmobilize enzimlerin ticari kullanımı	20
1.3.1.1. İmmobilizasyonda matris (taşıyıcı destek) materyalleri.....	20
1.3.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri	21
1.3.2.1. Kimyasal yöntemler	22
1.3.2.2. Fiziksel yöntemler	23
1.4. Epoksi polimerlerin hazırlanması	24

1.5. İlgili Literatür Işığında Çalışmanın Yeri.....	26
2. MATERYAL ve YÖNTEM	27
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
2.2. Araştırma Araçları.....	29
2.3. Deneysel Yöntemler.....	30
2.3.1. Polimerik destek materyalinin hazırlanması	30
2.3.1.1. İletken tiyol-ene kürlenebilen filmlerin hazırlanması.....	30
2.3.1.2. Polietilenimin modifiye filmlerin hazırlanması.....	32
2.3.1.3. Polimerik desteğin karakterizasyonu.....	32
2.3.2. Polimerik desteğe AChE enzimin immobilizasyonu.....	32
2.3.3. Bradford metoduna göre protein tayini	32
2.3.4. Standart grafiğin hazırlanması.....	33
2.3.5. Aktivite tayini.....	33
2.3.6. Serbest, epoksi grupları ve polietilenimin (PEI) üzerinden immobilize edilen enzimin pH'a bağlı olarak aktivite değişimi	34
2.3.7. Serbest, epoksi grupları ve polietilenimin (PEI) üzerinden immobilize edilen enzimin sıcaklığa bağlı aktivite değişimi	34
2.3.8. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi .	34
2.3.9. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	34
2.3.10. Serbest ve immobilize enzimler üzerine depolama kararlılıklarının etkisi .	35
2.3.11. Serbest ve immobilize enzimler üzerine metal etkisi	35
2.3.12. Serbest ve immobilize enzimler üzerine pestisit etkisi	35
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	36
3.1. Polimerik Desteğin Sentezi ve Karakterizasyonu	36
3.2. İmmobilize Olan Enzim Miktarının Hesaplanması.....	38
3.3. Asetiltiyokolin İyodür Standart Grafiğin Hazırlanması	40
3.4. Aktivite Tayini	40
3.4.1. İmmobilize ve serbest enzimin pH'a bağlı olarak aktivite değişimi	40
3.4.2. İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı olarak aktivite değişimi.....	41
3.4.3. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi .	42
3.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	44
3.4.5. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi	45

3.4.6. Serbest ve immobilize enzim üzerine metal etkisi	46
3.4.7. Serbest ve immobilize enzim üzerine pestisit etkisi.....	48
4. SONUÇLAR.....	50



ÖZET

Asetilkolinesterazın Farklı Polimerik Yüzeyle İmmobilize Edilmesi

Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), bir nörotransmitter olan asetil kolinin, kolin ve asetatata dönüşümünü katalizleyen bir hidrolazdır ve yaşam için büyük bir önem taşır. Pestisitlerde kullanılan etken maddeler kuvvetli AChE inhibitörleridir ve bu maddelerin eser miktarları bile canlılar için tehlike oluşturabilir. AChE inhibisyonu ölçülmesi, pestisitlerin tarımda çalışanlara ve çevreye verdiği zararı belirlemek için önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Hızlı ve hassas AChE ölçümü için biyosensör tasarımının ilk ve en kritik basamağını, AChE enziminin bir elektrot yüzeyine immobilizasyonu oluşturmaktadır. Bu çalışmada AChE enzimini immobilize etmek için hızlı ve tek basamaklı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tasarlanan sistemde pirolün ve tiyol-en bileşenlerinin eş zamanlı polimerizasyonu ile elektriksel olarak iletken ve fonksiyonel gruplara sahip polimerik yüzeylerin elde edilmesi planlanmıştır. İletken tiyol-en kürlenebilen için öncelikle pentaeritritoltetrakis (3merkaptopropiyonat) (4SH), 1,3,5-Triazol-1,3,5-triazin-4,6 (1H,3H,5H)-trionTTT ve alil glisidil eter (AGE) ve pirol belirli oranlarda karıştırılıp fotobaşlatıcı ve UV ışığı eşliğinde polimerleştirilmesiyle elde edilen filmlere epoksi grupları üzerinden AChE immobilize edildi. Ayrıca ikinci bir yol olarak, bu reaksiyona girmemiş serbest epoksi grupları polietilenimin (PEI) ile modifiye edilip ardından glutaraldehit ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası filmlerin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) tekniği ile fonksiyonel grupları incelendi.

İmmobilizasyon ile enzimin optimum sıcaklığı her iki polimer için serbest enzime göre 30°C'den 50°C'ye çıkarken, optimum pH değeri 8.0 den, 8.5'a çıkmıştır. Serbest enzim için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve Vmaks değerleri sırasıyla 1.25 mM, 1.53 mM/dakika bulunurken, epoksi grupları taşıyan polimere immobilize edilen enzim için 0.182 mM, 0.416 mM/dakika, PEI modifiye polimer için 0.5 mM, 0.018 mM/dakika bulunmuştur. İmmobilize edilen enzim üzerine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metallerinin etkisi araştırıldığında en fazla inhibisyona Cu^{+2} 'ın sebep olduğu anlaşılmıştır. 10 deneme sonrasında polimerik desteklere immobilize edilen enzim ilk aktivitesininin %51'ini korumuştur. 60 günün sonunda serbest enzim aktivitesini tamamen kaybederken, immobilize enzim aktivitesininin %29.1'ini kaybetmiştir. Sonuçlarımıza göre her iki polimer üzerine immobilize edilen enzimin kararlılığı ve dayanıklılığı arttığı

görülmektedir. Ürettiğimiz bu polimerler sağlam, kullanışlı ve düşük maliyetli bir AChE biyosensör tasarımında kullanılabilir.



ABSTRACT

Immobilization of Acetylcholinesterase on to Various Polymeric Surfaces

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is a hydrolase which converts neurotransmitter; acetylcholine to choline and acetate and substantial for living organisms. Active ingredients found in pesticides are very effective acetylcholinesterase inhibitors and even trace amounts of these agents can represent a considerable hazard to health for living things. Measurement of AChE inhibition has been used as a biomarker for the monitoring of exposure to pesticides in occupational and environmental health. The initial and most critical step for the fabrication of AChE biosensors with superior accuracy and speed involves the immobilization of AChE enzyme onto an electrode surface. A rapid and single step procedure has been aimed in this study. In the designed system; with the simultaneous polymerization of pyrrole and thiol-en complexes, synthesis of polymeric surfaces with conductive and functional groups have been planned. Firstly, pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) (4SH), 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (TTT) and allyl glycidyl ether (AGE) and pyrrole were mixed in certain proportions and were polymerized in conjunction with photoinitiator and UV light. AChE was immobilized on to the membranes through the epoxy functional groups. Also as a second way, free epoxy groups which did not enter this reaction were modified with polyethyleneimine (PEI) and then the enzyme was immobilized with glutaraldehyde. Functional groups of the films were elucidated in terms of its functional groups by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) before and after the immobilization process.

The temperature resistance of the enzyme was enhanced and the optimal temperature increased from 30°C to 50 °C and the optimal pH increased from 8.0 to 8.5 by the immobilization process. The Michaelis–Menten constants (K_m), and V_{max} , for the immobilized enzyme bearing epoxy and PEI groups were found as 1.25 mM/min, 1.53 mM/min and 0.018 mM/min respectively. The effect of metals; Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} was examined on the activity of immobilized enzyme through epoxy and EPI groups and Cu^{+2} caused a considerable inhibition for both. The immobilized enzyme retained 51% of its original activity after 10 runs. The free enzyme lost its activity on the 60th day while the immobilized ones lost literally 29.1% of their original activity. According to our results; stability and durability of immobilized AChE increases for both of the supports. In future a robust, low-cost and beneficial AChE biosensor may be designed by using these as supporting materials.

SEMBOLLER

cm	:Santimetre
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilovolt
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
°C	: Santigrat Derece
\$: Dolar
%	: Yüzde

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AChEI	: Asetilkolinesteraz İnhibitörü
CDI	: Karbonildiimidazol
E	: Enzim
EC	: Enzyme Comission
FDA	: Food and Drug Administration
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
IR	: Kızılötesi Işık
Km	: Maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu
MA	: Molekül Ağırlığı
PAA	: Poliakrilik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Revolutions Per Minute
S	: Substrat
SEM	: Taramalı Elektron Spektroskopisi
THA	: Tetrahidroaminoakridin
THF	: Tetrahidrofuran
UV	: Ultraviyole Işık
Vmaks	: Maksimum Hız

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Enzim ve aktivasyon enerjisi.....	3
Şekil 1.2. Michaelis-Menten eğrisi.....	4
Şekil 1.3. Lineweaver-Burk eğrisi.....	5
Şekil 1.4. Yarışmalı inhibisyon.....	8
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyon.....	9
Şekil 1.6. Karışık inhibisyon.....	9
Şekil 1.7. Asetilkolinesterazın bağlayıcı bölgeleri.....	10
Şekil 1.8. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.....	11
Şekil 1.9. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	12
Şekil 1.10. Asetilkolinesteraz inhibisyon mekanizması.....	13
Şekil 1.11. AD tedavisinde kullanılan Asetilkolinesterazın geri dönüşümlü inhibitörleri.....	14
Şekil 1.12. Biyolojik olarak aktif olan karbamatların genel kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.13. OP'ların genel yapı formülü.....	16
Şekil 1.14. Bazı insektistlerin genel yapısı. a: metil parathion, b:metil paraoksini c: malathion.....	17
Şekil 1.15. Ellman reaktifi ile asetiltiyokolinden AChE enzimi varlığında tiyokolin oluşum reaksiyonu	18
Şekil 1.16. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	24
Şekil 1.17. Tiyol-en polimerizasyonunun mekanizması.....	25
Şekil 1.18. UV ile pirolün katyonik polimerizasyonunun mekanizması	25
Şekil 1.19. Foto başlatılmış katyonik polimerizasyon ile epoksi gruplarının dönüşümüne ait mekanizması	25

Şekil 2.1. Pirol içeren tiyol-en kürlenebilen sıvı formülasyon.....	30
Şekil 2.2. Kullanılan tüm monomerlerin kimyasal yapıları.....	31
Şekil 3.1. AGE (siyah), 4SH (mavi), TTT (kırmızı), pirol (yeşil), ve kürlenmiş filmin (pembe) FTIR spektrumları.....	37
Şekil 3.2. PEI ile modifiye edilmiş pirol içeren tiyol-en filmlerin FTIR spektrumları.	38
Şekil 3.3. Protein standart eğrisi.....	39
Şekil 3.4. Asetiltiyokolin standart grafiği.....	40
Şekil 3.5. İmmobilize ve serbest enzimin pH'a bağlı aktivite değişimi.....	41
Şekil 3.6. İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı aktivite değişimi.....	42
Şekil 3.7. Serbest enzime ait Lineweaver-Burk eğrisi.....	43
Şekil 3.8. Epoksi grupları üzerinden immobilize olan enzimin Lineweaver-Burk eğrisi.....	44
Şekil 3.9. PEI grupları üzerinden immobilize olan enzimin Lineweaver-Burk eğrisi.....	44
Şekil 3.10. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği	45
Şekil 3.11. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi	46
Şekil 3.12. Serbest enzim aktivitesine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi	47
Şekil 3.13. Epoksi ve PEI grupları içeren filmlere immobilize edilen enzimin aktivitesine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi.....	47
Şekil 3.14. Pestisitlerin serbest enzim aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 3.15. Pestisitlerin epoksi ve PEI grupları içeren filmlere immobilize edilen enzimin aktivitesine etkisi	49

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Yaygın olarak kullanılan destek materyalleri.....	21
Tablo 2.1. Pirel içeren tiyol-en kürlenebilen bileşenler ve formülasyonları.....	31
Tablo 3.1. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim miktarları.....	39



1. GİRİŞ

Asetilkolinesteraz (AChE, EC:3.1.1.7) asetil kolin ile düzenlenen sinir iletiminde çok önemli rol oynar. Asetilkolini hidrolize eden hidrolaz sınıfına ve karboksilesteraz ailesine ait bir enzimdir (Massoulie ve ark., 1993; Karalliedde, 1999). AChE, kolinerjik sinapslarda uyarıların iletimini sonlandırdığından nörotransmisyon esnasında önemli rol oynar. Bugün piyasada kullanılan pestisitlerin büyük bir kısmı AChE inhibitörleridir.

Bunların %55'i organofosfatlar grubuna, %11'i karbamatlar grubuna aittir ve diğerleri piretroidler, klorlanmış hidrokarbonlar gibi diğer insektisitleri içerir (Kolovic ve ark., 2013). AChE enziminin geri dönüşümsüz inhibitörleri kas felçlerine ve kasılmalarına, bronşların büzülmesine ve nefes kesilmesi sonucu ölüme neden olur (Dhouib ve ark., 2016). Organofosfatlar enzimin aktif bölgesine yerleşerek hidrolizlenmesi uzun bir zamana gerek duyan fosforil grubunu esteratik bölgede bırakırlar ve kovalent olarak bağlanarak enzimin aktivitesini durdururlar (Sherma, 1995). AChE'nin geri dönüşümlü inhibitörleri enzimin esteratik bölgesini saniyeler ve dakikalar gibi kısa aralıklarda işgal ederler ve bu özelliklerinden dolayı bu tür inhibitörler merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar (Castro ve Martinez, 2001; Giacobini, 2003).

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan toksik etkiye sahip AChE inhibitörleri olan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte, insanların ve hayvanların yağ dokusunda birikebilmektedir. Çevre kirlenmesinde ve gıdalarda pestisitleri saptamak için AChE enziminin inhibisyonundan yararlanılır. Pestisitler enzimin aktif bölgesine bağlanarak

asetilkolinin kolin ve asetata hidrolizini engellerler ve oluşan bu inhibisyon ölçülebilir. AChE enziminin geri dönüşümsüz inhibitörleri ve fosforik asitin esterleri organofosfatlar olan malathion gibi insektisitleri, sarin ve soman gazları gibi kimyasal silahlarda kullanılır. Ayrıca N-metil karbimik asit esterleri olan karbamatlar, hidrolizlenmeleri saatler alan inhibitörleridir ve medikal amaçla kullanılırlar (Stoelting, 1999).

Pestisitleri saptamak için kullanılan biyosensörlerde AChE enziminin inhibisyonundan yararlanılır ve oluşan bu inhibisyon biyosensör tarafından ölçülebilir. Uzun bir süre kararlı bir aktivite sağlayabilmek için enzimlerin çözünmeyen destek görevi gören materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmelerine enzim immobilizasyonu denir. Enzim immobilizasyonunun çeşitli avantajları vardır. Enzimler

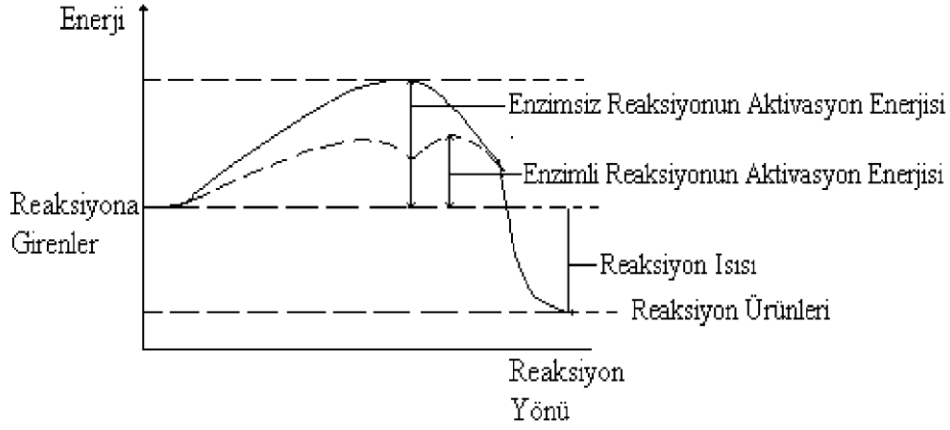
tekrar tekrar kullanılırlar, özellikle üretimi zor ve pahalı enzimler için bu önemlidir. Enzim matrikste tutulduğundan ürün enzimle kontamine olmaz ve matriks enzimi fiziksel bir bariyer olarak koruduğundan, enzim ekstrem pH ve sıcaklık gibi etkilere dayanıklı hale gelir. İmmobilize enzimler çok daha kolay bir şekilde kontrol edilebilirler.

Bu tez çalışmasında, immobilize ve serbest AChE aktivitesi spektrofotometrik olarak Ellman yöntemine göre belirlenmiştir. AChE'yi immobilize etmek için pirol içeren tiyol-en kürlenebilen filmler hazırlanmıştır. Sentezlediğimiz bu filmlere enzimin kovalent tutunması için yüzeyi fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek, reaksiyona girmemiş epoksi grupları üzerinden enzim kovalent olarak immobilize edilmiştir. Ayrıca ikinci bir yol olarak, bu reaksiyona girmemiş serbest epoksi grupları polietilenimin (PEI) ile modifiye edilip ardından glutaraldehit ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra serbest ve immobilize enzimin aktivite çalışmaları yapılarak, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği, serbest ve immobilize enzimin depolama süresi, kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) ve immobilize enzim için en uygun şartlar belirlenmiştir.

1.1. Enzimler

Enzimatik etki gösteren protein yapısında olmayan RNA modifiye edici etkisi olan ribozomlar hariç tüm enzimler protein yapısındaki biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde gerçekleşen binlerce reaksiyonun hızını ve özgülüğünü düzenleyen enzimler yalnızca canlılar tarafından doğal olarak sentezlenirler. Hücre solunumu, fotosentez, sindirim olayı, büyüme, sinirlerdeki iletim, kas kasılması gibi önemli fizyolojik olaylar ve çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan organik maddelerin hücrelerdeki yapım ve yıkım reaksiyonları enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır (Champe ve Harvey, 1997; Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek biyolojik reaksiyonları çok daha hızlı ve spesifik bir biçimde katalizlerler (Şekil 1). Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim bileşeni olan aminoasitlere ayrılır veya denatüre olursa katalitik aktivitesi genellikle yok olur. Bu nedenle protein yapılı enzimlerin katalitik aktivitesi onların birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarına bağlıdır (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.1. Enzim ve aktivasyon enerjisi (Stryer ve ark., 2012).

Substratlarına özgü olan enzimler genler tarafından şifrelenirler. Dolayısıyla da kendilerine özgü bir amino asit dizilimine sahiptirler. Bazı enzimler sadece proteinden oluşurlar ve aktivite gösterebilmek için sahip oldukları aminoasit kalıntıları dışında başka kimyasal gruplara gereksinim duymazlar. Metabolizmada gerçekleşen reaksiyonların çoğunda meydana gelen kimyasal değişiklikler enzimlerin sadece aminoasit zincirlerindeki fonksiyonel gruplar tarafından yapılamaz. Bu tür reaksiyonların katalizlenmesinde enzimler, K^+ , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} gibi kofaktör olarak adlandırılan bir veya birden fazla metal iyonuna ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar.

Bazı enzimler ise hem koenzime hem de bir veya birden fazla metal iyonuna gereksinim duyarlar (Champe ve Harvey, 1997; Nelson ve Cox, 2005).

1.1.1. Enzimin kataliz mekanizması ve enzimatik reaksiyon süreci

Enzim-substrat etkileşimini açıklayan ve yaygın olarak benimsenen model indüklenmiş uyum modelidir (Koshland, 1958). Bu modele göre, enzim ve substratın ilk etkileşimleri zayıftır fakat bu zayıf etkileşimden dolayı enzimde, substratın daha iyi bağlanacağı şekilde bir konformasyonel değişiklik oluşur. Bu şekilde bağlanma güçlenir. Substrat enzime daha uyumlu olarak bağlandığında enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarıyla substratın reaksiyon sonucu değişecek kimyasal bağları daha yakın hale gelir. Bağlanma olduktan sonra alternatif reaksiyon mekanizmalarıyla reaksiyonun geçiş halinin serbest enerjisi düşer. Bunu gerçekleştiren reaksiyon mekanizmaları arasında: bağ gerginliği yoluyla kataliz; aktif bölge proton alıcılar ve vericileri ile kataliz; kovalent kataliz; kuantum tünellemesi sayılabilir (Fersht, 1999). Enzim konsantrasyonu

reaksiyon sırasında azalır ve enzim-substrat kompleksini oluşturur. Reaksiyon ortamında bulunan enzim miktarı reaksiyon başında ve sonunda aynı olur.

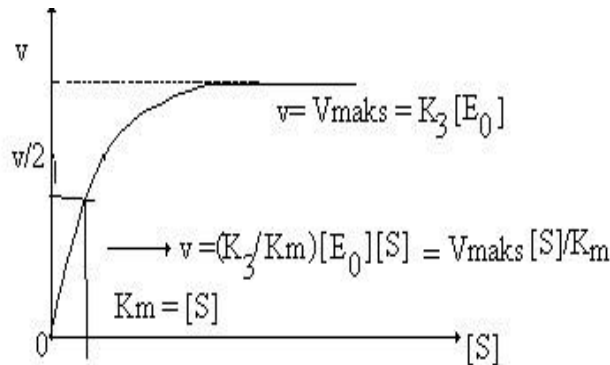
1.1.2. Enzim kinetiği

Enzim kinetiği çalışması reaksiyon hızı ölçülerek yapılmış, çeşitli reaksiyon şartlarının etkisi araştırılır. Organik kimyada çok yüksek veya çok düşük basınç, pH ve sıcaklıkta oluşan kimyasal değişme ve reaksiyonlar, canlı hücrelerin bozulmadan kalabildikleri çok dar olan basınç, pH ve sıcaklık aralığında ancak enzimler aracılığı ile gerçekleştirilir. Genel enzim reaksiyonunu aşağıdaki gibi gösterebiliriz.



E= Enzim; S= Substrat; ES= Enzim-Substrat Kompleksi; P= Ürün' dür.

Enzimatik reaksiyonlarda enzimler, substrat ve ürünler arasındaki dengeyi değiştirmez. Substrat derişiminin artmasıyla reaksiyon hızı artar ancak enzim substrat ile doydukça hız en yüksek değerine yaklaşır (V_{maks}). V_{maks} hızının yarısının elde edildiği substrat konsantrasyonu K_m olarak tanımlanır ve **Michaelis-Menten sabiti** olarak adlandırılır (Wrighton ve Ebbing, 1993). Birimi konsantrasyon birimi olan mol/litre'dir. K_m değerlerinden enzimler ayırt edilebilir ve enzim-substrat kompleksine ilişkin sabitlerin bulunabilir. Reaksiyon hızı substrat ya da ürün konsantrasyonu ölçülerek belirlenir. Reaksiyon hızının sürekli olarak ölçülmesini sağladığı için spektrofotometrik ölçüm oldukça yaygın kullanılır. Tek substratlı enzimatik reaksiyonların çoğu Michaelis-Menten denklemini doğrular. Başlangıç hızı (V_0) ile substrat konsantrasyonu arasındaki grafik aşağıdaki gibi olur. Bu grafiğe **Michaelis-Menten Grafiği** denir.

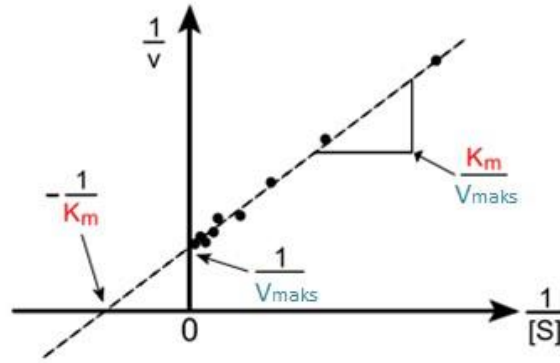


Şekil 1.2. Michaelis-Menten eğrisi (Stryer ve ark., 2012).

Düşük substrat konsantrasyonlarında $K_m \gg [S]$ olduğundan $[S]$, K_m 'nin yanında ihmal edilebilir olduğundan $V = V_{maks} \cdot [S] / K_m$ denklemine dönüşür. Yüksek substrat konsantrasyonunda $[S] \gg K_m$ olduğundan K_m , substrat konsantrasyonunun yanında ihmal edilebilir ve $V = V_{maks}$ eşitliğine dönüşür ve aşağıdaki Michaelis-Menten denklemini elde ederiz.

$$V = \frac{V_{maks} [S]}{K_m + [S]}$$

Ordinata $1/V$ değerlerini, apsise $1/[S]$ değerleri yerleştirildiğinde **Lineweaver-Burk eğrisi** elde edilir. Bu grafikteki doğrunu eğimi K_m/V_{maks} 'a eşittir. Ordinatı kesen nokta $1/V$ 'dir ve doğru uzatıldığında apsisi kesen nokta $-1/K_m$ bulunur. Buradan da K_m bulunur (Ogan, 2004).



Şekil 1.3. Lineweaver-Burk eğrisi (Stryer ve ark., 2012).

1.1.3. Enzim aktivitesinin ölçümü

Enzim aktivitesi birim zamanda dönüştürülen substratın mol sayısıdır. SI sistemde birimi katal'dır. 1 **katal**, optimal koşullarda 1 saniyede 1 mol substratı dönüştüren enzim aktivitesidir. Katalın birimi $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 'dir. Bu birim oldukça büyük olduğundan, enzim aktivitesini belirtirken daha çok enzim ünitesi kullanılır. **Enzim ünitesi**; 1 dakikada 1 μmol substratın dönüşümünü sağlayan enzim aktivitesidir. Enzim ünitesinin birimi $\mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1}$ 'dir. Yaygın olarak kullanılan diğer bir birim ise **spesifik aktivitedir**.

Spesifik aktivite 1 mg toplam proteindeki enzim aktivitesidir ve birimi $\mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 'dir. Enzim numunesinin spesifik aktivitesinin saf enzimin spesifik aktivitesine bölünmesiyle % saflık belirlenir. Saf olmayan enzim numunesinin aktivitesi düşüktür

çünkü kütlesi enzim olmayan safsızlıklar içerir. Bundan dolayı daima saf enzimin spesifik aktivitesi saf olmayan enzimden büyüktür.

Çalışmalarda substrat konsantrasyonu K_m değerinin en az 10 katı olacak şekilde seçilmelidir. Substrat konsantrasyonu $10.K_m$ olduğunda hız, teorik hızın %91'ine ulaşır. Eğer substrat konsantrasyonu çok fazla seçilirse ürünün engelleyici etkisi de artacaktır. Bu durumda oluşan ürün enzime çok sıkı bağlanır ve hız düşer. Bu durumda ürünün ortamdaki uzaklaştırılması gereklidir (Ogan, 2004). Enzimin aktivitesinin ölçümünde, oluşan ürün miktarının miktarı belirlenerek bu miktarla doğru orantılı olan enzim miktarı bulunabilir. Enzim aktivitesinin ölçümü, enzim kinetiği ve enzim aktivitesinin araştırılması için önemlidir.

1.1.4. Enzim aktivitesi ölçümlerinde kontrol edilecek faktörler

Enzim aktivitesine pek çok faktör etki edebilir. Tuz konsantrasyonu bunlardan bir tanesidir. İyonlar proteinlerdeki zayıf iyonik bağları etkilediği için çoğu enzim çok yüksek tuz konsantrasyonuna dayanamaz. Normal olarak enzimler 1-500 mM tuz konsantrasyonu aralığında işlev görür.

Diğer bir önemli etmen de sıcaklıktır. Belirli bir optimum sıcaklık değerine kadar sıcaklığın artması reaksiyonu hızlandırır fakat bu değerden sonra reaksiyon hızı düşmeye başlar. Bunun nedeni enzimin üçüncül yapısının stabil olmasını sağlayan iyonik ve hidrojen bağlarının kopmaya başlamasıdır (Daniel ve ark., 2010). Sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı artar fakat enzimin denatürasyon hızı da artar. Sıcaklık ölçümlerinde dikkat edilmesi gereken bir nokta vardır. Eğer bir enzimatik reaksiyonda reaksiyonun başlamasının hemen ardından aktivite ölçümü yapılırsa yüksek sıcaklık değerlerinde daha büyük bir reaksiyon hızı bulunur ancak ürün oluşumu bir saat gibi daha uzun sürelerde ölçülürse reaksiyon sonunda daha az ürün oluştuğu bulunur ve aktivitesi de daha düşük ölçülür. Her enzimin aktivitesini en yüksek gösterdiği bir sıcaklık değeri vardır. Bu değere enzimin optimum sıcaklığı denir.

Bir başka etmen de pH'dır. Enzimlerin çoğu ortamın pH değerine duyarlıdır ve belirli bir optimum pH aralığında maksimum aktivite gösterirler. Enzimler aktif bölgelerinde iyonik gruplar bulundurur ve pH'deki değişim aktif bölgeyi etkileyerek enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olur. Ekstrem pH değerlerinde enzimdeki iyonik ve

hidrojen bağları kırılır. Bunun doğal bir sonucu olarak enzim, üç boyutlu yapısını değiştirir ve denatüre olarak aktivitesini kaybeder. pH'deki değişim substratı da etkileyebilir. İyonik gruplar bulunduran substratlar farklı pH değerlerinde farklı iyonik formlarda olabilir.

Substrat doyumu ve çok sayıda makromolekülün bulunması da enzim aktivitesi üzerine etkilidir. Belirli bir substrat konsantrasyonuna kadar konsantrasyonun artırılması enzim aktivitesini ve bundan dolayı reaksiyon hızını artırır. Tüm enzim moleküllerinin aktif bölgeleri hep dolu olacak şekilde substrat konsantrasyonu artırıldığında enzim doyumuna ulaşır ve bundan sonra konsantrasyonun artırılması reaksiyon hızını değiştirmez ve sabit hızda enzimatik reaksiyon devam eder. Çözeltide yüksek miktarda makromolekülün bulunması enzimatik reaksiyonların reaksiyon hızını ve denge sabitini etkiler (Minton, 2001).

1.1.5. Enzim İnhibisyonu

Günümüzde karşılaşılan birçok hastalık, vücuttaki belli bir metabolitin eksikliği veya fazlalığından, yabancı bir organizmanın istilasından ya da anormal hücre büyümesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle vücut için gerekli metabolitlerin seviyesi normal düzeye getirilebilir ve yabancı organizma girişinin ya da anormal hücre büyümesinin önüne geçilebilirse söz konusu hastalıklar da tedavi edilebilir (Silverman ve Holladay, 2014). Bugün kullanılmakta olan birçok ilaç ve toksik ajan enzim inhibisyonu yoluyla hastalıklara etki etmektedir (Stryer ve ark., 2012).

Katalitik enzim reaksiyonu yavaşlatan veya durduran moleküler ajanlara enzim inhibitörü, gerçekleşen bu olaya da enzim inhibisyonu denir. Enzimler hemen hemen bütün hücresel süreçleri katalizledikleri için enzim inhibitörleri bilinen en önemli farmakolojik ajanlardır (Nelson ve Cox, 2005). Enzimleri inaktive etmek için kullanılan bu ajanların vücutta gerçekleşen diğer enzimatik reaksiyonları etkilememesi ve organizma için zararlı yan ürünler oluşturmaması son derece önemlidir. Bu nedenle bazı metabolik yolların tanımlanmasında, enzim mekanizmasının aydınlatılmasında özellikle de katalizde kilit rol oynayan aminoasitlerin tespit edilmesinde enzim inhibisyon çalışmaları önemli yer tutar (Nelson ve Cox, 2005; Stryer ve ark., 2012).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü inhibisyon ve geri dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere ikiye ayrılır (Stryer ve ark., 2012).

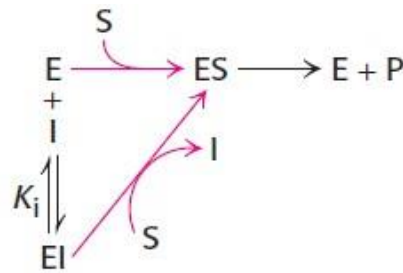
1.1.5.1. Geri Dönüşümsüz Enzim İnhibisyonu

Geri dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitörler enzime kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle çok sıkı bir şekilde bağlanarak genellikle enzimin aktivitesi için gerekli olan fonksiyonel grupla kararlı kompleksler oluştururlar (Nelson ve Cox, 2005; Stryer ve ark., 2012). Böylece enzimlerin substratla etkileşmesini engellerler.

Katalitik mekanizmada yer alabilen substrat analogları olan intihar inaktivatörleri, katalitik merkeze kovalent bir bağla bağlanarak enzimi bloklar. Burada kovalent bağlanma enzimin kendisi tarafından başlatılıp sonlandırıldığı için bu bileşiklere intihar inaktivatörleri denir (Stryer ve ark., 2012). İyi tasarlanmış bir intihar inaktivatörü tek bir enzime özgüdür ve enzimin aktif bölgesi içinde yer alana kadar da reaktif değildir.

1.1.5.2. Geri dönüşümlü İnhibisyon

Geri dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif), yarı yarışmalı (unkompetitif) ve karışık inhibisyon olmak üzere üç grupta incelenir. Geri dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge tepkimesi şeklindedir. Geri dönüşümlü inhibisyonda enzim inhibisyonu inhibitör ortamdan uzaklaştırılmadığı sürece inhibisyon devam eder. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata çok benzer ve enzimin aktif bölgesi için substrat ile yarışmaktadır. İnhibitör, enzimin aktif bölgesini işgal ederken, substratın enzime bağlanmasını engeller. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibitör etkisi ortadan kaldırılabilir. V_{max} değeri değişmezken, K_m değeri artar (Horton ve ark., 2006).



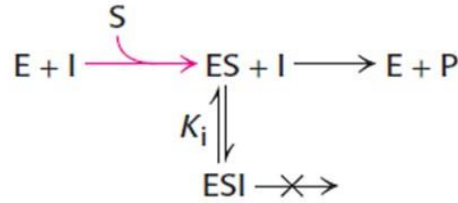
Şekil 1.4. Yarışmalı inhibisyon (Stryer ve ark., 2012).

Diğer bir dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon tipinde inhibitör, yarışmalı bir inhibitörden farklı olarak sadece enzimsubstrat (ES) kompleksine bağlanır, serbest enzime (E) bağlanamaz.

Bu inhibisyon daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Bu tip inhibisyonda inhibitör enzim substrat kompleksine bağlanıp aktif olmayan

enzimsubstrat-inhibitör (ESI) kompleksi oluşturduğundan inhibitörün varlığında V_{max} azalır.

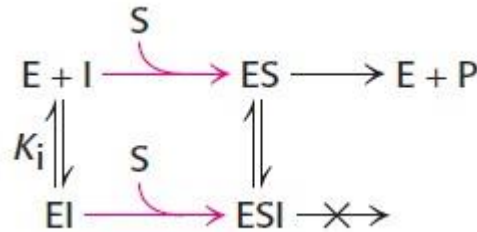
ESI kompleksinin oluşumu ile substrat (S) kompleksi ortamdan sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu reaksiyon dengesini daha fazla sağa kaydırır ve böylece K_m değeri küçülür (Horton ve ark., 2006).



Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyon (Stryer ve ark., 2012).

Karışık inhibisyonda; inhibitör enzime ya da enzim substrat kompleksine bağlanmaktadır. Aktif olmayan EI ve ESI kompleksi oluşturabilir. Substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Karışık inhibitörün etkisi, enzimin katalitik aktivitesini düşürerek gözlenmektedir. Bu tip inhibisyonda, inhibitör ile substrat arasında yarışma yoktur. Substrat konsantrasyonu artırılmasıyla inhibisyon ortadan kaldırılamaz.

Enzimin K_m değeri sabit kalırken V_{maks} değeri azalmaktadır (Horton ve ark., 2000).



Şekil 1.6. Karışık inhibisyon (Stryer ve ark., 2012).

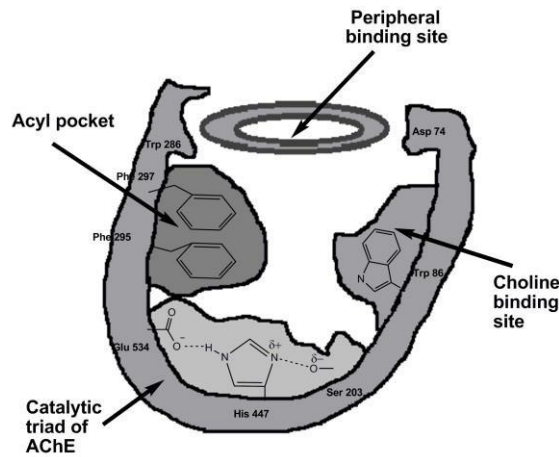
1.2. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolinesteraz (EC:3.1.1.7.) (AChE,Asetilhidrolaz), nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen hidrolaz grubundan bir enzimdir. Kolin esterazlar, bir nörotransmitter olan asetilkolinin kolin ve asetik aside hidrolizlenmesini sağlayan bir enzim ailesidir. Bu reaksiyon kolinerjik bir nöronun istirahat haline dönebilmesi için elzem bir reaksiyondur. AChE sinir, kas, merkezi ve periferel dokularda motor ve sensör fiberlerinde, kolinerjik ve kolinerjik olmayan fiberler gibi pek çok iletken dokuda bulunur (Voet and Voet, 1995). AChE'nin aktivitesi motor nöronlarında daha fazladır. Enzim çoklu moleküler formlarda bulunur, bu üniteler farklı olsa da benzer katalitik aktivite gösterirler. Memeli beyinde AChE tetramer formunda bulunur.

Pseudokolinesterazlar plazma kolinesteraz, butirikolinesteraz veya ailkolin ailhidrolazlar olarak bilinir da bilinirler ve genellikle karaciğerde bulunurlar. AChE den farklı olarak butirikolini, astilkoline (ACh) göre daha kolay hidrolizlerler. ACh motor sinirler ve iskelet kası arasındaki nöromuskuler kavşakta bulunan bir nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminde ACh ncelikli olarak nöronlarda bulunur. Nörotransmisyon sırasında ACh sinirden postsinaptik yarık içerisine salınır ve postsinaptik membran üzerindeki ACh reseptörüne (nikotonik ve muskorinik) balanır ve sinirden getirdiği iletiyi iletir. Post sinaptik membran üzerinde bulunan AChE, ACh'i hidrolizleyerek sinyal iletimini sonlandırır. ACh'nin bozunmasıyla açığa çıkan kolin pre-sinaptik sinir tarafından tekrar alınır ve kolin, asetil transferaz enzimiyle asetil CoA'ya balanarak tekrar ACh meydana getirir (Katzung, 2001; Barnard, 1974).

1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

AChE oldukça yüksek bir aktiviteye sahiptir, her bir molekül enzim saniyede yaklaşık olarak 25000 asetilkolin (ACh) parçalar. AChE-Yapısı ve katalitik fonksiyonu AChE nromuskular sinir kavşaklarında bulunan bir serin hidrolazdır. Temel biyolojik fonksiyonu asetil kolini asetat ve koline çevirmektir. AChE nin aktif bölgesi molekülün altından 4A yukarıda bulunur anyonik ve esteratik üniteler olmak üzere iki alt üniteden oluşur. Katalizden ve kolini balamaktan sorumlu anyonik alt ünite yüksüzdür ve lipofiliktir, ACh'nin pozitif kuaterner kolinini balayabildii gibi yarışmalı inhibitörler olan diğer kuaterneri aminleri de balayabilir. ACh'nin hidrolizlendii esteratik alt ünite tıpkı der serin hidrolazlarda olduğu gibi serin, histidin ve glutamat içeren katalitik l içerir. Karboksil esterin hidroliz reaksiyonu ile ail-enzim ve serbest kolin meydana gelir. Katalitik ldeki histidinin yardımı ve su molekülü ile asetik asit ve serbest enzim tekrar açığa çıkar. Aktif merkezin bu iki alt ünitesinin yanı sıra AChE'nin aktif merkezi kolin bağlayıcı paketinden ayrı olarak bir veya daha fazla anyonik bölge içerir. Burası ACh ve yarışmasız inhibitörler olan diğer kuaterner liandların balanmasını salar.



Şekil 1.7. Asetilkolinesterazın bağlayıcı bölgeleri (Susman ve ark., 1991).

Aşağıda enzimin kataliz reaksiyonu gösterilmektedir. Ürün olarak asetat ve kolin oluşur.

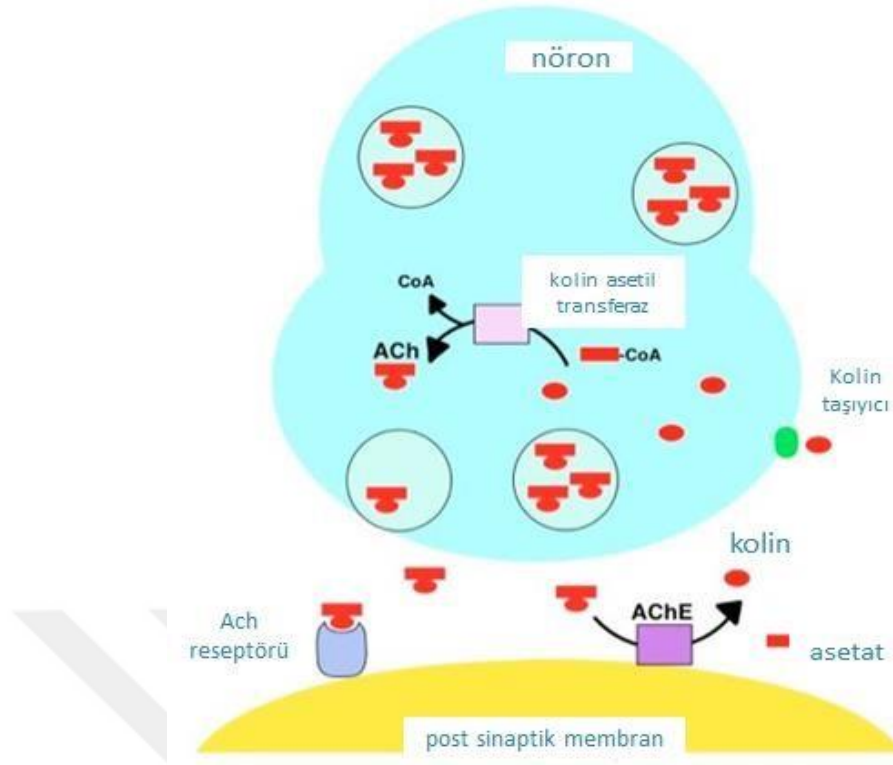


Şekil 1.8. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

Enzimdeki anyonik alt birim asetilkolinin pozitif kuaterner amini ile bağlanır. Ayrıca bu bölgeye diğer katyonik substratlar ve inhibitörler de bağlanır. Katyonik substratlar, aktif bölgeye giden aralıkta sıralanan 14 aromatik amino asit ile etkileşimden başka anyonik bölgede negatif yüklü amino asitlerle bağlanmazlar (Ariel ve ark., 1995). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça yüksek bir korumaya sahiptir (Ordentlich ve ark., 1993). Aromatik asitler arasında triptofan 84 kritik öneme sahiptir ve bu amino asitin alaninle yer değiştirmesi enzimin reaktifliğini 300 kat azaltır (Tougu, 2001). Aktif bölgeye giden bu aralık yaklaşık olarak 20 angstrom uzunluğa sahiptir. Aktif bölge enzimin alt kısmından 4 angstrom yukarıda bir konuma sahiptir (Harel ve ark., 1993). Karboksil ester hidroliz reaksiyonu açıl-enzim ve serbest kolin oluşumuna neden olur. Daha sonra açıl-enzim su (H₂O) molekülü tarafından nükleofilik atağa uğrar ve histidin 440 amino asitinin yardımıyla asetik asiti serbest bırakılır ve tekrar serbest enzim oluşur (Pohanka, 2011). Aktif merkezin bu iki alt ünitesinin yanı sıra AChE'nin aktif merkezi kolin bağlayıcı paketinden ayrı olarak bir veya daha fazla anyonik bölge içerir. Burası ACh ve yarışmasız inhibitörler olan diğer kuaterner ligandların bağlanmasını sağlar (Quinn, 1987).

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

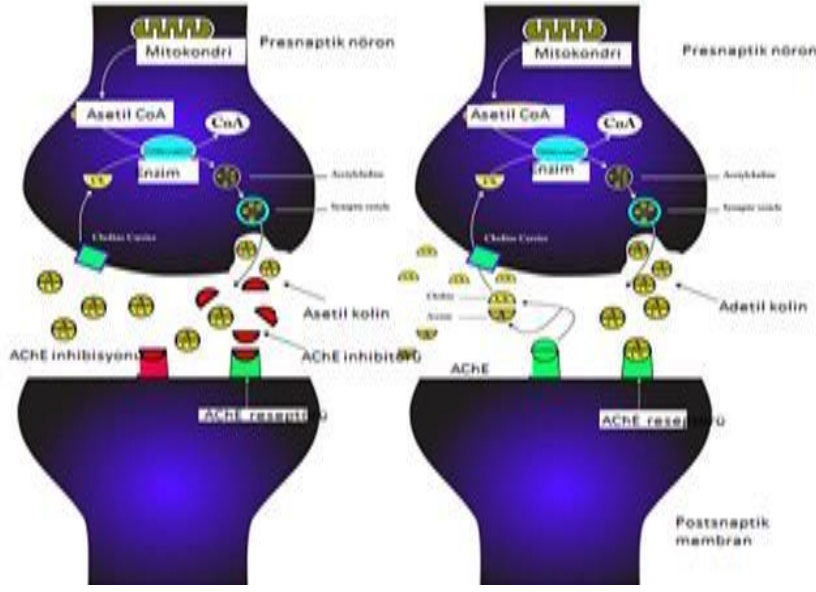
Nörotransmisyon sırasında ACh sinir hücresinden sinaptik boşluğa salınır ve postsinaptik membrandaki ACh reseptörlerine bağlanır. Böylece bir sinyal oluşur. Aynı şekilde postsinaptik membranda konumlu AChE enzimi asetilkolini hidrolize ederek sinyal iletimini durdurur. Serbest kalan kolin önceki sinaptik sinir hücresi tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferaz enzimi tarafından asetil-CoA ile reaksiyonundan tekrar asetilkolin sentezlenir (Whittaker, 1990). Aşağıdaki şekilde mekanizma gösterilmiştir:



Şekil 1.9. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu (Colevic, 2013) .

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

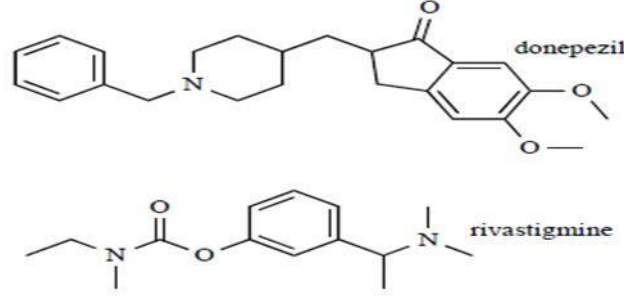
AChE enzimi inhibitörleri birçok alanda kullanılır. Doğal olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı zehirler AChE enzimini inhibe edebilirler ve asetilkolinin yıkımını engellerler. Böylece nörotransmitter asetilkolinin konsantrasyonunu ve işlev süresini artırır. AChE inhibitörleri geri dönüşümlü, ve geri dönüşümsüz olarak etki ederler (Pohanka, 2012). Tıbbi amaçlı olarak, myasthenia gravis tedavisinde, glaukoma tedavisinde, antikolinergik zehirlenmeye karşı antidot olarak, non-depolarlayıcı kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmek için, Alzheimer gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarının tedavisinde özellikle tepkisizliğe karşı, Lewy Body Dementia ve Parkinson Hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Taylor ve ark., 2012; Colovic ve ark., 2013). İnsektisitlerin hammaddesini oluştururlar, kimyasal silah olarak kullanılabilirler. Asetilkolinesterazın inhibisyon mekanizmasını gösteren şekil aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.10. Asetilkolinesteraz inhibisyon mekanizması (Hametpoor ve ark., 2017)

1.2.3.1. Geri dönüşümlü AChE inhibitörleri

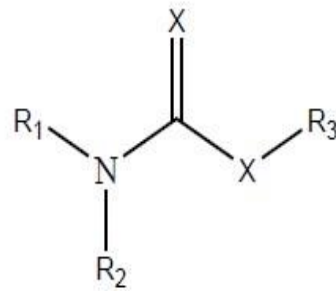
Geri dönüşümlü AChE inhibitörleri çoğunlukla tedavi amaçlı kullanılır. İnhibitörler enzim aktivitesinin değiştirilmesinde önemli rol oynarlar. Bu inhibitörler karbamat, kuaterner ve tersiyer amonyum tuzları gibi farklı fonksiyonel gruplar içerirler ve myasthenia gravis, Alzheimer hastalığı (AD), postoperatif uleus, idrar torbası sarkması, glokoma tedavisinde olduğu kadar antikolinergik doz aşımında antidot olarak kullanılırlar (Giacobin, 2004; Thompson ve ark., 2012; Stahl, 2002). Piyasada ticari olarak satılmakta olan Donepezil, Rivastigmine ve Galantamine AD tedavisinde etkin olarak kullanılan geri dönüşümlü AChE inhibitörleridir. AChE'ı inhibe ederek ACh'nin bozunma hızını azaltıp, ACh seviyelerinin belirli bir düzeyde kalmasını sağlarlar. AD'nin tedavisi yoktur fakat bu ilaçlar hafıza bozuklukları, düşünme, dil, muhakeme ve diğer kavrama gibi beyin faaliyetlerinin iyileştirilmesine yardımcı olurlar (Bond ve ark, 2012; Birks ve ark., 2009; Watkins ve ark., 1994). Bu ilaçlar arasında rivastigmine ve galantamine nazaran donepezil'in daha az mide barsak bozukluklarına yol açtığı ve iyi tolere edildiği saptanmıştır (Tayeb ve ark., 2012; Rojas-Fernandez, 2001).



Şekil 1.11. AD tedavisinde kullanılan Asetilkolinesterazın geri dönüşümlü inhibitörleri (Colevic, 2013).

Karbamatlar

Yine bir geri dönüşümlü AChE inhibitörü olan karbamatlar ise AD hastalığının tedavisinin yanı sıra Parkinson hastalığı (PD), myasthenia gravis, Lewy cisimcikleri ve glukoma tedavisinde, veterinerlikte parazit ilacı ve tarımda da insektisit olarak yaygın şekilde kullanılırlar. Karbamatlar karbonik asitten türeyen organik bileşiklerdir, karbamatlar, OP'lar gibi AChE inhibitörleridir ve zehirlenmelerde OP'lar ile benzer etki gösterirler. OP'lar gibi serin amino asit kalıntısına bağlanırlar fakat bu bağlanma OP'lar gibi çok sağlam ve kararlı değildir, 30-40 dakika sonra kendiliğinden hidroliz olarak enzimden ayrılırlar, bu yüzden geri dönüşümlüdürler (Gupta 2006; Kuhr ve Dorough 1976; Mothana ve ark., 2008). Karbamat bileşikler mantar ilacı, insektisit ve herbisit olarak zirai mücadelede kullanılırlar: Karbamat insektisitleri olan aldicarb, karbofuran, karbaril fenobucarb, propoosur önemli insektisitlerdir. Bunlar her ne kadar geri dönüşümlü AChE inhibitörleri oldukları için diğer OP'lara göre daha emniyetli insektisitlerdir. Ferbam, mancozeb ve thiram gibi bazı karbamat bileşikler herbisit olarak kullanılırken butilate, pebulate, metham, molinate, cycloate, vernolate ise herbisit olarak kullanılır. Akut toksikliği insanlarda azdır fakat maruz kalma ile gözleri ve deriyi kaşıntıdırabilir, öksürük ve hapşırma sebepleri olabilirler.



Şekil 1.12. Biyolojik olarak aktif olan karbamatların genel kimyasal yapısı (Colevic, 2013).

1.2.3.2. Geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri

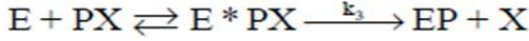
AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılırlar, organofosfat bileşikleridir. Ayrıca tedavi amacıyla kullanılan geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri de vardır (Colevic ve ark., 2013).

Organofosfat (OP) bileşikleri

OP'lar fosforik asit, fosfonik, fosforik ve fosfoamidilik asit türevleridir. R₁ ve R₂ grupları fosfor atomuna ya doğrudan (fosfinatlar oluşturarak) veya bir oksijen veya kükürt aracılığı ile fosfor grubuna bağlanırlar. Bazı durumlarda R₁ doğrudan fosfor atomuna tutunmuştur ve R₂ oksijen veya kükürt atomuna (fosfonatlar veya tiyofosfonat) oluşturarak bağlanırlar. Fosforoamidatlarda bu gruplardan en az bir tanesi –NH₂ dir ve fosforla çift bağ yapan ise ya oksijen ya da kükürt atomudur. Fosfor grubuna oksijen veya kükürt üzerinden bağlanan X grubu geniş bir grup olan halojenler, alifatik, aromatik veya heterosiklik grubundandır. OP fosfodiesteraz ile hidrolizlendiğinde veya protein hedefleriyle etkileştiğinde bu grup, fosfor grubundan ayrıldığı için terk eden grup olarak adlandırılır. OP'ların akut toksik etkisi, merkezi sinir sisteminde esterazları geri dönüşümsüz olarak fosforladıkları için AChE'nin aktivitesini kaybetmesine yol açmalarından dolayıdır (WHO 1986). Gerçekte OP'lar

ACh'nin substrat analoglarıdır ve tıpkı doğal substrat gibi aktif bölgeye girer ve serinin -OH grubuna kovalent olarak bağlanır. Asetillemede olduğu gibi OP parçalanır ve enzim fosforillenir. Normalde açıl enzim derhal hidrolizlenip serbest enzimi oluşturabilirken fosfor aktif bölgeyi kolay kolay terk etmez, fosforun aktif merkezi bırakması günler sürebilir. Fosforillenmiş enzim nörotransmitteri hidrolizleyemez. Enzimim inhibisyonu, ACh'nin sinaptik kavşakta birikmesine ve nikotik ve muskarinik ACh reseptörlerinin aşırı uyarılmasına sebep olur ve sonuçta sinir iletisi durur. Akut zehirlenmenin belirtileri ajitasyon, kas zayıflığı ve tutulmaları, gözbebeğinin büzülmesi, aşırı tükürük salgılama ve terlemedir (Bojgar, 2004; Smulders ve ark., 2004). Şiddetli zehirlenmelerde solunum güçlüğü, kendini kaybetme,

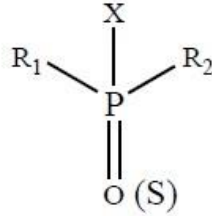
karıştırma, kasılma ve zehirlenmenin şiddetine bağlı olarak ölüm bile görülebilir. OP ile oluşan AChE zehirlenmesi aşağıda verilmiştir.



E: Enzim, PX: PX-OP, E*PX-geri dönüşümlü enzim OP kompleksi, EP: fosforillenmiş enzim, X: X-OP terk eden grup.

Geri dönüşümsüz inhibisyon iki basamakta gerçekleşir ;

- 1) Hızlı, kısa dönemli geri dönüşümlü enzim aktivitesinin sonlandırılması. Etki başlangıçta belirleyicidir.
- 2) Bu basamakta çok kararlı enzim-inhibitör kompleksi oluşturan, yavaş ilerleyen geri dönüşümsüz inhibisyonudur. İnhibitör enzime kovalent olarak bağlanır.



Şekil 1.13. OP'ların genel yapı formülü (Colevic, 2013).

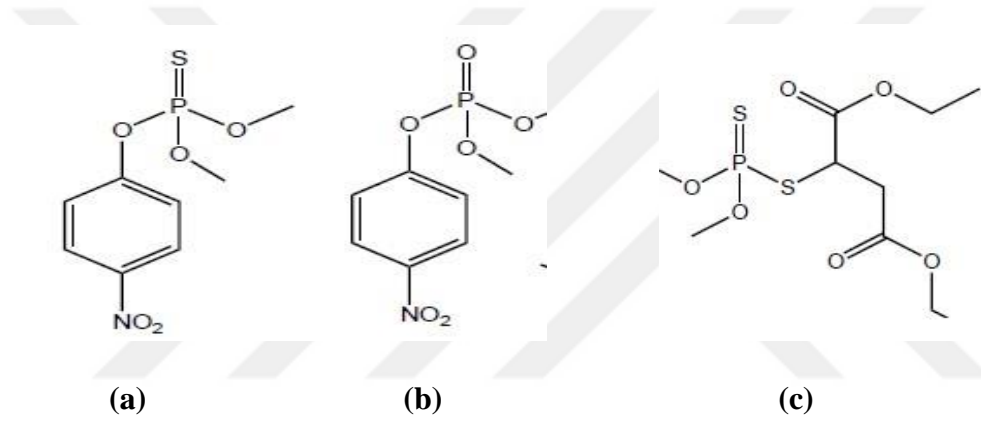
Organofosfor içeren böcek ilaçları

OP'ların tarımda ve evlerdeki haşerler için kullanımı yaklaşık 50 yılı aşkın bir zamandır sürmektedir. OP'ların büyük miktarda sentezi II. Dünya Savaşından sonra başlamıştır ve "parathion" bunlar arasında ilk büyük çaplı üretilendir. Parathionun ardından malathion ve azinofosmetil piyasaya çıkmıştır. Genel olarak OP insektisitleri; etil parathion, malathion, metil parathion, klorprifoz, diazinon, diklorvos, fosmet, fenitrothion, tetraklorvinfos, azinfos, metil, pirimiphos-metil, dimetoat ve phosalone dur (Cox, 1992; Green ve Pohanish, 2005).

1970'lerde organoklorlu DDT, dieldrin, aheptachlor insektisitleri doğada uzun süre etkileri sürdüğü ve çevrede biriktiği için yasaklanmıştır. Bu ilaçların yerini daha hızlı çözünen OP'lar almıştır. OP'lar her ne kadar çok hızlı bozunarak organoklorlara rakip olsa da akut toksisiteyi organoklorlara göre çok daha fazladır. Üretiminde çalışanlar ve tarımda uygulamalarını yaparak büyük miktarlara maruz kalanlar için çok tehlikelidir (Pekkonen ve Zhang, 2002). OP'lar tarımda bilinçsiz kullanımları, intiharlarda ve kazara kullanımları sonucu dünya genelinde en çok zehirlenmelere sebep olurlar. OP pestisitleri

solunum, sindirim yoluyla ve deriden emilim ile emilirler, toksiklikleri akut fazla sınırlı değildir ve kronik etkileri uzun süre devam eder (Ray ve Richard, 2001; Kristic ve ark., 2007; Colovic ve ark., 2010). OP'lara defalarca maruz kalan tarım ve ilaç işçileri maruz kalmanın şiddetine bağlı olarak hafız zayıflığı, konsantrasyon ve yer ve oriyantasyon tayininde güçlük yaşarlar. OP'ların çok küçük miktarlarının bile gelişmekte olan organizmalarda nörotoksik olduğu, sinir sistemi ve bağışıklık ile ilgili bazı hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (WHO, 1986).

OP içeren kimyasal silahlar sarin, soman, siklosarin ve VX dir. sarin, soman, siklosarin fosforidatları içerirken ikem VX fosfonotiyot içerir.



Şekil 1.14. Bazı insektistlerin genel yapısı. a: metil parathion, b:metil paraoksinin c: malathion (Colevic, 2013)

OP içeren kimyasal silahlar sarin, soman, siklosarin ve VX' dir. sarin, soman, siklosarin fosforidatları içerirken VX, fosfonotiyot içerir. Bu oldukça zehirli sinir ajanlarının gelişmesi ve üretimleri 1930'larda başlamış ve daha sonra savaşlarda ve terör saldırılarında kullanılmıştır. Bu ajanların toksisiteleri, enzimi geri dönüşümsüz inhibe etme dereceleri göre değişir, toksiklik sıralamasında VX en başta olanıdır. Bu silahlara maruz kalıp kurtulanların ilerideki hayatlarında kronik sinir sistemi bozuklukları ve psikolojik bozukluklar görülür.

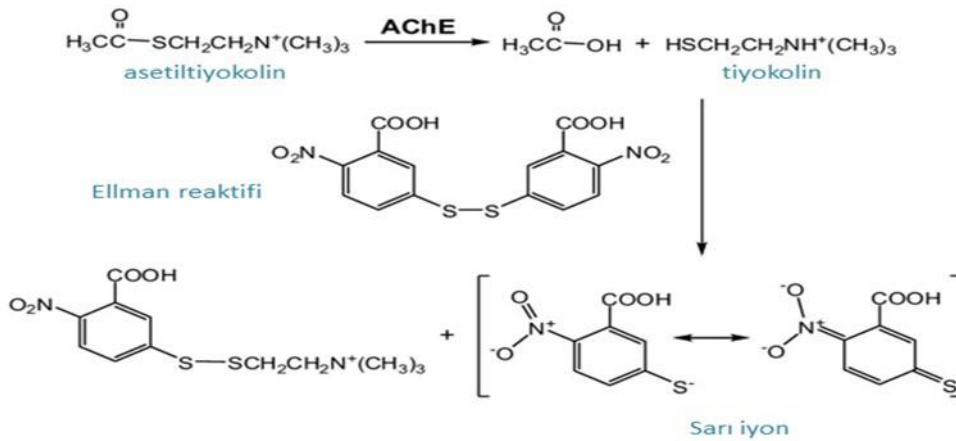
Tedavi amaçlı kullanılan geri dönüşümsüz inhibitörler

OP'ların optik sinirlerin hasar görüp göz içi sıvısının aşırı arttığı, körlüğe sebep olabilen glukom hastalığının tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Göz damlası olarak

uygulanan bu ilaçlar diziopropil florofosfat, ve eckotiyophate içerirler. OP bileşiklerinin oftalmolojik kullanımlarının yanı sıra Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Triklorfon (metrifonate) bir zamanlar pestisit olarak piyasaya sürülmesine rağmen karbamat olan rivastigmine alternatif olarak kullanılmaktadır (Colevic, 2013).

1.2.4. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi

AChE spektrofotometrik olarak Ellman yöntemine göre tayin edilecektir. Ellman yönteminde, substrat olarak oksi ester olan asetilkolin yerine tiyol ester olan asetiltiyokolin kullanılır. Ellman metodunun prensibine göre asetiltiyokolin, asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilir ve hidroliz sonucu açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olan DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucunda sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Reaksiyon sonunda oluşan bu sarı renkli bileşiğin oluşum hızı (rengin şiddeti), 405 nm de absorbans ölçümü yapılarak belirlenir. Bu sarı rengin şiddeti, AChE aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Şekil 1.15. Ellman reaktifi ile asetiltiyokolinden AChE enzimi varlığında tiyokolin oluşum reaksiyonu (Ellman ve ark., 1961).

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan

saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımını ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bununla birlikte endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılmaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler reaksiyon ortamını kirleteceğinden tercih edilmez. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (D'Sauza, 1998; Datta, 2013; Cao, 2006).

Son yıllarda immobilize enzimler besin üretiminde, farmasötiklerde ve diğer önemli alanlarda kullanılmaktadır. Biyoteknolojinin aktif çalışma alanı olan immobilize enzimler, diğer serbest formlarına göre birçok avantajlar sunmaktadır. Immobilize enzimler kolay yenilenebilir ve endüstriyel işlemler aracılığı ile düşük maliyetle kolaylıkla elde edilebilirler.

Endüstriyel uygulamaların çoğunun sulu çözeltilerde gerçekleşmesi ve enzimlerin de suda çözünüyor olmaları nedeniyle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak immobilize edilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre pek çok üstünlüğü vardır:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.
- Sıcaklık, pH gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- Tekrar kullanılabilir özelliğe sahiptirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır ve enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir ve ürünün enzimle kontaminasyonu gibi bir durum söz konusu değildir.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir (Börner, 2014).

1.3.1. İmmobilize enzimlerin ticari kullanımı

İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimlerden daha fazla aktivite gösterebilir. İmmobilize enzimler başlıca gıda ve farmasötik kimya alanlarında kullanılır. Enzim immobilizasyonuna alternatif yöntem tüm hücrelerin immobilizasyonudur. İmmobilize enzimler ekonomik ve katıldıkları reaksiyonlarda çok verimli oldukları için ticari kullanımlarda çok büyük bir öneme sahiptir.

Kimyasal reaksiyonlarda üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ Uygunluk: Eser miktarda enzim proteini reaksiyon çözeltine geçer. Bundan dolayı immobilize enzimlerle çalışması daha kolaydır. Reaksiyon bittiğinde ortamda yalnızca çözücü madde ve ürün kalır.
- ✓ Ekonomik: İmmobilize enzimin kolayca ortamdan alınabilmesi ve tekrar kullanıma elverişli olması.
- ✓ Stabilitate: İmmobilize enzimler enzimin çözünebilir formundan çok daha büyük termal ve operasyonel stabiliteye sahiptir.

Geçmişte, biyolojik yıkama tozları ve deterjanlar kiri parçalayabilen birçok serbest proteaz ve lipaz enzimi barındırırdı. Ancak bu enzimler cilde değdiğinde alerjik reaksiyonlara sebep olabildiklerinden söz konusu enzimlerin immobilize edilmesiyle sorun giderilmiştir. Bu durum enzim immobilizasyonunun yalnızca ekonomik olarak değil sağlık açısından da önemli olduğunu gösterir (Kent, 2007).

1.3.1.1. İmmobilizasyonda matriks (taşıyıcı destek) materyalleri

Taşıyıcı destek materyalinin şekli, yoğunluğu, porlu yapısı, por büyüklüğünün dağılımı, operasyonel kararlılığı immobilizasyonun sonucunu etkiler. İdeal destek materyali ucuz, reaksiyon vermez, fiziksel olarak sağlam ve stabil olmalı, enzimin spesifikliğini arttırmalı, optimum pH değerini işlem için istenen değere kaydırabilmeli, mikrobiyal çoğalmayı ve spesifik olmayan adsorpsiyonu önleyebilmelidir. Taşıyıcı materyaller başlıca organik ve inorganik olmak üzere iki sınıfa ayrılır:

- Organik taşıyıcı materyaller: polisakkaritler (selüloz, kitin, dekstran), karbon polimerleri, proteinler (kollajen, albümin), vinil ve allil polimerler, polistiren,

poliakrilamit, poliakrilat, polimetakrilat poliamidler (kalsiyum aljinat, agar, Kcarrageenin)

- İnorganikler: Aktif karbon, bentonit, silika, porlu seramikler, metaller, metal oksitler. Bu materyaller tanecikli, zar ve lifli yapıda olabilir.

İyi bir destek materyalinde geçirgenlik, çözünmezlik, hidrofilik karakter, termal, kimyasal ve mekanik kararlılık, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özellikler aranır. Bu özellikler enzim aktifliğinin korunmasına yardım eder. Aşağıdaki tabloda yaygın olarak kullanılan destek materyalleri verilmiştir.

Tablo 1.1. Yaygın olarak kullanılan destek materyalleri

Organik Destekler	Doğal Polimerler	<u>Polisakkaritler:</u> Seluloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat
		<u>Proteinler:</u> Kollojen, albumin
		<u>Aktif Karbon</u>
	Sentetik Mineraller	<u>Polistiren</u>
	<u>Diğer polimerler:</u> Poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamit, poliamidler, vinil, alil polimerler	
İnorganik Destekler	<u>Doğal mineraller:</u> Bentonit, silika	
	<u>İşlenmiş Materyaller:</u> Cam (nanporoz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler	

1.3.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri genel olarak ikiye ayrılır:

1. Bağlama

- Çapraz bağlama
- Enzim kopolimarizasyonu
- Taşıyıcı bağlama
 - ✓ Fiziksel adsorpsiyon
 - ✓ Adsorpsiyon ve çapraz bağlama
 - ✓ İyonik bağlama
 - ✓ Şelat bağlama

- ✓ Kovalent bağlama
- ✓ Biyospesifik bağlama

2. Tutuklama

- Jelde tutuklama
- Mikrokapsülleme
- Lipozom tekniği

Enzim immobilizasyon yöntemleri yukarıdaki gibi çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir fakat genel olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırmak mümkündür.

1.3.2.1. Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yönteminde suda çözünmeyen polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu sağlanır ya da çok sayıda enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumu sağlanır. Kimyasal yöntemlerde serbest enzim geri kazanılmaz. Kimyasal yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

Kovalent bağlanma: Kovalent bağlanma, geri dönüşümsüz bir immobilizasyon metodudur. Enzim immobilizasyon yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu metodun yaygınlığı bağların stabilitesi ile ilişkilidir ve çevreye enzim salınımını önleyen bu yöntem enzim ile destek materyali arasında gerçekleşir. Daha da önemlisi, herhangi bir engel olmaması nedeniyle enzim ve substrat arasında sınırsız bir ilişki kurulur. Artan biyokatalizör dengesi de bu yöntemin avantajlarından. Kovalent bağlanma yönteminin kullanılabilirliğini belirleyen en önemli faktör enzimin direkt olarak bağlanmasıdır. En yüksek aktivite seviyesini elde etmek için aktif merkezin amino asitleri destek materyaline bağlanmamalıdır. Matriks tipine ve substrata bağlı olarak türetilmiş birçok yol mevcuttur. İmmobilize edilecek enzimlerdeki aktif gruplara bağlı olarak enzimle desteğin birleştirilmesinin iki yolu vardır. Ya herhangi bir değişiklik olmadan reaktif işlev grupları eklenir, ya da aktive olmuş gruplar oluşturmak için destek materyali değiştirilebilir. Her iki durumda da protein üzerindeki güçlü nükleofillerle reaksiyona girecek destek üzerinde elektrofilik gruplar oluşturmak arzu edilen bir durumdur.

- Çapraz bağlanma: Küçük yapıdaki reaktifler herhangi bir katalizöre ya da destek materyaline ihtiyaç duymadan kendi aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen yapılar oluşturabilirler. Bu prensiple gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemine çapraz bağlanma metodu denir. Bağlanmalar molekül içi veya moleküller arası olabilir. Enzimin geri kazanımı mümkün değildir. Enzimin aktivitesini büyük ölçüde düşürmemek için bağlanma bölgesinin aktif bölgede olmamasına dikkat edilir. Bu yöntemin özellikleri kovalent bağlama metoduna benzer.

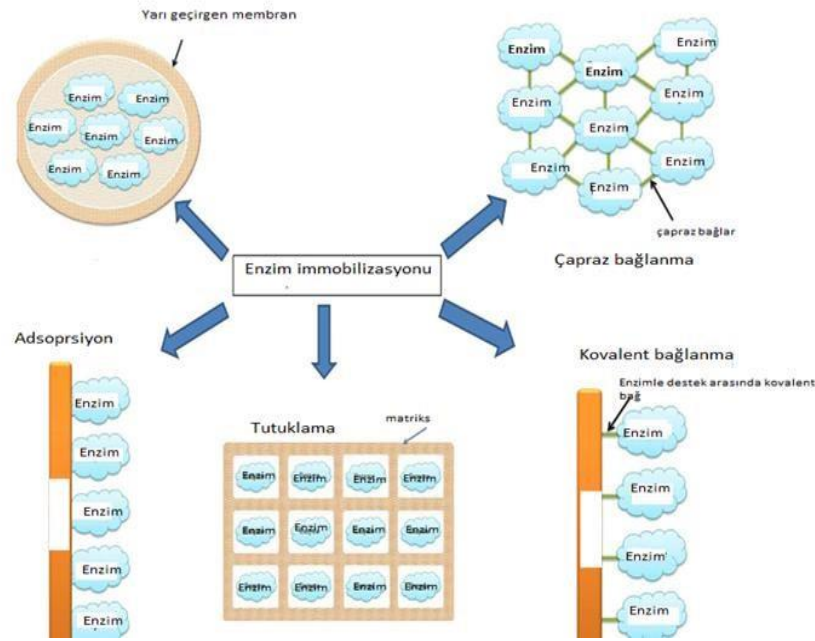
1.3.2.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemlerde ise enzimin belirli bir yere tutunması sağlanır. Bu fiziksel tutunma gerçekleştirilirken iyonik bağ oluşumu ve elektrostatik denge gibi çeşitli fiziksel etkileşimlerden yararlanır. Enzimin tutunduğu yerler destek materyalinin içindeki mikrobölmeler veya gözenekli membranlardır. Fiziksel yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

- Adsorbsiyon ile immobilizasyonu: Bu metod en basit ve en eski olan immobilizasyon metodudur. Bu metotla katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorbsiyonu veya iyonik bağlanması gerçekleşir. Fiziksel adsorbsiyonu gerçekleştiren kuvvetler, hidrojen bağları Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma kısmında ise proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin zıt yükleri arasında bir çekim gerçekleşir.
- Tutuklama (entrapment): Polimer maddelerde ya da yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsolması yöntemidir. Enzimin sulu bir polimer çözeltisinde veya monomer çözeltisinde çözülmesi gerekir. Polimerin oluşturulması, UV radyasyonu, gama ışınları veya ısıyla başlatılır. Oluşturulan ve hidrofilik olan polimer içerisinde enzim hapsedilir. Polimer, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verip ürünü hapsedmelidir. Bu yüzden polimerin yeteri kadar sıkı olması gerekir. Bu metot kullanılarak, bütün hücreler, farklı büyüklükteki mikroorganizmalar, diğer biyokatalizörler hapsedilebilir. Bu teknik matriks ve mikrokapsül olarak ikiye ayrılır. Enzim kalsiyum aljinat gibi çözünmeyen kafeslerde ve mikrokürelerde hapsedilir. Bu yöntemde enzim jel monomerleriyle inkübe edilir. Matrikste tutuklamada poliakrilamid ve polimetakrilamid jeller, membranda hapsedmede selüloz nitrat ve naylon türevleri yaygın bir şekilde

kullanılır. Polimerizasyon UV, IR ve gama ışınlarıyla başlatılır. Materyalin substrat geçirgenliği için por büyüklüğüne dikkat edilir. Ancak bu çözünmeyen matriks maddesi substrat girişini ve ürün çıkışını büyük ölçüde engeller. Çözeltiye enzim sızıntısı da olabilir. Bu dezavantajları matriks ve membran materyali modifiye edilerek büyük ölçüde giderilebilir.

- Enkapsülasyon: 1-100 mm µm çap uzunluğundaki enzim damlacıklarının bulunduğu hidrokarbon çözücünün enzim damlacıklarının çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı mebranlar adı verilmektedir. Bu yöntem ile aynı anda birçok enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin dezavantajları ise; substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağlı olmasıdır (Colecic, 2013; Sirisha ve ark., 2016).

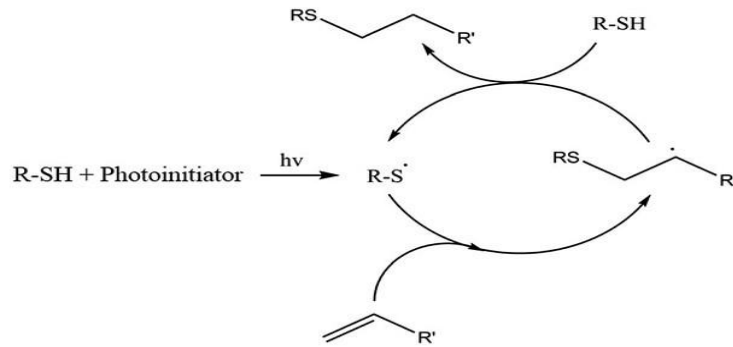


Şekil 1.16. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Sirisha ve ark., 2016).

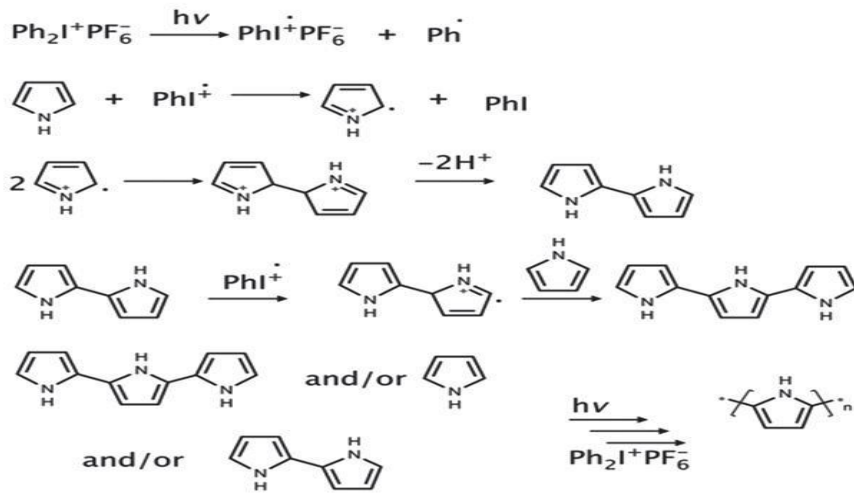
1.4. Epoksi polimerlerin hazırlanması

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda epoksi bileşikleri içeren tiyol-en formülasyonlarında epoksi dönüşümlerinin az olduğu (%20'den az) bilinmektedir. Bu durum daha çok nükleofilik tiyol gruplarının oksonyum iyonları ile reaksiyona girip katyonik polimerizasyonu inhibe etmesine bağlıdır (Ortiz, ve ark., 2007). Sonuçta serbest epoksi gruplarının reçine içerisinde kalacağı öngörülebilir ve enzimler açıkta kalan

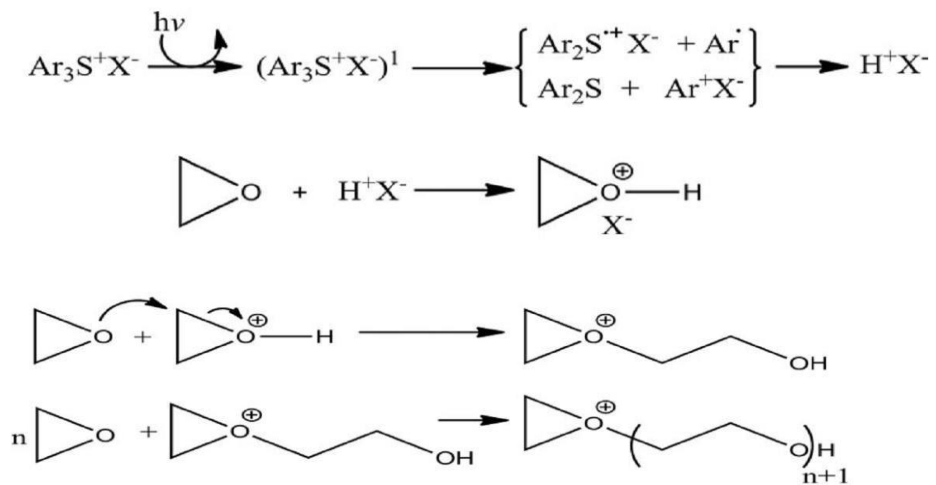
epoksi grupları üzerinden bağlanabilir. Aşağıda, yukarıda bahsedilen reaksiyonlara ait mekanizmalar verilmiştir.



Şekil 1.17. Tiyol-en polimerizasyonunun mekanizması (Razza, ve ark., 2017)



Şekil 1.18. UV ile pirolün katyonik polimerizasyonunun mekanizması (Razza, ve ark., 2017). Burada kullanılan katyonik başlatıcı bir diariliyodonyum tuzudur.



Şekil 1.19. Foto başlatılmış katyonik polimerizasyon ile epoksi gruplarının dönüşümüne ait mekanizma (Atif ve ark., 2015).

1.5. İlgili Literatür Işığı Altında Çalışmanın Yeri

AChE, kolinerjik sinapslarda uyarıların iletimini sonlandırdığından nörotransmisyon esnasında önemli rol oynar. Pestisitler, AChE enzimini geri dönüşümsüz inhibisyon mekanizması ile inhibe ederler. Bu inhibisyon AChE miktarındaki azalma ile tayin edilebilir. AChE ölçümünden yararlanan pek çok biyosensör çalışmaları vardır (Chauhan ve Pundir, 2011).

Enzim immobilizasyonu enzimlerin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini artırması bakımından ekonomik olarak avantajlar sağlar (Tanriseven ve Dogan, 2002; Mateo ve ark., 2007). İmmobilize enzimler sürekli kullanımları ve reaksiyon ortamından kolayca ayrılmaları bakımından tercih edilirler (Haider ve Husain, 2007). Çözünmeyen materyale adsorpsiyon, polimer jelde tutuklama, membranda enkapsülasyon, bifonksiyonel ya da multifonksiyonel reaktiflerle kimyasal çapraz bağlanma ve çözünmeyen taşıcılara bağlanma şeklinde çok çeşitli enzim immobilizasyonu teknikleri vardır (Elnashar ve Yassin, 2009).

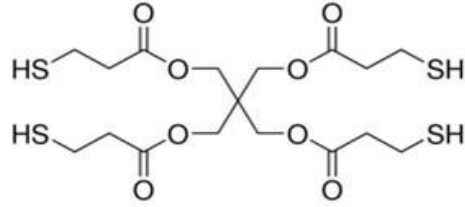
AChE enziminin immobilizasyonu ile ilgili literatürde çok çeşitli çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda serbest ve immobilize enzimin aktivite özellikleri ve kinetik parametreleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda AChE enzimini, Tümtürk ve arkadaşları aljinat jel mikrokürelerine, Moradzadegan ve arkadaşları nanofiber PVA/BSA membran üzerine, Stoilova ve arkadaşları nanofiber poliakrilonitril membran üzerine, Stoilova ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada stiren-maleik anhidrit kopolimer destek materyaline immobilize etmişlerdir (Tümtürk ve ark., 2007; Moradzadegan ve ark., 2010; Stoilova ve ark., 2010a; Stoilova ve ark., 2010b).

Bu çalışmada immobilize ve serbest AChE enziminin optimal sıcaklık ve pH değerleri belirlenmesi, kinetik özelliklerinin, immobilize enzimin tekrar kullanımının ve depolama kararlılıklarının incelenmesi hedeflenmiştir.

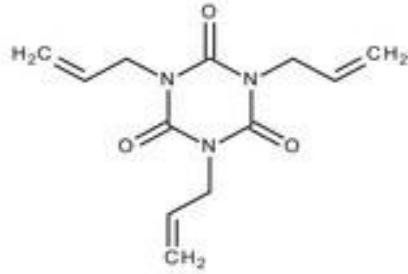
2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

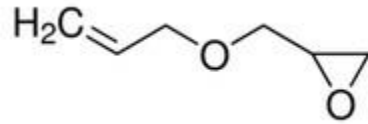
Pentaeritritoltetrakis(3-merkaptopropiyonat)(4SH): (Sigma-Aldrich)



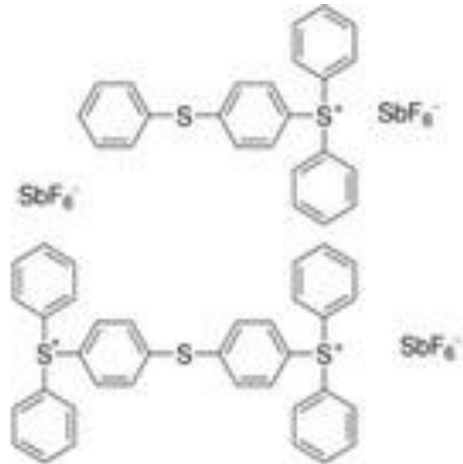
1,3,5-Trialil-1,3,5-triazin-,4,6(1H,3H,5H)-trion (TTT): (Sigma-Aldrich)



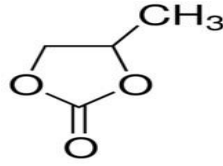
alil glisidil eter (AGE): (Sigma-Aldrich)



Triaril sulfonyum hekzafloroantimonat: (Sigma-Aldrich)

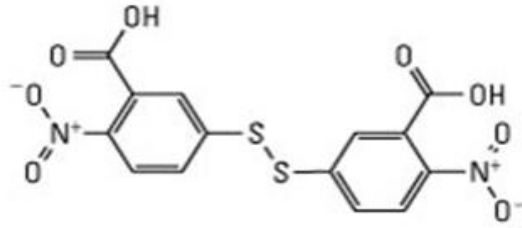


Prorilen karbonat: (Sigma-Aldrich)

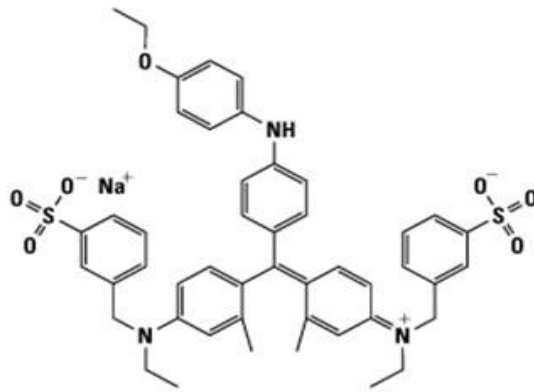


Asetilkolinesteraz Enzim (E.C.3.1.1.7;Asetilkolin asetilhidrolaz): MA:230-280 kDa, *Electrophorus electricus* (electric eel)'tan elde edilmiştir (Sigma-Aldric).

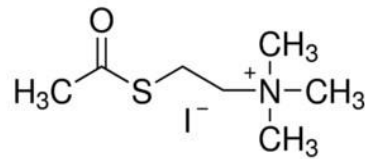
Elman Reaktifi: 5,5'-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)(DTNB):MA:396.35 g/mol. Açık sarı, toz.(Sigma-Aldric)



Bradford Reaktifi:o-nitrofenil β-D-galaktopiranosit (Coomassie Brilliant Blue G250,C₄₇H₄₈N₃NaO₇S₂): Renksiz, toz. MA:854.02 g/mol (Bio-Rad)

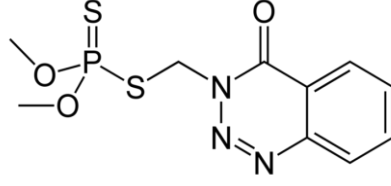


Asetiltiyokolin iyodür: Renksiz, toz. MA:289.18 g/mol (Sigma-Aldric)

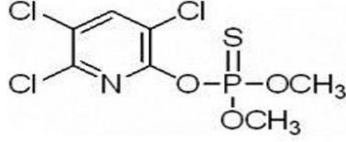


Fosfat Tamponları:NaH₂PO₄.2H₂O, Na₂HPO₄.12H₂O (Sigma-Aldrich)

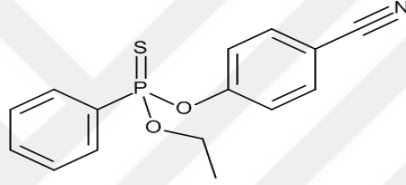
Azinfos Metil (Sigma-Aldrich)



Klorpirifos (Sigma-Aldrich)



Siyanofenos(Sigma-Aldrich)



2.2. Araştırma Araçları

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometre: Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FTIR Spektrometre

Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı: Philips XL30SEM FEG

Santrifüj: Sigma, 3K 30 Yüksek devirli, soğutmalı (A.B.D.)

Spektrofotometre: ThermoScientific, Helioszeta UV-VIS (A.B.D.)

Hassas Terazı: SartoriusAnalytic, A200S ±0,0001(Almanya)

-80°C Derin Dondurucu: ThermoElectronCorp., Forma (A.B.D.)

Buzdolabı: Regal (Türkiye)

Su Banyosu: Wasserbad WB Serisi (Almanya)

Vorteks Karıştırıcı: Fisons, Whirlimixer (İngiltere)

Destile Su Cihazı: Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)

Manyetik Karıştırıcı: VelpScientifica, ARE (İtalya)

Etüv: Genlab, midi/2/AL (0-100)(İngiltere) pH

metre: Hanna, HI 9024 (Romanya)

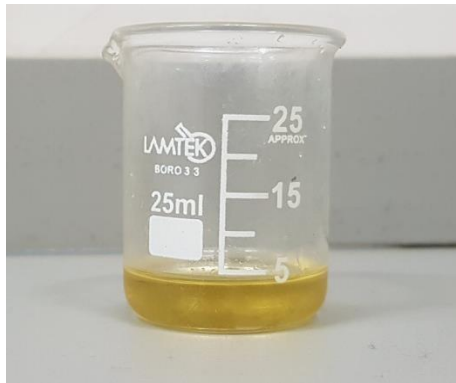
Orbital Karıştırıcı: IKA-Werke, OS 10 B(Almanya)

2.3. Deneysel Yöntemler

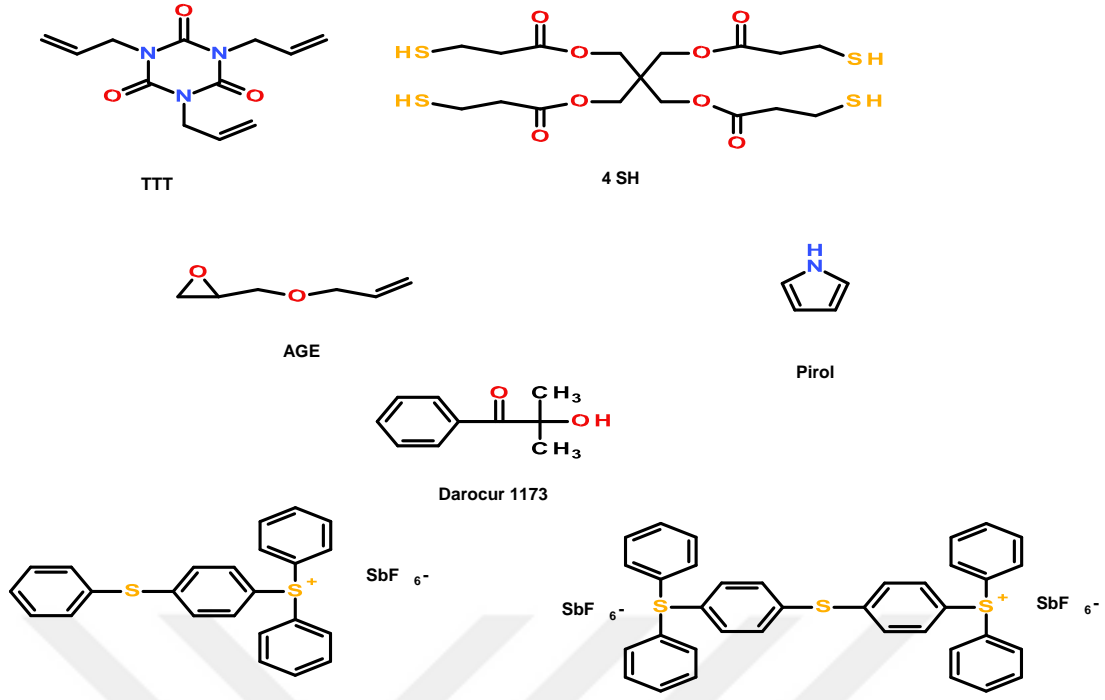
2.3.1. Polimerik destek materyalinin hazırlanması

2.3.1.1. İletken tiyol-ene kürlenebilen filmlerin hazırlanması

İletken tiyol-ene kürlenebilen filmlerin hazırlanması için öncelikle pentaeritritoltetrakis (3-merkaptopropiyonat) (4SH),1,3,5-Triazol-1,3,5-triazin- ,4,6(1H,3H,5H)-trionTTT) ve alil glisidil eter (AGE) ve pirol (hazırlık öncesi vakum altında destillendi) aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda alüminyum folyo sarılı bir beherde karıştırıldı. Çifte bağlı gruplar ile tiyol grupları arasında 1:1 oran olacak şekilde formülasyonlar hazırlandı. Ardından %4 oranında katyonik (Triarilsulfonyum hekzafloroantimonat tuzları, propilen karbonat içerisinde ağırlıkça %50 olacak şekilde karıştırıldı) ve yine %4 oranında radikalik fotobaşlatıcı (Darocur 1173) ilave edildi (Şekil 2.1). Ardından teflon kalıplara dökülen karışım UV ışığı altında 10 dakika sertleştirildi. Kullanılan tüm monomerlerin kimyasal yapıları Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. TE-APCR kodlu malzeme asıl, enzim bağlanması için hazırlanmış olup diğer formülasyonlar pirolün ve katyonik başlatıcının etkisini anlamak amacıyla hazırlanmıştır.



Şekil 2.1. Pirol içeren tiyol-en kürlenebilen sıvı formülasyon



Şekil 2.2. Kullanılan tüm monomerlerin kimyasal yapıları

Tablo 2.1. Pirol içeren tiyol-en kürlenebilen bileşenler ve formülasyonları

Kimyasal	TE-APCR	TE-PCR AGE içermeyen	TE-ACR Pirol içermeyen	TE-APR Kationik fotobaşlatıcı içermeyen
AGE	0,5707 g (0,005 mol)	-	0,5707 g (0,005 mol)	0,5707 g (0,005 mol)
TTT	1,2464 g (0,005 mol)	1,2464 g (0,005 mol)	1,2464 g (0,005 mol)	1,2464 g (0,005 mol)
4SH	2,445 g (0,005 mol)	1,8325 g (0,00375 mol)	2,445 g (0,005 mol)	2,445 g (0,005 mol)
Pirol	10% **	10%	-	10%
Kationik foto başlatıcı	4% **	4%	4%	-
Radikalik foto başlatıcı	4% **	4%	4%	4%

*TE: Tiyolen, A:AGE, P:Pirol, C: Kationik foto başlatıcı ** Toplam tiyolen bileşenleri içinde pirolün %'si 10 (AGE+TTT+4SH), başlatıcıların %'si 4 tür (AGE+TTT+4SH).

Hazırlanan formülasyonlar enzim uygulamaları için 3mm çaplı dairesel kalıplarda kürlendi.

2.3.1.2 Polietilenimin modifiye filmlerin hazırlanması

%30'luk PEI çözeltisinden 1g alınarak 30 mLsu ile seyreltildi. Hazırlanan 6 mm çaplı silindirik filmler bu çözelti içine atılarak 24 saat 40 derecedeki su banyosunda karıştırıldı.

2.3.1.3. Polimerik desteğin karakterizasyonu

Hazırlanan polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası fonksiyonel grup analizleri Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak yapıldı. Spektrumlar Perkin Elmer Spektrum 100ATR-FTIR Spektrometre cihazı ile 400-4000 cm^{-1} aralığında kaydedildi. Philips marka XL30SEM FEG model Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı kullanılarak polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası görüntüleri morfolojik olarak incelendi.

2.3.2. Polimerik desteğe AChE enzimin immobilizasyonu

Polietilenimin sonlu polimerik film %25'lik glutaraldehit ile aktive edildi. Aktive edilmiş PEI ve epoksi sonlu polimerik filmler tartıldı. Polimer filmler 25 mL'lik beherlerde bulunan 63 $\mu\text{g}/10$ mL pH 7 fosfat tamponu çözeltilerine konuldu. 8 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi. Polimerik yüzeylere immobilize olan enzim miktarları Bradford protein tayin metodu ile tayin edildi.

2.3.3. Bradford metoduna göre protein tayini

İmmobilize olan enzimin miktar tayini Bradford yöntemine göre yapıldı (Bradford 1976).

1. 2mg/mL ovalbumin stok çözeltisi 0.1 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek, standart olarak kullanıldı.
2. Standart çözeltilerden 20 μL (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 40 μL (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 60 μL (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 80 μL (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) olacak şekilde alındı.
3. Örnekten 100 μL alındı.

4. Standart ve örneklerin son hacmi distile su ile 800 µL'ye tamamlandı.
5. Referans olarak 800 µL distile su kullanıldı.
6. Standart, referans ve örnek çözeltilerine 200 µL Bradford reaktifi ilave edildi, tüpler iyice karıştırıldı.
7. 15 dakika sonra 595nm'de referans çözeltisine karşı absorbans ölçümleri yapıldı.

2.3.4. Standart grafiğinin hazırlanması

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0.5-2 mM) asetiltiyokolin iyodür çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 100µL alınıp, içerisinde DTNB çözeltisi (100 µL, 2 mM), 50 µL enzim çözeltisi ve 1.8mL 10 mM pH 7.0 fosfat tamponundan ilave edildi. 10 dakika sonra UV spektrofotometresi kullanılarak 412 nm' de aynı şekilde hazırlanan ancak substrat içermeyen kör çözeltisine karşı absorbans değerleri ölçüldü. Asetiltiyokolin iyodür konsantrasyonlarına karşı absorbans grafiği çizildi.

2.3.5. Aktivite tayini

Serbest ve epoksi grupları ve polietilenimin (PEI) üzerinden immobilize edilen AChE enzimi aktivite tayini spektrofotometrik olarak Ellman metoduna göre yapıldı (Elman ve ark., 1961). Distile suda hazırlanan 2 mM asetiltiyokolin iyodür çözeltisinden 100 µL, 2 mM 10 mM pH 8.0 fosfat tamponunda hazırlanan DTNB çözeltisinden 100 µL, 1.8 mL 10 mM pH 8.0 fosfat tamponundan 1.8 mL alındı. Üzerine 50 µL (0.308µg) enzim çözeltisinden eklendi. 10 dakika 37°C'de 100 rpm hızla karıştırıcılı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda aynı içerikle hazırlanan fakat substrat içermeyen köre karşı 412 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

İki ayrı desteğe immobilize edilen enzimin de aktivite tayini yukarıda anlatıldığı şekilde yapıldı. Sadece serbest enzim yerine tartımı alınmış immobilize enzim konuldu.

$$\text{Aktivite (IU/mg)} = \text{ATChI}(\mu\text{g}) / (\text{Enzim miktarı}(\mu\text{g}) \times 10\text{dk})$$

2.3.6. Serbest, epoksi grupları ve polietilenimin (PEI) üzerinden immobilize edilen enzimin pH'a bağı olarak aktivite değişimi

pH 7-9 aralığında değişik pH'larda fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. Bu tampon çözeltiler kullanılarak serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi incelendi ve aktivite ölçümü yapıldı. Aktivite hesabı yukarıdaki formüle göre yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağı Aktiviteye karşı pH grafiği çizildi.

2.3.7. Serbest, epoksi grupları ve polietilenimin (PEI) üzerinden immobilize edilen enzimin sıcaklığa bağı aktivite değişimi

Serbest ve epoksi ve PEI üzerinden immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (25°C-55°C) aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağı Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği çizildi.

2.3.8. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerinin aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimleri kullanılarak (0.1-2.0 mM) ölçüldü ve Lineweaver–Burk grafiği yardımıyla Km ve Vmaks değerleri hesaplandı.

2.3.9. İmmobilize enziminlerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Tartımı alınmış immobilize enzim üzerine 2 mM distile suda hazırlanan asetiltiyokolin iyodür çözeltilisinden 100 µL, 2 mM 10 mM pH 8.0 fosfat tamponunda hazırlanan DTNB çözeltilisinden 100 µL, 1.8 mL 10 mM pH 8.0 fosfat tamponundan 1.8 mL ilave edildi. 10 dakika 37°C'de 100 rpm hızla karıtırcılı su banyosunda inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda aynı içerikle hazırlanan substrat içermeyen köre karşı 412 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. İmmobilize enzimin bulunduğu çözeltiden alındı, yıkanıp kurulandıktan sonra tekrar temiz bir tüpe konuldu. İmmobilize enzim üzerine yukarıda anlatıldığı şekilde çözeltiler eklenerek deney tekrarlandı. Geriye kalan karışımın 412 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Deneme anlatıldığı şekilde her defasında immobilize enzim karışımdan çıkarılarak tekrar edildi. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer

sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı kullanım sayısı grafiği çizildi.

2.3.10. Serbest ve immobilize enzimler üzerine depolama kararlılıklarının etkisi

Serbest ve immobilize AChE enziminin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C'de ağzı kapalı şişelerde bekletildi ve bu enzimlerin aktiviteleri 2 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür.

2.3.11. Serbest ve immobilize enzimler üzerine metal etkisi

0.1 mM Mn⁺², Mg⁺², Cu⁺², Zn⁺², Ca⁺² metal tuzları zelteleri distile suda hazırlandı.

Serbest ve immobilize enzim aktivite tayini metal iyonları varlığında yapılarak aktivitedeki değişiklikler kaydedildi.





2.3.12. Serbest ve immobilize enzimler üzerine pestisit etkisi

Azinofos metil, klorpirifos, siyanofenfos pestisitleri 0.01µg/10µL asetonitril zeltelerinde hazırlandı. Serbest ve immobilize enzim aktivite tayini  farklı pestisit varlığında yapılarak aktivitedeki değişiklikler kaydedildi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Polimerik Desteğin Sentezi ve Karakterizasyonu

Elde edilen malzemelere ait fotoğraflar aşağıda verilmiştir.

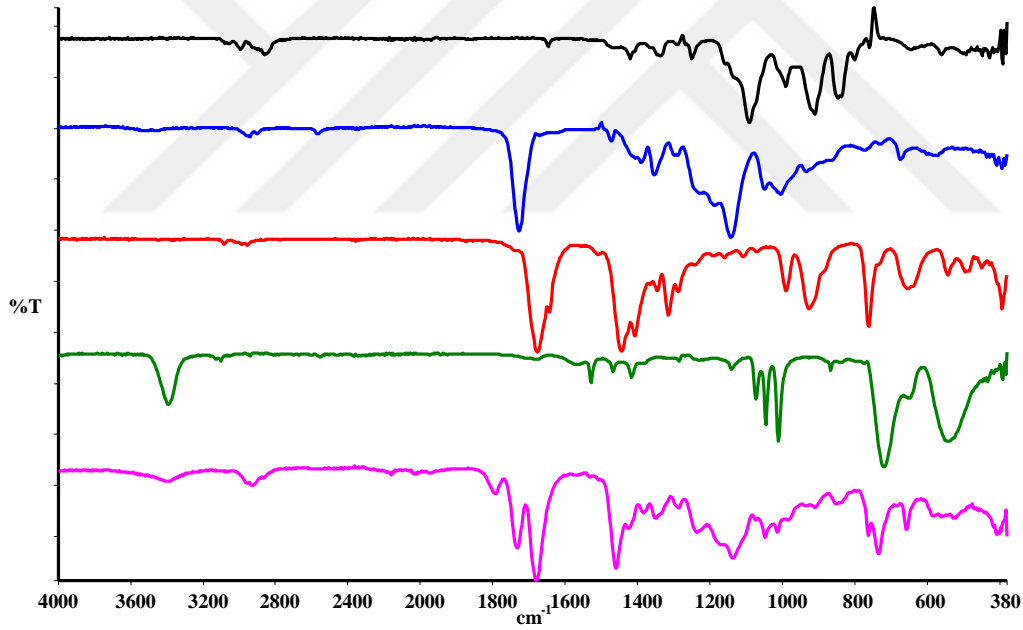
TE-APCR	TE-PCR (AGE free)	TE-ACR (Pyrrole free)	TE-APR (Katyonik fotobaşlatıcı free)
			

Fotoğraflardan görüleceği üzere pirol içermeyen örnek (**TE-ACR**) transparanken pirol içeren örnek (**TE-APR**) yalnızca radikalik başlatıcı varlığında açık sarı renklidir. AGE kullanılmadan hazırlanan formülasyonda (**TE-PCR**) oluşan kırmızı renk ise pirolün polimerleştiğinin kanıtıdır. Pirol asitlerler muamele edildiğinde kırmızı renkli çözünmez polimerler verirler (Bruce ve ark., 1980). Polipiroller daha çok siyah renkli olmakla birlikte kırmızı halleri de (pyrrole red) bulunmaktadır (Kricheldorf ve ark.,2005). **TEAPCR** kodlu pirol, AGE ve katyonik ile radikalik fotobaşlatıcıları birlikte içeren örnek ise kahverenkli. Bu durum pirolün tamamen değil kısmen polimerleştiğini göstermektedir. Bunun kullanılan katyonik foto başlatıcı tipinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde akirlatlar ile birlikte pirolün katyonik başlatıcılarla polimerleştirildiği çalışmalarda siyah renkli polipirol oluşumu söz konusudur. Örneğin Asmussen ve ark. (2015), pirol içeren metakilat oligomeri karışımını bir diariliyodonyum tuzu (p-(oktilooksifenil)fenilidonyu hekzafloroantimonat (Ph_2ISbF_6) ile birlikte polimerleştirmişlerdir ve elde ettikleri filmler siyah renklidir.

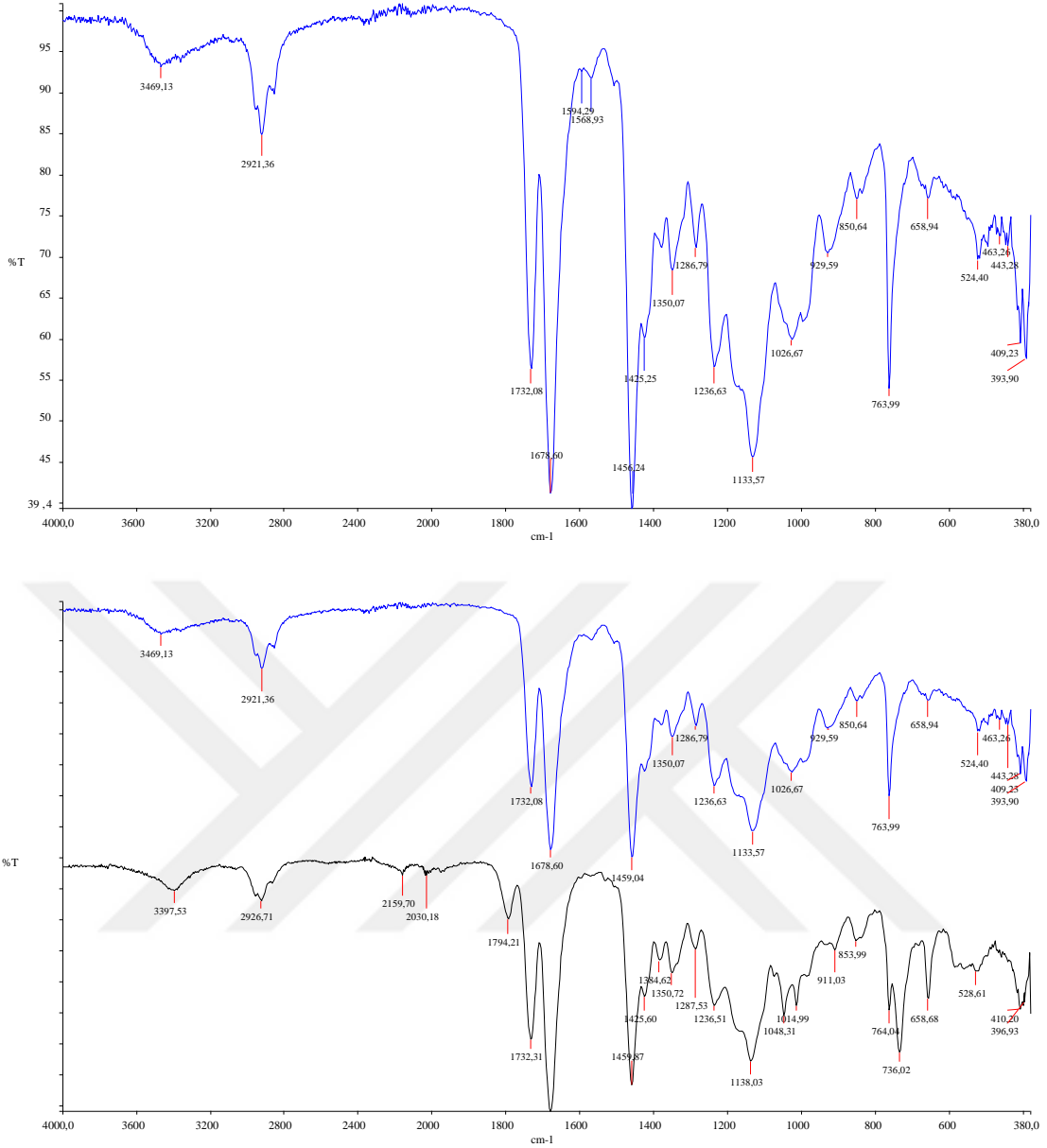
TE-APCR kodlu formülasyonun ve kullanılan monomerlerin AGE, 4SH, TTT ve pirolün FTIR spektrumları Şekil 3.1'de verilmiştir. Burada **TE-APCR**'deki 911 cm^{-1} 'de görülen pik AGE'nin epoksi halkasından kaynaklanmaktadır.

FTIR spektrumunda 2550 cm^{-1} 'de SH piklerinin görülmemesi ve 1645 cm^{-1} 'deki allil piklerinin olmaması filmlerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir. 1732 ve 1680 'deki pikler kullanılan monomerlerin karbonil gruplarına aittir. 1794 cm^{-1} 'deki band ise kullanılan katyonik fotobaşlatıcıdaki propilen karbonata aittir. $2980-2800\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler alifatik $-\text{CH}_2-$ ve CH_3 gruplarına aittir. Polipirole ait pikler tiyol-en monomerlerinin pikleri ile örtüldüğünden çok net olarak görülmektedir 3397 cm^{-1} 'de görülen pik $-\text{NH}$ gerilmelerine aittir.

Şekil 3.2'de PEI modifikasyonu görülmektedir. AGE'nin epoksi pikleri tamamen yok olmuş ve 3500 cm^{-1} civarındaki band $-\text{OH}$ ve amin guruplarına aittir.



Şekil 3.1. AGE (siyah), 4SH (mavi), TTT (kırmızı), pirol (yeşil), ve kürlenmiş filmin (pembe) FTIR spektrumları



Şekil 3.2. PEI ile modifiye edilmiş pirol içeren tiyol-en filmlerin FTIR spektrumları

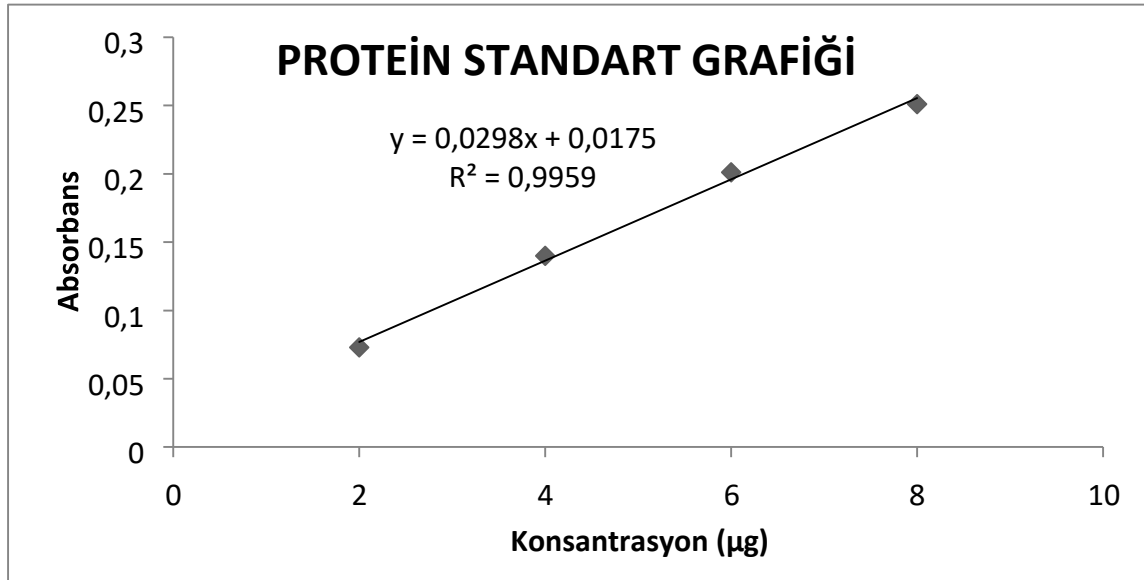
3.2. İmmobilize Olan Enzim Miktarının Hesaplanması

2.3.2’de anlatıldığı gibi AChE enzimi polimerik destek üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize olan enzim miktarı Bradford protein tayin yöntemine göre ovalbumin standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Standart protein grafiği aşağıda Şekil 3.3’te verilmiştir. Başlangıçta kullanılan enzim miktarından immobilizasyon sonunda bulunan enzim miktarı çıkarılarak bağlanan enzim miktarları hesaplanmıştır. Polimere yüklenen, bağlanmayan, bağlanan enzim miktarları ve bağlanma yüzdeleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Çeşitli destek materyalleri kullanılarak AChE enzimi ile yapılmış pek çok immobilizasyon çalışması vardır. Çakıroğlu ve arkadaşları 1g poliakrilik asit temelli nanofiber üzerine 0.4 mg AChE enzimini immobilize olduğunu yatın etmişlerdir (Çakıroğlu ve ark. 2018). Stoilova ve arkadaşları nanofiber poliakrilonitril membranüzerine AChE immobilize ettiklerinde 2.8 mg enzimin 1 g polimere bağlandığını belirlemişlerdir (Stoilova ve ark., 2010a). Tümtürk ve arkadaşları çalışmalarında 1 g aljinat jel mikrokürelerine 0.23 mg enzim bağlandığını bulmuşlardır (Tümtürk ve ark., 2007). Çalışmamızda 1g epoksi filme 47.19µg, 1g PEI filme 33.54 µg enzim bağlandığı bulunmuştur. İmmobilize olan enzim miktarı kullanılan polimere ve reaksiyon şartlarına (pH, zaman gibi) göre değişiklik göstermiştir.

Tablo 3.1. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim miktarları

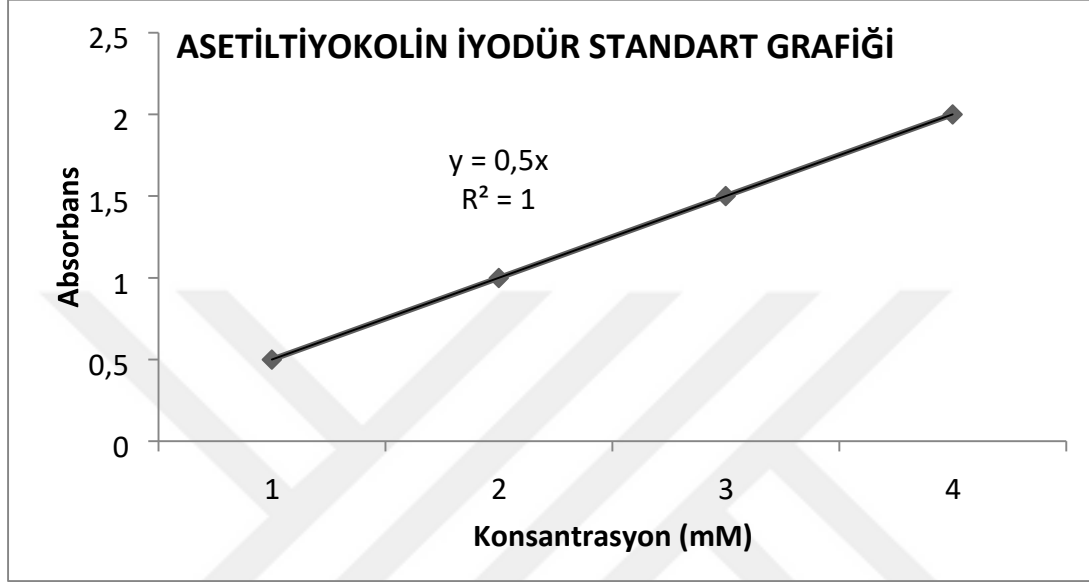
Polimer Filmler	Başlangıçtaki Enzim Miktarı (µg)	Bağlanmayan Enzim Miktarı(µg)	Bağlanan Enzim Miktarı(µg)	Bağlanma Yüzdesi
Epoksi	63	2.73	60.27	95.66
PEI	63	8.18	54.82	87.01



Şekil 3.3. Protein standart eğrisi

3.3. Asetiltiyokolin İyodür Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kalibrasyon grafiği anlatıldığı gibi 0.5-2 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan asetiltiyokolin iyodür çözeltileri ile yapıldı. Asetiltiyokolin iyodür standart grafiği Şekil3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Asetiltiyokolin standart grafiği

3.4. Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize AChE enziminin aktivite tayini 2.3.5'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık, pH, tekrar kullanılabilirlik ve depolama süresi üzerine etkileri incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzimin kinetik değerleri (K_m ve V_{maks}) de saptanmıştır.

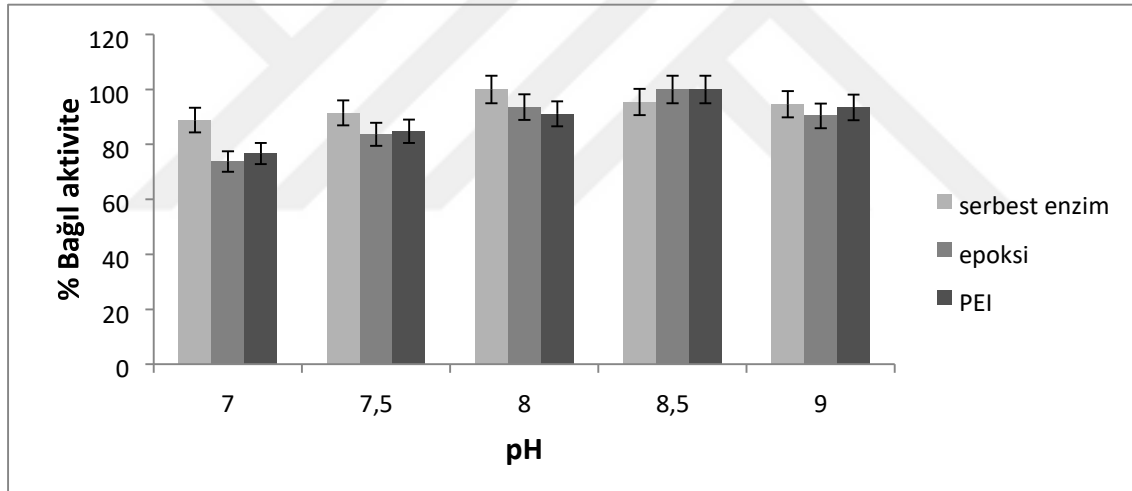
3.4.1. İmmobilize ve serbest enzimin pH'a bağlı olarak aktivite değişimi

Serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi 7-9 aralığında incelenmiştir ve % Bağıl Aktiviteye karşı pH grafiği Şekil 3.5'te verilmiştir. Serbest enzimin pH 8'de maksimum aktivite göstermiştir. Epoksi ve PEI filmler üzerine immobilize enzimler ise pH 8,5'da maksimum aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

Poliakrilik asit temelli nanofiber üzerine (Çakıroğlu ve ark. 2018), mezoporöz silikon yüzeyine (Saleem ve ark. 2016), SiO_2 hibrit membran (Yotova ve Medhat, 2012), aljinat jel mikroküreleri üzerine (Tümtürk ve ark., 2007) AChE enzimini immobilize ettiklerinde

pH 8’de maksimum aktivite gösterdiklerini tayin etmişlerdir. Stoilova ve arkadaşları nanofiber poliakrilonitril membran üzerine AChE immobilize ettiklerinde pH 8.4’te maksimum aktivite gözlemlemişlerdir (Stoilova ve ark., 2010a). Stoilova ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada stiren-maleik anhidrit kopolimer destek materyaline AChE immobilize ettiklerinde pH 8.5’te maksimum aktivite saptamışlardır (Stoilova ve ark., 2010b). Moradzadegan ve arkadaşları nanofiber PVA/BSA membran üzerine AChE immobilize ettiklerinde optimal pH’ı 7.5 olarak tayin etmişlerdir (Moradzadegan ve ark., 2010).

Enzim katı desteğe immobilize edildiğinde optimal pH’ının değiştiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu değişiklik katı desteğin yüzeyinde yük dağılımlarının farklı olması ve enzimin destekle etkileşimi sonucunda, enzimin çevresel yükünün değişmesi olarak açıklanabilir (Kahraman ve ark. 2007). Bizim optimal pH bulgularımız da literatürdeki bulgular ile uyumludur.



Şekil 3.5. İmmobilize ve serbest enzimin pH’a bağlı aktivite değişimi

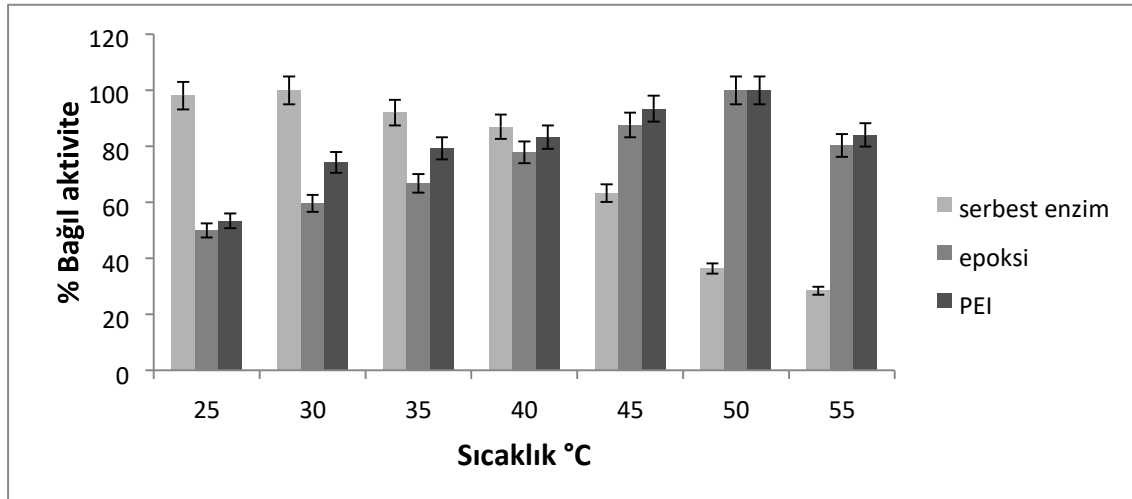
3.4.2. İmmobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı olarak aktivite değişimi

Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi 25-55°C aralığında incelenmiştir ve % Bağlı Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği Şekil 3.6’da verilmiştir. Serbest enzim 30°C’de maksimum aktivite gösterirken epoksi ve PEI üzerine immobilize enzimler 50°C’de göstermişlerdir.

Çakıroğlu ve arkadaşları poliakrilik asit temelli nanofiber üzerine AChE enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin 35°C’de maksimum aktivite gösterdiğini

ayın etmişlerdir (Çakıroğlu ve ark., 2018). Mezoporöz silikon üzerine AChE fiziksel olarak immobilize edildiğinde 50-90°C aralığında yüksek aktiviteye sahip olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Saleem ve ark. 2016). Tümtürk ve arkadaşları aljinat jel mikroküreleri üzerine AChE enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin 35°C’de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Tümtürk ve ark., 2007). Stoilova ve arkadaşları nanofiber poliakrilonitril membran üzerine AChE immobilize ettiklerinde 37°C’de maksimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Stoilova ve ark., 2010a). Stoilova ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada stiren- maleik anhidrit kopolimer destek materyaline AChE immobilize ettiklerinde 32°C’de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Stoilova ve ark., 2010b).

Enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi optimum sıcaklığın artmasına neden olabilir. Bu ise immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesinin korunduğunu; sıcaklık değişimi ile aktif bölgenin konformasyonunun bozulma ve zarar görmesinin engellendiği şeklinde açıklanabilir. Immobilizasyon sonucunda enzimin konformasyonel hareketliliği kısıtlandığından daha kararlı hale gelmiş olması onu dışarıdan gelebilecek etkilere karşı korur. Bu yüzden immobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha aktiftir (Yong, 2008).



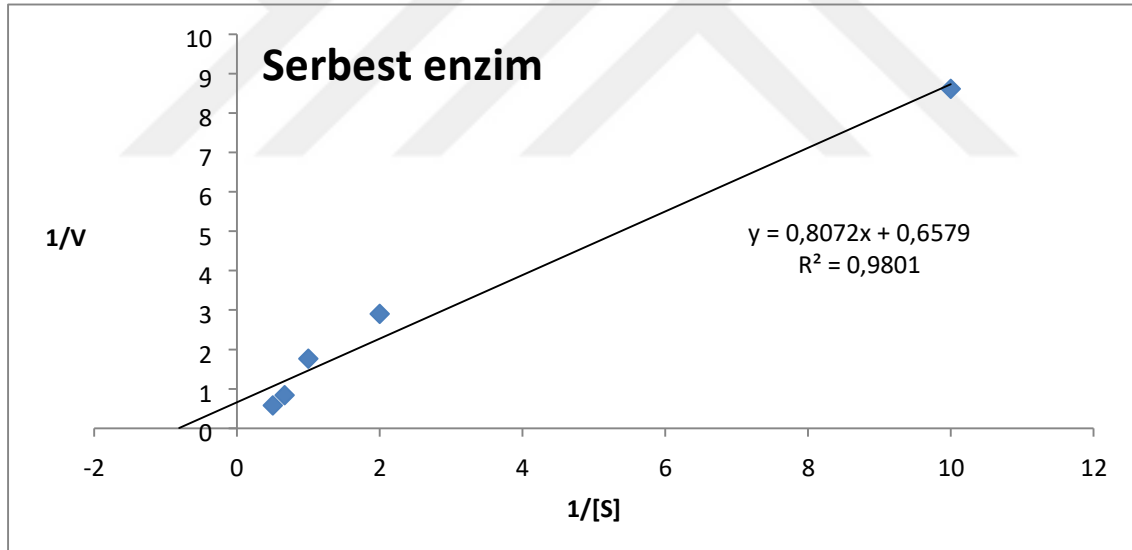
Şekil 3.6. Immobilize ve serbest enzimin sıcaklığa bağlı aktivite değişimi

3.4.3. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi

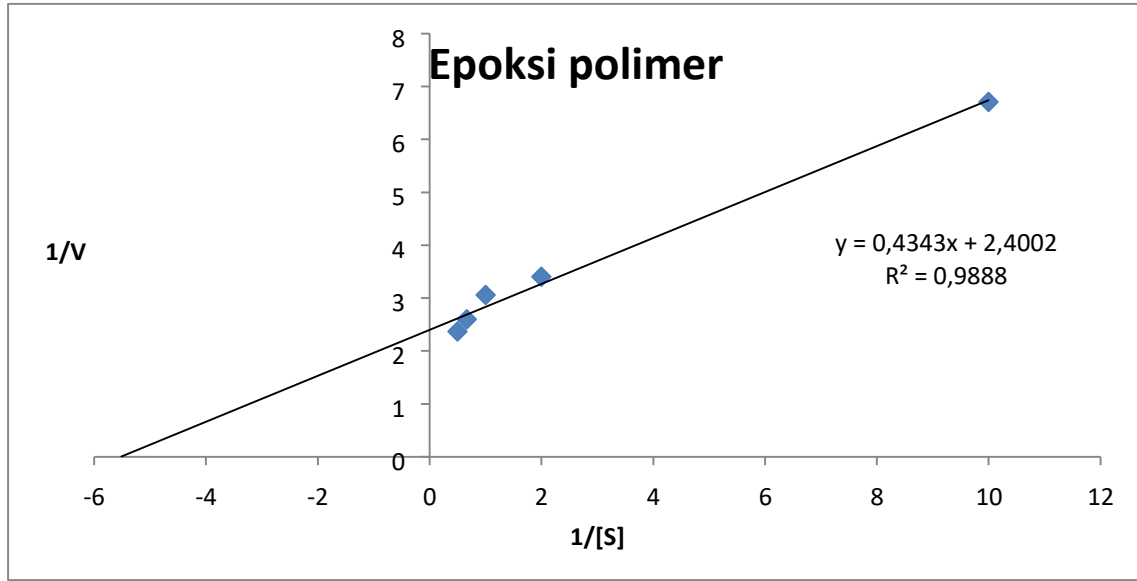
Tez çalışmasında kullanılarak farklı substrat konsantrasyonlarında (0,01-1,5 mM) serbest enzimin Km ve Vmaks değerleri Lineweaver–Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Kinetik değerlerine ait grafikler Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9’da verilmiştir. Serbest enzimin Km

değeri 1.25 mM iken epoksi ve PEI immobilize enzimin K_m değerleri 0.182 ve 0.5 mM olarak bulunmuştur. Serbest, epoksi ve PEI immobilize enzimlerin V_{maks} değerleri sırası ile 1.53 mM/dakika, 0.416 mM/dakika ve 0.018 mM/dakika şeklinde tayin edilmiştir. İmmobilizasyon sonunda V_{maks} ve K_m değerleri azalmıştır. K_m değerinin azalması enzimin substratına olan ilgisinin arttığını göstermiştir. İmmobilize olan enzimin konformasyonel yapısının değişmesi, sterik engel, difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı kinetik parametreler değişiklik gösterebileceği şeklinde açıklanabilir (Bayramoğlu ve ark., 2007).

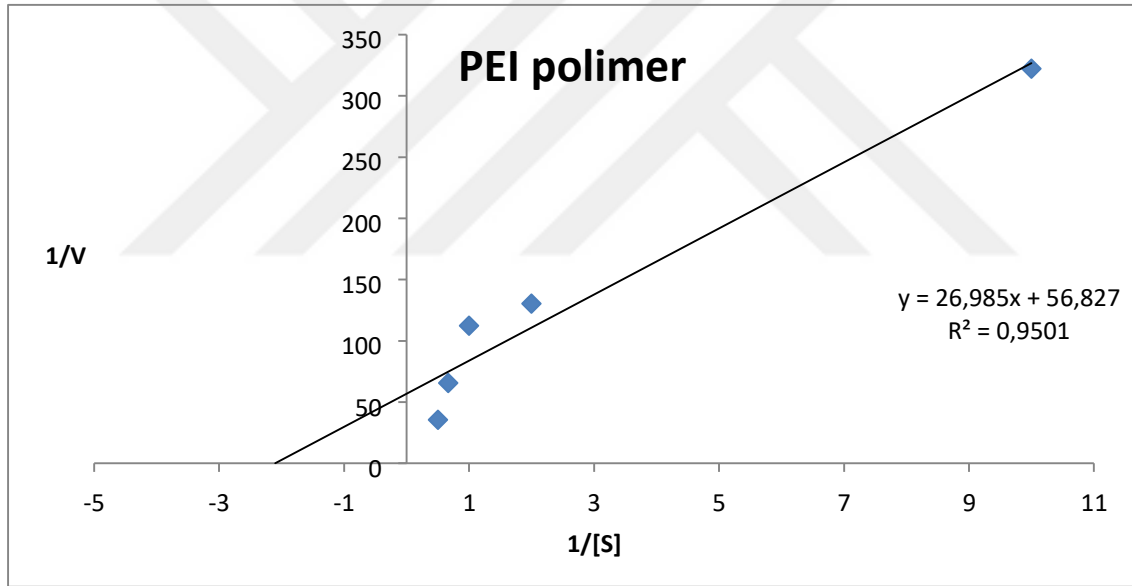
Yapılan çalışmalarda AChE immobilizasyonu sonrası K_m değerleri; poliakrilik asit temelli nanofiberde 0.5008 mM (Çakıroğlu ve ark., 2018), poli(akrilik asit)/çok duvarlı karbon nanotüp nanofiberde 0.1241mM (Ebadi ve ark., 2015), kitosan-SiO₂'de 27.24 mM (Ye ve ark., 2015), poliakrilamid fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüp nanofiberde 0.02630 mM (Amini ve ark., 2013), polimetil metakrilat nanofiberde 0.0272 mMolarak tayin edilmiştir (Amini ve ark., 2012).



Şekil 3.7. Serbest enzime ait Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 3.8. Epoksi grupları üzerinden immobilize olan enzimin Lineweaver-Burk eğrisi



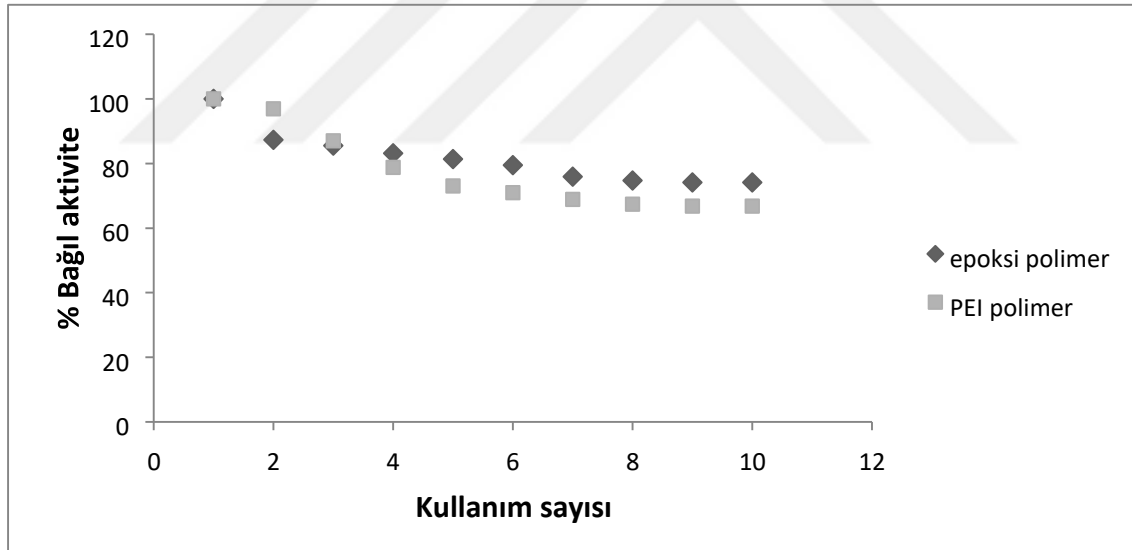
Şekil 3.9. PEI grupları üzerinden immobilize olan enzimin Lineweaver-Burk eğrisi

3.4.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen destek materyalinin ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Ayrıca, tekrar kullanılabilirlik ekonomik açıdan ve kararlılığın korunması bakımından immobilize enzimleri serbest enzimlerden üstün kılmaktadır.

Çalışmamızda immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği 2.3.9’da anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.10’da verilmiştir. Aynı immobilize enzim kullanılarak yapılan 10 deneme sonunda her epoksi filme ve PEI’ya immobilize edilmiş enzimin aktiviteleri sırası ile yaklaşık %74 ve %67 olarak tayin edilmiştir.

Çakıroğlu ve arkadaşları poliakrilik asit temelli nanofiber üzerine AChE enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin 10 denemeden sonra %87 oranında aktivite gösterdiğini tayin etmişlerdir (Çakıroğlu ve ark., 2018). Stoilova ve arkadaşları yaptıkları farklı iki çalışmada immobilize enzimin 10 denemeden sonra %55 ve 10 denemeden sonra %35 oranında aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Stoilova ve ark., 2010a; Stoilova ve ark., 2010). Moradzadegan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada immobilize enzimin 10 kullanım sonucunda %70 oranında aktivite gösterdiğini tayin etmişlerdir (Moradzadegan ve ark., 2010). Gabrovskva ve ark. asetonitril kopolimer üzerine immobilize enzimin 10 denemeden sonra %50 oranında aktvitesini koruduğunu bulmuşlardır (Gabrovskva ve ark., 2008).



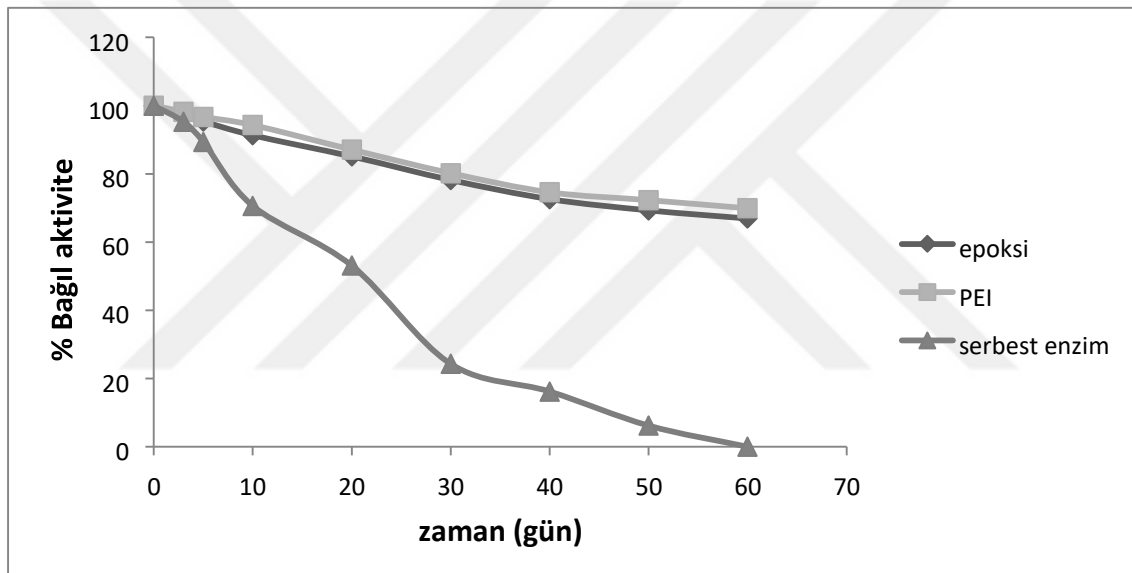
Şekil 3.10. Immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği

3.4.5. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi

Serbest ve immobilize AChE enziminin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C’de ağzı kapalı şişelerde bekletilmiş ve enzim aktiviteleri 2 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür. Serbest enzim 30 gün sonunda % 24.3, epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzimler ise sırası ile 78.2, % 80.2 aktivite göstermiştir. 60. gün sonunda serbest enzim

aktivitesini tamamen kaybederken epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim aktiviteleri %66.9 ve %69.9 olarak bulunmuştur.

Çakıroğlu ve arkadaşları poliakrilik asit temelli nanofibere immobilize enzimin aktivitesini 60 gün sonunda %70, Stoilova ve arkadaşları yaptıkları iki farklı çalışmada 40 gün sonunda % 29 ve 60 gün sonunda % 30, Moradzadegan ve arkadaşları ise 60 gün sonunda yaklaşık %90, Tümtürk ve arkadaşları immobilize AChE enziminin aktivitesini 60 gün sonunda yaklaşık % 68 olarak tayin etmişlerdir (Çakıroğlu ve ark., 2018; Stoilova ve ark., 2010a; Stoilova ve ark., 2010; Moradzadegan ve ark., 2010; Tümtürk ve ark., 2007). Bu bulgular ile kıyaslandığında epoksi ve PEI içeren filmlerin depolama kararlılığının iyi olduğunu söyleyebiliriz.

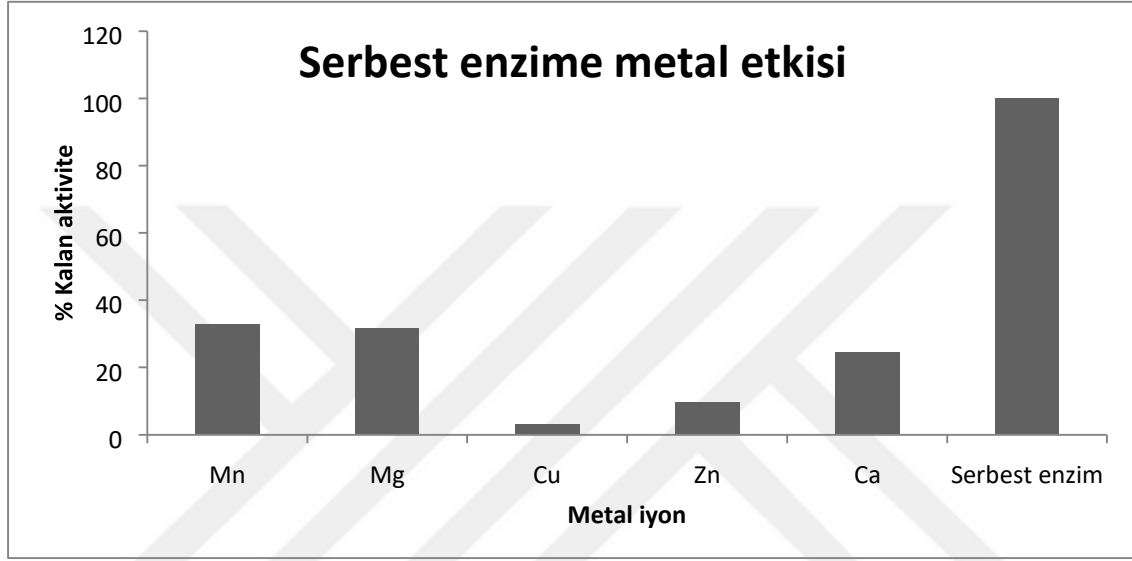


Şekil 3.11. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi

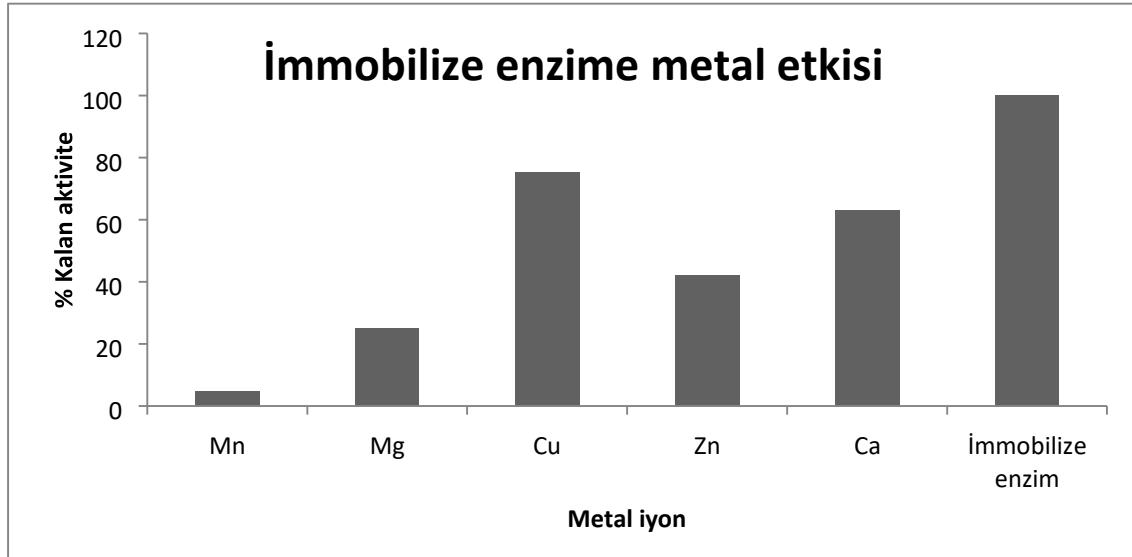
3.4.6. Serbest ve immobilize enzim üzerine metal etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Buna göre serbest enzimde % kalan aktivite sıralaması $Mn > Mg > Ca > Zn > Cu$ şeklindedir. Serbest enzimin Mn ve Mg iyonları varlığında gösterdiği aktiviteler sırası ile yaklaşık %33 ve %32 iken en az aktiviteyi Cu (%3.14) varlığında gösterdiği saptanmıştır. Epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim üzerine metal etkisi incelendiğinde her iki filmde benzer sonuçlar elde edildiğinden tek grafik üzerinde gösterilmiştir. Buna göre immobilize enzimde % kalan aktivite sıralaması

Cu>Ca>Zn>Mg>Mn şeklindedir. En yüksek % kalan aktiviteyi %75.19 ile Cu, en az % kalan aktiviteyi ise %4.62 ile Mn göstermiştir. Poliakrilik asit temelli nanofibere immobilize enzim üzerine metal aktivitesi incelendiğinde Ca>Mg>Zn>Cu>Mn şeklinde sonuçlar elde edilmiş Cu için yaklaşık %80, Mn için yaklaşık %70 aktivite bulunmuştur (Çakıroğlu ve ark., 2018). Ca ve Cu'nun enzimi önemli ölçüde inhibe ettiği ve Cu'nun non-kompetitif (yarışmasız) olarak inhibisyona neden olduğu literatürde belirtilmiştir (Pohanka, 2014).



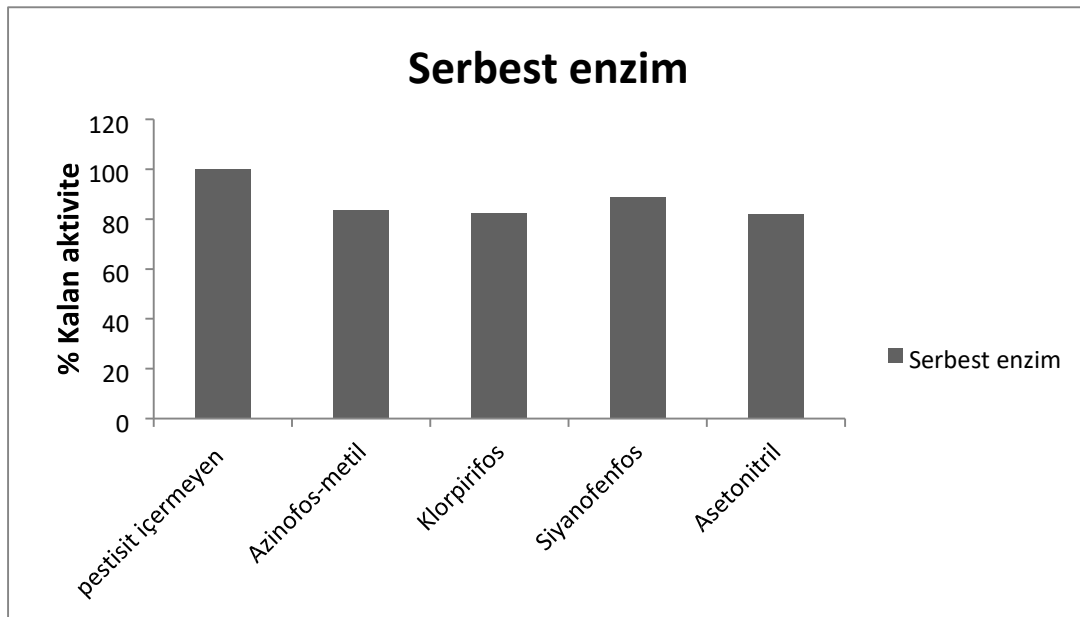
Şekil 3.12. Serbest enzim aktivitesine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi



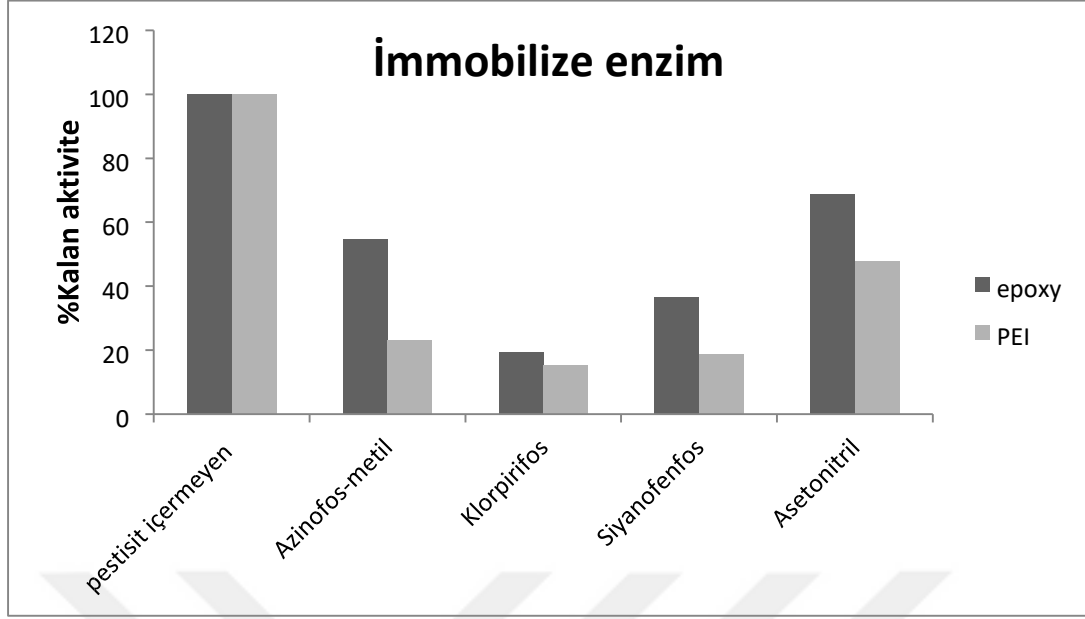
Şekil 3.13. Epoksi ve PEI grupları içeren filmlere immobilize edilen enzimin aktivitesine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi

3.4.7. Serbest ve immobilize enzim üzerine pestisit etkisi

Fosforlu ve karbamatlı insektisitler tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Su, yiyecek ve hayvan yemlerindeki varlıkları toksisitetlerine bağlı olarak memelilerde potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır (Mionetto ve ark., 1994). Bu pestisitler AChE ve asetilkolin arasındaki enzimatik reaksiyonu enzimin aktif bölgesine bağlanarak fosforilasyon veya karbomilasyon yoluyla AChE'nin serin kalıntısını bloke ederek enzimin aktivitesini inhibe etmektedirler (Singh ve Agarwal, 1983). Organofosforlu insektisitlerin belirlenmesi için en genel yaklaşım asetilkolinesteraz gibi enzimlerin inhibisyonunun takip edilmesi şeklindedir (Cremisini ve ark., 1995). Çalışmamızda fosforlu pestisit grubundan olan azinofos metil, klorpirifos, siyanofenfos pestisitleri kullanılmıştır. Klorpirifos, siyanofenfos pestisitleri asetonitrilde hazırlandığından ayrıca asetonitril etkisi de incelenmiştir. Serbest ve epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim üzerine pestisit etkisi Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir. Serbest enzimde kalan aktivite yüzdeleri kıyaslandığında etki sırasına göre siyanofenfos > azinofos metil > klorpirifos > asetonitril şeklinde bulunmuştur. Epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim için sıralama ise asetonitril > azinofos metil > siyanofenfos > klorpirifos şeklinde tayin edilmiştir. Immobilize enzimler kıyaslandığında Epoksi filme immobilize enzimin aktivitesinin PEI'ya göre biraz daha fazla olduğu görülmüştür. Bu da enzimin aktif bölgesinin PEI'daki enzime göre daha korunmuş durumda olması ile açıklanabilir.



Şekil 3.14. Pestisitlerin serbest enzim aktivitesine etkisi



Şekil 3.15. Pestisitlerin epoksi ve PEI grupları içeren filmlere immobilize edilen enzimin aktivitesine etkisi

4. SONUÇLAR

Çalışmamızda epoksi ve aktive edilmiş PEI sonlu polimerik filmler hazırlandı ve FTIR ile fonksiyonel gruplar incelenmiştir.

1 g epoksi filme 47.19 µg, 1g PEI filme 33.54 µg enzim bağlandığı bulunmuştur. Bağlanma yüzdeleri ise epoksi filmde %95.66, PEI filmde %87.01 olarak tayin edilmiştir. Enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olması nedeni ile kovalent immobilizasyon tercih edilmiştir. Enzimin polimerik destek materyaline yüksek konsantrasyonda immobilize olması oldukça iyi bir sonuçtur.

Tez çalışmamızda serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi incelenmiştir. Serbest enzim pH 8'de, epoksi ve PEI filmler üzerine immobilize enzimler ise pH 8,5'da maksimum aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Bu farklılığın nedeni katı desteğin yüzeyinde yük dağılımlarının farklı olması ve enzimin destekle etkileşimi sonucunda, enzimin çevresel yükünün değişmesi ile açıklanmıştır.

Serbest enzim 30°C'de maksimum aktivite gösterirken epoksi ve PEI üzerine immobilize enzimler 50°C'de göstermişlerdir. Bu ise immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesinin korunduğunu; sıcaklık değişimi ile aktif bölgenin konformasyonunun bozulma ve zarar görmesinin engellendiği şeklinde açıklanmıştır.

Serbest enzimin Km değeri 1.25 mM iken epoksi ve PEI immobilize enzimin Km değerleri 0.182 ve 0.5 mM olarak bulunmuştur. Serbest, epoksi ve PEI immobilize enzimlerin Vmaks değerleri sırası ile 1.53 mM/dakika, 0.416 mM/dakika ve 0.018 mM/dakika şeklinde tayin edilmiştir. İmmobilizasyon sonunda Vmaks ve Km değerleri azalmıştır. Km değerinin azalması enzimin substratına olan ilgisinin arttığını göstermiştir. Vmaks değerinin azalması enzimin konformasyonunun immobilizasyon işlemi ile değiştiğini ve buna bağlı olarak aktivitesinde azaldığını göstermektedir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen destek materyalinin ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Tez çalışmamızda yapılan 10 tekrar sonunda epoksi ve PEI filmlerine immobilize edilmiş enzimin aktiviteleri sırası ile yaklaşık %74 ve %67 olarak tayin edilmiştir.

60 gün boyunca serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri belirli zamanlarda ölçülmüştür. Serbest enzim 60 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim aktiviteleri %66.9 ve %69.9 olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize enzim üzerine Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Serbest enzimde % kalan aktivite sıralaması $Mn > Mg > Ca > Zn > Cu$, immobilize enzimde % kalan aktivite sıralaması $Cu > Ca > Zn > Mg > Mn$ şeklinde tayin edilmiştir. Immobilize enzimde en yüksek % kalan aktiviteyi %75.19 ile Cu, en az % kalan aktiviteyi ise %4.62 ile Mn^{+2} göstermiştir.

Pestisit etkisi incelendiğinde, serbest enzimde kalan aktivite yüzdeleri siyanofenfos > azinofos metil > klorpirifos > asetonitril, epoksi ve PEI filmlerine immobilize enzim için sıralama ise asetonitril > azinofos metil > siyanofenfos > klorpirifos şeklinde olduğu hesaplanmıştır.

Elde ettiğimiz düşük maliyetli, iyi mekanik kararlılığa sahip ve uygulanması kolay ve oldukça kullanışlı olan bu destek materyalini ileride tasarlayacağımız biyo-sensör yapımında kullanmayı planlamaktayız.

KAYNAKLAR

Ariel, N., Ordentlich, A., Barak, D., Bino, T., Velan, B., Shafferman, A. (1995). The aromatic patch of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitor. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.

Asmussen, S., Arenas, G., Vallo, C. (2015). Photopolymerization of pyrrole/methacrylate mixtures using α -cleavage type photoinitiators in combination with iodonium salt. *Synthetic Metals*, 209, 304-312.

Atif, M., Bongiovanni, R., Yang, J. (2015). Cationically uv-cured epoxy composites. *Polymer Reviews*, 55(1), 90-106.

Çakıroğlu, B., Beyler Cigil, A., Ogan, A., Kahraman, M.V., Demir, S. (2018). Covalent immobilization of acetylcholinesterase on a novel polyacrylic acid-based nanofiber membrane. *Engineering in Life Sciences*, 18 (4), 254-262.

Bajgar, J. (2004). Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. 38, 151–216.

Barnard, E.A. (1974). In: *The Peripheral Nervous System*; Hubbard, J.I., Editor Plenum: New York,; pp. 201-224.

Bayramoğlu, G., Tunalı, Y., Arıca, M.Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, (8), 1094–1101.

Birks, J., Grimley Evans, J., Iakovidou, V., Tsolaki, M., Holt, F.E. (2009). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD001191.

Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD005593.

Bond, M., Rogers, G., Peters, J., Anderson, R., Hoyle, M., Miners, A., Moxham, T., Davis, S., Thokala, P., Wailoo, A., Jeffreys, M., Hyde, C. (2012). The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the

treatment of Alzheimer's disease, (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and economic model. *Health Technol. Assessment*, 16, (1)-469.

Börner, R.A.(2014). Immobilization of *Clostridium Acetobutylicum* DSM 792 as macroporous aggregates through cryogelation for butanol production process. *Biochemistry*, 49(1), 10-18.

Bradford, M.M.(1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bruce, S., Lamb, B. S., Kovacic, P.((1980). Polymerization of aromatic nuclei. XXIII. investigation of oligomer and pyrrole red from pyrrole and trichloroacetic acid. *Journal of Polymer Science*, 18, 1759-1770 .

Cao, L. (2006). Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Champe, P.C., Harvey, R. A. (1997). *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye*, 47-58.

Chauhan, N., Pundir, C.S. (2011). An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 701, 66– 74.

Colovic, M., Krstic, D., Petrovic, S., Leskovac, A., Joksic, G., Savic, J., Franko, M., Trebse, P., Vasic, V. (2010). Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology Letters* ., 193, 9-18.

Colovic, MB., Krstic, D.Z., Lazarevic, P., Tamara, D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors : pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3), 315–335.

Cox, C., Diazinon. J. (1992). *Pesticide Reform*. 12, 30-35.

Creminini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., and Palleschi, G. (1995) Evaluation of the use of free and immobilized acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 311,273-280.

Çakıroğlu, B., (2015). Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin Poliakrilik Asit Esaslı Nanofiber Membran Üzerine Kovalent İmmobilizasyon. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , İstanbul.

Daniel, R.M., Peterson, M.E., Danson, M.J. (2010). The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemical Journal*, 425(2), 353-360.

Darvesh, S., Darvesh, K.V., McDonald, R.S., Mataija, D., Walsh, R., Mothana, S., Lockridge, O., Martin, E. (2008). Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4200-421.

Datta, S., Christena, L.Rene., Rani, Y., Rajaram, S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *Biotechnology*, 3:1–9.

D'Souza, SF. (1998). Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science* 77:69–79.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical pharmacology*, (7), 88-95.

Elnashar, M.M., Yassin, M.A. (2009). Lactose hydrolysis by β galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159, 426–437.

Fershet, A.(1999). Structure and Mechanism in Protein Science:A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, W.H.Freeman, San Francisco.

Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research.*, 50, 433-440.

Greene, S.A., Pohanish, R.P. (2005). Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals. William Andrew Publishing: New York.

Gupta, R.C. (2006). Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Academic Press/Elsevier: Amsterdam.

Guzmán, D., Ramis, X., Fernández-Francos, X., Serra. (2015). A.Preparation of click thiol-ene/thiol-epoxy thermosets by controlled photo/thermal dual curing sequence RSC Advances., 5, 101623–101633.

Haider, T., Husain, Q. (2007). Calcium alginate entrapped preparation of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. International Journal of Biological Macromolecules, 41,72–80.

Harel, M., Schalk, I., Ehret, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, PH., Silman, I.(1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proceedings of theNational Academy of Sciencesof the United States of America, 90 (19),9031–5.

Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan N., Güngör, A. (2007). α Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. Food Chemistry, 104, 1385–1392.

Katzung, B.G. (2001). Basic and clinical pharmacology; The McGraw Hill Companies: Columbus, USA, , pp. 75-91.

Koshlend, D.E. (1958). Application of a theory of enzyme specificityto protein synthesis. Proceedings of theNational Academy of Sciences of the USA, 44(2), 98.

Krstic, D., Colovic, M., Krinulovic, K., Djuric, D., Vasic, V. (2007). Inhibition of AChE by single and simultaneous exposure to malathion and its degradation products. General Physiology and Biophysics., 26, 247-253.

Kuhr, R.J., Dorough, H.W. (1976). Mode of action. In: Carbamate Insecticides: Chemistry. Biochemistry and Toxicology; Kuhr, R.J., Dorough, H.W., Eds.; CRC Press: Cleveland, 41-70.

Lane, R.M., Potkin, S.G., Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. International Journal of Neuropsychopharmacology., 9(1), 101-124.

- Lewis, K.W.(1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's Disease. *JAMA- Journal of the American Medical Association.*, 271, 992998.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuent, R. (2007). Improvement of enzyme properties via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40,1451–1463.
- Merritt, S.R., Agata, A.E., Zhenghong, L., Horst, A. (2012). Electrospinning and imaging. *Advanced Engineering Materials*, 14 (5), 266–278.
- Minton, A.P.(2001). The influence of macromelucular confinement on biochemical reactions in physiological media. *Journal of Biochemistry*, 276(14), 10577.
- Mionettol, N., Marty, J.L., Karube, I. (1994) . Biosensors. *Bioelectronics*. 463–470.
- Moradzadegan, A., Ranaei-Siadat, S.O., Ebrahim-Habibi,A., Barshan-Tashnizi,M., Jalili,R., Torabi, S.F., Khajeh, K. (2010).Immobilization of acetylcholinesterase in nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning. *Engineering in Life Sciences*,10(1), 57–64.
- National Pesticide Information Center, (2012). Diazinon Technical Fact Sheet.
- Nelson,D.L., Cox, M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition., W.H.Freeman, New York.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. (1979). Units of EnzymeActivity. *European Journal of Biochemistry*, 97, 319-320.
- Ogan, A. (2004). *Biyokimyasal Yöntemler ve Teknikler 1-2 Deney Kitapçığı*.
- Ogan, A., Demir, S., Daniş, Ö., Yüce Dursun, B. (2014). *Biyokimyasal Yöntemler I Ders Notu*.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segall, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B., Shafferman, A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, thehydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of the Biological Chemistry*, 268 (23), 17083–95.

- Ortiz, R. A., Puente Urbina, B.A., Cabello Valdez, L.V., Duarte, L.B., Santos, R, G., García Valdez, A.E., Soucek, M.D. (2007). Effect of introducing a cationic system into a thiol-ene photopolymerizable formulation. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 45, 4829–4843 .
- Pohanka. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, 155 (3), 219–229.
- Pohanka, M.(2012). Acetylcholinesterase inhibitors; a patent review. *Expert opinion on Therapeutic Patents*, 22 (8), 871–886.
- Pehkonen, S.O., Zhang, Q. (2002). The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.*, 32, 17-72.
- Quinn, D.M.(1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews.*, 87, 955-979.
- Ray, D.E., Richards, P.G. (2001). The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*, 120, 343-351.
- Razza, N., Blanchet, B., Lamberti, A., Pirri, F.C., Tulliani, J.M., Bozano, L.D., Sangermano, M. (2017). UV-printable and flexible humidity sensors based on conducting/insulating semi-interpenetrated polymer networks. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302 (10), 1700161-170067.
- Rojas-Fernandez, C.(2001). Successful use of donepezil for the treatment of dementia with Lewy bodies. *Annals of Pharmacotherapy.*, 35(2), 202-205.
- R.Kricheldorf, H., Dekker, M. (2005). *Handbook Of Polymer Synthesis*, USA page 755.
- Sirisha, V., Jain, A., Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes, *Advances in Food and Nutrition Research*, 79, 179-211.
- Stahl, S.M. (2000). The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, part 2: illustrating their mechanisms of action. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61, 813-814.
- Stoelting, R.K. (1999). *Anticholinesterase Drugs and Cholinergic Agonists*.

Pharmacology and Physiology.

Stoilova, O., Manolova, N., Gabrovska, K., Marinov, I., Godjevargova, T., Mita, D.G., Rashkov, I. (2010a). Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes Tailored for Acetylcholinesterase Immobilization. *Journal of Bioactive And Compatible Polymers*, 25, 40-57.

Stoilova, O., Ignatova, M., Manolova, N., Godjevargova, T., Mita, D.G., Rashkov, I. (2010b). Functionalized electrospun mats from styrene–maleic anhydride copolymers for immobilization of acetylcholinesterase. *European Polymer Journal*, 46, 1966–1974.

Smulders, C.J., Bueters, T.J., Vailati, S., van Kleef, R.G., Vijverberg, H.P. (2004). Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. *Toxicological Sciences*, 82, 545-554.

Stryer, L., L. Tymoczko, J., M. Berg, J. (2012). *Biochemistry: An Evolving Science*, 7th edition., Gregory, J., Gatto, Jr. W. H. Freeman and Company, New York.

Sussman, J.L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.

Tanriseven, A., Dogan, S. (2002). A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Process Biochemistry*, 38, 27–30.

Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., Tarazi, F.I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology Therapy*, 134, 8-25.

Taylor, D., Paton, C., Shitij, K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.

Thompson, P.A., Wright, D.E., Counsell, C.E., Zajicek, J. (2012). Statistical analysis, trial design and duration in Alzheimer's disease clinical trials: a review. *International Psychogeriatrics Journals*, 24, 689-697.

Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155–170.

Tripathi, A. (2008). Acetylcholinesterase: A versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neuroscience*, 15 (4).

Tümtürk, H., Şahin, F., Demirel, G. (2007). A new method for immobilization of acetylcholinesterase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30, 141-145.

Voet, D., Voet, J. (1995). *Biochemistry*; John Wiley and Sons: New York. Watkins, P.B.; Zimmerman, H.J.; Knapp, M.J.; Gracon, S.I.;

Whittaker, V. (1990). The contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8–13.

Wrighton, M.S., Ebbing D.D. (1993). *General Chemistry*, 4. bs., Houghton Mifflin, Boston.

World Health Organization (WHO). (1986). Effects of organophosphorus insecticides on the nervous system. In: *Organophosphorus Insecticides: a General Introduction*; Geneva, 58-69. [Http://apps.who.int/iris/handle/10665/40198](http://apps.who.int/iris/handle/10665/40198)

World Health Organization (WHO). (1986). Metabolism and mode of action. In: *Organophosphorus Insecticides: a General Introduction*; Geneva, 39-48.

Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?. *Advanced Materials*, 16 (14), 1151.

Yong, Y., Bai, Y.X., Li, Y.F., Lin, L., Cui, Y.J., Xia, C.G. (2008). Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochemistry*, 43, 1179–1185.

Ziabicki, A. (1976). *Fundamentals of fiber formation*, John Wiley and Sons, London.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : KHADIJA ALI
Doğum Yeri ve Tarihi : CIDDE/15.09.1992
Yabancı Dili : İngilizce – Arapça
E-Posta : miss.dejo1992@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen Bilimleri	32 No'lu Lise	2010
Üniversite	Biyokimya	King Abdulaziz University	2015