

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE BAZI KİMYASAL MADDELERİN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bilge ÖZCAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI
KİMYASAL MADDELERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bilge ÖZCAN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI KİMYASAL MOLEKÜLLERİN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Bilge ÖZCAN tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı –Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza:

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.11.2014 tarih ve 33/1049. nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI KİMYASAL MADDELERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bilge ÖZCAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Asetilkolinesteraz enzimi (AChE; E.C.3.1.1.7) insan eritrositlerinden CNBr ile aktive edilen Sepharose 4B-L-Tirozin-Takrin afinite kromatografisi ile 658 kat, %23,5 verimle saflaştırıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve tek bant bulundu (70 kDa) AChE enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla 7,6, 0,3 M, 50°C, 8,0 olarak tespit edildi. Ayrıca AChI ve DTNB substratları için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,11 mM, 0,031 mM ve 0,082 EÜ/ml, 0,16 EÜ/ml olarak hesaplandı. AChE enzim aktivitesi üzerine vankomisin HCl, amikasin sülfat, pantoprazol, sefuroksim, diltizem HCl, tenoksikam antibiyotikleri, essitalopram, mirtazapin, fluoksetin, trazodon HCl, sodyum valproat, risperidon antidepresanları, BHA ve BHT sentetik antioksidanları, 2,6-diizopropilfenol(propofol), 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain anesteziikleri, etil alkol, aseton ve DMSO organik çözücüler gibi farklı maddelerin inhibisyon etkileri incelendi. *In vitro* inhibisyon etkisi gösteren maddeler essitalopram okzalot, mirtazapin, risperidon, fluoksetin, pantoprazol, 2,6-diizopropilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain, BHA, BHT, etanol, aseton, dimetilsülfoksit için IC50 değerleri sırasıyla 1,06 mM, 0,019 mM, 0,428 mM, 1,62 mM, 1,97 mM, 5,94 µM, 6,96 µM, 36,3 µM, 260 µM, 5 µM, 32,85 µM, 36,3 µM, 2,24 M, 0,51 M, 0,51 M olarak hesaplandı. Aynı maddeler için sırasıyla ortalama Ki sabiti 1,30 mM, 0,012 mM, 0,23 mM, 1,48 mM, 1,26 mM, 3,93 µM, 2,06 µM, 18,9 µM, 14,3 µM, 13,4 µM, 30,9 µM, 17,35 µM, 1,28 M, 0,19 M, 0,37 M olarak hesaplandı. İnhibisyon tipleri lidokain ve bupivakain anesteziikleri için yarışmasız, diğer maddelerin tamamı için yarışmalı inhibisyon olarak tespit edildi.

2014, 149 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, insan eritrositi, karakterizasyon, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME CHEMICAL SUBSTANCES ON ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME ACTIVITY PURIFIED FROM HUMAN ERYTHROCTES

Bilge ÖZCAN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Acetylcholinesterase enzyme (AChE: EC 3.1.1.7) was purified 658 fold with 23,5% yield from human erythrocytes by Sepharose 4B-L-tyrosine-tacrine affinity column chromatography that activated with CNBr. The purity enzyme was checked by SDS-PAGE and one band was observed (70 kDa). For AChE enzyme optimal pH, optimal temperature, stabil pH was determined as 7.6, 0.3 M, 50°C, 8.0 respectively. Also K_M and V_{max} values were calculated for AChI and DTNB substrates 0,11 mM, 0,031 mM ve 0,082 EU/mL, 0,16 EU/mL. On AChE enzyme activity were investigated the inhibitory effects of different substances such as vancomycin HCl, ampicillin sulphate, pantoprazole, cefuroxime, diltiazem hydrochloride, tenoxicam antibiotics, escitalopram oxalate, mirtazapine, fluoxetine, trazodone hydrochloride, sodium valproate, risperidone antidepressants, BHA and BHT unnatural antioxidants, 2,6-dimethylphenol, 2,6-diisopropylphenol, 2,6-ditertbutylphenol, lidocaine, bupivacaine anesthetics, ethylalcohol, acetone and dimethylsulfoxide organic solvents. IC_{50} values were calculated as 1,06 mM, 0,019 mM, 0,428 mM, 1,62 mM, 1,97 mM, 5,94 μ M, 6,96 μ M, 36,3 μ M, 260 μ M, 5 μ M, 32,85 μ M, 36,3 μ M, 2,24 M, 0,51 M, 0,51 M for escitalopram oxalate, mirtazapine, risperidone, fluoxetine, pantoprazole, BHA, BHT, 2,6-diisopropylphenol, 2,6-dimethylphenol, 2,6-ditertbutylphenol, lidocaine, bupivacaine, ethylalcohol, acetone and dimethylsulfoxide substances which showed *in vitro* inhibitory effects respectively. Average K_i values were calculated as 1,30 mM, 0,012 mM, 0,23 mM, 1,48 mM, 1,26 mM, 3,93 μ M, 2,06 μ M, 18,9 μ M, 14,3 μ M, 13,4 μ M, 30,9 μ M, 17,35 μ M, 1,28M, 0,19M, 0,37M for same substances respectively. Inhibition types were determined as uncompetitive inhibition for lidocaine and bupivacaine anesthetics, the other chemicals demonstrated competitive inhibition.

2014, 149 pages

Keywords: Acetylcholinesterase, human erythrocyte, characterization, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün aşamalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na, tez izleme komitemde yer alan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve Eğitim Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ahmet MAVİ'ye,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru AKKEMİK'e, Sayın Arş. Gör. Zeynep KÖKSAL'a, Sayın Arş. Gör. Zuhâl ALİM'a ve Sayın Dr. Habibe BUDAK KAYA'ya, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, araştırma laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı ailemin bütün fertlerine, eşime ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doktora eğitimim süresince Yurt İçi Doktora Eğitim Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilge ÖZCAN

Temmuz, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	i
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çalışmanın Amacı	42
2. KAYNAK ÖZETLERİ	44
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	64
3.1. Materyal.....	64
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	64
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	64
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	65
3.2. Yöntemler	69
3.2.1. Protein tayini	69
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	69
3.2.1.b. Kantitatif protein tayini	69
3.2.2. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi aktivite ölçüm metodu.....	70
3.2.3. İnsan eritrosit AChE enziminin saflaştırılması	71
3.2.3.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması	71
3.2.3.b. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması	72
3.2.3.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	72
3.2.3.d. Takrin kenetlenmesi.....	73
3.2.3.e. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	74
3.2.3.f. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	74
3.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	74

3.4. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzimiyle ilgili Yapılan Kinetik Çalışmalar.....	76
3.4.1. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar.....	76
3.4.2. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar	76
3.4.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	76
3.4.4. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için stabil pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	77
3.4.5. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	77
3.5. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin IC_{50} ve K_i Değerlerinin Bulunması.....	77
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	79
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	79
4.2. AChE Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları.....	79
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları	79
4.2.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	81
4.3. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan AChE Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	82
4.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik sonuçlar	82
4.3.2. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik sonuçlar	83
4.3.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar	84
4.3.4. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için stabil pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	85
4.3.5. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	86
4.4. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkilerinin Sonuçları.....	88

4.5. İnsan Eritrositinden Safılaştırılan Asetilkolinesteraz Enzimini İnhibe Eden Bazı Kimyasal Maddeler İçin Ki Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları	88
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	122
KAYNAKLAR	137
ÖZGEÇMİŞ	150

SİMGELER DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AChI	: Asetiltiyokoliniyodat
BChE	: Bütilkolinesteraz enzimi
BHA	: Butillenmiş hidroksianisol
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTNB	: 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EÜ	: Enzim ünitesi
I	: İnhibitör
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TCA	: Trikloro asetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi, 1'de ligand matrikse kovalent bağlanır, 2'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup safsızlıklar akar ve 3'de numune elüe edilir.	40
Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü.	42
Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması.....	72
Şekil 3.2. Sepharose-4B-Takrin kenetlendirilmesi	73
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	79
Şekil 4.2. AChE enziminin Takrin kolonundan afinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen elüatların 280 nm'de absorpsiyon ve 412 nm'de aktivite değerleri.	80
Şekil 4.3. İnsan eritrosit AChE enziminin SDS-PAGE fotoğrafı;.....	81
Şekil 4.4. log MK-R _F grafiği.....	82
Şekil 4.5. Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği	83
Şekil 4.6. Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	83
Şekil 4.7. Değişik konsantrasyonlardaki K ₂ HPO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için yapılan iyonik şiddet aktivite ölçüm sonuçları grafiği.....	84
Şekil 4.8. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla çizilen sıcaklık-aktivite grafiği	85
Şekil 4.9. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	86
Şekil 4.10. Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği.....	86
Şekil 4.11. İnsan eritrosit AChE enzimi AChI substratı için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	87

Şekil 4.12. İnsan eritrosit AChE enzimi DTNB substratı için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	88
Şekil 4.13. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine essitalopram etken maddesinin aktivite %-[essitalopram] grafiği.....	89
Şekil 4.14. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolinyodat substratıyla essitalopram etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	90
Şekil 4.15. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine mirtazapin etken maddesinin aktivite % -[mirtazapin] grafiği.....	91
Şekil 4.16. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla mirtazapin etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 4.17. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine fluoksetin etken maddesinin aktivite %-[fluoksetin] grafiği.....	93
Şekil 4.18. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla fluoksetin etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	94
Şekil 4.19. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine risperidon etken maddesinin aktivite % -[risperidon] grafiği.....	95
Şekil 4.20. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla risperidon etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	96
Şekil 4.21. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine sefuroksim etken maddesinin aktivite%-[sefuroksim] grafiği	97
Şekil 4.22. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine amikasin sülfat etken maddesinin aktivite %-[amikasin sülfat] grafiği.....	98
Şekil 4.23. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine tenoksikam etken maddesinin aktivite %-[tenoksikam] grafiği	98
Şekil 4.24. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine pantaprazol etken maddesinin aktivite %-[pantaprazol] grafiği	99
Şekil 4.25. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla pantaprazol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği	100
Şekil 4.26. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-diizopropilfenol (propofol) etken maddesinin aktivite %-[2,6-diizopropilfenol] grafiği.....	101

Şekil 4.27. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-diizopropilfenol (propofol) etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği	102
Şekil 4.28. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-dimetilfenol etken maddesinin aktivite %-[2,6-dimetilfenol] grafiği	103
Şekil 4.29. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-dimetilfenol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği	104
Şekil 4.30. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin aktivite %-[2,6-ditertbutilfenol] grafiği	105
Şekil 4.31. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	106
Şekil 4.32. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine lidokain etken maddesinin aktivite %-[lidokain] grafiği.....	107
Şekil 4.33. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla lidokain etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	108
Şekil 4.34. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine bupivakain etken maddesinin aktivite %-[bupivakain] grafiği	109
Şekil 4.35. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla bupivakain etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği	110
Şekil 4.36. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine BHA maddesinin aktivite %-[BHA] grafiği	111
Şekil 4.37. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHA maddesinin Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 4.38. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine BHT maddesinin aktivite %-[BHT] grafiği	113
Şekil 4.39. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHT maddesinin Lineweaver-Burk grafiği.....	114
Şekil 4.40. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine etil alkol organik çözücüsünün aktivite %-[etil alkol] grafiği.....	115
Şekil 4.41. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla etil alkol organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği.....	116

Şekil 4.42. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine DMSO organik çözücüsünün aktivite %-[DMSO] grafiği	117
Şekil 4.43. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla DMSO organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği	118
Şekil 4.44. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine aseton organik çözücüsünün aktivite %-[aseton] grafiği.....	119
Şekil 4.45. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla aseton organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği.....	120

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Aktivite ölçüm prosedürü	71
Çizelge 4.1. İnsan eritrosit AChE enziminin saflaştırma basamakları	80
Çizelge 4.2. Essitalopram etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	89
Çizelge 4.3. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla Essitalopram inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	90
Çizelge 4.4. Mirtazapin etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	91
Çizelge 4.5. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla mirtazapin inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	92
Çizelge 4.6. Fluoksetin etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	93
Çizelge 4.7. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla fluoksetin inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	94
Çizelge 4.8. Risperidon etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	95
Çizelge 4.9. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla risperidon inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	96
Çizelge 4.10. Sefuroksim etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	97
Çizelge 4.11. Amikasin sülfat etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	97
Çizelge 4.12. Tenoksikam etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	98

Çizelge 4.13. Pantaprazol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	99
Çizelge 4.14. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla Pantaprazol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	100
Çizelge 4.15. 2,6-diizopropilfenol (Propofol) etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	101
Çizelge 4.16. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-diizopropilfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	102
Çizelge 4.17. 2,6-dimetilfenol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	103
Çizelge 4.18. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-dimetilfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	104
Çizelge 4.19. 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	105
Çizelge 4.20. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-ditertbutillfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.....	106
Çizelge 4.21. Lidokain etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	107
Çizelge 4.22. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla lidokain inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	108
Çizelge 4.23. Bupivakain etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	109
Çizelge 4.24. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla bupivakain inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	110
Çizelge 4.25. BHA maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	111

Çizelge 4.26. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHA inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	112
Çizelge 4.27. BHT maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi.....	113
Çizelge 4.28. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHT inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	114
Çizelge 4.29. Etil alkol organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	115
Çizelge 4.30. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla etil alkol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	116
Çizelge 4.31. Dimetilsülfoksit organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	117
Çizelge 4.32. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla DMSO inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	118
Çizelge 4.33. Aseton organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi	119
Çizelge 4.34. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla aseton inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	120
Çizelge 4.35. AChE enzimi üzerine kimyasal maddelerin etkilerinin toplu sonuçları .	121

1. GİRİŞ

Enzimler organizmada metabolik olayları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır ve düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler, böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir. Enzim aktiviteleri kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde belli hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Bazı hastalıklara, özellikle kalıtsal bozukluklara, bir ya da daha fazla enzim eksikliği veya tamamen yokluğu sebep olabildiği gibi, diğer bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Birçok ilaç, biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarır. Enzimler sadece tıpta değil aynı zamanda kimya endüstrisi, gıda sanayi ve ziraatte de büyük öneme sahiptir (Nelson and Cox 2005).

Hücre sinyaller almaları ve bu sinyallere göre düzenlemeler yapma yetenekleri yaşam için temeldir. Bu sinyaller, yiyeceğe doğru ilerleme, zehirli maddelerden uzaklaşma veya besinden yoğun bir ortamda faal olmayan deliklerin oluşturulması gibi yanıtlar ortaya çıkmasına neden olur. Çok hücreli organizmalarda, farklı işlevleri olan hücreler çok çeşitli sinyalleri alıp verirler. Bitki hücreleri büyüme hormonlarına ve güneş ışığındaki değişikliklere yanıt verirler. Hayvan hücreleri gelişmekte olan embriyo içindeki doğru yerleşimleri, hücre dışı sıvılardaki iyon ve glukoz derişimi ve farklı dokularda meydana gelen birbiriyle ilişkili metabolik aktiviteler hakkında bilgi alışverişinde bulunurlar (Nelson and Cox 2005).

Hayvan hücrelerinde sinyaller otokrin (sinyali oluşturan hücreye etki eden), parakrin (komşu hücreye etki eden) veya endokrin (sinyali oluşturan hücreden kanla uzak bir hedef hücreye taşınan) olabilir. Her üç durumda da, sinyal özgül bir reseptör tarafından algılanır ve hücrenel yanıtla dönüştürülür (Nelson and Cox 2005).

Sinyal İletimi

Sinyal iletimi son derece özgül ve duyarlı bir olaydır. Özgülük sinyal ve reseptör molekülleri arasındaki enzim-substrat ve antijen-antikor etkileşmelerinde benzeri görülen ve zayıf (nonkovalent) güçler aracılığıyla oluşturulan hassas moleküler tamamlıyıcılıkla sağlanır. Çok hücreli organizmalarda belirli bir sinyalin reseptörleri veya sinyal yollarının hücre içi hedefleri sadece belirli hücre tiplerinde bulunduğu için özgülük daha da kolaylaşır. Örneğin, Tirotropin salgılatıcı hormon ön hipofiz hücrelerinde yanıtı tetiklerken, bu hormona özgül reseptörleri taşımayan hepatositlerde herhangi bir yanıtı neden olmamaktadır. Hepatositler ve eritrositler epinefrin reseptörüne sahip oldukları halde, hepatositlerde epinefrin tarafından uyarılan glikojen metabolize edici enzimler varken, eritrositlerde bulunmaması nedeniyle bu hormon sadece hepatositlerdeki glikojen metabolizmasını etkilemektedir. Birçok sinyal iletim sistemi örneği vardır. Her sistem için tetikleyici farklı olmakla birlikte sinyal iletiminin genel özellikleri aynıdır; bir sinyal bir reseptörle etkileşir, aktif reseptör hücresel ileti mekanizmalarıyla etkileşerek ikinci bir sinyal oluşturur veya bir hücre proteininin aktivitesini değiştirir, hedef hücrenin metabolik aktivitesi değişikliğe uğrar, iletim yolu son bulur ve hücre uyarı öncesi durumuna geri döner (Nelson and Cox 2005).

En basit sinyal ileticiler kimyasal ligantların bağlanması veya trans membran potansiyel değişikliklerine yanıt olarak açılıp kapanan bu nedenle 'kapılı' terimiyle adlandırılan plazma zarı iyon kanallarıdır. Asetilkolin reseptör iyon kanalı bu mekanizmaya bir örnektir. İkinci temel sinyal iletim mekanizması aynı zamanda enzim olan (reseptör enzimleri) plazma zarı reseptörlerini içermektedir. Bu reseptörlerden biri hücre dışı bir ligand tarafından aktive edilirse hücre içinde ikincil haberci oluşturulmasını katalizler. Bu mekanizma insülin reseptörüyle örneklendirilir. Epinefrini tanıyan β -adrenerjik reseptör sistemiyle gösterilmiş olan üçüncü sinyal iletim mekanizmasına (GTP-bağlayıcı proteinler aracılığıyla) dolaylı olarak hücre içi ikincil habercileri oluşturan enzimleri aktive eden plazma zarı reseptör proteinleri aracılık etmektedir (Nelson and Cox 2005).

Son sinyal iletim mekanizması ise steroid hormon ve östrojen gibi özgül bir liganda bağlandığı zaman özgül genlerin transkripsiyon ve hücrel proteinlere translasyon hızını değiştiren büyük bir reseptör sınıfına sahip çekirdek reseptör proteinleridir (Nelson and Cox 2005).

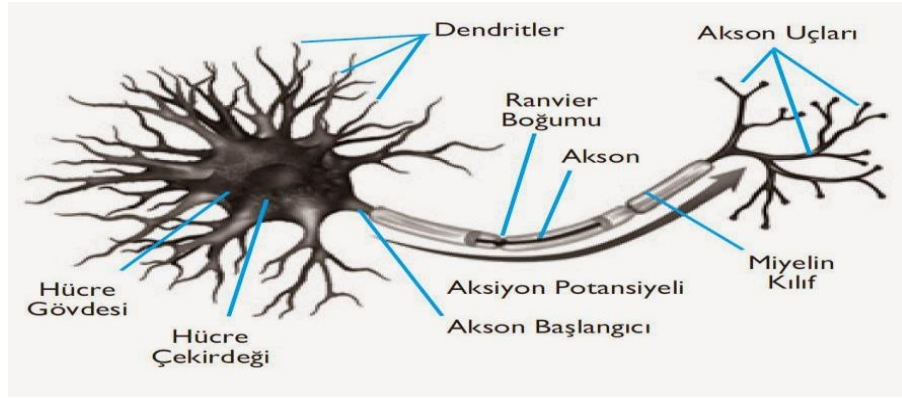
Sinir sistemi

Sinir sistemi beden, duyarlar ve çevre arasındaki iletişimi sağlayan ve düzenleyen bir ağ yapısıdır. Temel fonksiyonu elektrik uyarılarının iletilmesidir. Vücudu bir ağ gibi saran sinir hücreleri aracılığıyla, beyne mesajlar büyük bir hızla iletilir. Sinir sistemi, sinyalleri ileten hücreler olan nöronlar ve destek hücreleri olan ve nöronlardan sayıca 10 kat fazla olan nöroglidan kuruludur. Nöroglia; oligodendrositler ve astrositler, mikroglia hücreleri, ependim hücreleri ve Schwann hücrelerini kapsar. Nöroglia, nöronları destekleme ve varlıklarını sürdürmelerine yardımcı olmak üzere tasarlanmış olup bu görevlerini nöronları sarmalayıp yerlerinde tutarak, nöronlara besinleri ve oksijeni sağlayarak, elektrik sinyallerinin daha hızlı ilerlemesi için nöronları yalıtarak ve sinir sistemine giren herhangi bir döküntü artığı temizleyerek yerine getirir ve nöronlardan farklı olarak bölünebilirler. Merkezi sinir sistemi(MSS), beyin ve omuriliği içerir. Bu sistem, periferik sinir sisteminden(PSS) doğan tüm işaretleri bütünleştirir. MSS'in dışında kalan tüm nöronlar PSS'yi meydana getirir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Normal bir erişkinde yaklaşık 10^{11} nöron bulunur. Nöronlar, kendisinden uzun (akson) ve kısa (dendrit) uzantıların çıktığı bir hücre gövdesinden(soma) oluşur. Yani nöronlar başlıca üç bölgeden oluşur, nükleusun yer aldığı ve biyosentezin gerçekleştiği hücre gövdesi, gövdenin, diğer hücrelerden gelen kimyasal sinyalleri alan ince uzantılar olan dendrit ve diğer hücrelere sinyal iletiminden sorumlu olan uzunlukları birkaç milimetreden metreye kadar değişebilen ve gövdeden periferik uzanan lifsel yapı şeklindeki yapı aksonlardır (Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Dendritler, diğer nörönlörün aksonlarından bilgi alırken, aksonlar bilgiyi diğer nörönlörlere aktarır. Akson-dendrit bağlantısına kavşak adı verilir. Nörönlörün çoğu çok sayıda dendrite sahip olup bunların her biri çok sayıda aksondan işaret alabilir. Bu yapılanma tek bir nörönlörün çok sayıda kaynaktan gelen bilgileri bütünlemesine olanak sağlar. Nörönlörlerde sadece tek bir akson olmasına karşın aksonların çoğu yaygın dallanmalar yaparak bilgiyi çok sayıda hedefe dağıtır. Nörönlörler, işaretleri zarları üzerindeki elektriksel potansiyelde değişiklikler yaparak iletir. İşaretin bir kavşağı aşabilmesi nörotransmitterlerin salınmasını gerektirir ve bu nörotransmitterler özgül almaçlarına bağlandıkları zaman alıcı veya hedef hücrede elektriksel bir işaret başlatırlar. Nörönlörler farklılaşması son aşamada olan hücrelerdir, yani daha fazla bölünebilme yetenekleri bulunmaz. Bu nedenle, zedelenmiş nörönlörün kendilerini onarma yetenekleri oldukça kısıtlıdır ve hasar gördükleri zaman sıklıkla apoptoza, yani programlı hücre ölümüne giderler (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Akson, post sinaptik (hedef) hücre ile temas kurduğu yer olan sinapsda sonlanır. Akson yer yer esas olarak sfingomiyelin lipidinden meydana gelmiş miyelin bir kılıfla kaplıdır. Bu kılıf bir elektrik yalıtıcı olarak hareket eder ve büyük hayvanlarda bazen 1 metreyi aşan uzun mesafeler boyunca sinir impulsunun iletimini sağlar. Akson boyunca miyelin kılıfı yaklaşık her milimetrede bir Ranvier boğumları (nod) adı verilen miyelinsiz bölgelerle kesintiye uğrar. Aksonun ucu (yani, sinir ucu) asetilkolin gibi kimyasal nörotransmitterlerin depolanmış olduğu sinaptik veziküllerle doludur. Bir sinir impulsu sinir ucuna ulaştığı zaman, bu sinaptik veziküller içeriklerini pre-sinaptik ve post-sinaptik hücrenin yüzeyindeki reseptörlerle etkileşir ve o hücrede bir sinyal iletimine sebep olur. Beynin ve omuriliğin dışında yer alan sinir düğümleri olan gangliyonlar; sinir hücrelerinin gövde kısmını barındıran küçük kitlelerden oluşan sinir dokularıdır (Guyton and Hall 1996; Bayrak 2008).



Nöronlar arası bilgi aktarımı ‘sinaps’ adı verilen, iki nöronun birbiriyle bağlantı kurduğu ve impulsun bir nörondan diğerine geçişinin kontrol edildiği bölgelerde gerçekleşir. Bir nöronun aksonu ‘sinaptik yumru’ olarak adlandırılan kalın sonlanmalar göstererek, diğer nöronun dendriti ile iletişim bölgeleri oluşturur. Nöronun presinaptik bölgesine uyarının ulaşmasıyla ‘nörotransmitter’ adı verilen kimyasal ileti maddesi iki nöron arasındaki ‘sinaptik boşluğa’ salınır. Postsinaptik bölgeye ulaşan kimyasal ileti sonraki hücrede elektriksel potansiyel değişimine neden olur. Akson boyunca ilerleyen bu elektriksel potansiyel değişim dalgaları ‘aksiyon potansiyeli’ olarak adlandırılır. Aksiyon potansiyeli sinapslarda nörotransmitterler aracılığıyla kimyasal iletiye çevrilmiş olur ve bu kimyasal ileti de bir sonraki sinir hücresinde yeni bir aksiyon potansiyelini başlatır. Ökaryotlarda en hızlı ve kompleks sinyal iletimi sinir implusları ile olur. Sinir sisteminde sinyal iletimi bir elektriksel uyarı (aksiyon potansiyeli) hücrenin bir ucundan sitoplazmik uzantı (akson) aracılığıyla taşıyan, özelleşmiş hücreler olan nöron ağıyla gerçekleşmektedir. Elektriksel sinyal sinapta nörotransmitter moleküllerin salınımını tetikleyerek, sinyalin bir sonraki hücreye taşınmasını sağlar (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Nörotransmitterler

Nörotransmitterler, presinaptik membrandan sinaps aralığına salınan, postsinaptik membranda bir reseptöre bağlanarak burada aksiyon potansiyeli oluşturan ve böylece uyarıyı ileten kimyasal maddelerdir. Nörotransmitter olarak işlev gören moleküller iki

temel yapısal sınıfta incelenir; 1-azot içeren küçük moleküller ve 2- nöropeptidler. Azot içeren küçük nörotransmitter moleküllerinin en önemlileri arasında amino asitler (glutamat, glisin, aspartat), tirozinden türetilen katekolaminler (dopamine ve noradrenalin), serotonin (triptofandan türetilen), GABA (glutamattan türetilir), asetilkolin (karaciğerde sentez edilen kolin ve asetil-CoA'dan türetilir), histamin ve birçok peptidi kapsar. Ayrıca bu sınıfta adrenalin, aspartat ve nitrik oksit yer alır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Sinir dokusunda amino asit metabolizmasının ana işlevi nörotransmitterlerin sentezidir. 40'dan fazla bileşiğin nörotransmitter olarak işlev gördüğüne ve bunların tümünün öncül amino asitlerden türetilmiş azot içerdiğine inanılmaktadır. Genel olarak nörotransmitterler aksonların kavşak önü uçlarında oluşur ve akson üzerindeki elektrokimyasal potansiyelde meydana gelen geçici bir değişiklik tarafından serbest bırakılıncaya kadar kesecikler içinde depolanır. Nörotransmitterlerin bazılarının daha sonraki katabolizmasını idrarla atılan ürünler oluşturur. Nörotransmitterlerin metabolizmasının hızlı oluşu de novo nörotransmitter sentezi için amino asit öncül havuzunun kesintisiz olarak kullanılabilir halde bulunması gerekir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Genel olarak her nöron sadece bir kavşak üzerinden veya diğer bir hücreye iletim için kullandığı nörotransmitterleri üretir. Nöronal yollar çoğu kez kullanıldıkları nörotransmitterle tanımlanır, örneğin dopaminerjik bir yol nörotransmitter olarak dopamine sentezler ve salar. Nöropeptidler genellikle merkezi sinir sisteminde (MSS'de) üretilen ve işlemlenen küçük peptidlerdir. Bu peptidlerden bazılarının hedefi MSS iken (örneğin, opioid almaçlara bağlanan ve ağrı işaretlerini bloke eden andorfinler) diğerleri, diğer organlarda bulunan almaçlarına bağlanmak üzere kana salınır (örneğin büyüme hormonu ve tiroid uyarıcı hormon). Birçok nöropeptid önce bir iri molekül halinde sentez edilir ve sonra aktif peptide vermek üzere kırılır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Azot içeren küçük nörotransmitterlerin çoğu sentez, salgılanma ve metabolizma içeren bir grup ortak niteliğe sahiptir. Bu nörotransmitterlerin çoğu kavşak önü ucun sitoplazmasında amino asitler, glikoliz ile TCA döngüsünün ara ürünleri ve O₂ kullanılarak sentezlenir. Sentez hızı genellikle nöronun ateşleme hızını karşılayacak şekilde düzenlenmiştir. Nörotransmitterler bir kez sentezlendiğinde proton gradientine kenetlenir, ATP-gerektiren bir pompayla depolama keseciklerine taşınır. Depolama keseciklerinden salınma, kavşak ardı zarı depolarize eden ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları yoluyla hücre içine Ca⁺² iyonlarının akmasına neden olan sinir uyarısı tarafından tetiklenir. Ca⁺² iyonlarının hücre içine akışı keseciğin kavşak zarıyla kaynaşmasını nörotransmitteri kavşak yarığına boşaltmasını teşvik eder. Kavşak üzerinden iletim nörotransmitterin kavşak ardı zar üzerindeki bir almaca bağlanması ile tamamlanır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Sinir sisteminde uyarıların iletilmesinde görev yapan kimyasal maddeler olan nörotransmitterlerin bazı önemli ortak özellikleri vardır:

- 1) Salıverilecekleri sinir uçlarında sentez edilirler ve/veya depolanırlar. Nörotransmitter olarak etki eden ve nöroaktif peptitler olarak adlandırılan bileşiklerin sentezi peptit hormonlarının sentezine benzemektedir. Hücre gövdesindeki pürüklü endoplazmik retikulumda öncüllerinden peptitler sentez edilmekte ve daha sonra biriktirildiği veziküllerde akson boyunca taşınmaktadırlar.
- 2) Presinaptik uyarı ile salıverilirler ve uyarı iletildiğinde sinapsın ilişkide olduğu ekstrasellüler sıvıda bulunurlar. Bazı sinir hücrelerindeki Ca⁺² /kalmodulin-bağımlı protein kinaz II, salıverilecek nörotransmitterlerin bulunduğu veziküller ile ilişkili olan sinaptik I proteininin fosforilasyonunu sağlar. Sinaptik I proteininin fosforilasyonu, veziküllerin plazma membranı ile birleşmesi ve nörotransmitterlerin salıverilmesinde rol oynamaktadır.
- 3) Postsinaptik olarak uygulandıklarında presinaptik uyarı ile alınan yanıtı benzer yanıt oluştururlar.

4) Etkilerini önleyen spesifik antagonistleri vardır. Genellikle farmakolojik bileşikler olan antagonistler nörotransmitter ile reseptör arasındaki ilişkiyi engelleyerek uyarıya verilen yanıtı engellemektedirler.

5) Nörotransmitterin etkisini sonlandıran bir mekanizma bulunmaktadır.

Sinir hücrelerinden kana verilen maddeler nörohormon olarak adlandırılırlar. Nörotransmitterler aynı zamanda nörohormon olarak fonksiyon görürler. Nörotransmitterlerin bazıları **uyarıcı (stimülatör)**, bazıları ise **inhibe edici (inhibitör)** etkilidirler. Membran depolarizasyonuna neden olan nörotransmitterler uyarıcı, hiperpolarizasyon başlatan nörotransmitterler ise inhibitör etkilidirler. Asetilkolin, noradrenalin, serotonin, histamin, glutamat ve aspartat **stimülatör** nörotransmitterlerdir. Dopamin, GABA ve glisin ise **inhibitör** nörotransmitterlerdir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Reseptörler

Nörotransmitterlerin postsinaptik membranda veya nörohormonların hedef hücrede bağlandıkları reseptörler değişik tiplerdedirler:

1) Tip I reseptörler enzim aktivitesine sahiptirler. Birçok durumda bu reseptörler, tirozin kinaz aktivitesine sahip intrasellüler bölümler içerirler. Reseptörün ekstrasellüler bölümüne nörotransmitter veya nörohormonun bağlanmasıyla intrasellüler bölümde tirozin kinaz kalıntısı aktive olur. Aktive olan tirozin kinaz, diğer proteinlerin (enzimler) tirozin kalıntılarını fosforilleyerek enzim aktivasyonunu sağlar. Bundan başka reseptör kendi kendini de fosforilleyebilir ve fosforille tirozin kalıntılarına bağlanan proteinler çok daha fazla aktive olurlar. Aktive olan ikinci proteinler sinyali hücrenin diğer kısımlarına iletirler ve sonuçta hücrenin yanıtı ortaya çıkar.

Protein kinaz A diye bilinen ve katekolamin nörotransmitterlerin (dopamin, noradrenalin, adrenalin) oluşumunu artıran tirozin hidroksilazın fosforilasyonunu gerçekleştiren enzimin aktivasyonunda tip I reseptörler rol oynamaktadır. Hedef doku

hücrelerinin membranlarında bulunan insülin ve çeşitli büyüme faktörlerine ait reseptörler, tip I reseptörlere örnektirler.

2) Tip II reseptörler iyon kanallarıdır, **iyonotrofik reseptörler** olarak da adlandırılırlar. Reseptöre nörotransmitter veya nörohormonun bağlanmasıyla kanal hızla açılır ve ilgili iyonun (Na^+ , K^+ ve Cl^-) kanaldan geçişiyle intrasellüler iyon konsantrasyonu değişir. Nikotinik reseptörler (Na^+ ve K^+ kanalları) ve A reseptörler (Cl^- kanalları) tip II reseptör örnekleridir.

Nikotinik reseptörlere asetilkolinin bağlanması, kanalda yapısal değişikliklere yol açarak Na^+ iyonunun hücre içine girmesine neden olur. Na^+ iyonu hücre içine girerken membran potansiyeli sıfıra doğru hızla artar ki bu, uyarıcı (stimülator) postsinaptik potansiyel olarak adlandırılır.

A reseptörlere GABA bağlanması, kanalda yapısal değişikliklere yol açarak Cl^- iyonunun hücre içine girmesine neden olur. Cl^- iyonu hücre içine girerken membran hiperpolarize olur. Bu durum inhibitör postsinaptik potansiyel olarak adlandırılır.

3) Tip III reseptörler, sinyal iletimini guanin nükleotid bağlayan proteinler (G proteinler) vasıtasıyla sağlayan 7-heliks transmembran proteinlerdir. Bu tip reseptörler **metabotrofik reseptörler** olarak da adlandırılırlar. Metabotrofik reseptörlere nörotransmitter veya nörohormonun bağlanması, G proteinler vasıtasıyla hücrede birtakım metabolik olayların olmasına neden olur (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Asetilkolin

Biyolojik rolü büyük bir esterdir. Asetilkolin özel bir salgı vezikülü olan sinaptik veziküllerde depolanır ve Ca^{2+} bağımlı şekilde ekzositozla sinaptik aralığa salınır. Bu asetilkolin molekülleri post sinaptik hücre yüzeyindeki özgün reseptörlere bağlanarak hücre zarından geçerler (Perry *et al.* 1999).

Asetilkolin; omurgalılarda ve diğler hayvanlarda birbirine yakın sinir hücresi arasındaki dar aralıklardan sinirsel uyarıların atlatılarak taşınmasında rol oynadığı gibi bu uyarılar da kas hücresinin kasılmasını başlatır. Sinirsel uyarıların taşınması ve kas hücrelerinin kasılması elektrokimyasal olaylardır. Elektrikçe yüklü iyonlar sinir ve kas hücrelerini kaplayan membranlar boyunca akar ve sinir uyarılmasıyla uzun sinir lifleri boyunca iyon akışı sinapsa ulaşınca kadar devam eder. Orada sinir hücresindeki ufak baloncuklar, depo edilmiş olan taşıyıcı ACh'ın serbest kalmasını sağlar. ACh sinaps boyunca difüzenir ve yakındaki sinir lif membranına bağlanır. Bu bağlanma olur olmaz hücre membranı boyunca sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) iyonları yer değiştirir. Böylece ikinci bir sinir hücresinde sinirsel uyarım başlamış olur (Noyan 1996).

Asetilkolin reseptörü allosterik bir protein olup, iki alfa alt birimi üzerinde, iyon kapısından yaklaşık 3.0 nm uzaklıkta iki yüksek ilgili bağlanma yeri içermektedir, 4 polipeptid zincirinden meydana gelmiş 250 kDa'luk bir kompleks olup, zarda bir kanal geçidi oluşturur.

İki asetilkolin molekülü bağlandığında bu kanal açılarak Na^+ iyonlarının hücreye girmesine ve K^+ iyonlarının ise hücreden çıkmasına izin verir. Asetilkolin bağlanması iyon kanalında kapalıdan açığa doğru bir konformasyon değişikliğine neden olmaktadır. İşlem pozitif kooperatiftir: birinci yere asetilkolin bağlanması ikinci yerin asetilkolini bağlama ilgisini artırmaktadır. Presinaptik hücreler kısa bir süre asetilkolin salgıladığı zaman, postsinaptik hücre reseptörünün her iki bölgesi de kısa süreli işgal edilir ve kanal açılır. Bu durumda Na^+ veya Ca^{2+} zardan geçebilir ve bu iyonların hücre içine akışıyla plazma zarı depolarize olarak, dokunun tipine göre değişiklik gösteren daha sonraki olayları başlatır. Postsinaptik bir nöronda depolarizasyon bir aksiyon potansiyelini başlatır. Nöromusküler bileşkede ise kas lifinin depolarizasyonu kas kontraksiyonunu tetikler. Sinaptik yarıktaki asetilkolin derişimi normalde, yarıktaki bulunan asetilkolinesteraz enzimiyle hızla düşürülür. Asetilkolin düzeyleri birkaç milisaniyeden fazla yüksek kalırsa, reseptör duyarsızlaşması ortaya çıkar. Reseptör kanalı, kapalı ve asetilkolinin çok sıkı bağlı olduğu üçüncü bir konformasyona dönüşür (Nelson and Cox 2005).

Asetilkolinin bağlanma bölgelerinden yavaş (onlarca milisaniyede) serbestleşmesi, reseptörün kapalı ve asetilkolin düzeylerine yeniden duyarlı olduğu dinlenme durumuna gelmesine olanak sağlar (Nelson and Cox 2005).

Asetilkolinin, asetil CoA ve kolinden sentezlenmesi kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından katalize edilir. Bu sentez basamağı kavşak önü uçta meydana gelir. Bileşik keseciklerde depolanır ve daha sonra kalsiyum aracılı ekzositozla salınır. Kolin, kavşak önü uç tarafında kandan düşük afiniteli bir taşıma sistemi (yüksek km), kavşak yatağından yüksek afiniteli (düşük km) bir taşıma düzeneği ile alınır. Zar lipidlerinde fosfotidilkolinin (ve büyük olasılıkla sfingomiyelin) hidrolizi ile de türetilir. Yani zar lipidleri kolin için bir depo noktası oluşturabilir ve bunların hidrolizi, daha sonra da kolinin salınması ileri derecede düzenlenmiştir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Kolin diyetin sık rastlanan bir yapı taşı olsada insanda fosfolipidlerin sentez yolunun bir parçası olarak da sentezlenir. Kolin sentezi için tek yol SAM'dan gelen üç metil grubunun fosfotidilkolin yapmak üzere fosfotidiletanolaminin, etanolamin kısmına ardışık olarak eklenmesidir. Fosfotidilkolin daha sonra kolin veya fosfokolin olmak üzere hidrolize edilir. Fosfotidiletanolaminin, fosfotidilkoline dönüştürülmesi aralarında karaciğer ve beyinde bulunan pekçok dokuda görülür. Bu dönüşüm B6 (tetrahidrofolat) ve B12'ye bağımlıdır. Kolin sodyum ile birlikte ATP kullanılarak hücreye alınır, bu alınıp tutulma işlemi asetilkolin sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Asetilkolin sentezi için kullanılan asetil grubu temel olarak glukozun piruvata oksitlenmesi ve piruvatın, piruvat dehidrogenaz reaksiyonu yoluyla asetil-CoA yapmak üzere dekarboksilasyonundan türetilir. Sinir dokuları yağ asitlerini sadece sınırlı düzeyde Asetil-CoA'ya oksitleme kapasitesine sahip olduğundan, asetil gruplarının ana kaynağı glukozun oksidasyonudur. Yani asetilkolin sentezini katalizleyen kolinasetiltransferazın bulunduğu sinir uçlarında en önemli Asetil-CoA kaynağı glukozdur. Piruvat dehidrogenaz sadece mitokondrilerde bulunur. Yani piruvat

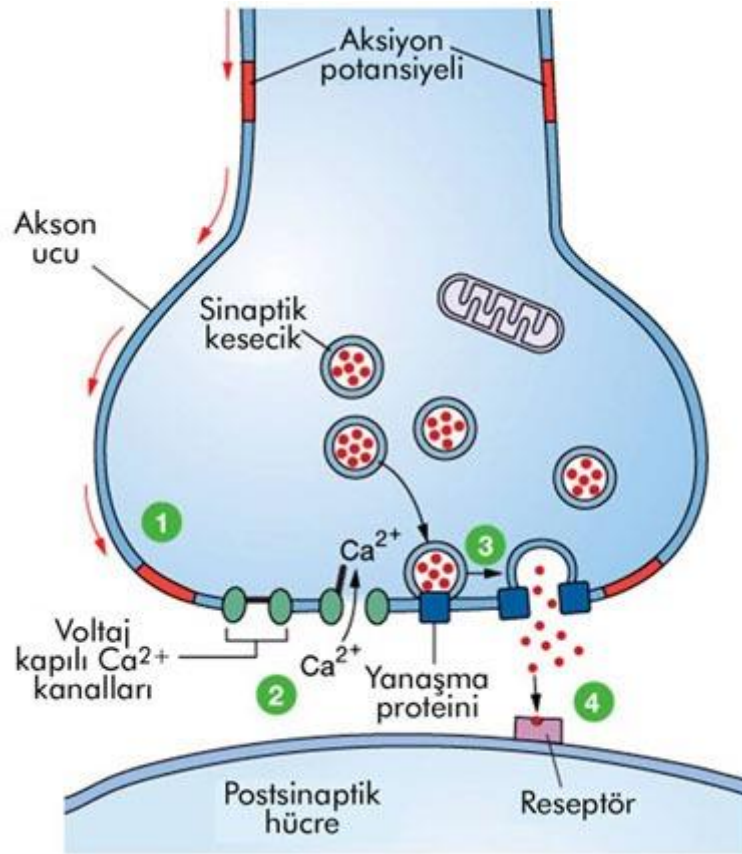
mitokondride asetil-CoA'ya dönüşür, fakat mitokondri iç membranı CoA-SH için geçirgen olmadığından piruvat mitokondriye geçer ve burada sitrata dönüşür, sitrat mitokondriden sitozole çıkar ve burada sitrat liyaz etkisiyle Asetil-CoA oluşur. Asetil grubu sitoplazmaya sitratın bir parçası olarak aktarılır ve sonra sitozolde asetil-CoA vermek üzere okzalasetata parçalanır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Oluşan asetilkolin sinir hücresinin presinaptik kabarcığında veziküllerde depolanır ki son konsantrasyonu 880 mM kadar olur. Asetilkolinin veziküllerde depolanması, enerji ve vezikül içinde pH:5 olacak şekilde H^+ gradienti gerektirmektedir. Her bir vezikül içerisinde 5000-10000 asetilkolin molekülüyle birlikte yaklaşık 1/5 oranında ATP yer almaktadır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Sinir ucuna aksiyon potansiyelinin ulaşmasından sonra voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları açılmakta ve hücre içinde artan Ca^{+2} iyonları veziküllerin membranı ile birleşerek vezikül içeriğinin salıverilmesine yol açmaktadır. Ekzositoz sonucunda asetilkolin vezikül içeriği ile birlikte sinaptik aralığa dağılır. Polarize durumda olan postsinaptik membran, çevresine asetilkolinin girmesiyle lokal olarak depolarize olur. Sinapsa ulaşan bir aksiyon potansiyeli, 200-300 kadar vezikül içeriğinin ekzositoz sonucu boşalmasına neden olmaktadır. Presinaptik kabarcıktaki veziküllerden sinaptik aralığa boşalan asetilkolin, difüzyonla postsinaptik membrana ulaşır ve buradaki reseptörlerine bağlanır. Asetilkolinin postsinaptik membrandaki asetilkolin reseptörlerine bağlanması, yeterli sayıda kanal açılmasına yol açarak Na^+ iyonlarının hücre içine girmesine, postsinaptik membranın depolarizasyonuna neden olmakta ve postsinaptik hücrenin fizyolojik fonksiyonunu yerine getirmesini sağlamaktadır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Asetilkolin, uyarının iletilmesinden sonra reseptörden ayrılır. Reseptörden ayrılan asetilkolin, pre- ve postsinaptik membranlarda bulunan asetilkolinesteraz tarafından hidrolize edilir ve böylece asetilkolinin etkisi sonlandırılır. Eserin (Fizostigmin), Paration ve malation gibi nörotoksinler asetilkolinesterazın aktif merkezindeki serin kalıntılarını bloke ederek asetilkolinin etkilerini uzatırlar. Ok zehiri olarak bilinen kürar

ise asetilkolinin reseptörüne bağlanmasını kompetitif olarak bloke ederek asetilkolinin etkisini önler. Asetilkolin hidrolizi sonucu oluşan kolin yüksek aktiviteli bir taşıma sistemiyle presinaptik membrandan geri çekilir, asetat ise ATP kullanılarak metil adenilat üzerinden yeniden asetil-CoA oluşturularak asetilkolin sentezinde kullanılır hale gelir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).



Beyindeki kolin miktarı asetilkolin sentezi için hız kısıtlayıcı hale gelebilir ve tardiv diskinezi bulunan hastalarda (çoğunlukla yüz kasları ve dilde inatçı, istem dışı hareketler vardır) beyin asetilkolin miktarını artırmak için diyetle lesitin(fosfotidilkolin) desteği sağlanması kullanılmıştır. Yenidoğanda hem beyin lipid sentezi (fosfotidilkolin ve sfingomiyelin) hem asetilkolin biyosentezi için çok yüksek bir kolin talebi bulunmaktadır. Anne sütünde fosfotidilkolin düzeyinin yüksek oluşu ve yenidoğanda kan-beyin engeli üzerinden kolin taşıyan yüksek afiniteli bir taşıma sisteminin yüksek düzeyde sürdürülmesine yardım eder (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Fetusta da yüksek bir kolin talebi bulunmakta olup kolini plasentadan aşırı yüksek afiniteli bir taşıma sistemi bulunmaktadır. Kolin anne depolarından, anne diyetinden türetilir ve sentez birincil olarak anne karaciğerinde yapılır. Kolin sentezinin folat ve B12 vitaminine bağımlı olmasından dolayı yüksek talep gebelik sırasında annenin bu iki vitamene olan gereksinimindeki artışa katkıda bulunur. Kolinerjik sinapsların postsinaptik membranlarında nikotinik reseptörler ve muskarinik reseptörler olmak üzere iki türlü asetilkolin reseptörü vardır. Muskarinik reseptörler beyinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bir hücre veya organelin bir uyarıya yanıt verebilme yeteneği uyarılabilme olarak tanımlanmaktadır. Uyarı, membranda geriye dönebilen bir değişiklik meydana getirir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Elektriksel uyarı, bilginin hızla uzun mesafeler kat ederek iletilmesini sağlarken, kimyasal ileti, iki nöron arasında bilginin geçişini sağlamaktadır. Elektriksel uyarı ve aksiyon potansiyeli nöronun iç ve dış ortamında geçici akım değişikliğine yol açar ve plazma membranının elektrik potansiyeli dinlenme durumuna göre değişir. Her nöronda membran boyunca elektriksel potansiyel farkı bulunmaktadır. Bu membran potansiyeli membranın her iki tarafındaki pozitif ve negatif yüklerin farklılığı sonucu oluşur. Sinir hücresi dinlenme durumunda hücre içinde negatif, hücre dışında pozitif olacak şekilde elektriksel dağılım gösterir. Bu dağılım farkı membran lipitlerinin iyonların geçişinde bariyer oluşturmasından kaynaklanır. Bunun sonucunda yaklaşık 60-70 mV'luk bir elektrik potansiyel farkı ortaya çıkar. Herhangi bir sinyal olmadığı dinlenme anında bu elektriksel fark 'dinlenme membran potansiyeli' olarak bilinir. Hücre dışındaki potansiyel sıfır olarak kabul edildiğinde, hücre içinde negatif yük baskın olur. Bu potansiyel farklılık -70 mV'a eşittir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Membranın iki yüzü arasındaki bu potansiyel fark, hücre içine veya dışına iyon çıkışı ile bozulur. Yük farkının azalması 'depolarizasyon', yük farkının artışı 'hiperpolarizasyon' olarak adlandırılır. Sinir uyarısı sonucu potansiyel farkta hızla geçici değişiklik oluşması 'iyon kanalları' ile sağlanmaktadır. Açılıp kapanabilen (gated) ve sürekli açık olan (nongated) kanallar olmak üzere iki tür iyon kanalı vardır. Sürekli açık olanlar dış faktörlerden bağımsız çalışır ve dinlenme membran potansiyelinin sağlanması ve

korunmasında başlıca görevi üstlenirler. Açılıp kapanabilen kanallar ise, elektrik, mekanik ve kimyasal uyarılara duyarlıdır. İyonların sinir membranlarının her iki tarafındaki dağılımları dengeli değildir. Hücre dışında Na^+ ve Cl^- , hücre içinde K^+ ve organik anyonlar yoğun olarak yer alır. Bu iyonik dağılım sonucunda da dinlenme potansiyeli ortaya çıkar. İyonların hücre içi ve dışı dağılımında etkin iki güç mevcuttur. Kimyasal konsantrasyon farkı bu iyonlar için itici güç oluşturur(kimyasal potansiyel). Membrandaki yük farklılığı sonucu ortaya çıkan elektrostatik güç iyonları yüklerine göre hareket etmeye yöneltir. Örneğin, Cl^- iyonu özellikle hücre dışında yoğun olarak bulunduğundan sürekli açık olan klor kanallarından konsantrasyon gradyanının düşük olduğu hücre içine doğru hareket edecektir. Buna karşılık hücre içindeki negatif yük fazlalığı Cl^- iyonunu hücre dışına yönlendirecektir. Sonuçta ulaşılan hücre içi ve dışı konsantrasyon oranı membran potansiyeline göre belirlenecektir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

K^+ iyonu içinde benzer güçler söz konusudur. Ancak Na^+ iyonu için her iki güçte Na^+ iyonunu hücre içine yönlendirecek biçimde hareket eder. Öncelikle Na^+ iyonu hücre dışında fazla olduğundan konsantrasyon gradyanı yönünden hücre içine yönelir. Öte yandan, Na^+ iyonu membran potansiyel farkı nedeniyle de hücre içine hareket eder. Böylece, hücre membranı dinlenme potansiyelinde ise hücre içine hareket eden Na^+ iyonu ile dışına yönelen K^+ iyonu dengede olacaktır. Ancak bu durumun sürekliliği K^+ havuzunu boşaltacak, hücre içi Na^+ iyonu artacak ve iyonik gradyan azalarak, geriye dönüşümsüz bir depolarizasyon oluşacaktır. Na-K iyonları arasındaki dağılımın korunması, hücre dışına Na^+ çıkışı ve beraberinde K^+ girişini sağlayan Na-K pompası ile gerçekleştirilmektedir. Bu pompa, Na^+ ve K^+ 'u net elektiksel gradyanların tersine yönlendirdiğinden enerji gerektiren bir sistemdir. Bu değişim için gerekli enerji, ATP'nin hidrolizi ile sağlanır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Duyusal hücrelerin, nöronların ve kas hücrelerinin uyarılabilirliği çeşitli uyarılara yanıt olarak Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Cl^- gibi inorganik iyonların plazma zarından düzenli bir şekilde geçmelerini sağlayan iyon kanalları ve sinyal ileticilerine bağlıdır. Bu iyon kanalları kapılı olup ilişkili reseptörün özgül ligandının (örneğin, bir nörotransmitör)

bağlanmasıyla aktifleşmesine ya da transmembran elektriksel potansiyel, V_m , değişikliklerine bağlı olarak açık ya da kapalı olabilir. Bütün ökaryotik hücre membranlarının iç tarafı ile dış tarafı arasında, iç taraf dış tarafa göre elektronegatif olmak üzere 60 mV kadar potansiyel farkı vardır. Bu, membranın iki tarafında anyon ve katyonların asimetrik dağılımının sonucudur (Nelson and Cox 2005).

En iyi anlaşılmiş ligant-kapılı reseptör kanal örneklerinden biri nikotinic asetilkolin reseptörüdür. Reseptör kanalı nörotransmitör asetilkoline (ve ismini aldığı nikotine) yanıt olarak açılır. Bu reseptör belirli sinapslardaki nöronların postsinaptik zarlarında ve nöromusküler bileşiklerdeki kas liflerinde bulunmaktadır (Nelson and Cox 2005).

Hücre membranının iki tarafında anyon ve katyonların asimetrik dağılımından ve dolayısıyla membranın iki tarafındaki potansiyel farkından çeşitli faktörler sorumludur. Bu faktörlerden en önemlisi plazma membranlarının K^+ iyonlarına geçirgenliğinin Na^+ iyonlarına geçirgenliğinden 20 kat daha fazla olmasıdır. Hücre membranında bulunan sodyum pompası (**Mg^{+2} -bağımlı Na^+/K^+ -ATPaz**) bu faktörlerden bir başka önemli olanıdır. Na^+/K^+ ATPaz hücre içine taşıdığı her iki K^+ için hücre dışına üç Na^+ çıkmasını sağlayarak ve böylece hücre içini dışına göre negatif hale getirerek plazma zarı boyunca yük dengesizliğine neden olur. Bu durumdaki zar polarize olmuş kabul edilir ve hücre içi dışına göre negatif olduğundan V_m negatiftir. Tipik bir hayvan hücresinde $V_m = -60$ ile -70 arasındadır (Nelson and Cox 2005).

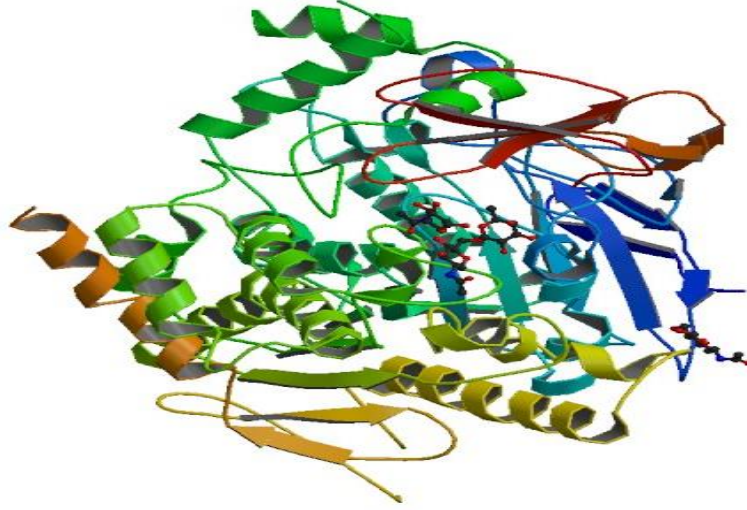
Sodyum pompası (Mg^{+2} -bağımlı Na^+/K^+ -ATPaz), hidroliz olan her ATP molekülünden açığa çıkan enerjiyle, konsantrasyon gradientlerine karşı 3 Na^+ iyonunun hücre içinden hücre dışına atılmasını ve bu sırada 2 K^+ iyonunun hücre dışından hücre içine girmesini sağlamaktadır. Böylece hücreye giren pozitif yükten daha fazlası hücreden çıkmakta ve dolayısıyla hücre membranının iç tarafı ile dış tarafı arasında, iç taraf dış tarafa göre elektronegatif olmak üzere bir potansiyel farkı oluşmaktadır (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Sinir hücrelerinin membranları Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonları için kanal proteinleri içermektedirler. Bu kanallar genellikle kapalıdır, fakat iyon geçişi için çok kısa bir süre açılabilirler. Sinir hücresinin uyarılmasıyla membranda Na^+ kanalları açılır, pozitif olarak yüklü Na^+ iyonları hücre içine girer ve sonuçta depolarizasyon olur. Uyarı yeterince şiddetli olursa aksiyon potansiyeli denen ve sinir aksonu boyunca iletilen sinyal oluşur. Depolarizasyon ile birlikte K^+ kanallarının açılmasıyla K^+ iyonları hücre içinden hücre dışına çıkar ve membran potansiyeli önceki negatif değerine döner (repolarizasyon). K^+ iyonlarının hücre içinden hücre dışına fazla çıkışı hiperpolarizasyona da neden olur (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

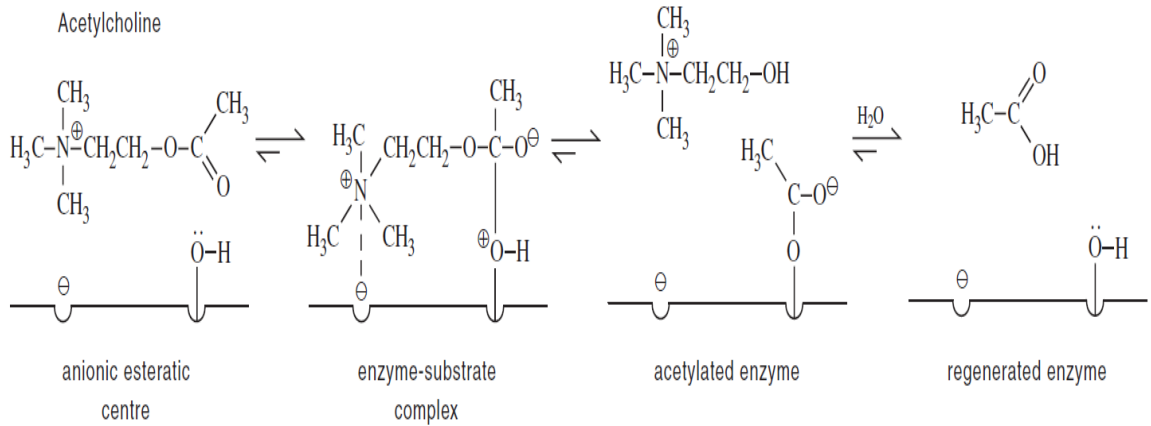
Sodyum pompası (Mg^{+2} -bağımlı Na^+/K^+ -ATPaz) iyon konsantrasyonlarını başlangıçtaki duruma getirmek için devamlı olarak çalışır. Yeterince şiddetli bir uyarı sonucu sinir hücresinde oluşan aksiyon potansiyeli akson boyunca seri depolarizasyonlarla iletilir. Aksiyon potansiyeli sinir hücreleri arasındaki bağlantı yeri olan sinapsa ulaştığında presinaptik bölgede veziküllerde bulunan ve **nörotransmitterler** adı verilen kimyasal maddeler presinaptik membrandan sinaps aralığına salıverilir. Presinaptik membrandan sinaps aralığına salıverilen nörotransmitter postsinaptik membranda bir reseptöre bağlanarak burada aksiyon potansiyeli oluşturur ve böylece uyarı iletilmiş olur (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

İyon kanalları genellikle ya anyonların ya da katyonların geçişine olanak verdiği, her ikisinin birden geçmesine izin vermediği için bir kanaldan iyon akışı zarın iki yüzü arasındaki yük dağılımına neden olarak V_m 'yi değiştirir. Na^+ gibi pozitif yüklü bir iyon girişi veya Cl^- gibi negatif yüklü bir iyonun çıkışı zarı depolarize eder ve V_m 'yi sıfıra yaklaştırır. Tam tersine pozitif iyon K^+ 'nın dışarı çıkması zarı hiperpolarize eder ve V_m 'yi daha negatif hale getirir. Kanallardan bu tür iyon akışı, Na^+/K^+ ATPaz ile gerçekleştirilen aktif taşınmanın tersine pasiftir (Marks 2007; Gürdol ve Ademoğlu 2010).

Asetilkolinesteraz Enzimi

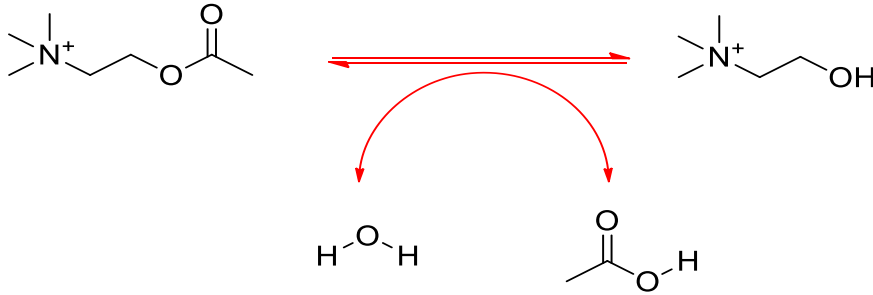


Asetilkolinesteraz (AChE), dokularda serbest veya fosfolipidlerle birleşik halde bulunan lipotropik etkiye sahip, asetilkolini hidrolizleyen özelleşmemiş bir enzimdir.



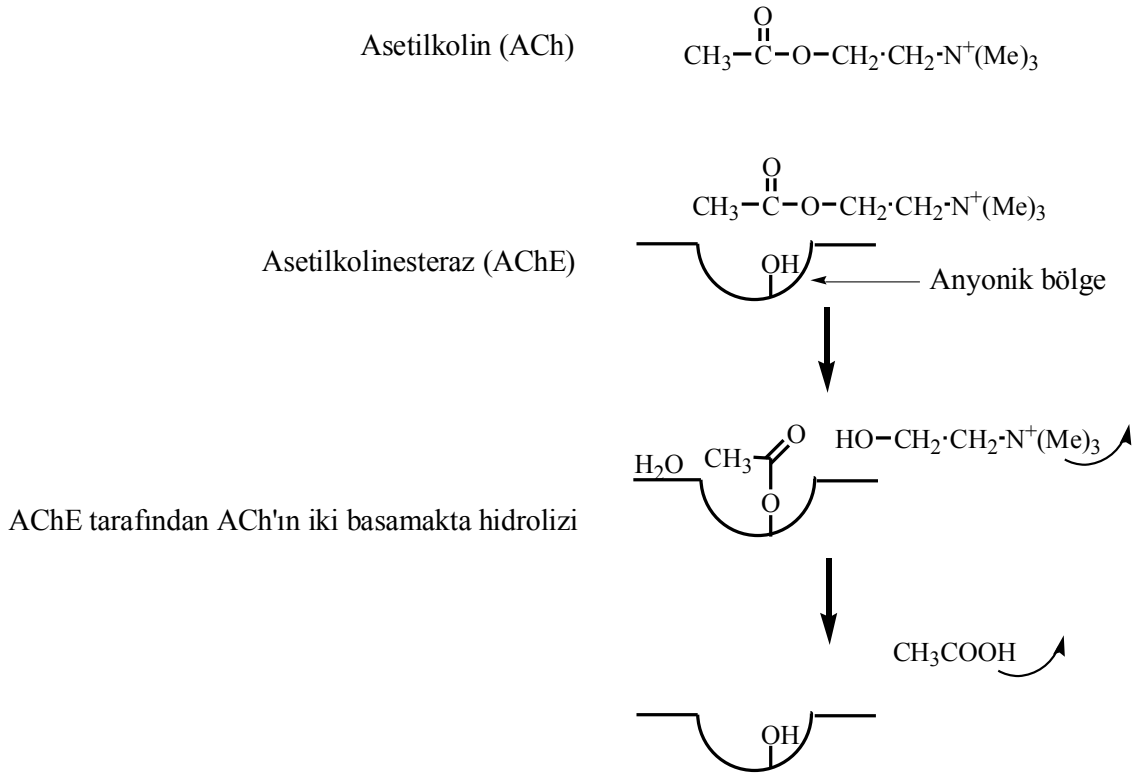
Hayvan kolinesterazları, plazma ve diğer vücut sıvılarının yanı sıra kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda yaygın bulunan enzimlerdendir (Massoulie *et al.* 1992; Ryhanen 1983; Chatonnet and Lockridge 1989). Kolinesterazlar; substrat spesifikliğı, aşırı substrata davranışı ve inhibitörlere karşı hassasiyetine göre 2 sınıfa ayrılır. Asetilkolinesteraz yada gerçek kolinesteraz (AChE; asetilkolin asetil hidrolaz

E.C.3.1.1.7) ve butirilkolinesteraz (BChE; açilkolin açil hidrolaz E.C.3.1.1.8). BChE yalancı kolinesteraz, spesifik olmayan kolinesteraz ve basit kolinesteraz olarak bilinir. AChE, asetilkolini diğer kolinesterazlardan daha hızlı hidrolizler ve butirilkolinde çok daha az aktiftir. Bunun aksine, BChE ayrıcalıklı olarak butirilkolinde görev alırken ayrıca asetilkolinde hidrolizler (Chatonnet and Lockridge 1989; Ekholm 2001).



AChE; aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından başka bir enzimde bulunmayan özelliklere sahiptir. AChE'nin aktif bölgesi dar oluk yapının dip kısmındadır ve iki alt üniteden oluşmuştur. Birincisi negatif yüklü veya anyonik bölge ikincisi katalitik kısmı içeren esteratik bölge ya da katalitik triad (üçlü) (Ser203, Glu334 ve His447) olarak adlandırılır. Katalitik triad, substratın açil bölgesine geçici olarak bağlanır. Hidrofobik alt ünite ve açil cebi tetrahedral geçiş durumunda alkol grubunu içerir. Oksiyon çukuru negatif yüklü karbonil oksijen vererek geçiş durumunu stabilize eder. Katalitik triad'a ilave olarak bilinen tüm AChE'ler periferik anyonik bölge (PAS) olarak adlandırılan ikinci bir substrat bağlayıcı bölge içerir. Bu bölge hem katalitik etkinliğin düzenlenmesine (substrat inhibisyonu) hem de AChE'nin pekçok inhibitör ile etkileşimine aracılık eder, esteratik bölge hidrolizleme görevini yapar (Güven 2000). AChE'nin β amiloid yumak oluşumuna yol açan katalitik olmayan rolünün gerçekleşmesinde periferik anyonik bölge önemlidir. AChE'nin G1, G2 ve G4 olmak üzere üç izoformu olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin belirli bölgelerinde G4 formunun kaybı nedeni ile G4/G1 oranı azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Talesa 2001; Grisaru *et al.* 1999).

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. Bu durumda asetilkolinesteraz enziminin substratla etkileşmesini ve hidrolizin nasıl oluştuğu şöyle açıklanabilir. Asetilkolinesteraz bir glutamik asit, bir histidin ve bir serin rezidüsünden oluşan katalitik üçlü yapısındaki histidin rezidüsüyle reaksiyona sokulması için, glutamik karboksil grubu, nükleofilik saldırı ile asetilkolinin ester fonksiyonunu hidrolizleyen serin hidroksil grubunu aktive eder (Taylor and Lappi 1975; Shafferman *et al.* 1992). Yani ilk basamakta enzim güçlü bir nükleofil olarak rol oynar, ikinci basamakta ise; enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür.



AChE ve ACh'in fizyolojik reaksiyonu (hidroliz)

AChE 'nin başlıca fonksiyonu nörotransmitter asetilkolini hidrolizlemektir ve bilinen en hızlı enzimdir (Quin 1987). BChE'nin önemi ise son yıllarda detoksifikasyon enzimi olarak artmaktadır. BChE farmakolojik ve toksikolojik olarak önemlidir, çünkü ester içeren ilaçları hidrolizler ve güçlü organofosfor sinir ajanlarından olan kolinesteraz inhibitörlerini sinaptik hedeflerine ulaşmadan önce parçalar (Raveh *et al.* 1997).

Kolinesterazlar doku spesifik dağılımına göre de biri diğerinden farklıdır. AChE'nin beyin, kas ve eritrosit membranında çokca olduğu bilinirken, BChE karaciğer, bağırsak, böbrek, kalp ve akciğerde daha yüksek aktiviteye sahiptir (Dave 2000; Prody *et al.* 1987). İnsan, at, fare gibi pekçok türün plazması BChE aktivitesi gösterirken ratların plazmasında AChE aktivitesi BChE'den daha yüksektir (Ecobichon and Corneau 1973; Prody *et al.* 1987; Chatonnet and Lockridge 1989). Serum BChE karaciğerde sentezlenmiştir ve plazmaya gönderilmiştir (Chatonnet and Lockridge 1989).

Asetilkolinesteraz enziminin, kolinerjik sinapsis ve kavşaklarda hem sinir uçlarında hem de kavşak sonrası veya postsinaptik membran üzerinde yerleştiği gözlenmiştir. Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer alır. BuChE ise hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunur (Geula and Mesulam 1999). Son zamanlarda asetilkolinesterazın beyinde nonkolinerjik nöronlarda da bulunduğu gösterilmiştir.

Butirilkolinesteraz, kardeş enzimi asetilkolinesteraza benzer şekilde yapısında üç farklı enzimatik aktivite barındırır, esteraz, aril açilamidaz ve peptidaz (proteaz) aktiviteleri. Asetilkolinesterazın kolinerjik sinir iletimindeki rolü tamamen anlaşılmış olmasına karşın, butirilkolinesterazın gerçek fizyolojik işlevi bugün halen bilinmemektedir. Her iki enzim farklı doku dağılımları gösteren benzer moleküler formlara sahiptir. Butirilkolinesterazın esteraz aktivitesi, organofosfat ve karbamat yapıli inhibitörlerin asetilkolinesteraza ulaşmadan dolaşımdan temizlenmesinde, asetilkolinesteraz yoksunluğunda kolinerjik sinir iletiminin kontrolünde kokain, aspirin, amitriplin gibi bazı ilaçların inaktivasyonu ve bambuterol, heroin gibi bazı ilaçların aktivasyonunda önem kazanmaktadır. Enzimin aril açilamidaz aktivitesinin ise seratonerjik ve kolinerjik sinir iletim sistemleri arasında iletişim sağlama işlevi vardır. Ayrıca enzimin peptidaz ve proteaz aktivitesinin Alzheimer hastalığının gelişmesi ve ilerlemesinde işlevi vardır. Butirilkolinesteraz bu hastalıkta β -amiloid proteinin üretimine ve proteinin β -amiloid plaklara difüzlenmesine neden olmaktadır. BChE, kolinesterazların çözünebilir globuler tetramerik formudur, insanoğlu dahil tüm omurgalıların dolaşımında bulunur. 4 tanımlı alt birimden oluşur ve molekül ağırlığı 340 kDa olan bir glikoproteindir. Herbir alt

birim 3 disülfid köprüsü içeren 574 amino asitten oluşur. Alt birim ağırlığı primer amino asit dizisinden hesaplanmıştır ve 65 kDa olarak rapor edilmiştir. Herbir alt birim 9-N-glikosilasyon bağlanma bölgesi ve bir katalitik bölge içerir. N-terminalden 198.pozisyonda aktif bölge de serin amino asiti bulunur (insanda AChE için 200.amino asit serindir). Herbir alt birimin SDS-PAGE ile 85 kDa olarak hesaplanan molekül ağırlığının %24-31 kadarı karbonhidrat zinciri olarak hesap edilmiştir. İnsan kromozomlarının farklı genlerinin ürünü olmalarına rağmen asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz moleküler formları ve aktif merkez yapıları benzer iki enzimdir ve bazı homologları %65 aynı aminoasit dizisine sahiptir (Allderice *et al.* 1991; Greig *et al.* 2001; Sussman and Silman 2005).

AChE'nin aşırı substrat tarafından inhibisyonu AChE'yi BChE'den ayıran anahtar bir özelliktir. BChE aşırı substratta substrat aktivasyonu gösterir (Tougu 2001; Masson *et al.* 2001). AChE seçici olarak 1,5-bis (4-allildimetilaminopropil) pentan 3-on dibrom(BW 284C51) tarafından, BChE ise spesifik olarak 10-[2-dietilaminopropil]-fenotiyazid (ethopropazine) ve izotetramonoizopropil pirofosfat tetramid(ISO-OMPA) tarafından inhibe edilir (Radi *et al.*1991).

AChE ve BChE farklı doku dağılımlarıyla vücut sıvıları ve dokularda benzer amfilik ve çözünebilir moleküler formlarda bulunur. Bu homo ve hetero oligomerik formlar şöyledir;

1-Tip 1 amfilik dimerler: Glikofosfotidilinositol memeli kas, eritrosit ve lökositte çıkan plazma membranına dimer bağlanır. Bu AChE'nin çoğu formudur ve sadece deterjanlar tarafından çözünebilir ve deterjanların yokluğunda agregat oluşturur.

2-Tip 2 amfilik monomerler ve dimerler: Glikolipid bağlanmadan yoksun olduğundan dolayı tip 1'den ayrılır ve deterjan yokluğunda agregat oluşturmaz. Bunlar tuz solüsyonları tarafından çözünür. Bu formlar her iki kolinesteraz için memeli beyin, kas ve bağırsakta bol bulunur.

3-Hidrofobik kuyruklu tetramerler: 20 kDa uzunluğunda polipeptid bir hidrofobik alt birim tarafından plazma membranına bağlanır. Bu form AChE için memeli merkezi sinir sisteminde boldur.

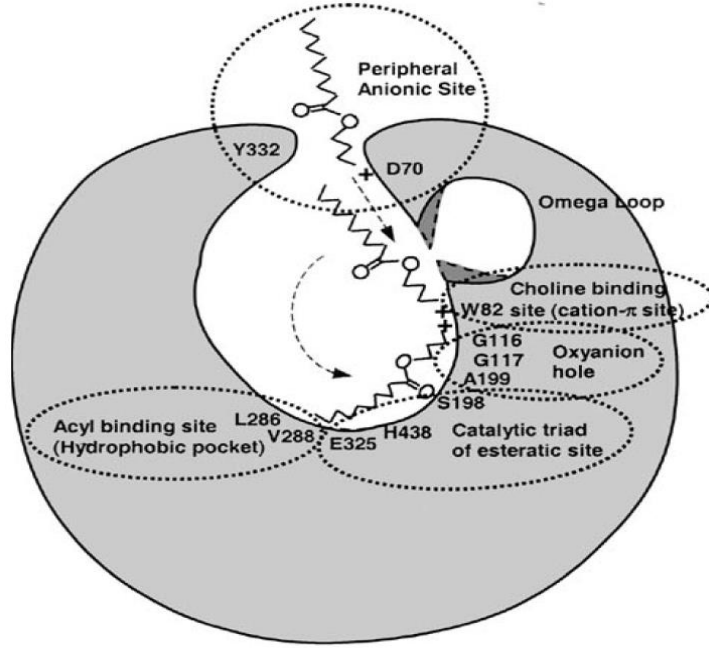
4-Kollajen benzeri kuyruklu form yada asimetrik formlar: Bu form bazal laminaya bağlandığı için kollajen benzeri kuyruğun varlığı ile karakterizedir. Bu her biri kolinesterazların tetramerleriyle ilişkili bir (A4), iki (A8) ve üç (A12) üç kollajenik alt birimlerin Q, üçlü helikal yapısı tarafından biçimlenmiştir. AChE ve BChE için sinir-kas kavşak noktasında en çoktur.

5-Çözünür tetramerik form(G4): Monomerlerin C-terminalinde hidrofobik amino asitlerin hidrofobik etkileşimleri ile stabilize edilmiştir ve 4 benzer monomerin birleşimidir. Bu form BChE için memeli vücut sıvılarında ve doku homojenatlarının çözünür fraksiyonunda boldur.

Esteratik aktif merkezin hareket mekanizması ve yapısı; Pekçok tür için, monomer yaklaşık olarak 574 amino asitten oluşur ve asparaginle bağlı birkaç karbonhidrat zincir taşır. Monomerin spesifik 3 boyutlu küresel yapıyı kazanmasına yardım eden 3 iç zincir disülfid köprüsüne sahiptir. Pekçok memeli türünde monomerler, 571.pozisyondaki sisteinle disülfid köprüsü üzerinden dimerler yapar. Zincir içindeki bu disülfid köprüsünün fonksiyonu dimerik yapıyı stabilize etmektir. Bazı türler örneğin at, içindeki bu disülfid köprüsüne sahip değildir. Monomerler yada disülfid bağlı dimerler karboksi terminallerindeki aromatik amino asitler üzerinden hidrofobik bağlarla tetramerde yapabilir (Altamirano and Lockridge 1999).

Herbir monomer 20°A derinliğe ve yaklaşık olarak 55 rezidü sıralanan dar aktif bölge çukuruna sahiptir. İnsan BChE'ında periferik anyonik bölge (PAS) çukurun ağzına yerleşmiştir. Aspartat70 (Asp70) ve Tirozin332 (Tyr332) rezidüleri PAS'ın pozitif olarak yüklü substratlarını ilk bağlanmasına karışır, örneğin; kolin esterlerini içeren kuaterner amonyum ve aktivasyonda kontrol. BChE, aktif bölge çukuru BChE 'ın fonksiyonel mimarisini kontrol eden Asp70 ve Tyr332 arasında bir hidrojen bağına

sahiptir. Pozitif yüklü substrat Tyr332'nin aromatik halkasıyla bir katyon- π kompleksi oluşturarak enzime bağlandığında, aynı zamanda substrat negatif yüklü Asp70 ile etkileşir ve bu proses monomerde konformasyonel değişikliği harekete geçirir. Daha sonra, Ω iliğin iki esnek kollarının biri diğerine yaklaşır ve substrat, aktif bölgenin katyon- π bölgesini yada kolin bağlanma bölgesini Trp82 rezidüsüne kaydırır. Bu bölge eskiden anyonik bölge olarak isimlendirilirdi, fakat şimdi kuaterner amonyum gruplarının bağlanmasından sorumlu negatif yüklü herhangi bir rezidü olmadığı bilinir. Trp82, substratın bu gruplarıyla katyon- π kompleksini de oluşturur (Masson *et al.* 1997; Masson *et al.* 1999; Masson *et al.* 2001).



(Butirilkolinesteraz monomerinin kolinesteraz aktif bölgesinin şematik gösterimi; (A=Alanin, D=Aspartikasit, B=Glutamikasit, O=Glisin, H=Histidin, L=Lösin, S=Serin, V=Valin, W=Triptofan, Y=Tirozin))

Oksiyon çukur, Gly116, Gly117 ve Ala199 içeren kolin bağlanma bölgesinin yakınında bulunur ve substratın Ser198 tarafından hidrolizlendiği yerde dikeyden yatay pozisyona substratın dönmesine yardım eder. Oksiyon çukurun amino asitleri ester

bağının fosforil oksijeni yada karboniliyle peptidik NH fonksiyonlarına sahiptir (Ekholm and Konschin 1999; Masson *et al.* 2003).

Substratın açıl kısmı substrat yatay olarak döndüğünde açıl bağlanma çukuruna bağlanır. AChE ve BChE'in açıl bağlanma çukurları farklı amino asit rezidüleri içerir. AChE'nin açıl bağlanma çukurunda Phe295 ve Phe297'nin fenil halkaları substratın bağlanma serbestliğinin derecesini kısıtlar ve asetilkolin gibi en kısa açıl grubu içeren substratların katalizini artırır. Diğer bir deyişle, Leu286 ve Val288 BChE'in açıl bağlanma çukurunda bulunur ve alifatik rezidüleriyle fenilalaninler yer değiştirir, butirilkolin gibi daha büyük açıl grubu içeren substratların katalizine izin verir (Radi *et al.* 1991).

Oksianyon çukur ve açıl bağlanma çukuru arasında stabilize edilmiş substrat aktif merkezin esteratik bölgesinin Ser198, His438 ve Glu325'in birleşimi katalitik triadın hidrolizi için hazırdır. Katalizin mekanizması yeniden yüklenme sisteminin bir örneğidir. His438'in imidazol halkası Glu325'den Ser198'e elektronlarını yükler ve Ser198'in hidroksil oksijeni bir nükleofil olur. Substratın ester bağına bu hidroksil oksijeninin nükleofilik atağı açıl-enzim arasına kılavuzluk eder ve kolin yarı serbestleşir. Daha sonra açıl grubu His438'den bir proton alarak aktive edilen bir su molekülünün nükleofilik atağı ile Ser198'den hidroliz edilir. BChE yada AChE karbamat yada organofosfatlar tarafından serinin karbamillenmesi yada fosforillenmesiyle son hidroliz adımı çok yavaş bir şekilde gerçekleşir ve genel olarak geri dönüşümsüz olarak inhibe edilir (Masson *et al.* 1997; Masson *et al.* 2003).

AChE'nin aktif bölge çukurunda uzanan 14 aromatik amino asit rezidüsünün 6'sı BChE'da alifatik amino asit rezidüleri tarafından yer değiştirir. Bu durum BChE aktif bölge çukurunun hacmi AChE aktif bölge çukurununkinden daha büyüktür (yaklaşık 200°A). Aromatik amino asitlerin alifatik amino asitlerle yer değiştirmesi iki enzimin farklı inhibitörlere karşı seçici hassasiyetinden sorumludur (Saxena *et al.* 1997). Aktif bölge çukurunda 3 ayrı domain AChE ve BChE inhibitörleri için seçicilik verir. İlk domain açıl bağlı çukurdur. Mutant BChE ile çalışmalar, seçici iso-OMPA inhibisyonu

ve daha büyük substratlara bağlanmasından Leu ve Val rezidülerinin sorumlu olduğunu gösterdi. AChE'de bulunduğu gibi fenilalaninlerle bu rezidülerin yer değiştirmesi en küçük substratları tercih etmesine sebep olur ve iso-OMPA AChE'nin bir inhibitörü değildir. İkinci domain aktif bölge çukurunun kenarının yakınında bulunur. AChE'nin bu domaininde, Tyr72, Ty124 ve Trp286 BW284C51'in bağlanması için kritik role sahiptir. Üçüncü domain kolin bağlanma bölgesi (katyon- π bölgesi) olarak tanımlanır. Bu bölgede Tyr337 ve Trp82 BChE'de ethopropazine hassasiyetinden sorumludur (Radi *et al.* 1991).

Serumda normal BChE aktivitesine sahip enzim genel BChE olarak isimlendirilir. Asp70 aktif bölge çukuruna pozitif yüklü substratların ilk bağlanmasında önemli bir rol oynadığı için, tipik olmayan BChE (Asp70Gly mutanlığı ya da dibukain direnç mutanlığı) en iyi bilinen varyanttır ve aktivitesi azalmıştır. K varyantı (Ala539Thr mutanlığı), J varyantı (Glu497Val mutanlığı) ve florid direnç varyantları (Thr247Met ya da Gly390Val mutanlığı) BChE aktivitesinin azaldığını gösterir. Ayrıca, yaklaşık olarak 20 farklı sessiz genotip normal aktivitesinin %0-2'si ile tanımlanmıştır. Diğer bir deyişle, C5+ varyantı (tanımlanmamış bir proteinle BChE'nin kombinasyonu), Cynthiana varyantı(normal seviyesinden daha fazla BChE'nin artmış miktarı) ve Johannesburg varyantı(normal enzim seviyesiyle artmış BChE'nin artan aktivitesi) genel BChE'dan daha fazla artmış aktiviteye sahiptir (Lockridge 1990; LaDu *et al.* 1990; Primo-Parmo *et al.* 1996). Gerçek substratları hala bilinmemesine rağmen, BChE hidrofobik ve hidrofilik karboksil ya da fosforik asit esterlerini içeren bileşikler hidrolizler. Toksikolojik ve farmakolojik olarak önemi asetilkolin bağlanma bölgelerini hedef alan zehirli bileşiklere birey maruz kaldığında açığa çıkmıştır. AChE'nin fonksiyonlarının kaybı kas felcine, inme ve boğulma ile ölüme sebep olabilir. BChE, antikolinesteraz bileşiklerini bir endojen çöp olarak düşünmüştür.

1-BChE insan plazma proteininin %0,1'ini yapar, fakat AChE aktivitesi insan için eritrosit membranında bulunur.

2-BChE hızlı ve dönüşümsüz bir şekilde molar stokiometrik 1:1 oranında organikfosforlara bağlanır.

3-BChE büyük oranda insan serumundan kolayca saflaştırılmıştır. Bu yüzden, insan kanından iyi tolere edilmiştir. Fetal sığır serumundan saflaştırılmış AChE immunoreaktiftir.

4-İnsan BChE aktif bölge çukuru içinde organikfosforların çok çeşidinin yerleştiği büyük boşluğa sahiptir.

5-İn-vivo yarılanma ömrü uzundur.(8-12 gün).

6-BChE uzun süreli muhafazada termal olarak stabildir (Broomfield *et al.* 1991; Raveh *et al.* 1993; Grunwald *et al.* 1997; Raveh *et al.* 1997; Ostergard *et al.* 1998).

Alzheimer hastalığı daha yüksek hafıza fonksiyonları ve kendini kaybetme gibi beynin özellikle hafıza ile ilişkili alanlarında kolinerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize olmuş kronik ve ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Diğer nörotransmitter sistemler etkilenmesine rağmen en çok derin kayıp kolinerjik transmisyonudur. β -amiloid plaklar ve nörofibril düğümler AD'nin patolojik ayırt edici özelliklerini oluşturur. AD'nin biyokimyasal açığı asetilkolinin seviyesi azalmıştır ve kolinasetiltransferaz aktivitesinde mevcut azalmadan dolayı AChE'nin aktivitesi azalır ve bunun aksine BChE aktivitesi artar. Beyinde bulunan normal nöron formlarından daha farklı kinetik ve moleküler özelliklere sahip hem AChE hem de BChE amiloid plaklar ve fibriller içinde birikir (Geula and Mesulam 1995).

Alzheimer tipi demans, orta yaşlı ve yaşlı bireylerde görülen mental patolojilerin en yaygın tipidir. Alzheimer hastalıklı bireylerin beyinlerinde saptanan en önemli değişiklikler; nöron ölümü ile sinaps kaybı, amiloid plak oluşumu ve azalmış nörotransmitter içeriğidir. Hastalığın anahtar noktaları olarak düşünülen senil plaklar ve nörofibriler yumaklar dışında Alzheimer hastalarında beyinde çok sayıda nörotransmitter sistemin etkilendiğine ait net veriler mevcuttur. En dramatik anormallikler kolinerjik sistemde olduğu için bu durum Alzheimer hastalığının kolinerjik hipotezi olarak adlandırılmıştır. Bu yüzden alzheimer hastalığı temel olarak kolinesteraz metabolizmasındaki değişim ve dejenerasyon ile ilişkilidir (Shen 2004). 60 yaşın üzerinde ilerleyici zihinsel işlev bozukluğunun en sık nedeni olan Alzheimer hastalığı, kolinerjik eksiklik ile zihinsel işlev bozukluğunun başlangıcı, seyri ve

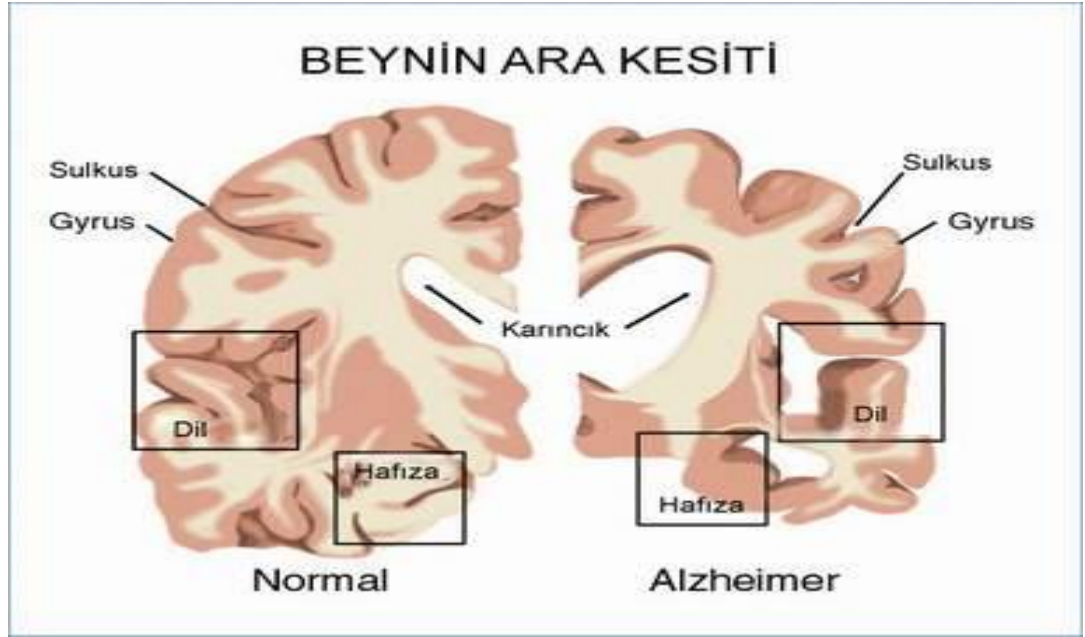
derinliği arasında net ilişkinin kurulabildiği nörodejeneratif bir hastalıktır. On yıllardır bilim adamları, beyindeki nörotransmitter düzeylerinin hastalık ile ilişkili olduğunu bilmektedirler. Sinir uyarısının nöron boyunca ilerlemesi sonucunda, sinir son ucu aksonda asetilkolin salınır. Asetilkolin, istirahat halindeki hücrede sinir iletisini yeniden oluşturmak için sinaptik boşluğu geçerek takip eden nörona bağlanır. Asetilkolini sinaptik aralıktan uzaklaştırmak için AChE enzimi nörotransmitteri hidroliz eder. Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekteşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri günümüzde imkansız olan asetilkolinin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeylerini artırmak için uygulanacak bir diğer yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (şahin 2002; Thacker 2003).

Hem AChE hemde BChE, kolinesteraz aktivitelerinden daha ziyade psikolojik fonksiyonu bilinmeyen o- nitroasetanilidi, o-nitroanilin ve asetata dönüştürerek sentetik substratı hidrolizlemeyi mümkün kılan gerçekte bir açıl arilamidaz aktivitesi (AAA) gösterir. BChE'nin AAA aktivitesi klasik kolinesteraz inhibitörlerinin yanı sıra serotonin tarafından seçici inhibisyona karşı hassastır, fakat triamin tarafından aktivasyon birkaç kattır. AAA ve BChE aktif bölgeleri enzim molekülünde yakın ilişkiye sahiptir. Klasik nörotransmitterlerin bazısının birbiriyle bağlantılı olduğu bilinir ve AAA ve BChE seratonik ve kolinerjik nörotransmitter sistemler arasında bir cross talk ile iyi temsil edilebilir (Weitnauer *et al.* 1998). Takrin, fizostigmin gibi alzheimer hastalığının bazı septomlarına karşı etkili olan güçlü kolinesteraz inhibitörleri, kolinesteraz aktivitesinden çok daha fazla AAA aktivitesini inhibe eder. Bu yüzden,

enzimlerin AAA aktivitesinde onların hareketindeki bazı yollarla ilgili bu ilaçların terapötik tesirsizliği olduğu akla gelir (Costagli and Galli 1998).

Hem AChE hem de BChE peptidaz ya da amidaz aktivitesine sahiptir (Chattonet and Masson 1986). Bu aktivite AD patogenezinde çok daha önemlidir. AChE'nin peptidaz aktivitesi nonamiloidogenik bölgede amiloid prekursor proteini ayırdığını göstermiştir (Small *et al.* 1991). Fakat BChE β -amiloid proteinlerini üretebilir ve β -amiloid plaklara yaymaya da yardım eder (Barber *et al.* 1996; Guillozet *et al.* 1997).

Beyindeki kolinerjik sistemin bozulması ile bellek arasındaki ilişkiye dayanılarak, asetilkolinesteraz inhibitörleri (antikolinesterazlar) tedavide en etkili ilaç grubu olarak kullanılmaktadır. Antikolinesteraz ilaçlar, merkezi sinir sisteminin önemli bir nöromedyatörü olan asetilkolini hidroliz eden ve dolayısıyla miktarının azalmasına sebep olan asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek, hastanın davranış bozukluklarında anlamlı bir gerileme sağlamaktadır. Asetilkolin iki sinir hücresi arasındaki iletişimi sağlayan bir nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz (AChE) tarafından asetilkolin hidroliz edildiğinde, sinirler arasındaki geçiş sona ermektedir. Hafıza kaybı ile ilgili hastalıklarda asetilkolinin çok kısa sürede parçalandığı tespit edilmiştir. Asetilkolini parçalayan enzimin inhibe edilmesiyle sinirler arasındaki geçişin kuvvetlendiği tespit edilmiştir. Asetilkolin iskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile derin ilişkisi bulunur ve bu yüzden beyinde asetilkolin içeren nöronlar mevcuttur (Akman 2007).



Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olur (Ercan 2002). Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile derin bir bağlantısı olduğu için asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden bazı ilaçlar bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır.

Bir nöromusküler hastalık olan myasthenia gravis de ise vücut asetilkolin reseptörlerine karşı antikor üreterek düzgün bir asetilkolin sinyal transferini önler. Bu bozukluğun tedavisinde de yine asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır.

Organizmaya verilen organik fosforlu, karbamatlı, klorlu veya diğer bazı kimyasal maddeler asetilkolinin reseptörlerle birleşmesini önler (Alon *et al.* 2008). Bunlar sinir ve kasların birleşme yerindeki taşıyıcıları çeşitli şekillerle etkiler. AChE'yi engelleyerek ACh'nin sinirlerle kasların birleşme bölgesinde uzun süre kalarak kasların sinirlere cevabını geciktirir. Bu bileşiklerin yaygın kullanımı böceklerde çeşitli dirençli

bireylerin gelişmesini sağlarken, organizmada dengesiz kas ve sinir fonksiyonlarına neden olur. Organikfosforlular ve karbamatlılar asetilkolinin benzeri olarak çalışır ve asetilkolinin aktif bölgesine bağlanırlar (Anazawa *et al.* 2003).

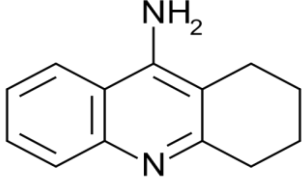
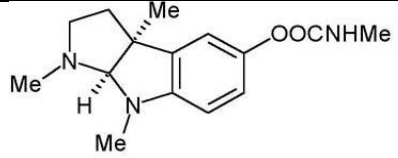
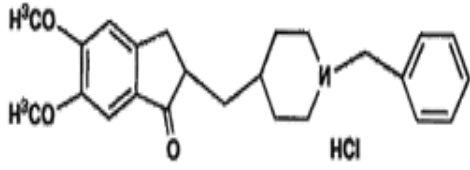
Asetilkolin hidroliz olmasına rağmen insektisitler, enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Bu insektisitler asetilkolinesteraz engellemesiyle sinir impulslarının transmisionunu bloke eder ve asetilkolin reseptörlerinin uyuşmasına neden olurlar. Sinapsislerdeki artan asetilkolin konsantrasyonu ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi böceklerde ölüme yol açmaktadır (Çakır ve Yamanel 2005). Organik fosforlular, karbamatlılar, piretroidler gibi insektisitlerin çoğu hidrolize hassas olan ester bağları içermektedir. Hidrolaz grubu içerisinde insektisit detoksifikasyonunda en önemli enzim olan esterazlar, asit ve alkol gruplarına su molekülünün eklenmesi sonucu oluşan hidrolazlardır.

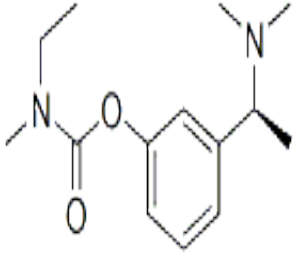
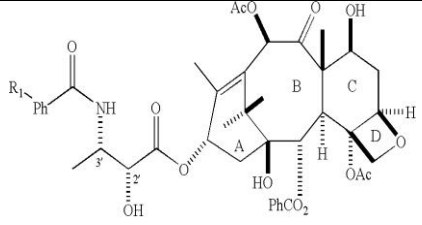
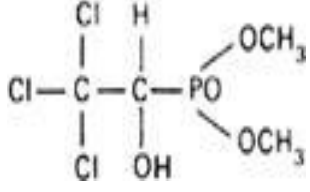
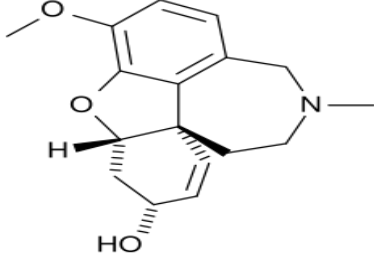
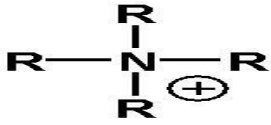

Kolinesteraz inhibisyonu, asetilkolin yetmezliği ile giden Alzheimer hastalığı, myastenia gravis gibi hastalıklarda sinaptik aralıktaki asetilkolini arttırmak üzere tedavi amaçlı kullanıldığı gibi öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere kimyasal gaz üretiminde de kullanılmaktadır (Mesulam *et al.* 2002). Alzheimer hastalığı tedavisi için ilk olarak takrin ve daha sonra donezepil, rivastigmin ve galantamine kullanıma girmiştir. Takrin ve rivastigmin, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesterazın her ikisini de inhibe ederken, donezepil ve galantamin spesifik olarak asetilkolinesterazı inhibe etmektedir (Porcelli *et al.* 1999; Alaşehirli 2005). Tetraalkilamonyum iyonları, kuarterner amonyum alkoller, sarin ve soman gibi sinir gazlarını da içine alan organofosfatlar, malation ve diazinon gibi böcek öldürücüler, huperzin A gibi maddelerde asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer almaktadır.

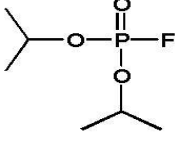
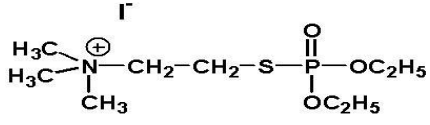
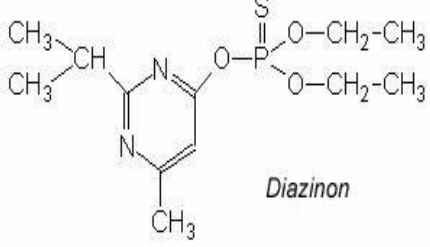
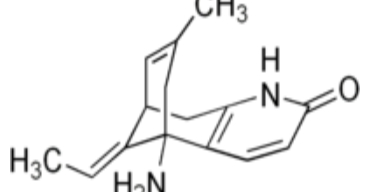
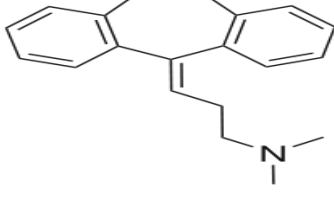
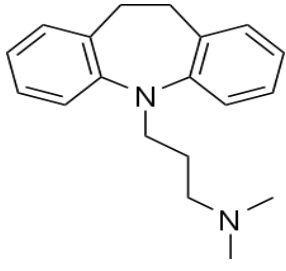
Yapılan bir çalışmada asetilkolinesteraz inhibitörü olarak 6-metoksi -takrin ve N-eptyl-Takrin gibi takrin türevleri de sentezlenmiştir (Porcelli *et al.* 1999). Yine yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere fizostigmin türevi olan phenserine'nin inhibisyon çalışması yapılmıştır (Al-Jafari *et al.* 1998). Başka bir çalışmada da insan eritrosit asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine prokain, tetrakain,

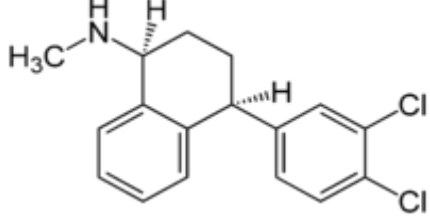
lidokain gibi lokal anestetik ilaçlar ile antidepresan ve anti-parkinson bir ilaç olan imipraminin etkileri incelenmiştir.

Bilinen Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri;

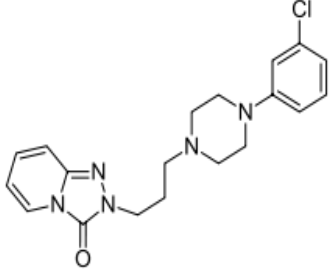
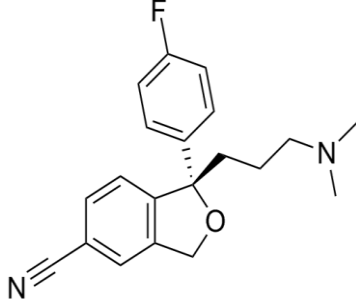
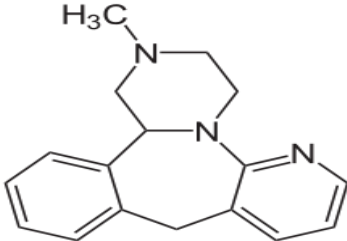
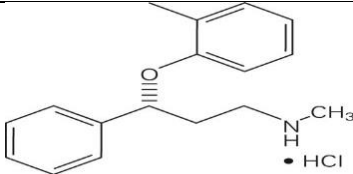
İNHİBİTÖR ADI	MOLEKÜL FORMÜLÜ	ÖZELLİKLERİ	
Takrin		1960'larda süksinilkolinin oluşturduğu çizgili kas felcini uzatmak için kullanılmış olan bir ilaçtır (Ercan 2002) Alzheimer hastalığının tedavisinde önemi oldukça büyüktür (Eroğlu 2003).	Asetilkolinesteraz ve butirilkinesterazın tersinir, yarışmalı inhibitörüdür.
Fizostigmin		Fizostigmin ilk kolinesteraz inhibitörüdür, glokomda kullanılan ilk etkili ilaç (1877'de) ve mynestia gravis'teki ilk etkili tedavidir (Liebelt 2007).	SSS ve periferik sinir sistemindeki kolinerjik sinapslarda asetilkolinesteraz enzimini tersinir olarak bloke ederek kolinerjik transmisyonu artırır (Ercan 2002).
Donazepil		Alzheimer hastalığında bilişsel bozuklukların düzeltilmesi amacıyla yönelik olarak geliştirilen Piperidin grubundan ikinci kuşak inhibitörlerden biridir.	Reversibl AChE inhibitörüdür ve serebral AChE üzerinde nispeten spesifik bir inhibisyona yol açar (İseri and Efendi 2003) .

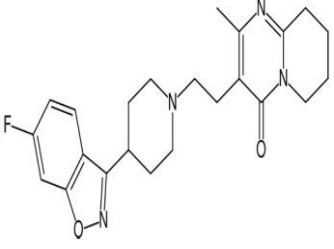
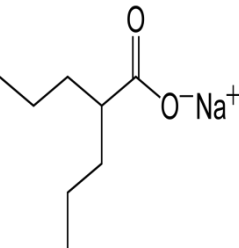
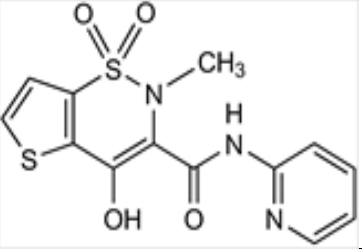
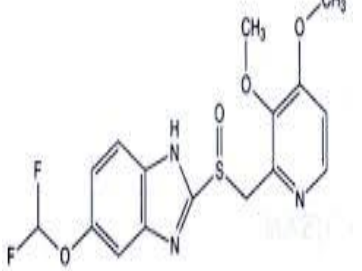
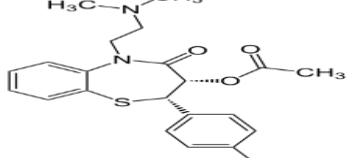
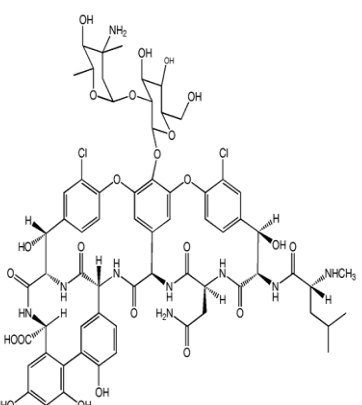
Rivastigmin		Kolinesteraz enziminin esteratik bölgesine bağlanan ancak çok yavaş ayrılan bu nedenle de psödo-reversibl inhibisyon yapan bir ilaç olarak tanımlanmıştır (İseri and Efendi 2003) .	Korteks ve hipokampusdaki kolinesterazı seçici olarak inhibe eder.
Eptastigmin		Fizostigminin indol halkasındaki karbamoyl-metil grubunun karbomoyl heptil grubu ile değiştirilmesiyle elde edilmiştir.	İn vivo olarak beyinde, in vitro olarak ise kırmızı kan hücrelerinde kolinesteraz inhibisyonu yapar(Saraçoğlu 1998).
Metrifonat		Organizmada non-enzimatik bir yol ile etken metaboliti olan diklorvosa dönüşerek etkinlik kazanan bir pro-drug'dır.	Diklorvos enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. İntrinsik antikolinesteraz etkisinin olmayışı diğer inhibitörlerden farklıdır(Saraçoğlu 1998).
Galantamine		Reseptörün allosterik bölgesine bağlanarak asetilkolinin nikotinik reseptörler üzerindeki intrinsik etkisini artırır(Yalgın 2001).	Tersiyer bir alkaloid olan seçici, yarışılmalı ve geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür,
Tetraalkil amonyum iyonları		Anyonik kısma bağlanır ve asetilkolinin hidrolizini önler.	Tersinir bir inhibisyon meydana getirir.
Kuarterner amonyum alkolleri	 <p>Edrophonium (Tensilon)</p>		Asetilkolinesteraz'ın non-kovalent tersinir bir inhibitörüdür.

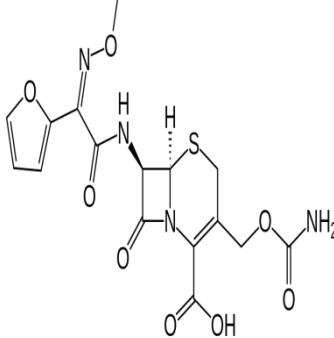
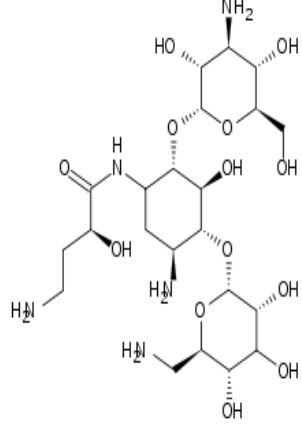
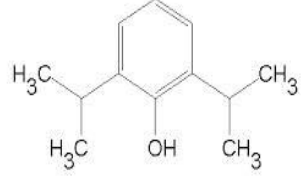
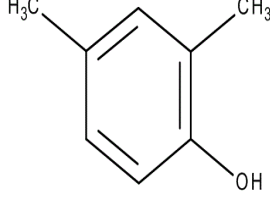
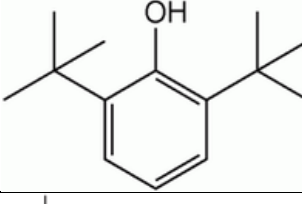
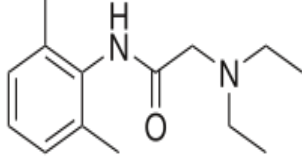
Organofosfatlar	 <p>Isofluorophate; DFP (Floropryl)</p>  <p>Echothiophate (Phospholine Iodide)</p>	50 farklı madde vardır. Fosforik asitin ester yada amidleridir.	Asetilkolinesteraza kovalent olarak bağlanır. Tersinir olmayan uzun bir etkiye sahiptir.
Böcek öldürücüler	 <p><i>Diazinon</i></p>	Memelilerde çok hızlı bir etki gösterirler.	Tersinir olmayan bir yolla asetilkolinesterazı inhibe ederler
Huperzin A			Doğal olarak bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür.
Amitriplin		Trisiklik antidepresan bir ilaçtır. Depresyon belirtilerinin giderilmesinde, özellikle endojen depresyonun tedavisinde endikedir.	Antidepresan etkisinin beyinde, noradrenalin ve serotonin geri emiliminin inhibe edilmesine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.
İmipramin		Trisiklik antidepresan olup alfa-adrenolitik, antihistaminik, antikolinergik ve 5-HT-reseptör blokajı gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir.	Oral yoldan alınan imipramin karaciğerden ilk geçişi sırasında kısmen, yine antidepresif aktiviteye sahip bir metabolit olan desmetilimipramine dönüşür.
Sertralin		Sertralin, klinik dozlarda trombositlerde serotonin alımını bloke eder, sedasyon yapmaz	Nöronal serotoninin (5-HT) in vitro güçlü ve spesifik bir gerialım inhibitörüdür.

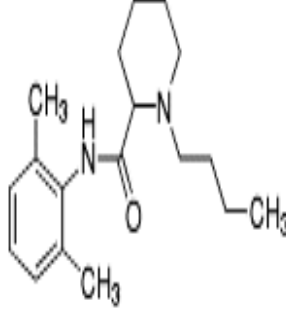
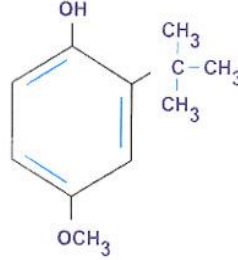
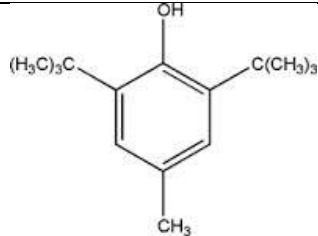
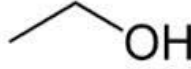
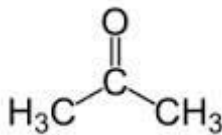
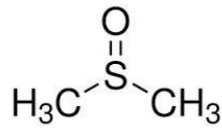
		ve psikomotor performansı etkilemez.	
--	---	--------------------------------------	--

AChE enzimi üzerine çalışılan moleküller

SINIFI	MOLEKÜL ADI	MOLEKÜL FORMÜLÜ	ÖZELLİĞİ
ANTİDEPRESAN	Trazodon		Anksiyolitik etkiye sahip kuvvetli bir antidepresandır. Beyin sinaptozomlarında ve trombositlerde serotonin (5-HT) uptake'ni engeller.
	Essitalopram okzalat		Beyindeki sinaptik boşluktaki serotonin (5-hidroksitriptamin veya 5-HT olarak bilinen) isimli nörotransmitterin geri emilimini engelleyerek miktarını arttırmayı hedefler.
	Mirtazapin		Major depresif bozukluk tedavisinde kullanılır. Beyinde dengesiz hale gelerek depresyona ve anksiyete sebep olabilecek kimyasalları etkiler.
	Fluoksetin		Selektif serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) grubu bir antidepresandır. Fluoksetin beyinde dengesiz hale gelerek depresyona veya anksiyeteye (endişe, kaygı) sebep olabilecek kimyasalları etkiler.

	Risperidon		Dopamin (D2) ve serotonin(5-HT2) reseptör antagonistlerine etki eder. Başka diğer reseptörler üzerindeki antagonist etkisi risperidonun diğer etkilerini açıklayabilir. Aynı zamanda alfa-1, alfa-2 ve histamin-1 reseptörlerine de antagonistik etki gösterir.
	Sodyum Valproat		Etkisini merkezi sinir sistemi üzerinde gösteren anti epileptik bir maddedir.
ANTİBİYOTİK	Tenoksikam		Oksikam grubundan bir tienotiazin türevi olan tenoksikam NSAİİ olan bir ajandır. Antiinflamatuvar, analjezik, antiromatizmal ve antipiretik etkisi yanında trombosit agregasyonunda önlemektedir.
	Pantoprozol Sodyum		Bir süstitüye benzimidazol olup, selektif proton pompası inhibitörüdür, peptik ülser tedavisinde kullanılır Paryetal hücrelerin apikal membranında hücre içine sokulmuş durumdaki sekretuar kanalikülleri kaplayan tübüloveziküllerde yerleşmiş olan K^+ , H^+ -ATPaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe eder.
	Diltiazem		Kalsiyum kanal blokörleri olarak bilinen bir nonhidropiridin grubu maddelerden biridir. Kalp ve kan damarlarındaki kasları gevşeterek çalışır.
	Vankomisin HCl		Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki gösterir. Ayrıca bakteri hücre membranı geçirgenliğini değiştirmekte ve RNA sentezini önlemektedir.

	Sefuroksim		İkinci kuşak sefalosporinlerdendir. Bu madde esas olarak solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. Önemli hedef proteinlere bağlanarak bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eder ve bu yolla bakterisid etki gösterir.
	Amikasin		Aminoglikozid grubu yarı sentetik bir antibiyotiktir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan asilleme suretiyle elde edilir. Amikasin bakteriyel 30S ribozomal alt birine bağlanarak etki eder. Bakteriyel mRNA da yanlış okunmaya neden olur ve bu sayede bakteriler çoğalması için gerekli proteinlerini sentezleyemezler.
ANESTEZİK	2,6 diizopropilfenol (Propofol)		İntravenöz hipnotik ajandır. Genel anestezi, induksiyon ve idamesi, mekanik ventilasyon amacıyla kullanılır.
	2,6 dimetilfenol		Propofol türevidir.
	2,6 ditertbutilfenol		Propofol türevidir.
	Lidokain		Antiaritmetik ve lokal anestezik olarak kullanılır. Genellikle kaşıntıyı gidermek, yanma veya deri enfeksiyonlarını hafifletmek ve küçük cerrahi işlemler ve dişte anestezik olarak kullanılır.

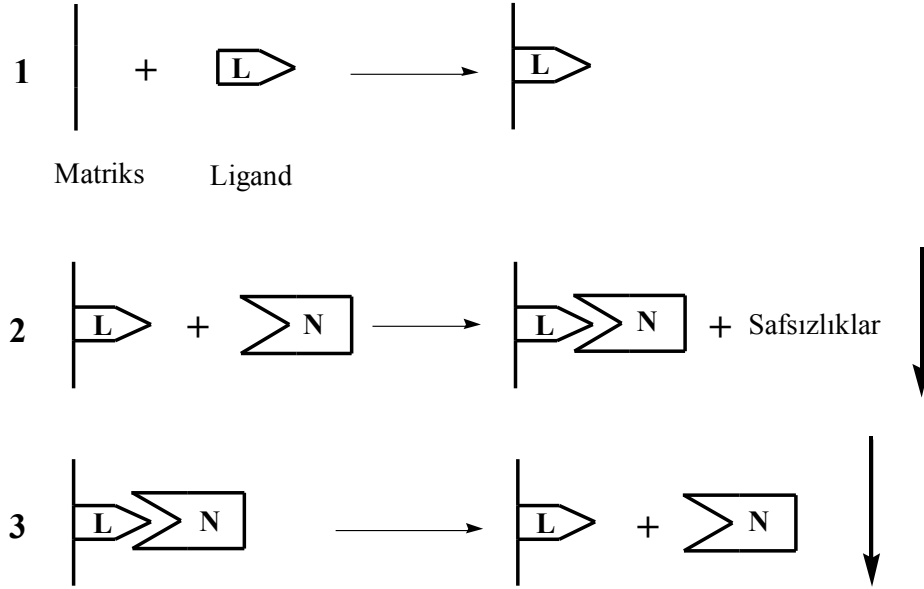
	Bupivakain (Markain)		Bupivakain lidokain ve mepivakainden 4 kez, prokainden 8 kez potent, amid yapıda lokal anestezi ajandır. Piperidin halkası üzerinde metil gurubu yerine butil gurubu içermesi ile mepivakainden ayrılır.
SENTETİK ANTIÖKSİDAN	BHA (Butillenmiş hidroksi anisol)		Yağlarda çözünebilir suda çözünmeyen antioksidandır, fırınlanmış ve kızarmış ürünlerde yağları koruma etkisinden faydalanılır.
	BHT (Butillenmiş hidroksitoluen)		BHA'ya benzer özellikli antioksidandır. Özellikle kısa zincirli hindistan cevizi, palm yağı gibi yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede, fındık, ceviz gibi yağlı tohumlarda oksidasyon kontrolünde, tahıl ve şekerli ürünlerde kullanılır.
ORGANİK ÇÖZÜCÜLER	ETANOL		Organik bileşiklerden alkoller sınıfının bir üyesidir. Renksiz ve yanıcı bir bileşiktir. Alkollü içeceklerde kullanılan tek alkol türüdür. Bir kısım vitamin şuruplarında çözücü olarakta kullanılmaktadır.
	ASETON		Dimetilketon olarak bilinir, alifatik ketonların en basit üyesidir. Deri hastalıklarının tedavisinde çözücü olarak kullanılır, uzun süre deri ile etkileşimi sonucu deride iltihaplanmaya neden olur, ağızdan alınması merkezi sinir sisteminde, böbrek ve karaciğerde hasara sebep olur.
	DMSO		Dimetil sülfoksit, organo kükürt bileşimidir. Kağıt yapım işleminin yan ürünü olarak üretilen renksiz polar bir çözücüdür. Suda çözünmeyen birçok terapötik ve zehirli maddeyi çözer. Cilde kolayca nüfuz eder ve ağızda sarımsak tadı bırakır.

Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, saflaştırılması istenen molekülün,"matriks"adı verilen bir destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir, hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonları veya özel kimyasal yapıları esasına dayanarak saflaşmasını mümkün kılan bir çeşit adsorbsiyon kromatografisidir. Saflaştırma çoğu zaman bir kaç bin kat olur ve aktif materyalin geri kazanılması genelde çok yüksektir. Diğer tekniklerle çok basamaklı işlemler gerektiren, çok zaman alan hatta ayrılması mümkün olmayan birçok biyolojik materyaller, bu teknikle bir tek basamakta gerçekleştirilir. Afinite kromatografisinin konsantre edici etkisi de vardır; bundan dolayı büyük hacimlerle de çalışmak mümkündür. Ayrımların yüksek seçicilikleri, birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden kaynaklanır. Bu sebepten dolayı afinite kromatografisi şu amaçla kullanılabilir:

- a) Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için,
- b) Bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabii şekillerini ayırmak için.
- c) Kirletici büyük miktarlardan küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak için.

Afinite kromatografisinin genel prensibi Şekil 1.1 'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi 1'de ligand matrikse kovalent bağlanır, 2'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup safsızlıklar akar ve 3'de numune elüe edilir.

Afinite kromatografisinde matriks olarak; Sephadex, Sepharose ve Bio-gel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Bu jel, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonu işleminde başarılı bir matriks için gerekli olan bütün özelliklere sahiptir. Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca derivatize edilebilir. Bunlardan Sepharose-4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır. Jel filtrasyon kromatografisindeki dışarılama limiti, (molekül ağırlığı olarak) 20×10^6 olan Sepharose-4B'nin açık porlu yapısı, iç tarafını ligand bağlanmasına müsait hale getirir ve büyük moleküller için bile, iyi bir bağlanma kapasitesi temin eder. Söz konusu jel, oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon gösterir; bunun böyle olması, afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı zaruridir. Sepharose jeli küresel ve rijit bir yapıya sahiptir, üzerinde yapılan işlemlerden sonra jelin bu yapısı değişmez

Sepharose üzerinde hazırlanan adsorbanlar: Yüksek ve düşük pH, Deterjanlar, Disosiye edici maddeler gibi çok değişik şartlara dayanıklıdır. Fakat organik çözücülerin, yüksek

sıcaklıkların, guanidin hidroklorür, gibi parçalayıcı elüentlerin gerektiği durumlarda, kovalent şekilde çapraz bağlanmış Sepharose olan Sepharose-CL en ideal ortamdır. Mesela; Protein A-Sepharose-CL-4B ve Blue Sepharose-CL-6B adsorbanları Sepharose-CL üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-CL'in destek maddesi olduğu adsorbanlar az miktarda substitüe olmuşlardır ve Sepharose-4B'ye bağlı adsorbanlardan daha az kapasiteleri vardır; çünkü çapraz bağlama, ligandın bağlanabileceği bölge sayısını azaltır.

Afinite kromatografisi için ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenir. Birincisi, ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama afinitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözeltilde 10^{-4} - 10^{-8} M arasında olması idealdir. 10^{-4} M'dan daha büyük ayrışma sabitlerini içine alan etkileşmeler (mesela bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilişki gibi), başarılı afinite kromatografisi için uygun değildir. 10^{-8} M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddelerden (mesela bir hormon ve reseptörü arasındaki ilişki gibi) meydana gelen afinite kromatografisinde ise, bağlı maddenin inaktive etmeden elüsyonu zor olacaktır. Eğer bağlanma kompleksinin dayanıklılığı hususunda herhangi bir bilgi bulunamıyorsa deneme yanılma yöntemi kullanılmalıdır. Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi de önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse saflaştırılacak molekülle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır.

Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Küçük ligandları (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kollar etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar.



Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü.

Uzantı kolunun uzunluğu da önemlidir. Şayet çok kısa ise, kol etkisiz olur ve ligand numunedeki maddeyi bağlayamaz. Aksine çok uzunsa, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve ayırmanın seçiciliği azalır. O'Carra ve arkadaşları, çok uzun uzantı kollarının numunedeki maddelere hidrofobik etkileşmelerle bağlandığını göstermiştir. Spesifik olmayan hidrofobik etkileşmeler, afinite kromatografisinde arzu edilmez.

Çok noktali bağlanma, proteinlerin ve diğer biyopolimerlerin matriksten hidroliz olmamasını sağlar. CNBr ile aktivasyon işlemi, Sepharosu çapraz bağlar ve böylece kimyasal dayanıklılık artar. Bu da elüsyon şartlarının seçiminde daha fazla bir esneklik sağlar (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

1.1. Çalışmanın Amacı

AChE enzimi sinir iletiminde görev alan çok önemli bir metabolik enzimdir. Plazma membranlarındaki AChE kolinerjik fonksiyonların değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanıldığından enzimin yeni inhibitörlerinin bulunması ve etkisinin belirlenmesi çok önemlidir. Sinir iletiminde görev alan AChE enzimi üzerine antidepresan, anestezi ve antibiyotik etkili moleküllerin araştırılmasının, insan sağlığına ve literatüre önemli katkılar sağlayacağı inancındayız.

Bu tez kapsamında AChE enzimi insan eritrositinden Sepharose 4B-L-tirozin takrin afinite kromatografisi tekniği ile tek kademedede saflaştırıldı ve enzim aktivitesi üzerine antidepresan (essitalopram, mirtazapin, risperidon, sodyum valproat, trazodon, fluoksetin), antibiyotik (tenoksikam, vankomisin HCl, amikasin sülfat, diltiazem HCl,

sefuroksim, pantaprazol sodyum), anestezik (2,6-diizopropilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain), sentetik antioksidanlar (BHA, BHT) ve organik çözücüler (etanol, aseton, dimetilsülfoksit) gibi maddelerin *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı, bu amaçla IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri tespit edildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kan, insan metabolizmasında taşıma, düzenleme, savunma ve koruma görevleri yapar. (Özden 1990). Kanın %42-45'ini eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücreleri oluşturur. Lökositler mikroorganizmaların vücuda yayılmalarının önlenmesi ve dokuların tamir edilmesinde görev alır. Trombositler, kapillerin endotel bütünlüğünün sağlanması ve damardan dışarıya kanın sızmasını önlemek gibi fonksiyonlara sahiptir (Onat 1996). Eritrositler, gerek kolay elde edilebilmeleri, gerekse fonksiyonel önemleri ve birçok hastalıkta rol almaları nedeniyle yoğun şekilde üzerinde çalışılmış hücrelerdir. Eritrositlerin başlıca görevi, oksijen ve karbondioksit taşınması ve kanın pH'sının sürdürülmesidir.

Bu görevi yerine getirebilmeleri için şekillerini, içyapılarını ve membran aktivitelerini koruyacak enerjiye ihtiyaç duyarlar. 1921 yılında *in vivo* hücrelerde kan akımının artışıyla kırmızı hücrelerde yoğunluk artışı ilk kez gözlenmiştir. Bu prensiple Sabine (1955) basit bir santrifügasyonla kırmızı hücreleri ayırabilmiştir. Genç ve yaşlı hücreler olarak iki sınıf göstermiştir. AChE aktivitesinin ikinci grupta daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı metodla Kadlubowski ve Agutter (1977) kırmızı hücreleri 8 gruba ayırmış ve AChE aktivitesinin hücrenin yaşı ile azaldığı sonucuna varmıştır. Farklı yaşlı gruplarında hücrenin kararlılığının zayıflaması yaşa bağlı değişimlerin sadece niteliksel bir değerlendirme içermesi bu yaklaşımın dezavantajıdır. Şimdiki çalışmalarda immünelektroforez ile birleştirilen kısımlara ayrılmış bir freol/Triosal süreksiz fraksiyonu ile hücrelerle ilgili daha fazla değerlendirme elde etmek mümkündür. Kırmızı hücredeki enzimin protein miktarının oranı ve spesifik aktivite kadar total aktivitenin yüzdesini de hesaplamak mümkündür (Galbraith and Wattschanges 1980).

Eritrositlerde başlıca katyonu olan K^+ ile birlikte Ca^{+2} , Na^+ ve Mg^{+2} bulunur. Anyonları klorür, bikarbonat, hemoglobin ve anorganik fosfat olup, başlıca fosfat bileşiği 2,3-bisfosfogliserattır. Eritrositler iyonik dengelerini membran yapısında yer alan Na^+ , K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz gibi enerji gerektiren enzimlerle sürdürürler. Hücre yaşlandıkça

iyon pompalarının aktiviteleri azalarak hücre içi $[Ca^{+2}]$ ve $[Na^{+}]$ artar, $[K^{+}]$ azalır. Böylece hücre stabilitesi bozulur ve yıkımı uyarılır (Marks 2007).

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Hem AChE hem de BuChE'nin birkaç moleküler formu bilinmektedir. Bu formlar arasında önemli bir ayrım vardır (Massoulie *et al.* 1992). Kollajen kuyruklu asimetrik form (An) ve globuler form (Gn). Asimetrik formlar kollojen bir kuyruk üzerinden bazal laminadaki nöromusküler sinaptik aralıktaki ekstraselüler yapılarla bütünleşmiştir. Globuler formlar ise membranın lipit tabakasının içine yerleşmiştir (Ott 1985). Globuler formun memeli beyinde monomer alt birimlerinin monomer, dimer ve tetramer olmak üzere farklı biçimleri mevcuttur. Normal bir beyinde G4 daha yaygın olarak bulunur. Asetilkolin hidrolizinin çoğunu G4 formu yapmaktadır. G1 nispeten azdır ve asetilkolin hidrolizinin çok az bir kısmından sorumludur. Bu izomerik formların nöronlarda farklı şekillerde lokalize olduğu bulunmuştur. Tek bir globuler protein içeren G1 formu sitozolik ve dört globuler protein içeren G4 formu ise glikofosfolipidler yada hidrofobik amino asit sekuensi ile membrana bağlıdır (Heller and Hanahan 1972; Inestrosa and Perelman 1990; Massoulie *et al.* 1992). G4 ve G1 formu sırasıyla AChE'nin deterjanda çözünebilir ve suda çözünebilir fraksiyonlarını baskın bir şekilde içerir (Rieger and Vingy 1976).

İnsan beyni başlıca iki tip kolinesteraz içermektedir; 7. Kromozom tarafından kodlanan asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ve diğeri 3. kromozom tarafından kodlanan butirilkolinesteraz (BuChE, EC 3.1.1.8) (Mesulam *et al.* 2002; Darvesh *et al.* 2003). Sağlıklı bir beyinde normal olarak asetilkolinesteraz baskındır. Ancak, Alzheimer hastalığında beyinde asetilkolinesteraz aktivitesi ya değişmeden kalır ya da azalırken, butirilkolinesteraz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Greig *et al.* 2001). Bu yüzden, hem BChE hem de AChE'ı inhibe eden bir ilaç potansiyel terapötik faydalara ve özelliklere sahip olmalıdır. Beyinde, butirilkolinesteraz asetilkolinin yarılması için asetilkolinesterazı destekleyici enzim olarak çok önemli rol oynamaktadır (Soreq and Zakut 1993; Greig *et al.* 2005). Ayrıca, kolinesterazlar nörotogenesis, synaptogenesis ve

glia aktivasyon, beyin kan akışı, hücre yapışması, amiloid kaskatı ve tau fosforilasyon gibi enzimatik fonksiyonlarla ilgisiz klasik olmayan hareketlere sahip olduğu belirlenmiştir (Mesulam *et al.* 2002; Giacobini 2003).

AChE'nin çeşitli biyokimyasal yönlerdeki yoğun çalışmalarına rağmen, moleküler izoformları üzerindeki bilgi ve onların hafıza ve öğrenme fonksiyonları üzerindeki bağın oldukça yetersiz olduğu bulunmuştur (Das *et al.* 2005). Yapılan çalışmalarda sıçan beyin bölgelerindeki AChE aktivite modelinin yaş ve cinsiyete dayalı olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur (Das *et al.* 2000).

Kolinesterazlar için 2 ligand bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. Açılasyon ya da A bölgesi ve periferal yada P bölgesi. Açılasyon yada A bölgesi aktif bölge çukurunun temelidir ve p bölgesi onun giriş yerindedir (Rosenberry *et al.* 2005). Substrat düşük afinitesinden dolayı p bölgesine geçici olarak bağlanır ve aktif bölgede ES kompleksine dönüşür. P bölgesine geçici olarak bağlanan tüm substrat molekülleri A bölgesine doğru ilerleyerek sigorta altına alınıp katalitik prosese katkıda bulunurlar. P bölgesine takrinin bağlanması enzimin konformasyonunu değiştirir ve sterik olarak aktif bölge ya da A bölgesini engeller. Bu durumda aktif bölgeye diğer moleküllerin giriş ve çıkış oranında azalma olur. Artan K_M değeri, enzimin aktif bölgesine substratın afinitesininin azalmasının nedeninin takrin olduğunu göstermiştir. Kolinesteraz-substrat kompleksi durumunda aktif bölge zaten işgal edilmiştir, bu yüzden, böyle durumda, takrin aktif bölgeden ziyade diğer bölgeye (P bölgesine) bağlanmaktadır (Rosenberry *et al.* 2005).

Merkezi kolinerjik nöronlar, bir çeşit öğrenme davranışlarını kazanma, yerine getirme ve sağlamlaştırmada önemlidir. Davranışsal inhibisyon kesilmesine yol açan ilaçlar tarafından muskarinik reseptörün bloke edildiğine önemli klinik delil vardır. Çalışma hafızası (kısa dönem), var olan bilginin bellekte geri alımı, (uzun dönem) hafıza, dikkat, karar süreci, hareket ve strateji seçimi ve duyumsal değiştirme süreci gibi davranışsal özellikler demansın büyük karakteristik özellikleridir Kolinerjik yükselticiler özellikle antikolinesteraz ilaçlar günümüzde anti-demans ilaç terapisinin dayanağı olarak gösterilmektedir (Sarter *et al.* 2005).

Klinik çalışmaların yanı sıra büyük deneyler bilişsel fonksiyonların düzenlenmesinde asetilkolinin tartışılmaz büyük bir rolü olduğunu açıkça göstermiştir. Terapötik stratejiler, bilişsel bozukluk rahatsızlıklarıyla mücadele için asetilkolin aktivitesini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu yüzden, kolinerjik reseptör agonistler (muskarinik ve nikotinik) ve asetilkolinin endojen seviyesini yükselticiler (metabolize enzimlerinin inhibitör ve promoterlerinin sentezi) Alzheimer tip yaşlılık demansının tedavisinde denenmiştir. Çeşitli teşebbüs girişimleri arasında asetilkolinesterazın inhibisyonu en başarılılarından biridir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri salınan asetilkolinin hidrolizini önleyerek kolinerjik geçişin etkisini arttırmakta ve bu yüzden kolinerjik sinapsta mevcut asetilkolin daha fazla yapılmaktadır (Sarter *et al.* 2005).

Asetilkolin merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi için önemli bir nörotransmitterdir. İnsan beyninin multiple alanlarında mevcut olan kolinerjik sinirlerin birleşimidir Nörodejenaratif hastalıklar bağlamında ön beyindeki kolinerjik çekirdeğin tüm kortikal alanlarına yayıldığı tahmin edilmektedir. Asetilkolin (ACh) düşünce ile ilgili sensörlerin üretilmesi ve seçici dikkati düzenlemektedir. Retiküler çekirdek dikkat ve bilinci kontrol eder. Bu sistemin bozulması belli klinik motor fonksiyonların bozulması parkinson semptomları ile ilişkilendirilmektedir. Ön beyindeki kolinerjik nöronların kaybı, duyu dejenerasyonu, Alzheimer hastalarının önemli olayları ve düşünme yeteneklerini yaygın bir şekilde tutar. Alzheimer hastalarında kolinerjik düşünme yapısı ciddi bir şekilde bozulmuştur (Mesulam *et al.* 2004).

Asetilkolin, böceklerde de merkezi sinir sisteminde bulunan, buna karşılık nöromuskular bağlantılarda varlığı gösterilmemiş olan nörotransmitter bir maddedir (Burnell and Wilkins 1988). Kolinerjik sistemlerin metabolik enzimleri böceklerde fazla miktarda bulunmaktadır ve histokimyasal olarak asetilkolinesteraz (AChE) başın nörofillerini ve toraksik gangliyonlarını çevreleyen sinir hücrelerinin korteksinde yüksek oranda bulunmaktadır (Hall *et al.* 1980). Canlılarda organik fosforlu insektisit uygulamasına bağlı olarak, AChE enzimi inhibe edilmektedir. AChE hedef enzim olduğundan biyokimyasal belirteç olarak, organik fosforlu insektisit toksisitesi çalışmalarında enzim inhibisyonu çalışılmaktadır. İnsektisite maruz kalan canlılar besin

zinciri yolu ile hasarlara neden olmaktadır. Günümüzde hedef olarak seçilen zararlı böcekleri kontrol etmek amacı ile kullanılan kimyasal insektisitlerin tümü nörotoksik maddelerdir ve etkilerini sinir sistemi üzerinde göstermektedirler. Ancak bu maddelerin seçici olmamaları nedeni ile hedef organizmalar kadar ekosistemde hedef olmayan canlılar üzerine de benzer etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Amdur *et al.* 1991).

Asetilkolinesteraz aktivitesi başlıca böceklerde gözükürken, hem asetilkolinesteraz hemde butirikolinesteraz aktivitesinin omurgalılarda ortaya çıktığı, BuChE aktivitesinin ise yaprak bitlerinde olduğu ifade edilmiştir.

AChE aktivitesinin olmamasının dentritik çıkıntılarının oluşumunda, hücre büyüklüğü ve sayısı ile reseptör dansitesinde bazı anormalliklere yol açtığı belirlenmiştir. Aynı zamanda tek başına ne AChE ne de BuChE asetilkolin metabolizmasının ve kolinerjik iletimin sağlıklı işlemesi için yeterli olmamıştır. Yapılan çalışmalara göre varılan nokta hem AChE'nin hem de BuChE'nin nöral gelişim ve kolinerjik iletimde birlikte aktif rol oynadıkları şeklindedir (Xie *et al.* 2000; Mesulam *et al.* 2002). Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'sinden BuChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Greig *et al.* 2001). Sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerinde BuChE düzeylerinin yüksek, ilerleyen evrelerde ise bu düzeyin düştüğü belirlenmiştir (Darvesh *et al.* 2003). Kolinerjik nöronlarda AChE'nin, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer aldığı ve BuChE'nin ise hücre gövdesi ve dendritlerde bulunduğu belirlenmiştir (Geula and Mesulam 1999).

Kolinesterazlar çok çalışılmıştır, çünkü onlar çoğu sinir ajanı ve böcek öldürücülerin spesifik hedefi olduğundan ve sinir akışının geçişinde önemli bir rol oynadıklarından pek çok türdeki polimorfik enzimlerdir. Türler göre çeşitli kolinesterazlar için kodlanan genlerin sayısı, böceklerde bir, omurgalılarda iki ve nematodlarda üç olarak belirlenmiştir. Asetilkolin ve butirikolinin kullanımı omurgada, AChE ve BuChE için iki proteinin ayrılmasına izin vermektedir. Moleküler biyolojide sonuçlar AChE ve BuChE için türler içinde yaklaşık olarak %50 amino asit benzerliği olduğunu göstermiştir (Massoulie *et al.* 1993).

Herbir protein için, çeşitli moleküler formlar ya indirgenmeye ya da alternatif gen splicinge neden olmaktadır. Bu formlar kollajen bir kuyruk yüzünden bazal laminaya, hidrofobik peptid ya da glikolipid yüzünden membrana bağlanabilir ya da çözünebilir. Bunlar, tüm omurgalı sınıflarında ortaya çıkan formlar; asimetrik, globuler asimetrik yada kollajen kuyruklu olarak sınıflandırılmıştır, fakat omurgasızlarda yoktur. Globuler formlarla; monomer, dimer ve tetramer olarak karşılaşılır. AChE ve BuChE, bu iki enzim başlıca substrat spesifikliğı esasında fonksiyonel olarak ayırt edilmektedir (Radi *et al.* 1991) AChE bir periferel substrat bağlanma bölgesi tarafından aracı olunan aşırı substrat inhibisyonu sergilediğı belirlenmiştir (Radi *et al.* 1991).AChE, asetiltiyokolini diğer kolin esterlerinden daha hızlı hidrolizler ve butirilkolinde neredeyse inaktive olur, halbuki BuChE hem butirilkolini hem de gözlenebilir bir oranda asetilkolini hidrolizlemektedir. İki enzim, AChE için iso-OMPA gibi teşhis inhibitörlere, onların hassasiyetleri tarafından ayırt edilebilmektedir.

Merkezi sinir sisteminde önemli rol oynadığı için bu enzimin birçok inhibitörü geliştirilmiştir (Guedes *et al.* 1998). Asetilkolinesteraz enzimi, organofosfat ve karbamat böcek öldürücüler tarafından inhibisyonun hedef bölgesidir (Matsumura 1985; Toutant 1989) Ancak, bu böcek öldürücülerin 30 yıldan fazla kullanımı bu bileşiklerle böcek öldürmek için daha az hassas, değiştirilmiş AChE'lerden dolayı böcek türlerinde birçok dirençle sonuçlanmıştır. Organofosfat ve karbamat böcek öldürücüler tarafından inhibisyona, AChE'nin azalan hassasiyetinden dolayı böcek öldürücü direncinin artan etkisi AChE'nin toksikolojik önemine ek bir direnç mekanizması olarak yardım etmiş ve böceklerde bu önemli enzimin araştırılmasını ayrıca gayrete getirmiştir (Zhu and Clark 1994; Zhu and Clark 1995).

Organofosfat ve karbamat böcek öldürücülerin yoğun kullanımı çeşitli ekolojik problemlere sebep olmaktadır. Bu maddelerin başlıca toksik etkisi sinir sisteminin anahtar bir enzimi olan asetilkolinesterazın dönüşümsüz bir inhibisyonu olduğundan dolayıdır. Aktif bölgedeki serin, fosforilasyon ve karbamoilasyonu nörotransmitter asetilkolinin metabolizasyonunu bloke etmektedir. Bunun sonucunda postsinaptik membran depolarize kalır ve sinaptik geçiş gerçekleşmez. Antikolinesteraz ajanlar,

organofosfat ve karbamat böcek öldürücüler çeşitli zirai rahatsız edici şeyleri kontrol etmek için kullanılır, fakat hayvanlar için potansiyel olarak toksiktir. Bireylerin, öldürücü olabilen kolinesteraz inhibisyonu denenmiş bu bileşikler tarafından zehirlendiği bildirilmiştir. Ancak, enzim inhibisyonunun yaşanılabilirliği etkilemediği vücut bölgelerinde de bulunduğu tespit edilmiştir (Massoulie *et al.* 1993).

Uzun yıllardan beri kolinesterazlar; organofosfat ve karbamat böcek öldürücüler, ağır metaller gibi bileşikler tarafından çevresel kirliliği göstermek için ilginç biomarkerlar olarak düşünülmüştür.

AChE, böcekler dışında deniz canlılarından da saflaştırılmıştır. Deniz canlılarından yapılan çalışmalarda inhibitörlere karşı kabukluların, omurgalı türleri ve yumuşakçalardan daha az hassas olduğu ispatlanmıştır. Dahası, asetilkolin kabuklu merkezi sinir sisteminde de bir nörotransmitter olarak tanımlanmıştır. Ectoparasit copepod sealouse (*Lepeophtheirus salmonis*)ın sadece AChE içerdiği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, *S.mantis*, *M.verrucosa* ve *P.vulgaris* gibi diğer kabuklularda olduğu gibi kabuklu *T.brevicornis*'te de tek bir kolinesterazın varlığından bahsedilmiştir. Copepod *T.brevicornis* AChE çalışmasında, ortalama molekül ağırlığı 200 kDa olan tek bir AChE bulunmuştur (Forget and Bocquene 1999).

Deniz canlılarından inhibisyon ölçümlerinde nörotoksik kirlilik (organofosfat ve karbamat böcek öldürücülerin yanı sıra pestisitlerin kompleks karışımları ve metaller) etkisi biomarker olarak kullanıldığı için kolinesterazların sadece tek bir formunun varlığı ve inhibitör etkilerinin potansiyel bioindikatör olarak bu deniz canlılarının yaygın dağılımında tercih edilebilirliğini göstermektedir (Forget and Bocquene 1999).

Canlılar yaşam döngüleri boyunca insanlar tarafından yapay olarak üretilen pestisitler (organik fosforlar, karbamatlılar, piretroitler vb.) veya bitkiler tarafından doğal olarak üretilen allelokimyasallar gibi toksinlere (ksenobiyotik) maruz kalmaktadır. Böceklerin, hayvanların bu toksinlere karşı kendilerini korumak için geliştirdikleri detoksifikasyon mekanizmaları bulunmaktadır. P450, GST ve hidrolaz gibi bazı enzimler insektisitlerin

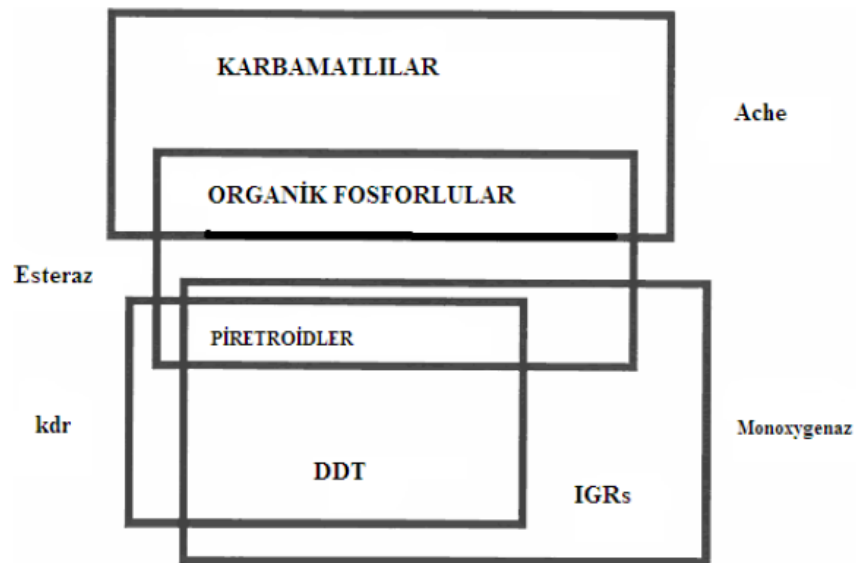
böcek vücuduna girmesi sonucunda bu kimyasalların zehirliliğinin giderilmesini sağlamaktadırlar (Tsagkarakou *et al.* 2009).

Insektisitler böcek vücuduna girdiklerinde hızla zehirliliği giderilmektedir. Bu maddelerin zehirliliğinin giderilmesinin faz I ve faz II olmak üzere iki aşamada gerçekleştiği belirlenmiştir (Yu 2008).

Faz I oksidasyon, hidroliz ve indirgenme aşamalarını içermektedir. Faz I reaksiyonunda kutupsuz yapıdaki zehirli moleküller bazı fonksiyonel grupların eklenmesi ile zehirliliği daha az olan ara maddelere dönüşmektedir. Bu fonksiyonel gruplar 2 kısma ayrılmaktadır:

a) Elektrofilik maddeler: Epoksidaz fonksiyonları ve α , β karbonil grupları elektrofilik karbonlu yapılardır. Bazı insektisitler böcek vücuduna girdikten sonra elektrofilik fonksiyonel gruplar sayesinde aktif olmayan maddelere dönüştürülmektedir.

b) Nükleofilik maddeler: Alkolik yada fenolik hidroksil grupları, amino ve karboksil grupları nükleofilik maddelerdir. Nükleofilik maddeler sayesinde kutupsuz yapıdaki insektisitler daha az zehirliliğe sahip maddelere dönüşmektedir (Soderlund 1997).



Faz II reaksiyonları: İnsektisitlere faz I reaksiyonu sonucunda hidroksil, karboksil ve epoksidaz gibi fonksiyonel gruplar eklenmektedir. Pestisitlere bu grupların eklenmesi sonucu büyük moleküller oluşmaktadır. Bu moleküller şeker, amino asit, glutatyon, fosfat ve sülfat gibi maddeleri de içermektedir. Kimyasallarla farklı grupların birleşmesi sonucu oluşan bu moleküller kutuplu yapıda ve daha az zehirlidir. Faz II'de oluşturulan bu maddeler vücuttan atılmaktadır (Kranthi 2005).

Faz I'de böcek bünyesinde bulunan P450 ve esteraz enzimleri sayesinde insektisitlere elektrofilik yada nükleofilik maddelerin eklenmesi ile ara maddelere dönüşmektedir. Faz II'de ise genellikle GST enzimi sayesinde Faz I'de oluşturulan maddeler hidrofilik maddelere dönüştürülmekte ve vücuttan atılmaktadır (Yu 2008).

Plazma membranlarındaki AChE'de kolinerjik fonksiyonların değerlendirilmesinde bir belirteç olarak kullanılmıştır. Alzheimer hastalarında kullanılan tedavi edici ajanların etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmalar için eritrosit AChE aktivitesinin güvenli bir model olabileceği bildirilmiştir. Bu amaçla temel tedavi şekli beyin ACh içeriğinin artırılması amacı ile AChE inhibitörlerinin kullanılması olarak bildirilmiştir.

Bazı önemli bileşikler psikolojik olarak önemli hedef bölgedeki AChE'ye ulaşmadan önce BChE tarafından detoksifiye edilir. Bu bileşiklerden bazıları;

Süksinildikolin(SuCh); operasyon, endoskopi ve elektrokasılma esnasında soluk borusu entübasyonu için kullanılan nöromuskular ilaçları bloke etmektedir. SuCh; süksinilmonokolin ve koline BChE tarafından hidrolizlenmektedir. Diester ve güçlü bir kas gevşeticidir SuCh damar içine enjekte edildiğinde 1 dakika içinde dozunun yaklaşık %90'ı BChE tarafından hidrolizlenir ve kalan miktar sinir-kas kavşaklarına ulaşmakta ve bir reseptöre bağlanmaktadır. Sonuçta, sinir-son plakanın depolarize olduğu ve asetilkoline hassasiyetin kaybolduğu bildirilmektedir (Wetherel and French 1986; Lockridge 1990; LaDu *et al.*1990; Primo-Parmo *et al.* 1996). Bireylerde SuCh idaresi gerçekleşmez ya da azalır, sinir-kas kavşağına büyük bir dozu ulaştığı için BChE

aktiviteli varyantlar uzun süreli apneyle sonuçlanacağı belirlenmiştir. Bu sonuçlardan kaçınmak için, serum BChE aktivitesinin ölçümü, anestezi esnasında SuCh'in idaresinden sonra uzun süre apneli hastaların değerlendirmesinde kullanılmaktadır. Şayet uzun süreli apne gerçekleşirse, saflaştırılmış insan serum BChE'ı ile yüksek bir şekilde iyi zamanlanmış damar içi idaresiyle, apneye sebep olunan sürenin azaltılacağını ifade etmişlerdir (Viby-Mogensen 1981).

Organofosfat ya da karbamat esterleri pestisit, böcek öldürücü, kimyasal savaş ajanı ve glukoma, parazit enfeksiyonu ve Alzheimer hastalığı gibi medical rahatsızlıkların tedavisi için ilaç olarak kullanılmıştır. Bu bileşikler hem AChE hem de BChE için güçlü inhibitörü olduğu ifade edilmiştir. Askeri ve sivil halka karşı kullanılan toksik en yaygın organofosforlar (OPs); soman (O-pinacolil metilfosforidat), VX (etil-S-(2-diizopropilaminoetil) metilfosfontiyolat), sarin (O-izopropil metilfosforidat) ve tabun (N,N-dimetilamido-O-etil fosfosiyamidat) olarak belirlenmiştir. Organofosfatlar tarafından kolinesterazın ilerleyen inhibisyonunun onların aktif bölgesindeki serinin fosforilasyonundan dolayı olduğu belirlenmiştir (insan BChE enzimi için serin198./ insan AChE enzimi için 200. amino asit). AChE fonksiyonlarının kaybının sinaptik yarıktaki asetilkolin birikmesine ve kas felci, inme ve boğularak ölüme yol açtığı sonucuna varılmıştır (Raveh *et al.* 1993).

Toksik akut sinir gazlarına karşı terapi AChE'nin aktif bölgesini ya kısmi yada geçici maskeleyen dönüşümlü AChE inhibitörü ve bir karbamat olan piridostigminle (nöromuskular plakta asetilkolinin yıkılmasını önleyen madde) ön tedaviyi kapsamaktadır. Tedaviye maruz kaldıktan sonra atropin gibi kolinolitik ajanlar, pralidoxime klorür gibi oxime reaktivatörü, diazepam gibi kasılmayı önleyici bir ilacın idaresiyle devam edilmektedir. Pekçok ilaç kombinasyon terapisi yaşam süresinin artmasında etkili olmasına rağmen, titreme, kasılma, soluksuzluk, sinir ve kas liflerinin bir araya gelerek demet oluşturması gibi maruz kalınan toksik belirtilerden sonra ortaya çıkanlar önlenememektedir. Bu terapinin diğer olumsuzluğu onların idaresinin zamanlamasında onun etkisine bağlıdır (Levine and Rodnitzky 1976; McDonough and Shih 1993). Diğer bir deyişle, piridostigmin de bir AChE inhibitörüdür ve

asetilkolinin birikmesine neden olmaktadır. Onun daha ykek propilaktik etkisi ve yan etkilerini önlemek için benactizin gibi antikolinerjik bir ilaçla piridostigminin idare edilmesi amalanılmaktadır (Kassa and Fusek 1997).

Bu terapinin mekanizması Őyledir: FosforillenmiŐ kolinesterazlar, oksimler gibi güçlü nükleofilik bileşikler tarafından reaktive edilmektedir. Bu yüzden pralidoksim tuzlar yada obidoksim diklorür fosforillenmiŐ AChE'nin reaktivasyonu için kullanılmaktadır ve yüksek oranda reaktif fosforiloksim (POX) oluŐurmaktadır. Fakat POX'un kolinesterazları tekrar inhibe edebileceği bulunmuştur. Bu enzimlerin tekrar inhibe edilmiş formu 'aged enzim' olarak isimlendirilir ve onun tekrar aktivasyonun mümkün olmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden aged plazma enzimin in vivo aktivitesi sadece karaciğerde yeni enzimlerin sentezlenmesiyle normal seviyesine döndüğü belirlenmiştir (Mason *et al.* 1993). Bu yüzden, onlar psikolojik olarak önemli hedef bölgelerde AChE'yi inhibe etmeden önce dolaŐımda organikfosforların el koymasđ için daha etkili terapi, saf AChE ve BChE idaresinin ekzojen bir Şekilde olabileceği düşünülmüştür. İnsan serum BChE bir propilaktik antidot olarak ipek maymun, thesus maymun, fare ve ratlarda kullanılmıştır.

Güçlü etkisiyle organik fosforların tüm çeŐitlerini hidrolizleme yeteneğini kazandıran daha güçlü BChE mutantlarını elde eden araŐtırmaların, savaŐta sinir gazlarına maruz kalan tüm insanlara daha çok Őans vereceğini düşündürmüştür (Lockridge *et al.* 1997).

BChE, kokain metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Plazmada hem doğal hem doğal olmayan kokainin büyük detoksifikasyon enzimidir. BChE tarafından üretilen inaktif metabolitler böbrek tarafından dolaşımdan hızlı bir Şekilde ıkarılan ecgonine, metil ester ve benzoik asittir (Matter *et al.* 1996; Hoffman *et al.* 1996). Kokainin kötüye kullanımı, tüm dünyanın medikal bir problemidir. Kokainin toksik semptomları arasında vücut sıcaklığının yükselmesi, kalp durması, büyük kapsamlı fel vardır. Hayvan alıŐmaları, saflaŐmıŐ insan serum BChE 'ın idaresinin hipertansiyon ve ritim bozukluğunun yanı sıra kokainin öldürücü etkisinden fare ve ratları koruduğunu göstermiştir (Mattes *et al.* 1997; Sun *et al.* 2001).

BChE kokainin toksik etkisine karşı korumasına rağmen, yavaş bir şekilde hareket etmektedir. Doğal kokainin turnover sayısı (K_{cat}) 3.9 min^{-1} olarak bulunmuştur. Hidroliz oranı ve afinite bağlarını arttırarak BChE'ın kokaine karşı katalitik etkisini arttırmak için enzimin farklı mutantları test edilmiştir. Ala328Tyr mutantının artmış hidrolaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Xie *et al.* 1998).

BChE'ın negatif yüklü substratlarına aspirin bir örnektir. BChE aspirinin salisilata hidrolizini kapsayan büyük plazma esterazdır. Genel ve genel olmayan butirilkolinesterazlar aynı kinetik yolla aspirini hidrolizler. Aspirin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak hidrolizlerin plotted oranları asimetric en iyi biçimli kavisi vermektedir. pH'da azalmaya da sebep olan aspirinin kendiliğinden hidrolizi ile salisilat konsantrasyonu arttığından BChE inhibisyonu aspirin konsantrasyonlarında yüksek oranda görülmüştür. Turnover sayısı tipik ve tipik olmayan butirilkolinesterazlar için $5000-12000 \text{ min}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Asp70'in aspirinin enzime ilk bağlanması için büyük bölge olmadığını göstermiştir. Fakat aktif merkezde aspirinin bağlanması için gerekli Trp82 halkasının varlığını gösteren Trp82 mutantının aspirini hidrolizleyemediği belirlenmiştir (Masson *et al.* 1997).

Anticonvulsant ilaçlar sinir gazlarına maruz kalınca karbamatla ön tedavide bile, salgılama, çarpınma gibi toksik kolinerjik sinyallerin bir çeşidini üretmektedir. Çünkü karbamatların AChE ve BChE'ın da inhibitörleri olduğu belirlenmiştir. Karbamatla ön tedaviden sonra, bir kolinolitik ajan (genel olarak atropin) bir oksim reaktivatör ve bir antikonvulsant içeren pek çok ilaç kompleksi, hastaların tedavisi sonrası için gerekmektedir. Diazepam genel olarak atropinle birlikte anticonvulsant olarak kullanılır, fakat iğne yapılabilir formu savaş alanında askeri personel için daha az tercih edilebilen suistimale uğrama, nonaquas formulasyon ve delibilatig gibi yan etkiler onun noksanlığıyla ilişkilendirilmiştir (Shih *et al.* 1991). Benactyzin test edilen hayvanlarda convulsiyona sebep olan somanın, önlemede daha çok etkili olduğu belirlenmiştir. Benactyzin kullanıldığında kolinolitik ajan gerekmeyeceği belirlenmiştir (Schenk *et al.* 1976). Fakat insan serum BChE'da benactyzinin etkisi üzerine yapılan çalışmada,

benactyzin ve drofeninin enzimin yarışmalı inhibitörü olduğu görülmüştür. Bunlar hem karboksilik asit esterleridir hem de BChE tarafından hidrolizlenir (Bodur *et al.* 2001).

Bazı öncül ilaçlar BChE tarafından aktif formlara dönüştürülür. Bu öncül ilaç çeşitlerinin bazı türleri: Bambuterol, dikarbamat ve yeni öncü ilaçtır ve antihistamatik etkiye sahip BChE tarafından terbutaline dönüştürülmüştür (Tunek *et al.* 1998). Heroin, beyinde enzimler tarafından morfine hidrolizlenir ve kan-beyin bariyerini delip geçen 6-asetilmorfine BChE tarafından hidrolizlenmektedir. BChE heroini hidrolizleyen insan serumundaki tek enzimdir. Suskun BChE varyantlarına sahip kişilerin heroini hidrolizleyemediği belirtilmiştir (Lockridge *et al.* 1980). CPT-II(Irinotecan), bir antikanser öncül ilacıdır ve güçlü topoizomerez I zehiri olan SN-38(7-etil-10-7-hidroksi-camptothecin)'e BChE tarafından dönüştürülmektedir (Morton *et al.* 1999).

Yakın gelecekte, yeni bir terapötik hedef ve AD tedavisinde teşhis edici bir marker olarak AChE ve BChE'in değeri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunacaktır. Embriyonik yaşamda, hücrel proliferasyonda ve farklılaşmasında kolinesterazların rolünün tanımı, tümorogenesisde AChE ve BChE'yi içeren mümkün araştırmalara başlanmıştır. (Saez-Valero and Vidal 1996; Saez-Valero *et al.* 1996). Hem AChE hemde BChE'in anormal ekspresyonu ve genlerinin in vivo amplifikasyonu, glioma, meningioma, akustik nöronimaz ve ciğer kanseri, megakaryostopoietic rahatsızlıklar ve leukemias, ovaryum tümörleri gibi intracranial neoplazmalarda gözlenmiştir (Lapidot-Lifson *et al.* 1989; Zakut *et al.* 1990; Brass *et al.* 1997; Garcia *et al.* 1999). AChE ve BChE insan nöroblastoma hücrelerde, hücre yapışmasını ayarladığını da göstermiştir (Johnson and Moore 2000). BChE'in antisense blokması megakaryoktopoiesis bir inhibisyonunda sonuçları göstermiştir. Embriyonik civciv göz hücresinde benzer tekniklere başvurma proliferasyonun bir inhibisyonunun sonucunda gerçekleşmiştir (Lapidot-Lifson *et al.* 1989; Robitzki *et al.* 1997). Bu yüzden tümorogenesis ve BChE arasındaki yakın ilişki çok daha açık okunabilmekte ve spesifik BChE inhibitörlerinin kullanılışı kemoterapik bir ajan olarak gelecekte de kullanılabilirlik sunacağı düşünülmektedir.

Kolinerjik sinapslarda önemli rol oynayan bir serin hidrolaz olan AChE'nin sinir sisteminde nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen katalitik reaksiyon enzimlerinin en etkililerinden biri olduğu bilinmektedir. Bu yüksek etkisinin esası, çeşitli substratlar kullanan ligand–bağlanma çalışmaları ve bir periferel anyonik bölge (PAS) ve aktif merkezde serin içeren bir katyonik esteratik alt bölge birleşimi asetilkolinin küçük parçası kolinin yerleştiği bir anyonik bölge olduğu fikrine yol açmıştır (Changeux 1966; Epstein *et al.* 1979). AChE periferel bölgesinin ilk psikolojik rolü düşük substrat konsantrasyonlarında asetilkolinin hidrolizlenmesini hızlandırmaktadır (Mallender *et al.* 1999; Szeglets *et al.* 1999). PAS bölgesine spesifik olarak bağlanan ligandlar substrat hidrolizini inhibe eder (Taylor and Lappi 1975). Bu tamamıyla PAS'a bağlanarak açılasyon bölgesinde bir konformasyonel değişikliğe katkıda bulunmuştur (Shafferman *et al.* 1992; Szeglets *et al.* 1998). Bazı çalışmalarda AChE enzim aktivitesi allosterik kontrol göstermiştir (Radi *et al.* 1994; Radi *et al.* 1995; Rosenberry *et al.* 1996; Nery de Matte *et al.* 1996; Saxena *et al.* 1998). Yılan zehirinden yapılan çalışmada enzim aktif bölgesinde ligandın ayrışması ve ilgili sabit oranın değişmesi ile PAS'a bu zehirin bağlandığını ifade etmişlerdir (Radi *et al.* 1994; Radi *et al.* 1995; Rosenberry *et al.* 1996). İlk zamanlarda Nolte *et al.* katyonik substrat ve inhibitörlere elektrostatik olarak bağlanabilen aktif bölgeye bağlanan asetiltiyokolinyodatın (ATC) komşu net bir negatif yükü kontrol edildiğini ileri sürmüşlerdir (Nolte *et al.* 1980). Son zamanlarda ise AChE'de yapışma fonksiyonunun PAS'da lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir (Johnson and Moore 1999).

İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedo mormoreta) elektrik organında ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidroliz etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Düşük konsantrasyonda substrat, enziminin aktif bölgesindeki proteinin çok az bir miktarı ile reaksiyona girmektedir (Akman 2007).

Daha önce yapılan çalışmalarda inhibitör olarak N-metilacridinium (Dudai *et al.* 1974; Sekar *et al.* 1980) edrophonium (Chan *et al.* 1973) ve procainamid (Ralston *et al.* 1983; Dela Hoz *et al.* 1986) kullanılan ligand afinite kromotografisi ile saflaştırılmıştır. Takrin

afinite jelinin diğer kullanılan jellere üstünlüğü; sentezinin daha kolay olması, daha ucuz olması ve çeşitli biyolojik materyallerden AChE'nin spesifik olarak saflaştırılmasında seçiciliğinin tespit edilmesidir (Corrol *et al.* 1995).

Takrin, beyinde asetilkolin konsantrasyonu artırmak için, kolinesterazı inhibe ederek Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan iyi bilinen bir ilaçtır (Berman and Leonard 1992; Eagger *et al.* 1992; Al-Jafari *et al.* 1998). Bu artışın takrin kullanımıyla hafızadaki ilerlemeden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca, takrinin plazma BChE'ı inhibe etmek için de çok etkili olduğu belirlenmiştir (Cheng and Tang 1998).

Böcek AChE çalışmalarının pek çoğu substrat spesifiklikleri çakışan diğer esterazları içeren ham preparatlarla gerçekleştirilmiştir (Guilbault 1970; Toutant 1989). Fakat özellikle araştırmalara göre diğer esterazlar, hidrolizlenen bileşiklere bağlanabildiğinden, saflaştırılmış AChE'nin kullanımı inhibitör bağlanmaları ve substrat kinetik çalışmalarında ham homojenattan daha fazla avantajlara sahip olduğunu göstermiştir (Lee *et al.* 1974). Böceklerden AChE'nin izolasyonu için pek çok farklı metot kullanılmıştır, afinite kromatografisi böceklerden AChE'nin saflaştırılması için en etkili tekniktir ve genellikle pek çok toksikolojik çalışmada istenilen AChE'nin yeterli saflığıyla yüksek bir verim sağladığı belirlenmiştir.

AChE, böcek nöropsikolojisi ve hastalık direnci için biyolojik olarak öneminden dolayı oldukça dikkat çekici bir enzim olduğu ifade edilmiştir. Çoğu araştırmacı böcek direncinin AChE değişikliği ile nasıl bir ilgisi olduğunu araştırmışlardır. Ancak, bu çalışmaların pek çoğunda vücudun tümü ya da bir kısmının homojenatlarından saflaştırılmamış AChE kullanılmıştır. Ham AChE ekstraktları, AChE ile ilgisi olmayan karboksilesteraz gibi, kirlilik faktörleri içermektedir. Bunların AChE'nin ölçümünü etkileyebileceği ve yanlış anlaşılacak sonuçlar üretebileceği ifade edilmiştir.

Tayvan'da oriental meyve sineği *Bactrocera dorsalis*(Hendel) (Diptera)'in her yıl meyve ağaçlarına zarar veren çok ciddi meyve hastalığı olduğu ifade edilmiştir. Organofosfor ve karbamat böcek öldürücüler bu hastalığı kontrol etmek için yaygın şekilde

kullanılmıştır. Tarla popülasyonları, son direnç çalışmalarında çıkarılan sonuçlara göre, karbamat böcek öldürücülere ve organofosforlara kademe kademe direnç geliştirdikleri belirlenmiştir. Organofosfor böcek öldürücülere karşı meyve sineği direncinin yaygın sebebinin ise değişmiş AChE olduğu düşünülmüştür (Vontas *et al.* 2001).

Böcek asetilkolinesterazı omurgalılarınkinden çok daha fazla araştırılmıştır ve çalışmaların pek çoğu ekstraktan yapılmasına rağmen AChE; *Musca domestica* (Fournier *et al.* 1987), *Lygus hesperus* Knight (Zhu and Brindley 1992), *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu and Clark 1994), *Helicoverpa armigera* (Gao *et al.* 1998), *Diabrotica Virgifera virgifera* (Gao *et al.* 1998), *Galleria mellonella* L. (Keane and Ryan 1999), *Schizaphis graminum* (Gao and Zhu 2001) ve pamuk böceği, *Aphis gossypii* Glover (Li and Han 2002), Lesser grain borer gibi birçok böcek türünden saflaştırılmıştır (Guedes *et al.* 1998).

Böceklerden yapılan çalışmalarda AChE enzimi vücutlarının tamamından ya da bir kısmından saflaştırılmıştır. Bazı kaynaklar için saflaştırma yüzdesi ve katsayıları: Oriental meyve sineği başlarından Sepharose 4B-procainamide afinite kromatografisi ile %52 verimle 8183 kat, *Galleria mellonella* L. beyninden CH-Sepharose 4B'ye procainamid vasıtasıyla bağlı 1-(3-dimetilaminopropil)-3-3-etilkarbodiimidle afinite kromatografisi ve devamında DEAE-Sepharose iyon değişim kolonu ile iki adımda %32 verimle 283 kat (Keane and Ryan 1999), Lesser grain borer tüm vücudundan siyanojen bromürle aktive edilmiş Sepharose 4B'ye bağlı 3-karboksifeniletildimetil amonyum afinite kolonu ile %54 verimle 771 kat (Guedes *et al.* 1998), *Leptinotarsa decemlineata* için %51 verimle 39000 kat ve *Diabrotica Virgifera virgifera* için 20000 kat olarak bulunmuştur (Zhu and Clark 1994).

Ayrıca substrat olarak asetiltiyokoliniyodat kullanılmış ve saflaştırılmış AChE'ler için spesifik aktiviteler *Drosophila* kafaları için 1350 units/mg protein, at sineği için 385, Western tarnished plant bug için 50, Colorado patates böceği için 128, Lesser grain borer için 5, cotton aphid için 1456 ve oriental meyve sineği için 691 olarak bulunmuştur. Farklı böcek türleri arasında saflaştırılmış AChE'nin spesifik aktivitesindeki

farklılığın AChE'nin saflık derecesine bağlı olabileceği gibi böcek türlerindeki farklılıktan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

AChE'nin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül kütlesi oriental meyve sineği için dimerik, 61 kDa (Hsiao *et al.* 2004), *Drosophila* için 55 kDa Horn fly için 54kDa, Colorado patates böceği için 65 kDa, Lesser grain borer için 56 kDa (Guedes *et al.* 1998), Waxmoth için 60 kDa, Greenburg için 72 kDa ve cotton Aphid için 63,5 kDa olarak bulunmuştur (Li and Han 2002).

Ayrıca *Galleria Mellonella*'da enzimin molekül kütlesi indirgen olmayan doğal PAGE'de 240 kDa olarak bulunmuştur ve çok benzer tetramer alt birimler olduğu rapor edilmiştir (Keane and Ryan 1999). Lesser Grain Borer'de indirgenmemiş ortamda AChE enzimi için molekül ağırlığı 107kDa olarak hesaplanmış ve her bir AChE molekülünün disülfid bağlarıyla bağlı 2 benzer alt birimden oluştuğu bulunmuştur (Guedes *et al.* 1998). Oriental meyve sineği için yine indirgenmemiş ortamda molekül kütlesi 116 kDa, homodimer olarak bulunmuştur. Bu biyokimyasal farklılıklar diğer böcek türlerindeki AChE'yle karşılaştırıldığında oriental meyve sineğinden saflaştırılmış AChE'nin yapısal farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca meyve sineği kontrolü için kullanılan böcek öldürücüler AChE'nin etkisini inhibe ederek etkisini gösterdiği sonucuna varılmıştır (Hsiao *et al.* 2004).

Ev sineği AChE'sinin saflığında, poliakrilamid gradient jel elektroforezi kullanılarak üç farklı doğal formu açığa çıkarılmıştır. İki 75 ve 150 kDa molekül ağırlıklı hidrofilik formdur ve üçüncü formun molekül ağırlığı ise deterjanın konsantrasyonu ve niteliğine bağlıdır (Fournier *et al.* 1987). *Lygus Hesperus* AChE'sinin saflığı için doğal ve indirgenmiş proteinler için molekül ağırlıkları; hidrofilik a formu için 199 ve 94 kDa, hidrofilik b formu için 150 ve 79 kDa, amfilik c formu için 82 ve 86 kDa olarak rapor edilmiştir. Bu bilgiler hidrofilik a ve b formlarının dimer, c formunun ise monomer olduğunu göstermiştir (Zhu and Brindley 1992). Son olarak, saflaştırılmış *Leptinotarsa decemlineata* AChE'sinin büyük formu bir hidrofilik dimerken küçük formunun bir amfilik dimer olmak üzere 2 moleküler formdan oluştuğu ve her iki moleküler formun

doğal form için 130 ve alt birimler için 65 kDa olarak neredeyse aynı molekül ağırlığına sahip olduğu bulunmuştur (Zhu and Clark 1994).

Yüksek konsantrasyonlarda substrat inhibisyonu AChE için karakteristik iken BChE için değildir. Bu yüzden AChE ve BChE'ı ayırt etmek için kullanılan kriterlerden biri olarak yaygın bir şekilde kabul edilir (Toutant 1989). Ancak, oriental meyve sineğinden AChE' nin saflaştırılmasında önemli bir substrat inhibisyonu gözlenmemiştir, Ayrıca benzer sonuçlar Western flower thrip, Colorado patates böceği ve organofosforlar ya da karbamat böcek öldürücülere karşı dirençli tobacco budworm'dan değişmiş AChE'nin saflaştırıldığı rapor edilen çalışmaların hiçbirinde aşırı substrat inhibisyonu gözlenmemiştir. Bazı araştırmacılar substrat inhibisyonunun inaktif enzim-substrat-substrat kompleksine yol açan periferik anyonik bölgeye aşırı substrat bağlanmasından dolayı olduğunu savunmuşlardır. Bu hipotez, oriental meyve sineği AChE'sinin periferik anyonik bölgesinin diğer böcek türlerinin AChE'lerinden yapısal olarak farklı olduğunu akla getirmiştir.

AChE'nin çoğunlukla farklı doğal formlarda ortaya çıktığı belirlenmiştir . Yine yapılan çalışmalar sonucunda böcek AChE enzimi *M.domestica* ve *L.hesperus* Knight için 3 form, Colorado böcek bitkisi *L.decemlineate* için iki molekül form olarak bulunurken, oriental fruit fly'dan saflaştırılmış AChE için denatüre edilmemiş PAGE'de Triton X-100 varlığında ve yokluğunda sadece tek bir büyük bant yani tek bir molekül form bulunmuştur. Bu bant gümüş boyama esnasında elde edilmiştir. Denatüre edilmemiş elektroforezde yada Triton X-100 yokluğunda protein göçünde farklı bir noktaya dikkat çekilmiştir, bu da saflaştırılmış AChE'nin büyük molekül formunun bir amfilik form olabileceğidir. Diğer bir deyişle, oriental meyve sineğinden saflaştırılmış AChE deterjandan etkilenmiştir ve protein göçünü geciktirdiğinden, amfilik AChE molekülünün hidrofobik domainiyle deterjan arasındaki bağlanmadan dolayı daha yavaş göç ettiği düşünülmüştür (Brodbeck 1986).

Oriental meyve sineğinden saflaştırılmış AChE'nin substrat spesifikliğı için üç tiyokolik esteri çalışılmıştır. AChE aktivitesinde substrat konsantrasyonunun etkisini çalışmak

için 3 substrat, asetiltiyokoliniyodat, propiltiyokoliniyodat ve butiriltiyokoliniyodat kullanılmıştır. Kinetik çalışmalarla farklı substratlara AChE'nin afinitesi saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda substrat inhibisyon olayı gözlenmemiştir ve optimal substrat konsantrasyonu belirlenmiştir. Km değerleri ATC için $87,9 \pm 9,5 \mu\text{M}$, PTC için $26,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ve BTC için $195,3 \pm 22,0 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur (Hsiao *et al.* 2004). Üç substrat için AChE'nin hidrolizleme etkisi, onların Vmax değerleri ile gösterilmiştir. ATC için $833,3 \pm 19,3 \mu\text{mol/min/mg}$ protein, PTC için $222,2 \pm 11,0$ ve BTC için $57,5 \pm 3,6$ 'dır. Km değerleri, saflaştırılmış AChE'nin afinitesinin ATC ve BTC için sırasıyla 3,3 ve 7,3 kat, PTC için daha düşük olduğunu, ayrıca ATC ve PTC'nin hidrolizleme etkisi Vmax; 14,5 ve 3,9 kat BTC'den daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Oriental meyve sineğinden AChE'nin turnover sayısı (kcat), ATC, PTC ve BTC için sırasıyla 97000,26000 ve 6700'dür. ATC, PTC ve BTC için oriental meyve sineğinden AChE'nin substrat spesifiklik sabitleri(kcat/km) sırasıyla 1103, 968 ve 34 olarak bulunmuştur ve ATC için substrat özgüllük sabitinin, BTC'den 32 kat daha yüksek olduğunu ve sonuç olarak AChE'nin ATC'ye BTC'den çok daha yüksek spesifikliğinin olduğunu rapor etmişlerdir (Hsiao *et al.* 2004).

Aynı zamanda Lesser grain borer'dan AChE aktivitesinde substrat konsantrasyonunun etkisini çalışmak için 4 substrat ATC, PTC, BTC ve A β MTC kullanılmıştır. Optimal substrat konsantrasyonları 0,06-1,00 mM arasında sıralanan ATC, PTC, ve A β MTC için oldukça geniş olmasına rağmen, AChE aktivitesi ATC, PTC, ve A β MTC'nin yüksek konsantrasyonları tarafından önemli ölçüde inhibe olmuştur. BTC'nin yüksek konsantrasyonlarında da AChE aktivitesi inhibe olmuştur fakat inhibisyon büyüklüğü çok daha küçüktür. Bu substrat inhibisyon olayının enzimin periferik düzenleyici bölgesine substratın aşırı bağlanmasından dolayı olduğu düşünülmüştür (Cohen *et al.* 1991) ve AChE'lerin özelliklerini ayırt etmede önemlidir (Toutant 1989). Kinetik çalışmalar sonucunda 4 farklı substratına AChE'nin afinitesi saptanmıştır ve afinitedeki tüm farklılıklar bu dört substrat arasında küçük oranlardadır. ATC, A β MTC, PTC, ve BTC için Km değerleri sırasıyla $24,2 \mu\text{M}$, $13,4 \mu\text{M}$, $20,4 \mu\text{M}$ ve $8,4 \mu\text{M}$ 'dir. 4 substrat için AChE'nin hidrolizleme etkisi, V_{max} değeri olarak gösterilmiştir ve sırasıyla $18,7 \mu\text{mol/min/mg}$, $13,4 \mu\text{mol/min/mg}$, $9,3 \mu\text{mol/min/mg}$ ve $0,6 \mu\text{mol/min/mg}$ 'dır. Bu

sonuçlara göre AChE, ATC, AβMTC ve PTC'yi sırasıyla 31,22 ve 15 kat hidrolizlerken BTC'yi daha etkili bir şekilde hidrolizlediği rapor edilmiştir.

Oriental meyve sineğinden saflaştırılmış AChE için BTC ve ATC 'nin hidrolizinin relative etkisi $V_{\max}(\text{BTC})/V_{\max}(\text{ATC})$ oranı olarak saptanmıştır ve 0,069 olarak bulunmuştur. Bu oran Western tarnished plant bug için bulunan değerden (0,098) daha düşük ve *Drosophila*'dan saflaştırılmış AChE için elde edilenin (0,6) sadece %10'u kadar olduğunu rapor etmişlerdir. Daha küçük oranlara rağmen Lesser grain borer ve Colorado patates böceği için 0,032 olarak bulunmuştur (Zhu and Clark 1994; Guedes *et al.* 1998). AChE'lerin bu oranlarının omurgalılarda bulunanlardan çok daha büyük olduğu görülmüştür, örneğin bu değer elektrik yılan balığı için 0,005 ve insan eritrositi için 0,01'dir. Bu iki substart tarafından gerçekleştirilen böcek AChE'lerinin substrat spesifikliğinin omurgalılardaki AChE'nin bu değerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmamızda standart sığır serum albumin, sodyum fosfat, potasyum fosfat, sodyum hidroksit, %0.9'luk sodyum klorür, triton X-100, EDTA, Tris-HCl, DTNB, Asetiltiyokolin iyodat, triklor asetik asit (TCA), hidroklorik asit, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, coomassie brillant blue R-250, sodyum dodesilsülfat (SDS), gümüş nitrat, etil alkol, sodyum karbonat, sodyum tiyosülfat, formaldehit, gliserol, destile su, PER, Tris-HCl, TEMED, Glisin, Bromtimol mavisi, Asetik asit, metanol, izopropanol, taze kan kullanıldı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanıldı.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whırlı-mixer
Hassas terazi	: Denver
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Wise Stir-MSH-20A
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF

Su Banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Liyofilizatör	: Snijders
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar):	Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılacak çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. 1M Tris-HCl 5mM EDTA pH=8 (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 30,27gram Tris, 0,37gram EDTA 200 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8'e kadar titre edildi ve daha sonra toplam hacim destile suyla 250ml'ye tamamlandı
2. 10 mM 50 ml asetiltiyokolin iyodat (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 0,145gram asetil tiyokolin iyodat tartılarak destile su ile 50 mililitreye tamamlandı.
3. %1 sodyum- sitrat, 0,5mM DTNB(enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 0,5 gram sodyum sitrat ve 0,01 gram DTNB tartılarak destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. %0,9 NaCl çözeltisi (taze kandan ayrılan eritrositleri yıkamak için kullanıldı): 0,9 gram sodyum klorür tartılarak destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
5. 0,1M Na₂HPO₄ pH=7,4 (Hemolizat hazırlama aşamasında elde edilen çökeleğin alınacağı tampon): 26,8 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ · 7H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.
6. %1'lik Triton X-100 (Enzimi membranlardan sökmek için kullanılan çözelti): 50 µl Triton X-100 alınarak 0,1M Na₂HPO₄ pH=7,4 tamponu ile 5 mililitreye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 0,1 M NaHCO₃ pH=10 (CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ye tirozin takılırken yıkamada kullanıldı): 2,1 g (0,025 mol) NaHCO₃ 200 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=10'a kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 250 mililitreye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO₃ (pH=8,8) (tirozin takılı jelin aynı tamponun içine alınmasında kullanıldı): 0,84 g ($1 \cdot 10^{-2}$ mol) NaHCO₃ 80 ml destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8 kadar titre edildi, daha sonra toplam hacim destile suyla 100 mililitreye tamamlandı.
3. 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) (takrin kenetlendirilmesinde Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonunun yıkanmasında kullanıldı): 1,21 g Tris 150 ml destile su içerisinde çözümlenerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 200 litreye tamamlandı.
4. 0,1M Na₂HPO₄ pH=7,4 (Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin dengelenmesinde ve yıkanmasında kullanılan tampon) : 26,8 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ · 7H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.
5. 200 mM NaCl içeren 10 mM Na₂HPO₄ pH=7,4 (Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin elüsyonunda kullanılacak tampon): 11,7 g (0,2 mol) NaCl ve 2,68 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ · 7H₂O, 950 ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim destile suyla 1 litreye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözeltiler:

1. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl (pH 8,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'lük amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'lük SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml saf suda çözüldü. %10'lük SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,65 ml, %10'lük SDS'den 3 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptolanol ilave edildi.

Coomassie-Blue R-250 ile boyamada kullanılan çözeltiler

1. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
2. Jel boyama çözeltisi: 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin 120 ml metanolde çözülmesiyle ve üzerine 24 ml saf asetik asit ile 120 ml destile suyun ilavesiyle hazırlandı.
3. Jel yıkama çözeltisi: %5 metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 saf su karıştırılarak elde edildi.
4. %0,1'lük brom timol mavisini çözeltisi: 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler:

1. Tespit çözeltisi: 60 ml saf su, 30 ml %96'lık etanol, 10 ml asetik asitin karıştırılmasıyla elde edilir.
2. Redüksiyon Çözeltisi: 4,8 g Sodyum asetat, 45 ml Etanol ve 80 ml saf su karıştırılıp, pH= 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml gluteraldehit eklenip saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 ml saf suda çözülüp üzerine 20 µl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf suda çözülerek üzerine 120 µl formaldehit eklendi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 250 ml'lik çözelti, 1 ml gliserin ve %5 asetik asitten oluşur.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

1. Essitalopram okzalate: 10 mg madde 1 ml solüsyon içinde (0,002 M).
2. Fluoksetin: 20 mg madde 5ml solüsyonda (0,013 M).
3. Mirtazapin: 15 mg madde 1 ml solüsyon içinde (0,056 M).
4. Risperidon: 1mg madde 1ml solüsyon içinde (0,234 µM).
5. Sodyum Valproat: 200 mg madde 1ml solüsyon içinde (0,12 M).
6. Trazodon HCl: 287mg madde 5ml alkolde çözüldü (0,14 M).
7. Amikasin sülfat: 100 mg madde 2ml solüsyon içinde (0,0725 M).
8. Pantaprazol: 40 mg madde 5 ml suda çözüldü (0,021 M).
9. Sefuroksim: 750 mg madde 6 ml suda çözüldü (0,293 M).
10. Diltizem HCl: 25 mg madde 5 ml suda çözüldü (0,012 M).
11. Vankomisin HCl: 1g madde 20 ml suda çözüldü (0,034 M).
12. Tenoksikam: 20 mg madde 2ml suda çözüldü (0,029 M).
13. 2,6-diizopropilfenol: 250 µl madde 3500 µl alkolde çözüldü (5,23 M).
14. 2,6-dimetilfenol: 10 mg madde 3 ml alkolde çözüldü (0,027 M).
15. 2,6-ditertbutilfenol: 10 mg madde 2 ml alkolde çözüldü (0,029 M).
16. Lidokain: 5 mg madde 20 ml suda çözüldü ($8,65 \cdot 10^{-4}$ M).

17. Bupivakain(Markain): 5 mg madde 20 ml suda çözüldü
18. BHA: 10 mg madde 3 ml alkolde çözüldü (184 μ M).
19. BHT:10 mg madde 3 ml alkolde çözüldü (161 μ M).
20. Etilalkol: 16,86 molar olarak hazırlandı.
21. Aseton:13,5 molar olarak hazırlandı.
22. DMSO:13,9 molar olarak hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometre'de köre karşı okundu.

3.2.1.b. Kantitatif protein tayini

Bu metodla hemolizat, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerinde protein tayini yapıldı. Bu yöntem, proteine Coomessie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır (Bradford 1976).

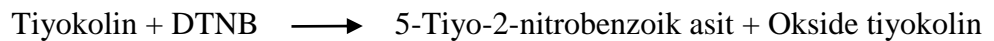
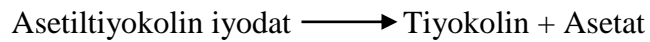
Tayin işlemlerinde şu yöntem takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l alındı.

Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vortex ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılacak ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 20 kat veya daha çok seyreltme yapılarak elde edilen seyreltilmiş çözeltilerden 3 ayrı tüpe sırasıyla 50, 100 ve 200 µl alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi aktivite ölçüm metodu

Kolinesteraz aktivite tayini, güçlü antikolinesteraz aktivitesi taşıyan insektisitlerle oluşan akut ve kronik zehirlenme olaylarında tedaviye yön verilmesi bakımından klinik yönden önemlidir. Serum ve eritrosit kolinesteraz aktivite değerleri çeşitli patolojik durumlarda anlamlı bir klinik veri olarak kabul edilmektedir.

Asetilkolinesteraz asetiltiyokolinin tiyokoline hidrolizini katalizler. Tiyokolinin oluşum oranı, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin oluşumundan kaynaklanan bir sarı rengi üreten 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tiyokolinin reaksiyonunun takibiyle ölçüldü. Sarı anyonun oluşum oranı 412 nm'de ölçüldü (Ellman *et al.* 1961).



Çizelge 3.1. Aktivite ölçüm prosedürü

	Kör(µl)	Sistem (µl)
0,3M Fosfat Tamponu, 5 mM EDTA, pH: 7,6	100	100
%1 lik Sodyum sitrat içinde 0,5 mM DTNB	50	50
1:10 su da seyreltilmiş 1:20 hemolizat	10	10
H ₂ O	840	790
Karışım 37°C’de 10 dk inkübe edildi.		
10 mM Asetiltiyokolin iyodat	-	50

Sistemin optik yoğunluğundaki artış 412 nm’de 10 ila 15 dk için köre karşı ölçüldü. (Ellman *et al.* 1961).

$$A = \frac{\Delta OD}{13,6} \times \frac{VC}{VE} \times f$$

A = ml başına enzim ünitesi

ΔOD = 412 nm’de optik dansitenin dk. başına değişimi

VC = Küvet hacmi

VE = Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi

f = Seyreltme faktörü

13.6 = 412 nm’de ve 37°C’de 3 mM asetiltiyokoliniyodür’ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir (Alırız ve Türkoğlu 2003; Akman 2007).

3.2.3. İnsan eritrosit AChE enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Kan temini ve hemolizat hazırlanması

İnsan kanı taze olarak temin edildi. Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, santrifüje yerleştirilip 15 dakika 2500xg’de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklı dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti %0,9 (izotonik) NaCl çözeltisi ile üç defa yıkanıp her defasında 2500xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 3 katı kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi ve +4°C’de 13.000

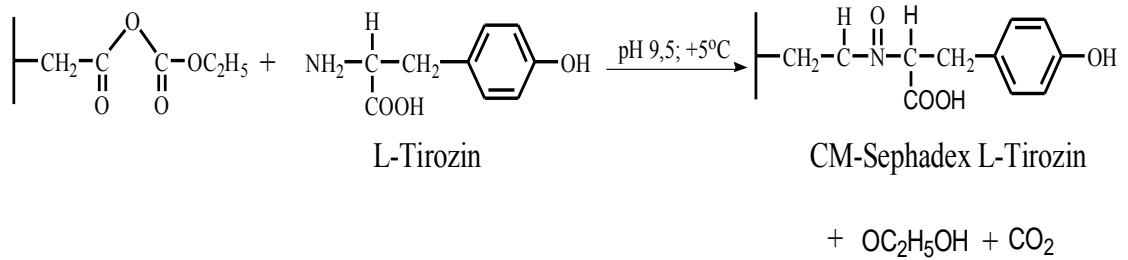
rpm'de 60 dakika santrifüj yapıldı. Çökelek kısmı (membranlar) alınarak 5mL 0,1 M, pH=7,4 Na-fosfat tamponu içinde süspanse edildi ve %1 Triton X-100 ilave edildi. 4°C'de, 100.000 xg'de 60 dk santrifüjden sonra üst kısımdaki süpernatant sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınıp çökelek kısmı atıldı.

Afinite kromatografisi

3.2.3.b. Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra takrine tirozin kenetlendirildi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, takrin ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Takrin, AChE spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

3.2.3.c. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması



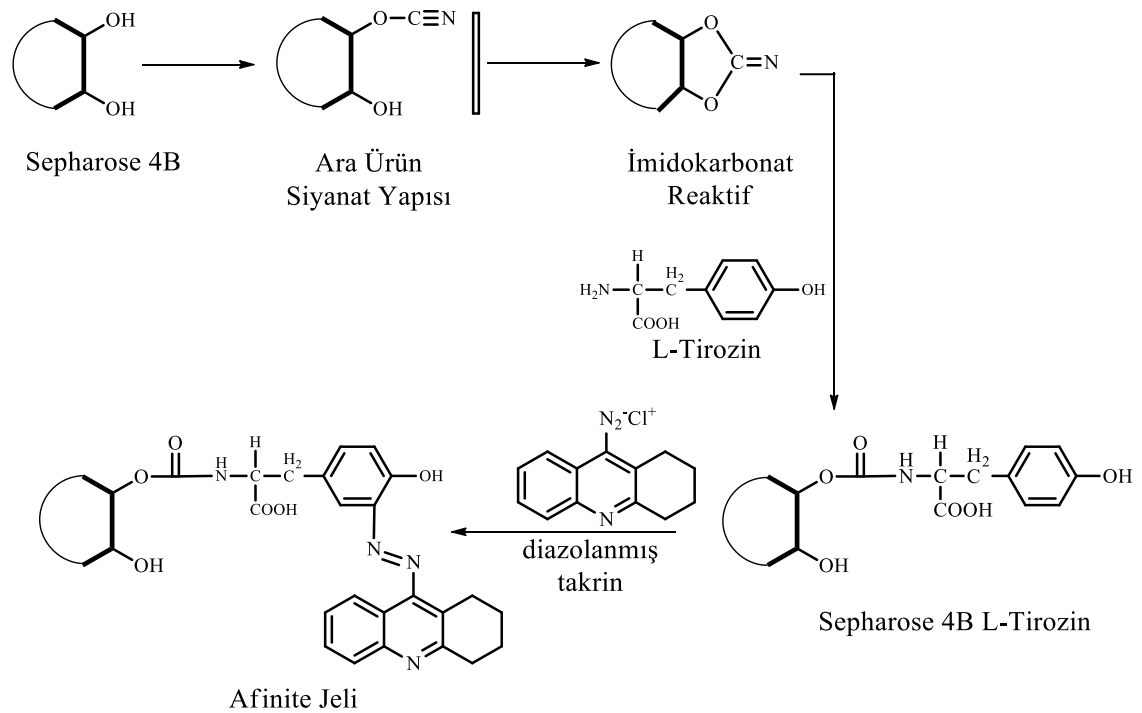
Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra süspansiyon,

4°C’de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbanı vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml’si içine alındı.

3.2.3.d. Takrin kenetlendirilmesi

25 mg takrin, 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C’deki 5 ml çözelti, takrin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan takrin 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH= 9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı. Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Sepharose 4B-Takrin kenetlendirilmesi

3.2.3.e. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Na_2HPO_4 pH=7,4) içine alınarak jel süspansiyonu olarak ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspansiyonu edilmiş jel, 1×10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.2.3.f. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanan homojenat kolona tatbik edildi ve kolon 0,1 M Na-fosfat (pH=7,4) çözeltisi ile yıkandı. Böylece AChE enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 200 mM NaCl/10 mM Na_2HPO_4 (pH=7,4) tamponu tatbik edilerek AChE enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5 ml halinde ependorflara alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı.

3.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 4,4 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %10'luk SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED, 3,13 ml saf su ve 0,1 ml %10'luk PER karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,410 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,400 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,030 ml %10'luk SDS, 0,030 ml %5'lik TEMED, 2,450 ml saf su ve 0,1 ml %10'luk PER karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve en son ilave edilerek hemen jel hazırlandı.

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuvcu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jeli polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldıktan sonra akım 120 volta çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar, yaklaşık 1,5 saat kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Coomassie blue R-250 ile boyama için; jel shakerda 30 dakika sabitleştirme çözeltisinde çalkalandı, jel çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve shaker üzerinde en az 2 saat boyandı, daha sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Gümüş boyama için jel shaker üzerinde 30 dakika tespit çözeltisinde, 30 dakika redüksiyon çözeltisinde bekletildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika süreyle saf su ile iyice yıkandı. Taze hazırlanıp karanlıkta bekletilmiş gümüş nitrat çözeltisiyle 20 dakika çalkalayıcının üzerinde boyandı ve son olarak yıkama 1 çözeltisi ile bantlar belirginleşinceye kadar karıştırıldı. Siyahlaşan sıvı döküldü ve jel yıkama 2 çözeltisine alındı.

3.4. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzimiyle ilgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.4.1. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

İnsan eritrosit AChE enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 5,5-6,0-6,5-7,0-7,2-7,4-7,6-7,8 ve 8 olan potasyum fosfat ve 7,2-7,4-7,6-7,8-8,0-8,5 ve 8,9 olan Tris-HCl tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi.

3.4.2. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik çalışmalar

İnsan eritrosit AChE enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla 1500 mM ile 50 mM arasındaki potasyum fosfat (pH=7,6) tamponu kullanılarak belirlendi.

3.4.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum sıcaklığın bulunmasına yönelik çalışmalar

İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enzimini optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 0-80°C arasında 10'ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı.

3.4.4. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için stabil pH'nın bulunmasına yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 6,0-6,5-7,0-7,4 ve 8,0 olan potasyum fosfat ve pH'ları 7,2-7,4-8,0-8,5 ve 8,9 olan Tris-HCl tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 ml'si 1 ml enzim çözeltisiyle karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 9 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi.

3.4.5. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolin iyodat (AChI) ve DTNB substratlarının K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek için sabit asetiltiyokolin iyodat konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak DTNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

Aynı şekilde DTNB'nin sabit konsantrasyonunda (AChI)'in 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve (AChI) için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi.

3.5. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin IC50 ve Ki Değerlerinin Bulunması

İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolin iyodat (AChI) substratına bağlı olarak, IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: optimum sıcaklık ve optimum pH'da, doygun olmayan asetiltiyokolin iyodat konsantrasyonunda enzim aktivitesi üzerine bazı maddelerin etkilerini belirlemek amacıyla en az 5 farklı konsantrasyonda madde kuvvet ortamına katılarak aktivite değerleri okundu. Kullanılan maddenin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Bu maddelerden

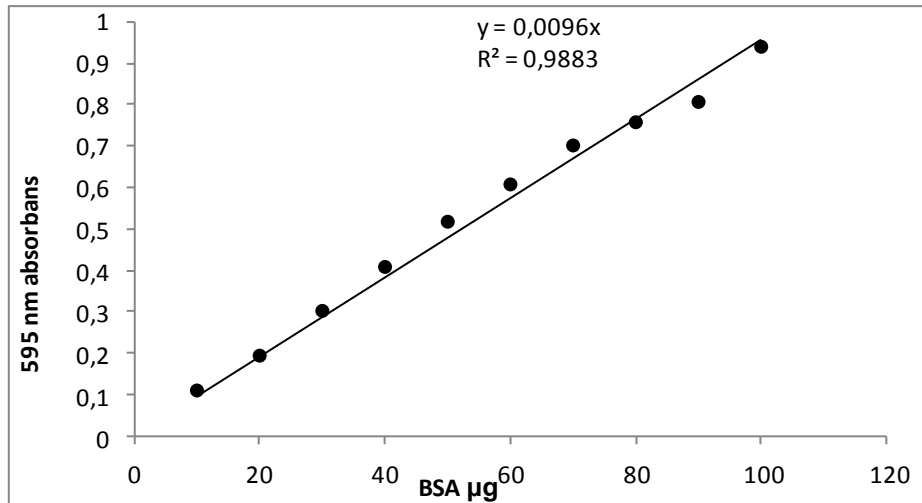
inhibisyon etkisi gösterenler için % aktivite-[I] grafikleri çizildi. Eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı.

Bu ilaçların K_i değerlerini ve inhibisyon tiplerini belirlemek amacıyla asetilkolinesteraz enziminin aktivitesini yarıya düşüren madde konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit madde konsantrasyonu olmak üzere 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda optimal şartlarda uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_{M(I)}=K_M(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $V_{max(I)}=V_{max}/(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Kromatografik işlemler sırasında saflaştırdığımız AChE enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerinin protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

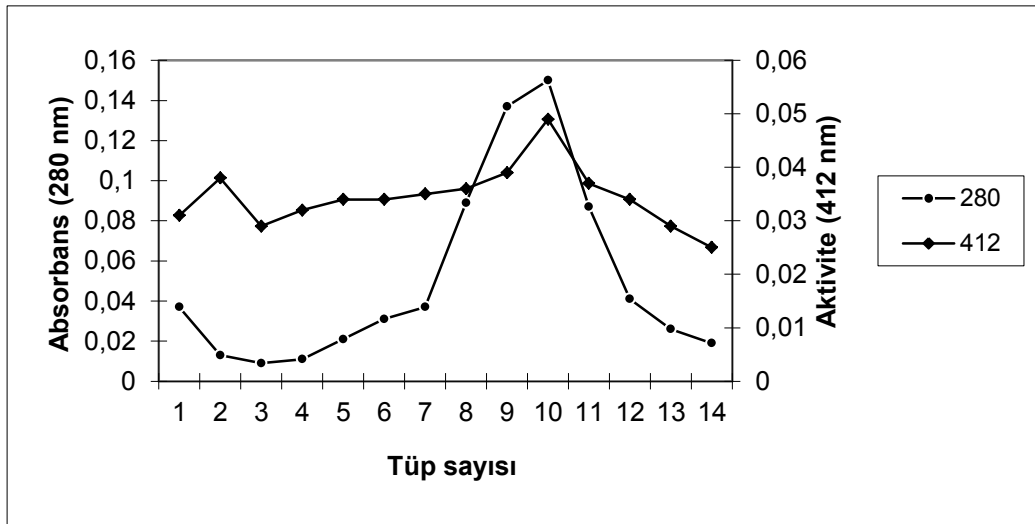
4.2. AChE Enziminin Saflaştırma Basamakları Sonuçları

4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları

Bölüm 3.2.3.b, 3.2.3.c, 3.2.3.d ve 3.2.3.e’de anlatıldığı şekilde hazırlanan dengelenmiş kolona, alınan 40 ml kandan ayrılan 5 ml hemolizat pipet vasıtasıyla tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar

kolon akış hızı 60 ml/saat'e ayarlanarak fraksiyonlar 1,5 ml halinde ependorflara alındı. Her bir elüatın önce 280 nm'de protein tayinleri yapıldı. Daha sonra tüplerde 412 nm'de AChE aktivitesi bakılarak grafikleri Şekil 4.2'de verildi.

Asetilkolinesterazın saflaştırılma kademelerinde Ellman metoduyla 412 nm de aktivite tayini ve Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.2. AChE enziminin Takrin kolonundan afinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen elüatların 280 nm'de absorbans ve 412 nm'de aktivite değerleri.

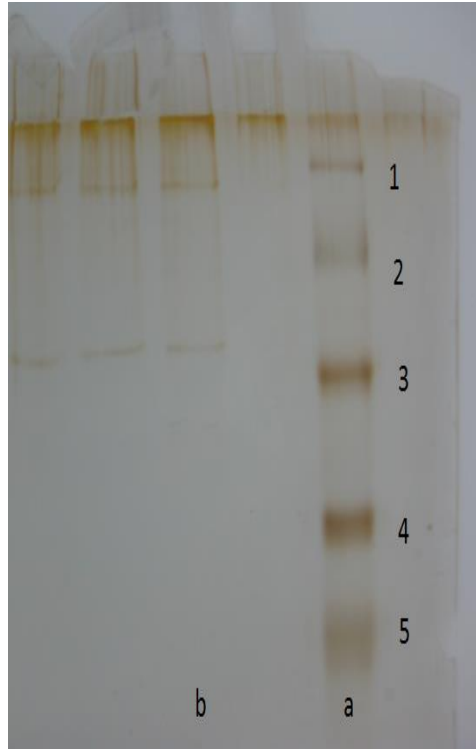
Hazırlanan afinite kolonundan elde edilen enzim için saflaştırma basamakları belirlendi. Bu amaçla hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1. İnsan eritrosit AChE enziminin saflaştırma basamakları

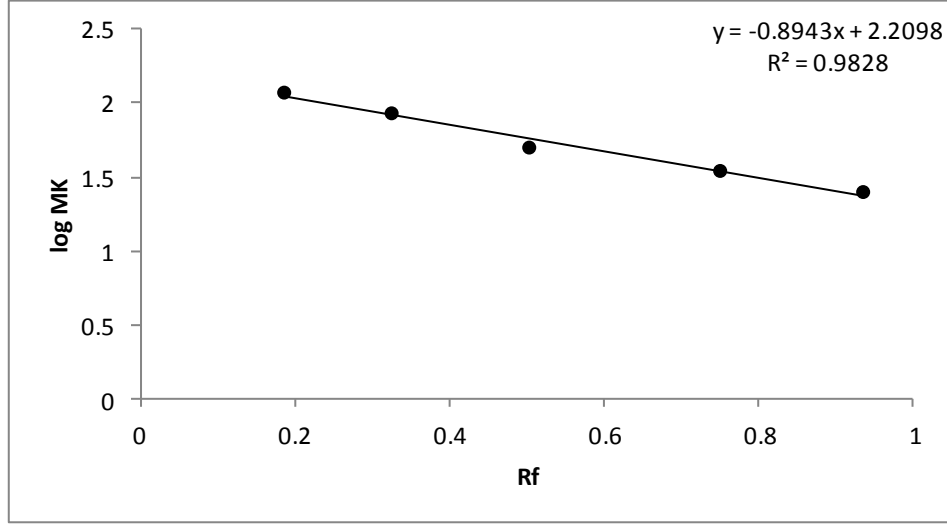
	Total Hacim	Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/mL)	Total Protein Miktarı (mg)	Total Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	5	0,12	8,2	41	0,6	0,0146	100	1,00
Afinite kromatografisi	3	0,047	0,0051	0,0153	0,141	9,22	23,5	658

4.2.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Afinite kromatografisi sonucu insan eritrositinden saflaştırılan asetilkolinesteraz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için Bölüm 3.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-PAGE elektroforezine enzim numuneleri yerleştirildi. Sonuçta insan eritrosit AChE enziminin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE gümüş boyama yöntemiyle Şekil 4.3'te 70kDa olarak bulundu.



Şekil 4.3. İnsan eritrosit AChE enziminin SDS-PAGE fotoğrafı
a) Standartlar;1.(120kDa) 2. (85kDa) 3.(50kDa) 4. (35kDa) 5.(25kDa)
b) Afinite sonrası insan eritrosit AChE enzimi

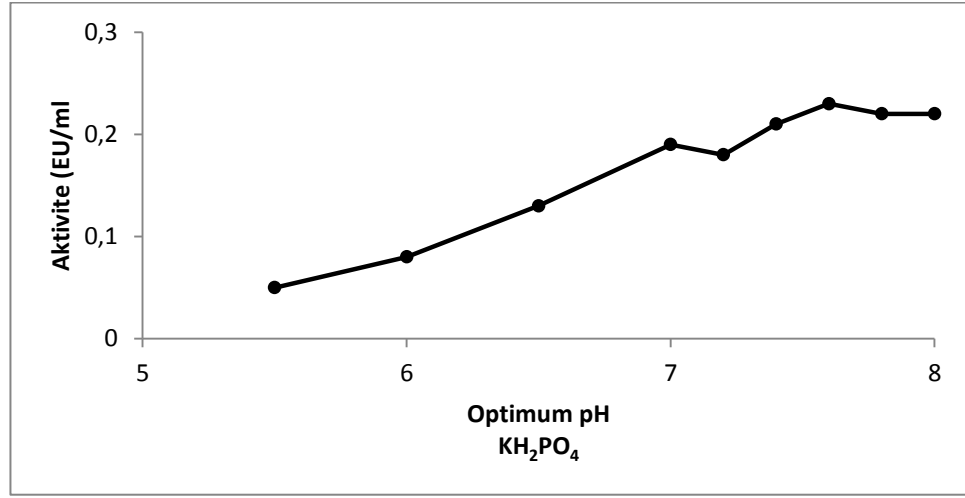


Şekil 4.4. log MK-R_F grafiği

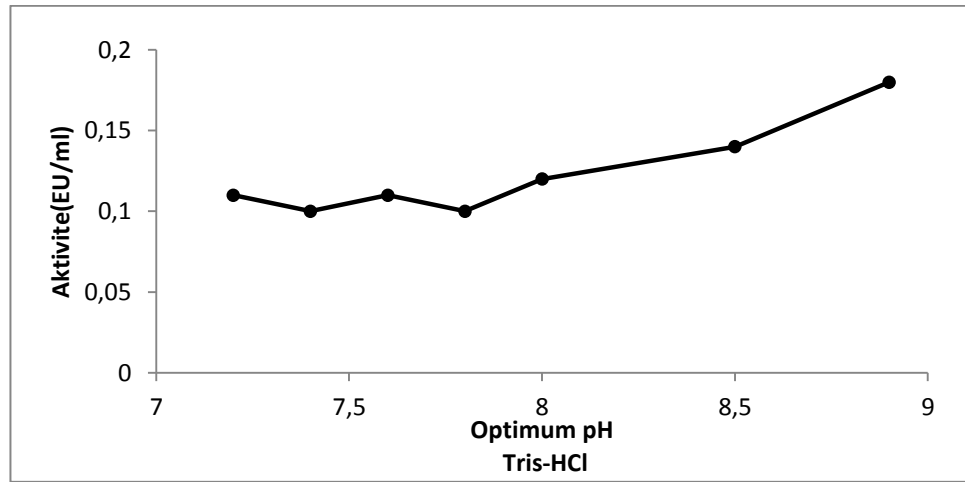
4.3. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan AChE Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

4.3.1. Optimum pH'nın belirlenmesine yönelik sonuçlar

İnsan eritrosit AChE enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 5,5-8,0 aralığında 100 mM potasyum fosfat, 7,2- 8,9 aralığında 100mM Tris-HCl ve 8,6-10,6 aralığında 100 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil.4.5-4.6). İnsan eritrosit AChE enzimi için optimum pH 100 mM potasyum fosfat pH=7,6 tamponu olarak belirlendi. Ayrıca enzim aktivite çözeltilerinin Glisin-NaOH tamponunda enzimsiz aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.5. Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

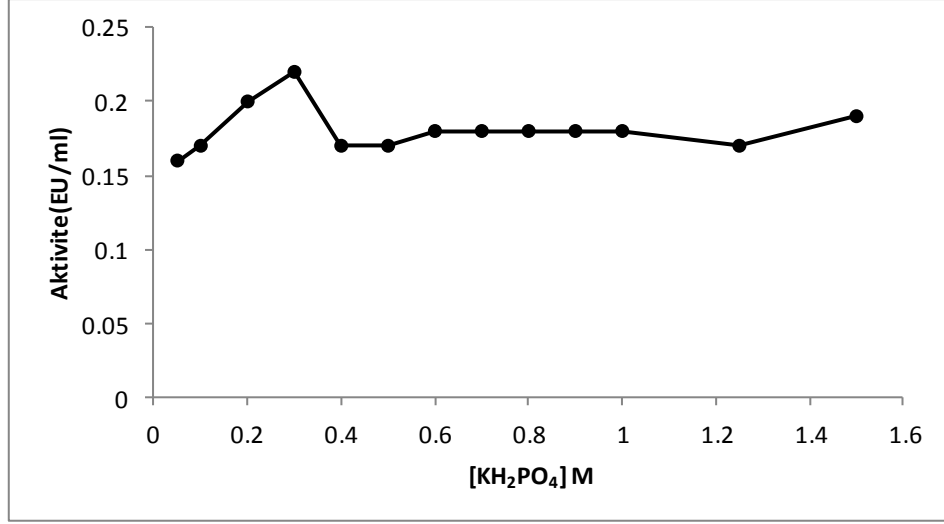


Şekil 4.6. Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

4.3.2. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum iyonik şiddetin bulunmasına yönelik sonuçlar

İnsan eritrosit AChE enziminin aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla optimal pH'da değişik konsantrasyonlarda potasyum fosfat (pH=7,6) tamponu Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı konsantrasyonlardaki tamponlarda aktivite ölçümleri yapıldı. Konsantrasyona karşı aktivite grafiği çizildi. Yapılan

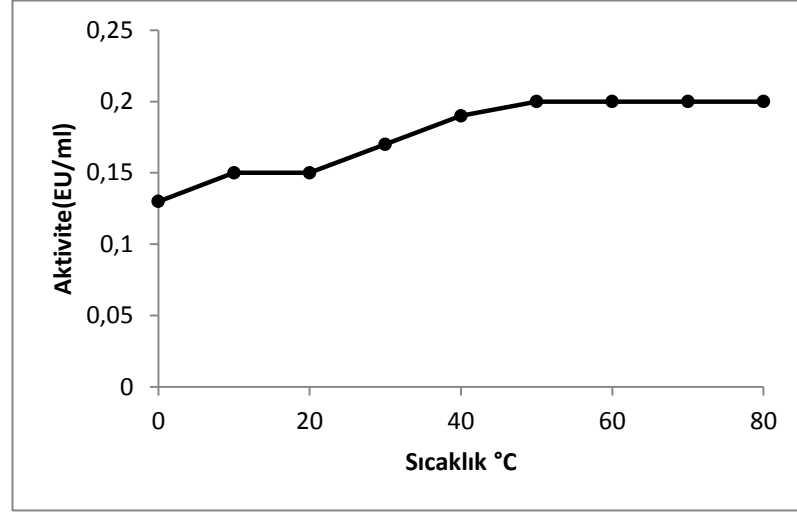
çalışmalar sonucu insan eritrosit AChE enzimi için en uygun iyonik şiddet 300 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7,6) olarak tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Değişik konsantrasyonlardaki K₂HPO₄ tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için yapılan iyonik şiddet aktivite ölçüm sonuçları grafiği

4.3.3. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar

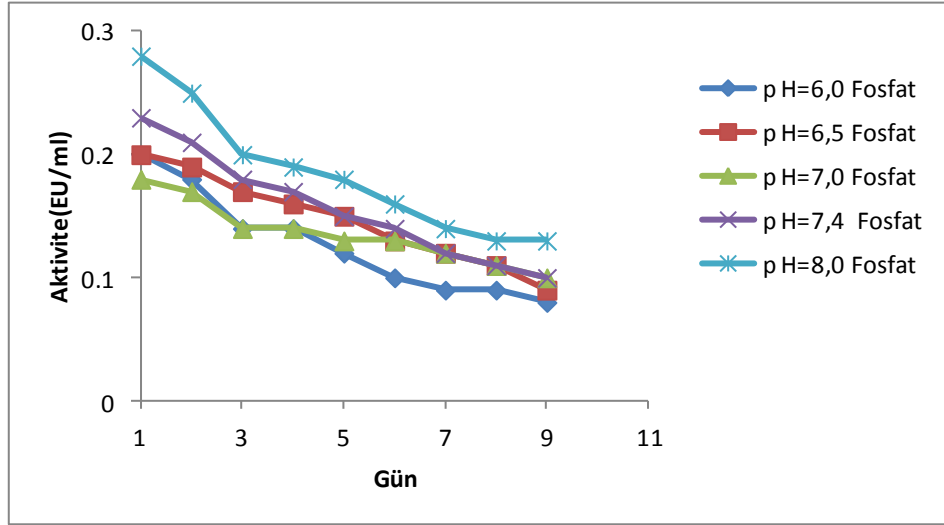
İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip 300 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7,6) kullanılarak Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen eğri Şekil 4.8'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucunda enzim aktivitesinin sıcaklık artışıyla arttığı tespit edildi. Ancak en yüksek aktivite artışı 50°C'de gözlemlendi.



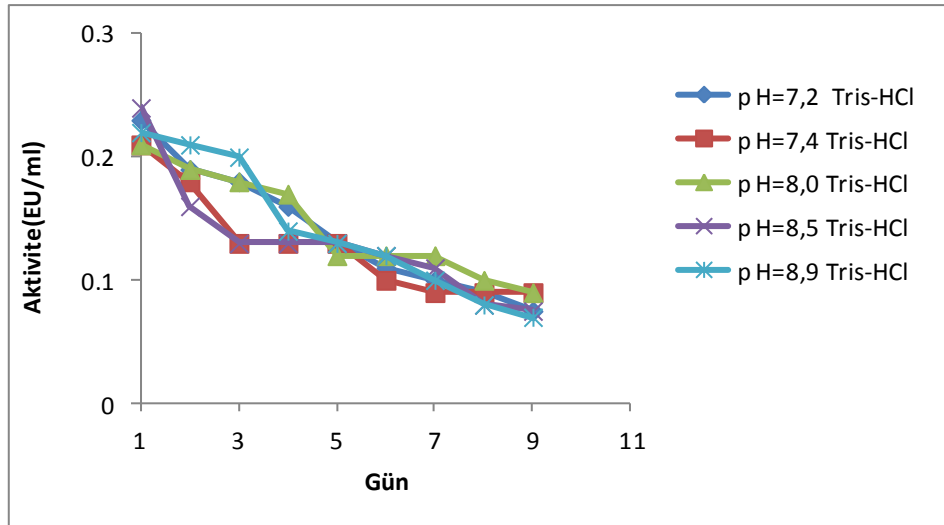
Şekil 4.8. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla çizilen sıcaklık-aktivite grafiği

4.3.4. İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi için stabil pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 6,0-8,0 aralığında potasyum fosfat ve 7,2-8,9 aralığında Tris-HCl tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'larda tampon çözeltilerinin 2 ml'si 1 ml enzim çözeltisiyle karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. Bölüm 3.4.4'te anlatıldığı gibi 9 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin 10 mM pH=8,0 fosfat tamponunda stabil olduğu belirlendi (Şekil 4.9-4.10).



Şekil 4.9. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

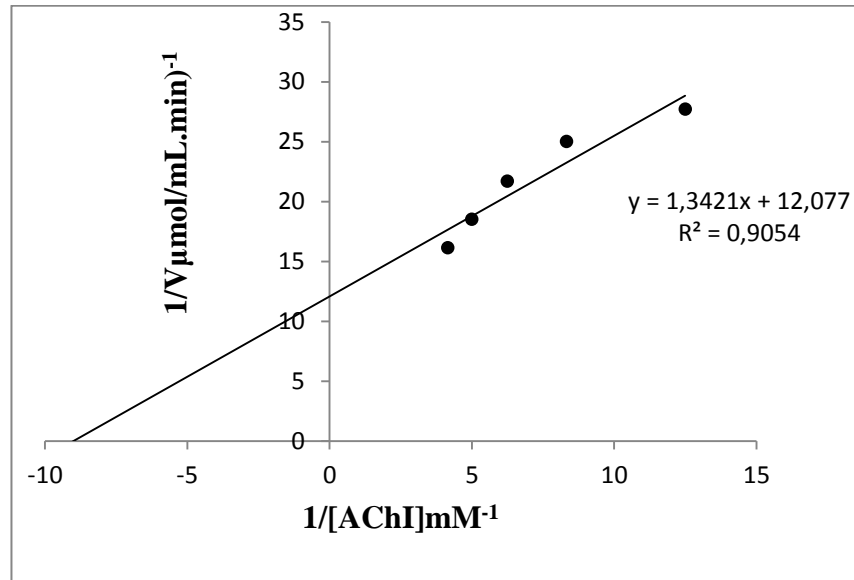


Şekil 4.10. Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin stabil pH'sı için yapılan aktivite ölçüm grafiği

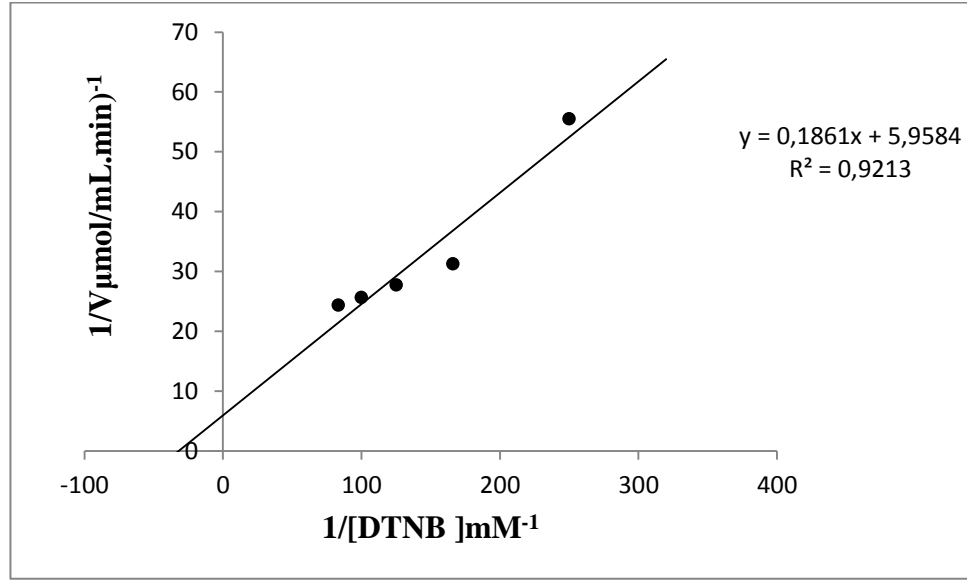
4.3.5. İnsan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı şekilde insan eritrosit asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolin iyodat (AChI) ve 5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) substratları

için K_m ve V_{MAX} değerlerini belirleyebilmek için substratlardan birinin sabit konsantrasyonu için diğer substratın değişik konsantrasyonları kullanıldı. Bu amaçla, sabit asetiltiyokolin iyodat konsantrasyonunda DTNB'nin 5 farklı konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak DTNB için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde DTNB'nin sabit konsantrasyonunda AChI'nin 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve AChI için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. DTNB substratı için $K_M=0,031$ ve $V_{max}=0,16$ olarak bulunurken, AChI substratı için $K_M=0,11$ ve $V_{max}=0,082$ olarak bulundu (Şekil 4.11-4.12) .



Şekil 4.11. İnsan eritrosit AChE enzimi AChI substratı için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. İnsan eritrosit AChE enzimi DTNB substratı için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

4.4. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Maddelerin Etkilerinin Sonuçları

İnsan eritrositinden takrin afinite kromatografisi ile saflaştırılan asetilkolinesteraz enzimi için Bölüm 3.1.3'te anlatıldığı gibi bazı maddelerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan eritrositlerinden saflaştırılan AChE enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Bu bileşiklerden bazıları enzimi aktive ederken, bazıları inhibe etti, bazıları ise etki etmedi. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon ve aktivasyon etkileri çizelgeler halinde verildi. Ayrıca aktivite %-konsantrasyon grafikleri oluşturuldu.

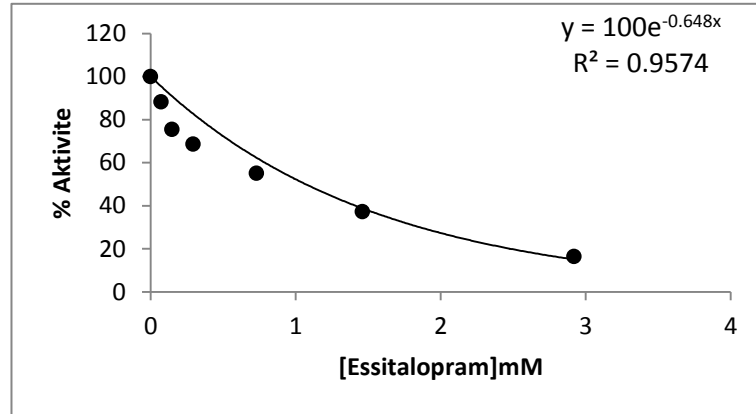
4.5. İnsan Eritrositinden Saflaştırılan Asetilkolinesteraz Enzimini İnhibe Eden Bazı Kimyasal Maddeler İçin Ki Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan asetilkolinesteraz enzimi inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra

kullanılan kimyasal maddeler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V-1/S$ değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı. İnsan eritrositinden saflaştırılan asetilkolinesteraz enzimi için elde edilen sonuçlar çizelge ve şekillerde gösterildi.

Çizelge 4.2. Essitalopram etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

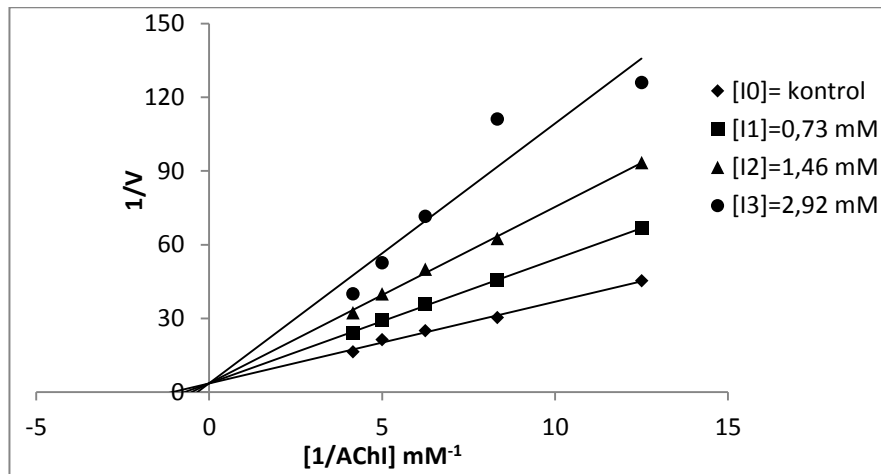
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100,0
0,07	88,18
0,15	75,45
0,29	68,63
0,73	55,00
1,46	37,27
2,92	16,36



Şekil 4.13. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine essitalopram etken maddesinin aktivite % -[essitalopram] grafiği

Çizelge 4.3. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla Essitalopram inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

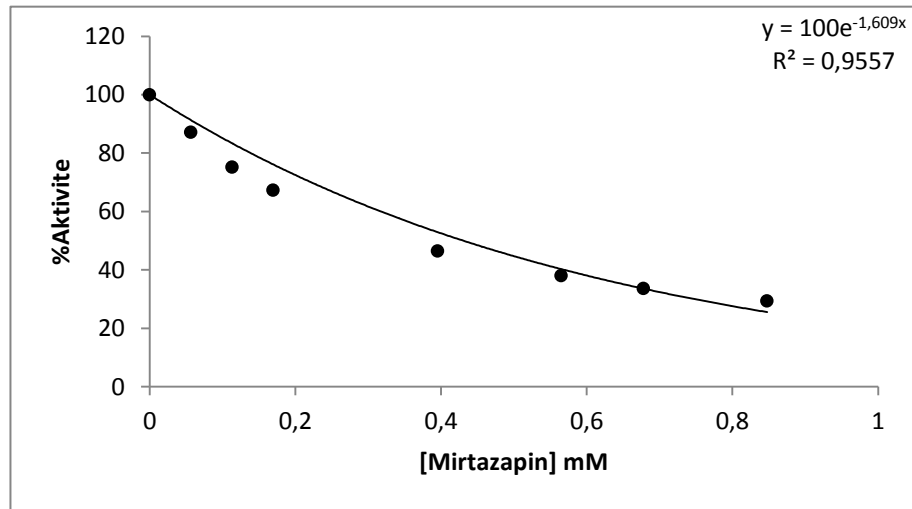
İnhibitör	Kör					Sistem						1/V ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	1/S mM^{-1}
	Su(μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	D ^{TNB} (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	D ^{TNB} (μl)		
[I] ₁	795	100	50	5	50	8	787	100	5	50	50	66,66	12,5
	795	100	50	5	50	12	783	100	5	50	50	45,45	8,33
	795	100	50	5	50	16	776	100	5	50	50	35,71	6,25
	795	100	50	5	50	20	772	100	5	50	50	29,41	5,00
	795	100	50	5	50	24	768	100	5	50	50	23,8	4,16
[I] ₂	790	100	50	10	50	8	782	100	10	50	50	93,33	12,5
	790	100	50	10	50	12	778	100	10	50	50	62,50	8,33
	790	100	50	10	50	16	774	100	10	50	50	50,00	6,25
	790	100	50	10	50	20	770	100	10	50	50	40,00	5,00
	790	100	50	10	50	24	766	100	10	50	50	32,50	4,16
[I] ₃	750	100	50	50	50	8	742	100	50	50	50	126,0	12,5
	750	100	50	50	50	12	738	100	50	50	50	111,1	8,33
	750	100	50	50	50	16	734	100	50	50	50	71,42	6,25
	750	100	50	50	50	20	730	100	50	50	50	52,63	5,00
	750	100	50	50	50	24	726	100	50	50	50	40,00	4,16



Şekil 4.14. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokoliniyodat substratıyla essitalopram etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

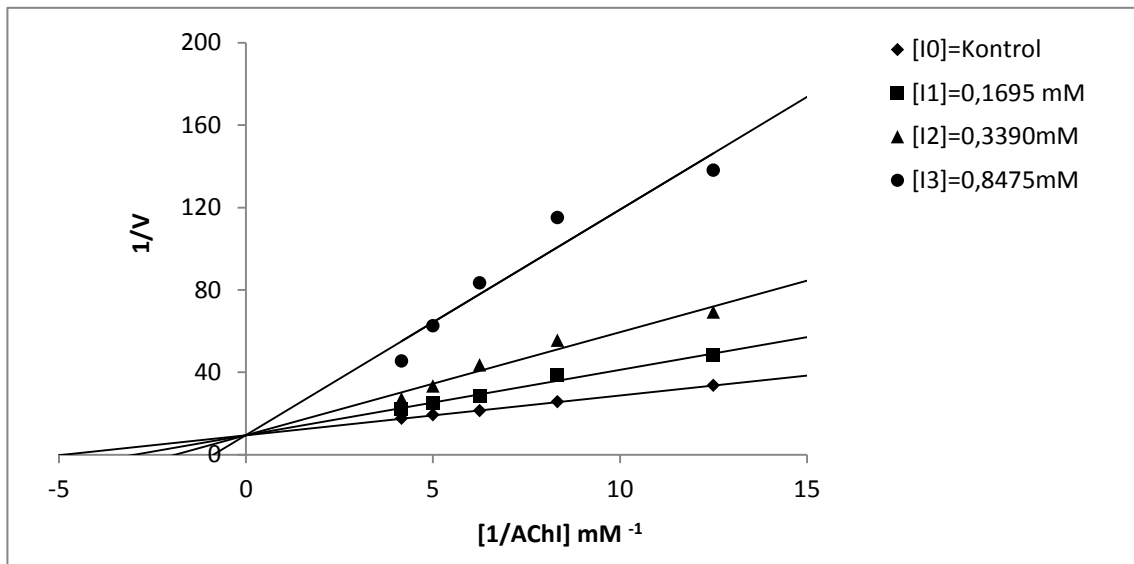
Çizelge 4.4. Mirtazapin etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,000	100,0
0,056	87,17
0,113	75,21
0,169	67,34
0,395	46,50
0,565	38,04
0,678	33,69
0,847	29,34

**Şekil 4.15.** İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine mirtazapin etken maddesinin aktivite % -[mirtazapin] grafiği

Çizelge 4.5. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla mirtazapin inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

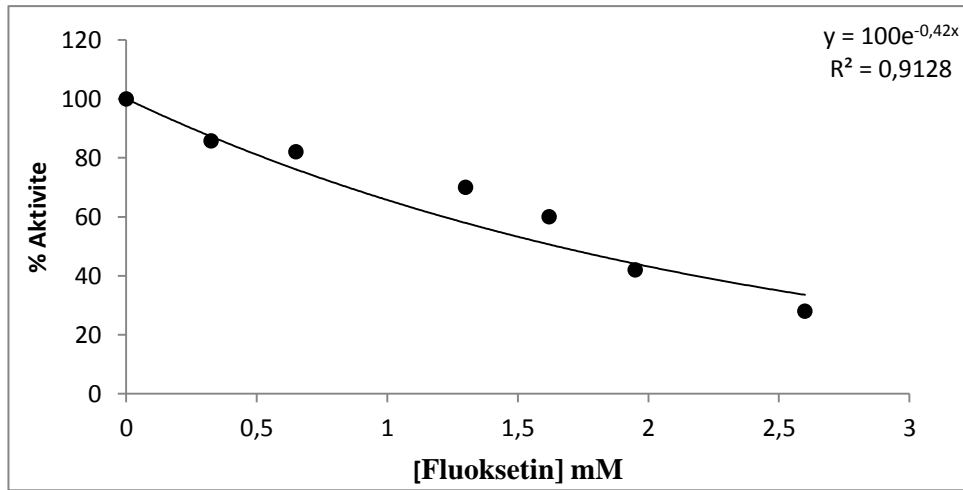
İnhibitör	Kör					Sistem					$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}	
	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör (μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)			DTNB (μl)
[I] ₁	770	100	50	30	50	8	762	100	30	50	50	48,06	12,5
	770	100	50	30	50	12	758	100	30	50	50	38,46	8,33
	770	100	50	30	50	16	754	100	30	50	50	28,57	6,25
	770	100	50	30	50	20	750	100	30	50	50	25,00	5,00
	770	100	50	30	50	24	746	100	30	50	50	22,20	4,16
[I] ₂	760	100	50	40	50	8	752	100	40	50	50	69,19	12,5
	760	100	50	40	50	12	748	100	40	50	50	55,50	8,33
	760	100	50	40	50	16	744	100	40	50	50	43,47	6,25
	760	100	50	40	50	20	740	100	40	50	50	33,30	5,00
	760	100	50	40	50	24	736	100	40	50	50	27,02	4,16
[I] ₃	650	100	50	150	50	8	642	100	150	50	50	138,0	12,5
	650	100	50	150	50	12	638	100	150	50	50	115,0	8,33
	650	100	50	150	50	16	634	100	150	50	50	83,30	6,25
	650	100	50	150	50	20	630	100	150	50	50	62,50	5,00
	650	100	50	150	50	24	626	100	150	50	50	45,45	4,16



Şekil 4.16. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla mirtazapin etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.6. Fluoksetin etken madesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

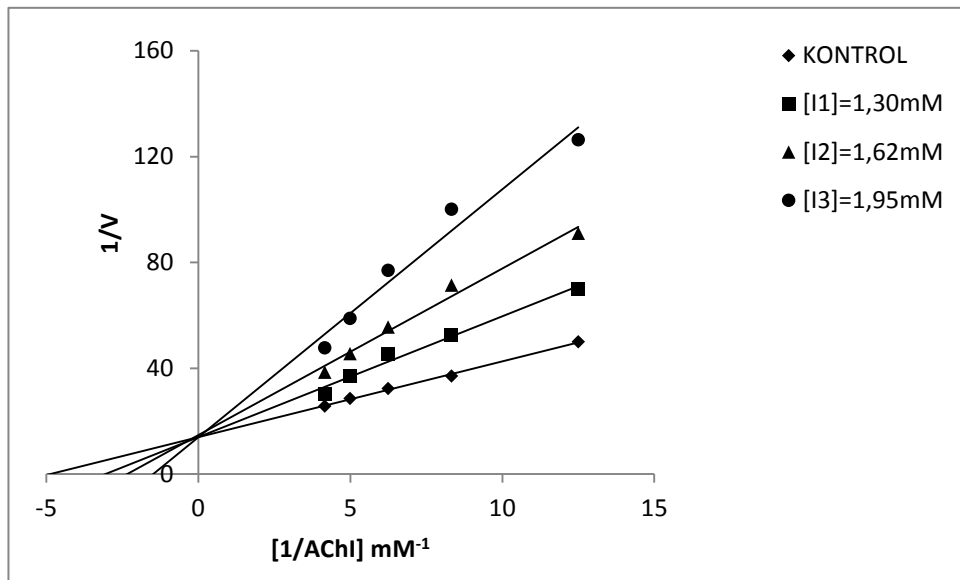
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100
0,32	85
0,65	82
1,30	70
1,62	60
1,95	42
2,60	28



Şekil 4.17. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine fluoksetin etken madesinin aktivite % -[fluoksetin] grafiği

Çizelge 4.7. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla fluoksetin inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

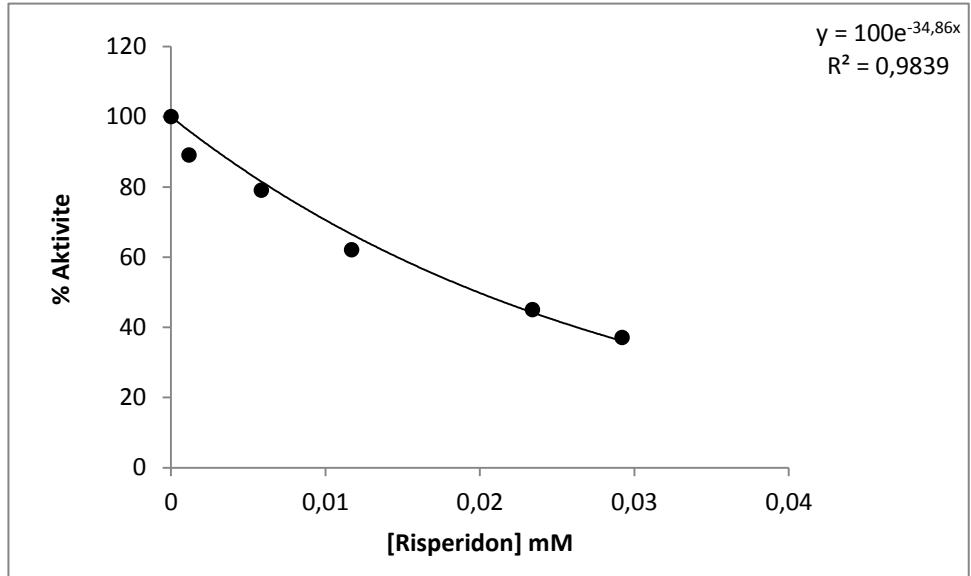
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	700	100	50	100	50	8	692	100	100	50	50	70,00	12,5
	700	100	50	100	50	12	688	100	100	50	50	52,63	8,33
	700	100	50	100	50	16	684	100	100	50	50	45,45	6,25
	700	100	50	100	50	20	680	100	100	50	50	37,00	5,00
	700	100	50	100	50	24	676	100	100	50	50	30,30	4,16
[I] ₂	675	100	50	125	50	8	667	100	125	50	50	91,00	12,5
	675	100	50	125	50	12	663	100	125	50	50	71,42	8,33
	675	100	50	125	50	16	658	100	125	50	50	55,5	6,25
	675	100	50	125	50	20	654	100	125	50	50	45,45	5,00
	675	100	50	125	50	24	650	100	125	50	50	38,46	4,16
[I] ₃	650	100	50	150	50	8	642	100	150	50	50	126,3	12,5
	650	100	50	150	50	12	638	100	150	50	50	100,0	8,33
	650	100	50	150	50	16	634	100	150	50	50	76,9	6,25
	650	100	50	150	50	20	630	100	150	50	50	58,8	5,00
	650	100	50	150	50	24	626	100	150	50	50	47,6	4,16



Şekil 4.18. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla fluoksetin etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

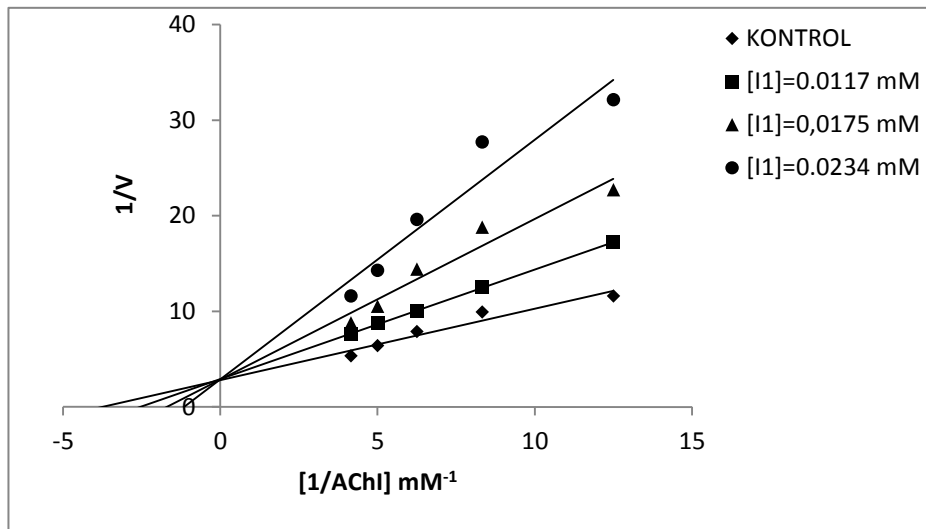
Çizelge 4.8. Risperidon etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon(μ M)	Aktivite %
0,0000	100
0,00117	89
0,00585	79
0,01170	62
0,02340	45
0,02950	37

**Şekil 4.19.** İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine risperidon etken maddesinin aktivite % -[risperidon] grafiği

Çizelge 4.9. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla risperidon inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

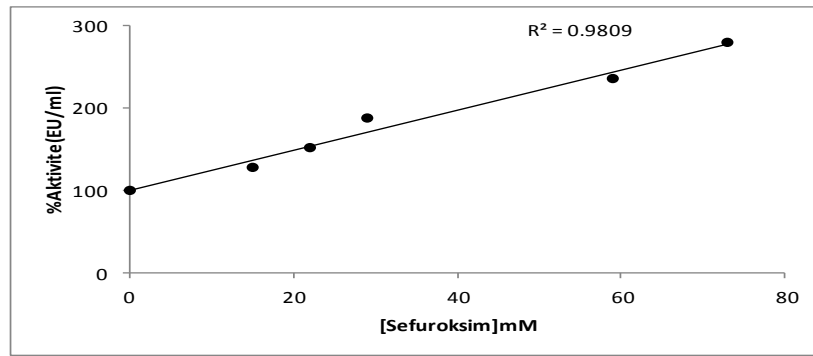
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	790	100	10	100	50	8	782	100	100	10	50	17,2	12,5
	790	100	10	100	50	12	778	100	100	10	50	12,5	8,33
	790	100	10	100	50	16	774	100	100	10	50	10,0	6,25
	790	100	10	100	50	20	770	100	100	10	50	8,77	5,00
	790	100	10	100	50	24	766	100	100	10	50	7,57	4,16
[I] ₂	740	100	10	150	50	8	732	100	150	10	50	22,7	12,5
	740	100	10	150	50	12	728	100	150	10	50	18,8	8,33
	740	100	10	150	50	16	724	100	150	10	50	14,4	6,25
	740	100	10	150	50	20	720	100	150	10	50	10,5	5,00
	740	100	10	150	50	24	716	100	150	10	50	8,77	4,16
[I] ₃	690	100	10	200	50	8	682	100	200	10	50	32,1	12,5
	690	100	10	200	50	12	678	100	200	10	50	27,7	8,33
	690	100	10	200	50	16	674	100	200	10	50	19,6	6,25
	690	100	10	200	50	20	670	100	200	10	50	14,28	5,00
	690	100	10	200	50	24	666	100	200	10	50	11,6	4,16



Şekil 4.20. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla risperidon etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.10. Sefuroksim etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

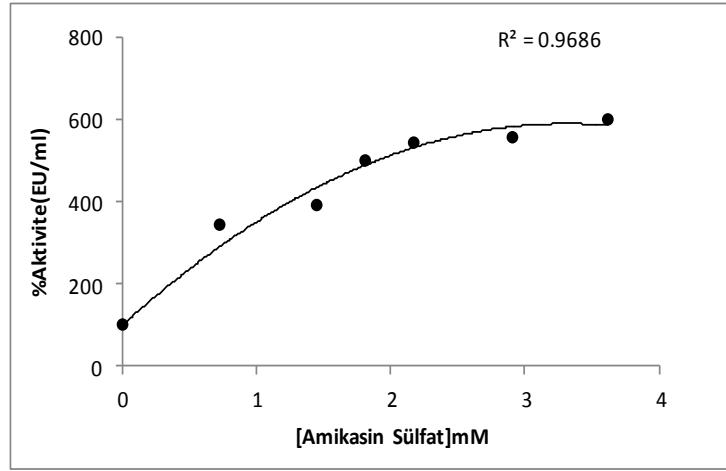
Konsantrasyon.(mM)	% aktivite
0	100
15	108
22	152
29	188
59	236
73	280



Şekil 4.21. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine sefuroksim etken maddesinin aktivite %-[sefuroksim] grafiği

Çizelge 4.11. Amikasin sülfat etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

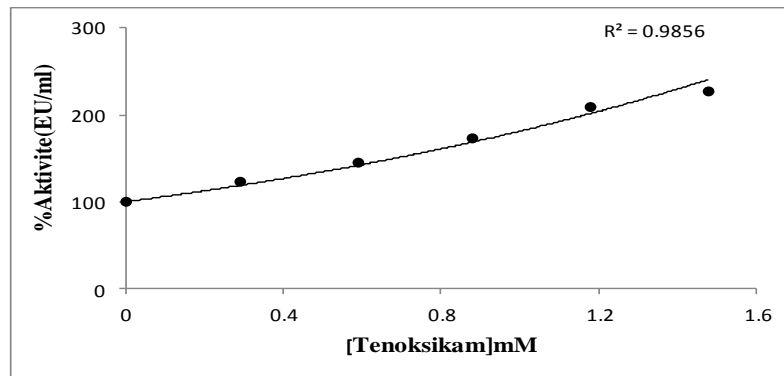
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100,00
0,73	343,75
1,45	393,75
1,81	500,00
2,17	543,75
2,91	556,25
3,62	600,00



Şekil 4.22. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine amikasin sülfat etken maddesinin aktivite % -[amikasin sülfat] grafiği

Çizelge 4.12. Tenoksikam etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

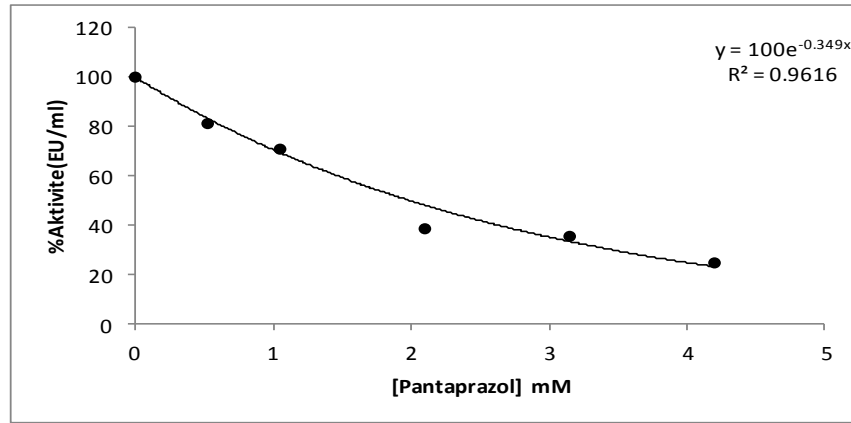
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100
0,29	123
0,59	145
0,88	175
1,18	209
1,48	227



Şekil 4.23. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine tenoksikam etken maddesinin aktivite % -[tenoksikam] grafiği

Çizelge 4.13. Pantaprazol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

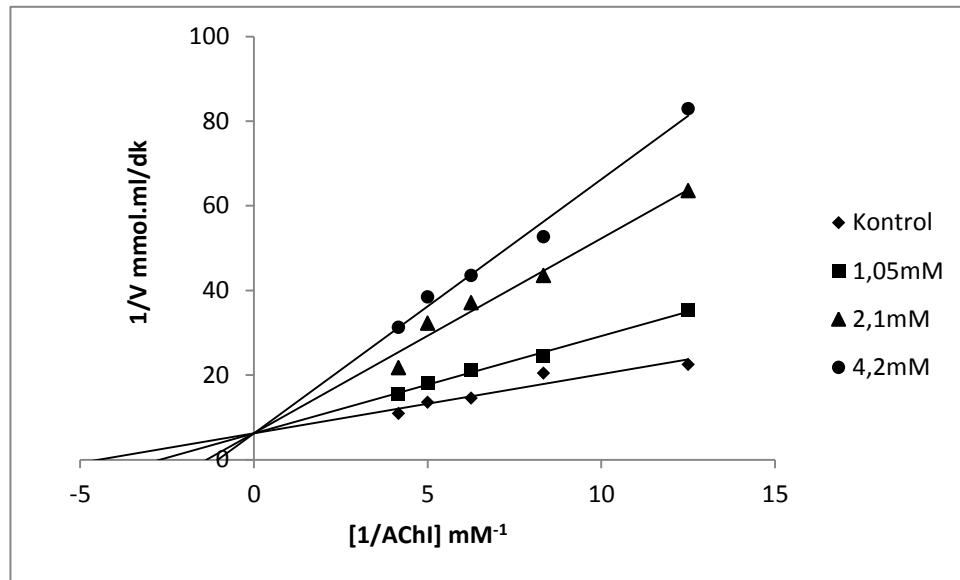
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100,0
0,53	81,15
1,05	70,76
2,10	38,46
3,15	35,38
4,20	24,61



Şekil 4.24. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine pantaprazol etken maddesinin aktivite % -[pantaprazol] grafiği

Çizelge 4.14. AChE enzimi için Asetiltiyokolün iyodat substratıyla Pantaprazol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

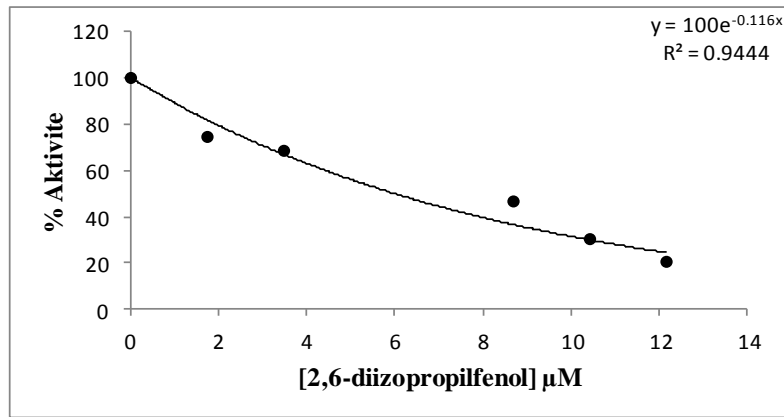
İnhibitör	Kör					Sistem						1/V ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
	Su(μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
	750	100	50	50	50	8	742	100	50	50	50	35,25	12,5
	750	100	50	50	50	12	738	100	50	50	50	24,39	8,33
[I] ₁	750	100	50	50	50	16	734	100	50	50	50	21,27	6,25
	750	100	50	50	50	20	730	100	50	50	50	18,18	5,00
	750	100	50	50	50	24	726	100	50	50	50	15,38	4,16
	700	100	50	100	50	8	692	100	100	50	50	63,53	12,5
	700	100	50	100	50	12	688	100	100	50	50	43,47	8,33
[I] ₂	700	100	50	100	50	16	684	100	100	50	50	37,03	6,25
	700	100	50	100	50	20	680	100	100	50	50	32,25	5,00
	700	100	50	100	50	24	676	100	100	50	50	21,74	4,16
	600	100	50	200	50	8	592	100	200	50	50	82,94	12,5
	600	100	50	200	50	12	588	100	200	50	50	52,63	8,33
[I] ₃	600	100	50	200	50	16	584	100	200	50	50	43,47	6,25
	600	100	50	200	50	20	580	100	200	50	50	38,46	5,00
	600	100	50	200	50	24	576	100	200	50	50	31,25	4,16



Şekil 4.25. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolün iyodat substratıyla pantaprazol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.15. 2,6-diizopropilfenol (Propofol) etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

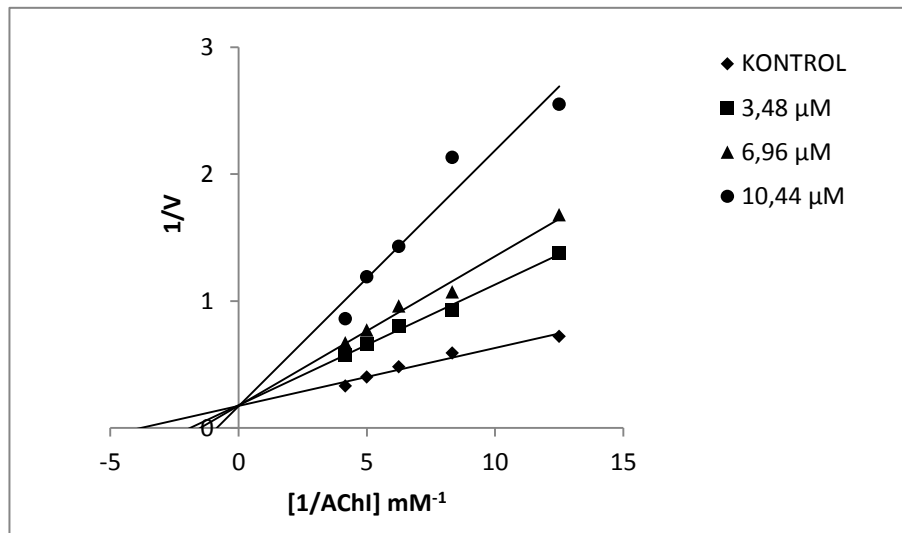
Konsantrasyon(μM)	Aktivite %
0,00	100,0
1,74	74,5
3,48	68,5
8,70	46,6
10,44	30,3
12,18	20,5



Şekil 4.26. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-diizopropilfenol(propofol) etken maddesinin aktivite %-[2,6-diizopropilfenol] grafiği

Çizelge 4.16. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-diizopropilfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

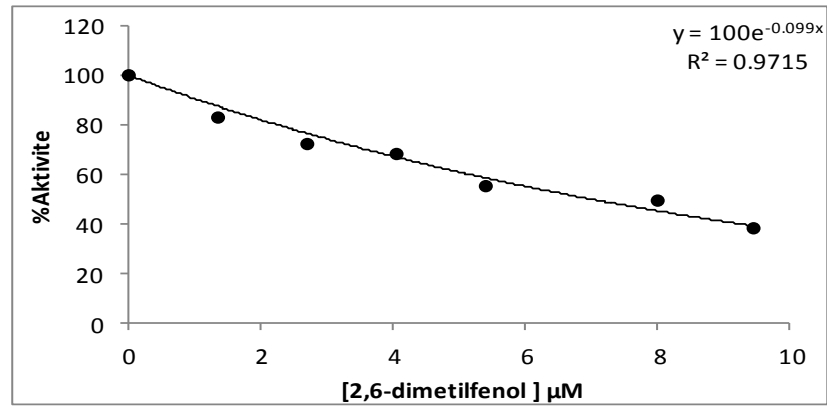
İnhibitör	Kör					Sistem							$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)			
[I] ₁	740	100	10	100	50	8	732	100	100	10	50	1,38	12,5	
	740	100	10	100	50	12	728	100	100	10	50	0,93	8,33	
	740	100	10	100	50	16	724	100	100	10	50	0,80	6,25	
	740	100	10	100	50	20	720	100	100	10	50	0,66	5,00	
	740	100	10	100	50	24	716	100	100	10	50	0,57	4,16	
[I] ₂	640	100	10	200	50	8	632	100	200	10	50	1,68	12,5	
	640	100	10	200	50	12	628	100	200	10	50	1,07	8,33	
	640	100	10	200	50	16	624	100	200	10	50	0,96	6,25	
	640	100	10	200	50	20	620	100	200	10	50	0,77	5,00	
	640	100	10	200	50	24	616	100	200	10	50	0,67	4,16	
[I] ₃	540	100	10	300	50	8	532	100	300	10	50	2,55	12,5	
	540	100	10	300	50	12	528	100	300	10	50	2,13	8,33	
	540	100	10	300	50	16	524	100	300	10	50	1,43	6,25	
	540	100	10	300	50	20	520	100	300	10	50	1,19	5,00	
	540	100	10	300	50	24	516	100	300	10	50	0,86	4,16	



Şekil 4.27. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-diizopropilfenol (propofol) etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.17. 2,6-dimetilfenol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

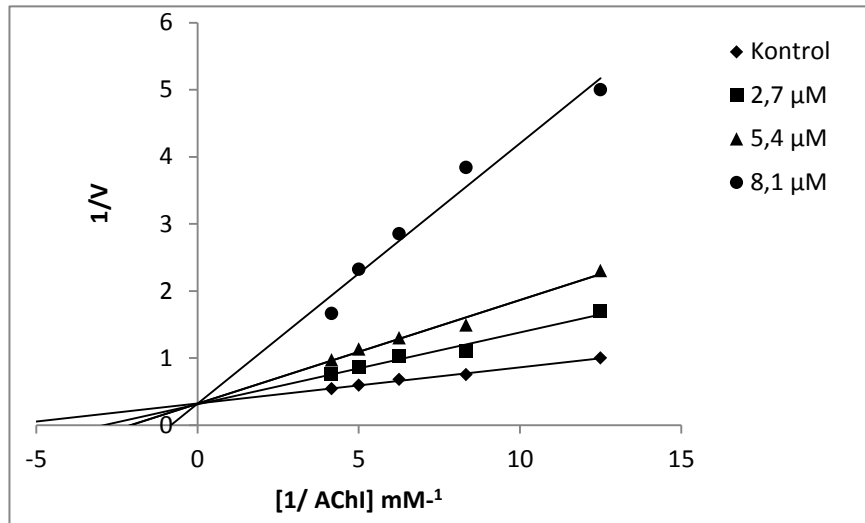
Konsantrasyon(μM)	Aktivite %
0,00	100,0
1,35	82,90
2,70	72,19
4,05	68,16
5,40	55,15
8,10	49,30
9,45	38,10



Şekil 4.28. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-dimetilfenol etken maddesinin aktivite %- [2,6-dimetilfenol] grafiği

Çizelge 4.18. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-dimetilfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

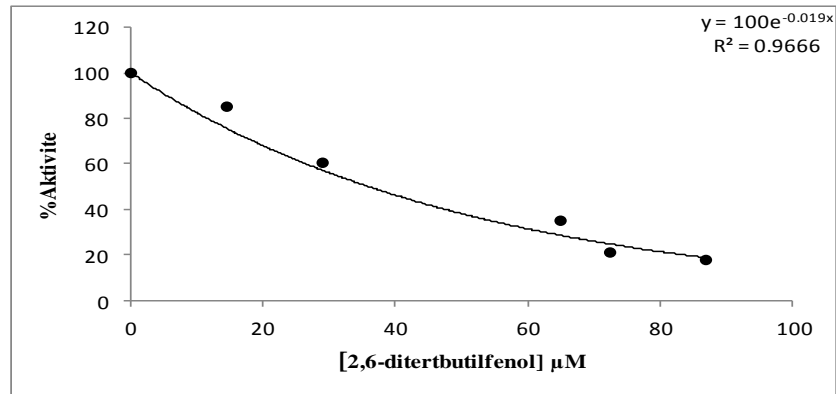
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	740	100	10	100	50	8	732	100	100	10	50	1,69	12,5
	740	100	10	100	50	12	728	100	100	10	50	1,10	8,33
	740	100	10	100	50	16	724	100	100	10	50	1,03	6,25
	740	100	10	100	50	20	720	100	100	10	50	0,86	5,00
	740	100	10	100	50	24	716	100	100	10	50	0,76	4,16
[I] ₂	640	100	10	200	50	8	632	100	200	10	50	2,30	12,5
	640	100	10	200	50	12	628	100	200	10	50	1,49	8,33
	640	100	10	200	50	16	624	100	200	10	50	1,30	6,25
	640	100	10	200	50	20	620	100	200	10	50	1,13	5,00
	640	100	10	200	50	24	616	100	200	10	50	0,97	4,16
[I] ₃	540	100	10	300	50	8	532	100	300	10	50	5,00	12,5
	540	100	10	300	50	12	528	100	300	10	50	3,84	8,33
	540	100	10	300	50	16	524	100	300	10	50	2,85	6,25
	540	100	10	300	50	20	520	100	300	10	50	2,32	5,00
	540	100	10	300	50	24	516	100	300	10	50	1,66	4,16



Şekil 4.29. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-dimetilfenol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.19. 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

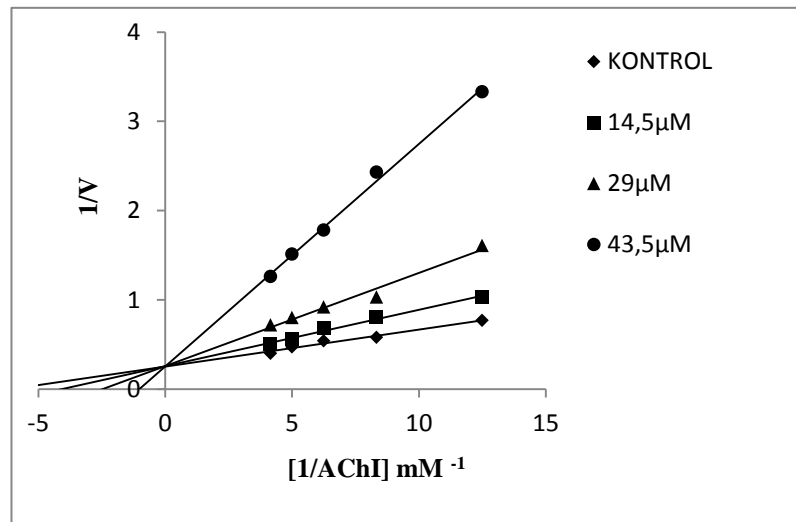
Konsantrasyon(μM)	Aktivite %
0,00	100,0
14,5	85,18
29,0	60,49
43,5	48,97
65,0	34,97
72,5	20,98
87,0	17,69



Şekil 4.30. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin aktivite % -[2,6-ditertbutilfenol] grafiği

Çizelge 4.20. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-ditertbutilfenol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

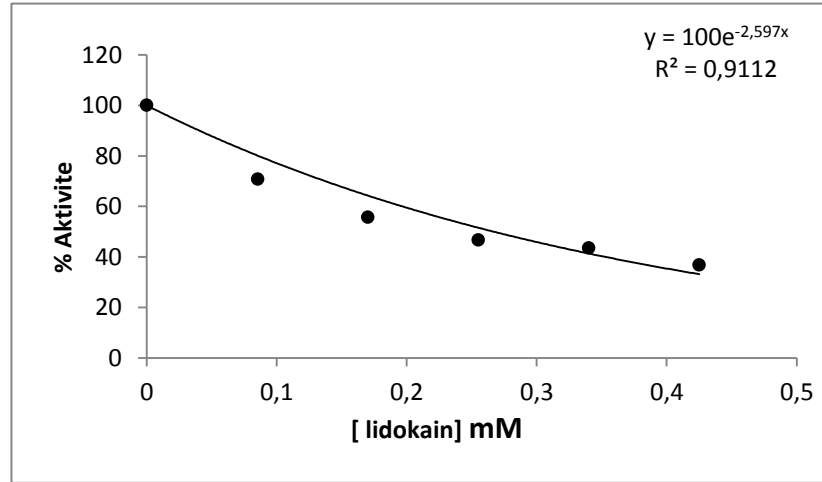
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	790	100	10	50	50	8	782	100	50	10	50	1,03	12,5
	790	100	10	50	50	12	778	100	50	10	50	0,81	8,33
	790	100	10	50	50	16	774	100	50	10	50	0,68	6,25
	790	100	10	50	50	20	770	100	50	10	50	0,56	5,00
	790	100	10	50	50	24	766	100	50	10	50	0,50	4,16
[I] ₂	740	100	10	100	50	8	732	100	100	10	50	1,61	12,5
	740	100	10	100	50	12	728	100	100	10	50	1,03	8,33
	740	100	10	100	50	16	724	100	100	10	50	0,92	6,25
	740	100	10	100	50	20	720	100	100	10	50	0,80	5,00
	740	100	10	100	50	24	716	100	100	10	50	0,72	4,16
[I] ₃	690	100	10	150	50	8	682	100	150	10	50	3,33	12,5
	690	100	10	150	50	12	678	100	150	10	50	2,43	8,33
	690	100	10	150	50	16	674	100	150	10	50	1,78	6,25
	690	100	10	150	50	20	670	100	150	10	50	1,51	5,00
	690	100	10	150	50	24	666	100	150	10	50	1,26	4,16



Şekil 4.31. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla 2,6-ditertbutilfenol etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

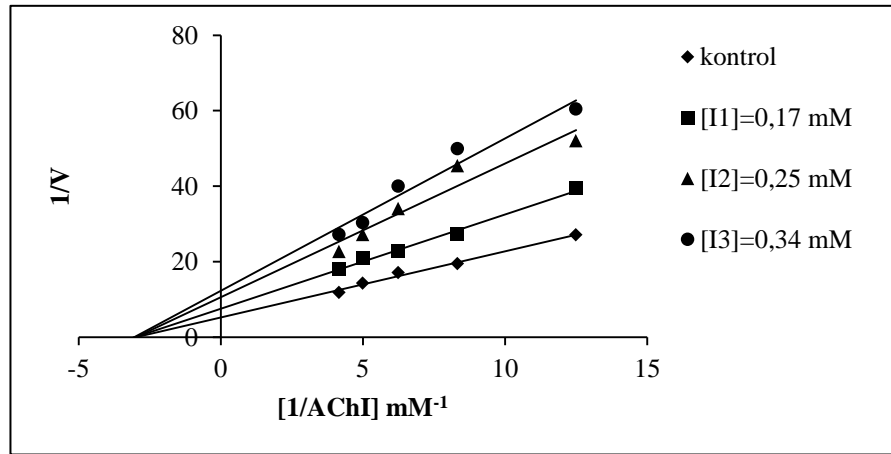
Çizelge 4.21. Lidokain etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100,0
0,08	70,82
0,17	55,62
0,25	46,72
0,34	43,44
0,42	36,76

**Şekil 4.32.** İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine lidokain etken maddesinin aktivite %-[lidokain] grafiği

Çizelge 4.22. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla lidokain inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

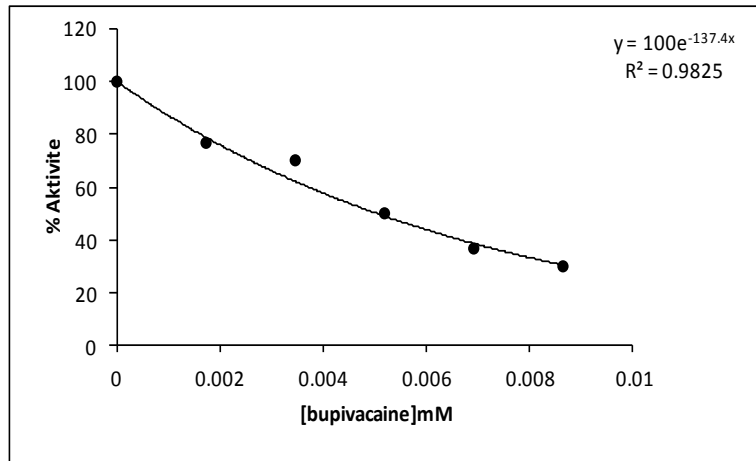
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	835	100	10	5	50	8	827	100	5	10	50	39,40	12,5
	835	100	10	5	50	12	823	100	5	10	50	27,20	8,33
	835	100	10	5	50	16	819	100	5	10	50	22,67	6,25
	835	100	10	5	50	20	815	100	5	10	50	20,92	5,00
	835	100	10	5	50	24	811	100	5	10	50	18,13	4,16
[I] ₂	825	100	10	15	50	8	817	100	15	10	50	52,00	12,5
	825	100	10	15	50	12	813	100	15	10	50	45,45	8,33
	825	100	10	15	50	16	809	100	15	10	50	34,01	6,25
	825	100	10	15	50	20	805	100	15	10	50	27,20	5,00
	825	100	10	15	50	24	801	100	15	10	50	22,67	4,16
[I] ₃	815	100	10	25	50	8	807	100	25	10	50	60,40	12,5
	815	100	10	25	50	12	803	100	25	10	50	49,92	8,33
	815	100	10	25	50	16	799	100	25	10	50	40,01	6,25
	815	100	10	25	50	20	795	100	25	10	50	30,30	5,00
	815	100	10	25	50	24	791	100	25	10	50	27,20	4,16



Şekil 4.33. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla lidokain etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.23. Bupivakain etken maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

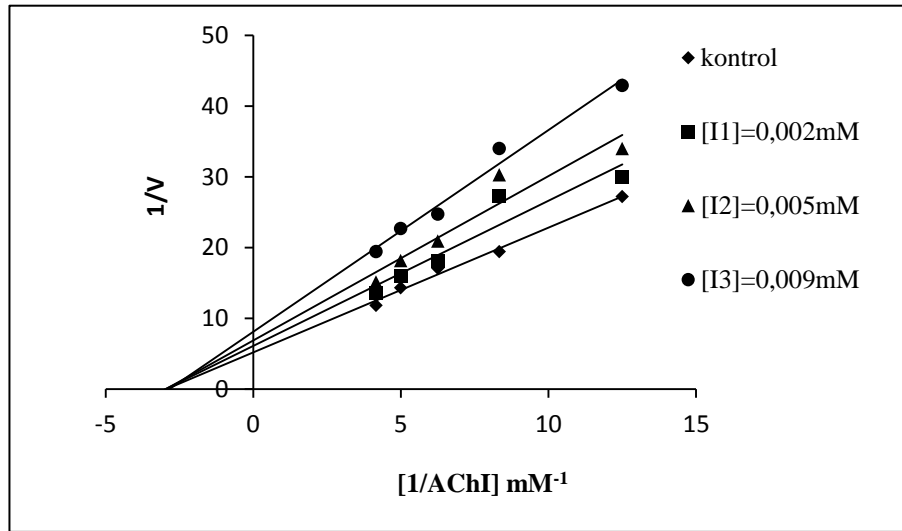
Konsantrasyon(mM)	Aktivite %
0,00	100,0
0,00173	76,81
0,00346	70,18
0,00519	50,09
0,00692	36,76
0,00865	30,00



Şekil 4.34. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine Bupivakain etken maddesinin aktivite % -[Bupivakain] grafiği

Çizelge 4.24. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla bupivakain inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

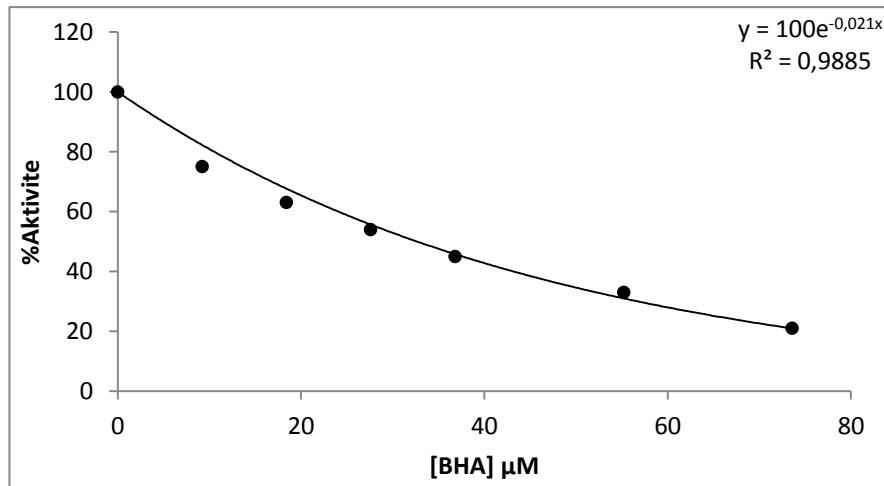
inhibitör	Su(μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	AChE (μl)	inhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K ₂ HPO ₄ (μl)	inhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)	1/V (μmol/ ml.dk) ⁻¹	1/S mM ⁻¹
[I] ₁	836	100	10	4	50	8	828	100	4	10	50	30,00	12,5
	836	100	10	4	50	12	824	100	4	10	50	27,20	8,33
	836	100	10	4	50	16	820	100	4	10	50	18,13	6,25
	836	100	10	4	50	20	816	100	4	10	50	16,00	5,00
	836	100	10	4	50	24	812	100	4	10	50	13,60	4,16
[I] ₂	834	100	10	6	50	8	826	100	6	10	50	34,00	12,5
	834	100	10	6	50	12	822	100	6	10	50	30,30	8,33
	834	100	10	6	50	16	818	100	6	10	50	20,92	6,25
	834	100	10	6	50	20	814	100	6	10	50	18,14	5,00
	834	100	10	6	50	24	810	100	6	10	50	15,13	4,16
[I] ₃	832	100	10	8	50	8	824	100	8	10	50	42,90	12,5
	832	100	10	8	50	12	820	100	8	10	50	34,01	8,33
	832	100	10	8	50	16	816	100	8	10	50	24,72	6,25
	832	100	10	8	50	20	812	100	8	10	50	22,67	5,00
	832	100	10	8	50	24	808	100	8	10	50	19,45	4,16



Şekil 4.35. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla bupivakain etken maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.25. BHA maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

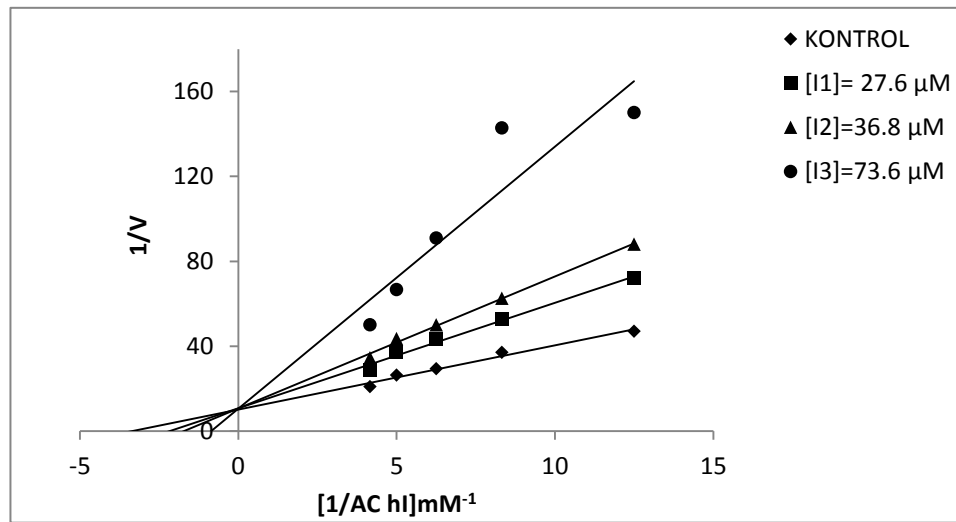
Konsantrasyon(μM)	Aktivite %
0,00	100
9,2	75
18,4	63
27,6	54
36,8	45
55,2	33
73,6	21



Şekil 4.36. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine BHA maddesinin aktivite %-[BHA] grafiği

Çizelge 4.26. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHA inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

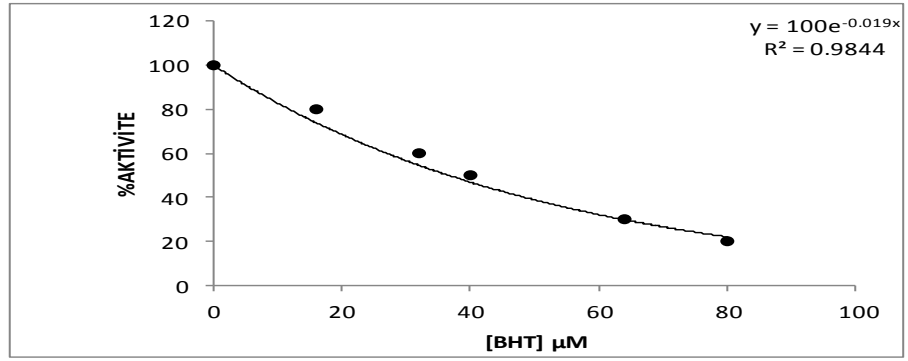
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	650	100	50	150	50	8	642	100	150	50	50	72,00	12,5
	650	100	50	150	50	12	638	100	150	50	50	52,63	8,33
	650	100	50	150	50	16	634	100	150	50	50	43,47	6,25
	650	100	50	150	50	20	630	100	150	50	50	37,03	5,00
	650	100	50	150	50	24	626	100	150	50	50	28,57	4,16
[I] ₂	600	100	50	200	50	8	592	100	200	50	50	88,00	12,5
	600	100	50	200	50	12	588	100	200	50	50	62,50	8,33
	600	100	50	200	50	16	584	100	200	50	50	50,00	6,25
	600	100	50	200	50	20	580	100	200	50	50	43,47	5,00
	600	100	50	200	50	24	576	100	200	50	50	34,48	4,16
[I] ₃	400	100	50	400	50	8	392	100	400	50	50	150,0	12,5
	400	100	50	400	50	12	388	100	400	50	50	142,8	8,33
	400	100	50	400	50	16	384	100	400	50	50	90,9	6,25
	400	100	50	400	50	20	380	100	400	50	50	66,6	5,00
	400	100	50	400	50	24	376	100	400	50	50	50,0	4,16



Şekil 4.37. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla BHA maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.27. BHT maddesinin insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

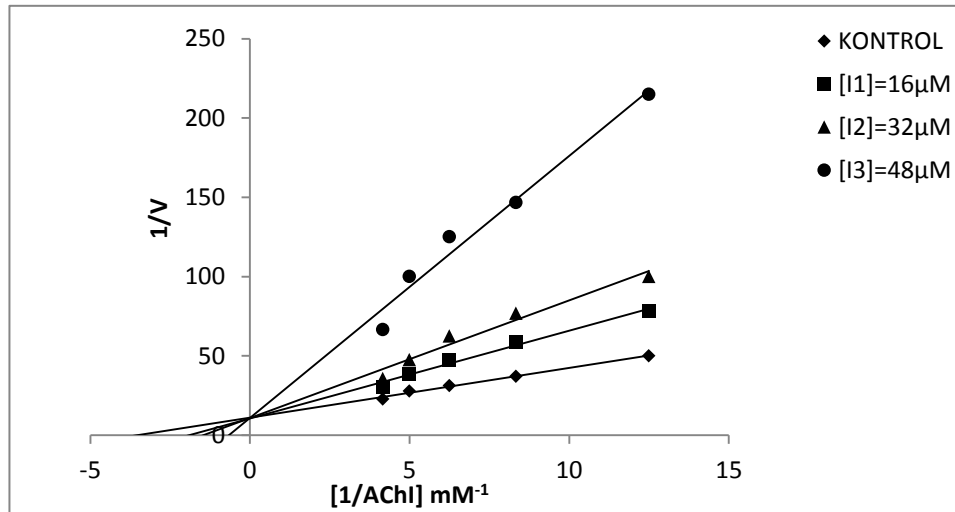
Konsantrasyon(μM)	Aktivite %
0	100
16	80
32	60
40	50
64	30
80	20



Şekil 4.38. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine BHT maddesinin aktivite %-[BHT] grafiği

Çizelge 4.28. AChE enzimi için Asetiltiyokolün iyodat substratıyla BHT inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

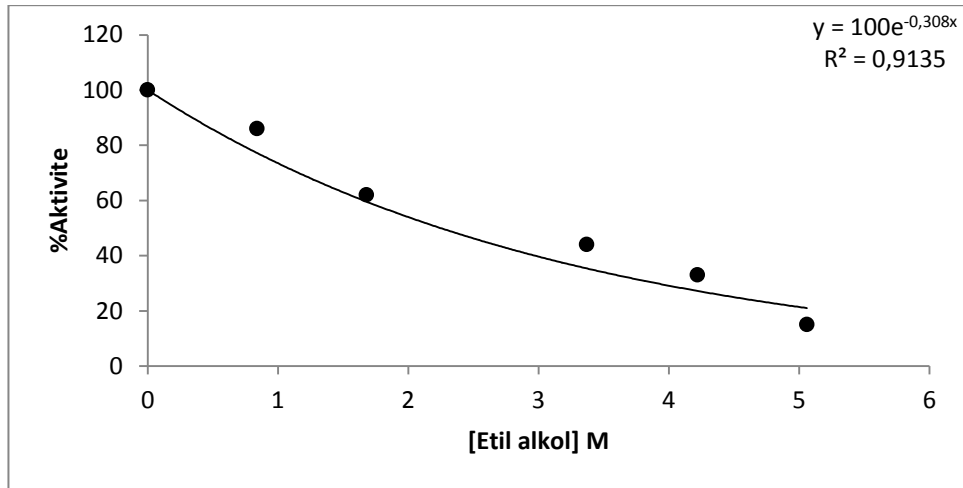
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	700	100	50	100	50	8	692	100	100	50	50	78,0	12,5
	700	100	50	100	50	12	688	100	100	50	50	58,8	8,33
	700	100	50	100	50	16	684	100	100	50	50	47,6	6,25
	700	100	50	100	50	20	680	100	100	50	50	38,5	5,00
	700	100	50	100	50	24	676	100	100	50	50	30,3	4,16
[I] ₂	600	100	50	200	50	8	592	100	200	50	50	100,0	12,5
	600	100	50	200	50	12	588	100	200	50	50	76,9	8,33
	600	100	50	200	50	16	584	100	200	50	50	62,5	6,25
	600	100	50	200	50	20	580	100	200	50	50	47,6	5,00
	600	100	50	200	50	24	576	100	200	50	50	35,7	4,16
[I] ₃	500	100	50	300	50	8	492	100	300	50	50	215,0	12,5
	500	100	50	300	50	12	488	100	300	50	50	146,6	8,33
	500	100	50	300	50	16	484	100	300	50	50	125,0	6,25
	500	100	50	300	50	20	480	100	300	50	50	100,0	5,00
	500	100	50	300	50	24	476	100	300	50	50	66,6	4,16



Şekil 4.39. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolün iyodat substratıyla BHT maddesinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.29. Etil alkol organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

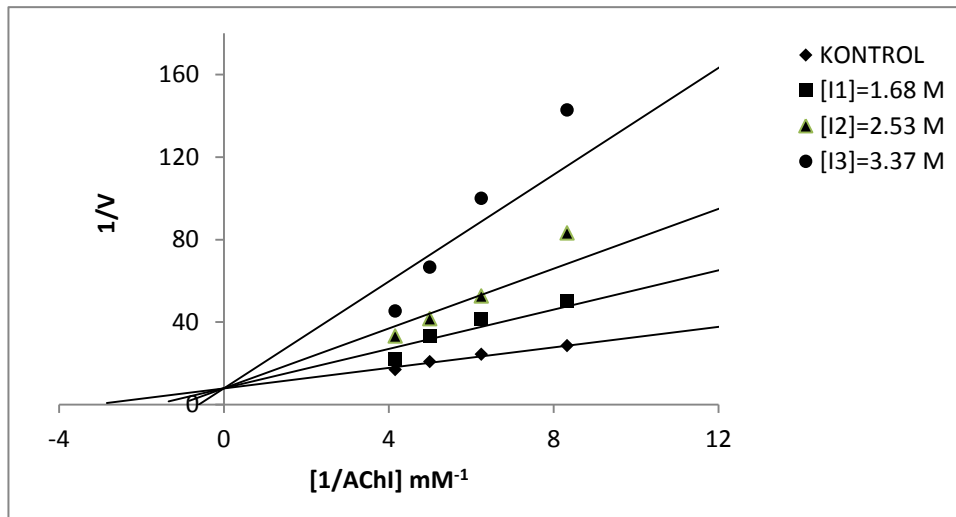
Konsantrasyon(M)	Aktivite %
0,00	100
0,84	86
1,68	62
3,37	44
4,22	33
5,06	15



Şekil 4.40. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine etil alkol organik çözücüsünün aktivite % -[etil alkol] grafiği

Çizelge 4.30. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla etil alkol inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

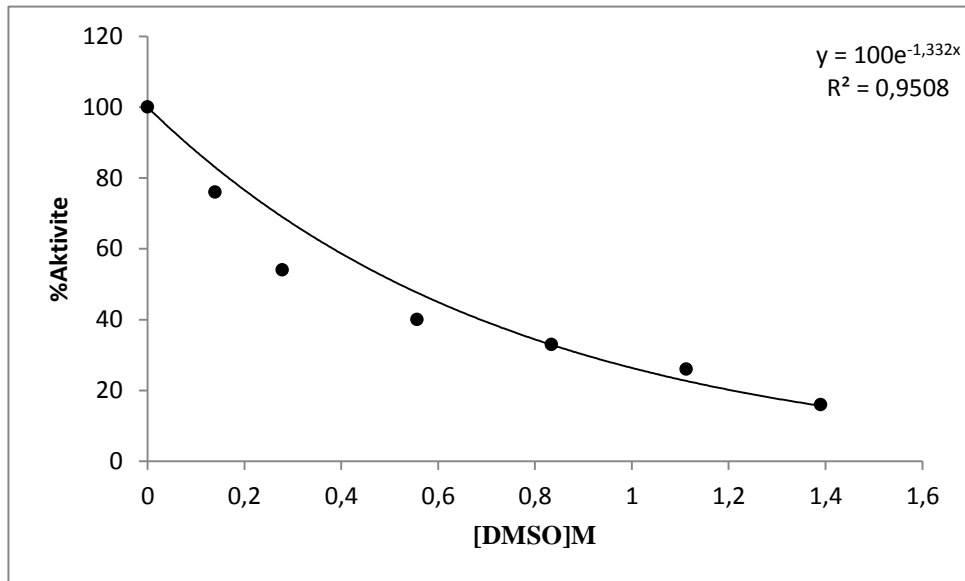
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör (μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	700	100	50	100	50	8	692	100	100	50	50	65,20	12,5
	700	100	50	100	50	12	688	100	100	50	50	50,00	8,33
	700	100	50	100	50	16	684	100	100	50	50	41,66	6,25
	700	100	50	100	50	20	680	100	100	50	50	33,30	5,00
	700	100	50	100	50	24	676	100	100	50	50	22,20	4,16
[I] ₂	650	100	50	150	50	8	642	100	150	50	50	91,50	12,5
	650	100	50	150	50	12	638	100	150	50	50	83,30	8,33
	650	100	50	150	50	16	634	100	150	50	50	52,63	6,25
	650	100	50	150	50	20	630	100	150	50	50	41,66	5,00
	650	100	50	150	50	24	626	100	150	50	50	33,30	4,16
[I] ₃	600	100	50	200	50	8	592	100	200	50	50	154,2	12,5
	600	100	50	200	50	12	588	100	200	50	50	142,8	8,33
	600	100	50	200	50	16	584	100	200	50	50	100,0	6,25
	600	100	50	200	50	20	580	100	200	50	50	66,50	5,00
	600	100	50	200	50	24	576	100	200	50	50	45,45	4,16



Şekil 4.41. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla etil alkol organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.31. Dimetilsülfoksit organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

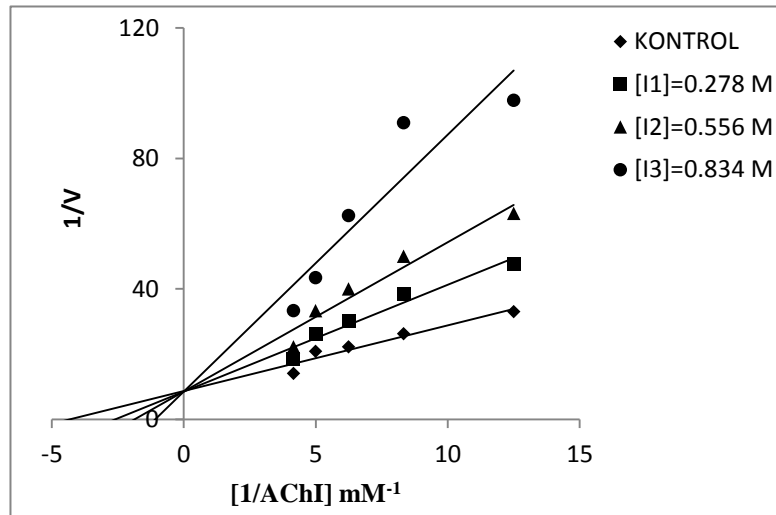
Konsantrasyon(M)	Aktivite %
0,000	100
0,139	76
0,278	54
0,556	40
0,834	33
1,112	26
1,390	16



Şekil 4.42. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine DMSO organik çözücüsünün aktivite % -[DMSO] grafiği

Çizelge 4.32. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla DMSO inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V$, $1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

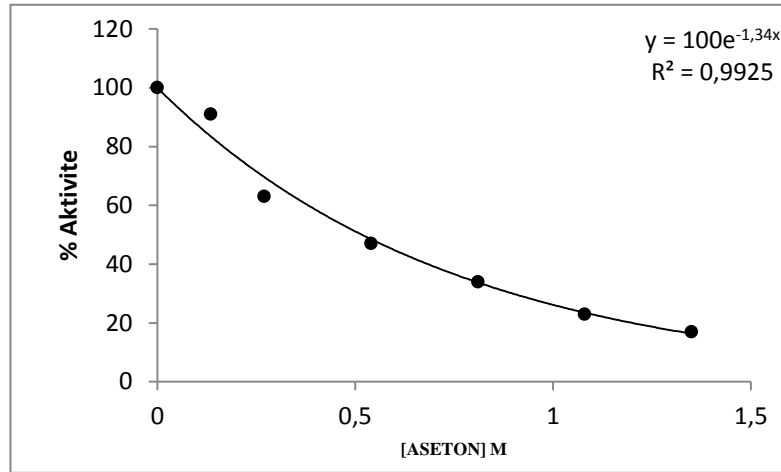
İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE (μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	780	100	50	20	50	8	772	100	20	50	50	47,61	12,5
	780	100	50	20	50	12	768	100	20	50	50	38,46	8,33
	780	100	50	20	50	16	764	100	20	50	50	30,30	6,25
	780	100	50	20	50	20	760	100	20	50	50	26,31	5,00
	780	100	50	20	50	24	756	100	20	50	50	18,51	4,16
[I] ₂	760	100	50	40	50	8	752	100	40	50	50	63,20	12,5
	760	100	50	40	50	12	748	100	40	50	50	50,00	8,33
	760	100	50	40	50	16	744	100	40	50	50	40,00	6,25
	760	100	50	40	50	20	740	100	40	50	50	33,30	5,00
	760	100	50	40	50	24	736	100	40	50	50	22,20	4,16
[I] ₃	740	100	50	60	50	8	732	100	60	50	50	97,80	12,5
	740	100	50	60	50	12	728	100	60	50	50	90,90	8,33
	740	100	50	60	50	16	724	100	60	50	50	62,50	6,25
	740	100	50	60	50	20	720	100	60	50	50	43,47	5,00
	740	100	50	60	50	24	716	100	60	50	50	33,30	4,16



Şekil 4.43. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla DMSO organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.33. Aseton organik çözücüsünün insan eritrosit AChE aktivitesi üzerine etkisi

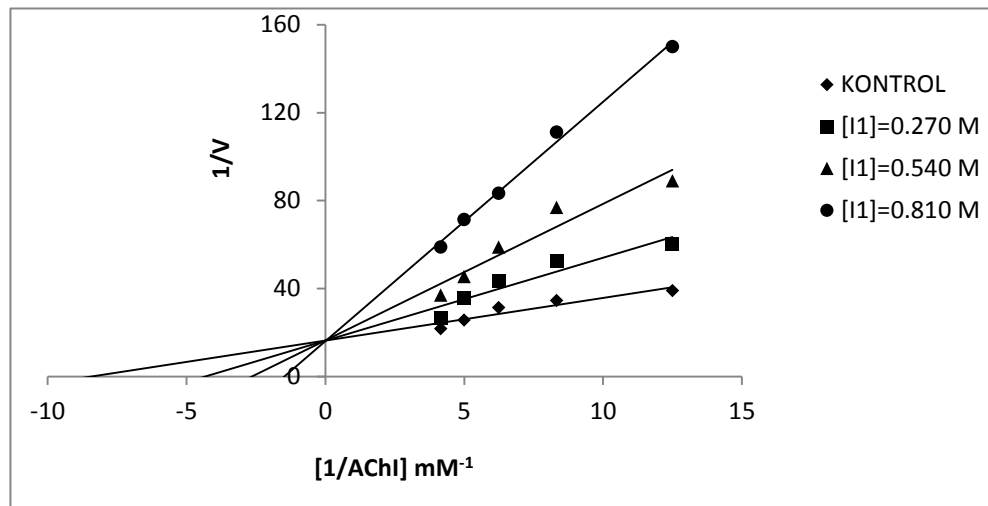
Konsantrasyon (M)	Aktivite %
0,000	100
0,135	91
0,270	63
0,540	47
0,810	34
1,080	23
1,350	17



Şekil 4.44. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine aseton organik çözücüsünün aktivite %- [aseton] grafiği

Çizelge 4.34. AChE enzimi için Asetiltiyokolin iyodat substratıyla aseton inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör	Kör					Sistem						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk}$) ⁻¹	$1/S$ mM^{-1}
	Su(μl)	K_2HPO_4 (μl)	AChE (μl)	İnhibitör(μl)	DTNB (μl)	AChI (μl)	Su (μl)	K_2HPO_4 (μl)	İnhibitör (μl)	AChE(μl)	DTNB (μl)		
[I] ₁	780	100	50	20	50	8	772	100	20	50	50	60,00	12,5
	780	100	50	20	50	12	768	100	20	50	50	52,40	8,33
	780	100	50	20	50	16	764	100	20	50	50	43,47	6,25
	780	100	50	20	50	20	760	100	20	50	50	35,71	5,00
	780	100	50	20	50	24	756	100	20	50	50	26,31	4,16
[I] ₂	760	100	50	40	50	8	752	100	40	50	50	89,00	12,5
	760	100	50	40	50	12	748	100	40	50	50	76,90	8,33
	760	100	50	40	50	16	744	100	40	50	50	58,82	6,25
	760	100	50	40	50	20	740	100	40	50	50	45,45	5,00
	760	100	50	40	50	24	736	100	40	50	50	37,03	4,16
[I] ₃	740	100	50	60	50	8	732	100	60	50	50	150,0	12,5
	740	100	50	60	50	12	728	100	60	50	50	111,1	8,33
	740	100	50	60	50	16	724	100	60	50	50	83,30	6,25
	740	100	50	60	50	20	720	100	60	50	50	71,42	5,00
	740	100	50	60	50	24	716	100	60	50	50	58,80	4,16



Şekil 4.45. İnsan eritrosit AChE enzimi üzerine asetiltiyokolin iyodat substratıyla aseton organik çözücüsünün Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.35. AChE enzimi üzerine maddelerin etkilerinin toplu sonuçları

Etken Madde Cinsi	Etken madde	IC50	Ortalama Ki	İnhibisyon tipi
Antidepresan	Essitalopram	1,06mM	1,30±0,09mM	Yarışmalı inhibisyon
	Fluoksetin	1,62 mM	1,48±0,66 mM	Yarışmalı
	Mirtazapin	0,428 mM	0,23±0,051mM	Yarışmalı
	Risperidon	0,019 mM	0,012±0,0018 mM	Yarışmalı
Antibiyotik	Pantaprazol	1,97 mM	1,26±0,38 mM	Yarışmalı
Organik çözücüler	Etanol	2,24 M	1,28±0,52M	Yarışmalı
	DMSO	0,51 M	0,37±0,086M	Yarışmalı
	Aseton	0,51 M	0,19±0,040M	Yarışmalı
Sentetik antioksidanlar	BHA	32,85 µM	30,9±6,33 µM	Yarışmalı
	BHT	36,3 µM	17,35±6,00 µM	Yarışmalı
Anestezik	2,6-dizopropilfenol	5,94 µM	3,93±2,42 µM	Yarışmalı
	2,6-dimetilfenol	6,96 µM	2,06±0,75 µM	Yarışmalı
	2,6-ditertbutilfenol	36,3 µM	18,9±10,2 µM	Yarışmalı
	Lidokain	260 µM	14,3±4,6 µM	Yarışmasız
	Bupivakain	5 µM	13,4±3,6 µM	Yarışmasız

Etken Madde Cinsi	Etken madde	Konsantrasyon	Etkisi
Antidepresan	Trazodon	0,14M	Etki etmedi
	Sodyum valproat	0,12M	Etki etmedi
Antibiyotik	Sefuroksim	0,29M	Aktive etti
	Amikasin Sülfat	0,0725M	Aktive etti
	Tenoksikam	0,029M	Aktive etti
	Diltizem-HCl	0,012 M	Etki etmedi
	Vankomisin	0,034M	Etki etmedi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada AChE enzimi insan eritrositlerinden saflaştırılarak karakterize edildi ve bazı maddelerin enzim üzerine kinetik özellikleri incelendi. Yaptığımız çalışmada hemolizat hazırlandıktan sonra afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma işlemi yapıldı. Elde edilen elüatlardan aktivite gösteren fraksiyonlar toplanıp; hemolizat ve saf enzimdeki protein, protein tayin yöntemleriyle bulundu ve bunlar üzerinde AChE enzim aktivitesi belirlendi. Saflaştırma basamakları esnasında elüatların protein muhtevaları 280 nm'de absorbanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin protein yapısında bulunan fenil alanin, tirozin ve triptofan amino asitlerinin bu dalga boyunda absorban vermesi esasına dayanmaktadır. Kantitatif protein tayinleri ise Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin Coomassie brilliant blue G-250 reaktifıyla kompleks oluşturması esasına dayanır. Bu reaktif negatif yüklü bir gruba sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüklü gruba bağlanır. Proteinin bağlanması kırmızı formun (465 nm) mavi forma (595 nm) dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein boya kompleksinin çözeltisinde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Asetilkolinesteraz enzimi insan eritrositlerinden, balık karaciğer ve beyninden yine balık üzerinde yapılan çalışmalarda balığın plazma ve eritrositlerden, kobra yılanı zehrinden bıldırcın beyninden izole edilmiştir. Corroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise takrin afinite kromatografisi ile asetilkolinesteraz enzimi yılan balığından %92 sığır eritrositlerinden %59 ve elektrik balığından %27-%60 verimle saflaştırma işlemi yapılmıştır. Asetilkolinesteraz enzimi rat karaciğerinden 600 kat (Sadar *et al.* 1970), sığır eritrositinden 930 kat (Schmidt-Dannert 1994), cenin durumundaki sığır serumundan 44.000 kat (Ralston *et al.* 1985) ve at sineğinden 400 kat (Im 2004) saflaştırılmıştır. Yine literatürde belirtildiği gibi main ve arkadaşları (1974) tarafından yapılan çalışmada at serumundan saflaştırılma oranı 4160 kat, başka bir çalışmada insan eritrosit asetilkolinesterazının saflaştırılmasında bu oran 4818 kat bulunmuştur. Omurgalılardan koyun karaciğerinden AChE enzimi Concanavalin A-Sepharose 4B

afinite kolonunu takiben Edrophonium- Sepharose 6B kolonu ile iki adımda 842 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivite 21 U/mg protein olarak bulunmuştur (Askar *et al.* 2011). Chhajlani ve arkadaşlarının (1989) yaptığı çalışmada AChE enzimi, insan eritrositinden %22 verimle 113.000 kat saflaştırılmıştır. İnsan eritrosit AChE enzimini Budak ve ark. yaptığı çalışmada Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.2’de gösterildiği gibi Sepharose 4B –L-tirozin-takrin afinite kolonu ile tek adımda 658 kat %23,5 verimle saflaştırılmıştır (Budak *et al.* 2013).

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enziminin saflık kontrolü ve molekül ağırlığının tespiti için bölüm 3.5’te anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapıldı. Yapılan SDS-PAGE sonucu Şekil 4.3’te verildi. Elde edilen bantların molekül kütleleri Şekil 4.4’te log Mk-Rf grafiğinden belirlendi. Çizilen grafiğe göre enzimin molekül kütlesi literatürle uyumlu olarak 70 kDa olarak bulundu. Chhajlani ve arkadaşlarının (1989) yaptığı çalışmada AChE enziminin monomer molekül kütlesi SDS-PAGE ile 70 kDa olarak bulunurken, doğal formunun 140 kDa molekül kütlelerine sahip dimer bir enzim olduğu rapor etmişlerdir.

Koyun karaciğerinden saflaştırılan AChE enzimi için SDS-PAGE ile enzimin monomer molekül kütlesi 67.04 kDa bulunurken, Sephacryl-SL-200 jel kromatografisi ile denatüre edilmemiş şartlarda 201.5 kDa molekül kütlelerine sahip tetramer bir enzim olarak bulunmuştur (Askar *et al.* 2011). Yine yapılan çalışmalarda farklı kaynaklar için molekül kütleleri bulunmuştur. Bildircin beyni için 62.5 kDa (Son *et al.* 2002), insan beyni için 66 kDa (Zhu *et al.* 1993), insan serumu için 65 kDa (Lockridge *et al.* 1987) ve elektrik yılan balığı elektrik organı için 25-59 kDa (Dudai and Silman 1974), Torpedo californica için 71- 82 kDa (Taylor and Lappi 1975; Lwebuga-Mukasa 1976), sığır serumu için 83 kDa (Ralston *et al.* 1985) ve sığır servikal gangliası için 75 kDa (Marc *et al.* 1979) olarak bulunmuştur.

Saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra enzim için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla insan eritrosit AChE enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH ve substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 5,5-8,0 aralığında 0,1 M'lık KH_2PO_4 ve 7,2-8,9 aralığında 0,1 M Tris-HCl tamponlarında enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak 412nm'de ölçüldü. Sonuçlarımız Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'ta gösterildi. Sonuçlarımıza göre AChE enzimi için optimum pH değeri 0,1 M KH_2PO_4 tamponu pH=7,6 olduğu tespit edilmiştir. pH=7,6'da insan eritrosit AChE enzimi max aktivite göstermiştir. Literatürde yapılan bir çalışmada oriental meyve sineğinden saflaştırılan AChE enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimal pH için 0,1 M sodyum fosfat tamponu ile 5,8-8,0 aralığında aktivite ölçümü yapılmıştır ve enzim aktivitesi 5,8 ile 8,8 pH'larında ölçülmüş ve 7,4'te max aktivite gözlenirken, 8,0'de enzim aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir. 6,8 ile 7,8 arasında enzim aktivitesinde çok önemli farklılık gözlenmemiştir (Hsiao *et al.* 2004). Optimum pH sonucumuz literatürle uygunluk göstermektedir.

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi optimum iyonik şiddetini belirlemek amacıyla 0,05-1,5 M arasında fosfat tamponları kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda Şekil 4.7'de gösterildiği gibi optimum iyonik şiddet 0,3M KH_2PO_4 tamponu olarak tespit edildi.

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enzimi optimum sıcaklığını belirlemede optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar °C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı. Enzim aktivitesi sıcaklık artışıyla artış gösterdi ve max aktivite 50°C'de gözlemlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda optimum sıcaklık 50°C olarak bulundu ve Şekil 4.8'de gösterildi. Literatürde yapılan bir çalışmada oriental meyve sineğinden saflaştırılan AChE enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum sıcaklığı tespit etmek amacıyla 15-45°C arasında enzim aktivitesi ölçülmüş, 40°C ye kadar aktivite artışı sürerken, sonraki değerlerde enzimin inaktive olduğu gözlenmiş ve optimum sıcaklık 37°C olarak tespit edilmiştir, enzimin stabil olduğu sıcaklığı tespit etmek için 25-60°C arasında 7 farklı sıcaklıkta enzim 5 dakika oda sıcaklığında soğutulmuş daha sonra 10 dak belirtilen sıcaklıklarda su banyosunda inkübe edilerek yapılan ölçümlerle 40°C'ye kadar enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmezken, 40°C'den sonra farklıdır ve bu farklılığın AChE kaynağının farklılığından olduğunu söyleyebiliriz.

Hsiao ve ark. yaptığı çalışmada ayrıca optimal triton X-100 konsantrasyonunu saptamak için %0-1 arasında farklı konsantrasyonlarda triton X-100 fosfat tamponuna eklenerek enzim aktivitesi ölçmüşlerdir. Enzim aktivitesinin %0,5'e kadar arttığı, %0,5'te maksimum aktiviteye ulaştığı ve %1'de enzim aktivitesinde çok az düşüş gözlemlendiği rapor edilmiştir (Hsiao *et al.* 2004).

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enziminin stabil olduğu pH'yı belirlerken pH'sı 6,0-8,0 aralığında 10 mM fosfat tamponu ve 7,2-8,9 aralığında 10 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Bu tamponlarda hazırlanan enzim stokları 24 saat arayla 9 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak enzimin stabil olduğu pH tespit edildi ve AChE enzimi için stabil pH, 10 mM pH 8,0 fosfat tamponu olarak belirlendi. Sonuçlarımız Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterildi.

İnsan eritrositinden saflaştırılan AChE enziminin substratlarına olan ilgisini belirlemek amacıyla her iki substratı için en az beş farklı konsantrasyonda enzim aktivite değerleri belirlendi. Elde edilen $1/V$ ve $1/S$ değerleri yardımıyla Lineweaver –Burk grafikleri çizilerek K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.11-4.12). Asetilkolinyodat substratı için $K_M=0,11$ mM ve $V_{max}=0,082$ EÜ/ml, DTNB substratı için $K_M=0,031$ mM ve $V_{max}=0,16$ EÜ/ml olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda substrat olarak ATC kullanan Colorado patates böceği, Western corn rootworm ve Greenbug'dan saflaştırılmış AChE için sırasıyla K_M değerleri 14,9 μ M, 24,2 μ M, 19,7 μ M, 57,6 μ M ve V_{max} değerleri 177,7 μ mol/min/mg, 18,7 μ mol/min/mg, 184,8 μ mol/min/mg, 78,0 μ mol/min/mg olarak bulunmuştur.

AChE inhibitörlerinin önemi göz önünde bulundurularak asetilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine farklı maddelerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda tıbbi uygulamada yaygın olarak kullanılan antidepresan, antibiyotik, anesteziik ilaçların yanı sıra gıda maddelerinde koruma amaçlı kullanılan sentetik antioksidanlar ve özellikle çokca kullanılan organik çözücülerin insan eritrosit AChE enzimi üzerine *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda da insan eritrosit AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için K_i sabitlerinin ve inhibisyon tiplerinin

belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir. Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

AChE enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilir. Özellikle hastalık riski olan insanlarda bu enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler son derece önemlidir. Bu nedenle bu enzimlerin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması oldukça önemlidir. Bu bilgiler göz önüne alınırsa bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi anlaşılmaktadır. Ama bunun için de çok daha kapsamlı inhibisyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir Bu tez kapsamında elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 4.35'te özetlenmiştir.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitelerini inhibe eden ilaç ve maddelerin IC_{50} değerleri belirlendi. Buna göre Çizelge 4.10-4.11-4.12'de ve Şekil 4.21-4.22-4.23'te görüldüğü gibi amikasin sülfat, sefuroksim ve tenoksikam antibiyotiklerin insan eritrosit AChE enzimi üzerine aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenirken, çalışmamızda kullanılan diğer antibiyotik ilaçlar diltizem HCl ve vankomisin HCl'in insan eritrosit AChE enzim aktivitesi üzerine net bir etkisi olmamıştır. Bir proton pompası inhibitörü olan pantoprazol sodyum ise insan eritrosit AChE enzimi üzerinde yarışmalı bir inhibisyon göstererek enzim aktif bölgesine bağlanma konusunda substratla yarışmaktadır. IC_{50} değeri ve K_i sabiti Çizelge 4.13-4.14 ve Şekil 4.24-4.25'te görüldüğü gibi 1,97 mM ve $1,26 \pm 0,38$ mM olarak belirlendi. Tariq ve ark. yaptığı çalışmada ampicilin ve cephaleksin gibi yaygın kullanılan iki önemli antibiyotiğin insan eritrosit AChE enzimi üzerine in vitro etkisini incelemişlerdir. Sonuçlar Micheales Menten grafiği ile yorumlanmıştır. Ampicilin kontrol grubu için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $23,83 \pm 0,13 \mu\text{mol}$ $87,60 \pm 5,55 \mu\text{mol}$ iken, test grubu için aK_M ve aV_{max} değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sırası ile $22,03 \pm 0,19 \mu\text{mol}$, $74,82 \pm 10,56 \mu\text{mol}$ olarak yarışmasız inhibisyon olarak %55,18 ve %55,28 inhibisyona sebep olduğu

belirlenmiştir. Cephaleksin içinde aynı şekilde kontrol grubu için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla $23,83\mu\text{mol}\pm 0,13\mu\text{mol}$, $87,60\pm 5,55\mu\text{mol}$ iken, test grubu için aK_M ve aV_{max} değerleri $12,06\mu\text{mol}\pm 0,16$, $48,20\pm 8\mu\text{mol}$ olarak hesaplanmıştır. %52,71 ve %64,52 inhibisyona sebep olarak yarışmasız inhibe ettiği rapor edilmiştir (Tariq *et al.* 2012).

Yine çalışmamızda kullanılan sentetik antioksidanlar BHA ve BHT'nin insan eritrosit AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği ve her ikisininde enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlendi. BHA ve BHT için IC50 değerleri sırası ile 32,85 ve 36,3 μM olarak ve K_i sabitleri de $30,9\pm 6,33\mu\text{M}$ ve $17,35\pm 6,00\mu\text{M}$ olarak belirlendi (Çizelge 4.25-4.26-4.27-4.28 ve Şekil 4.36-4.37-4.38-4.39).

Anestezik ilaç etken maddeleri 2,6-dimetilfenol, 2,6-diizopropilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, gibi benzer gruplar içeren maddelerin inhibisyonunu kıyasladığımızda K_i sabitlerine göre küçük ten büyüğe doğru 2,6-dimetilfenol>2,6-diizopropilfenol> 2,6-ditertbutilfenol sıralaması görülür. Buna göre yapıdaki metil gruplarının sayısı arttıkça inhibisyonun azaldığı gözlemlendi ve bu durumun sterik engelden kaynaklanabileceği düşünüldü. İnhibisyon tipleri her 3 madde içinde yarışmalıdır. Köksal vd (2014) yaptığı çalışmada propofol ve türevlerinin laktoperoksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemiş ve bu maddelerin LPO enzimini inhibe ettiği belirlemiş ve sonuçlarımızla benzer etkiler gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine anestezik maddeler sınıfında olan lidokain ve bupivakain(markain) için kinetik sonuçlarımızda diğer maddelerin aksine her ikisininde enzimi yarışmasız olarak birbirine yakın değerlerde inhibe ettiği gözlenmiştir. Yani bu maddeler enzimde aktif bölge haricinde bir yere bağlanarak etkisini göstermiştir. Bu anestezik maddeler için IC50 değerleri sırası ile; 5,94 μM , 6,96 μM , 36,3 μM , 260 μM , 5 μM olarak bulunurken, K_i sabitleri ise; $3,93\pm 2,42\mu\text{M}$, $2,06\pm 0,75\mu\text{M}$, $18,9\pm 10,2\mu\text{M}$, $14,3\pm 4,6\mu\text{M}$, $13,4\pm 3,6\mu\text{M}$ olarak belirlendi (Çizelge 4.15-4.24 ve Şekil 4.26-4.35). Literatürde yapılan bir çalışmada insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi üzerine lokal anestezik prokain, tetrakain ve lidokain ile antidepresan imipraminin etkisi çalışılmıştır. Dört amfilik ilacın enzim aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur ve IC50 değerleri prokain için 0,4 mM, tetrakain için 0,05mM, lidokain için 7,0 mM ve imipramin için 0,7 mM olarak bulunmuştur. Tüm

maddeler için enzim inhibisyonu dönüşümlüdür ve prokain ve tetrakain asetilkolinesteraz aktivitesini yarışmalı inhibe ederken, lidokain ve imipraminde karışık tip inhibisyon gözlenmiştir. 100 mM prokain, 30 mM, 100 mM imipramin ve 300 mM lidokain stok konsantrasyonlarda kullanılmışlardır (Spinedi *et al.* 1989).

Çalıştığımız diğer bir grup madde ise gerek endüstride gerekse laboratuarlarda çokça kullanılan organik çözücüler etil alkol, DMSO ve aseton'dur. Bu maddelerin yine insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimini yarışmalı inhibe ettiği belirlendi. IC50 değerleri 2,24 M, 0,51 M, 0,51 M olarak, K_i sabitleri ise $1,28 \pm 0,52M$, $0,37 \pm 0,086M$, $0,19 \pm 0,040M$ olarak bulundu (Çizelge 4.29-4.34 ve Şekil 4.40-4.45). Bu çözücülerin insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisini kıyaslırsak en çok inhibisyonu asetonun gösterdiği sonucuna varırız. Yapılan bir çalışmada insan eritrositleri integral membran proteini olan AChE *in vitro* olarak farklı konsantrasyonlarda aromatik hidrokarbonlar, klorlanmış alifatik hidrokarbonlar ve alkoller gibi ajanların etkisine maruz bırakılmışlardır. 37°C'de aromatik hidrokarbonların, alkoller ve alifatik hidrokarbonlardan çok daha güçlü AChE inhibitörü olduğu belirlenmiştir. 5 ile 15°C arasında azalan sıcaklıklarda aromatik hidrokarbonların etkisinin daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Ancak, genel olarak sıcakta inkübasyonun azalması organik solventlerin AChE inhibisyonunu artırmıştır. Bu durum lipid çözünürlüğü ve moleküler yapıdaki değişikliklerle açıklanmıştır. Bu durumda da membrandaki AChE'de meydana gelen değişim membran akışkanlığını ve dolayısıyla membran stabilizasyonu etkileyen faktörlerden biri olduğunu düşündürmüştür (Korpela and Tahti 1986).

AChE aktivitesi üzerinde etkili periferik anyonik bölgesi bir membran proteindir. Trisiklik antidepresanlar ve asetilkolin esteraz arasındaki bağlanma çalışmaları, asetilkolinesteraz aktivitesine bu antidepresanların nasıl etki ettiğini anlamak için önemli bir çalışmadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan antidepresan ilaçlardan çalışmamızda kullandığımız essitalopram, risperidon, mirtazapin ve fluoksetin insan eritrosit AChE enzim aktivitesi üzerinde yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiler. Bu maddeler için IC50 değerleri sırası ile 1,06 mM, 0,019 mM, 0,428 mM, 1,62 mM

olarak, K_i sabitleri ise $1,30 \pm 0,09$ mM, $0,012 \pm 0,0018$ mM, $0,23 \pm 0,051$ mM ve $1,48 \pm 0,66$ mM olarak belirlendi. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. Buna göre bu maddeler için IC_{50} değerlerine göre inhibisyon güçlerini büyükten küçüğe doğru sıralama yaparsak risperidon > mirtazapin > essitalopram > fluoksetin sıralaması vardır. K_i değerlerini göz önüne alırsak IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynı olduğu görüldü (Çizelge 4.2-4.9 ve Şekil 4.13-4.20). Ayrıca yine antidepresan özellik gösteren trazodon HCl ve sodyum valproatın enzim üzerinde önemli bir etkisi olmadığını belirledik. Nunes-Tavares *et al.* (2002) yaptığı çalışmada *Elektrophorus electricus*'un elektrik organından saflaştırılan AChE enzimi üzerine amitriplin, imipramin ve nortriplin trisiklik antidepresan (TCA) ilaçların etkisi kinetik olarak incelenmiştir, Yarışmasız bir mekanizma ile AChE aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Dimetilli amitriplin ve imipramin'in mono metilli nortriplin'den daha güçlü inhibitör olduğu tespit edilmiştir. AChE enzimi periferal anyonik bölgesine (PAS) bu katyonik antidepresanların ligand-bağlanma özelliklerini gözlemek için bis-quaterner propidium ligandı kullanan floresans ölçümler yapmışlardır ve bu ilaçların enzimde propidiumun yerini aldığını gözlemişlerdir. Sonuçlar trisiklik antidepresanların enzimin katalitik aktif merkezine katılmadığını göstermiştir. Bu çalışma trisiklik antidepresanlar için bağlanma bölgesinin periferal anyonik bölgede lokalize olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada sırasıyla amitriplin, imipramin ve nortriplin için antidepresan ilaçlar için IC_{50} değerleri; 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM ve K_i sabitleri; 231 μ M, 210 μ M, 370 μ M olarak bulunmuştur. Sonuçlar amitriplin ve imipraminin nortriplinden daha güçlü inhibitör olduğunu ortaya koymuştur (Nunes-Tavares *et al.* 2002).

Üçüncü derecede amin siklik antidepresan ilaçlar (imipramin, amitriplin, doxepin. Trimipramine ve klomipramin) ve ikinci derecede trisiklik aminler (desipramine, maproptiline, nortriplin, protriplin ve amoksapin) sinir uçlarındaki bu maddelerin iletimini ve alım zorluğunu içeren psikolojik inaktivasyonunu büyük oranda bloke ederek serotonin ve norepinefrin gibi biojenik aminlerin hareketini zorlaştırmaktadır

(Millard and Broomfield 1995). Bunun yanı sıra, bu ilaçların kolinerjik nikotinik ve muskarinik reseptörleri bloke eden antikolinerjik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Synder and Yamamura 1977; Izaguirre *et al.* 1997).

Trisiklik antidepresanların periferik muskarinik hareketleri (atropin gibi) iyi tanımlanmıştır ve sıkıntıya, ağız kuruluğu, kabızlık, bulanık görüş, idrar alıkoyma gibi istenmeyen etkilere sebep olduğu belirlenmiştir (Sanganahalli *et al.* 2000). Trisiklik antidepresanlar membran dinamikliğine etki etmekte ve pozitif yüklü aminlerin anyonik bölgeye bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Cainacross 1965). Bazı antidepresan ilaçların antikolinesteratik özelliklerinin büyük tıbbi uygulamalara sahip olduğu kabul edilmiştir (Synder and Yamamura 1977). Asetilkolinesterazın farmakolojik inhibitörleri asetilkolinin nörotransmisyonunu bozan Alzheimer, myasthenia Gravis ve Parkinson gibi hastalıkları kontrol etmede önemlidir. AChE inhibisyonu asetilkolinin sinaptik konsantrasyonunu arttırmakta ve reseptörde daha uzun süre ve daha yüksek oranda kalmasına izin vermektedir (Jann 1998; Giacobini 2000; Soreq and Seidman 2001).

Krulik *et al.* (1991) *in vitro* ve *in vivo* sistemleri kullanarak membranların arasına trisiklik antidepresan ilaçlarının bölünmesi ve bağlanmasını çalışmışlardır ve bunların membranların dinamik ve psikokimyasal özelliklerinin değişebildiğini görmüşlerdir. Pek çok ilaç, özellikle trisiklik antidepresanlar, kolinerjik nörotransmisyon ve monoaminerjiği etkileyebileceği ve bu kolinerjik blokajın bir belirtisi olarak yorumlanmıştır (Newton 1974). İmipramin ve amitriplinin muskarinik, histaminik ve α -1-adrenajik reseptörler için daha yüksek afiniteye sahipken, N-monometillenmiş sekonder amin türevleri, desipramin ve nortriplinin tüm bu bölgelere neredeyse 10-100 kat daha düşük afiniteye sahip olduğu gözlenmiştir (Cusack *et al.* 1994). Dimetilli trisiklik antidepresanların monometilli formlara göre daha güçlü antikolinerjikler olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden, amitriplinin nortriplinden daha güçlü olduğunu ve imipraminin hem kobay beyni hemde ileumunda muskarinik reseptörlere bağlanmasının desipraminden daha yüksek afiniteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Izaguirre *et al.* 1997). İmipraminle kronik tedavide ratların striatum ve hippocampusunda membrana bağlı AChE aktivitesinde değişikliklere neden olmuştur (Camarini and Benedito 1997).

İmipramin, amitriplinden kimyasal olarak diğesinde bulunmayan sadece exosiklik bir çift bağın varlığıyla ayrılır. Exosiklik çift bağ amitriplinin onu biraz daha rijit yapan yan zincirlerinin serbest rotasyonunu önlediği belirtilmiştir (Synder and Yamamura 1977).

Son zamanlarda, amitriplin, imipramin ve nortriplin gibi bazı antidepresanlarla yapılan moleküler mekanik, moleküler dinamik ve NMR spektroskopisi çalışması sonuçları bu trisiklik antidepresanların yan zincirin, akrep benzeri şekilde fenil halkasının bir taneden fazlasını bağladığı konformasyonları tercih ettiğini göstermiştir (Marone *et al.* 1999). AChE aktif bölgesinin konformasyonu, enzime substratın bağlanmasında ilk role sahip olduğunu gösteren periferik anyonik bölgenin işgalinden etkilendiğini göstermiştir (Szeglets *et al.* 1999). Periferik bölgede ajanların varlığı aktif merkeze (yüksüz substratlar değil) yüklü substratların girişini bloke eder (Massoulie *et al.* 1992). Radi vd (1993) trisiklik bileşikler acridin, kloropromazin, fenotiyazin, promethazin, takrin ve ethopropazine gibi ligandlar tarafından asetilkolinesteraz ve butirilkolinesterazın inhibisyonunu araştırmışlardır. İlk zamanlarda, Hasson-Voloch and Liepin (1963) curar ve curar benzeri kuaterner amonyum türevi ajanlar tarafından E.electricus asetilkolinesterazın dönüşümlü inhibisyonunu tanımlamışlardır.

Son zamanlarda Saxena *et al.* (1998) mekanizmanın organofosfat, karbamat ve propidium gibi diğer ligandlar tarafından AChE'nin inhibisyonuyla ilgili olduğu, bir ya da daha fazla bağlanma içerdiğini öne sürmüşlerdir, bu bağlanmalar: aktif bölge serin kovalent bağlanma, aktif bölge çukurunda amino asit rezidüsüyle hidrofobik etkileşim, W86(84) ile yada 337(330) pozisyonunda aromatik amino asit rezidüsüyle katyon- π yada π - π bağlanması; PAS'da rezidüleriyle katyon- π bağlanmasıdır.

Yapılan çalışmada trisiklik antidepresanlar tarafından AChE'nin yarışmasız inhibisyon gözlenmesine dayanarak, bu ilaçların PAS'da aromatik amino asit rezidüleri ve onların halkaları arasındaki π - π bağlarının biçimlenmesini içerebildiği önerilmiştir. Dimetillenmiş trisiklik antidepresanlar amitriplin ve imipraminin, monometilli nontriplinden daha güçlü inhibitörü olmasının sebebinin üçüncül aminlerin ikincil aminlere göre pKa değerlerinin daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Ayrıca, PAS'a bağlanmasına yardım eden katyonik formları pH 8.0'de baskındır. Açılasyon bölgesinde substrat hidrolizini inhibe ederek, pekçok ligand yalnızca periferel bölgeye bağlanır, fakat bu inhibisyonun mekanistik yorumu açık değildir (Nunes-Tavares *et al.* 2002). Taylor and Lappi (1975) propidiumun periferel bölgeye bağlandığını, substrat katalizini düzenlediğini ve asetilkolinesteraz alt biriminin her biriminde tek bir bağlanma bölgesine sahip olduğunu göstermişlerdir (Newton 1974; Szeglets *et al.* 1998).

Amitriplin, fluoksetin, setralin dünya çapında klinik olarak kullanılan antidepresanlardır. Onların müzmin yan etkilerinin yanı sıra, amitriplin kardiyovasküler bozukluklar, hafızanın bozulması, sayıklama ve davranışsal toksisite içeren antikolinerjik yan etkiler ile karakterizedir. Bu yan etkilerinin sebebi ise AChE ve BChE aktivitelerinin inhibisyonudur. Serebral korteks ve eritrosit membranında AChE'nin yüksek konsantrasyonlarda imipramin, desipramin ve amitriplin tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir (Barcellos *et al.* 1998, Miller *et al.* 2002). Ayrıca insan serum BChE için amitriplinin kısmi yarışmalı inhibitörü olduğu da bulunmuştur (Çokuğraş ve Tezcan 1997). Amitriplin ile uzun dönem tedavi klinik seviyelere bir dereceye kadar yakın kazanılmış AChE ve BChE eksikliğine sebep olmuştur. Şayet bu hastalar acil olarak operasyona alınmak zorunda kalırsa, mümkün süksinilkolin apnesi düşünölmek zorunda kalınmalıdır.

Kato *et al.* yaptığı çalışmada (2000) insan plazma kolinesterazı (BChE) ve eritrosit asetilkolinesterazının depolarize edilmemiş nöromuskular bloke edici ajanlar tarafından inhibisyonunu incelemişlerdir. Alcuronium, Atracurium, d-tubocurarin, pancuronium, pipecuronium ve vecuronium 35 hastadan alınan kandan çalışılmıştır. Her iki enzimin 6 ajan tarafından inhibisyonu karışık tip olarak bulunmuştur. Plazma kolinesterazı için pancuronium ($8,72 \cdot 10^{-8}$ M) ve vecuronium ($3,53 \cdot 10^{-7}$ M) neostigminden ($7,56 \cdot 10^{-7}$ M) daha güçlü inhibitör etkisi gösterirken, eritrosit AChE için 6 maddede neostigminden ($6,31 \cdot 10^{-8}$ M) daha zayıftır. Plazma kolinesterazı için pancuronium, vecuronium, pipecuronium, alcuronium, d-tubocurarin, ve atracurium için sırasıyla K_i sabitleri $8,72 \cdot 10^{-8}$ M, $3,53 \cdot 10^{-7}$ M, $3,34 \cdot 10^{-6}$ M, $9,47 \cdot 10^{-6}$ M, $2,66 \cdot 10^{-5}$ M, $3,08 \cdot 10^{-5}$ M olarak

bulunmuştur. Aynı şekilde eritrosit AChE içinde Ki sabitleri sırasıyla $7,41 \cdot 10^{-6}M$, $2,30 \cdot 10^{-6}M$, $5,88 \cdot 10^{-6}M$, $3,25 \cdot 10^{-5}M$, $8,19 \cdot 10^{-5}M$, $7,81 \cdot 10^{-6}M$ olarak bulunmuştur. Nöromuskular bloke edici ajanlar tarafından AChE aktivitesinin inhibisyonu nöromuskular kavşakta mevcut asetilkolin miktarını artıracak, bu asetilkolin reseptörünün aktivasyonu ile sonuçlanacaktır ve bu yüzden bu ajanlar nöromuskular aktivitelerine kısmen karşı gelmiş olurlar. Diğer bir deyişle, örneğin plazma kolinesteraz aktivitesindeki azalma bu enzim tarafından hidrolizlenen süksinilkolin, prokain gibi ilaçların metabolizmasını bozacağı yorumu yapılmıştır. Ayrıca aynı çalışmada asetiltiyokolin substratı için BChE ve AChE için K_M değerleri $5,00 \cdot 10^{-5}M$ ve $5,28 \cdot 10^{-5}M$ olarak belirlenmiştir ve substrata her iki enzimin benzer ilgi gösterdiği sonucuna varılmıştır (Kato *et al.* 2000).

Literatürde insan eritrosit AChE enzimi üzerine bir fenilkarbamat olan fizostigmin türevi phenserin'in inhibisyon etkisi çalışılmıştır. Dixon ve Lineweaver-Burk grafikleri ile bu madde için IC_{50} değeri ve Ki sabiti $0,0453 \mu M$ ve $0,048 \mu M$ olarak belirlenmiştir. İnhibisyon tipi yarışmasız inhibisyon olarak bulunmuştur. Aynı zamanda K_m ve V_{max} değerleride $0,124 mM$ ve $0,980 \mu mol/min/mg$ protein olarak belirlenmiştir (Al-Jafari *et al.* 1998).

Mushtaq *et al.* (2006) yaptığı çalışmada krait (*Bungarus sindanus*) zehirinde asetilkolinesteraz, insan serumunda da butirilkolinesteraz aktivitesinin takrin tarafından inhibisyonunu incelemişlerdir. Yapılan çalışmada yılan zehirinin asetilkolinesterazca zenginken, insan serumunun yüksek miktarda butirilkolinesteraz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Mushtaq *et al.* 2006). Takrin, hem yılan zehiri AChE'yi hemde serum BChE'yi inhibe etmiştir. AChE ve BChE 'nin takrin tarafından inhibisyon tipi benzerdir ve lineer karışık tip inhibisyon olarak bulunmuştur (Ahmed *et al.* 2006). Alhomida ve arkadaşları insan retinası (2000) , Al-Jafari deve retinası (1996), Al-Jafari *et al.* sığır retinası (1998) gibi farklı kaynaklardan elde edilen kolinesterazların bir inhibitörü olarak kullanılan takrinin inhibisyon tipini karışık tip olarak bulmuşlardır. Yılan zehiri, insan retinası, deve retinası ve sığır retinası asetilkolinesterazı ve insan serum butirilkolinesterazı için IC_{50} değerleri sırasıyla $31nM$, $44,6 nM$, $230 nM$, $8,07$

nM ve 25,6 nM olarak bulunmuştur. Aynı kaynaklar için K_i sabitleri ise sırasıyla 13 nM, 37,76 nM, 68 nM, 4,5 nM ve 12 nM olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada yılan zehiri AChE ve insan serum BChE'yi için K_m değerleri sırasıyla Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak 0,0537mM ve 0,0299 mM olarak bulunmuştur. İnsan serum ve yılan zehir kolinesterazları karşılaştırıldığında, insan serum butirilkolinesterazının yılan zehir asetilkolinesterazından takrine daha hassas olduğu bulunmuştur (Ahmed *et al.* 2006). İnsan, deve ve sığır retinaları için K_m değerleri sırasıyla 0,120 mM, 0,064 mM, ve 0,061 mM olarak bulunmuştur.

Böceklerde yapılan inhibitör çalışmalarında ise farklı inhibitörlerin IC50 değerleri bulunmuştur. Bu inhibitörlerin özellikleri BChE'dan, AChE'yi ayırt etmenin bir yolu olarak kullanılmıştır (Chatonnet and Lockridge 1989). Oriental meyve sineğinden ATC'yi BTC'den daha yüksek bir hidrolizleme etkisine sahip gerçek kolinesteraz AChE saflaştırılmıştır AChE eserine ve BW284C51'e yüksek inhibisyon hassasiyeti gösterirken, Ethopropazine çok daha az hassastır. Saflaştırılmış AChE, hem AChE hemde BChE için genel bir inhibitörü olan eserine tarafından ve nispeten AChE için spesifik bir inhibitör olan BW284C51 inhibisyonu yüksek hassasiyetlidir fakat nispeten BChE için spesifik bir inhibitör olan ethopropazine tarafından inhibisyonu çok daha az hassasiyetlidir. Hem eserin hem de BW284C51; 10 μ M konsantrasyonda enzim aktivitesini sırasıyla %99 ve %97 inhibe etmiştir. Ancak aynı konsantrasyonda ethopropazine tarafından enzim aktivitesinin %53'ü inhibe olmuştur. %50 inhibitör konsantrasyonu ($IC_{50} \pm SD$), eserin için $(2,80 \pm 0,57) \times 10^{-8}$ M, BW284C51 için $(8,59 \pm 1,67) \times 10^{-8}$ M, Ethopropazine için $(1,17 \pm 0,65) \times 10^{-3}$ M olarak bulunmuştur. Ayrıca Colorado patates böceği, Lesser grain borer, Western corn rootworm ve Greenbug'dan saflaştırılmış AChE için sırasıyla IC50, eserin için $2,3 \times 10^{-8}$ M, $0,9 \times 10^{-9}$ M, $2,6 \times 10^{-8}$ M ve $4,8 \times 10^{-7}$ M olarak, BW284C51 için sırasıyla $5,4 \times 10^{-9}$ M, 8×10^{-8} M, $1,9 \times 10^{-8}$ M ve $1,5 \times 10^{-7}$ M olarak, ethopropazine için $8,7 \times 10^{-6}$ M, $1,1 \times 10^{-6}$ M, $1,1 \times 10^{-5}$ M ve $1,0 \times 10^{-4}$ M olarak bulunmuştur (Hsiao *et al.* 2004).

Ayrıca *Galleria mellonella* üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında 6 monotermen çalışılmıştır ve bunların tümünün AChE'yi dönüşümlü inhibe ettiği tespit edilmiştir.5

bitki savunma monoterpeni ve alarm pheromone, 2-heptanon yarışmalı inhibitördür. Dixon grafiğine göre K_i sabitleri cineole için $2,2 \times 10^{-1} \mu\text{M}$, pulegone için $3,2 \times 10^{-1} \mu\text{M}$, linalool için $2,4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$, citral için $3,3 \times 10^{-2} \mu\text{M}$, (-)bornyl acetat için $5,1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ve 2-heptanon için $1,34 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur (Keane and Ryan 1999).

Avrupa Atlantik kıyılarında yaygın bulunan deniz kabuklusu *Tigriopus brevicornis* AChE çalışmasında, organofosforlar; paraoxon etil, iso-OMPA, (tetraizopropilpirofosfoamid) (insan serum BChE spesifik inhibitörü) böcek öldürücü; diklorvos, malation ve karbamatlar; eserin, karbofuran gibi inhibitörlere karşı AChE hassasiyeti incelenmiştir. Stok çözeltiler etanolde hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Copepod *Tigriopus brevicornis* için K_i değerleri sırasıyla $2,7 \times 10^{-6} \text{ M}$, $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, $6,1 \times 10^{-1} \text{ M}$, $2,3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ve $2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak bulunmuştur (Forget and Bocquene 1999). Ayrıca elektrik eel, böcek ve nematode AChE'de paraoxon maddesi için K_i değerleri sırasıyla $2,9 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1,4 \times 10^{-7} \text{ M}$, $2,7 \times 10^{-5} \text{ M}$, diklorvos için 10^{-3} M 'dan küçük, $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3,6 \times 10^{-4} \text{ M}$, ve karbofuran için $2,9 \times 10^{-6} \text{ M}$, $5,8 \times 10^{-7} \text{ M}$ ve $6,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak bulunmuştur (Talesa *et al.* 1993).

Organofosfat bileşikler ve oksimler gibi pestisitler insan sağlığında önemli bir problemdir ve abunlar kolinesteraz inhibitörlerinin spesifik gruplarındandır. Sinir ajanlarında bunlar arasındadır ve en toksik maddelerdendir. Bu maddeler asetilkolinesterazın aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak merkezi ve periferel sinapsta nörotransmitter asetilkolinin hidrolizlenmesini inhibe etmektedirler. Bu yüzden diğer canlılarda ve bunun yanısıra insan eritrositinde de çalışılmıştır. Costa *et al.* yaptığı çalışmada (2011) kloroprifos, diazinon ve malathion gibi organofosfat maddelerinin insan eritrosit AChE ve plazma BChE üzerine inhibisyon etkisi çalışılmıştır ve sonuçta IC_{50} değerleri tespit edilmiştir AChE için sırasıyla $8,06 \mu\text{M}$, $20,72 \mu\text{M}$, $73 \mu\text{M}$ olarak bulunurken, BChE için $1,15 \mu\text{M}$, $1,20 \mu\text{M}$, $1,80 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada antioksidan özellik gösteren iki yeni oksim (oksim1-butan2,3-dionethiyosemikarbazon, oksim2-3-fenilhidrazon butan 2-one), pralidoksim ve obidoksim denenmiş ve asetilkolinesteraz reaktivatörü oldukları belirlenmiştir (Costa *et al.* 2011).

Sonuç olarak bu tez kapsamında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

1. İnsan eritrosit AChE enzimi Sepharose 4B-L-Tirozin-Takrin afinite kromatografisi yöntemiyle 658 kat, %23,5 verimle saflaştırıldı.
2. Enzimin stabil olduğu pH= 8,0, optimum iyonik şiddet 0,3 M Fosfat tamponu, optimum pH= 7,6, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi.
3. pH= 7,6'da K_M değerleri AChI için 0,11 mM, DTNB için 0,031 mM, V_{max} değerleri sırasıyla 0,082 ve 0,16 EÜ/ml olarak belirlendi.
4. Enzim aktivitesi üzerine antideprasan (essitalopram okzalate, mirtazapin, risperidon, sodyum valproat, trazodon HCl, fluoksetin), antibiyotik (tenoksikam, vankomisin HCl, amikasin sülfat, diltiazem HCl, sefuroksim, pantoprazol sodyum), anesteziği(2,6-diizopropilfenol,2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain), sentetik antioksidanlar (BHA, BHT) ve organik çözücüler (etanol, aseton, dimetilsülfoksit) gibi maddelerin *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu amaçla IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Bu maddelerden inhibisyon etkisi gösteren essitalopram okzalate, risperidon, mirtazapin, fluoksetin, pantoprazol, 2,6-diizopropilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-ditertbutilfenol, lidokain, bupivakain, BHA, BHT, etanol, aseton, dimetilsülfoksit için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,06 mM, 0,019 mM, 0,428 mM, 1,62 mM, 1,97 mM, 5,94 μ M, 6,96 μ M, 36,3 μ M, 260 μ M, 5 μ M, 32,85 μ M, 36,3 μ M, 2,24 M, 0,51 M, 0,51 M olarak bulundu. Aynı maddeler için sırasıyla ($K_{i_{ort}} \pm$ Standart sapma) sabiti 1,30 \pm 0,09 mM, 0,012 \pm 0,0018mM, 0,23 \pm 0,051mM ve 1,48 \pm 0,66 mM, 1,26 \pm 0,38 mM, 3,93 \pm 2,42 μ M, 2,06 \pm 0,75 μ M, 18,9 \pm 10,2 μ M, 14,3 \pm 4,6 μ M, 13,4 \pm 3,6 μ M , 30,9 \pm 6,33 μ M, 17,35 \pm 6,00 μ M, 1,28 \pm 0,52M, 0,19 \pm 0,040M, 0,37 \pm 0,086M olarak bulundu. İnhibisyon tipi lidokain ve bupivakain anesteziği için yarışmasız olarak bulunurken, diğer maddeler için yarışmalı inhibisyon olarak tespit edildi.

KAYNAKLAR

- Ahmed M., Rocha J.B.T., Correa M., Mazzanti M.C., Zanin R.F., Morsch A.L.B., Morsch V.M., Schetinger M.R.C. 2006. Inhibition of two different cholinesterases by tacrine. *Chem. Biol. Interact.* 162, 165-171.
- Akman, E., 2007. Van Gölü Balığının (*Chalcalburnus Tarichii P.1811*) beyin ve karaciğerinden asetilkolinesteraz (E.C. 3.1.1.7) enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi Van.
- Alaşehirli, B., 2005. Kolinesteraz İnhibitörleri (Antikolinesterazlar) Türkiye Klinikleri *J. int. Med Sci*, 1 (18), 47-57.
- Alhomida A.S., AL.Rajhi A.A., Kamal M.A., Al-Jafari A.A. 2000. Kinetik analysis of the toxicology effect of tacrine (cognex) on human retinal acetylcholinesterase activity. *Toxicol.* 147, 33-39.
- Alırız, S. and Turkoglu, V. 2003. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the lake van fish (*Chalcalburnus Tarichii P.1811*). *Prep. and Biotech.* 33,137-145.
- Al-Jafari A.A. 1996. The nature of the inhibition of camel retina acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) activity by tetrahydroacridine, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 12, 503-514.
- Al-Jafari A.A., Kamal M.A., Alhomida A.S. 1998. Sensitivity of bovine retinal acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7) toward tacrine: Kinetic characterization. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12, 245-251.
- Al-Jafari, A., Kamal, A., Greig, N., H., Alhomida, S., A., Perry, R., E. 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivate of physostigmine :phenserine. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 248, 180-185.
- Allderdice P.W., Garner H.A.R., Galutira D., Lockridge O., LaDu B.N., McAlpines J. 1991. The cloned butyrylcholinesterase (BChE) gene maps to a single chromosome site. *Genomics* 11, 452-454
- Alon M.F., Alon R.N., Morin S. 2008. Organophosphates resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci*(*Hemiptera:Aleyrididae*) is associated with a point mutation in an acetyl-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 38, 940-949.
- Altamirano C.V., Lockridge O. 1999. Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. *Chem. Biol. Interact.* 119, 53-60.
- Amdur M.O., Doull J., and Klassen C.D. Casarett' and Doull toxicology. *The Basic Science of Poisons.* Pergamon Press, Newyork, 1991, 1033 pp
- Anazawa Y., Tomita T., Aiki Y., Kozaki T., Konoa Y. 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae*). *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 33,509-514.
- Askar K.A., Kudi A.C., Moody A.J. 2011 Purification of soluble acetylcholinesterase from sheep liver by affinity chromatography. *Appl. Biochem Biotech.* 165, 336-346
- Barber K.L., Mesular M.M., Kraft G.A., Klein W.L. 1996. Butyrylcholinesterase alters the aggregation state of β -amyloid. *Proc. Soc. Neurosci.* 72,1172.

- Barcellos C.K., Schetinger M.R.C., Dias R.D., Sarkis J.J.F. 1998. In vitro effect of central nervous system active drugs on ATPase-ADPase activity and acetylcholinesterase activity from cerebral cortex of adult rats. *Gen. Pharmacol.* 31, 563-567.
- Bayrak, B. 2008. Sinir hücrelerinde iletim ve bunun öğrenme sürecine etkileri. Selçuk Üniversitesi, A.K. Eğitim Fakültesi Dergisi. 25, 101-113.
- Berman H.A., Leonard K. 1992. Interaction of tetrahydroaminoacridine with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 41, 412-418.
- Bodur E., Çokuğraş A.N., Tezcan E.F. 2001. Inhibition effects of benactyzine and drofenine on human serum butyrylcholinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 25-29.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248.
- Brass N., Racz A., Heckel D., Remberger K., Sybrecht G.W., Meese E.U. 1997. Amplification of the genes BChE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 57, 2290-2294.
- Brodbeck U. 1986. Amphiphilic acetylcholinesterase: Properties and interactions with lipids and detergents. *Progress in Protein-Lipid Interactions*; Elsevier: Amsterdam. pp:303-308.
- Broomfield C.A., Maxwell D.M., Solana R.P., Castro C.A., Finger A.V., Lenz D.E. 1991. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 145, 43-53.
- Burnell A.N and Wilkins N.P. 1988. An investigation in vitro of acetylcholinesterase by the carbamate inhibitor eserine sulphate in eserine resistant strains of *Drosophila Melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90, 215-220.
- Cainacross K.D. 1965. On the peripheral pharmacology of amitriptyline. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 154, 438-448.
- Camarini R., Benedito M.A.C. 1997. Chronic imipramine treatment-induced changes in acetylcholinesterase (EC.3.1.1.7) activity in discrete rat brain regions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 955-960.
- Chan, S. L., Gardner, E., and Trevor, A. J., 1973. Improved method of large scale purification of acetylcholinesterase from the electric eel (*Electrophorus electricus*) by affinity chromatography. *Experientia.* 29, 638-639.
- Changeux J.P. 1966. Response of acetylcholinesterase from torpedo marmorata to salts and curarizing drugs, *Mol. Pharmacol.* 2, 369-392.
- Chattonet A., Lockridge O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.
- Chattonet A., Masson P. 1986. Is peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase? *Biochimie.* 68, 657-667.
- Cheng D.H., Tang X.C. 1998. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 377-386.
- Chhajlani V., Deer D., Earles B., Schmell E., August T. 1989. Purification and partial amino acid sequence analysis of human erythrocyte acetylcholinesterase, *FEBS. Lett.* 247, 279-282.

- Cohen S.G., Chrishti S.B., Bell D.A., Howard S.I., Salih E., Cohen J.B. 1991. General occurrence of binding to acetylcholinesterase-substrate complex in noncompetitive inhibition and inhibition by substrate. *Biochem. Biophys. Acta* 1076, 112-122.
- Corroll, T.R., Grimm, L.J., Hepburn, W.T., Mark, R. 1995. Second Congress of the European Society for Clinical Neuropharmacology
- Costa M.D., Freitas M.L., Soares F.A.A., Carratu V.S., Brandao R. 2011. Potential of two new oximes in reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by organophosphate compounds: An in vitro study. *Toxicol.* 25, 2120-2123.
- Costagli C., Galli A. 1998. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents: Focus on drugs potentially effective in Alzheimer disease. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1733-1737.
- Cusack B., Nelson A., Richelson E. 1994. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacol. (Ber)*. 114, 559-565.
- Çakır Ş., Yamanel Ş. 2005. Böceklerde insektisitlere direnç. Gazi üniversitesi Kırşehir eğitim fakültesi dergisi, 6, 21-29.
- Çokuğraş A.N., Tezcan E.F. 1997. Amitriptyline: A potent inhibitor of butyrylcholinesterase from human serum. *Gen. Pharmacol.* 29, 835-838
- Darvesh S., Hopkins D.A., Geula C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat Rev. Neurosci.* 4, 131-138.
- Das A., Dishit M., Nath C. 2005. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmac. Biochem. Behav.* 81, 89-99.
- Das A., Kapoor K., Sayeepriyadarshini A.T., Dikshit M., Palit G., Nath C. 2000. Immobilization stress induced changes in acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. *Pharmacol. Res.* 42, 211-216.
- Dave K.R., Syal A.R., Katyare S.S., 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z. Naturforsch.* 55, 100-108.
- De La Hoz, D., Doctor, B. P., Ralston, J.S. Rush, R.S., and Wolfe, A. D., 1986. A simplified procedure for the purification of large quantities of fetal bovine serum acetylcholinesterase. *Life Sci.* 39, 195-199.
- Dudai Y., Silman I. 1974. The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of the electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59, 117-124.
- Eagger S., Morant N., Levly R., Sahakian B. 1992. Tacrine in Alzheimer's disease. Time course of changes in cognitive function and practice effect. *Br. J. Psychol.* 160, 36-40.
- Ecobichon D.J., Corneau A.M. 1973. Pseudocholinesterase of mammalian plasma: Physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 24, 92-100.
- Ekholm M., 2001. Predicting relative binding free energies as substrate and inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Theo. Chem.* 572, 25-34.
- Ekholm M., Kanschun H. 1999. Comparative model building of human butyrylcholinesterase. *J. Mol. Struct.* 467, 161-172.
- Eldewrafi M.E., Tripathi R.K., O'Brien R.D. 1970. Acetylcholinesterase isozymes from the housefly brain. *Biochim Biophys Acta.* 2, 308-314.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone R. M. A. 1961. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Epstein D.J., Berman H.A., Taylor P. 1979. Ligand-induced conformational changes in acetylcholinesterase investigated with fluorescence phosphates, *Biochem.* 18, 4749-4754.
- Ercan, S.Z., 2002. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan kolin esteraz inhibitörleri. *Demans Dergisi*, 2,5-9.
- Forget J., Bocquene G. 1999 Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Phys.* 123, 345-350
- Fournier D., Cuany A., Bride J.M., Berge J.B. 1987. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult house flies (*Musca domestica L.*). *J. Neurochem.* 15, 267-274.
- Galbraith, D.A., and Watts Changes D.C. 1980. In some cytoplasmic enzymes from red cells fractionated into age groups by centrifugation in Ficoll/Triosil gradients. comparison of normal humans and patients with Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. J.* 191, 63-70.
- Gao J.R., Rao J.V., Wilde G.E., Zhu K.Y. 1998. Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera (Coleoptera:Chrysomelidae)*. *Ach. Insect. Biochem. Physiol.* 39, 118-125.
- Gao J.R., Zhu K.Y. 2001. An acetylcholinesterase purified from the Greenbug *Schizaphis graminum* with some unique enzymological and pharmacological characteristics. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1095-1104.
- Gao X.W., Zhou X.G., Wang R.G., Zheng B.Z. 1998. Distribution and purification of acetylcholinesterase in cotton bollworm (*Lepidoptera: noctuidea*). *Acta Entomol. Sin.* 41, 21-25.
- Garcia-Ayllon M.S., Saez-Valero J., Piqueras-Perez C., Vidal C.J. 1999. Characterization molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human acoustic neuromas. *Neurosci. Lett.* 274, 56-60.
- Geula C., Mesulam M.M. 1995. Cholinesterases and pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 9,23-28.
- Geula, C., & Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer Disease* (R. D. Terry, R. Katzman, K. L. Bick & S. S. Sisodia, Eds.), pp. 269-292. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Giacobini E. 2000. Cholinesterase inhibitor therapy stabilizes symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 14, 3-10.
- Giacobini E. 2003. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 28, 515-522.
- Greig N., Utsuki T., Ingram D., Wang Y., Pepeu G., Scali C., Yu S.Q., Mamczarz J., Holloway H.W., Giordano T., Chen D., Furukawa K., Sambamurti K., Brossi A., Lahiri D. 2005. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer's β - amyloid peptide in rodent. *PNAS* 102, 17213-17218.

- Greig N.H., Utsuki T., Yu S., Zhu X., Holloway H.W., Perry T., Lee B., Ingram D.K., Lahiri D.K. 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* 3, 159-165.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq H. 1999, Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology, *Eur J. Biochem.* 264, 672-686.
- Grunwald J., Marcus D., Papier Y., Raveh L., Pittel Z., Ashani Y. 1997. Large-scale purification and long term stability of human butyrylcholinesterase a potential bioscavenger drug. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 34, 123-135.
- Guedes R.N., Zhu K.Y., Kambhampati S., Dover B.A. 1998. Characterization of acetylcholinesterase purified from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 205-210.
- Guilbault G.G., Kuan S.S., Sadar M.H. 1970. Purification and properties of cholinesterase from honeybees- *Apis mellifera* Linnaeus –and boll weevils- *Anthonomus grandis* Boheman. *J. Agric. Food. Chem.* 18, 692-697.
- Guillozet A., Smiley J.F., Mash D.C., Mesulam M.M. 1997. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann. Neurol.* 42, 909-918.
- Guyton ve Hall. 1996. *Tıbbi Fizyoloji*, 9. Ed. Nobel Kitabevi.
- Gürdol F., Ademoğlu E. 2010. *Biyokimya 2*. Baskı Nobel Kitabevi.
- Güven, A. 2000. Asetilkolinesteraz'ın Önemi ve inhibitörleri. *Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6, 145-151.
- Hall J.C., Alahiolis S.N., Strumpf D.A and White K. 1980. Behavioral and biochemical defects in temperature sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 96, 939-965.
- Hasson-Voloch A., Liepin L.L. 1963. Reversible inhibition of electric organ cholinesterase by curare and curare-like agents. *Biochem. Biophys. Acta.* 75, 397-401.
- Heller M., Hanahan D.J. 1972. Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 17, 251-272.
- Hoffman R.S., Morasco R., Goldfrank L.R. 1996. Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 34, 259-266.
- Hsiao Y.M., Lai J.Y., Liao H.Y., Feng H.T. 2004. Purification of acetylcholinesterase from oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*(Hendel)) (Diptera:Tephritidae). *J. Agricult. Food Chem.* 52, 5340-5346.
- Im D., Kim W.T., Boo K.S. 2004. Purification and partial cDNA sequence of acetylcholinesterase from a Korean starin of the housefly (*Musca Domestica*). *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 7, 81-87.
- Inestrosa N.C., Perelman A. 1990. Association of acetylcholinesterase with the cell surface. *J. Membr. Biol.* 118, 1-9.
- Izaguirre V., Fernandez-Fernandez J.M.,Cena V., Gonzalez- Garcia C. 1997. Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptor and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 418, 39-42.
- İseri, K., P., Efendi, H., 2003. Efficacy and safety of donepezil and rivastigmine in Alzheimer's disease. *Geriatrici* 6, 119-123.

- Jann M.W. 1998. Pharmacology and Clinical efficacy of cholinesterase inhibitors. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 55, 22-25.
- Johnson G., Moore S.W. 1999. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 758-762.
- Johnson G., Moore S.W. 2000. Cholinesterase modulate cell adhesion in human neuroblastoma cell in vitro. *Int. J. Devl. Neurosci.* 18, 781-790.
- Kadlubowski M. & Agutter, P.S. 1977. Changes in the activities of some membrane – associated enzymes during in vivo ageing of the normal human erythrocyte. *Br. J. Haematol.* 37, 111-125.
- Kassa J., Fusek J. 1997. Effect of panpal pretreatment and antidotal treatment (HI-6 plus benactyzine) on respiratory and circulatory function in soman-poisoned rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 16, 563-569
- Kato M., Hashimoto Y., Horinouchi T., Ando T., Ito J., Yamanaka H. 2000. İnhibition of human plasma cholinesterase and erythrocyte acetylcholinesterase by nondepolarizing neuromuscular blocking agents. *J. Anesth.* 14, 30-34.
- Kaya H.B., Özcan B., Şişecioglu M., Özdemir H. 2013. Purification of Acetylcholinesterase by 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from Human Erythrocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170, 198-209.
- Keane S., Ryan M.F. 1999. Purification, characterization and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth (*Galleria mellonella*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 1097-1104.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ. 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Korpela M., Tahti H. 1986. The effect of selected organic solvents on intact human red cell membrane acetylcholinesterase in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 257-262.
- Köksal, Z., Usanmaz, H., Özdemir, H., Gülçin İ., Güney, M. (2014). Inhibition effects of some phenolic and dimeric phenolic compounds on bovine lactoperoxidase (LPO) enzyme. *Inter. Journal. Acad. Res.* 6, 27-35.
- Kranthi K.R. 2005. Insecticide resistance monitoring. Mechanism and management manual. Central Institute Cott. Res. 51-87.
- Krulik R., Brue P., Simunkova D., Havranek M. 1991. Liposomes-model membranes to study the binding of tricyclic antidepressants. *Drug Metab. Drug. Interact.* 3, 269-281.
- LaDu B.N., Bartels C.F., Noguera C.P., Hajra A., Lightstone H., Van der Spek A.F.L., Lockridge O. 1990. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* 23, 423-431.
- Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lapidot-Lifson Y., Prody C., Ginzberg D., Meytes D., Zakut H., Soreq H. 1989. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4715-4719.
- Lee A.H., Metcalf R.L., Kearns C.W. 1974. Purification and some properties of house cricket (*Acheta domesticus*) acetylcholinesterase. *Insect. Biochem.* 4, 267-280.
- Levine H., Rodnitzky R.L. 1976. Behavioral effects of organophosphate pesticide in man. *Clin. Toxicol.* 16, 563-569.

- Li F., Han Z. 2002. Purification of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). Arch. Insect Biochem. Physiol. 51, 37-45.
- Liebelt, L. E. 2007. Eski Antidotlar, Yeni Antidotlar Ve "Evrensel Antidot": Pediatrik Zehirlenmede Ne Kullanmalıyız? Current Opinion in Pediatrics, 19, 199-200
- Lockridge O. 1990. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. Pharmac. Ther. 47, 35-60.
- Lockridge O., Bartels C.F., Vaughan T.A., Wong C.K., Norton S.E., Johnson L.L. 1987. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. The Journal of Biol. Chem. 262, 549-557.
- Lockridge O., Blong R.M., Masson P., Froment M.-T., Millard C.B., Broomfield C.A. 1997. A single amino acid substitution. Gly116His confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. Biochem. 36, 786-795.
- Lockridge O., Motershow-Jackson N., Eckerson H.W., LaDu B.N. 1980. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. J.Pharmac. Exp. 215,1-8.
- Lwebuga-Mukasa J.S., Lappi S., Taylor P. 1976. Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: their relation to synaptic membranes. Biochem.15, 1425-1434.
- Mallender W.D., Szeglets T., Rosenberry T.L. 1999. Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the presence of peripheral site ligands: distinct effects of propidium and fasciculin. J. Biol. Chem. 274, 8491-8499.
- Marc V., Suzanne B., Jean M., Victor G. 1979. The subunit structure of mammalian acetylcholinesterase: catalytic subunits, dissociating effect of proteolysis and disulphide reduction on the polymeric forms. Journal of Neurochem. 33, 559-565.
- Marone S., Rozas I., Weaver D.F. 1999. Theoretical structural analyses of tricyclic neuroactive drugs: quantum pharmacologic descriptors for clustering anticonvulsant, antidepressants, and antipsychotic activities. J.Mol Struct. (Teochem.) 467, 25-30.
- Mason H.J., Waine E., Stevenson A., Wilson H.K. 1993. Aging and spontaneous reactivation of human plasma cholinesterase activity after inhibition by organophosphorus pesticides. Hum. Exp. Toxicol. 12, 497-503.
- Masson P., Froment M.T., Fortier P.-L., Visicchio J.-E., Bartels C.F., Lockridge O. 1998. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin related neutral esters. Biochim. Biophys. Acta. 1387, 41-52.
- Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.-T., Schopfer L.M., Lockridge O. 1997. Role of aspartate⁷⁰ and tryptophan⁸² in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. Biochem. 36, 2266-2277.
- Masson P., Nachon ., Bartels C.F., Froment M.-T., Ribes F., Matthews C., Lockridge O., 2003. High activity of human butyrylcholinesterase at low pH in the presence of excess butyrylcholine. Eur. J. Biochem. 270, 315-325.
- Masson P., Xie W., Froment M.T., Lockridge O. 2001. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with Ω loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. Biochim Biophys. Acta 1544, 166-176.

- Masson P., Xie W., Froment M.T., Levitsky V., Fortier P.-L., Albaret C., Lockridge O. 1999. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 1433, 281-293.
- Massoulie J., Bon S., Anselment A., Chatel J.M., Coussen F., Duval N. 1992. Biosynthesis of the molecular forms of the acetylcholinesterase. In: Shafferman A., Velan B., editors. *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions.* New York: Plenum Press. 17-24
- Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Valette F.M., 1992. Molecular and cellular biology of cholinesterases and cellular biology of cholinesterases. *Neurobiology* 41, 31-91.
- Massoulie J., Sussman J., Bon S., Silman L. 1993. Structure and function of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Brain Res.* 98, 139-146.
- Matsumura F. *Toxicology of insecticides.* 2nd Edition, New York: Plenum Press: 1985.
- Matter C., Bradley R., Slaughter E., Browne S. 1996. Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE) Determination of enzymatic parameters. *Life Sci.* 58, 257-261.
- Mattes C.E., Lynch T.J., Snigh A., Bradley R.M., Kellaris P.A., Brady R.O., Dretchen K.L. 1997. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 372-380.
- McDonough J.M., Shih T.M. 1993. Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci. Behav. Rev.* 17, 203-215.
- Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw P., Levey A., Duysen E.G., Lockridge O. 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627-639.
- Mesulam, M. 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, ny)* 11, 43-9.
- Millard C.B., Broomfield C.A. 1995. Anticholinesterases: medical applications of neurochemical principles. *J. Neurochem.* 64, 1909-1918.
- Miller T.C., Rocha J.B.T., Morsch V.M., Neis R.T., Schetinger M.R.C., 2002. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587, 92-98.
- Morton C.L., Wadkins R.M., Danks M.K., Potter P.M. 1999. The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase, but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase. *Cancer Res.* 59, 1458-1463.
- Nelson, D.L., Cox M.M. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Çeviri Editörü: Prof.Dr.Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.*
- Nery de Matta A., Silva C.B., Hasson-Voloch A. 1996. Effect of Mg⁺²-ATP on acetylcholinesterase of *Electrophorus electricus*(L.). *Z.Naturforsch.* 51, 65-69.
- Newton R. 1974. Amitriptyline and imipramine poisoning in children. *Br. J. Med.* 2, 176-177.
- Nolte H.J., Rosenberry T.L., Neumann E. 1980. Effective charge on acetylcholinesterase active site determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochem.* 19, 3705-3711.
- Noyan, A.. Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. *Metaksan A.Ş. Ankara,* 240-242, 1996
- Nuves-Tavares N., Nery da Matta A., Batista e Silva C.M., Araujo G.M.N., Luoro S.R.W., Hasson-Voloch A. 2002. Inhibition of acetylcholinesterase from

- Electrophorus electricus(L.) by tricyclic antidepressants. *The International J. Biochem.&Cell Biology*, 34, 1071-1079.
- Onat T. Eritrosit Biyokimyasi. In Emerk K, Onat T ed. *Temel Biyokimya* Izmir, Saray
- Ostergard D., Viby-Mogensen J., Hanel H.K., Skovgaard L.T. 1998. Half-life of plasma cholinesterase. *Acta. Anaesth. Scand.* 32, 266-269.
- Ott, P. 1985. Membrane acetylcholinesterases-purification, molecular-properties and interactions with amphiphilic environments. *Biochim. Biophysica. Acta.* 822,375-392.
- Özden M. *Anatomi ve fizyoloji ders kitabı*. Ankara. Kadioğlu Matbaası. 1990: 87-92.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R. 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness. *Trends Neurosci.* 22, 273 80.
- Porcelli, F., Deflini, M., Del Giudice, M.R. 1999. The kinetic inhibition of acetylcholinesterase from human erythrocyte by tacrine and some tacrine derivatives. *Bioorganic Chem.* 27, 197-205.
- Primo-Parmo S.L., Bartels C.F., Wiersema B., Van der Spek A.F.L., Innis J.W., LaDu B.N. 1996. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BChE) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 52-64.
- Prody C.A., Zevin-Sonkin D., Gnatt A., Goldberg O.,Soreq H., 1987. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc. Natl. Acad.* 84, 3555-3559.
- Quin D.M. 1987. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87, 955-979.
- Radi C.Z., Gibney G., Taylor P. 1991 Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol.* 39, 98-104.
- Radi C.Z., Quinn D.M., Vellom D.C., Camp S., Taylor P.J. 1995. Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin. *Biol. Chem.* 270, 20391-20399.
- Radi C.Z., Duran R., Vellom D.C., Li Y.,Cervenanky C., Taylor P.J. 1994.Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J.Biol. Chem.* 269, 11233-11239.
- Ralston J.S., Rush R.S., Doctor B.P., Wolfe A.D. 1985. Acetylcholinesterase from fetal bovine serum. Purification and characterization of soluble G4 enzyme. *The journal of Biological Chem.* 260, 4312-4318.
- Ralston, J. S., Main, A. R., Kilpatrick, B.F., Chasson, A.L. 1983. Use of procainamide gels in the purification of human and horse serum cholinesterase. *Biochem.J.* 211, 243-250 .
- Raveh L., Grauver E., Grunwald J., Cohen E., Ashani Y., 1997. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharm.* 145, 43-53.
- Raveh L., Grunwald J., Marcus D., Papier Y., Cohen E., Ashani Y. 1993. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity: In vitro and in vivo quantitative characterization. *Biochem Pharmac.* 45, 2465-2474.
- Rieger F., Vingy M. 1976. Solubilization and physicochemical characterization of rat brain acetylcholinesterase:development and maturation of molecular forms. *J. Neurochem.* 27, 121-129.

- Robitzki A., Mack A., Chattonet A., Layer P.G. 1997. Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA Butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. *J. Neurochem.* 69, 823-833.
- Robitzki A., Mack A., Hoppe U., Chattonet A., Layer P.G. 1997. Regulation of cholinesterase gene expression affects neuronal differentiation of revealed by transfection studies on reaggregating embryonic chicken retinal cells. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2394-2405.
- Rosenberry T.L., Rabl C.R., Neumann E. 1996. Binding of the neurotoxin fasciculin 2 to the acetylcholinesterase peripheral site drastically reduces the association and dissociation rate constants for N-methylacridinium binding to the active site. *Biochem.* 35, 685-690.
- Rosenberry T.L., Johnson J.L., Cusack B., Thomas J.L., Emani S., Venkatasubban K.S. 2005. Interaction between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 157/158. 181-189.
- Ryhanen R.J.J. 1983. Pseudo-cholinesterase activity in some human body fluids. *Gen. Pharmacol.* 14, 459-460.
- Sabine J.C., *Blood.* 1955.10, 1132-1138.
- Sadar M.H., Kuan S.S., Guilbault G.G. 1970. Trace analysis of pesticides using cholinesterase from human serum, rat liver, electric eel, bean leaf beetle and white fringe beetle. *Analytical Chem.* 42, 1770-1774.
- Saez-Valero J., Poza-Cisneros G., Vidal C.J. 1996. Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma. *Neurosci. Lett.* 206, 173-176.
- Saez-Valero J., Vidal C.J. 1996. Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochem. Biophys. Acta.* 1317, 210-218.
- Sanganahalli B.G., Joshi P.G., Joshi N.B. 2000. Differential effects of tricyclic antidepressants drugs on membrane dynamics-a fluorescence spectroscopic study. *Life Sci.* 68, 81-90.
- Saraçoğlu, M., Tanrıdağ, T., Tanrıdağ, O. 1998. Alzheimer Hastalığında Kognitif Terapi ve Yaklaşımları. *Demans Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*; 8, 197-201
- Sarter, M., Hasselmo, M., Bruno, J., Givens B., 2005. Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res. Rev.* 48, 98-111.
- Saxena A., Hur R., Doctor B.P. 1998. Allosteric control of acetylcholinesterase activity by monoclonal antibodies, *Biochem.* 37, 145-154.
- Saxena A., Redman A.M.G., Jiang X., Lockridge O., Doctor P. 1997. Differences in active site gorge dimension of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochem.* 36, 14642-14651.
- Schenk J., Löffler W., Weger N. 1976. Therapeutic effects of HS-3, HS-6, benactyzine and atrophine in soman poisoning dogs. *Arch. Toxicol.* 36, 71-81.
- Schmidt- Danner C., Kalisz H.M., Safarik I., Schmid R.D. 1994. Improved properties of bovine erythrocyte acetylcholinesterase, isolated by papain cleavage. *Journal of Biotechn.* 36, 231-237.
- Segel, I.H. 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Sekar, M.C., Webb, G., Roufogalis, B.D., 1980. Differential behaviour of eel and erythrocyte acetylcholinesterase on N-methylacridine affinity columns.

- Importance of ligand affinity and concentration. *Biochim. Biophys. Acta* 613, 420-428.
- Shafferman A., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Grosfeld H., Ordentlich A. 1992. Mutagenesis of human acetylcholinesterase identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biochem.* 267, 640-648.
- Shafferman A., Velan B., Ordentlich A., Konman C., Grosfeld H., Leitner M., Flashner Y., Cohen S., Barak D., Ariel N. 1992. Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.* 11, 3561-3568.
- Shen Z.X. 2004. Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Med. Hypothesis.* 63, 308-321.
- Shih T.-M., Koviak T.A., Capacio B.R. 1991. Anticonvulsant for poisoning by the organophosphorus compound soman: Pharmacological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 349-362.
- Small D.H., Moir R.D., Fuller S.J., Michaelson S., Bush A.I., Li Q.X., Milvard E., Hilbich C., Weidmann A., Beyreuther K., Masters C.L. 1991. A protease activity associated with acetylcholinesterase releases the membran bound form amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Biochem.* 30, 10795-10799.
- Smith C., Marks A.D., Lieberman M., 2007. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım 2. Baskı Güneş Tıp Kitabevleri
- Soderlund D.M. 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. (Molecular mechanism of resistance to agrochemicals. *Chem. Plant Protect.* 13, 21-73.
- Son J.Y., Shin S., Choi K.H., Park I.K. 2002. Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese Quail brain by affinity chromatography. *The international Journal of Biochem.&Cell Biology.* 34, 204-210.
- Soreq H., Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase-new roles for old actor. *Nat. Neurosci. Rev.* 2, 294-302.
- Soreq K., Zakut H. 1993. Human cholinesterase and anti-cholinesterase. Academic Press. Newyork.
- Spinedi A., Pacini L., Luly P. 1989. A study of the mechanism by which some amphiphilic drugs affect human erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Biochem. J.* 261, 569-573.
- Sun H., Yazal J.E., Lockridge O., Schopfer L.M., Brimijoin S., Pang Y.P. 2001. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 276, 9330-9336.
- Snyder S.H., Yamamura H.I. 1977. Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor. *Arch. Gen. Psychiatry.* 34, 236-239.
- Szeglets T., Mallender W.D., Rosenberry T.L. 1998. Nonequilibrium analysis the mechanistic interpretation of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochem.* 37, 4206-4216.
- Szeglets T., Mallender W.D., Thomas P.J., Rosenberry T.L. 1999. Substrate binding to peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry.* 38, 122-133.
- Şahin, A. H. 2002. Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı. *Demans dergisi,* 2, 69-73.
- Talesa, V.N. 2001, Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 122, 1961-1969.

- Tariq S.A., Khan H., Muhammad N., Khan A.Z., Haleemi A. 2013. Inhibition of erythrocytic acetylcholinesterase by Ampicillin and Cephalexin: Possible role of uncompetitive inhibition. *Molecular & Clinical Pharmacology*. 4, 38-43.
- Taylor P., Lappi S. 1975. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase the site and specificity of propidium binding. *Biochem*. 14, 1989-1997.
- Taylor P., Radi C.Z. 1994. The cholinesterases: From genes to protein. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol*. 34, 281-320.
- Thacker P.D. 2003. Surprising discovery with alzheimer's medication. *Drug Discovery Today*. 1, 8-9.
- Tougu V. 2001. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. *Curr. Med. Chem*. 1, 155-170.
- Toutant J.P. 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular form. *Prog. Neurobiol*. 32, 423-446.
- Tsagkarakou A., Leeuwen T.V., Khajehalil A., Grispuou M., Williams M.S., Tirry L., Vontas J. 2009. Identification of Pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two spotted spider Mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biology*. 18, 583-593.
- Tunek A., Levin E., Svesson L.A. 1998. Hydrolysis of 3H-bambuterol, a carbamate prodrug of terbutalin in blood from human and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol*. 37, 3867-3871.
- Viby-Mogensen J. 1981. Succinylcholine neuromuscular blockade in subject homozygous for atypical plasma cholinesterase. *Anesthesiology*. 55, 428-434.
- Vontas J.G., Cosmidis N., Loukas M., Tsakas S., Hejazi M.J., Ayoutanti A., Hemingway J. 2001. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic. Biochem. Physiol*. 71, 124-132.
- Weitnauer E., Robitzki A., Layer P.G. 1998. Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chicken and in horse but much lower than in fetal calf serum. *Neurosci. Lett*. 254, 153-156.
- Wetherel J.R., French M.C., 1986. The hydrolysis of succinylcholine and related thiocholine esters by human plasma and purified cholinesterase. *Biochem. Pharmacol*. 35, 939-945.
- Worek F., Eyer P., Kiderlen D., Thiermann H., Szinicz L. 2000. Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase. *Arch. Toxicol*. 74, 21-26.
- Xie W., Stribley J.A., Chatonnet A. 2000. Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking AChE. *J Pharmacol Exp Ther*. 293, 896-902.
- Xie W., Altamirano C.V., Bartels C.F., Speirs R.J., Cashman J.R., Lockridge O. 1998. An improved cocaine hydrolase: The A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. *Mol. Pharmacol*. 55, 83-91.
- Yalgin, Ç. Alzheimer Hastalığında Kolinomimetik Tedavisi. İstanbul, Ekim-2001.
- Yu S.J. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press Taylor-Francis group, 250 pp.
- Zakut H., Erlich G., Ayalan A., Prody C.A., Malinger G., Seidman S., Ginzberg D., Kehlenbach R., Soreq H. 1990. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J.Clin. Invest*. 86, 900-908.

- Zhu K.Y., Brindley W.A. 1992. Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (*Hemiptera: Miridae*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 253-260.
- Zhu K.Y., Brindley W.A. 1992. Enzymological and inhibitory properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (*Hemiptera: Miridae*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 245-251.
- Zhu K.Y., Clark J.M. 1994. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 453-461.
- Zhu K.Y., Clark J.M. 1995. Comparisons of kinetic properties of acetylcholinesterase purified from azinphosmethyl-susceptible and resistant strains of Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51, 57-67.
- Zhu M., Xie Y., Sun M., Fang Y. 1993. Purification and properties of acetylcholinesterase from human brain. *Science in China. Series B. Chemistry. Life Sciences and Earth Sciences.* 10, 1207-1215.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Erzurum'un Hasankale ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Hasankale'de, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2000 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden 2004 yılında üçüncülükle mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2007 yılında “Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi” konulu tezini tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk annesidir.