



**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNDE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ömer AKDENİZ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Doç.Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI

Temmuz-2019

Her hakkı saklıdır.

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE
BAZI PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ömer AKDENİZ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI

Temmuz-2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNDE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Ömer AKDENİZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 16/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selçuk ÇEKER

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Namık KILINÇ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 22/07/2019 tarih ve 19. / 29.11 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ömer AKDENİZ

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Bakteriler, virüsler ve çeşitli haşerelerin insanlar, çevre ya da gıdalarına olan zararlı etkilerini yok etmek için kullanılan kimyasal maddeler, organik bileşenler ya da dezenfektanlar gibi bileşikler ve yöntemlere pestisit ismi verilir. Çalışmamızda bazı pestisitlerin (Propoksür, oksamil, karbofuran, metomil, simazin ve karbaril) AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla enzimlerin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için IC₅₀ değerleri 0,544 ile 11,270 µM arasında olduğu hesaplandı.

2019, 46 sayfa

Anahtar Kelimeler: Pestisit, Asetilkolinesteraz, Butirilkolinesteraz, İnhibisyon

ABSTRACT

Ms. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE ENZYMES

Ömer AKDENİZ

Ağrı İbrahim Çeçen University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Compounds and methods such as chemicals, organic compounds or disinfectants used to eliminate the harmful effects of bacteria, viruses and various pests on humans, the environment or food are called pesticides. In our study, the inhibition effects of some pesticides (Propoxure, oxamyl, carbofuran, methomyl, simazine and carbaryl) on AChE and BChE enzymes were investigated. For this purpose, IC_{50} values were calculated to be between 0,544 and 11,270 μ M for these substances which had inhibitory effect on the activities of enzymes.

2019, 46 pages

Keywords: Pesticide, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Inhibition

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler	1
1.2. Asetilkolinesteraz.....	5
1.2.1.Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması.....	5
1.2.2.Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	6
1.2.3.Asetilkolinesteraz inhibitörleri.....	7
1.2.4.AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları.....	7
2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları.....	8
2.6. Çalışmada Kullanılan Pestisitler.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	17
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	17
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	18
3.2. Yöntem	18
3.2. 1. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi	18
3.2.2. İnhibitörler için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1. İnhibitörler İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları....	20
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	25
KAYNAKLAR	31

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovin serum albumin
AChE	Aserilkolinesteraz
BChE	Butirilkolinesteraz
E	Enzim
EC	Enzim komisyonu
I	İnhibitör
ES	Enzim-substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
P	Ürün
S	Substrat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
AChTI	Asetiltiyokoliniyodat
BChTI	Butiriltiyokoliniyodat
Tris	Trihidroksimetil aminometan
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	3
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın üç boyutlu yapısı.....	5
Şekil.1.3. Asetilkolinin yapısı.....	5
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.....	6
Şekil 1.5. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	6
Şekil 1. 6. Asetilkolinesteraz inhibisyon mekanizması.	8
Şekil 1. 7. Kolinesterazların moleküler biçimleri	9
Şekil 4.1. Propoksür ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	20
Şekil 4.2. Oksamil ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	21
Şekil 4.3. Karbofuran ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	21
Şekil 4.4. Metomil ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	22
Şekil 4.5. Simazin ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	22
Şekil 4.6. Karbaril ile AChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	23
Şekil 4.7. Oksamil ile BChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	23
Şekil 4.8. Metomil ile BChE enzimini IC ₅₀ grafiği.....	24
Şekil 5.1. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme..	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Propoksür pestisiti hakkında genel bilgiler.....	9
Çizelge 1.2. Oksamil hakkında genel bilgiler.....	10
Çizelge 1.3. Karbofuran hakkında genel bilgiler.....	11
Çizelge 1.4. Metomil hakkında genel bilgiler.....	12
Çizelge 1.5. Simazin hakkında genel bilgiler.....	13
Çizelge 1.6. Karbaril hakkında genel bilgiler.....	14
Çizelge 4.1. AChE ve BChE enzimleri için IC ₅₀ değerleri.....	24



1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

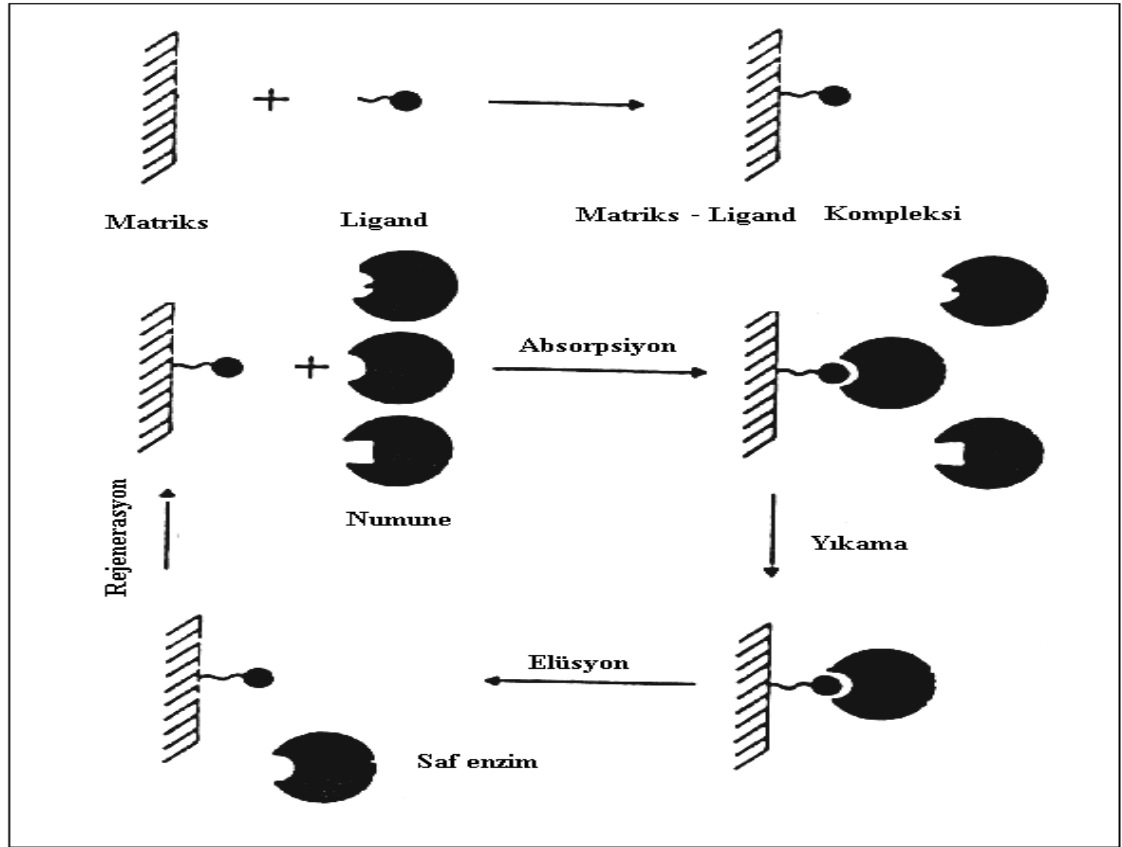
Enzimler, çoğunluğu protein yapısında olan ve canlılardaki biyokimyasal tepkimeleri gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzimlerde tıpkı yapısal proteinler gibi, 12.000 ile 1.000.000 Da aralığında değişen molekül ağırlığına sahiptir. Birçok enzim aktiviteleri için protein yapısı dışında herhangi bir kimyasal gruba ihtiyaç duymaz. Bazı enzimler ise kofaktör adı verilen Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} veya Se^{2+} gibi iyon ya da iyonlara ihtiyaç duyar. Bazı enzimler ise koenzim adı verilen kompleks yapıdaki organik veya metaloorganik yapıli moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bazı enzimlerin ise aktiviteleri için hem bir veya daha fazla metal iyonuna hem de koenzime ihtiyacı vardır. Protein yapısına çok güçlü hatta kovalent olarak bağlanan koenzim ya da metal iyonlarına prostetik grup adı verilir. Metal iyonları ya da koenzimi ile beraber katalitik aktif olan enzim yapısına holoenzim adı verilir. Bu şekilde aktif olabilen enzimlerin yalnızca protein kısmı apoenzim ya da apoprotein olarak adlandırılır. Koenzim olarak, koenzim A; açıl grupları, nikotinamid; elektron, tiamin pirofosfat; aldehitler, gibi işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak katalizlemeye yardımcı olurlar. Koenzimlerin çoğunluğunu gıdalar yolu ile alınan vitaminler oluşturmaktadır (Nelson and Cox, 2005).

Çeşitli organizmalar kendilerine özgü olan proteinleri içerdikleri gibi, hücre türleri de yüzlerce farklı protein içermektedir. Bununla birlikte proteinler, biyolojik aktivitesini ancak belli sıcaklık ve pH sınırlarında gösterebilir. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya bir dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklerle rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binden fazla enzim kısmi olarak saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Enzimatik aktivitesi olmayan birçok protein farklı canlılardan çok yüksek saflık derecesinde elde edilmiştir. Proteinler sıcaklık, üç boyutlu yapıları, yüzey gerilimi, pH gibi birçok faktörlerden hızlı şekilde etkileşerek çok kısa sürede enzim aktiviteleri değişiklik göstere bilmektedirler. Bu sebepten enzim izolasyonu için yapılması gereken deneyleri oldukça dikkatli şekilde yayılması gerekir.

Saflaştırmak için genel olarak enzimlerin;

1. Moleküler ağırlıkları,
2. Çözünürlük farkları,
3. Adsorbsiyon farklılıkları,
4. Elektriksel yük farklılıkları esasına göre gerçekleştirilir (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan yöntemlerden birispesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinleri afinite kromatografisi kullanarak tek basamakta yüzlerce proetin bulunduğu karışımlardan ayırtedilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir, saflaştırılmak istenen molekülün, matriks diye adlandırılan kolona kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak sephadex, sepharose, biogel ve selüloz gibi farklı materyaller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılmak istenen maddeye spesifik ve tersinir bağlanma özelliğine sahip olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) direk matrikse bağlamak suretiyle elde edilen adsorbanlar, matriks ve ligandla etkileşen maddeler arasında sterik engelden dolayı daha küçük ayırma kapasitesi gösterebilir. Bu durumda uzantı kolu, etkili bir saflaştırmayı kolaylaştırmak amacı ile matriksle ligand arasına bağlanarak kullanılır (Keha ve Küfrevioğlu, 2008).



Şekil 1.1. Afinitite kromatografisinin şematik gösterimi.

Küçük bir grup olan katalitik RNA molekülleri dışında tüm enzimler protein yapısındadır. Katalitik aktiviteleri, doğal protein yapılarının korunmasına bağlıdır. Eğer enzimlerin doğal yapıları bozulursa ya da alt birimlerine ayrıştırılırsa aktivitesi çoğu zaman kaybolur. Ya da enzimi oluşturan yapıtaşları olan amino asitlere ayrıştırılırsa, katalitik aktivitesi ortadan kalkar. Bu sebepten enzimlerde birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılar gibi üçboyutlu yapıların oluşturulması katalitik aktivite için esastır (Senturk, 2017).

Enzimlerin etkileştiği maddeye substrat adı verilir. Substratlar enzimlerle etkileştikten sonra ürüne dönüşür sonrasında ürün ve enzim birbirinden ayrılır. Reaksiyon esnasında enzimlerin üç boyutlu yapısında değişiklik olabilir fakat reaksiyon sonunda başlangıç formuna dönerler. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarına ilaveten hücrelerde metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenlerler. Bazı enzimlerin adlandırması substrat adının sonuna “-az” son eki getirilerek yapılırken, bazı enzimlerde ise ilk bulan bilim insanının koyduğu isimlerle

tanınır. Örneğin; üreaz, fosfataz, pepsin ve tripsin gibi. Ancak verdiğimiz bu örneklerin çoğusu enzimlerin katalizledikleri fonksiyonlar hakkında sınırlı bilgi verirler. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için enzim konseyi tarafından belirlenen 4 rakamlı bir kod numarası belirlenmiştir (Lehninger, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2008).

Bugün yaklaşık 2000'den fazla farklı enzim türü keşfedilmiştir. Enzimler için hem katalizledikleri reaksiyon hem de substrat özgüllükleri dikkate alınarak bir sınıflandırma yöntemi geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan E.C. numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtirken sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıftaki sırasını gösterir.

Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgüllüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (sınıf 1), bir redoks sisteminden diğerine indirgeyici ekvalentleri katalizlerler. Transferazlar (sınıf 2) bir substrattan diğerine hidrojen dışındaki diğer fonksiyonel grupların transferini katalizlerler. Çoğu oksidoredüktazların ve transferazların koenzimlere gereksinimi vardır. Hidrolazlarda (sınıf 3) grup transferinde rol alırlar ancak alıcı her zaman bir su molekülüdür. Liyazlar (sınıf 4) bir çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. İzomerazlar (sınıf 5) geometrik, optik ya da yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini kataliz eden enzimlerdir. Ligazlar (sınıf 6, sentetazlar) tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle, her zaman nükleosit trifosfatların hidrolizi ile birlikte gerçekleşir (Koolman *et al.*, 2003; Keha ve Küfrevioğlu, 2008).

Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristalleştirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar. Katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Enzimler, protein yapısında olduklarından protein özelliklerine sahiptirler.

Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı

demektir. Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

Substrat konsantrasyonu

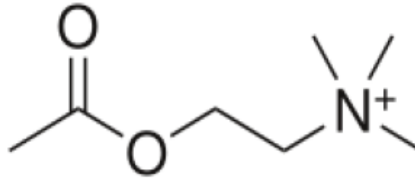
- a. Enzim konsantrasyonu
- b. pH
- c. İyonik şiddet
- d. İnhibitor ve aktivatörlerin varlığı
- e. Sıcaklık

1.2. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (E.C. 3.1.1.7) (AChE, Asetilhidrolaz), nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen hidrolaz grubundan bir enzimdir. AChE başlıca nöromuskular kavşakta ve sinaptik iletimi sonlandırdığı kolinerjik beyin sinapslarında bulunur. Enzimlerin karboksilesteraz ailesine aittir. AChE enzimi pestisitler ve sinir gazları gibi organofosfat türevi bileşiklerle inhibisyon için birincil hedeftir.

1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

Oldukça yüksek aktiviteye sahip olan AChE enzimi saniyede yaklaşık olarak 25.000 asetilkolin (ACh) molekülünü parçalar. Bu enzimin aktif bölgesi katyonik alt birim ve anyonik alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşur. AChE'nin yapısı ve reaksiyon mekanizması enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (Susman *et al.*, 1991). Enzimin mekanizmasının daha iyi anlaşılması için önemli bir nörotransmitter madde ve enzimin substratı olan asetilkolinin kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 1. 3. Asetilkolinin yapısı.

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



Şekil 1. 4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

Enzimdeki anyonik alt birim asetilkolinin pozitif kuaterner amini ile bağlanır. Ayrıca bu bölgeye diğer katyonik substratlar ve inhibitörler de bağlanır. Katyonik substratlar, aktif bölgeye giden aralıkta sıralanan 14 aromatik amino asit ile etkileşimden başka anyonik bölgede negatif yüklü amino asitlerle bağlanmazlar (Ariel *et al.*, 1995). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça yüksek bir korumaya sahiptir (Ordentlich *et al.*, 1993). Aromatik asitler arasında triptofan 84 kritik öneme sahiptir ve bu amino asitin alaninle yer değiştirmesi enzimin reaktivliğini 300 kat azaltır (Tougu, 2001). Aktif bölgeye giden bu aralık yaklaşık olarak 20 angstrom uzunluğuna sahiptir. Aktif bölge enzimin alt kısmından 4 angstrom yukarıda bir konuma sahiptir (Harel *et al.*, 1993).

Asetilkolinin asetat ve koline hidrolizlendiği esteratik alt birim katalitik üçlü; serin 200, histidin 440, glutamat 327 amino asitlerinden oluşmuştur. Bu üçlü amino asit grubu, 3. amino asitin olması gereken aspartat yerine glutamat gelmesi dışında serin proteazlarla benzer dizilime sahiptir (Tripathi, 2008). Karboksil esterinin hidroliz reaksiyonu açıl-enzim ve serbest kolinin oluşumuna neden olur. Daha sonra açıl-enzim su (H₂O) molekülü tarafından nükleofilik atağa uğrar ve histidin 440 amino asitinin yardımıyla asetik asiti serbest bırakılır ve tekrar serbest enzim oluşur (Pohanka, 2011).

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

Nörotransmisyon sırasında ACh sinir hücresinden sinaptik boşluğa salınır ve post-sinaptik membrandaki ACh reseptörlerine bağlanır. Böylece bir sinyal oluşur. Aynı şekilde post-sinaptik membranda konumlu AChE enzimi asetilkolini hidrolize ederek sinyal iletimini durdurur. Serbest kalan kolin önceki sinaptik sinir hücresi

tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferaz enzimi tarafından asetil-CoA ile reaksiyonundan tekrar asetilkolin sentezlenir (Whittaker, 1990). Aşağıdaki şekilde mekanizma gösterilmiştir:

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

Bir asetilkolinesteraz inhibitörü AChE enzimini inhibe ederek asetilkolinin yıkımını engeller. Böylece nörotransmitter asetilkolinin konsantrasyonunu ve işlev süresini artırır. AChE inhibitörleri geri dönüşümlü, yarı geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak etki ederler (Pohanka, 2012; Zilbeyaz *et al.*, 2018).

Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü AChE inhibitörleri çoğunlukla tedavi amaçlı kullanılır. Bu inhibitörlere karbamatlar, fizostigmin, neostigmin, pyridostigmine, ambenonium, demekaryum, rivastigmin, fenantren türevleri, galantamin, kafein (yarışmasız), piperidinler, donepezil, takrin (tetrahidroaminokridin, THA), edrofonyum, Huperzin A, ladostigil, ungeremine, lactucopirin örnek olarak verilebilir (Pohanka 2012; Zilbeyaz *et al.*, 2018; Cavdar *et al.*, 2019; Ozil *et al.*, 2019).

Yarı-geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılır. Bu inhibitörlere organofosfatlar, ekotiofat, sarin, diazinon, ethiofencarb, propamocarb, diizopropilfluorofosfat, malathion, soman, galantamin, cadusafos, klorprifos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, parathion, aldicarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb, pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbetamit, karbofuran, karbosulfan, chlorbufam, chlorpropham, formetanate, methiocarb, methomyl, propham, onchidal ve kumarinler örnek olarak verilebilir (Pohanka, 2012).

1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları

AChE enzimi inhibitörleri birçok alanda kullanılır. Bu alanlar aşağıda sıralanmıştır.

- Doğal olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı zehirler AChE enzimini inhibe edebilirler.

- Sinir gazları kimyasal silah olarak kullanılabilir.
- İnsektisitlerde bulunurlar (Colovic *et al.*, 2013).
- Tıbbi amaçlı olarak, glaucoma ve myasthenia gravis tedavisinde, antikolinerjik zehirlenmeye karşı antidot olarak, non-depolarlayıcı kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmek için, Alzheimer gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarının tedavisinde özellikle tepkisizliğe karşı, Lewy Body Dementia ve Parkinson Hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Taylor *et al.*, 2012). Butirilkolinesteraz (BChE, E.C. 3.1.1.8) enzimi inhibitörleride son yıllarda AChE inhibitörlerigibi Alzheimer hastalığı tedavisinde önemli uygulama alanı bulmuştur (Taylor *et al.*, 2012)..

Asetilkolinesterazın inhibisyon mekanizmasını gösteren şekil aşağıda verilmiştir:

2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları

Kolinesteraz enzimleri (AChE ve BChE) moleküler formlarının farklılığına, çözünürlük özelliklerine, kuarterner yapıları ve kendilerini oluşturan alt birim sayısına göre sınıflandırılırlar (Massoulie *et al.*, 1993; Massoulie, 2002). AChE enzimi Tip I G2 yapısındadır ve glikofosfatidilinositol çıpası içerir (Massoulie *et al.*, 1993). Tip II G1 ve G2 yapısındaki AChE ve BChE enzimlerinin ise hidrofobik yapıdaki bir çıpa ile zara tutunurlar (Massoulie *et al.*, 1993; Massoulie *et al.*, 2008). A12 asimetrik yapısı içeren disülfid bağları ile oluşan üç katalitik alt birim birbirine, kollajen yapıda üçlü heliks kuyruk ile tutunarak bu yapıyı oluşturur (Massoulie *et al.*, 1993).

İnsan ve sığır gibi memelilerin beynindeki kaudat çekirdek AChE'si G4 tetramerleridir, ayrıca asimetrik kollajen kuyruklu AChE memeli kas dokusunda bulunmaktadır, (Şekil 2.4) (Chatonnet and Lockridge, 1989; Lockridge, 1988).

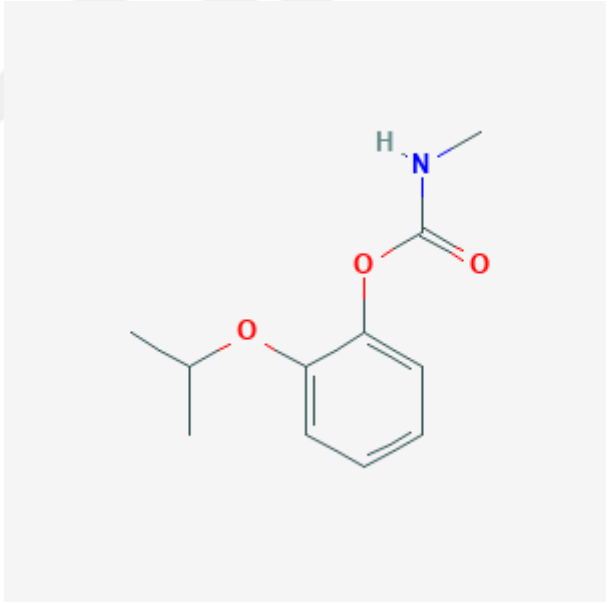
İnsan serum BChE enzimi ise iki disülfid bağı ile birbirine bağlanmış dimerlerden oluşan G4 tetrameri halinde bulunmaktadır (Chatonnet and Lockridge, 1989; Blong *et al.*, 1997).

Kolinesterazlar, glikoprotein yapıda olan monomer veya oligomerlerdir (Chatonnet and Lockridge, 1989). İnsan serumunda BChE'nin büyük bir kısmı çözünebilir halde olan G4 formunda bulunmaktadır, ne bir glikolipid çıpa ne de

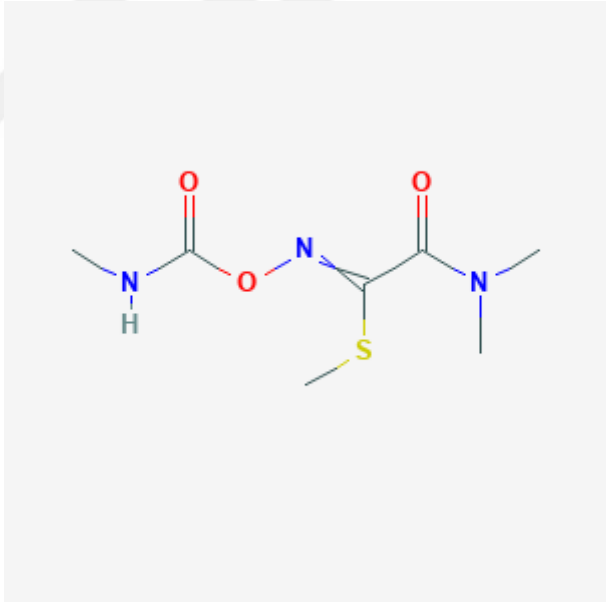
kollajen kuyruğu vardır, yapısı birbirine eş dört alt birimin oluşturduğu tetramerdir (Masson and Lockridge, 2010). BChE'nin bir monomerinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 90 kDA, bir dimeri ise yaklaşık 180 kDa'dır (Lockridge, 1990).

2.6. Çalışmada Kullanılan Pestisitler

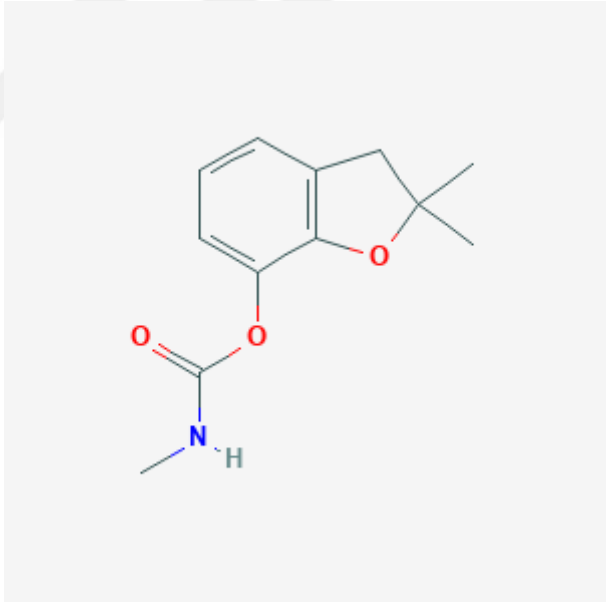
Çizelge 1.1. Propoksür pestisiti hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Propoksür
Formülü	$C_{11}H_{15}NO_3$
Molekül ağırlığı	209.245 g/mol
Molekül yapısı	

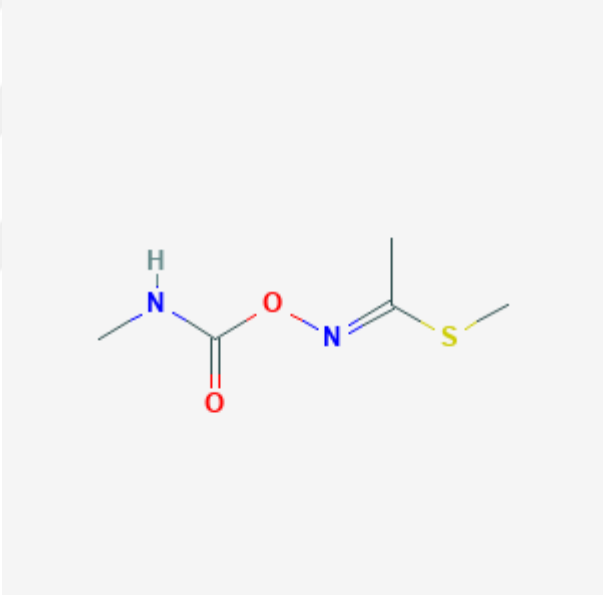
Çizelge 1.2. Oksamil hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Oksamil
Formülü	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Molekül ağırlığı	219.259 g/mol
Molekül yapısı	

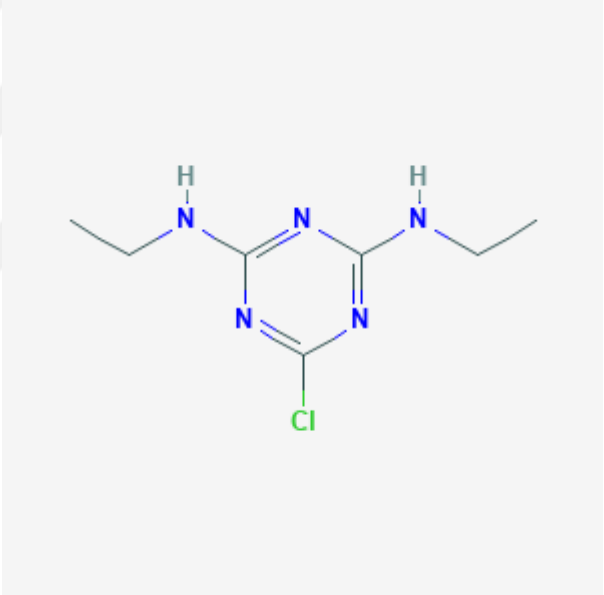
Çizelge 1.3. Karbofuran hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Karbofuran
Formülü	$C_{12}H_{15}NO_3$
Molekül ağırlığı	221.256 g/mol
Molekül yapısı	

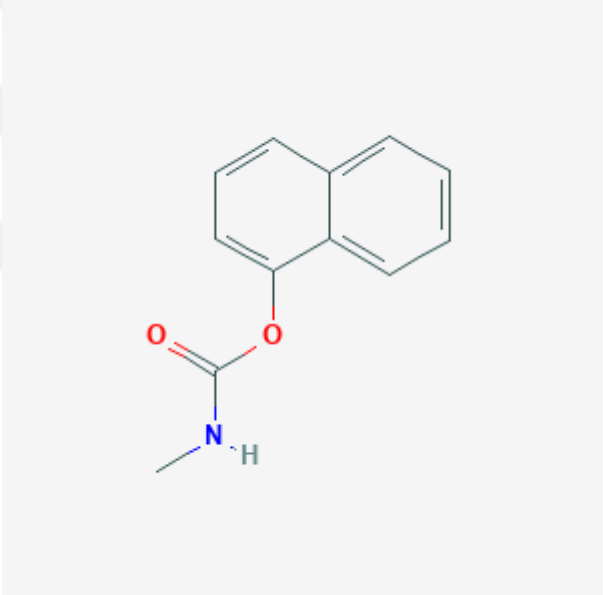
Çizelge 1.4. Metomil hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Metomil
Formülü	$C_5H_{10}N_2O_2S$
Molekül ağırlığı	162.207 g/mol
Molekül yapısı	 <chem>CNC(=O)ON=CSC</chem>

Çizelge 1.5. Simazin hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Simazin
Formülü	$C_7H_{12}ClN_5$
Molekül ağırlığı	201.658 g/mol
Molekül yapısı	

Çizelge 1.6. Karbaril hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Karbaril
Formülü	$C_{12}H_{11}NO_2$
Molekül ağırlığı	201.225 g/mol
Molekül yapısı	

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kolinesteraz enzimleri, birçok dokuda, vücut sıvıların ve plazmada bulunan enzimlerdir. İnhibitöre hassasiyet seviyelerine ve substrat özgüllüklerine göre asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz diğer iki gruba ayrılırlar (Radic *et al.*, 1993). AChE enzimi kas, beyin ve eritrosit zarında bulunan asıl kolinesteraz enzimidir (Grisaru *et al.*, 1999). Kolinerjik sinapslardan asetilkolinin salınmasından sonra kolinesterazlar yardımıyla parçalanması sonucu sinir iletileri sonlanır (Massoulie *et al.*, 1993). BChE enzimi ise kolin esterlerini ve bu bileşiklerin tiyol analoglarını, nitroasetanilidleri, ksenobiyotikleri, amitriptilin, aspirin, drofenin ve benaktizin gibi ilaçları; pestisitler, süksinildikolin, insektisitler gibi karbamat türevlerini ve birçok organofosfat yapısındaki maddeleri parçalayabilen, serumda bulunan ana detoksifiye edici enzimlerdendir (Massoulie *et al.*, 1993; Masson *et al.*, 2010). Birçok tür kimyasal bileşiği hidrolizleyebilmesine rağmen, BChE enziminin doğal substratı bilinmemektedir (Masson *et al.*, 2010). Ancak, en uygun substratı bütirilkolindir (Augustinsson *et al.*, 1971). Bütirilkolin ise sıgır kornea epitelinde ve beyinde tespit edilmiştir, görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, nörotransmitter özellikte bir madde olduğu düşünülmektedir (Duysen *et al.*, 2012).

Dekametonyum, edrofonyum ve propidyum BW284C51'e benzer şekilde etki gösterebilen ligandlar olarak görev yaparlar (Masson *et al.*, 1994; Saxane *et al.*, 1997). Dekametonyum BChE enziminin yarışmalı inhibitörü olarak davranırken, AChE enzimi için ise karışık tip inhibisyon görülmektedir (Saxane *et al.*, 1997). Propidyum bileşiği AChE enziminin periferik anyonik bölgesine bağlanarak inhibisyon etkisini gösterirken AChE enziminin aktif bölgesiyle etkileşemeyen bir ligand olmakla birlikte BChE enziminin aktif bölgesi ile etkileşebilmektedir (Saxane *et al.*, 1997; Bourne *et al.*, 2010).

Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan takrin, serum BChE ve AChE enzimlerini çok etkili bir şekilde inhibe edebildiği için bu hastalıkta ilaç olarak kullanılmaktadır (Saxane *et al.*, 1997). Takrin molakülü kolinesteraz enzimlerinin aril

açıl amidaz (AAA) ve esteraz aktivitelerini etkileyerek inhibisyon etkisini göstermektedir (Rajesh *et al.*, 2009a).

Kaslardaki sinir iletimini engellemek amacı ile kullanılan bir ligand olan süksinilkolin, nikotinik asetilkolin reseptörlerini yarışmalı inhibe ederek kas gevşemesini sağladığı için tıbbi müdahalelerde anestezi ilaç olarak kullanılmaktadır (Monaharan *et al.*, 2007; Lockridge, 1982). Süksinilkolinin inhibe edemediği atipik BChE varyantları, süksinilkolin apnesi diye adlandırılan klinik olgunun ortaya çıkmaktadır (Lockridge, 1982).

Terpenlerin seskuiterpen sınıfından olan huperzin A molekülü, doğal bir alkaloid türevidir ve kolinesteraz enzimlerini inhibe edebildiği için Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (Rajesh *et al.*, 2009a). Kolinesterazların AAA aktivitesini inhibe edici özelliği bulunmaktadır (Rajesh *et al.*, 2009a; Rajesh *et al.*, 2009b).

Karaciğerde sentezlenip plazmaya aktarılan BChE enzimi insanlarda serumdaki proteinlerin yaklaşık % 0.01'ini teşkil etmektedir (Massoulie *et al.*, 2008). Ayrıca BChE enziminin bir görevinde toksik bileşiklerin AChE enzimine ulaşmadan detoksifiye edilmesinin sağlanmasıdır (Soreq and Seidman, 2001; Malfitano *et al.*, 2014). BChE enzimi kalp, damar, beyin, ince barsak, plazma, akciğer, kas, karaciğer, dalak, tükürük ve deri olmak üzere birçok dokuda bulunmaktadır (Soreq and Seidman, 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneylerde kullanılan NaOH, Tris, NaCl, NaCH₃COO, HCl, glisin, H₃PO₄, NaN₃, gliserol, potasyum fosfat, asetiltiyokolin iyodat, potasyum bisfosfat, butiriltiyokolin iyodat, HCH₃COO, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit), KCl, etanol, E.Merck AG'den satın alındı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmamızda yararlanılan alet ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

Soğutmalı santrifüj	: Thermo SL16R
Spektrofotometre	: Shimadzu 2800
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Peristaltik pompa	: Gilson miniplus3
Hassas terazi	: Ohaus PA214C
Otomatik pipet	: Thermo scientific
Magnetik karıştırıcı	: Stuart SB162
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu:	Arçelik Freezer (-20°C'ye kadar)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözeltiler hazırlanırken kullanılan saf su ve deionize sudur. Bazı çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan suda sterildir.

1. 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,0 (AChE enzimi aktivite ölçümü için): 12,11 g Tris 950 ml distile suda çözülerek, 1 N'lik HCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlandı.

2. 0,1 M KH_2PO_4 (pH=7,8) (BChE enzimi aktivite ölçümü için): 0,68 g KH_2PO_4 tartılarak 85 ml distile suda çözüldü, 1 N'lik HCl ile pH=7,8'e ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. 2 mM asetiltiyokolin iyodat çözeltisi: 5,96 mg asetiltiyokolin iyodat alınarak 10 ml saf suda çözülerek hazırlanır.

4. 2 mM S-butiriltiyokolin iyodat çözeltisi: 6,34 mg S-butiriltiyokolin iyodat alınarak 10 ml saf suda çözülerek hazırlanır.

5. 2 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi: 7,73 mg DTNB alınarak 10 ml 0,1 M KH_2PO_4 (pH=7,8) tamponunda çözülerek hazırlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ellman yöntemine göre AChE/BChE inhibitör etkisi ölçülmesi

AChE ve BChE enzimleri spektrofotometrik olarak Ellman yöntemine göre tayin edilecektir. Ellman yönteminde, substrat olarak oksit ester olan asetilkolin yerine tiyol ester olan asetiltiyokolin kullanılır. Ellman metodunun prensibine göre asetiltiyokolin, asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilir ve hidroliz sonucu açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olan DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucunda sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Reaksiyon sonunda oluşan bu sarı renkli bileşiğin oluşum hızı (rengin şiddeti), 412 nm de absorbans ölçümü yapılarak belirlenir (Ellman *et al.*, 1961). Bu sarı rengin şiddeti, AChE/BChE enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

AChE / BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

$$EU / ml = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_T}{V_E} \times \frac{1}{13,6}$$

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki simgeler aşağıdaki gibidir;

EU / ml	: 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri
ΔOD	: Zamana göre absorbans farkı değişimi
T	: Zaman (Dk)
13,6	: DTNB için ekstinksiyon katsayısı
V_T	: Toplam hacim (ml)
V_E	: Küvete katılan enzim miktarı (ml)

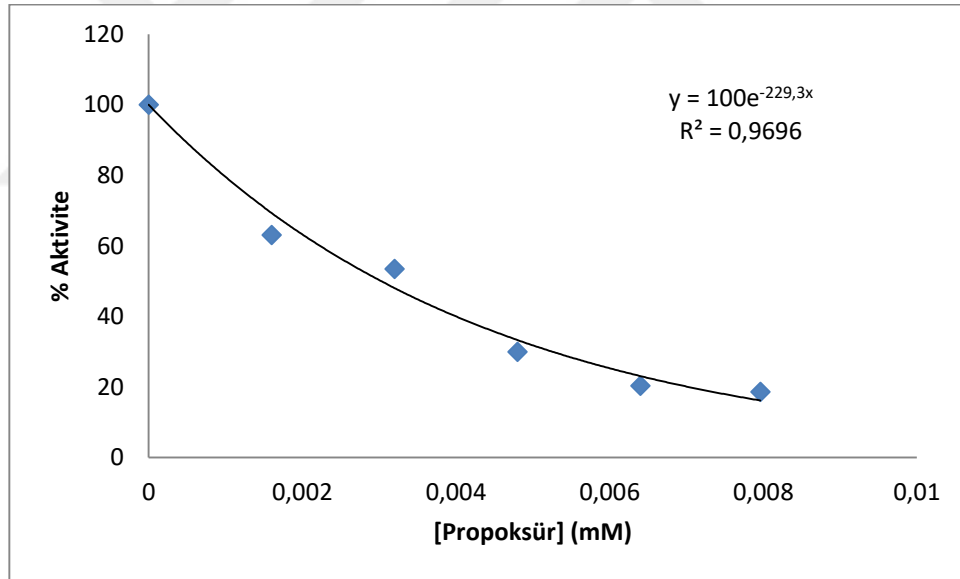
3.2.2. İnhibitörler için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

Bazı ilaç etken maddeler için farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteleri ölçülerek % aktivite - [I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk, 1934).

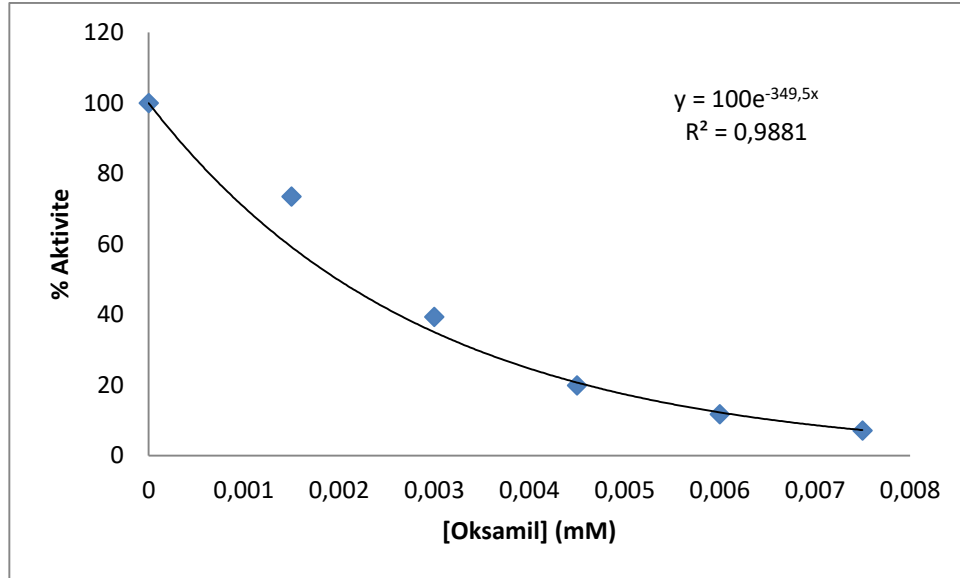
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnhibitörler İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

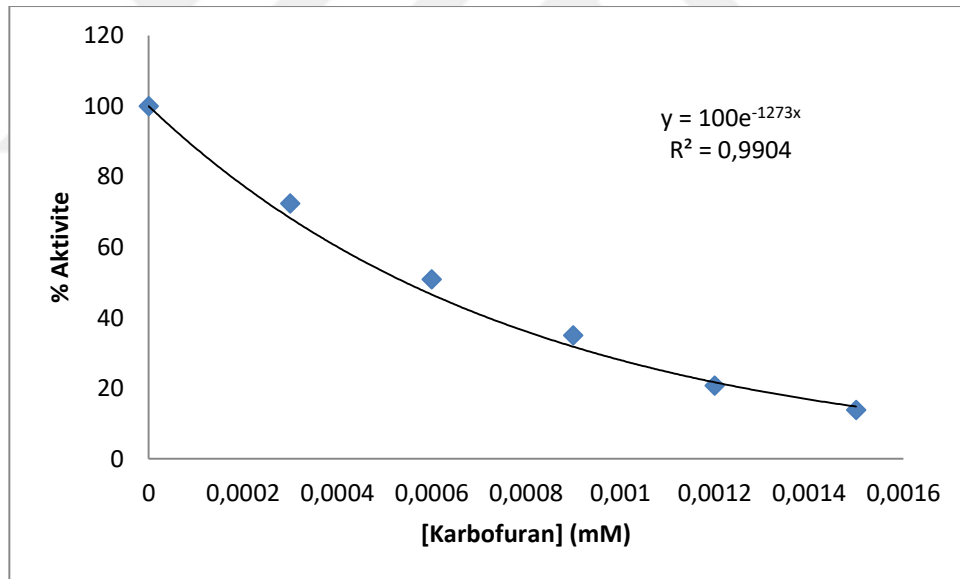
Çalışılan enzimlerin aktiviteleri üzerine meloksikam, lornoksikam, enalapril, silazapril ve ramipril ilaçlarının inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu maddelerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.2-4.8’de gösterildi. Eğrilerin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.



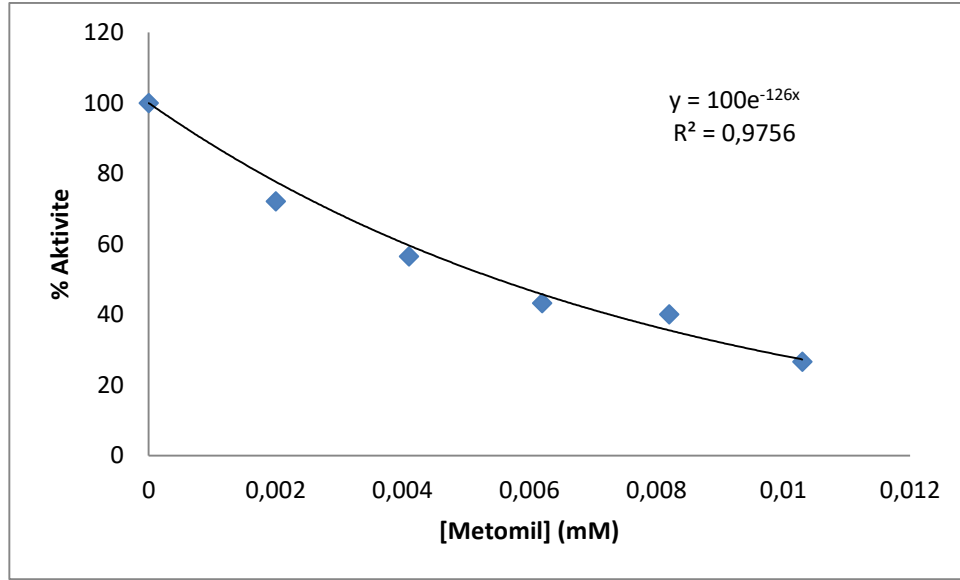
Şekil 4.1. Propoksür ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



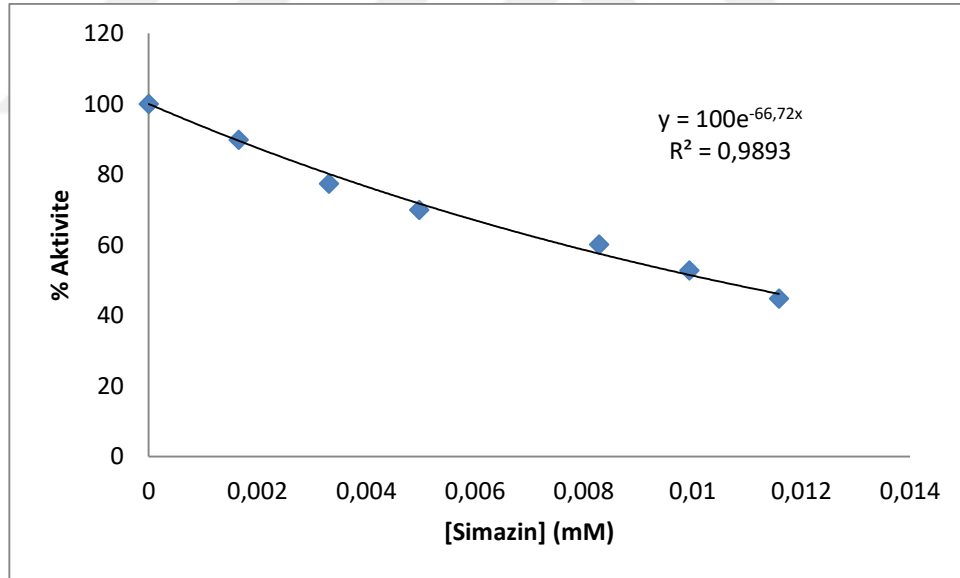
Şekil 4.2. Oksamil ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



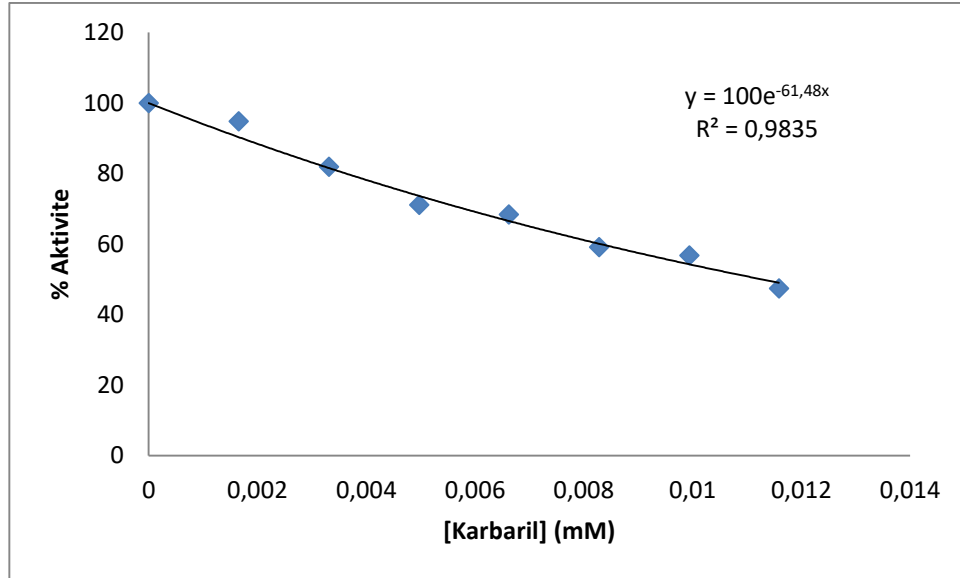
Şekil 4.3. Karbofuran ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



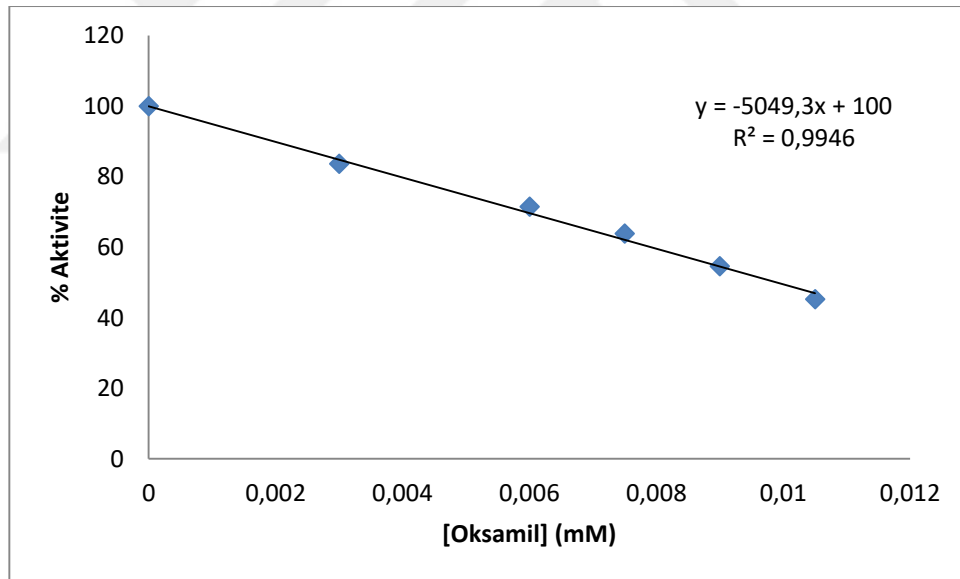
Şekil 4.4. Metomil ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



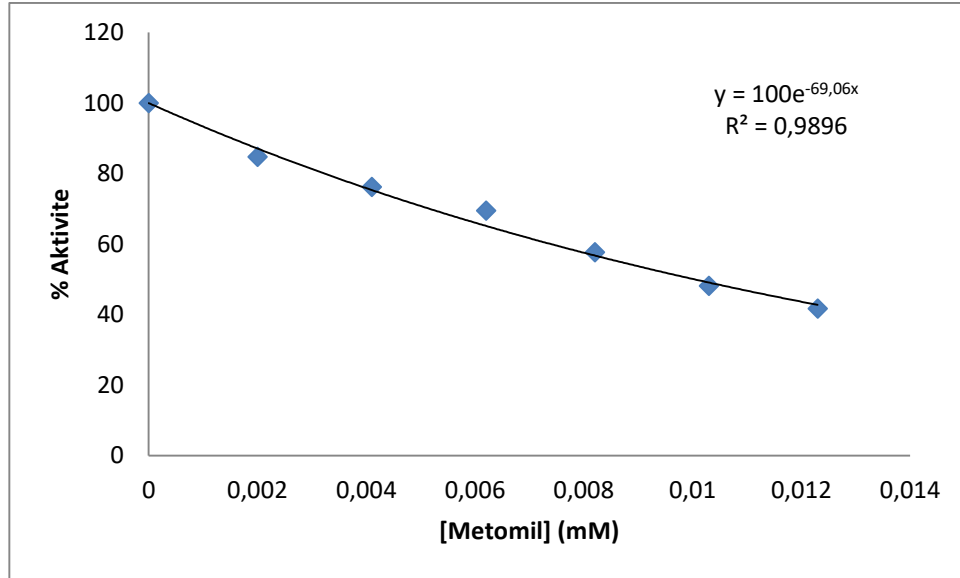
Şekil 4.5. Simazin ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.6. Karbaril ile AChE enzimini IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.7. Oksamil ile BChE enzimini IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.8. Metomil ile BChE enzimini IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.1. Bazı pestisitler ile AChE ve BChE enzimleri için IC₅₀ değerleri.

	IC ₅₀ değerleri (µM)	
Maddeler	AChE	BChE
Propoksür	3,023	-
Oksamil	1,983	9,903
Karbofuran	0,544	-
Metomil	5,500	10,037
Simazin	10,380	-
Karbaril	11,270	-

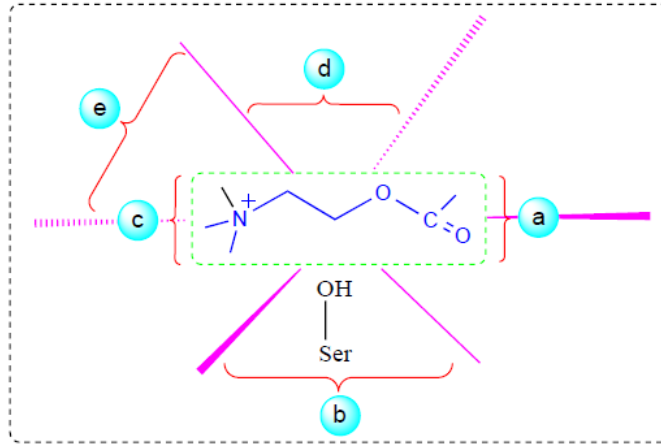
4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, metabolizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve yüzde yüzlük bir ürün oluşumunu sağlayan, hiç bir yan ürün oluşumuna meydan vermeyen biyokatalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2008). Enzimatik reaksiyonlarda substratlar farklı moleküllere yani ürünlere dönüşürler. Canlı metabolizmadaki tepkimelerin neredeyse tamamının gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyar. Enzimler substratları için son derece seçici oldukları için, ve pek çok olası tepkimeden sadece birkaçını hızlandırdıklarından dolayı, bir hücredeki enzimlerin kümesi o hücrede hangi metabolik yolların bulunduğunu belirler. Enzimler ileri ve geri tepkimeyi eşit derecede katalizler. Dengeyi değil, ona ulaşma hızını değiştirirler. Örneğin, karbonik anhidraz, substratların konsantrasyonuna bağlı olarak tepkimesini her iki yönde de katalizleyebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2008; Senturk, 2017).

Bunun yanında, genel olarak bahsedildiği gibi asetilkolin gibi nörotransmitter madde miktarındaki azalma yada artmalar çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin asetilkolin'nin çok fazla hidrolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı meydana gelmekte ve bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan ilaçlar aranmakta ve çalışılmaktadır. AChE inhibitörleri olarak kumarin türevleri üzerinde durulmuştur.

Enzim α heliks ve β tabakalarından oluşur. Sarı renk ile gösterilmiş 14 aromatik rezidü aktif bölgenin çevresinde sıralanmışlardır. Aktif bölgede bulunan Serin, Glutamat ve Histidin amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda AChE inhibisyonu, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin normal nörotransmisyonu ile etki edebilen kimyasalların nörotoksik etkilerini belirlemede kullanılır. Organofosfatların, karbamat pestisitlerin (Duysen *et al.*, 2012), enantiyomerik inhibitörlerin (Lin *et al.*, 1998), metallerin ve çeşitli kimyasalların AChE aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Bocquene *et al.*, 1995; Zilbeyaz *et al.*, 2018; Cavdar *et al.*, 2019). Ayrıca AChE'nin alifatik bileşikler ile özellikle de aromatik bileşikler tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Lin *et al.*, 1998). Yapılan diğer bir çalışmada ise Pasifik Torpedo californica elektrik organının AChE enziminin X-ışınları

ile yapılan analizi sonucu enzimin beş önemli bağlama sitesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme.

AChE enziminde esterik ve anyonik olmak üzere iki etkin kısım bulunur. Negatif yüklü anyonik kısım, iki karboksilli bir aminoasitin iyonize karboksil grubundan ibarettir. Asetilkolinin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esterik kısım ise pozitif yüklü olup, serinin hidroksil grubu ile histidin bazik imidazol halkasından oluşur. Bazik imidazol halkası, serinin hidroksil grubuna hidrojen bağları ile bağlanarak onun etkinliğini artırır (Vale, 1998). Şekil 5.1’de görüldüğü gibi AChE enziminin etki mekanizması şöyle özetlenebilir.

- Öncelikle bir oksianyon bölgesi tetrahedral ara ürünü stabilize eder.
- Daha sonra aktif bölgeyi oluşturan bir esteratik site esteratik karbonil grubuna (C-O) saldırır.
- Az sayıda negatif yük ve çok sayıda aromatik rezidü içeren bir anyonik substrat bağlama bölgesinde ACh’nin kuarterner amonyum kutbunu içermektedir. Bu grup aromatik grupların elektronları tarafından farklı aktif bölge ligantları ile tercihli etkileşim içerisinde olur.
- Esteratik ve anyonik bir bölgeye bitişik olan ve aynı zamanda aktif bölge-selektif aromatik bağlanma bölgesi olan bu kısım aril substratları ve aktif bölge ligantlarını bağlamada oldukça önemlidir.

e. Son olarak periferik bir anyonik bağlama bölgesi hidrofobik bölgeye bağlanır ve aktif bölgeden gurupların ayrılmasını sağlar.

Bütün yapılan bu çalışmalar açık bir şekilde mekanizma temelli inhibitörlerin dizayn ve araştırılmasına ve ayrıca AChE enziminin de etki mekanizmaları ile ilgili araştırmaları göstermektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için farklı yapılara sahip AChE inhibitörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış AChE enzimi Şekil 5.2’de görülmektedir. Bu inhibitörler de metabolizmaya, etki mekanizmasına ve beyin selektivitesine göre değişmektedir.

Genellikle; serum, barsak, cilt ve sinir uçlarında bol bulunan BChE ise ACh ve bütirilkolin için aktivite gösterebilmekle birlikte bütirilkolin için daha spesifiktir (Lang et al., 1997). BChE’nin rolü henüz tam olarak belirlenememiştir. BChE’nin görevinin dokularda AChE tarafından temizlenemeyen ACh’i uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir ve *Cyprinus carpio*’da beyin dokusunda BChE aktivitesi bulunmamaktadır (Chuiko, 2000).

Asetilkolin (ACh), balıkların sinir ve nöromuskular sistemlerindeki başlıca nörotransmitterdir (Kirby et al., 2000). Bütün kolinerjik nöronlarda asetilkolin sentezi, yıkımı ve depolanması benzerdir. Asetil kolin, Asetil koenzim A ve kolinden asetiltransferaz (ChAT) enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunu tek bir adımda sentezlenir. Bu reaksiyonda kullanılan asetil koenzim A’nın büyük çoğunluğu, mitokondri iç membranında, glikolizis sırasında, pürivat dehidrojenaz enzimi tarafından oluşturularak ChAT’nin bulunduğu sitoplazmaya taşınır. Kolinin yaklaşık %35-50’si, sinaps aralığında AChE tarafından yeniden oluşturulup, ACh sentezinde kullanılan kolinin yarısını içeren akson ucuna taşınır. Merkezi sinir sisteminde, ACh sentezinde kullanılan kolinin üçte biri ise diğer kaynaklardan sağlanır (Chang and Strichartz, 2005).

AChE enzimi baskılandığında, sinir sisteminde ACh birikmeye başlar ve merkezi sinir sisteminde yüksek miktardaki ACh, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara,

koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açar (Chang and Strichartz, 2005).

Genellikle altmış yaşı́n üzerindeki hastalarda ilerleyici zihinsel işlev bozukluğunun en sık nedeni olarak görölen Alzheimer hastalığı (AH), nörodejeneratif bir hastalıktır (Geula and Mesulam, 1999). Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte kolinerjik eksikliğin giderilmesi amacıyla asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan yöntemdir. Bu amaca yönelik olarak en fazla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Geula and Mesulam, 1999; Cavdar *et al.*, 2019). AH'nin ileri dönemlerinde beyindeki AChE aktivitesi %55-67 oranında azılırken, BChE aktivitesi artmaktadır (Perry *et al.*, 1978).

Yapılan mikroskopik incelemeler, Alzheimer hastalarında AChE'nin yanı sıra BChE aktivitesinin de aşırı derecede arttığını göstermiştir. Bu durum, AH'nin tedavisinde, AChE'nin yanı sıra BChE'nin de inhibe edilmesinin avantajlı olacağını düşündürmektedir (Geula and Mesulam, 1999; Durmaz, 2015).

Organofosforlu pestisidler de asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer alırlar. Enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Bunun sonucu olarak kolinerjik sinir kavşaklarında asetilkolin miktarının artması, düz kasların kasılmasına ve salgı bezlerinin salgı yapmasına sebep olur. AChE aktivitesindeki inhibitör etki, pestisitlerin aynı zamanda, sinir hücrelerindeki enerji metabolizması gibi önemli yaşamsal süreçleri de etkilediğini göstermektedir (Nath and Kumar, 1999). Karbamatlı pestisidlerle gerçekteşen AChE inhibisyonu dönüşümlü olmasına rağmen; OP'lu pestisidlerle gerçekteşen inhibisyon dönüşümsüzdür. Asetilkolinesteraz aktivitesindeki değişimler OP pestisidlerin organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi sırasında bioindikatör olarak kullanılmaktadır (Lang *et al.*, 1997). Ayrıca akuatik kirlenmede AChE aktivitesi biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Dembele *et al.*, 2000).

Bu çalışmamızda farklı pestisit molekülleri ile AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon etkisi değerlendirildi. Ellman metoduna göre inhibisyon türü, IC₅₀ değerleri belirlendi (Ellman, 1961). Çalışmada kullanılan kimyasalların hem AChE hem de BChE enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlendi. Bu amaçla kullanılan pestisitlerin için AChE ve BChE enzimleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,544-11,270 µM ve 9,903-10,037 µM aralığında olduğu belirlendi. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun ikinci basamağında ilave edilen 5,5'-ditiyo-bis(2-nitro-benzoik) asit (DTNB) ile hidrolisi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanil)benzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir (Ellman *et al.*, 1961).

AChE inhibitörleri geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir (Colovic *et al.*, 2013). Zehirler doğal olarak oluşur ve AChE'ı kuvvetli şekilde inhibe ederler. AChE inhibitörleri sinir gazları şeklinde silah olarak kullanılabilirler, insektisit olarak, ilaç olarak ağır kas zaafı anlamına gelen, çabuk yorulma şeklinde ortaya çıkan ve nöromusküler bir hastalık Myastenia gravis tedavisinde, glukoma tedavisinde, postural taşikardi sendromu tedavisinde, antikolinergik zehirlenmelere karşı panzehir olarak, non-depolarizan kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmede, apati gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarını tedavisinde kullanılırlar. Ayrıca Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde, dementiada (bunamada), hafıza ve öğrenme defektleri gibi nörodejeneratif bozuklukların sipmtomal tedavilerinde, görsel halusinasyon gibi psikotik belirtilerde (Singh *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2012), şizofreni hastalarında bilişsel bozuklukların tedavisinde (Ribeiz *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013), otizm tedavisinde (Buckley *et al.*, 2011), uykuyu hızlı bir şekilde teşvik eder ve uyuma yüzdesini arttırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Handen *et al.*, 2011).

- Çeşitli pestisitlerin biyolojik etkilerinin son yıllarda artmasının ana nedeni günlük hayatımızda çokça kullanılan bu maddelerin toksisite değerlerini ya da zararlarını belirlemektir.

- Bu çalışmamızda tarım sahalarında yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin (Propoksür, oksamil, karbofuran, metomil, simazin ve karbaril) AChE ve BChE enzimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.
- Yaptığımız çalışma sonunda AChE ve BChE enzimleri üzerinde denenen bu pestisitler için IC₅₀ değerleri 0,544 ile 11,270 µM arasında olduğu belirlendi.



KAYNAKLAR

- Ariel, N., Ordentlich A., Barak, D., Bino, T., Velan, B. and Shafferman, A. (1995). The Aromatic Patch of Three Proximal Residues in the Human Acetylcholinesterase Active Centre Allows for Versatile Interaction Modes with Inhibitors. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.
- Augustinsson, K.B. (1971). Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bull World Health Organ*, 44 (1-3), 81-89.
- Blong, R., Bedows, E. and Lockridge, O. (1997). Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J*, 327, 747-757.
- Bocquene, G., Bellanger C., Cadiou, Y. and Galgani, F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- Bourne, Y., Radic, Z., Taylor, P. and Marchot, P. (2010). Conformational remodeling of femtomolar inhibitor-acetylcholinesterase complexes in the crystalline state. *J Am Chem Soc*, 132 (51), 18292-18300.
- Buckley, A.W., Sassower, K., Rodriguez, A.J., Jennison, K., Wingert, K., Buckley, J., Thurm, A., Sato, S. and Swedo, S. (2011). An open label trial of Donepezil for enhancement of rapid eye movement sleep in young children with Autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21, 353-357.
- Cavdar, H., Senturk, M., Guney, M., Durdagi, S., Kayik, G., Supuran, C.T. and Ekinici, D. 2019. Kinetic and In Silico Studies of Some Uracil Derivatives on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34 (1) 429-437.
- Chatonnet, A. and Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (3), 625-634.
- Chang, M.S. and Strichartz, G.R., 2005. Cholinergic pharmacology (Golan, D.E and Tashjian, A.H. editörler). *Principles of Pharmacology*, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.

- Choi, KH; Wykes, T. and Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. *The British Journal of Psychiatry* 203,172-178.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 233-242.
- Colovic, MB., Krstic, D.Z., Lazarevic, P., Tamara, D., Bondzic, A.M. and Vasic, V.M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3), 315–335.
- Dembélé, K., Haubruge, E. and Gaspar, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49-54.
- Durmaz, L. 2015. Bazı Kumarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duysen, E.G., Cashman, J.R., Schopfer, L.M., Nachon, F., Masson, P. and Lockridge, O. (2012) Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chem Biol Interact*, 195 (3), 189-198.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D. and Andres, V., et al., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7,88-95.
- Geula, C. and Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D. and Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264 (3), 672-686.
- Harel, M., Schalk, I., Ehret, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, PH. and Silman, I.(1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-

- site gorge of acetylcholinesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (19), 9031-5.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J. and Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism: neuropsychological measures. Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology 21, 43-50.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., (2008) Biyokimya, Aktif Yayınevi, Sirkeci / İstanbul.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T. and Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. Marine Pollution Bulletin, 780-791.
- Küçükkılınç, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. Turk J Biochem, 39, 126-131.
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr. Özgül Alper., Nobel.
- Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T. and Nemcsok, J., 1997. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by mediation and paraquat in alimentary canal of common carp. Genetic Pharmacology, 55-59.
- Lehninger Biyokimyanın İlkeleri David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Y. Murat Elçin) Palme yayıncılık, Ankara 2013.
- Lin, G., Tsai, Y. C., Liu, H. C., Liao, W. C. and Chang, C. H. (1998). Enantiomeric inhibitors of cholesterol esterase and acetylcholinesterase. Biochim. Biophys. Acta. 1388, 161-174.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 57, 685.
- Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. J Neurochem, 39 (1), 106-110.
- Lockridge, O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. Bioessays, 9 (4), 125-128.

- Lockridge, O. (1990). Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther*, 47 (1), 35-60.
- Malfitano, A.M., Marasco, G., Proto, M.C., Laezza, C., Gazzerò, P. and Bifulco, M. (2014). Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacological Research*, 88 (0), 74-83.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31-91.
- Massoulié, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
- Massoulie, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D. and Bon, S. (2008). Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175 (1-3), 30-44.
- Masson, P. and Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, 494 (2), 107-120.
- Masson, P., Froment, M.T., Sorenson, R.C., Bartels, C.F. and Lockridge, O. (1994). Mutation His322 Asn in human acetylcholinesterase does not alter electrophoretic and catalytic properties of the erythrocyte enzyme. *Blood*, 83 (10), 3003-3005.
- Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S. and Lockridge, O. (2007). A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin Chim Acta*, 378 (1-2), 128-135.
- Nath, B.S. and Kumar, P.S., 1999. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157-162.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Segall, Y., Ariel, N., Cohen, S., Velan, B. and Shafferman, A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of Biological*.

- Ozil, M., Balaydin, H.T. and Senturk, M. 2019. Synthesis of 5-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 86, 705-713.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. ve ark. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 273-277.
- Pohanka, (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc*, 155 (3), 219-229.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S. and Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.
- Rajesh, R.V., Chitra, L., Layer, P.G. and Boopathy, R. (2009a). The aryl acylamidase activity is much more sensitive to Alzheimer drugs than the esterase activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic brain. *Biochimie*, 91 (9), 1087-1094.
- Rajesh, R.V., Layer, P.G. and Boopathy, R. (2009b). High aryl acylamidase activity associated with cobra venom acetylcholinesterase: biological significance. *Biochimie*, 91 (11-12), 1450-1456.
- Ribeiz, S.R., Bassitt, D.P., Arrais, J.A., Avila, R., Steffens, D.C. and Bottino, C.M. (2010). Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.
- Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O. and Doctor, B.P. (1997). Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (48), 14642-14651.
- Senturk, M., *Enzyme Inhibitors and Activators*, 2017. Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M. and Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.

- Soreq, H. and Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker L. and Silman, I.(1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterasefrom Torpedo Californica: A Prototypic Asetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Taylor, D., Paton, C. and Shitij, K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155–170.
- Tripathi. A. (2008). Acetylcholinsterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 15 (4).
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 649-652.
- Whittaker, V.(1990).The Contribution of Drugsand Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8-13.
- Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A. and Senturk, M. 2018. Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32:e22210.

ÖZGEÇMİŞ

Ömer AKDENİZ 1979’de Ağrı-Taşlıçay’da doğdu. İlkokulu Aşağı Toklu Köyü’nde, ortaokulunu Ağrı’da ve lise eğitimini Taşlıçay’da tamamladı. 1997 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi’ni 2002 yılında bitirdi. 2015 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2019 yılında tamamlamıştır. Evli ve iki çocuk babasıdır.

