



**ASETİLKOLİNESTERAZ VE
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNE BAZI SULFANİLAMİD
TÜREVİ MOLEKÜLLERİNİN İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sibel AKTAY

**Yüksek lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANSTEZİ

**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BÜTİRİLKOLİNESTERAZ
ENZİMLERİ ÜZERİNE BAZI SULFANİLAMİD TÜREVİ
MOLEKÜLLERİNİN İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sibel AKTAY

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNE BAZI SULFANİLAMİD TÜREVİ MOLEKÜLLERİNİN
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Sibel AKTAY tarafından hazırlanan bu çalışma 03/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (2.2.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu..27.10.2017/2017 tarihve 30. / ..35. nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2016/152

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

Yüksek Lisans Tezi

ASETİLKOLİNESTERAZ VE BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE BAZI SULFANİLAMİD TÜREVİ MOLEKÜLLERİNİN İNİHİBSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sibel AKTAY

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu tez kapsamında Asetilkolinesteraz (AChE; E.C.3.1.1.7) ve Bütirilkolinesteraz (BChE; E.C.3.1.1.8) enzimi üzerine Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan takrin ilacına alternatif olarak sulfanilamid türevlerinin, enzim aktiviteleri üzerine kinetik parametrelerin belirlenmesi hedeflenmiştir. AChE ve BChE enzimlerinin aktiviteleri üzerine Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide ve Sulfisoxazole gibi aromatik maddelerin inhibisyon etkileri incelendi. AChE için *In vitro* inhibisyon etkisi gösteren maddeler Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide ve Sulfisoxazole için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,300 mM, 0,363 mM, 0,353 mM, 0,507 mM, 0,0049mM olarak bulundu. Aynı maddeler için sırasıyla standart sapma ve ortalama K_i sabiti $118 \pm 0,024$ mM, $0,717 \pm 0,193$ mM, $0,302 \pm 0,116$ mM, $0,343 \pm 0,055$ mM, $0,0049 \pm 0,00012$ mM olarak hesaplandı. İnhibisyon tipleri Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide maddelerinde yarışmasız inhibisyon etkisi gösterirken, Sulfisoxazole maddesi yarışmalı inhibisyon gösterdi. BChE için *In vitro* inhibisyon etkisi gösteren maddeler Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide ve Sulfisoxazole için IC_{50} değerleri sırasıyla 3,397 mM, 3,364 mM, 5,414 mM, 2,717 mM, 2,235mM olarak bulundu. Aynı maddeler için sırasıyla standart sapma ve ortalama K_i sabiti ise $0,815 \pm 0,098$ mM, $3,104 \pm 0,736$ mM, $2,763 \pm 0,055$ mM, $0,923 \pm 0,191$ mM, $0,582 \pm 0,143$ mM olarak hesaplandı. İnhibisyon tipleri Sulfadiazine, Sulfacetamide ve Sulfisoxazole maddelerinde yarışmalı inhibisyon gösterirken, Sulfamerazine ve Sulfamethazine maddelerinde ise yarışmasız inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.

2017, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, inhibisyon

ABSTRACT

MS Thesis

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS OF SOME SULFANILAMID DERIVATES ON ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE ENZYME

Sibel AKTAY

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this thesis, it is aimed to determine the effects of kinetic parameters on enzyme activities of some derivatives of sulfanilamides as an alternative to the tacrin drug used in the treatment of Alzheimer's disease on acetylcholinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; E.C.3.1.1.8) activities and butyrylcholinesterase enzyme. The inhibitory effects of some aromatic compounds such as Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide and Sulfisoxazole on acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase enzyme activities were investigated. IC_{50} values for Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide and Sulfisoxazole that show in vitro inhibition effect for AChE were determined as 0,300 mM, 0,363 mM, 0,353 mM, 0,507 mM and 0,0049 mM respectively. Respectively, standard deviations and mean K_i constants for the same samples were calculated as $118 \pm 0,024$ mM, $0,717 \pm 0,193$ mM, $0,302 \pm 0,116$ mM, $0,343 \pm 0,055$ mM, $0,0049 \pm 0,00012$ m. IC_{50} values for Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamide and Sulfisoxazole that show in vitro inhibition effect for BChE were determined as 3,397 mM, 3,364 mM, 5,414 mM, 2,717 mM, 2,235 mM respectively. Standard deviations and mean K_i constants for the same samples were recorded as $0,815 \pm 0,098$ mM, $3,104 \pm 0,736$ mM, $2,763 \pm 0,055$ mM, $0,923 \pm 0,191$ mM, $0,582 \pm 0,143$ mM respectively. While the inhibition types showed competitive inhibition in Sulfadiazine, Sulfacetamide and Sulfisoxazole, Sulfamerazine and Sulfamethazine showed noncompetitive inhibition effect.

2017, 83 pages

Keywords: Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans 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. Yüksel ÖZDEMİR'e, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREYOĞLU'na, tez izleme komitemde yer alan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Sayın Uzman Songül BAYRAK'a, Sayın Uzman Hülya TÜRK'e, Sayın Serpil GERNİ'ye ve Sayın Suzan YILDIZ'a, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, araştırma laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, teyzelerime, özellikle babama çok teşekkür ederim.

Sibel AKTAY

Temmuz, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
2.1. Çalışmanın Amacı	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler	33
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	33
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	34
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddelerin IC ₅₀ ve K _i değerlerinin bulunması	35
3.2.2. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi aktivite ölçüm metodu.....	36
3.2.3. Bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi aktivite ölçüm metodu	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar;.....	39
4.1.1. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine ile ilgili sonuçlar	39
4.1.2. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamerazine ile ilgili sonuçlar	42
4.1.3. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamethazine ile ilgili sonuçlar	45
4.1.4. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfacetamide ile ilgili sonuçlar	48

4.1.5. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfisoxazole ile ilgili sonuçlar	51
4.2. Bütirilkolinesteraz (BChE) Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	55
4.2.1. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine ile ilgili sonuçlar	55
4.2.2. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamerazine ile ilgili sonuçlar	58
4.2.3. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamethazine ile ilgili sonuçlar	61
4.2.4. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfacetamide ile ilgili sonuçlar	64
4.2.5. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfisoxazole ile ilgili sonuçlar	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	84

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AChI	: Asetilkolinyodat
BChE	: Bütirilkolinesteraz enzimi
BChI	: Bütirilkolinyodat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTNB	: 5,5' –ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
E	: Enzim
E.C	: Enzim kod numarası
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Mevcut konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
Tris	: Trihidroksimetilamino metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Substrat molekülünü bağlayan aktif bölgeye sahip bir enzimin şematik olarak gösterilmesi	3
Şekil 1.2. Dönüşümsüz inhibisyonun şekil olarak gösterimi	5
Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyonun şekil olarak gösterimi	6
Şekil 1.4. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun şekil olarak gösterimi	6
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyonun şekil olarak gösterimi;	6
Şekil 1.6. Lineweaver-burk grafiği	7
Şekil 1.7. Bütirilkolinesteraz enzimini.....	10
Şekil 1.8. Bütirilkolinesteraz enziminin hidroliz mekanizması	11
Şekil 1.9. Asetilkolinesteraz'ın açık yapısı.....	12
Şekil 1.10. Asetilkolinesteraz enzimi	12
Şekil 1.11. Asetilkolinin sentez reaksiyonu	14
Şekil 1.12. Sinir hücresinin yapısı	14
Şekil 1.13. Nöronların diğer nöronlara ya da kas veya salgı bezleri gibi nöron olmayan hücrelere mesaj iletimine olanak tanıyan özelleşmiş bağlantı noktaları olan sinapsların gösterimi	15
Şekil 1.14. Asetilkolinin yıkım reaksiyonu.....	16
Şekil 1.15. Asetilkolin metabolizması	18
Şekil 4.1. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfadiazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	40
Şekil 4.2. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	41
Şekil 4.3. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfamerazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	42
Şekil 4.4. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfamerazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	44

Şekil 4.5. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfamethazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	45
Şekil 4.6. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfamethazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	47
Şekil 4.7. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	48
Şekil 4.8. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfacetamide eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	50
Şekil 4.9. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfisoxazole inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	51
Şekil 4.10. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfisoxazole eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	53
Şekil 4.11. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfadiazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	56
Şekil 4.12. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfadiazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	57
Şekil 4.13. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfamerazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	58
Şekil 4.14. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfamerazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	60
Şekil 4.15. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfamethazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	61
Şekil 4.16. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfamethazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	63

Şekil 4.17. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	64
Şekil 4.18. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfacetamide eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	66
Şekil 4.19. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	67
Şekil 4.20. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfisoxazole eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan moleküller	19
Çizelge 3.1. Aktivite ölçüm prosedürü	37
Çizelge 3.2. Aktivite tayin yöntemi	38
Çizelge 4.1. Sulfadiazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	39
Çizelge 4.2. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfadiazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	40
Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfadiazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	41
Çizelge 4.4. Sulfamerazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	42
Çizelge 4.5. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamerazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	43
Çizelge 4.6. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamerazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	44
Çizelge 4.7. Sulfamethazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	45
Çizelge 4.8. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	46
Çizelge 4.9. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamethazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	47

Çizelge 4.10. Sulfacetamide inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	48
Çizelge 4.11. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfacetamide inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	49
Çizelge 4.12. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfacetamide inhibitörünün inhibisyon etkisi	50
Çizelge 4.13. Sulfisoxazole inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	51
Çizelge 4.14. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfisoxazole inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	52
Çizelge 4.15. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfisoxazole inhibitörünün inhibisyon etkisi	53
Çizelge 4.16. Asetilkolinesteraz enzimi için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları	54
Çizelge 4.17. Sulfadiazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	55
Çizelge 4.18. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfadiazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	56
Çizelge 4.19. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfadiazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	57
Çizelge 4.20. Sulfamerazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	58
Çizelge 4.21. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamerazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	59

Çizelge 4.22. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamerazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	60
Çizelge 4.23. Sulfamethazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	61
Çizelge 4.24. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	62
Çizelge 4.25. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamethazine inhibitörünün inhibisyon etkisi	63
Çizelge 4.26. Sulfacetamide inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	64
Çizelge 4.27. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.	65
Çizelge 4.28. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfacetamide inhibitörünün inhibisyon etkisi	66
Çizelge 4.29. Sulfisoxazole inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	67
Çizelge 4.30. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü	68
Çizelge 4.31. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfisoxazole inhibitörünün inhibisyon etkisi	69
Çizelge 4.32. Bütirilkolinesteraz enzimi için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları	70

1. GİRİŞ

18. yüzyıl sonlarında tükürük ve bazı bitki özütlerinin nişastayı şekere dönüştürdükleri, etin mide salgıları tarafından sindirildiği bilinmesine rağmen (Réaumur 1752) bunun hangi mekanizmayla gerçekleştiği bilinmemekteydi (Williams 2007).

Fermentasyon, yani maya tarafından şekerin alkole dönüşmesini 19. yüzyılda, Louis Pasteur, tarafından araştırılırken, maya hücrelerindeki fermentasyonun bir güç tarafından meydana geldiği sonucuna ulaşmıştır. "Ferment" olarak adlandırılan bu etmenlerin sadece canlılarda işlev gördüğü düşünülmüştür. 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne, Yunanca'da 'maya içinde' anlamına gelen "wikt: enzim" terimini kullanmıştır. Sonraki yıllarda enzim kelimesini canlı olmayan bileşikler (örneğin pepsin) için kullanılmaya başlanmış, canlılar tarafından meydana getirilen kimyasal aktiviteler için de "ferment" kelimesi kullanılmaya başlanmıştır (Dubos 1995).

Biyokimyasal araştırmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri 1926 yılında J.B.Sumner'in üreaz enzimini "JackBean" bitkisinden elde edip kristallendirmesi ve protein yapısında olduğunu keşfetmesidir. Günümüzde 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

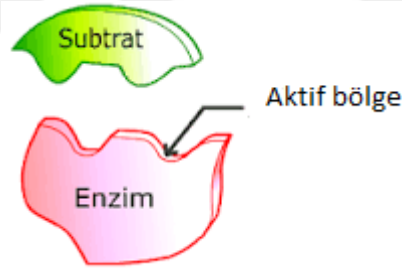
Her canlının, hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri kendi yapısına uygun biyolojik moleküllere seçici ve etkili bir şekilde dönüştürmesi gerekmektedir. Canlı organizmalarda, bu dönüşümün meydana geldiği kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmaksızın %100'lük verim sağlayan biyolojik katalizörlere enzim denir. Enzimler, proteinlerin en büyük ve özelleşmiş şeklidir. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır (Nelson and Cox 2004).

Enzimler olağanüstü katalitik aktiviteye sahip moleküllerdir. Örneğin bir dakikada 36 milyon molekülü değişikliğe uğratmaktadırlar. Asetilkolinesteraz enzimi ise dakikada 1.500.000 molekülü etkilemektedir. Enzimler, substratları karşısında oldukça spesifik davranmakta ve karşısındaki molekülün sadece belli bir bölgesini etkiler, bu etkilenen yerden bir veya birden fazla atomu ya da fonksiyonel grubu almaktadır. Enzimler, bugün hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır. Bugün enzimlerin kimya endüstrisinde, gıda prosesinde, ziraatte pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilmektedirler. Fakat aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzim proteininde bulunan amino asitlerin özel dizilişi, enzimin belirli bir konformasyon ve kuaterner yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır. Enzimler sadece enzimin biyolojik aktivitesi için değil bunun yanı sıra metabolik olayların kontrolünü sağlamak için de gereklidir (Gözükara 2001).

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, 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).

Enzimlerle katalize edilen, tepkimeye katılan kimyasal moleküllere “substrat” adı verilir. Enzimler son derece spesifiktirler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu gruba sahip olan substrat serisine karşı etkinlik göstermektedirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle etkileşen çok spesifik enzimler de bulunmaktadır (Tüzün 1997). Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir alan bulunmaktadır. Bu alan substratla üç boyutlu bir yüzey oluşturabilen aminoasit yan zincirlerine sahiptir. Aktif bölge substratı bağlayarak enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir.

Daha sonra enzim-substrat kompleksi, enzim ve ürüne dönüştürülür (Champe and Harvey 2007). Her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın molekül sayısı “turnover sayısı” olarak adlandırılmaktadır (Champe and Harvey 2007). Katalaz enzimi $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile en yüksek turnover sayısı olan enzim iken, karbonik anhidraz enzimi $10.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile en yüksek ikinci turnover sayısına sahip enzimdir (Bülbül, 2003; Söyüt, 2006). Enzimler bir veya birden fazla substratı etkilerken aktivite gösterebilmek için bazı hallerde “kofaktör” adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi “koenzim” adı verilen kompleks bir organik bileşikte olabilir. Kofaktöre sahip enzimlere “holoenzim” denilmektedir. Kofaktörler enzimlere ligand bağlarıyla farklı kuvvetlerde tutunmuş olup diyaliz yoluyla enzimlerden uzaklaştırılabilirler. Kofaktörü kendinden uzaklaşmış enzim aktivitesini kaybeder. Enzimin proteinden oluşan kısmına “apoenzim” denilmektedir (Gözükara 1997).



Şekil 1.1. Substrat molekülünü bağlayan aktif bölgeye sahip bir enzimin şematik olarak gösterilmesi

Bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için reaksiyona giren maddelerin gerekli enerji engelini (aktivasyon enerjisi) aşacak enerjiye sahip olmaları gerekir. Aktivasyon enerjisi düşükse reaksiyon çok hızlı yürür. Bilindiği gibi katalizörler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları çok hızlandırırlar. Enzimler de dâhil bütün katalizörler reaksiyona maddelerle bir geçiş hali oluşturup serbest enerji değişimini azaltarak etkilerler. Aktivasyon enerjisinin yarısına düşürülmesi bile reaksiyon hızını çok arttırır. Örneğin; hidrojen peroksitin katalizörsüz parçalanması için aktivasyon enerjisi 76 kJ/mol iken katalaz enzimi bu enerjiyi 30 kJ/mol seviyesine düşürür.

Bir enzimatik reaksiyonun hızını etkileyen faktörler

Bir enzimatik reaksiyonun hızını birden fazla etkileyen faktörler vardır ve bazıları şunlardır:

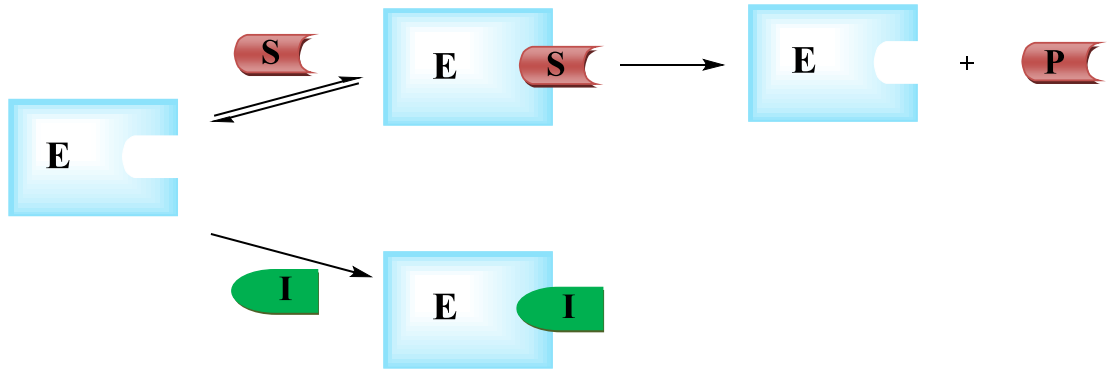
- 1- Enzim konsantrasyonu,
- 2- Substrat konsantrasyonu,
- 3- pH,
- 4- Isı veya sıcaklık,
- 5- Zaman,
- 6- Işık ve diğer fiziksel faktörler,
- 7- İyonların doğası ve konsantrasyonu,
- 8- Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler,
- 9- Reaksiyon ürünleri.

Enzim kinetiği için 1913 yılında Lenor Michaelis ve Maude Menten tarafından geliştirilen model Michaelis-Menten modeli olarak bilinir ve bugün hala birçok açıdan tatmin edici sonuçlar vermektedir (Telefoncu 2007). Enzimlerin kinetik özellikleri Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilir. Bazı araştırmacılar 1902 yılında Enzim-Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Michaelis-Menten bu tanımlı daha fazla genişleterek bugün kendi adlarıyla anılan sabite ve eşitliğe ulaşmışlardır (Boyer 1970; Colowick and Kaplan 1987). Bu denklemdeki K_M sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken, V_{max} enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C'de ve optimal şartlarda 1 μ mol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

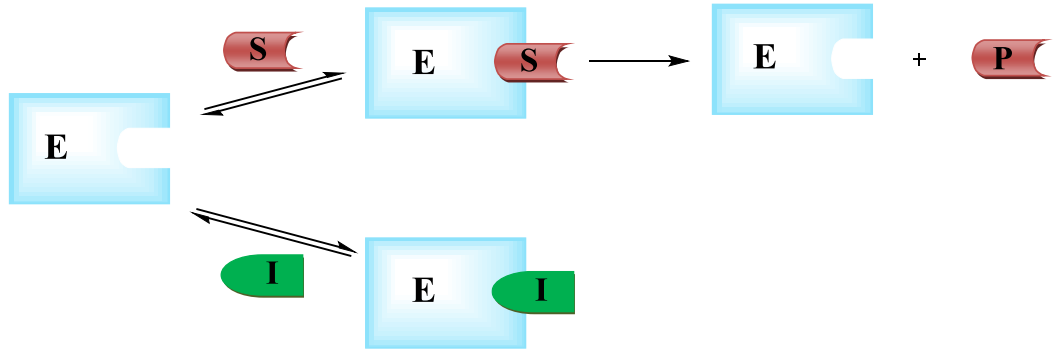
$$V=V_{\max}[S]/K_M+[S]$$

İnhibisyon, dönüşümsüz ya da dönüşümlü olmak üzere iki şekilde incelenir. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana gelir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

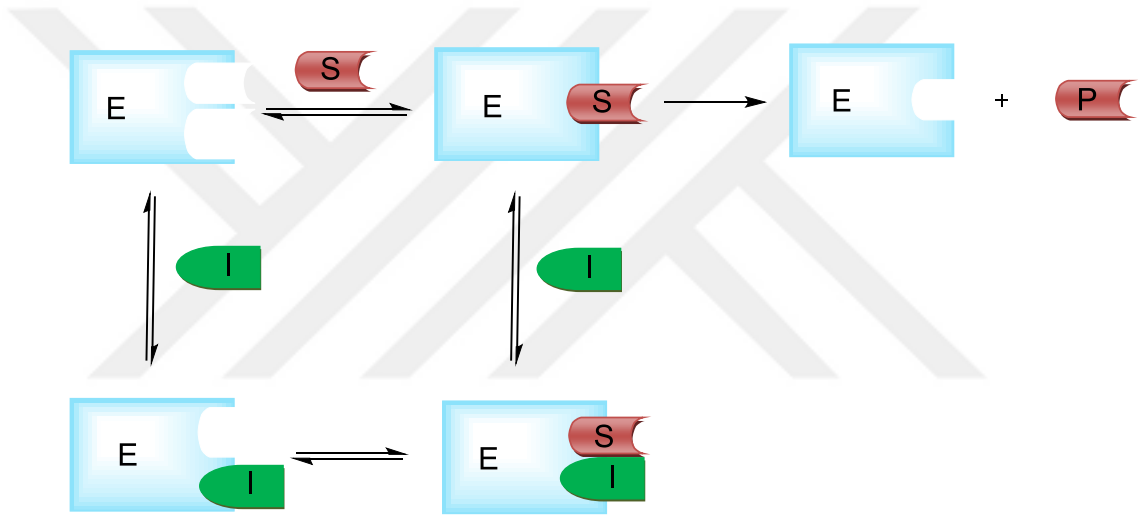
Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşimleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışır. İnhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda K_M değeri artar $V_{\max}$ değişmez. Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyonda $V_{\max}$ düşerken K_M değişmez. Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda $V_{\max}$ ve K_M azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



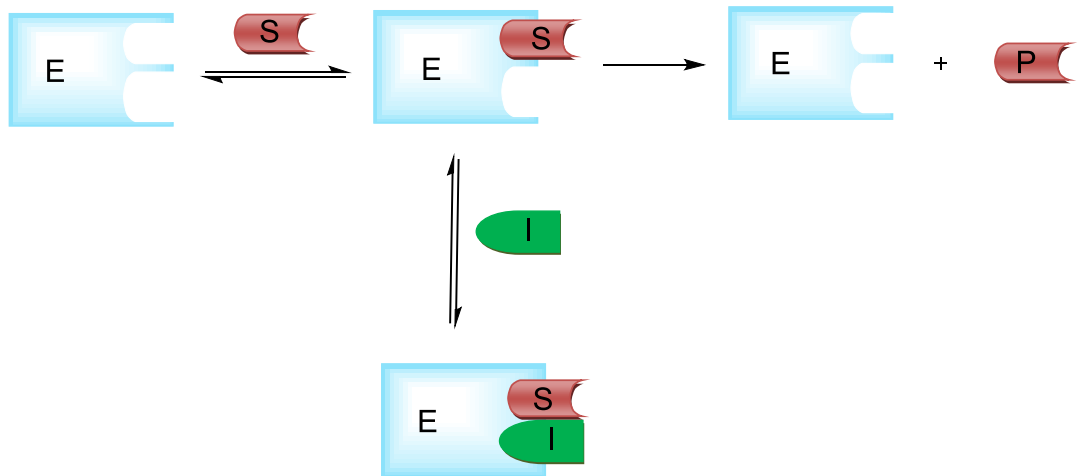
Şekil 1.2. Dönüşümsüz inhibisyonun şekil olarak gösterimi



Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyonunşekil olarak gösterimi

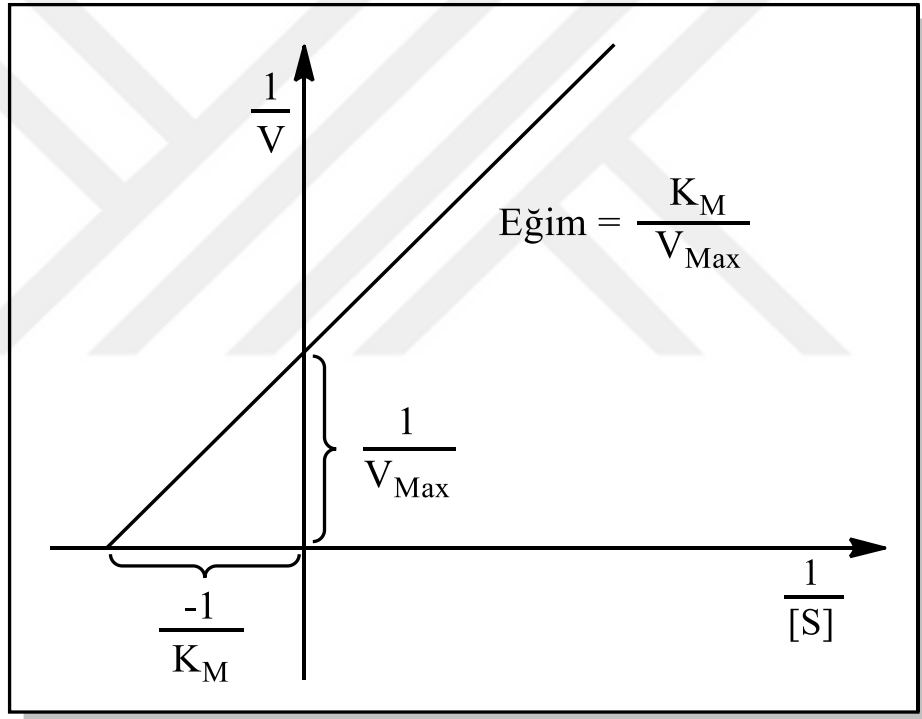


Şekil 1.4. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunşekil olarak gösterimi



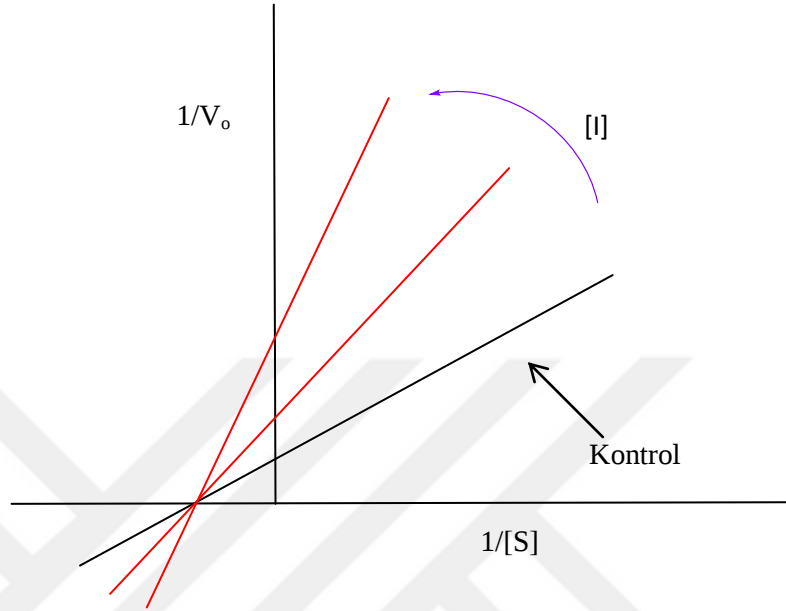
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyonunşekil olarak gösterimi;

Michaelis-Menten kinetiğinden farklı olarak karşımıza çıkan allosterik enzim kinetiği; sigmoidal grafikler göstermektedirler. İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için iki temel yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en çok kullanılan Lineweaver–Burk eğrisi (Şekil 1.6); $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek kesim noktalarından değerlendirmeler yapılarak elde edilir. Bir diğer yöntem olan Dixon grafiği; en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V$ -[I] grafiği çizilerek kesim noktalarından hesaplanarak elde edilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Gilbert 1992; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

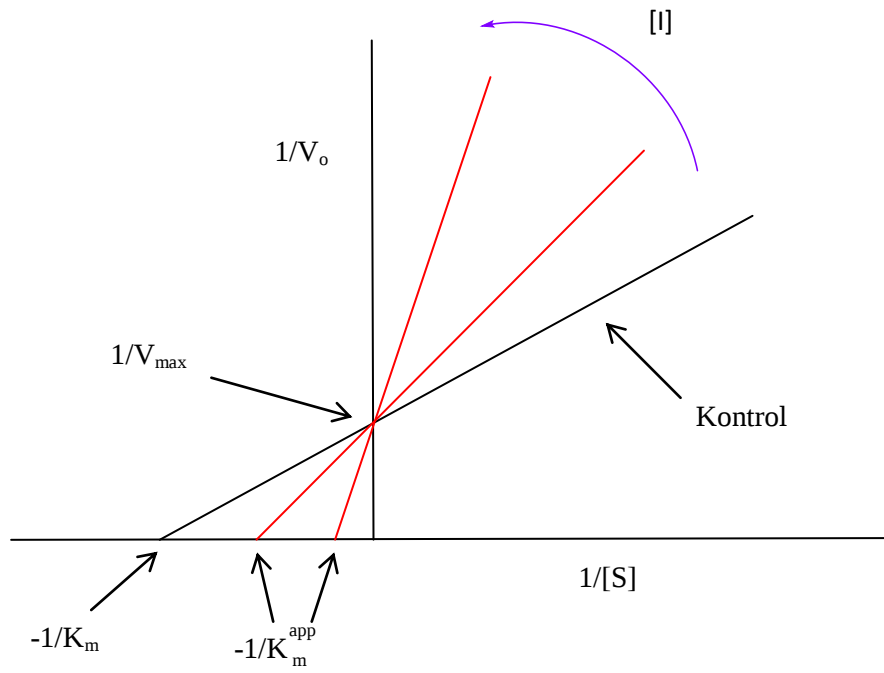


Şekil 1.6. Lineweaver-burk grafiği

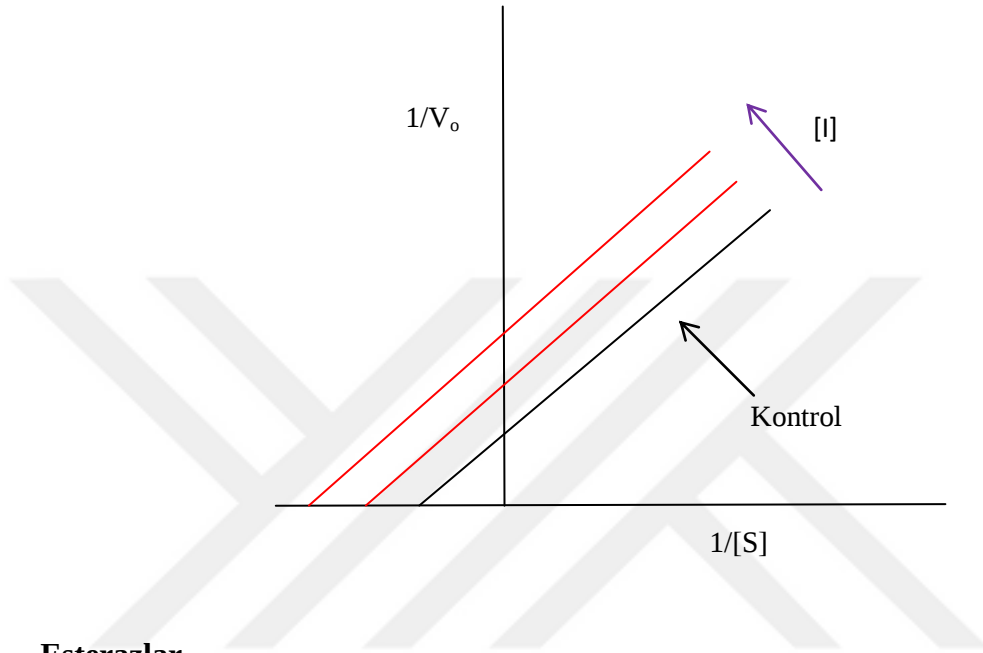
Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon Lineweaver-Burk Grafiği;



Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon Lineweaver-Burk Grafiği;



Yarıyarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon Lineweaver-BurkGrafiği;



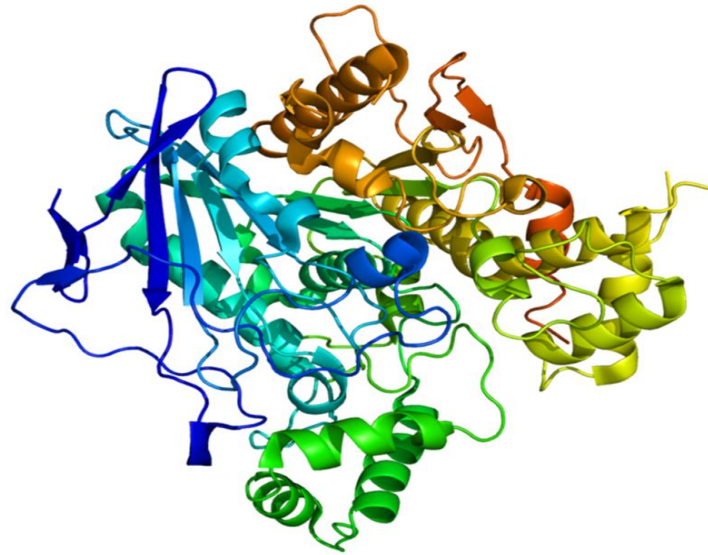
Esterazlar

Esteraz enzimleri feromen ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Esteraz enzimlerinin Asetilesterazlar, Arilesterazlar, Karboksil esterazlar (CaE) ve Kolin esterazlar (ChE) olmak üzere 4 sınıfı bulunmaktadır. CaE (EC 3.1.1.1)'lar α,β -hidrolaz proteinleridir ve gen ürünlerinin birçok dokunun endoplazmik retikulumunda lokalize olduğu bir çok genli süper aileyi oluşturmaktadırlar (Hosokawa vd 1987,1990, 1995,2001; Maki 1991; Satoh 1994; Yamada 1994; Satoh and Hosokawa 1995,1998; Takayama 1998; Mori 1999; Satoh 2005). Bu enzimler ester ve amid-bağı içeren geniş çeşitlilikteki ilaçların hidrolizini katalizlemektedirler (Satoh 2005). OP insektisitlerin en önemli toksikolojik etkilerini esterazların merkezi sinir sisteminde geri dönüşümsüz fosforilasyonu ile sağladıkları bildirilmiştir (Aldridge and Reiner 1972; WHO 1986; Sogorb and Vilanova 2002). OP ve karbamat pestisitler ChE aktivitesini spesifik olarak inhibe etmektedirler (O'Brien 1960) ve ChE aktivitesinin ya sucul çevrelerin bu

bileşikler çekirletildiğine ya da balıkların bu bileşiklere maruz kaldığına dair bir biyoindikatör olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Zinkl 1987; Chuiko 2003).

Bütirilkolinesteraz Enzimi

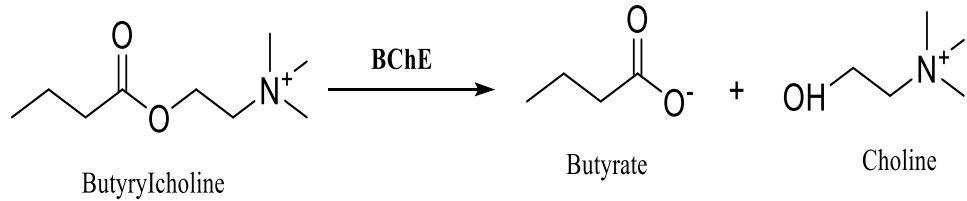
Bütirilkolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) yaklaşık olarak 342 kDa ağırlığında olan tetramerik bir glikoproteindir (Barta 2001). BChE karaciğerde sentezlenip kana karışır (Chatonnet and Lockridge 1989). Ayrıca yağ dokusu, incebağırsak, akciğer ve beyin gibi çeşitli dokularda bulunur (Dave 2000).



Şekil 1.7. Bütirilkolinesteraz enzimini

Görevi çeşitli kolin türevi bileşikleri hidroliz etmektedir. Asetilkolin-asetilkolinesteraz ilişkisi gibi bütirilkolin-bütirilkolinesteraz ilişkisi bulunmamaktadır. Bunun başlıca nedeni ise asetilkolin vücutta çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşturulurken, bütirilkolinin sentetik olması ve vücutta doğal yollardan sentezlenmemesidir (Çokuğraş 2005). BChE pseudokolinesteraz, non-spesifik kolinesteraz ya da basit kolinesteraz olarak da bilinmektedir (Frasco 2006; Kristoff 2006). Asetilkolini hidrolize edebilmesine rağmen daha geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Kokain gibi alkaloidleri içeren diğer esterler üzerine de etki etmektedir (Sun 2002; Selkirk 2005) ve bilinen spesifik doğal bir

substratı bulunmamaktadır. Bütirilkolinesteraz metabolizmada bütirilkolini bütirat ve koline hidroliz ederek katalizleyen enzimdir. Bütirilkolinesteraz, memelilerde bilinen biyolojik substratı olmayan bir enzimdir (Kutty 1989).



Şekil 1.8. Bütirilkolinesteraz enziminin hidroliz mekanizması

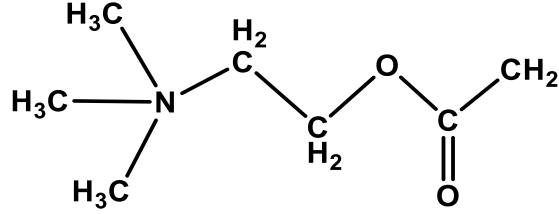
Bütirilkolinesteraz, doğrudan kolesterol veya kolesterol esterlerinin karşılıklı etkileşimi ile lipid metabolizmasında etkili olabilmektedir (Soreq 2008). Kolinesteraz aktivitesi ile triaçilgliserol düzeyleri, obezite, koroner arter hastalıkları, tip 2 diyabetes mellitus ve karaciğer yağlanması arasında ilişki olduğunu ortaya çıkaran çalışmalar yapılmaktadır (Darvesh *et al.* 2003). Ek olarak bütirilkolinesteraz geni olmayan farelerde yüksek yağ içerikli diyetin, obeziteye yol açtığı düşünülmektedir (Chatonnet and Lockridge 1989).

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri alzheimer hastalığının ortaya çıkmasında önemli rol oynayan enzimlerdir. Hastalığın kesin nedeni henüz tam olarak bilinmemekle beraber, kolin bileşiklerinin eksikliği arttıkça bu hastalığın ortaya çıkma olasılığının arttığı bilinmesinden dolayı, bu enzimler ile ilişkilendirilmiştir. Asetil kolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak alzheimer tedavisinde kullanılan yöntemlerin başında yer almaktadır. Bu amaca yönelik olarak da kolin bileşiklerini inhibe edici özellikte olan kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Beach 2000).

Asetilkolinesteraz Enzimi

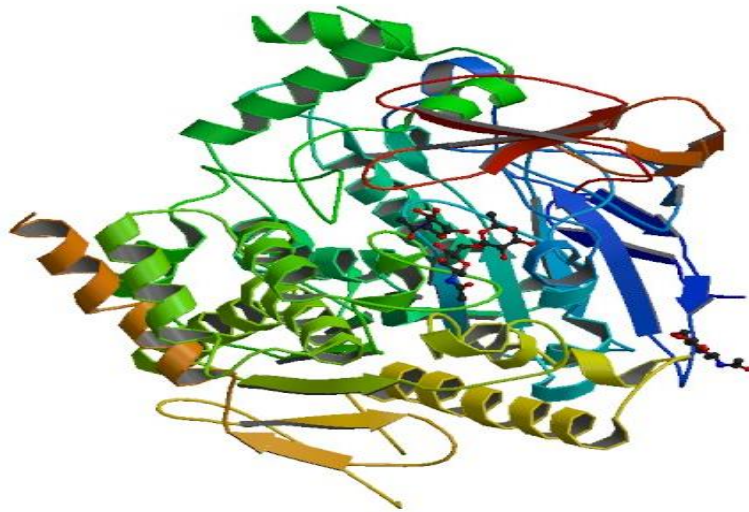
Asetilkolinesteraz enzimi (AChE, E.C.3.1.1.7) 1938 yılında ilk kez elektrik balığının (Torpedomarmoreta) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır (Phillips

1996; Öztaşkın 2015). Asetilkolin büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Onun güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur (Nachmansohn 1952).



Şekil 1.9. Asetilkolin açık yapısı

Önceleri bazı farmakolog ve fizyologlar, bu esterin sadece sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevi olduğuna inanıyorlardı. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu esterin sadece bir görevi yapmadığı ayrıca sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu bulundu (Wilson and Nachmansohn 1954). Organizmadaki asetilkolinin faaliyeti asetilkolinesteraz enzimi tarafından kontrol edilir. Bu enzim asetilkolinin kolin ve asetik aside parçalanmasını sağlar (Bingöl 1977).

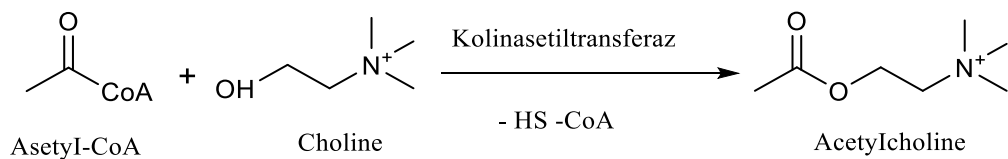


Şekil 1.10. Asetilkolinesteraz enzimi

Asetilkolinesteraz enzimi metabolizmada asetilkolinin, kolin ve asetata hidrolizlenmesini katalizler (Polat ve Köse 2015). Asetilkolinesteraz enzimi eritrositlerde, dalakta, karaciğerde, sinir uçlarında ve beyinin gri cevherinde bulunmaktadır (Nachmonsohn and Lededer 1939; Aras ve Erşen 1988). Asetilkolinesteraz (AChE), dokularda serbest veya fosfolipidlerle birleşik halde bulunan lipotrofik etkiye sahip, asetilkolini hidrolizleyen özelleşmemiş bir enzimdir (Ryhanen 1983; Chatonnet and Lockridge 1989; Massoulie 1992). Asetilkolinesterazın temel yapısal ve katalitik birim, kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir glikoproteindir. Enzim bulunduğu dokuya göre bu birimin monomer, dimer veya tetrameri şeklinde bulunur (Massoulié *et al.* 1993). Bu enzimin eksikliği veya yetersizliği halinde merkezi sinir sisteminde aksaklıklar meydana gelmektedir (Lotti 1995).

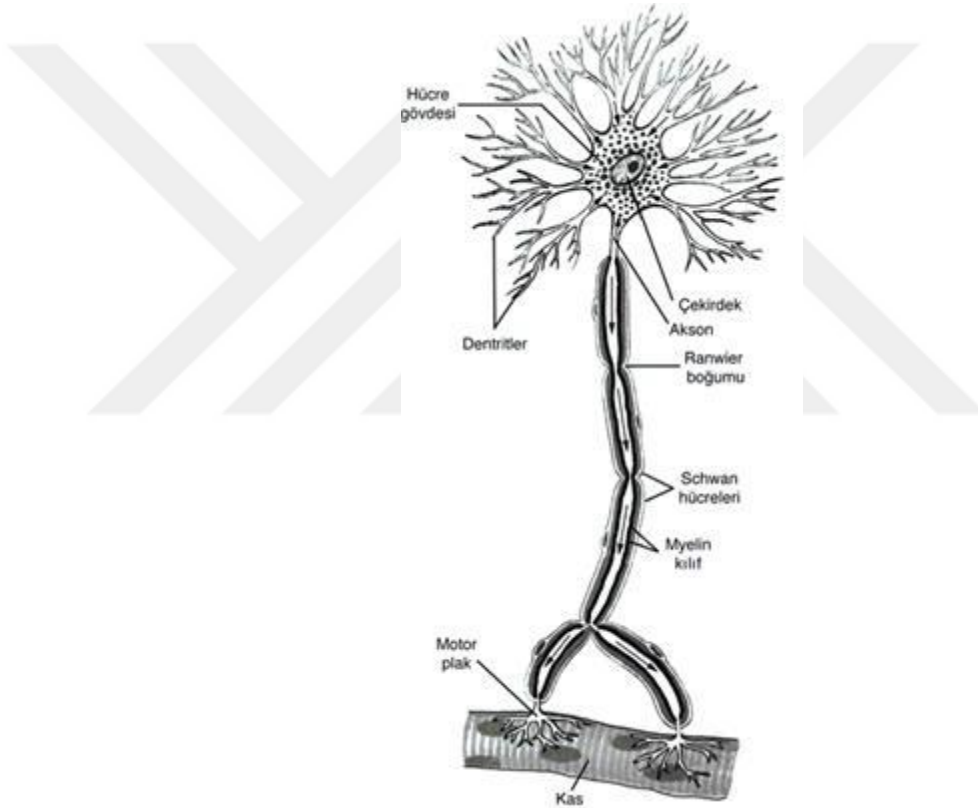
Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar

Protozoon ve süngerlerde de saptanan ve hayvanlar âleminde tüm canlılarda bulunan kolinesterazlar serin hidrolazların bir sınıfıdır (Wilson and Cabib 1956; Talesa 1993b; Marcel 1998; Stojan 2004; Focardi 2006). Asetilkolin, kolinerjik sinir uçlarında gösterildiği gibi kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolinin asetil-CoA ile enzimatik asetilasyonundan sentez edilmektedir. Asetilkolinesteraz enzimi başta sinir ve kas dokusunda bulunmak üzere pek çok dokuda bulunan bir enzim olup, esas görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini sağlamaktır. Asetil kaynağı, sinir ucundaki mitokondrilerde sentezlenen asetilkoenzim A'dır. Kolin kaynakları ise; sinir aralığında asetilkolin yıkımıyla, vücutta fosfolipid (fosfatidilkolin) yıkımıyla açığa çıkan ve diyetle alınan kolindir. Kolin sinir ucuna sinaps veya kavşak aralığından aktif transportla alınmaktadır. Kolinin asetillenmesi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir (Kent 2000).



Şekil 1.11. Asetilkolinin sentez reaksiyonu

Sinir hücrelerindeki aksonlar diğer hücelere sinyal iletiminden sorumludur. Sinir gövdesinin ince uzantıları olan dendritler ise komşu sinir hücresinden gelen kimyasal uyarıları almakla görevlidirler. Bu uyarılar, hücre gövdesinde elektriksel uyarıya dönüştürülmektedir. Sinir hücresi zarı boyunca kendini gösteren bu elektrokimyasal değişime "**aksiyon potansiyeli**" adı verilmektedir (Kiss and Vizi 2001).

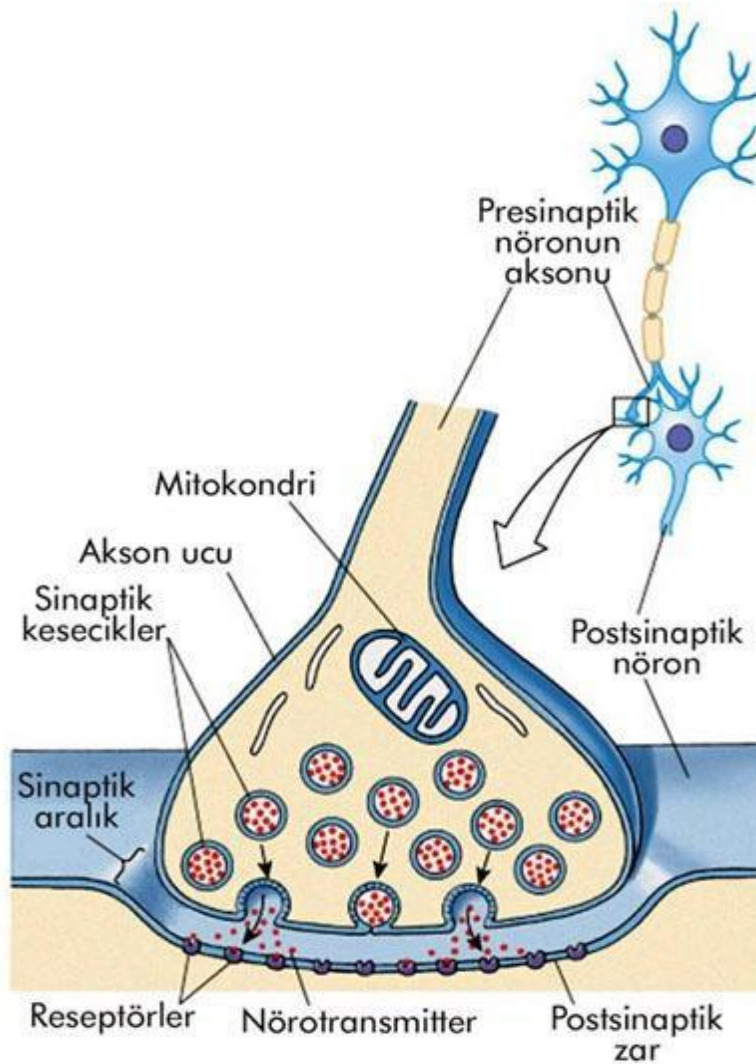


Şekil 1.12. Sinir hücresinin yapısı

Oluşan aksiyon potansiyeli dendritten aksona ve oradan akson boyunca ilerleyerek akson ucuna geldiğinde, içleri kimyasal iletici maddelerle (asetilkolin gibi bir nörotransmitter) dolu kesecikleri uyarmaktadır. Uyarılmış olan bu kesecikler, ekzositoz yoluyla içerdikleri iletici maddeleri salgılamaktadırlar (Noyan 1988). Böylece elektriksel uyarı, nörotransmitter yardımıyla kimyasal bir uyarı haline

dönüştürülmektedir. Bu kimyasal uyarı da bir sonraki sinir hücresinde yeni bir aksiyon potansiyeli başlatmaktadır (Noyan 1993; Bayrak 2008).

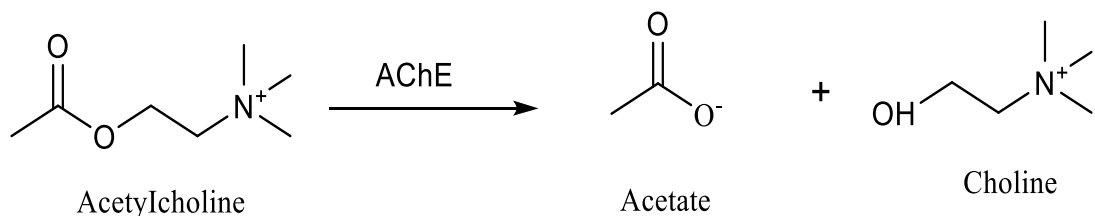
Akson ucundan bu şekilde salgılanan sinirsel iletiler, iki sinir hücresini birbirine bağlayan sinaptik aralığa geçmektedir. Sinaptik aralığı oluşturan sinir uçlarından sinirsel uyarıyı aktaran uca "sinaps öncesi (presinaptik) uç", sinirsel uyarıyı alan uca ise "sinaps sonrası (postsinaptik) uç" adı verilmektedir (Bunin and Wightman 1999).



Şekil 1.13. Nöronların diğer nöronlara ya da kas veya salgı bezleri gibi nöron olmayan hücrelere mesaj iletimine olanak tanıyan özelleşmiş bağlantı noktaları olan sinapsların gösterimi

Elektriksel uyarı akson ucuna vardığında, sinaps öncesi uçtan salgılanan sinirsel iletiler, sinaps sonrası uçta bulunan reseptörleri uyarmaktadırlar. Reseptörler, hücrelerde dış (ör. ilaçlar) ya da iç kaynaklı kimyasal madde moleküllerini seçici bir şekilde bağlayan, etkinin başlamasına aracılık eden yapılardır. Uyarılmış olan reseptör, kendisine bağlı olarak çalışan çeşitli enzim sistemlerini etkinleştirerek ya da baskılayarak ya da hücre yüzeyinde bulunan iyon kanallarını açıp kapatarak, hücrede aksiyon potansiyeli oluşmasını sağlamaktadır. Uyarma işlemi tamamlandıktan sonra, süreçte rol oynayan nörotransmitterler, ya sinaptik aralıkta bulunan enzimlerce yıkılmakta ya da sinaps öncesi uca geri alınmaktadır (Bear *et al.* 2006; Bayrak 2008).

Bir nörotransmitter olarak asetilkolinin görevi, sinir hücreleri tarafından sinaptik aralığa salındıktan sonra sinirsel uyarıları sinir sistemi boyunca taşıyarak, bunların kaslara veya ilgili dokulara ulaşmasını sağlamaktır (Geula and Mesulam 1999). Kolinerjik ileti sinaptik aralıktaki asetilkolinin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hızlı (30 milisaniye içerisinde) katalitik hidrolizi yolu ile sonlandırılmasına bağlıdır (Swartz 2000).



Şekil 1.14. Asetilkolinin enzimatik hidrolizi

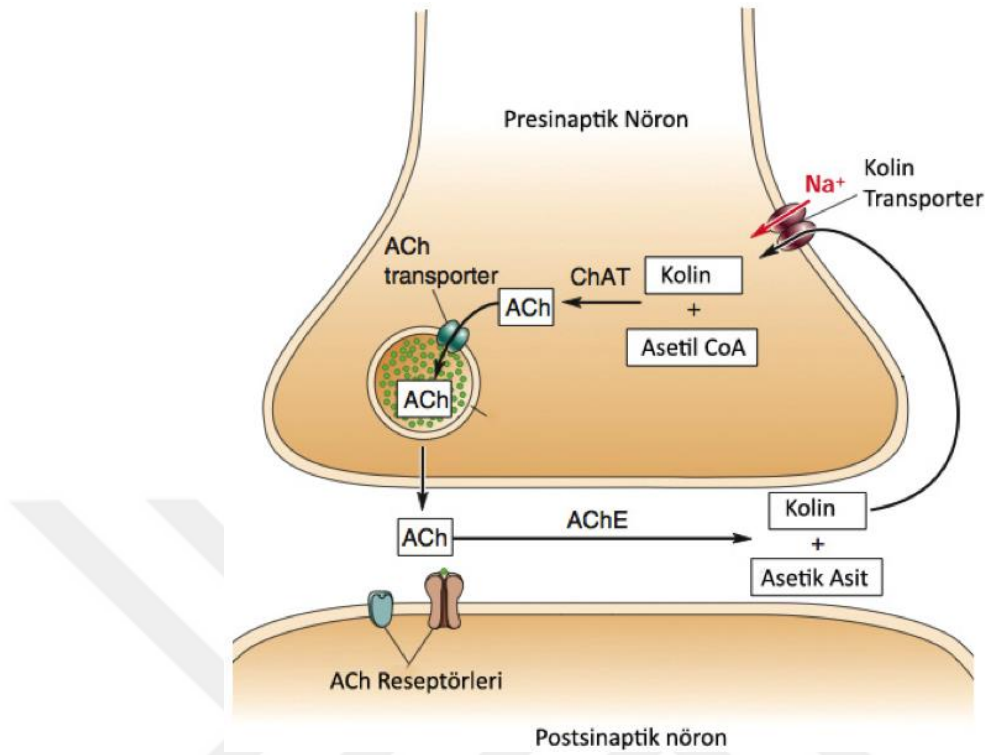
Bu hidroliz sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin tekrar presinaptik nörona alınarak yine ACh sentezinde kullanılmaktadır. Kolinesterazların ortamda bulunmaması, hem ACh sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki ACh etkisinin uzamasına yol açmaktadır (Silver 1974).

AChE inhibisyonu, asetilkolin yetmezliği ile paralel giden Alzheimer hastalığı, myasteniagravis gibi hastalıklarda sinaptik aralıktaki ACh'i artırmak üzere tedavi

amaçlı kullanıldığı gibi öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere kimyasal sinir gazlarının üretiminde de kullanılmaktadır (Silver 1974; Mesulam *et al.* 2002).

Asetilkolin omurgalılarda ve diğer hayvanlarda yakın sinir hücreleri 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 bir olaydır. Elektrik yüklü iyonlar sinir ve kas hücrelerini kaplayan membranlar boyunca akar ve bir sinir uyarılmasıyla uzun sinir lifleri boyunca bir iyon akışı bir sinapsa ulaşmaya kadar devam eder. Sinir hücresindeki küçük baloncuklar içindeki depo edilen taşıyıcı asetilkolinin serbest kalması sağlanır (Noyan 1996).

Asetilkolin, bugün Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır (Kent 2000). Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması ile karakterizedir. Hastalık temel olarak asetilkolin azalması, kolinesteraz metabolizmasındaki değişim ve dejenerasyon ile ilişkilidir. Asetilkolin beyin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitterdir. ACh (asetilkolin) kolinerjik nöronların gövdesinde asetilkoenzimA (CoA)'dan gelen asetil ve kolinin kolin asetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi ile oluşur. Asetilkoenzim A glikoliz ürünüdür. Kolinin ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik boşluğa döker. Sinaptik boşluğa dökülen ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir.



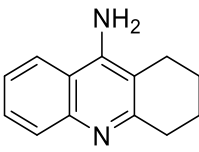
Şekil 1.15. Asetilkolin metabolizması

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki sınıfa ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolinasetilhidrolaz) ve bütirilkolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 açilkolinaçilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya pseudokolinesteraz olarak bilinir. AChE beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, BChE ise serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur.

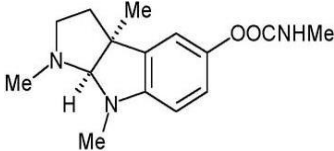
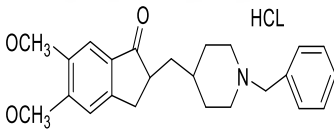
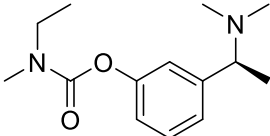
AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil rolü oynar. İkinci basamakta ise enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığıyla mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür. AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir.

Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen 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 sinir hücrelerine asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeyini arttırmak için uygulanacak diğer bir yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Asetilkolinin sinaptik boşlukta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın tedavisinde en sık uygulanan stratejidir (Temel, H.E.,2008) 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 nörotransmitteri olan asetilkolini salındığı sinir ucunda hidroliz eden ve dolayısıyla miktarının azalmasına sebep olan asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek, hastanın davranış bozukluklarında anlamlı bir gerileme sağlamaktadır (Giacobini 1995).

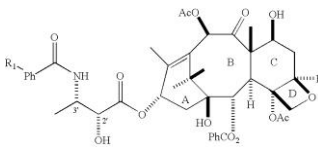
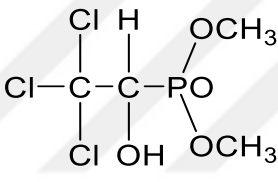
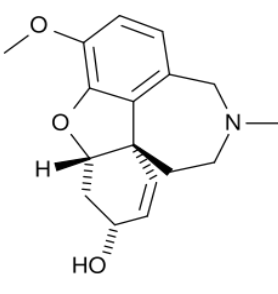
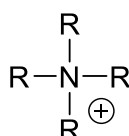
Çizelge 1.1. Kolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan moleküller

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 butirilkolinesterazın tersinir, yarışmalı inhibitörüdür.

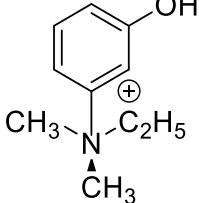
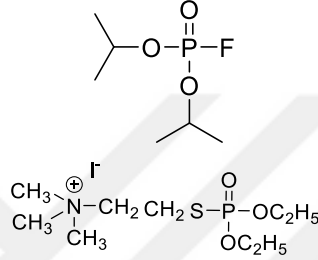
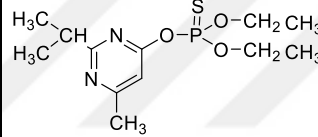
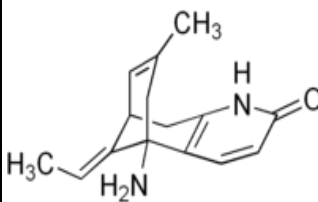
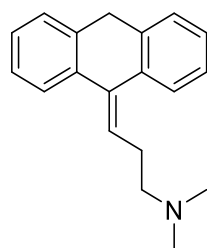
Çizelge 1.1. (devam)

Fizostigmin		Fizostigmin ilk kolinesteraz inhibitörüdür, glokomda kullanılan ilk etkili ilaç (1877’de) ve mynestiagravis’teki ilk etkili tedavidir (Liebelt 2007)	SSS ve periferik sinir sistemindeki kolinerjiksınapslardaasetilkolinesteraz 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.	ReversiblAChE inhibitörüdür ve serebral AChE üzerinde nispeten spesifik bir inhibisyona yol açar (İseriandEfendi, 2003) .
Rivastigmin		Kolinesteraz enziminin esteratik bölgesine bağlanan ancak çok yavaş ayrılan bu nedenle de psödo-reversiblinhibisyon yapan bir ilaç olarak tanımlanmıştır (İseriandEfendi, 2003)	Korteks ve hipokampusdaki kolinesterazı seçici olarak inhibe eder.

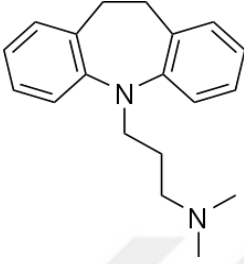
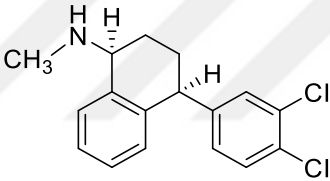
Çizelge 1.1. (devam)

Eptastigmin		Fizostigmininindol halkasındaki karbamoyl-metil grubunun karbamoylheptil grubu ile değiştirilmesiyle elde edilmiştir.	İn vivo olarak beyinde, in vitro olarak ise kırmızı kan hücrelerinde kolinesteraz inhibityonu yapar (Saraçoğlu 1998)
Metrifonat		Organizmada non-enzimatik bir yol ile etken metaboliti olan diklorvos'a dönüşerek etkinlik kazanan bir pro-drug'dır.	Diklorvos enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. İntrinsikanti kolinesteraz etkisinin olmayışı diğer inhibitörlerden farklıdır (Saraçoğlu, 1998).
Galantamine		Reseptörün allosterik bölgesine bağlanarak asetilkolininnikotinik reseptörler üzerindeki intrinsik etkisini artırır (Yalgın, 2001).	Tersiyer bir alkaloidolanseçici, yarışmalı ve geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür.
Tetraalkil amonyum iyonları		Anyonik kısma bağlanır ve asetilkolinin hidrolizini önler.	Tersinir bir inhibisyon meydana getirir.

Çizelge 1.1. (devam)

Kuarterner amonyum alkolleri			Asetilkolinestera z'ınnon-kovalent tersinir bir inhibitörüdür.
Organofosfatlar		50 farklı madde vardır. Fosforik asitin ester yada amidleridir.	Asetilkolinestera za kovalent olarak bağlanır. Tersinir olmayan uzun bir etkiye sahiptir.
Böcek öldürücüler		Memelilerde çok hızlı bir etki gösterirler.	Tersinir olmayan bir yolla asetilkolinesteraz ı inhibe ederler
Huperzin A			Doğal olarak bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür.
Amitripllin		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.

Çizelge 1.1. (devam)

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 ve psikomotor performansı etkilemez.	Nöronal serotoninin (5-HT) in vitro güçlü ve spesifik bir geri alım inhibitörüdür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedomarmoreta) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan asetilkolinesteraz enzimi, diğer kolin esterazlardan asetilkolini hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilmektedir. Bu nedenle asetilkolinesteraz olarak adlandırılır. Birçok dokuda farklı tipleri bulunmaktadır (Nachmansohn *et al.* 1939).

İlk kez polisiklikaromatik hidrokarbonların *in vitro* muhtevası elektrik balığından saflaştırılan asetilkolinesteraz aktivitesi üzerine yarışmalı bir inhibisyon etkisi gözlenmiştir. 3 yada daha yüksek aromatik halkalar ihtiva eden polisiklik aromatik hidrokarbonlar en yüksek inhibitör etkisi gözlenmiştir (Kang and Fang 1997).

Asetilkolinesteraz başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferel birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir enzim olup, ana görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini bitirmektir. Asetilkolinesterazın temel yapısal ve katalitik birimi, kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir glikoproteindir. Enzim bulunduğu dokuya göre bu birimin monomer, dimer veya tetrameri şeklinde bulunur (Massoulié *et al.* 1993). Enzim etkisiyle farklı substratların hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin farklı olması, serum ve kırmızı kan hücrelerindeki asetilkolinesterazın farklı tipleri olduğunu göstermektedir. Mesela serum kolinesterazında asetilkolin, butirilkoline göre daha fazla hidrolizlenir. Butirilkolin kırmızı kan hücrelerindeki enzim tarafından çok zor hidrolize uğrar. Yani gerek serum ve gerekse kırmızı kan hücrelerinde enzimin iki tipi de mevcuttur. Ancak miktarları farklıdır. Tip I kolinesterazolan hakiki kolinesteraz, sinir dokusunda bulunur. Serumda ve kırmızı kan hücrelerinde ki tip II kolinesteraz (Pseudokolinesteraz) yanında gerçek kolinesteraz da vardır (Nachmansohn and Lededer 1939; Nachmansohn and Rothenberg 1944a; Nachmansohn and Rothenberg 1944b).

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.

1971 yılında Main ve arkadaşları at serumundan asetilkolinesteraz enzimi saflaştırmışlar ve saflığını elektroforezle ispatlamışlardır. At serumundan kolinesterazlar en az %95 saflıkta elde edilmiş. SephadexG-200 ve Sepharose6B jel filtrasyonu kullanılarak başarılı bir saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Asetilkolin için K_M sabiti 0.53 mM, turnover sayısı 61.020 dak^{-1} olarak pH: 8 de ve 25°C 'de belirlenmiştir. Bütilkolin için K_M sabiti 0.29 mM, turnover sayısı $171,000 \text{ dak}^{-1}$ olarak pH: 7.6 da sıcaklık 25°C 'de belirlenmiştir (Main *et al.* 1971).

Yine aynı araştırmacılar başka bir çalışmada insan eritrositlerinden asetilkolinesteraz enzimi saflaştırmışlar ve enzimin kinetik özelliklerini tespit etmişlerdir (Main *et al.* 1974).

İnsan eritrosit asetilkolinesterazı saflaştırılmış ve kısmi aminoasit sequence analizleri yapılmıştır (Chhajlani *et al.* 1989).

Sığır epidimal spermlerinden bu enzim saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (Bruns and Casillas 1990).

Sirke sineğinden asetilkolinesteraz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır (Gnagey *et al.* 1987).

Bu görevi yerine getirebilmeleri için şekillerini, iç yapılarını 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 (Galbraithand and Wattschanges 1980).

Karbonikanhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadieve O'Brien tarafından, birbirlerinden ayrı olarak keşfedilmiştir. Keilin ve Martin ise 1944 yılında insane eritrosit karbonikanhidraz enzim aktivitesinin çinko içeriği ile bağlantılı olduğunu ve çinkonun katalizlemede özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Karbonikanhidraz enzimi böylece tanımlanan ilk metalo enzim olarak tarihe geçmiştir. HCA enzimi bir çok bitki, mantar, böcek, memeli dokuları ve suda yaşayan canlılar gibi geniş bir canlı topluluğunda tespit edilmiştir (Krungrai and Beydemir 2005; Yu 2006). CA enziminin bitkilerdeki molekül kütlesi 160-260 kDa arasında olduğu ve memelilerde ise yaklaşık olarak 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir. Bu enzim ciğer, göz ve merkezi sinir sistemi gibi bir çok dokuda bulunmaktadır (Beydemir 2002; Beydemir ve Gülçin 2004).

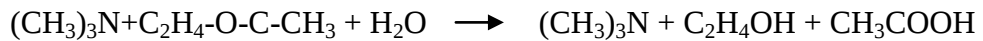
İnsan eritrosit asetilkolinesterazın yapısı tespit edilmiş ve Akrininyum reçine afinitekolonu kullanılarak saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesinin 5000-5800 ünit/mg olduğu tespit edilmiş daha sonra ise enzimin alt birimlerinin ditiyotreitol ile indirgenerek subunitmonomerlerinin molekül ağırlığı 75 kDa olarak belirlenmiştir (Rossenberry and Scoggin 1984).

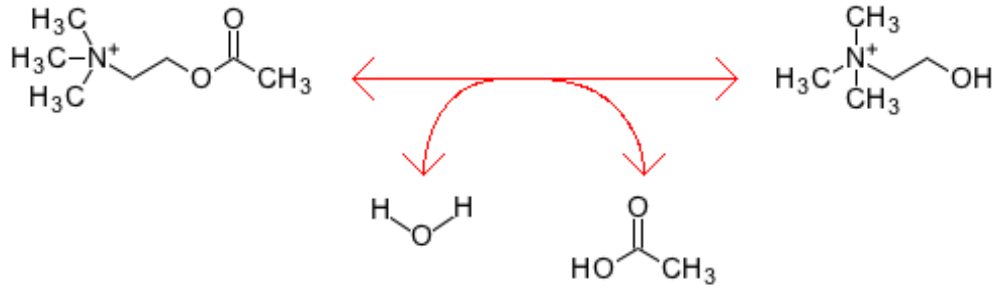
İnsan beyni başlıca iki tip kolinesteraz içermektedir; 7. Kromozom tarafından kodlanan asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ve diğeri 3. kromozom tarafından kodlanan butirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) (Mesulam 2002; Darvesh 2003). Sağlıklı bir beyinde normal olarak asetilkolinesteraz baskındır. Ancak, Alzheimer hastalığında beyinde asetilkolinesteraz aktivitesi ya değişmeden kalır ya da azalırken, butirilkolinesteraz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Greig 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 2005). Ayrıca, kolinesterazlar nörotogenesis, synaptogenesis ve glia aktivasyon, beyin kan akışı, hücre yapışması, amiloid kaskatı ve taufosforilasyon gibi enzimatik fonksiyonlarla ilgisiz klasik olmayan hareketlere sahip olduğu belirlenmiştir (Mesulam 2002; Giacobini 2003).

Oldukça spesifik olan ve yalnızca asetilkolini hidroliz eden ester dış çevre ile lifin iç kısmı arasında konsantrasyon farklılıklarının oluşması neticesi sodyum iyonu geçişi ve bir elektrik akımının meydana gelmesine de sebep olmaktadır. Bu olayın sonunda ester, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek inaktif hale getirilir. Hidroliz sonunda iki tane inaktif kısım meydana gelir. Bunlar kolin ve asetik asittir. Bir süre sonra inaktif formlar restore edilerek eski haline dönerler ve sonraki impulsu geçirmeye hazır hale gelirler. Enzimin bu etkisi iletimin esasını oluşturmaktadır. Asetilkolin iskelet kası liflerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanarak, lifin kasılmasına neden olur. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur ve bu yüzden beyinde asetilkolin içeren nöronlar mevcuttur (Akman 2007).

O

II





Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimini incelemiştir. Bu çalışmada 3 ay boyunca, donepezil ve rivastigmin tedavisi alan Alzheimer hastalarında kolinesteraz inhibisyonu ile oksidatif stres değişiminin incelenmesi hedeflenmiştir. Alzheimer hastalığı tanısı konulan 13 hastaya (8 kadın, 5 erkek) rivastigmin, geri kalan 13 hastaya (8 erkek, 5 kadın) ise donepezil tedavisi uygulanmıştır. Kontrol grubu ise 17 sağlıklı kişiden (9 erkek, 8 kadın) oluşturulmuştur. Kontrol grubu ile tedavi öncesi ve sonrasında hasta grubundan elde edilen örneklerde; asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, süperoksitdismutaz, katalaz, glutatyonperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit düzeyleri ölçülmüştür. Mini mental durum incelemesi yapıp, kognitif demans evrelendirilmesi ve günlük yaşam becerileri gözlenmiştir. Yapılan çalışmada rivastigmin ve donepezil tedavisinin Alzheimer tanı gruplarında arttığı belirlenen malondialdehit düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığı, Alzheimer hastalarında azalmış olduğu saptanan eritrosit süperoksitdismutaz ve katalaz aktivitesini belirgin düzeyde arttırdığı saptanmıştır. Rivastigmin tedavisinin plazma bütirilkolinesteraz aktivitesini, donepezil tedavisinin ise eritrosit asetilkolinesteraz aktivitesini anlamlı düzeyde azalttığı ve Rivastigmin tedavisi uygulanan hastaların günlük yaşam becerilerinin olumlu etkilendiği gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar; rivastigmin ve donepezil tedavisinin Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde asetilkolin düzeylerini artırarak kolinerjik iletinin düzenlenmesine yardımcı olabileceğini ve aynı zamanda oksidatif stres üzerindeki olumlu etkileri ile tedavinin etkinliğinin artırılmasında rol oynayabileceğini göstermektedir (Temel 2008).

Edrophonium-Sepharoseafinite kolonu kullanarak çeşitli vücut sıvılarından çözünebilir. Asetilkolinesteraz'ın saflaştırılması işlemini gerçekleştirilmiş; ancak kullanılan matriks seçilen bütün vücut sıvılarında aynı başarıyı göstermemiştir (Hodgson and Chubb 1983)

Guhathakurta ve arkadaşları tarafından 1989 yılında keçi beyni asetilkolinesterazına saf ve ticari bazı pestisidlerin *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Araştırmada pestisid olarak karbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7- benzofuranil N-metilkarbamat), pentoat (O,O-dimetil-S-(a-etoksi karbonil benzilfosforoditiyoat), diizopropilflorofosfat (DFP) ve fisostimin kullanılmıştır (Guhathakurta *et al.* 1989).

Asetilkolinesteraz aktivitesinin yeni ve hızlı birkolorimetrik tayinini göstermişlerdir. Bu çalışmada doku ekstratları, homojenatlar, hücre süspansiyonları, asetilkolinesteraz aktivitesini belirlemek için fotometrik bir yöntem olarak tarif edilmiştir. Enzim aktivitesi, ditiyobisnitrobenzoat iyonu ile tiyokolin reaksiyona girdiğinde üretilen sarı renk artışı gözlenerek ölçülmüştür (Ellman *et al.* 1961).

Tavuk beyin membranına bağlı asetilkolinesterazı saflaştırılmış ve özelliklerini araştırılmıştır (Rotundo 1984).

1996 yılında Türkoğlu sığır serum ve eritrositlerinden asetilkolinesterazı afinite kromatografisiyle saflaştırmış ve bu saf enzim üzerine bazı pestisitlerin etkilerini araştırmıştır. Yapılan çalışmada sepharose-4B-EDCI kolonu kullanılarak sığır serum ve eritrositlerinden asetilkolinesteraz saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin saflığı kontrol edildikten sonra, 8 ayrı pestisidin etkisi araştırılmıştır. Enzim saflaştırma oranı sığır serumu için 4301 kat, sığır eritrositi için 4367 kat olarak bulunmuştur. Kullanılan her bir pestisidin K_i ve IC_{50} değerleri tespit edilmiştir (Türkoğlu 1996).

2006 yılında Nino ve arkadaşları Kolombiya florasındaki bazı bitkilerin ham ekstraktlarının asetilkolinesteraz enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Bitki materyali olarak Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae,

Rubiaceae ve Solanaceae familyasından 27 çeşit bitki kullanılmıştır. Bu bitki ekstraktlarının IC_{50} değerleri verilmiştir (Nino *et al.* 2006).

Asetilkolinesteraz enzimini insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırmıştır. Saflaştırma basamakları sonucunda 0,0153 mg AChE, %23,5 verimle 658 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiş ve tek bant bulunmuştur (80 kDa). Enzim aktivite ölçümünde pH 7,4'de asetiltikolinyodat substratı kullanılmıştır. Saflaştırılan AChE'nin 20°C pH 7,4'de K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,372 mM ve 0,065 EÜ/mL. dk olarak belirlenmiştir. Hazırlanan afinite kolonunda bağlanma kapasitesi 20°C'de pH 7,4 ve 0,1 M iyonik şiddet konsantrasyonunda 0,07 mg/g jel ve ligand olarak kullanılan takrin inhibitörü I_{50} değeri 4.5.10⁻⁵ mM olarak bildirilmiştir (Kaya 2012).

Doretti ve arkadaşları, ACh tayin etmek amacıyla bienzimatik sensör hazırlamışlardır. Sensör, dondurma-çözdürme prosesi ile hazırlanmış poli(vinil alkol) membran içerisine AChE ve poli(etilen glikol) modifiyeli ChO'nun fiziksel ko-immobilizasyonu ile elde edilmiştir. Sensör, enzim modifiyeli polimer Pt elektrot üzerinde enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin elektrokimyasal tayinine dayanır. Bu sensörün analitiksel karakterizasyonları olarak Ch ve ACh'in kalibrasyon eğrileri, pH, sıcaklık etkisi ve kararlılığı belirlenmiştir. Optimum pH 8,0; optimum sıcaklık 30°C olarak bulunmuş ve ACh kalibrasyon grafiği 5,0-100,0 mM aralığında lineer olarak elde edilmiştir (Doretti *et al.* 2000).

Literatürde yapılan bir çalışmada insan eritrosit asetilkolinesteraz enzimi üzerine lokal anestetik prokain, tetrakain ve lidokain ile antidepresan imipraminin etkisi çalışılmıştır. Dört amfilik ilacın enzim aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur ve IC_{50} 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 1989).

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 K_i 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 $0,124\text{ mM}$ ve $0,980\text{ }\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak belirlenmiştir (Al-Jafari 1998).

Orhan ve arkadaşları tarafından 2004 yılında 21 çeşit tıbbi bitkinin kloroform: metanol (1:1) ekstraktlarının hem asetilkolinesteraz hemde bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu *in vitro* çalışmada bitkilerden bazılarının % inhibisyon oranlarını önemli ölçüde değiştirdiği görülmüştür. Özellikle Ericaceae familyasındaki bazı bitkilerin asetilkolinesterazı, Fumariaceae ve caeselpiniaceae familyasındaki bazı bitkilerin ise bütirilkolinesterazı kuvvetle inhibe ettikleri anlaşılmıştır (Orhan *et al.* 2004).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise ligand olarak sülfanilamid türevleri kullanılmış, koyun ve sığır sütlerinden LPO saflaştırılması ilk kez tek basamakta gerçekleştirilmiştir (Usanmaz 2014).

2.1. Çalışmanın Amacı

Asetilkolinesteraz (AChE) (EC 3.1.1.7.) asetilkolini hidroliz ile kolin ve asetik aside dönüştürür ve hem sinir uçlarında hem de postsinaptik membran üzerinde yerleştiği bilinmektedir. Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların asetilkolin ve bütirilkolin eksikliği ile derin bir bağlantısı olduğu bilinmektedir. Enzimi inhibe eden bazı ilaçlar Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında AChE enzimi ve BChE enzimi üzerine Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan takrin ilacı türevlerine benzer sülfanilamidlerin bazı türevlerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerini, kinetik parametrelerini belirlemek amaçlandı. Bu çalışmada öncelikle söz konusu enzimler

temin edilerek enzim aktivitesi üzerine sülfanilamid türevi olan organik moleküllerin *in vitro* etkileri araştırılıp ve inhibitör etkisi gösterenler için IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri tespit edildi. Böylece moleküllerin inhibisyon dozajları belirlenip literatüre sunuldu.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılacak kimyasal maddeler

Çalışmamızda, Asetilkolinesteraz enzimi, Bütirilkolinesteraz enzimi, EDTA, Tris-HCl, DTNB, Asetiltiyokoliniyodat, Bütirilkoliniyodat, Sodyum fosfat, triklor asetik asit (TCA), sodyum sitrat, kullanıldı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanıldı.

Spektrofotometre	: BeckmanCoulter
pH metre	: SehotpH-Meter CG840
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fısonswırlılı-mixer
Hassas terazi	: Denver
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Wise Stir-MSH-20A
Saf su cihazı	: BarnsteadEasyPure UV/UF
Su Banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomaticicemachines)
Güç kaynağı	: 1-Bio RadPowerPac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar):	SanyoMedicalFreezer
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 asetiltiyokoliniyodat (enzimin aktivite tayini için kullanıldı): 0,145gram asetiltiyokoliniyodat tartılarak destile su ile 50 ml'ye 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.(Ve günlük hazırlandı.)
4. Sodyum fosfat (NaH_2PO_4) pH=8: 3 gram sodyum fosfat (50 mM) tartılıp, yaklaşık 450 ml destile suda çözüldü. pH metre yardımıyla pH=8 ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
5. Bütirilkoliniyodat: 0,145 gram bütirilkoliniyodat tartılarak destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Asetilkolinesterazın inhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

- 1.Sulfadiazine: 0,0086 g madde 3000 μl DMSO da çözüldü (0,011M).
- 2.Sulfisoxazole: 0,0058 g madde 2000 μl DMSO da çözüldü. Sonra 100 kat seyreltme yapıldı (0,010 M).
- 3.Sulfamerazine: 0,0065 g madde 2000 μl DMSO da çözüldü (0,012 M).
- 4.Sulfamethazine: 0,0061g madde2000 μl DMSO da çözüldü (0,010 M).
- 5.Sulfacetamide: 0,0088 g madde 3000 μl DMSO da çözüldü (0,013 M).
6. DMSO:13,9 molar olarak hazırlandı.

Bütirilkolinesterazın inhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

- 1.Sulfadiazine: 0,01 g madde 1000 μ l DMSO da çözündü (0,039 M).
- 2.Sulfisoxazole: 0,03 g madde 3000 μ l DMSO da çözündü.(0,037 M).
- 3.Sulfamerazine: 0,03g madde 3000 μ l DMSO da çözündü (0,037 M).
- 4.Sulfamethazine: 0,01g madde1000 μ l DMSO da çözündü (0,035 M).
- 5.Sulfacetamide: 0,03g madde 3000 μ l DMSO da çözündü (0,046 M).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasal maddelerin IC₅₀ ve K_i değerlerinin bulunması

Asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolinoyodat (AChI) substratına ve Bütirilkolinesteraz enziminin bütirilkolinoyodat (BChI) substratına bağlı olarak, IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla: optimum sıcaklık ve optimum pH'da, doymuş olmayan asetiltiyokolinoyodat konsantrasyonunda ve bütirilkolinoyodat 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 IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Bu ilaçların K_i değerlerini ve inhibisyon tiplerini belirlemek amacıyla asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enziminin aktivitesini yarıya düşüren madde konsantrasyonu ile bu değerin 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

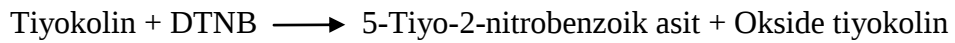
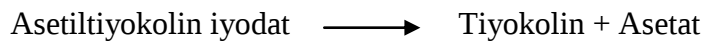
eşit olan $K_{M(I)}=K_M(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $V_{max(I)}=V_{max}/(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi

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.

Sulfanilamid türevlerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Asetilkolinesteraz enzimi hazır olarak temin edildi. Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonunu katalizlerler.

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 1961).



Asetilkolinesteraz enziminin iki substratı vardır. İlki DTNB, ikincisi ise asetilkolinyodat'tır. DTNB hazırlamak için 0,01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat tartılıp, 50 mL saf su içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı. Asetilkolinyodatı hazırlamak için 0,145 g asetilkolin tartılıp 50 mL saf su içinde çözündürüldü. Ayrıca bu enzim için aktivite tayin yönteminde Tris/HCl tamponu kullanılır. Bu tamponu hazırlamak için 30,27 g Tris ve 0,37 g (5 mM) EDTA tartılıp, yaklaşık 230 mL saf suda çözündü. pH metre ile pH:8'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

412 nm’de 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak yapılan ölçümde, reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin katılım sırası ve miktarları aşağıda gösterilen çizelgedeki gibi uygulandı.

Çizelge 3.1. Aktivite ölçüm prosedürü

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
Tris/HCl	100	100
Saf su	790	800
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	-
Asetilkolinyodür	50	50
Toplam hacim	1000	1000

Sistemin optik yoğunluğundaki artış 412 nm’de 5 dk köre karşı ölçüldü (Ellman 1961)

Çizelge 3.1’deki gibi reaksiyon karışımı ayarlandıktan sonra 1 dakikada bir absorbans değeri okundu ve 5 dakika sonunda 25°C’de 412 nm’de absorbans değeri okunarak ikisi arasındaki fark alındı. Yapılan bu deney 5 farklı inhibitör konsantrasyonu için tekrarlandı. IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplanarak inhibisyon türüne karar verildi.

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

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 asetiltiyokolinyodür’ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir.

3.2.3. Bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi aktivite ölçüm metodu

Sulfanilamid türevlerinin bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Bütirilkolinesteraz enzimi hazır olarak temin edildi. Kolinesterazlar, kolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonunu katalizlerler. Açığa çıkan ürün 412 nm’de absorpsiyon göstermektedir (Ellman 1961).

Bütirilkolinesteraz enziminin iki substratı vardır. İlki DTNB, ikincisi ise bütirilkolinyodattır. DTNB çözeltisini hazırlamak için 0,0034 g DTNB tartılıp, 25 mL saf su içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı. Bütirilkolinyodatu hazırlamak için ise 0,145 g bütirilkolin tartılıp, 50 mL saf suda çözündürüldü. Ayrıca BChE enziminin aktivite tayin yönteminde sodyum fosfat tamponu kullanılır. Bu tamponu hazırlamak için 3 g sodyum fosfat (NaH_2PO_4) (50 mM) tartılıp, yaklaşık 450 mL saf suda çözüldü. pH metre ile pH: 8’e ayarlanıp son hacim saf su ile 500 mL’ye tamamlandı.

412 nm’de 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak yapılan ölçümde, reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin katılım sırası ve miktarları aşağıda gösterilen çizelgedeki gibi uygulandı.

Çizelge 3.2. Aktivite tayin yöntemi

Kullanılan Maddeler	Numune Tüpü (μL)	Kontrol Tüpü (μL)
Saf su	780	800
Sodum fosfat(NaH_2PO_4)	100	100
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	20	-
Bütirilkolinyodür	50	50
Toplam hacim	1000	1000

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

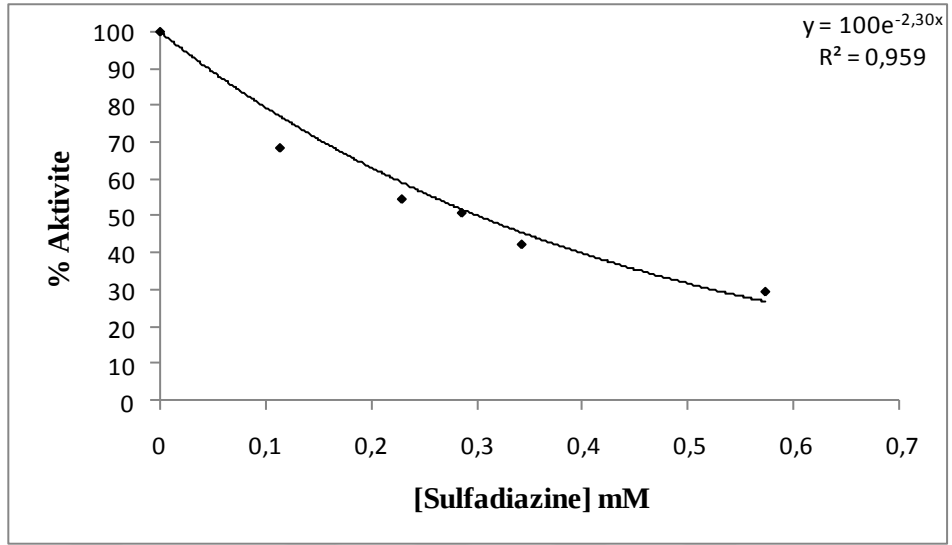
4.1. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar;

4.1.1. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine ile ilgili sonuçlar

Hazır olarak temin edilen asetilkolinesteraz enzimi üzerine Sulfadiazinenin etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite yöntemine göre yapıldı. Bu ölçümler 5 dakikada bir ve 412 nm’de gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine için Aktivite (%)-[Sulfadiazine] ve K_i grafikleri çizildi. Aktivite (%)-[I] grafiği çizmek için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda ölçüm yapıldı. K_i için ayrıca 3 ayrı inhibitör konsantrasyonu seçilip, 5 ayrı substrat konsantrasyonunda (8-12-16-20-24 μ L) çalışıldı. Çizilen grafiklerden IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.1. Sulfadiazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

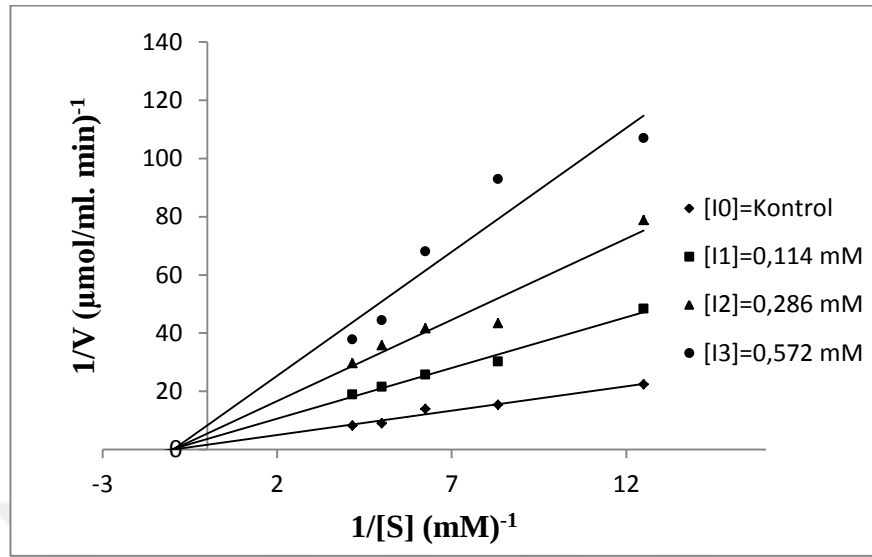
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfadiazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,790	0,1	0,05	0,01	0,05	0,780	0,1	0,05	0,01	0,05	0,01	68,75	0,114
	0,780	0,1	0,05	0,02	0,05	0,770	0,1	0,05	0,02	0,05	0,01	54,68	0,229
	0,775	0,1	0,05	0,025	0,05	0,765	0,1	0,05	0,025	0,05	0,01	50,78	0,286
	0,770	0,1	0,05	0,03	0,05	0,760	0,1	0,05	0,03	0,05	0,01	42,18	0,343
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	29,68	0,572



Şekil 4.1. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfadiazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

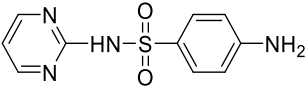
Çizelge 4.2. AChE enzimi için Asetiltiyokolinyodat substratıyla Sulfadiazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör	Kör					Numune						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su(ml)	Tris-HCL (ml)	DTNB (ml)	İnhibitör(ml)	AChI (ml)	Su (ml)	Tris-HCL (ml)	DTNB (ml)	İnhibitör(ml)	AChI (ml)	AChE(ml)		
[I] ₁	0,832	0,1	0,05	0,01	0,008	0,802	0,1	0,05	0,01	0,008	0,03	48,353	12,5
	0,828	0,1	0,05	0,01	0,012	0,798	0,1	0,05	0,01	0,012	0,03	30,218	8,33
	0,824	0,1	0,05	0,01	0,016	0,794	0,1	0,05	0,01	0,016	0,03	25,708	6,25
	0,820	0,1	0,05	0,01	0,020	0,790	0,1	0,05	0,01	0,020	0,03	21,473	5,00
	0,816	0,1	0,05	0,01	0,024	0,786	0,1	0,05	0,01	0,024	0,03	18,841	4,16
[I] ₂	0,817	0,1	0,05	0,25	0,008	0,787	0,1	0,05	0,25	0,008	0,03	78,842	12,5
	0,813	0,1	0,05	0,25	0,012	0,783	0,1	0,05	0,25	0,012	0,03	43,459	8,33
	0,809	0,1	0,05	0,25	0,016	0,779	0,1	0,05	0,25	0,016	0,03	41,684	6,25
	0,805	0,1	0,05	0,25	0,020	0,775	0,1	0,05	0,25	0,020	0,03	35,829	5,00
	0,801	0,1	0,05	0,25	0,024	0,771	0,1	0,05	0,25	0,024	0,03	29,673	4,16
[I] ₃	0,792	0,1	0,05	0,05	0,008	0,762	0,1	0,05	0,05	0,008	0,03	106,93	12,5
	0,788	0,1	0,05	0,05	0,012	0,758	0,1	0,05	0,05	0,012	0,03	92,850	8,33
	0,784	0,1	0,05	0,05	0,016	0,754	0,1	0,05	0,05	0,016	0,03	68,073	6,25
	0,780	0,1	0,05	0,05	0,020	0,750	0,1	0,05	0,05	0,020	0,03	44,404	5,00
	0,776	0,1	0,05	0,05	0,024	0,746	0,1	0,05	0,05	0,024	0,03	37,821	4,16



Şekil 4.2. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfadiazin eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

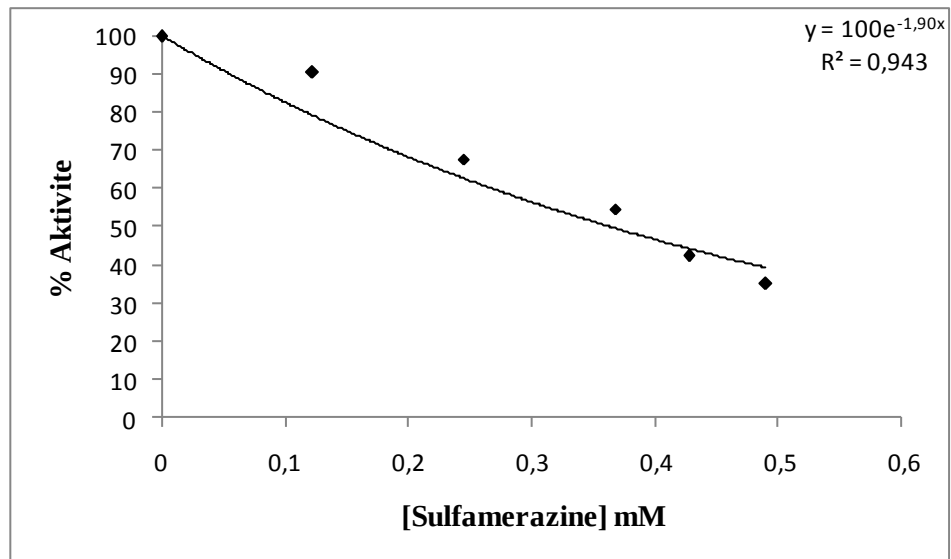
Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfadiazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfadiazine	AChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		0,300	0,118 ± 0,024	Yarışmasız

4.1.2. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamerazine ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.4. Sulfamerazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

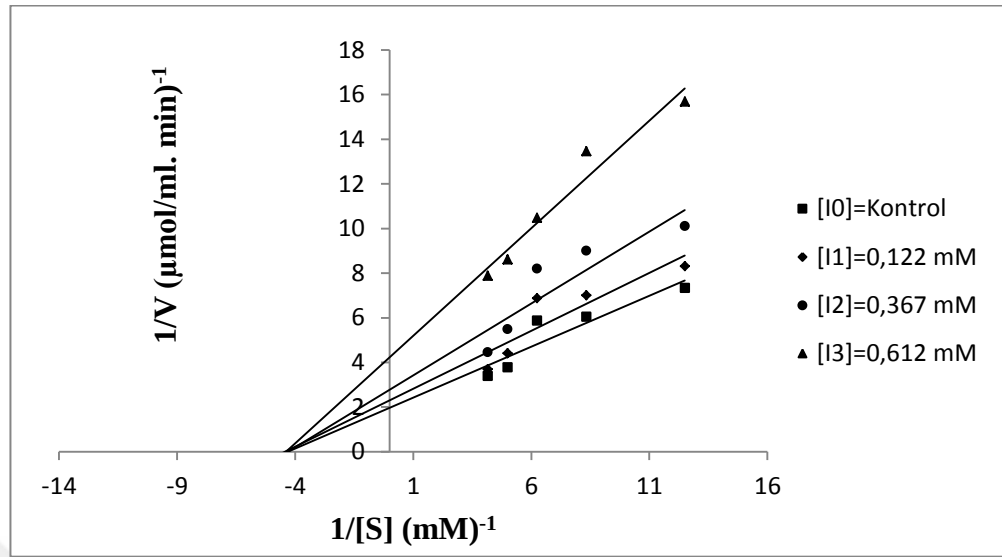
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfamerazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,790	0,1	0,05	0,01	0,05	0,780	0,1	0,05	0,01	0,05	0,01	90,62	0,122
	0,780	0,1	0,05	0,02	0,05	0,770	0,1	0,05	0,02	0,05	0,01	67,96	0,245
	0,770	0,1	0,05	0,03	0,05	0,760	0,1	0,05	0,03	0,05	0,01	54,68	0,367
	0,765	0,1	0,05	0,035	0,05	0,755	0,1	0,05	0,035	0,05	0,01	42,36	0,428
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	35,15	0,490



Şekil 4.3. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfamerazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

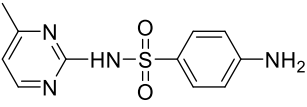
Çizelge 4.5. AChE enzimi için Asetiltiyokolinyodat substratıyla Sulfamerazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
İnhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
[I] ₁	0,832	0,1	0,05	0,01	0,008	0,822	0,1	0,05	0,01	0,008	0,01	8,309	12,5
	0,828	0,1	0,05	0,01	0,012	0,818	0,1	0,05	0,01	0,012	0,01	7,000	8,33
	0,824	0,1	0,05	0,01	0,016	0,814	0,1	0,05	0,01	0,016	0,01	6,872	6,25
	0,820	0,1	0,05	0,01	0,020	0,810	0,1	0,05	0,01	0,020	0,01	4,416	5,00
	0,816	0,1	0,05	0,01	0,024	0,806	0,1	0,05	0,01	0,024	0,01	3,696	4,16
[I] ₂	0,812	0,1	0,05	0,03	0,008	0,802	0,1	0,05	0,03	0,008	0,01	10,10	12,5
	0,808	0,1	0,05	0,03	0,012	0,798	0,1	0,05	0,03	0,012	0,01	9,000	8,33
	0,804	0,1	0,05	0,03	0,016	0,794	0,1	0,05	0,03	0,016	0,01	8,196	6,25
	0,800	0,1	0,05	0,03	0,020	0,790	0,1	0,05	0,03	0,020	0,01	5,485	5,00
	0,796	0,1	0,05	0,03	0,024	0,786	0,1	0,05	0,03	0,024	0,01	4,445	4,16
[I] ₃	0,792	0,1	0,05	0,05	0,008	0,782	0,1	0,05	0,05	0,008	0,01	15,67	12,5
	0,788	0,1	0,05	0,05	0,012	0,778	0,1	0,05	0,05	0,012	0,01	13,45	8,33
	0,784	0,1	0,05	0,05	0,016	0,774	0,1	0,05	0,05	0,016	0,01	10,47	6,25
	0,780	0,1	0,05	0,05	0,020	0,770	0,1	0,05	0,05	0,020	0,01	8,613	5,00
	0,776	0,1	0,05	0,05	0,024	0,766	0,1	0,05	0,05	0,024	0,01	7,874	4,16



Şekil 4.4. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfamerazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

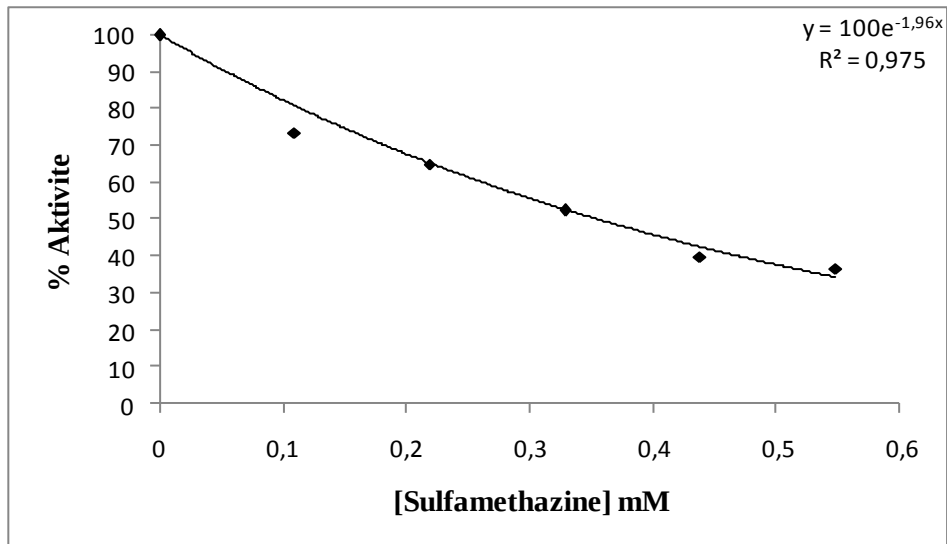
Çizelge 4.6. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamerazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfamerazine	AChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		0,363	0,717 ± 0,193	Yarışmasız

4.1.3. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamethazine ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.7. Sulfamethazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

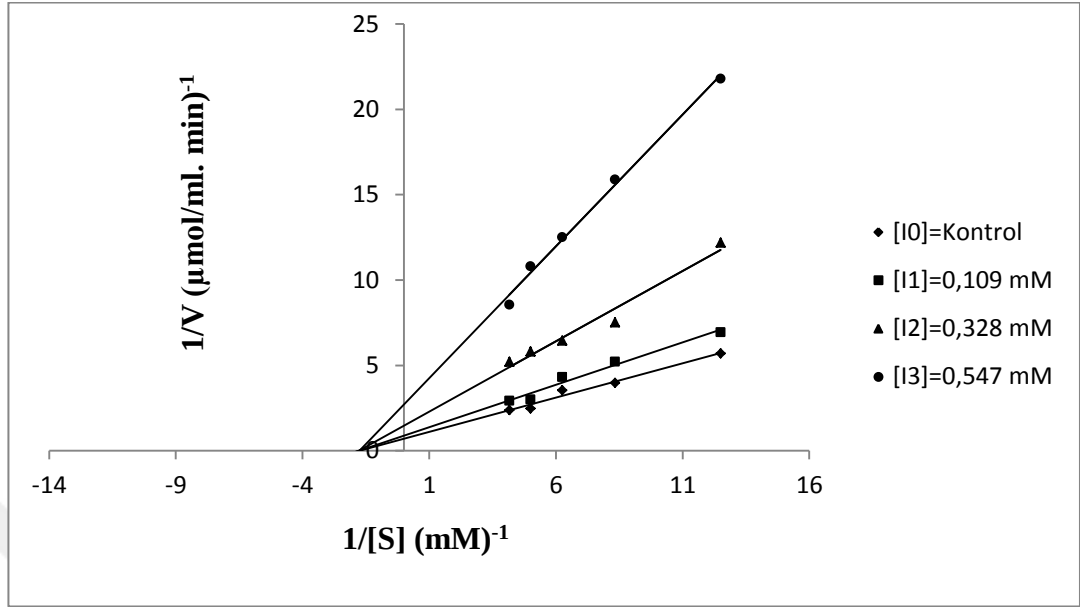
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfamethazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,790	0,1	0,05	0,01	0,05	0,780	0,1	0,05	0,01	0,05	0,01	73,43	0,109
	0,780	0,1	0,05	0,02	0,05	0,770	0,1	0,05	0,02	0,05	0,01	64,84	0,219
	0,770	0,1	0,05	0,03	0,05	0,760	0,1	0,05	0,03	0,05	0,01	52,34	0,328
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	39,84	0,438
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	36,71	0,547



Şekil 4.5. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfamethazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

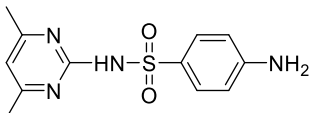
Çizelge 4.8. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
[I] ₁	0,832	0,1	0,05	0,01	0,008	0,822	0,1	0,05	0,01	0,008	0,01	6,942	12,5
	0,828	0,1	0,05	0,01	0,012	0,818	0,1	0,05	0,01	0,012	0,01	5,208	8,33
	0,824	0,1	0,05	0,01	0,016	0,814	0,1	0,05	0,01	0,016	0,01	4,310	6,25
	0,820	0,1	0,05	0,01	0,020	0,810	0,1	0,05	0,01	0,020	0,01	3,003	5,00
	0,816	0,1	0,05	0,01	0,024	0,806	0,1	0,05	0,01	0,024	0,01	2,923	4,16
[I] ₂	0,812	0,1	0,05	0,03	0,008	0,802	0,1	0,05	0,03	0,008	0,01	12,18	12,5
	0,808	0,1	0,05	0,03	0,012	0,798	0,1	0,05	0,03	0,012	0,01	7,518	8,33
	0,804	0,1	0,05	0,03	0,016	0,794	0,1	0,05	0,03	0,016	0,01	6,451	6,25
	0,800	0,1	0,05	0,03	0,020	0,790	0,1	0,05	0,03	0,020	0,01	5,813	5,00
	0,796	0,1	0,05	0,03	0,024	0,786	0,1	0,05	0,03	0,024	0,01	5,208	4,16
[I] ₃	0,792	0,1	0,05	0,05	0,008	0,782	0,1	0,05	0,05	0,008	0,01	21,78	12,5
	0,788	0,1	0,05	0,05	0,012	0,778	0,1	0,05	0,05	0,012	0,01	15,87	8,33
	0,784	0,1	0,05	0,05	0,016	0,774	0,1	0,05	0,05	0,016	0,01	12,50	6,25
	0,780	0,1	0,05	0,05	0,020	0,770	0,1	0,05	0,05	0,020	0,01	10,79	5,00
	0,776	0,1	0,05	0,05	0,024	0,766	0,1	0,05	0,05	0,024	0,01	8,547	4,16



Şekil 4.6. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfamethazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

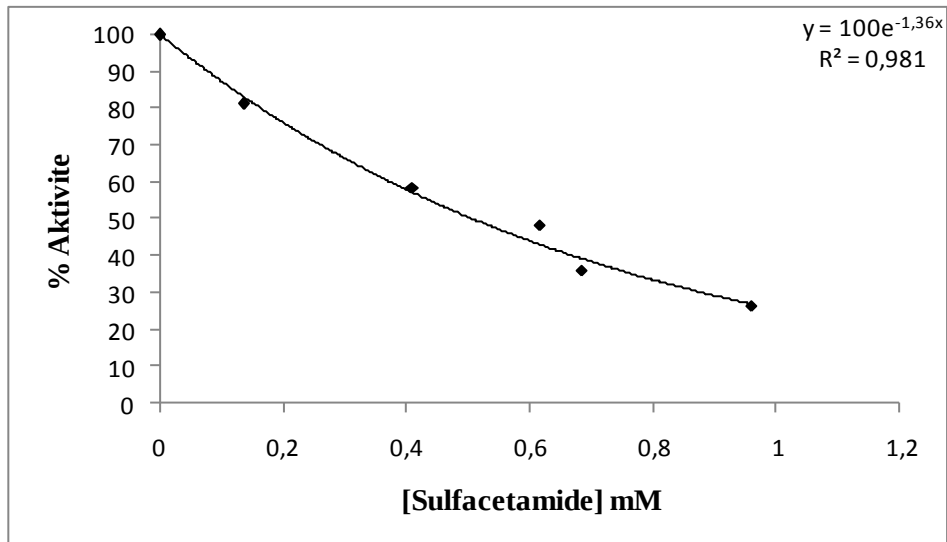
Çizelge 4.9. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamethazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfamerazine	AChE	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		0,353	0,302 ± 0,116	Yarışmasız

4.1.4. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfacetamide ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.10. Sulfacetamide inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

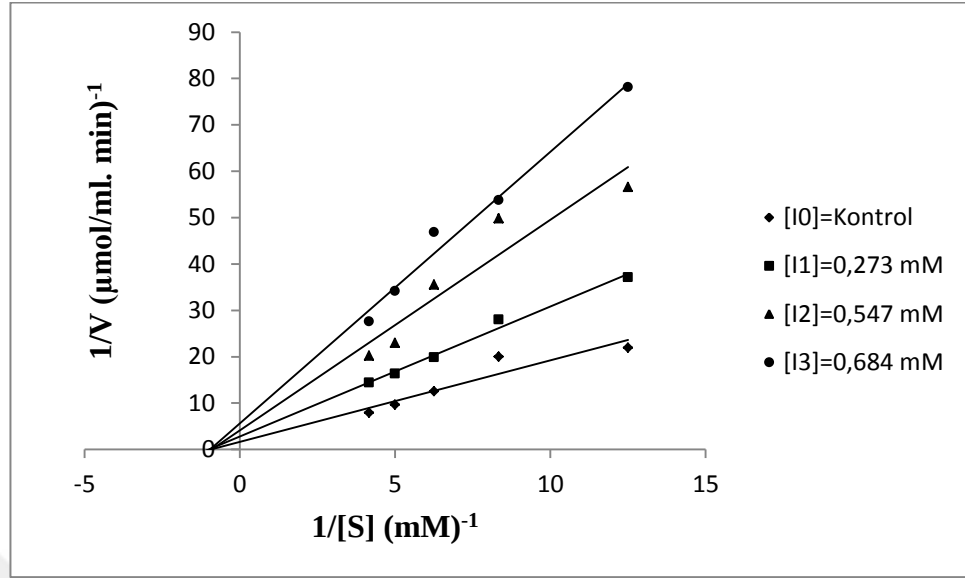
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfacetamide	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,790	0,1	0,05	0,01	0,05	0,780	0,1	0,05	0,01	0,05	0,01	81,25	0,136
	0,770	0,1	0,05	0,03	0,05	0,760	0,1	0,05	0,03	0,05	0,01	58,59	0,410
	0,755	0,1	0,05	0,045	0,05	0,745	0,1	0,05	0,045	0,05	0,01	48,43	0,616
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	35,93	0,684
	0,730	0,1	0,05	0,07	0,05	0,720	0,1	0,05	0,07	0,05	0,01	26,56	0,958



Şekil 4.7. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.11. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfacetamide inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
[I] ₁	0,822	0,1	0,05	0,02	0,008	0,792	0,1	0,05	0,02	0,008	0,03	37,13	12,5
	0,818	0,1	0,05	0,02	0,012	0,788	0,1	0,05	0,02	0,012	0,03	28,01	8,33
	0,814	0,1	0,05	0,02	0,016	0,784	0,1	0,05	0,02	0,016	0,03	19,84	6,25
	0,810	0,1	0,05	0,02	0,020	0,780	0,1	0,05	0,02	0,020	0,03	16,33	5,00
	0,806	0,1	0,05	0,02	0,024	0,776	0,1	0,05	0,02	0,024	0,03	14,38	4,16
[I] ₂	0,802	0,1	0,05	0,04	0,008	0,772	0,1	0,05	0,04	0,008	0,03	56,58	12,5
	0,798	0,1	0,05	0,04	0,012	0,768	0,1	0,05	0,04	0,012	0,03	49,82	8,33
	0,794	0,1	0,05	0,04	0,016	0,764	0,1	0,05	0,04	0,016	0,03	35,55	6,25
	0,790	0,1	0,05	0,04	0,020	0,760	0,1	0,05	0,04	0,020	0,03	22,98	5,00
	0,786	0,1	0,05	0,04	0,024	0,756	0,1	0,05	0,04	0,024	0,03	20,24	4,16
[I] ₃	0,782	0,1	0,05	0,06	0,008	0,752	0,1	0,05	0,06	0,008	0,03	78,14	12,5
	0,778	0,1	0,05	0,06	0,012	0,748	0,1	0,05	0,06	0,012	0,03	53,76	8,33
	0,774	0,1	0,05	0,06	0,016	0,744	0,1	0,05	0,06	0,016	0,03	46,85	6,25
	0,770	0,1	0,05	0,06	0,020	0,740	0,1	0,05	0,06	0,020	0,03	34,12	5,00
	0,766	0,1	0,05	0,06	0,024	0,736	0,1	0,05	0,06	0,024	0,03	27,62	4,16



Şekil 4.8. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfacetamide eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

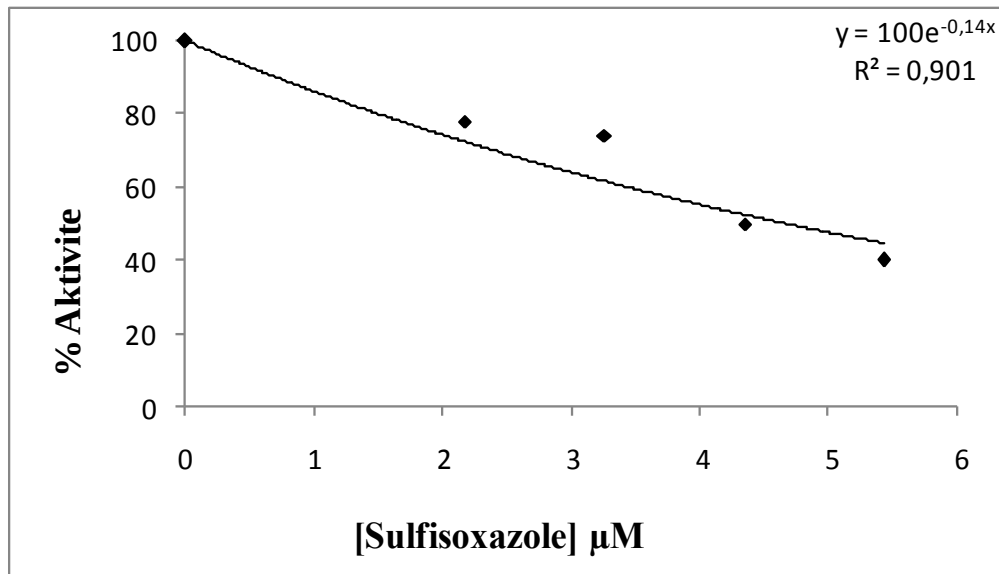
Çizelge 4.12. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfacetamide inhibitörünün inhibisyon etkisi

<chem>CC(=O)NS(=O)(=O)c1ccc(N)cc1</chem> Sulfacetamide	AChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		0,507	0,343 ± 0,055	Yarışmasız

4.1.5. AChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfisoxazole ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.13. Sulfisoxazole inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Asetilkolinesteraz, AChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

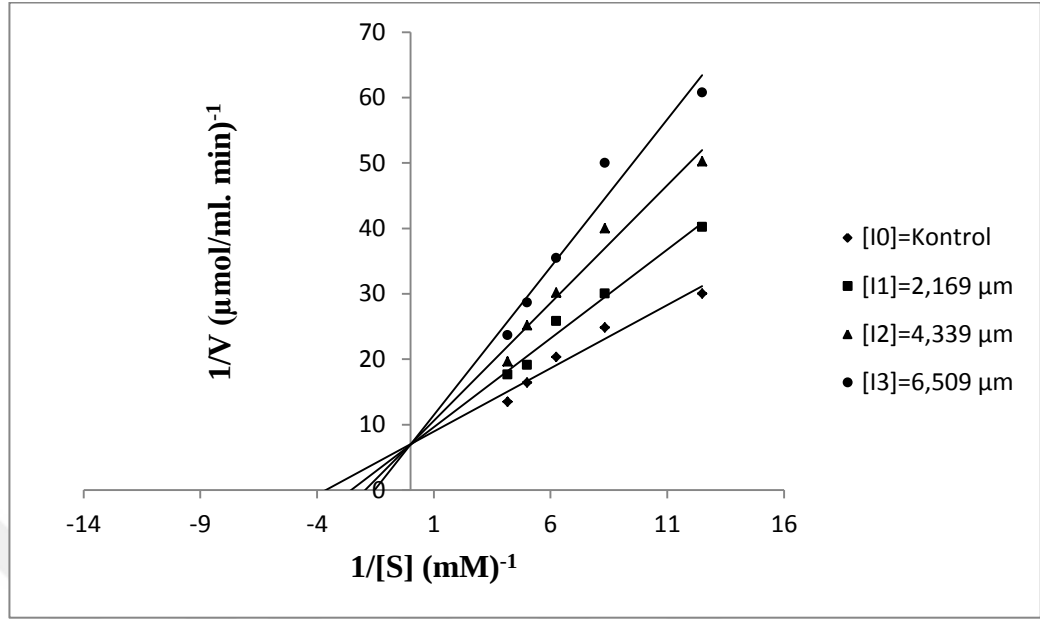
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] μ M
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfisoxazole	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,780	0,1	0,05	0,02	0,05	0,770	0,1	0,05	0,02	0,05	0,01	78	2,169
	0,770	0,1	0,05	0,03	0,05	0,760	0,1	0,05	0,03	0,05	0,01	74	3,254
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	50	4,339
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	40	5,424



Şekil 4.9. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratına bağlı olarak Sulfisoxazole inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

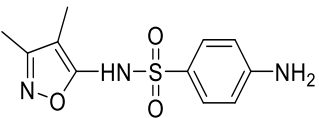
Çizelge 4.14. AChE enzimi için Asetiltiyokoliniyodat substratıyla Sulfisoxazole inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S\text{mM}^{-1}$
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
[I] ₁	0,822	0,1	0,05	0,02	0,008	0,772	0,1	0,05	0,02	0,008	0,05	40,18	12,5
	0,818	0,1	0,05	0,02	0,012	0,768	0,1	0,05	0,02	0,012	0,05	30,02	8,33
	0,814	0,1	0,05	0,02	0,016	0,764	0,1	0,05	0,02	0,016	0,05	25,79	6,25
	0,810	0,1	0,05	0,02	0,020	0,760	0,1	0,05	0,02	0,020	0,05	19,10	5,00
	0,806	0,1	0,05	0,02	0,024	0,756	0,1	0,05	0,02	0,024	0,05	17,64	4,16
[I] ₂	0,802	0,1	0,05	0,04	0,008	0,752	0,1	0,05	0,04	0,008	0,05	50,21	12,5
	0,798	0,1	0,05	0,04	0,012	0,748	0,1	0,05	0,04	0,012	0,05	40,00	8,33
	0,794	0,1	0,05	0,04	0,016	0,744	0,1	0,05	0,04	0,016	0,05	30,18	6,25
	0,790	0,1	0,05	0,04	0,020	0,740	0,1	0,05	0,04	0,020	0,05	25,18	5,00
	0,786	0,1	0,05	0,04	0,024	0,736	0,1	0,05	0,04	0,024	0,05	19,63	4,16
[I] ₃	0,782	0,1	0,05	0,06	0,008	0,732	0,1	0,05	0,06	0,008	0,05	60,76	12,5
	0,778	0,1	0,05	0,06	0,012	0,728	0,1	0,05	0,06	0,012	0,05	50,00	8,33
	0,774	0,1	0,05	0,06	0,016	0,724	0,1	0,05	0,06	0,016	0,05	35,44	6,25
	0,770	0,1	0,05	0,06	0,020	0,720	0,1	0,05	0,06	0,020	0,05	28,63	5,00
	0,766	0,1	0,05	0,06	0,024	0,716	0,1	0,05	0,06	0,024	0,05	23,65	4,16

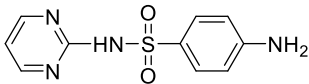
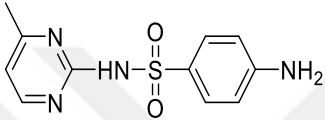
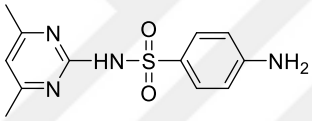
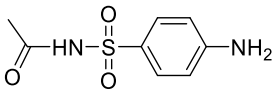
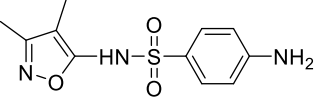


Şekil 4.10. Asetilkolinesteraz enzimi için AChI substratıyla Sulfisoxazole eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.15. Asetilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfisoxazole inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfisoxazole	AChE	IC ₅₀ (μM)	Ortalama K _i ± S.D. (μM)	İnhibisyon tipi
		4,650	4,921 ± 0,129	Yarışmalı

Çizelge 4.16. Asetilkolinesteraz enzimi için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları

İnhibitör		AChE (mM)
 Sulfadiazine	IC ₅₀	0,300
	Ort. K _i ± S.D.	0,118 ± 0,024
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfamerazine	IC ₅₀	0,363
	Ort. K _i ± S.D.	0,717 ± 0,193
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfamerazine	IC ₅₀	0,353
	Ort. K _i ± S.D.	0,302 ± 0,116
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfacetamide	IC ₅₀	0,507
	Ort. K _i ± S.D.	0,343 ± 0,055
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfisoxazole	IC ₅₀	0,0046
	Ort. K _i ± S.D.	0,0049 ± 0,00012
	İnhibisyon tipi	Yarışmalı

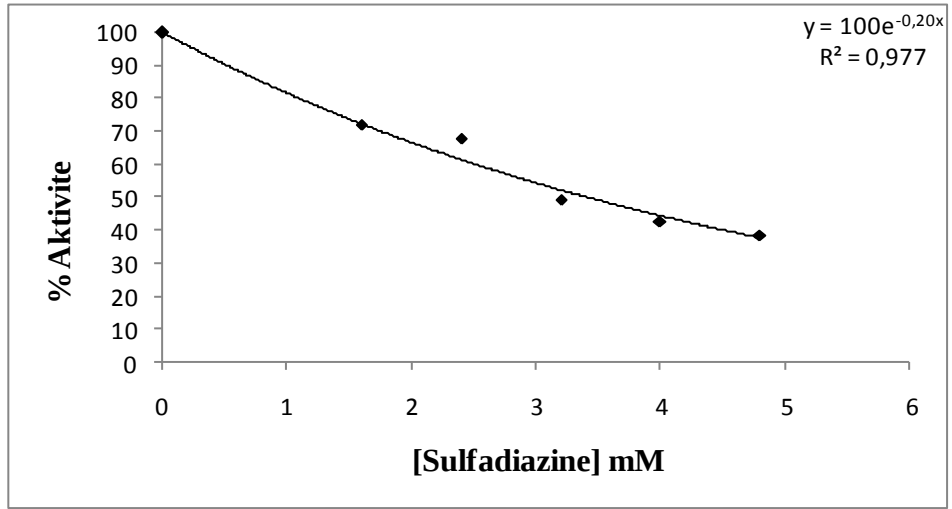
4.2. Bütirilkolinesteraz (BChE) Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

4.2.1. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine ile ilgili sonuçlar

Hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki Sulfadiazinenin etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite yöntemine göre yapıldı. Bu ölçümler 5 dakikada bir ve 412 nm'de gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi gösteren Sulfadiazine için Aktivite (%) - [Sulfadiazine] ve K_i grafikleri çizildi. Aktivite (%) - [I] grafiği çizmek için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda ölçüm yapıldı. K_i için ayrıca 3 ayrı inhibitör konsantrasyonu seçilip, 5 ayrı substrat konsantrasyonunda (8-12-16-20-24 μ L) çalışıldı. Çizilen grafiklerden IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.17. Sulfadiazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

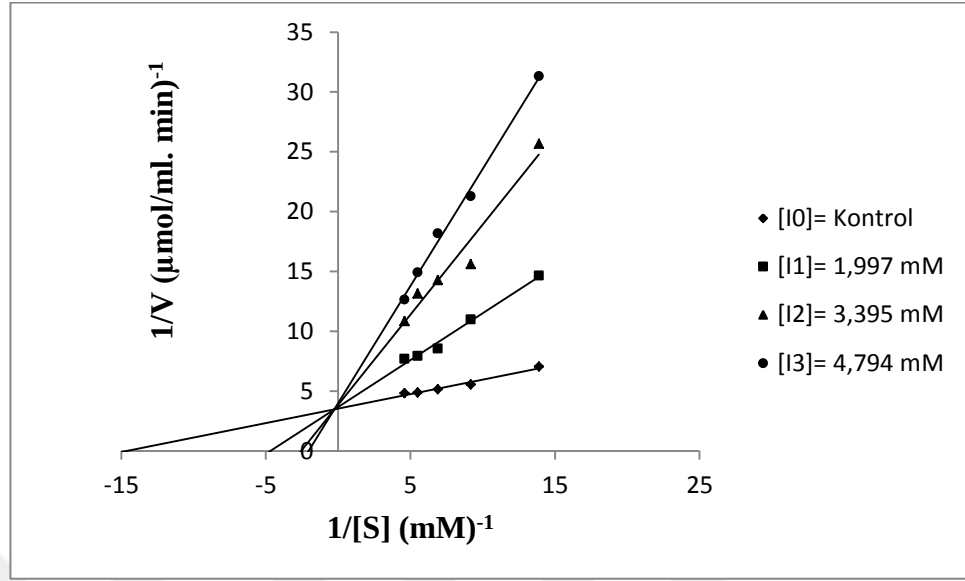
Kör Tüpü						Numune Tüpü							
İnhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	% Aktivite	[I] mM
Sulfadiazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	71,91	1,598
	0,740	0,1	0,05	0,06	0,05	0,730	0,1	0,05	0,06	0,05	0,01	67,80	2,397
	0,720	0,1	0,05	0,08	0,05	0,710	0,1	0,05	0,08	0,05	0,01	49,31	3,196
	0,700	0,1	0,05	0,1	0,05	0,690	0,1	0,05	0,1	0,05	0,01	42,46	3,995
	0,680	0,1	0,05	0,12	0,05	0,670	0,1	0,05	0,12	0,05	0,01	38,35	4,794



Şekil 4.11. Bütirikolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfadiazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

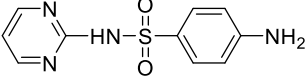
Çizelge 4.18. BChE enzimi için Bütiriltiyokolinyodat substratıyla Sulfadiazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

İnhibitör	Kör					Numune						$1/V$ ($\mu\text{mol}/\text{ml.dk})^{-1}$	$1/S$ mM^{-1}
	Su(ml)	Tris-HCL (ml)	DTNB (ml)	İnhibitör(ml)	AChI (ml)	Su (ml)	Tris-HCL (ml)	DTNB (ml)	İnhibitör(ml)	AChI (ml)	AChE(ml)		
[I] ₁	0,792	0,1	0,05	0,05	0,008	0,782	0,1	0,05	0,05	0,008	0,01	14,65	13,88
	0,788	0,1	0,05	0,05	0,012	0,778	0,1	0,05	0,05	0,012	0,01	10,98	9,17
	0,784	0,1	0,05	0,05	0,016	0,774	0,1	0,05	0,05	0,016	0,01	8,540	6,89
	0,780	0,1	0,05	0,05	0,020	0,770	0,1	0,05	0,05	0,020	0,01	7,930	5,49
	0,776	0,1	0,05	0,05	0,024	0,766	0,1	0,05	0,05	0,024	0,01	7,690	4,58
[I] ₂	0,757	0,1	0,05	0,085	0,008	0,747	0,1	0,05	0,085	0,008	0,01	25,68	13,88
	0,753	0,1	0,05	0,085	0,012	0,743	0,1	0,05	0,085	0,012	0,01	15,62	9,17
	0,749	0,1	0,05	0,085	0,016	0,739	0,1	0,05	0,085	0,016	0,01	14,28	6,89
	0,745	0,1	0,05	0,085	0,020	0,735	0,1	0,05	0,085	0,020	0,01	13,15	5,49
	0,741	0,1	0,05	0,085	0,024	0,731	0,1	0,05	0,085	0,024	0,01	10,86	4,58
[I] ₃	0,722	0,1	0,05	0,12	0,008	0,712	0,1	0,05	0,12	0,008	0,01	31,31	13,88
	0,718	0,1	0,05	0,12	0,012	0,708	0,1	0,05	0,12	0,012	0,01	21,27	9,17
	0,714	0,1	0,05	0,12	0,016	0,704	0,1	0,05	0,12	0,016	0,01	18,18	6,89
	0,710	0,1	0,05	0,12	0,020	0,700	0,1	0,05	0,12	0,020	0,01	14,92	5,49
	0,706	0,1	0,05	0,12	0,024	0,696	0,1	0,05	0,12	0,024	0,01	12,65	4,58



Şekil 4.12. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfadiazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

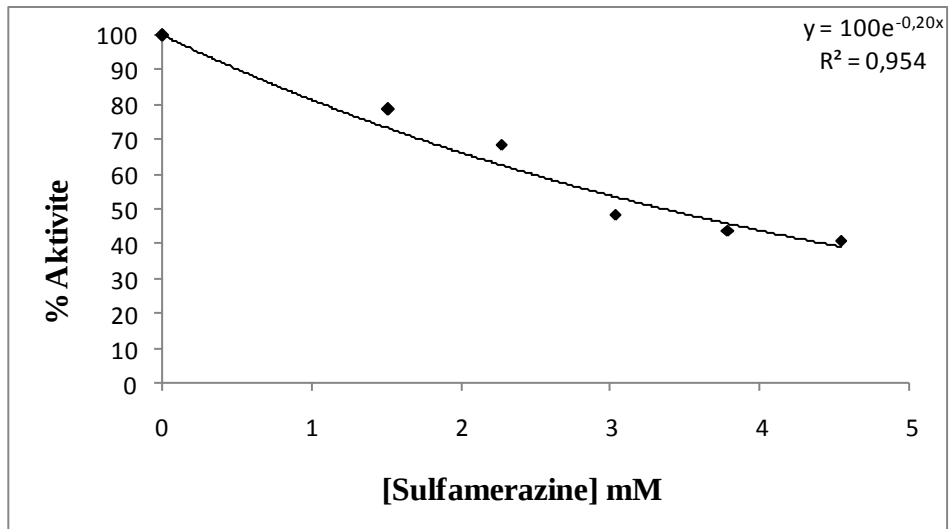
Çizelge 4.19. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfadiazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfadiazine	BChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		3,397	0,815 ± 0,098	Yarışmalı

4.2.2. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamerazine ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.20. Sulfamerazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

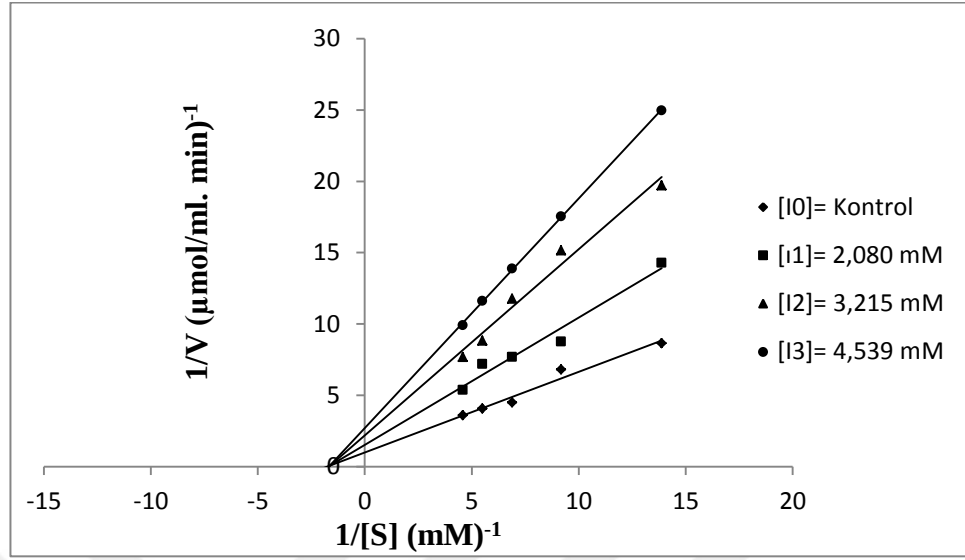
Kör Tüpü						Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	Inhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfamerazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	78,57	1,513
	0,740	0,1	0,05	0,06	0,05	0,730	0,1	0,05	0,06	0,05	0,01	68,75	2,269
	0,720	0,1	0,05	0,08	0,05	0,710	0,1	0,05	0,08	0,05	0,01	48,21	3,026
	0,700	0,1	0,05	0,1	0,05	0,690	0,1	0,05	0,1	0,05	0,01	43,75	3,783
	0,680	0,1	0,05	0,12	0,05	0,670	0,1	0,05	0,12	0,05	0,01	41,07	4,539



Şekil 4.13. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfamerazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

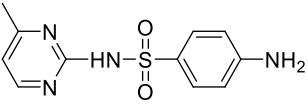
Çizelge 4.21. BChE enzimi için Bütiriltiyokoliniyodat substratıyla Sulfamerazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
İnhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	İnhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
[I] ₁	0,787	0,1	0,05	0,055	0,008	0,777	0,1	0,05	0,055	0,008	0,01	14,28	13,88
	0,783	0,1	0,05	0,055	0,012	0,773	0,1	0,05	0,055	0,012	0,01	8,770	9,17
	0,779	0,1	0,05	0,055	0,016	0,769	0,1	0,05	0,055	0,016	0,01	7,690	6,89
	0,775	0,1	0,05	0,055	0,020	0,765	0,1	0,05	0,055	0,020	0,01	7,190	5,49
	0,771	0,1	0,05	0,055	0,024	0,761	0,1	0,05	0,055	0,024	0,01	5,370	4,58
[I] ₂	0,757	0,1	0,05	0,085	0,008	0,747	0,1	0,05	0,085	0,008	0,01	19,72	13,88
	0,753	0,1	0,05	0,085	0,012	0,743	0,1	0,05	0,085	0,012	0,01	15,15	9,17
	0,749	0,1	0,05	0,085	0,016	0,739	0,1	0,05	0,085	0,016	0,01	11,76	6,89
	0,745	0,1	0,05	0,085	0,020	0,735	0,1	0,05	0,085	0,020	0,01	8,840	5,49
	0,741	0,1	0,05	0,085	0,024	0,731	0,1	0,05	0,085	0,024	0,01	7,690	4,58
[I] ₃	0,722	0,1	0,05	0,12	0,008	0,712	0,1	0,05	0,12	0,008	0,01	24,97	13,88
	0,718	0,1	0,05	0,12	0,012	0,708	0,1	0,05	0,12	0,012	0,01	17,54	9,17
	0,714	0,1	0,05	0,12	0,016	0,704	0,1	0,05	0,12	0,016	0,01	13,88	6,89
	0,710	0,1	0,05	0,12	0,020	0,700	0,1	0,05	0,12	0,020	0,01	11,62	5,49
	0,706	0,1	0,05	0,12	0,024	0,696	0,1	0,05	0,12	0,024	0,01	9,900	4,58



Şekil 4.14. Bütirikolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfamerazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

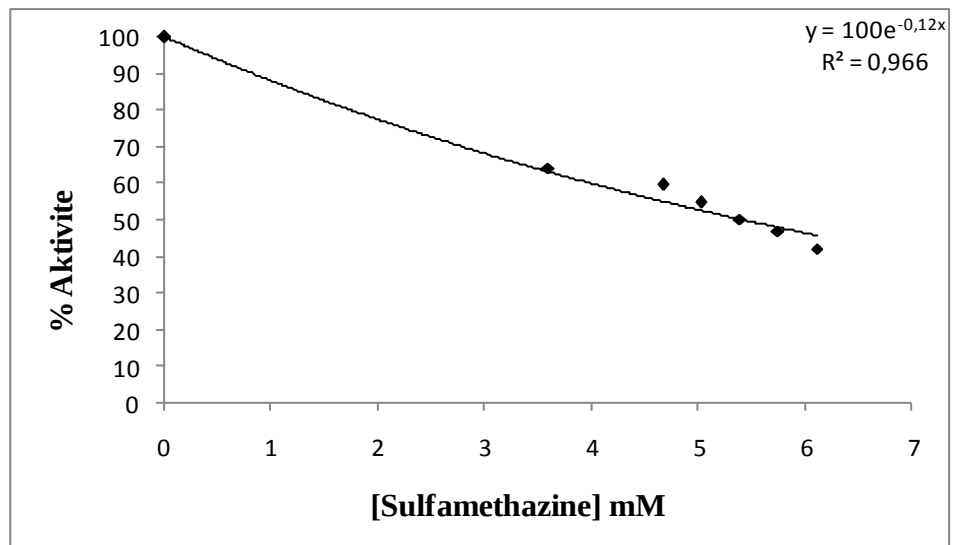
Çizelge 4.22. Bütirikolinesteraz enziminin üzerine Sulfamerazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfamerazine	BChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		3,364	3,104 ± 0,736	Yarışmasız

4.2.3. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfamethazine ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.23. Sulfamethazine inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

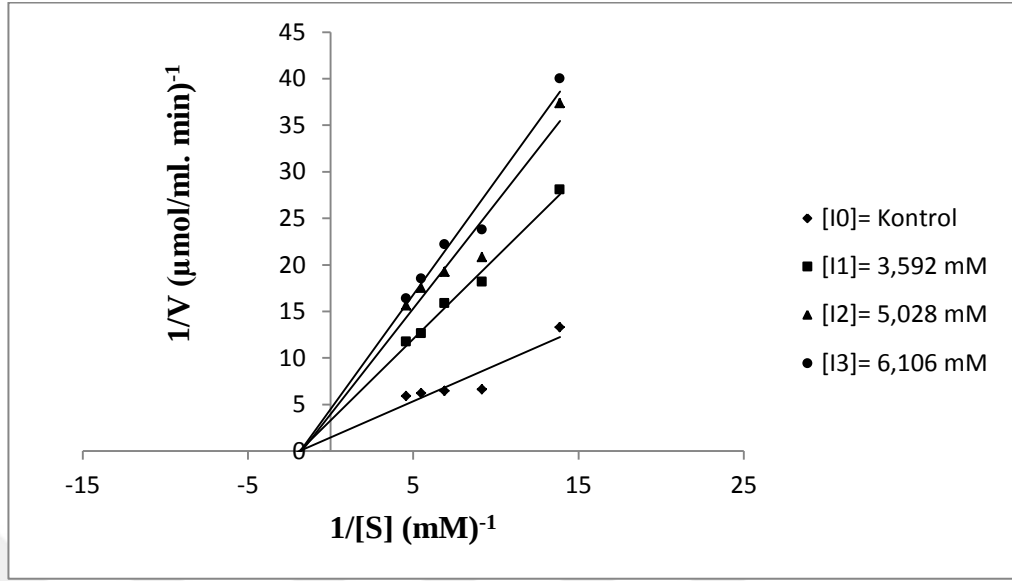
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfamethazine	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,700	0,1	0,05	0,1	0,05	0,690	0,1	0,05	0,1	0,05	0,01	64,28	3,592
	0,670	0,1	0,05	0,13	0,05	0,660	0,1	0,05	0,13	0,05	0,01	59,52	4,669
	0,660	0,1	0,05	0,14	0,05	0,650	0,1	0,05	0,14	0,05	0,01	54,76	5,028
	0,650	0,1	0,05	0,15	0,05	0,640	0,1	0,05	0,15	0,05	0,01	50,00	5,388
	0,640	0,1	0,05	0,16	0,05	0,630	0,1	0,05	0,16	0,05	0,01	46,82	5,747
	0,630	0,1	0,05	0,17	0,05	0,620	0,1	0,05	0,17	0,05	0,01	42,06	6,106



Şekil 4.15. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfamethazine inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

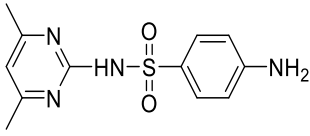
Çizelge 4.24. BChE enzimi için Bütiriltiyokolinyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

Kör Tüpü						Numune Tüpü						$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
[I] ₁	0,742	0,1	0,05	0,01	0,008	0,732	0,1	0,05	0,01	0,008	0,01	28,07	13,88
	0,738	0,1	0,05	0,01	0,012	0,728	0,1	0,05	0,01	0,012	0,01	18,18	9,17
	0,734	0,1	0,05	0,01	0,016	0,724	0,1	0,05	0,01	0,016	0,01	15,87	6,89
	0,730	0,1	0,05	0,01	0,020	0,720	0,1	0,05	0,01	0,020	0,01	12,65	5,49
	0,726	0,1	0,05	0,01	0,024	0,716	0,1	0,05	0,01	0,024	0,01	11,76	4,58
[I] ₂	0,702	0,1	0,05	0,14	0,008	0,692	0,1	0,05	0,14	0,008	0,01	37,38	13,88
	0,698	0,1	0,05	0,14	0,012	0,688	0,1	0,05	0,14	0,012	0,01	20,83	9,17
	0,694	0,1	0,05	0,14	0,016	0,684	0,1	0,05	0,14	0,016	0,01	19,23	6,89
	0,690	0,1	0,05	0,14	0,020	0,680	0,1	0,05	0,14	0,020	0,01	17,54	5,49
	0,686	0,1	0,05	0,14	0,024	0,676	0,1	0,05	0,14	0,024	0,01	15,62	4,58
[I] ₃	0,672	0,1	0,05	0,17	0,008	0,662	0,1	0,05	0,17	0,008	0,01	40,00	13,88
	0,668	0,1	0,05	0,17	0,012	0,658	0,1	0,05	0,17	0,012	0,01	23,80	9,17
	0,664	0,1	0,05	0,17	0,016	0,654	0,1	0,05	0,17	0,016	0,01	22,22	6,89
	0,660	0,1	0,05	0,17	0,020	0,650	0,1	0,05	0,17	0,020	0,01	18,51	5,49
	0,656	0,1	0,05	0,17	0,024	0,646	0,1	0,05	0,17	0,024	0,01	16,39	4,58



Şekil 4.16. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfamethazine eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

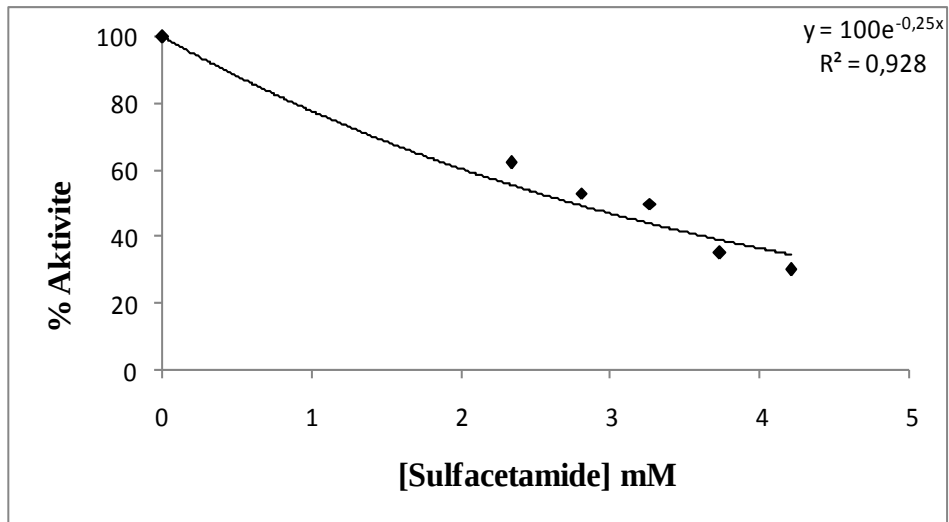
Çizelge 4.25. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfamethazine inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfamethazine	BChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		5,414	2,763 ± 0,055	Yarışmasız

4.2.4. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfacetamide ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.26. Sulfacetamide inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

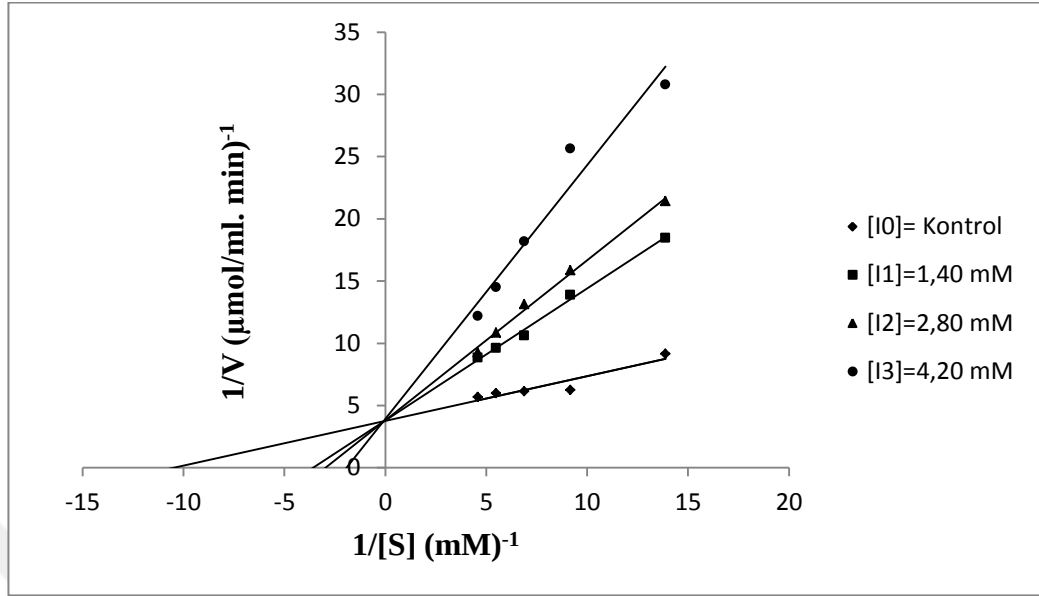
Kör Tüpü						Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	Inhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfacetamide	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	62,1	2,33
	0,740	0,1	0,05	0,06	0,05	0,730	0,1	0,05	0,06	0,05	0,01	52,8	2,80
	0,730	0,1	0,05	0,07	0,05	0,720	0,1	0,05	0,07	0,05	0,01	50,0	3,26
	0,720	0,1	0,05	0,08	0,05	0,710	0,1	0,05	0,08	0,05	0,01	35,0	3,73
	0,710	0,1	0,05	0,09	0,05	0,700	0,1	0,05	0,09	0,05	0,01	30,0	4,20



Şekil 4.17. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.27. BChE enzimi için Bütiriltiyokolin iyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü.

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/\text{SmM}^{-1}$
[I] ₁	0,812	0,1	0,05	0,03	0,008	0,802	0,1	0,05	0,03	0,008	0,01	18,47	13,88
	0,808	0,1	0,05	0,03	0,012	0,798	0,1	0,05	0,03	0,012	0,01	13,88	9,17
	0,804	0,1	0,05	0,03	0,016	0,794	0,1	0,05	0,03	0,016	0,01	10,63	6,89
	0,800	0,1	0,05	0,03	0,020	0,790	0,1	0,05	0,03	0,020	0,01	9,610	5,49
	0,796	0,1	0,05	0,03	0,024	0,786	0,1	0,05	0,03	0,024	0,01	8,850	4,58
[I] ₂	0,782	0,1	0,05	0,06	0,008	0,772	0,1	0,05	0,06	0,008	0,01	21,43	13,88
	0,778	0,1	0,05	0,06	0,012	0,768	0,1	0,05	0,06	0,012	0,01	15,87	9,17
	0,774	0,1	0,05	0,06	0,016	0,764	0,1	0,05	0,06	0,016	0,01	13,15	6,89
	0,770	0,1	0,05	0,06	0,020	0,760	0,1	0,05	0,06	0,020	0,01	10,86	5,49
	0,766	0,1	0,05	0,06	0,024	0,756	0,1	0,05	0,06	0,024	0,01	9,250	4,58
[I] ₃	0,752	0,1	0,05	0,09	0,008	0,742	0,1	0,05	0,09	0,008	0,01	30,78	13,88
	0,748	0,1	0,05	0,09	0,012	0,738	0,1	0,05	0,09	0,012	0,01	25,64	9,17
	0,744	0,1	0,05	0,09	0,016	0,734	0,1	0,05	0,09	0,016	0,01	18,18	6,89
	0,740	0,1	0,05	0,09	0,020	0,730	0,1	0,05	0,09	0,020	0,01	14,49	5,49
	0,736	0,1	0,05	0,09	0,024	0,726	0,1	0,05	0,09	0,024	0,01	12,19	4,58



Şekil 4.18. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfacetamide eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

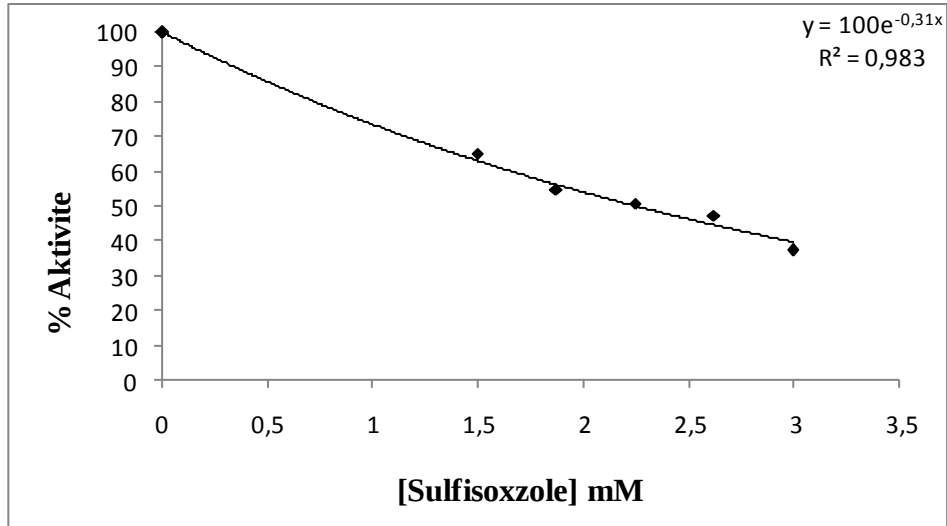
Çizelge 4.28. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfacetamide inhibitörünün inhibisyon etkisi

<chem>CC(=O)NS(=O)(=O)c1ccc(N)cc1</chem> Sulfacetamide	BChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		2,717	0,923 ± 0,191	Yarışmalı

4.2.5. BChE enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sulfisoxazole ile ilgili sonuçlar

Çizelge 4.29. Sulfisoxazole inhibitörü ile hazır olarak temin edilen Bütirilkolinesteraz, BChI substratıyla yapılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

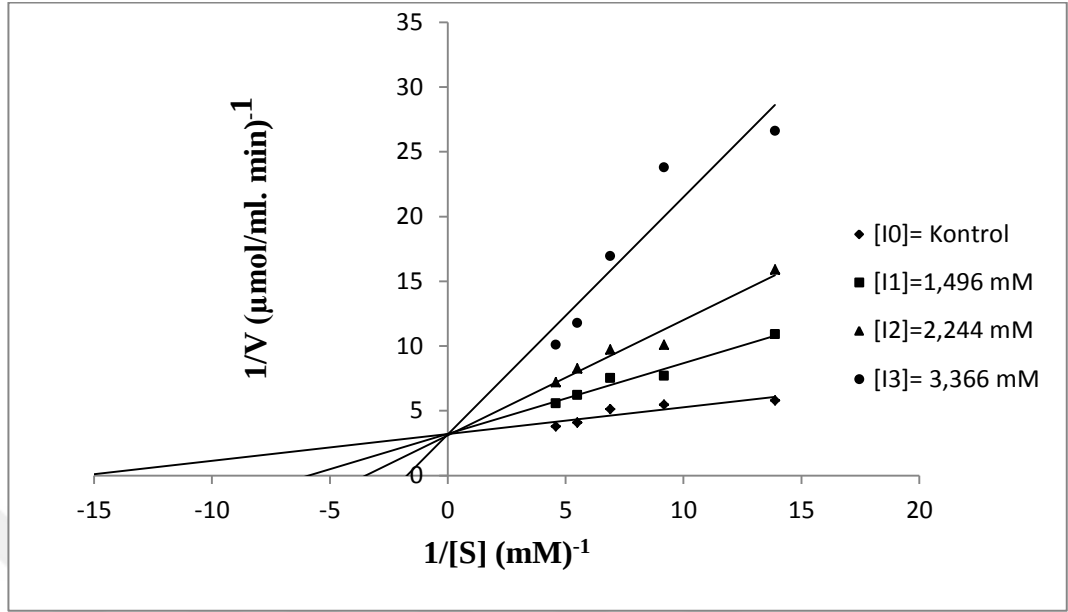
İnhibitör	Kör Tüpü					Numune Tüpü						% Aktivite	[I] mM
	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI (mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon(mL)	DNTP(mL)	İnhibitör (mL)	AChI(mL)	AChE(mL)		
Sulfisoxazole	0,800	0,1	0,05	-	0,05	0,790	0,1	0,05	-	0,05	0,01	100	0
	0,760	0,1	0,05	0,04	0,05	0,750	0,1	0,05	0,04	0,05	0,01	65,12	1,496
	0,750	0,1	0,05	0,05	0,05	0,740	0,1	0,05	0,05	0,05	0,01	54,65	1,870
	0,740	0,1	0,05	0,06	0,05	0,730	0,1	0,05	0,06	0,05	0,01	50,58	2,244
	0,730	0,1	0,05	0,07	0,05	0,720	0,1	0,05	0,07	0,05	0,01	47,09	2,618
	0,720	0,1	0,05	0,08	0,05	0,710	0,1	0,05	0,08	0,05	0,01	37,21	2,992



Şekil 4.19. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratına bağlı olarak Sulfacetamide inhibitörü ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

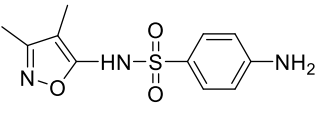
Çizelge 4.30. BChE enzimi için Bütiriltiyokolinyodat substratıyla Sulfamethazine inhibitörü eşliğinde elde edilen $1/V, 1/[S]$ değerleri ve deney prosedürü

Kör Tüpü						Numune Tüpü							
Inhibitör	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör (mL)	AChI(mL)	Su (mL)	Tris-HCL Tampon (mL)	DNTP (mL)	Inhibitör(mL)	AChI(mL)	AChE(mL)	$1/V(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$1/S\text{mM}^{-1}$
[I] ₁	0,812	0,1	0,05	0,03	0,008	0,802	0,1	0,05	0,03	0,008	0,01	10,91	13,88
	0,808	0,1	0,05	0,03	0,012	0,798	0,1	0,05	0,03	0,012	0,01	7,690	9,17
	0,804	0,1	0,05	0,03	0,016	0,794	0,1	0,05	0,03	0,016	0,01	7,520	6,89
	0,800	0,1	0,05	0,03	0,020	0,790	0,1	0,05	0,03	0,020	0,01	6,210	5,49
	0,796	0,1	0,05	0,03	0,024	0,786	0,1	0,05	0,03	0,024	0,01	5,560	4,58
[I] ₂	0,782	0,1	0,05	0,06	0,008	0,772	0,1	0,05	0,06	0,008	0,01	15,91	13,88
	0,778	0,1	0,05	0,06	0,012	0,768	0,1	0,05	0,06	0,012	0,01	10,10	9,17
	0,774	0,1	0,05	0,06	0,016	0,764	0,1	0,05	0,06	0,016	0,01	9,710	6,89
	0,770	0,1	0,05	0,06	0,020	0,760	0,1	0,05	0,06	0,020	0,01	8,260	5,49
	0,766	0,1	0,05	0,06	0,024	0,756	0,1	0,05	0,06	0,024	0,01	7,190	4,58
[I] ₃	0,752	0,1	0,05	0,09	0,008	0,742	0,1	0,05	0,09	0,008	0,01	26,60	13,88
	0,748	0,1	0,05	0,09	0,012	0,738	0,1	0,05	0,09	0,012	0,01	23,80	9,17
	0,744	0,1	0,05	0,09	0,016	0,734	0,1	0,05	0,09	0,016	0,01	16,95	6,89
	0,740	0,1	0,05	0,09	0,020	0,730	0,1	0,05	0,09	0,020	0,01	11,76	5,49
	0,736	0,1	0,05	0,09	0,024	0,726	0,1	0,05	0,09	0,024	0,01	10,10	4,58

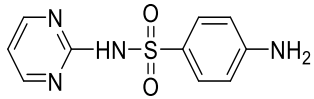
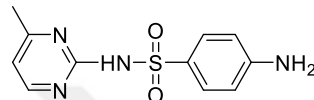
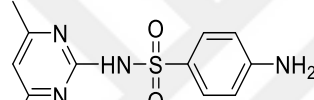
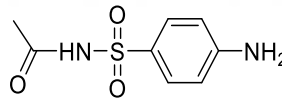
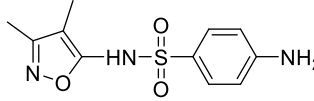


Şekil 4.20. Bütirilkolinesteraz enzimi için BChI substratıyla Sulfisoxazole eşliğinde elde edilen $1/V-1/[S]$ grafiği

Çizelge 4.31. Bütirilkolinesteraz enziminin üzerine Sulfisoxazole inhibitörünün inhibisyon etkisi

 Sulfisoxazole	BChE	IC₅₀ (mM)	Ortalama K_i ± S.D. (mM)	İnhibisyon tipi
		2,235	0,582 ± 0,143	Yarışmalı

Çizelge 4.32. Bütirilkolinesteraz enzimi için moleküllerin toplu inhibisyon sonuçları

İnhibitör		BChE (mM)
 Sulfadiazine	IC ₅₀	3,397
	Ort. K _i ± S.D.	0,815 ± 0,098
	İnhibisyon tipi	Yarışmalı
 Sulfamerazine	IC ₅₀	3,364
	Ort. K _i ± S.D.	3,104 ± 0,736
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfamethazine	IC ₅₀	5,414
	Ort. K _i ± S.D.	2,763± 0,055
	İnhibisyon tipi	Yarışmasız
 Sulfacetamide	IC ₅₀	2,717
	Ort. K _i ± S.D.	0,923 ± 0,191
	İnhibisyon tipi	Yarışmalı
 Sulfisoxazole	IC ₅₀	2,235
	Ort. K _i ± S.D.	0,582 ± 0,143
	İnhibisyon tipi	Yarışmalı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyokimyasal araştırmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır. Bu yüzden enzim çalışmaları çok fazla pratik öneme sahiptirler. 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 yokluğu sebep olabildiği gibi, diğer bir grup hastalığa da aşırı enzim aktivitesi neden olabilir. Birçok ilaç, biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarır. Enzimler, ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve sağlık tıpta teşhis ve tedavide büyük rol oynamaktadır. Bugün enzimlerin kimya endüstrisinde, gıda prosesinde ve ziraatte pek çok kullanım alanı bulunmaktadır.

Bütirikolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) yaklaşık olarak 342 kDa ağırlığında olan tetrameric bir glikoproteindir (Barta 2001). BchE karaciğerde sentezlendikten sonra kana karışır (Chatonnet and Lockridge 1989). Ayrıca yağ dokusu, incebağırsak, akciğer ve beyin gibi çeşitli dokularda da bulunur (Dave 2000).

Membrana bağlı bir enzim olan asetilkolinesteraz, enzimi kolinerjik sinapsis ve kavşaklarda hem sinir uçlarından hem de kavşak sonrası veya postsinaptik membran üzerinde yerleştiği gözlenmiştir. Bu enzim sinir hücrelerinde, beyinin gri cevherinde, kasta, akciğer, dalak ve eritrositlerde bulunur (Milatovic and Schetinger 2000). Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum, lökosit, trombosit, kemik iliği ve plasentada da mevcuttur (Wilson and Nachmansohn 1954). Asetilkolinesteraz kolinerjik sinapsiste nörotransmitter asetilkolini hidroliz ederek birkaç fiziksel olayın düzenlenmesinde önemli rol oynar.

Kolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesteraz inhibitörleri; Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara verilen isimlerdir. Santral ve perifer kolinerjik fonksiyonu güçlendirmek için kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe eder.

Sadece reversibl kolinesteraz inhibitörleri II Dünya Savaşından önce bilinirken uzun süre etkili ve oldukça toksik bileşikler olan irreversible bileşikler ise savaş sırasında geliştirilmiştir. Bu inhibitörler, enzimi tersinir veya tersinir olmayan şekilde inhibe ederek asetilkolin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Ercan 2002).

Klinik olarak Myastenia Gravis, glokom, ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. İlk olarak takrin Alzheimer Hastalığı tedavisinde geliştirilmiş ve daha sonra donepezil, rivastigmin ve galantamin bu hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. Takrin asetilkolinesteraz enzimini (AChE) ve bütirikolinesteraz enzimini (BChE) inhibe etmektedir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile paralellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin hastalığı tedavi edebileceğinden yola çıkılmıştır.

1970'lerden itibaren Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Alzheimer hastalığının araştırmaları zamanla bu hastalığın karmaşık yapısının sadece kolinerjik eksikliği değil, hem diğer beyinde işlevi olan kimyasalların dengesinde kayda değer bir bozulmayı içerdiği, hem de belirgin hücre kaybının olduğunu göstermiştir. 1990'larda kolinesteraz inhibitörleri bu hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

Bu ilaçlar içerisinde ilk takrin kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra Donepezil, Rivastigmine ve Galantamine kullanıma sunulmuştur. Asetilkolin yıkımını bu ilaçların hepsi engellemektedir. Dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle asetilkolin önemli bir rol oynayan kimyasal belirleyicidir. Alzheimer hastalarında yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evrelerinde bu ilaçların zihinsel yıkımı yavaşlatıcı veya zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici etkisinin görüldüğü sunulmuştur. Yıkımının azalması, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarıda sözü edilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Ancak bu yüz güldürücü sonuçlar tüm Alzheimer hastalarının %30-40'ında

görülebilmektedir, bu yüzden dışarıda kalan diğer hastalarda ise önemli bir etkiye rastlanmamıştır.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri Asetilkolini parçalayan asetilkolinesterazı inhibe ederek sinaptik aralıktaki asetilkolin miktarını ve dolayısıyla kolinerjik iletimi artırır. 6-9 ay kadar tabloyu bulunduğu noktada sabitlerler. Progresyonu yavaşlatırlar ancak tedaviye erken evrede başlanması gerekmektedir. Kullanılan bu inhibitörlerin etkileri 3. ayda belirginleşmeye başlar ancak ilaç kesildikten 4-6 hafta sonra görülen etkiler kaybolmaya başlar.

Henüz nedeni tam olarak aydınlatılamayan Alzheimer hastalığının beyin hücrelerinin programlanandan daha erken ölmesi ile meydana geldiği bilinmektedir. Yaşla beraber her kişide beyin hücre ölümü olmaktadır ama Alzheimer hastalığında bu süreç çok hızlı ve erken gerçekleşmektedir. Günümüzde Alzheimer hastalığının nedeni tam olarak bilinmese de bir takım risk yaratan durumlar ortaya çıkmıştır. Kalp krizi, hipertansiyon, kolesterol yüksekliği gibi damar hastalıkları, düşük eğitim düzeyi, geçmişte ciddi kafa yaralanmaları da hastalığa sebep olan faktörler arasındadır. Bu faktörlerden yaş değiştirilemez faktör iken geçmişte yaşanan depresyonlar ise değiştirilebilir faktördendir.

Alzheimer hastalığı yeni bilinen bir hastalık olmamasına rağmen hastaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir. Çünkü bu hastalıkta önemli olan risk faktörü yaştır ve yaşlanma kaçınılmaz bir süreçtir. Hastalığın azami seviyede gözlemlendiği yaş grubu günümüzde ve tüm dünyada 65 yaş grubu ve üzeridir. Türkiye’de şu an 300 binden fazla Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de 30-40 yıl sonra genç nüfusun giderek yaşlanacağı bir ülke olarak Alzheimer hastalığının çok önemli bir sağlık sorunu olması söz konusudur.

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).

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 enziminin aktivitesi Ellman Metoduna göre yapıldı. Asetilkolinesteraz asetilkolinin 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 1961). Aktivite tayininde 1 enzim ünitesi 10mM asetiltiyokolin'in dakika başına 37°C'de pH:8 tiyokoline ve asetat'a çeviren enzim miktarı olarak tanımlandı.

Bu tez kapsamında AChE ve BChE inhibitörlerinin önemi göz önünde bulundurularak, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim aktivitesi üzerine in vitro şartlarda takrin ilacı türevlerine benzer sülfanilamidlerin bazı türevlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda BChE ve AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren sülfanilamidlerin bazı türevleri 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.

2013 yılında geliştirilen en son yöntemde CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B'ye sülfanilamid ligandı kenetlenerek kolon sentezlenmiş, ardından yağı alınmış süt zayıf katyon değiştirici Amberlit CG-50 H+reçinesi kullanılarak kısmi saflaştırılmıştır. CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna tatbik edilen süt

11 homojenatından tek kademede LPO saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Atasever 2013).

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. 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'ı 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 2006).

Kinetik çalışmalar sırasında Asetilkolinesteraz enzim aktivitelerini inhibe eden Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamıde ve Sulfisoxazole maddelerin IC_{50} değerleri belirlendi. Buna göre Çizelge (4.1)-(4.4)-(4.7)-(4.10)-(4.13)'de ve Şekil (4.1)-(4.3)-(4.5)-(4.7)-(4.9)'da görüldüğü gibi Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamıde ve Sulfisoxazole maddeleri AChE enzimi üzerine aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu maddeler için yapılan çalışmada aktivite değerleri hesaplandı ve elde edilen bu değerlerle % Aktivite-Konsantrasyon grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Bu maddeler için bulunan IC_{50} değerleri sırasıyla 0,300 mM, 0,363 mM, 0,353 mM, 0,507 mM, 0,0049mM olarak bulunmuştur. Daha sonra elde edilen asetilkolinesteraz enzimleriyle 5 farklı asetiltiyokolin iyodat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı (Çizelge (4.2)-(4.5)-(4.8)-(4.11)-(4.14)'de gösterilmiştir) Çalışmamızdaki maddeler için Şekil (4.2)-(4.4)-(4.6)-(4.8)-(4.10)'de Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek gösterilmiş ve K_i ve standart sapma değerleri belirlenmiştir. Sırasıyla K_i ve standart sapma değerleri 0,118±0,024mM, 0,717±0,193mM, 0,302±0,116mM, 0,343±0,055mM, 0,0049±0,00012mM olarak

bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamıde maddeleri yarışmasız inhibisyon gösterirken, Sulfisoxazole maddesi ise yarışmalı inhibisyon göstermiştir.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç veya madde konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Çalışmamızda Bütirikolinesteraz enzim aktivitelerini inhibe eden Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamıde ve Sulfisoxazole maddelerin IC_{50} değerleri belirlendi. Buna göre Çizelge (4.17)-(4.20)-(4.23)-(4.26)-(4.28)'de ve Şekil (4.11)-(4.13)-(4.15)-(4.17)-(4.19)'da görüldüğü gibi Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfacetamıde ve Sulfisoxazole maddeleri AChE enzimi üzerine aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu maddeler için bulunan IC_{50} değerleri sırasıyla 3,397 mM, 3,364 mM, 5,414 mM, 2,717 mM, 2,235mM olarak bulunmuştur. Daha sonra Çizelge (4.18)-(4.21)-(4.24)-(4.27)-(4.30)'de gösterildiği gibi aktivite ölçümü yapıldı. Bu maddeler için Şekil (4.12)-(4.14)-(4.16)-(4.18)-(4.20)'de Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek gösterildi K_i ve standart sapma değerleri belirlendi. Sırasıyla K_i ve standart sapma değerleri $0,815 \pm 0,098 \text{mM}$, $3,104 \pm 0,736 \text{mM}$, $2,763 \pm 0,055 \text{mM}$, $0,923 \pm 0,191 \text{mM}$, $0,582 \pm 0,143 \text{mM}$ olarak bulunmuştur. Sulfadiazine, Sulfacetamıde ve Sulfisoxazole maddeleri yarışmalı inhibisyon gösterirken, Sulfamerazine ve Sulfamethazine maddeleri ise yarışmasız inhibisyon göstermiştir.

AChE ve BChE 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. Bu tez kapsamında elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 4.16 ve 4.32'de özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akman, E., 2007. Van Gölü Balığının (*Chalcalburnus tarichii* p.1811) Beyin ve Karaciğerinden Asetilkolinesteraz (e.c.3.1.1.7) Enziminin Afinite Kromatografisi Yöntemi İle Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Aldridge, W. N. and Reiner, E. (1972) Acylated Amino Acids in Inhibited B-Esterases. In: Neuberger, A., Tatum, E. L. (Eds.), Enzyme Inhibitors as Substrates. North-Holland, Amsterdam, pp. 170-175.
- Anonim, 2017a. [http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1enz.\(1\).pdf](http://content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33921/d%C4%B1enz.(1).pdf)
- Anonim, 2017b. <http://www.Alzheimer.web.tr>
- Aras, K., Erşen, G., 1988. Tıbbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 198-203.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gülcin, I., Küfrevioğlu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. Food Chemistry, 136, 864–870.
- Barta C, Sasvari-Szekely M, Devai A, Kovacs E, Staub M, Enyedi P., 2001. Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. Molecular Genetics and Metabolism, 74, 484-488.
- Bayrak, B.K., 2008, Sinir Hücrelerinde Gletim ve Bunun Öğrenme Sürecine Etkisi, *Selçuk Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Dergisi*, 25, 101-113.
- Beach, T. G. *The Cholinergicdeficit Coincides with Ab Deposition at the Earliest Histopathologicstages of Alzheimer Disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 54(9):308-313, (2000).
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2006, *Neuroscience*, 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ. 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 193-197.
- Bingöl, G., 1977. *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Yayınları Ders Kitapları Serisi No:46, Ankara. 88.
- Boyer, P.D., 1970. *The Enzymes* (3rd Edition) Academic Press Inc, New York
- Bunin, M.A., Wightman, R.M., 1999, Paracrine Neurotransmission in the CNS: Involvement of 5-HT, *Trends in Neurosciences*, 22, 377- 382.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Ciftci, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro*and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout(*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. Journal ofEnzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 18, 371-375

- Chatonnet A., Lockridge O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260, 625-634.
- Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* 260 (3), 625-634.
- Chuiko, G. M., Podgornaya, V. A., and Zhelnin, Y. Y., 2003. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Brain and Plasma of Freshwater Teleosts: Crossspecies and Cross-family Differences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 135 B: 55-61.
- Colowick, S.P., Kaplan, N.O., 1987. *Methods in Enzymology*. (Editors: Colvick, S. P., Kaplan, N. O.) academic Press, Inc., London 1-55.
- Çokuğraş, A. N., 2005. *The Effects of Indole -3-acetic acid on Human and Horse Serum Butyrylcholinesterase*. *Chemicobiological Interactions*. 157-158 (16): 375–378,
- Darvesh S., Hopkins D.A., Geula C. 2003. Neurobiology of butyrycholinesterase, *Nat Rev. Neurosci.* 4, 131-138.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C., 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (2), 131-138.
- Dave, K.R., Syal, A.R., Katyare, S.S., 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *A Journal of Biosciences*, 55, 100-108.
- Doretti, L., Ferrara, D., Lora, S., Schiavon, F., and Veronese, F.M., 2000. Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 279-285.
- Dubos, J., 1995. Louis Pasteur (1822-1895)-Chance and the Prepared Mind, *Trends in Biotechnology*, 13, 511-515.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., JR, V.A., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2) : 88-90.
- Focardi, S., Corsi, I., Mazzuoli, S., Vignoli, L., Loiselle, S. A., and Focardi, S., 2006. Integrating Remote Sensing Approach with Pollution Monitoring Tools for Aquatic Ecosystem Risk Assessment and Managment: a Case Stuary of Lake Victoria (Uganda). *Environ. Monit. and Assess.*, 32: 579-584.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., and Guilhermino, L., 2006. Cholinesterase from common Prawn (*Palaemon serratus*) Eyes: Catalytic Properties and Sensitivity to Organophosphate and Carbamate Compounds. *Aquat. Toxicol.*, 77: 412-421.
- Galbraith, D.A., and WattsChanges 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.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. *Cholinergic Systems in Alzheimer's Disease*, Alzheimer Disease, 2nd ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.
- Giacobini, E., 1995, *Cholinesterase Inhibitors: From Preclinical Studies to Clinical Efficacy in Alzheimer Disease*, *Enzymes of the Cholinesterase Family*, Plenum Press, New York, 463-469.
- Giacobini E. 2003. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 28, 515-522.

- Gilbert, H.F., 1992. Basic concepts in biochemistry. Mc Graw-Hill Inc. Germany, 81.
- Gözükara, E. M., 2001. *Biyokimya Cilt 2. 4.* Ankara Nobel Tıp Kitapevi. 1258
- Gözükara, M.E., 1997. Enzimler, 13. *Biyokimya Z 3.* Nobel tıp Kitabevleri, İstanbul. 1225s.
- 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.
- Guhathakurta, S., Bhattacharya, S., 1989. *In Vitro* Inhibition of Goat Brain Acetylcholinesterase by Pure and Commercial Anticholinesterase Pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 17, 16-20.
- Gürvit, İ. H., 2010. Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer Dışı Demanslar Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul
- Harvey, R.A., Champe, P.C., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 53-68.
- Hodgson, A.J., Chubb, I.W., 1983. Isolation of the Secretory Form Soluble Acetylcholinesterase by Using Affinity Chromatography on Endophonium-Sephadex. *Journal of Neurochemistry*, 654-662.
- Hosokawa, M., Endo, Y., Fujisawa, M., Hara, S., Iwata, N., Sato, Y., and Satoh, T., 1995. Interindividual Variation in Carboxylesterase Levels in Human Liver Microsomes. *Drug. Metab. Dispos.*, 23: 1022-1027.
- Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T., 1987. Multiplicity and Regulation of Hepatic Microsomal Carboxylesterases in Rats. *Mol. Pharmacol.*, 31: 579-584.
- Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T., 1987. Multiplicity and Regulation of Hepatic Microsomal Carboxylesterases in Rats. *Mol. Pharmacol.*, 31: 579-584.
- Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T., 1990. Characterization of Molecular Species of Liver Microsomal Carboxylesterases of Several Animal Species and Humans. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277: 219-227.
- Hosokawa, M., Suzuki, K., Takahashi, D., Mori, M., Satoh, T., and Chiba, K., 2001. Purification, Molecular Cloning, and Functional Expression of Dog Liver Microsomal acyl-CoA Hydrolase: a Member of the Carboxylesterase Multigene Family. *Arch. Biochem. Biophys.*, 389: 245-253.
- Kang, J.J., Fang, W.F., 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons inhibit the Activity of Acetylcholinesterase Purified from Electric Eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 23, 367-369
- Kaufer, D.I., Cummings, J.L., 1996. Effect of Tacrine on Behavioral Symptoms in Alzheimer's Disease: An Open-Label Study, J. Geriatric Psychiatry and Neurology, 9: 1-6.
- Kaya, H. B., 2012. *Asetilkolinesteraz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Afinitive Kromatografisi İle Saflaştırılması* doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum.* 637.

- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 91-95, 118 s.
- Kent, M., 2000, *Advanced Biology*, Oxford University Press, England.
- Kıss, J.B., Vizi, E.S., 2001, Nitric Oxide: A Novel Link Between Synaptic and Nonsynaptic Transmission Trends Neuroscience, *Trends in Neuro Science*, 24, 211-215.
- Knopman, D., Schneider, L., Davis, K. And et al, 1996, Long-term Tacrine (Cognex) Treatment: Effects on Nursing Home Placement and Mortality, *Neurology*, 47: 166-177.
- Kristoff, G., Guerrero, N. V., D'Angelo, A. M. P., and Cochon, A. C., 2006. Inhibition of Cholinesterase Activity by Azinphos-methyl in Two Freshwater Invertebrates: *Biophalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicol.*, 222(3): 185-194.
- Kutty, K.M., Annanpurna, V., Prabhakaran, V., 1989. Pseudocholinesterase: A protein with functions unrelated to its name. *Biochemical Society Transactions*, 7, 555-556
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41, 1814-1818
- Maki, T., Hosokawa, M., Satoh, T., and Sato, K., 1991. Changes in Carboxylesterase isozymes of Rat Liver Microsomes During Hepatocarcinogenesis IPN. *J. Cancer Res.*, 82: 800-806.
- Marcel, V., Palacios, L. G., Pertuy, C., Mason, P., and Fournier, D., 1998. Two Invertebrate Acetylcholinesterase Show Activation Followed by Inhibition with Substrate Concentration. *Biochem. J.*, 329: 329-334.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette F. M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41 (1): 31-91.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette F. M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41 (1): 31-91.
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Valette F.M., 1992. Molecular and cellular biology of cholinesterases and cellular biology of cholinesterases. *Neurobiology* 41, 31-91.
- 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.M., Guillozet, A., Shaw, P., Quinn, B., 2002. Widely Spread Butyrylcholinesterase can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain, *Neurobiology of Disease*, 9, 88-93.
- Mori, M., Hosokawa, M., Ogasawara, Y., Tsukada, E., and Chiba, K., 1999. cDNA Cloning, Characterization and Stable Expression of Novel Human Brain Carboxylesterase. *FEBS Lett.*, 458: 17-22.
- Nachmansohn, D., 1952. *In Modern Trends in Physiology, Biochemistry. Academic Press*, New York. 229.
- Nachmansohn, D., Lededer, E., 1939. Chemical and molecular basis of nerve activity. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21:797.
- Nachmansohn, D., Lededer, E., 1939. Chemical, Molecular Basis of Nerve Activity. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21: 797.

- Nachmansohn, D., Lededer. E., 1939. Chemical and molecular basis of nerve activity. *Bull Soc Chim Biol*, 21, 797.
- Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A., 1944a. Hydrolyze of the Butrylcholine in the Serum Cholinesterase. *Science*, 100: 454.
- Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A., 1944b. Hydrolyze of the Butrylcholine in the Red Cell Enzyme. *JBC*, 158: 653.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Nelson, D.L., Cox M.M. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof.Dr.Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık
- Nino, J., Hernandez J. A., Correa, Y. M., Mosquera O. M., 2006. *In Vitro* Inhibition of Acetylcholinesterase by Crude Plant Extracts from Colombian Flora. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101 (7), 783-785
- Noyan, A., 1988. *Fizyoloji*, 8. Baskı, Meteksan Yayınları, Ankara, 1157.
- Noyan, A., 1996. *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Meteksan Anonim Şirketi, Ankara. 1103.
- O'Brien, R. D., 1960. Toxic Phosphorus Esters. Chemistry, Metabolism, and Biological Effects. *Academic Press.*, New York.
- Onat T. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. *Temel Biyokimya* İzmir, Saray
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M. I., Khalid, A., 2004. Acetylcholinesterase and Butrylcholinesterase Inhibitory Activity of Same Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.*, 91: 57-60.
- Ostergard D., Viby-Mogensen J., Hanel H.K., Skovgaard L.T. 1996. Half-life of plasma cholinesterase. *Acta. Anaesth. Scand*. 32, 266-269.
- Öztaşkın, N., Çetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., Gülçin, İ. 2015. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 60, 49-57.
- 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.
- Polat Köse L., Gülçin İ., Gören A.C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A.L., Gorinstein, S., 2015.LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarumHance*) rhizomes. *Industrial Crops and Products*, 74, 712–721.
- Reaumur, R.A.F., 1752. *Observations sur la Digestion des Oiseaux*, Histoire de L'academie Royale des Sciences, 266, 461.
- Rosenberry, T.L., Scoggin, D.M., 1984. Structure of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 5643-5652
- Rotundo, L.R., 1984 Purification and Properties of the Membrane-Bound form of Acetylcholinesterase from Chicken Brain. *The Journal Of Biological Chemistry*, vol 259 No.21 pp 13186-13194.
- Ryhanen R.J.J. 1983. Pseudocholinesterase activity in some human body fluids. *Gen. Pharmacol*. 14, 459-460.
- Satoh, T. (2005) Toxicological Implications Esterases From Molecular Structures of Functions. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 207: S11-S12.
- Satoh, T., and Hosokawa, M., 1995. Molecular Aspects of Carboxylesterase Isoforms in Comparison with Other Esterases. *Toxicol. Lett (Shannon).*, 82: 439-445.

- Satoh, T., Hosokawa, M., Atsumi, R., Suzuki, W., Hakusui, H., and Nagai, E., 1994. Metabolic Activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinol], Carbonyloxycamptothecin, a Novel Antitumor Agent, by Carboxylesterase. *Biochem. Pharm. Bull.*, 17: 662-664.
- Segel, I.H., 1975. Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons, New York.
- Selkirk, M. E., Lazari, O., and Matthews, J. B., 2005. Functional Genomics of Nematode Acetylcholinesterases. *Parasitology.*, 131: S3-S18.
- Silver, A., 1974, *The Biology of Cholinesterases*, American Elsevier Publishing, New York.
- Sogorb, M. A., and Vilanova, E., 2002. Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphorus, Carbamate and Pyrethroid Insecticides Through Hydrolysis. *Toxicol. Letters.*, 128: 215-228.
- Soreq K., Zakut H. 1993. Human cholinesterase and anti-cholinesterase. Academic Press. Newyork.
- Soreq, H., 2008. Introduction: cholinesterases, from molecular complexity to non-hydrolytic functions. *FEBS J*, 275 (4), 603.
- Stojan, J., Brochier, L., Alies, C., Colletier, J. P., and Fournier, D., 2004. Inhibition of *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase by High Concentration of Substrate. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1364-1371.
- Sun, H., Pang, Y. P., Lockridge, O., and Brimijoin, S., 2002. Re-engendering Butyrylcholinesterase as a Cocaine Hydrolase. *Molecular Pharm.*, 62: 220-224.
- Swartz, H.J., 2000, *Neurotransmitters*, Principles of Neural Science, 4th ed., McGraw-Hill Companies, US, 280-297.
- Takayama, H., Watanabe, A., Hosokawa, M., Chiba, K., Satoh, T., and Aimi, N., 1998. Synthesis of New Class of Camptotecin Derivates The Long Chain Fatty Acid Esters of 10-hydroxycamptothecin, and a Potent Prodrug Candidate, and Their in vitro Metabolic Conversion by Carboxylesterases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 415-418.
- Talesa, V., Principato, G. B., Giovannini, E., Di Giovannini, M. V., and Rosi, G., 1993b. Dimeric forms of Cholinesterases in *Sprinculus nudus*. *Eur. J. Biochem*, 215: 267-275.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (der), 59, İzmir.
- Temel, H. E., 2008. *Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri ile Değişimi* (doktora tezi, basılmamış). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir
- Temel, H.E., 2008. *Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi*, Doktora Tezi; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı,
- Türkoğlu, V., 1996. *Sığır Serum ve Eritrositlerinden Saflastırılan Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Kinetiklerinin Araştırılması* (Doktora Tezi). Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Van.
- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, 124.

- Usanmaz, H., 2014. Laktoperoksidaz Enziminin Sığır ve Koyun Sütlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- WHO, World Health Organization, 1986b. World Health Organization Metabolism and mode of Action. Organophosphorus Insecticides: a General Introduction. WHO, Geneva, pp. 39-48.
- Williams, H.S., 2007. *Modern Development of the Chemical and Biological Sciences, A History of Science: in Five Volumes*, Harper and Brothers, New York.
- Wilson, I. B., and Cabib, E. (1956) Acetylcholinesterase: Enthalpies and Entropies of Activation. *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 202-207.
- Wilson, I., B., Nachmansohn, D., 1954. *In Ion Transport Across Membranes*. Academic Press Inc., New York. 35s.
- Yamada, T., Hosokawa, M., Satoh, T., Moroo, I., Takahashi, M., Akatsu, H., and Yamamoto, T., 1994. Immunohistochemistry With an Antibody to Human Liver Carboxylesterase in Human Brain Tissues. *Brain. Res.*, 658: 163-16.
- Zinkl, J. G., Shea, P. J., Nakamoto, R. J., and Callman, J., 1987. Effects of Cholinesterases of Rainbow Trout Exposed to Acephate and Metamidophos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, pp. 22-28.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ankara’da doğdu.İlk, orta ve lise öğrenimini Ankarada’da tamamladı.2010 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü’nden 2015 yılında mezun oldu.Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında çalıştı. Şu an ise DAYTAM bünyesinde uzman yardımcısı olarak atandığı görevine devam etmektedir.

