



**BAZI İLAÇLARIN KOLİNESTERAZ
İNHİBİTÖRÜ OLMA POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ergün HALİS

Yüksek Lisans Tezi

Prof.Dr. Murat ŞENTÜRK

2021

Her Hakkı Saklıdır

**T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**BAZI İLAÇLARIN KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ OLMA
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ergün HALİS

Danışman: Prof.Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI

Haziran-2021

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI İLAÇLARIN KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ OLMA
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

ErgünHALİS

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI
Haziran-2021



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ KABUL VE ONAY FORMU

**BAZI İLAÇLARIN KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ OLMA
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, ErgünHALİS tarafından hazırlanan bu çalışma, 16/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyokimya Bilim Dalı Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr.Deniz EKİNCİ

İmza :

Üye: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi AykutÖZTEKİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../2021 tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI İLAÇLARIN KOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ OLMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Ergün HALİS

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Asetilkolin (ACh) vücutta bulunan hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde işlev gören ana nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7), nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen hidrolaz grubundan bir enzimdir. Bütilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8), spesifik olmayan bir kolinesteraz enzimidir. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinin parçalanmasını sağlayan enzimleri inhibe eder. Kolinesteraz inhibitörlerinin ana kullanımı Alzheimer hastalarındaki demansı tedavi etmektir. Alzheimer hastalığındabeyindeki ACh seviyesi azalır. Kolinesteraz inhibitörleri bu seviyeyi dengeyerek hastalığın iyileştirilmesinde görev alır.

Bu tez çalışmasında bazı ilaç etken maddelerinin (Etofenamat, brimonidin, bimatoprost, tetrahidrozolin, trimetoprim ve deksketoprofen) AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyelleri belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için docking ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

2021, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, Butirilkolinesteraz, İnhibisyon, İlaç

ABSTRACT

MS. Thesis

DETERMINING THE POTENTIAL OF SOME DRUGS TO BECOME CHOLINESTERASE INHIBITORS

ErgünHALİS

Ağrı İbrahim Çeçen University

Graduate Education Institute

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Acetylcholine (ACh) is the main neurotransmitter in the body that functions in both the peripheral and central nervous systems. Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) is an enzyme from the hydrolase group that hydrolyzes the neurotransmitter ACh. Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is a nonspecific cholinesterase enzyme. Cholinesterase inhibitors inhibit the enzymes that break down ACh. The main use of cholinesterase inhibitors is to treat dementia in Alzheimer's patients. ACh level in the brain decreases in Alzheimer's disease. Cholinesterase inhibitors play a role in curing the disease by balancing this level.

In this thesis, it was tried to determine the inhibition potential of some drug active ingredients (Etofenamate, brimonidine, bimatoprost, tetrahydrozoline, trimethoprim and dexketoprofen) on AChE and BChE enzymes. For this purpose, docking and IC_{50} values were calculated for these drugs which show inhibition effect on enzyme activities.

2021, 52 page

Keywords:Acetylcholinesterase, Butirylcholinesterase, İnhibition, Drug

ÖNSÖZ

Yapmış olduğum tez çalışmasına bilgi ve tecrübeleri ile çok büyük katkılarda bulunan ve her noktada beni aydınlatıp yüreklendiren çok değerli danışman hocam Prof Dr Murat ŞENTÜRK'e, kıymetli vakitlerini ayırarak docking değerlerinin belirlenmesi çalışmalarında önemli öneri ve katkılarda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Yalçın KARAGÖZ hocama Ve Tezimi inceleyip ilerideki çalışmalarda yol gösteren Prof. Dr.Deniz EKİNCİ ile Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu zorlu süreçte desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim ve çocuklarıma teşekkür ediyorum.

Sadece eğitim hayatım değil, tüm hayatım boyunca yaşadığım her süreçte, yanımda olarak beni destekleyen ve asla yalnız bırakmayan babam, annem ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ağrı 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler	1
1.2. Asetilkolinesteraz.....	5
1.2.1.Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması.....	6
1.2.2.Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	7
1.2.3.Asetilkolinesteraz inhibitörleri.....	8
1.2.4.AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları.....	9
2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları.....	9
2.6. Çalışmada Kullanılan İlaçlar.....	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	19
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2. 1. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi	20
3.2.2. İnhibitörler için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	21
3.3.3. Test edilen maddeler için docking değerlerinin belirlenmesi çalışmaları.....	21

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	22
4.1. İnhibitörler İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	22
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR	46



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Aserilkolinesteraz
BChE	Butirilkolinesteraz
E	Enzim
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
P	Ürün
S	Substrat
AChtI	Asetiltiyokoliniyodat
BChtI	Butiriltiyokoliniyodat
Tris	Trihidroksimetil aminometan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin basitleştirilmiş gösterim şeması	3
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın katalitik bölgesi.....	6
Şekil.1.3. Asetilkolinin yapısı.....	6
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.....	7
Şekil 4.1. Etofenamat ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	22
Şekil 4.2. Brimonidin ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	23
Şekil 4.3. Bimatoprost ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	23
Şekil 4.4. Tetrahidrozolin ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	24
Şekil 4.5. Trimetoprim ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	24
Şekil 4.6. Deksketoprofen ile AChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	25
Şekil 4.7. Etofenamat ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	25
Şekil 4.8. Brimonidin ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	26
Şekil 4.9. Bimatoprost ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	26
Şekil 4.10. Tetrahidrozolin ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	27
Şekil 4.11. Trimetoprim ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	27
Şekil 4.12. Deksketoprofen ile BChE enzimini IC ₅₀ garfıği.....	28
Şekil 4.13. Etofenamat AChE docking pozları.....	29
Şekil 4.14. Etofenamat BChE docking pozları.....	30
Şekil 4.15. Brimonidin AChE docking pozları.....	31
Şekil 4.16. Brimonidin BChE docking pozları.....	32
Şekil 4.17. Bimatoprost AChE docking pozları.....	33
Şekil 4.18. Bimatoprost BChE docking pozları.....	34
Şekil 4.19. Tetrahidrozolin AChE docking pozları.....	35
Şekil 4.20. Tetrahidrozolin BChE docking pozları.....	36
Şekil 4.21. Trimetoprim AChE docking pozları.....	37
Şekil 4.22. Trimetoprim BChE docking pozları.....	38
Şekil 4.23. Deksketoprofen AChE docking pozları.....	39
Şekil 4.24. Deksketoprofen BChE docking pozları.....	40
Şekil 5.1. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.Etofenamat hakkında genel bilgiler.....	11
Çizelge 1.2.Brimonidin hakkında genel bilgiler.....	12
Çizelge 1.3.Bimatoprost hakkında genel bilgiler.....	13
Çizelge 1.4.Tetrahidrozin hakkında genel bilgiler.....	14
Çizelge 1.5.Trimetoprim hakkında genel bilgiler.....	15
Çizelge 1.6.Deksketoprofen hakkında genel bilgiler.....	16
Çizelge 4.1.Bazı ilaç etken maddelerinin AChE ve BChE enzimleri için belirlenen IC ₅₀ değerleri	28
Çizelge 4.2. Bazı ilaç etken maddelerinin AChE ve BChE enzimleri için belirlenen docking değerleri.....	41

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

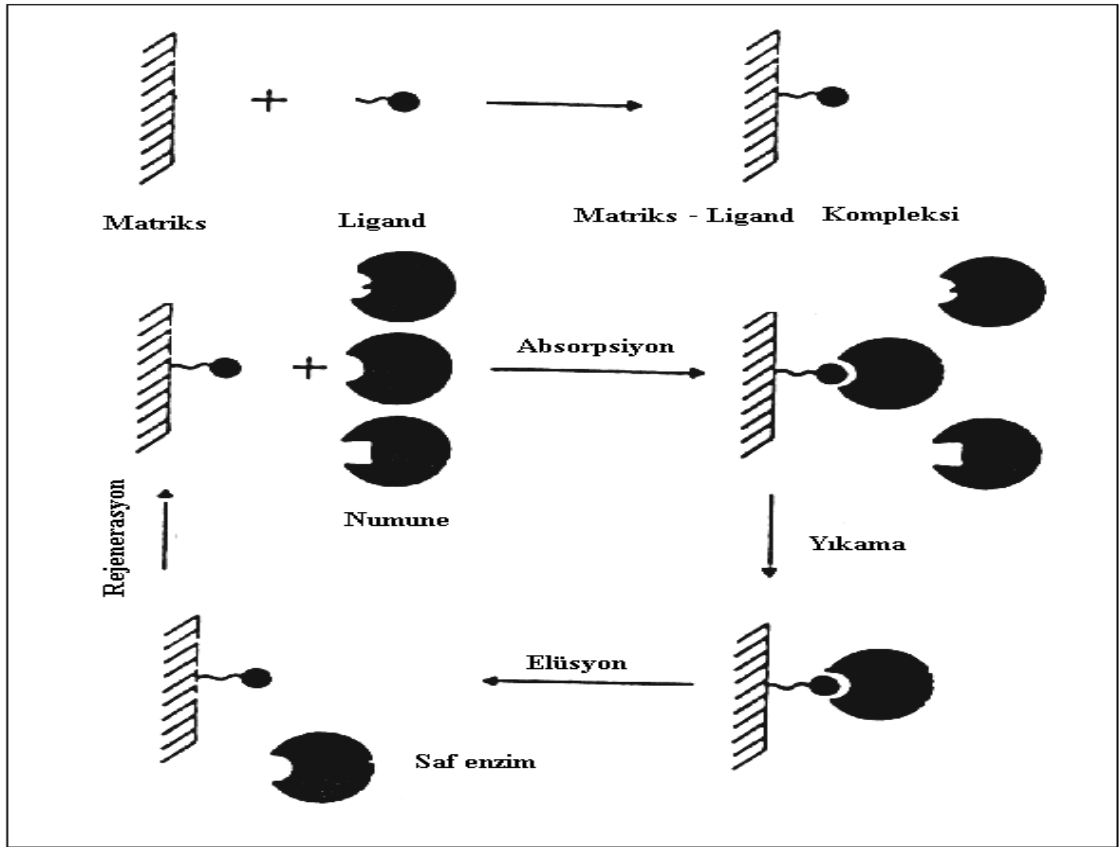
Enzimler, çoğunluğu protein yapısında olan ve canlılardaki biyokimyasal tepkimeleri gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzimlerde tıpkı yapısal proteinler gibi, 12.000 ile 1.000.000 Da aralığında değişen molekül ağırlığına sahiptir. Birçok enzim aktivite için protein yapısı dışında herhangi bir kimyasal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

Çeşitli organizmalar kendilerine özgü olan proteinleri içerdikleri gibi, hücre türleri de yüzlerce farklı protein içermektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli sıcaklık ve pH değerlerinde gösterebilmektedirler. Bu durumdan dolayı bir proteinin tek başına saf olarak bir hücre veya dokudan izole edilmesi çok zor bir iştir. Bu zorluğa rağmen şu ana kadar çok sayıda protein saf halde elde edilebilmiştir. Günümüzde yüzlerce enzim kısmen saflaştırılabilmiş ve iki yüzden daha fazla sayıda enzimde saf kristal halde elde edilebilmiştir. Enzimatik aktivitesi olmayan birçok protein farklı canlılardan çok yüksek saflık derecesinde elde edilmiştir. Proteinler, sıcaklık, üç boyutlu yapıları, yüzey gerilimi, pH gibi birçok faktörlerden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktiviteleri değişiklik gösterebilmektedirler. Bu sebepten enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırmak için genel olarak enzimlerin;

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

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



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin basitleştirilmiş gösterim şeması

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

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

örneklerin çoğu enzimlerin katalizledikleri fonksiyonlar hakkında sınırlı bilgi verdiğinden Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) sınıflandırmayı sistematik bir şekilde yapılmaktadır. Ayrıca her bir enzim için enzim konseyi tarafından belirlenen 4 rakamlı bir kod numarası belirlenmiştir (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Bugün yaklaşık 2000'den fazla farklı enzim türü keşfedilmiştir. Enzimler için hem katalizledikleri reaksiyon hem de substrat özgüllükleri dikkate alınarak bir sınıflandırma yöntemi geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC (enzim konseyi) numarası altında girerler. İlk basamakta 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtilirken sonraki ikisi basamak ise alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıfta kaçınıcı sırada olduğunu belirtir.

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

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

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

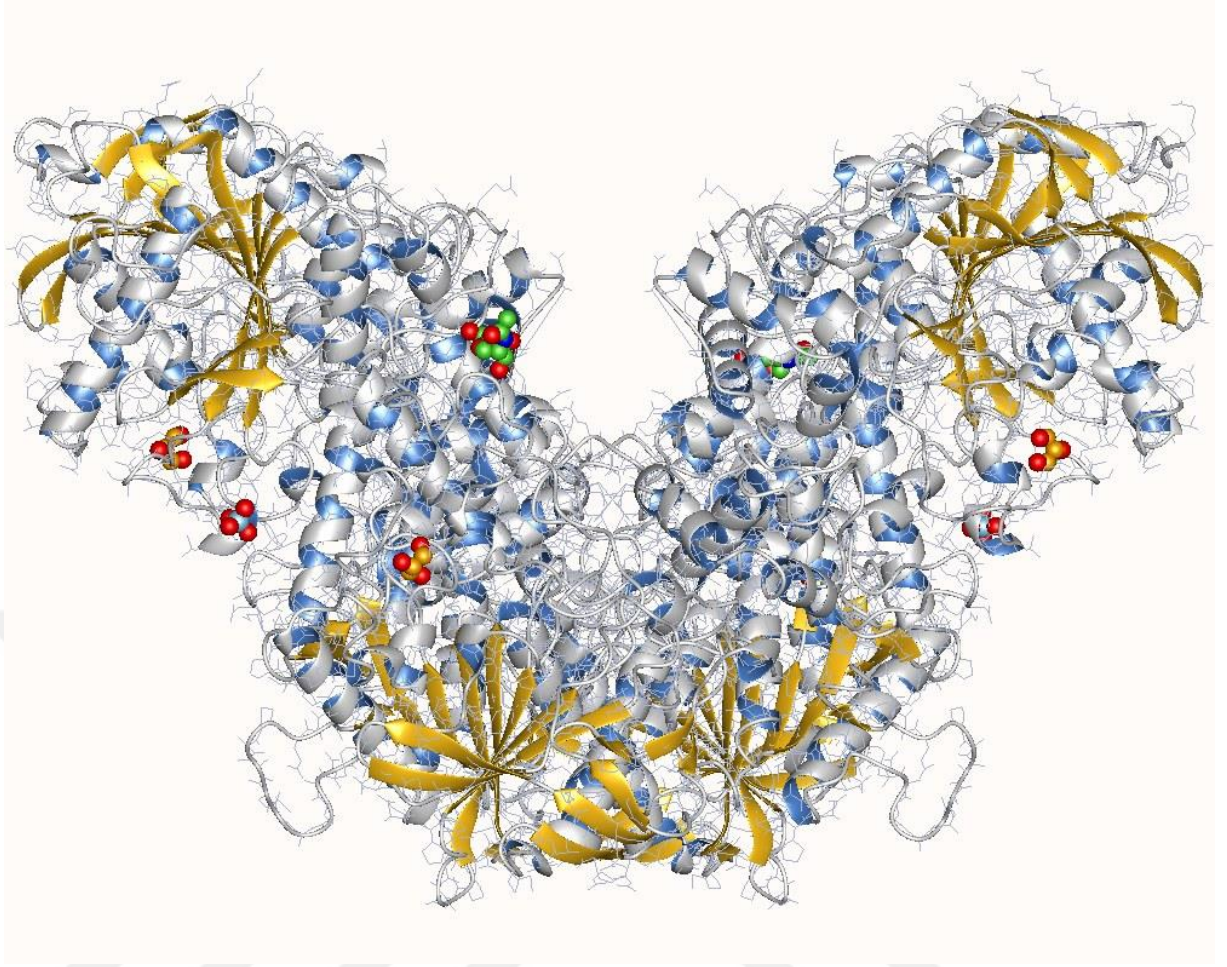
Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

Substrat konsantrasyonu

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

1.2. Asetilkolinesteraz

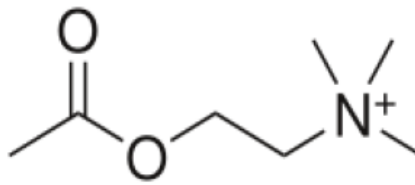
Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7), esas olarak postsinaptik nöromusküler bağlantılarda, özellikle kaslarda ve sinirlerde bulunan kolinerjik bir enzimdir. Doğal olarak oluşan bir nörotransmitter olan asetilkolini (ACh) hemen asetik asit ve koline dönüştürür veya hidrolize eder. AChE'nin birincil rolü, ACh'nin dağılmasını ve yakındaki reseptörlerin aktivasyonunu önlemek için sinapslar arasındaki nöronal iletimi ve sinyalleme sonlandırmaktır. AChE, organofosfatlar tarafından inhibe edilir ve pestisitlerin ve sinir ajanlarının önemli bir bileşenidir (McHardy *et al.* 2017).



Şekil 1.2. Asetilkolin esterazın katalitik bölgesi (Bourne *et al.*, 2011)

1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

AChE enzimi çok yüksek bir aktiviteye sahiptir; yaklaşık olarak saniyede 25.000 ACh'ı parçalayabilir. AChE enzimin aktif bölgesi iki alt birimden oluşmaktadır bunlar; Ayonik alt birim ve katyonik alt birim olarak adlandırılır. AChE'nin yapısı ve reaksiyon mekanizması enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (Susman *et al.* 1991). Enzimin mekanizmasının daha iyi anlaşılması için önemli bir nörotransmitter madde ve enzimin substratı olan asetilkolinin kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 1. 3. Asetilkolinin yapısı.

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



Şekil 1. 4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

AChE enziminin yapında bulunan anyonik alt birim bölgesi ACh'n pozitif kuaterner amini ile bağlanır. Ayrıca bu bölgeye diğer katyonik substratlar ve inhibitörlerinde bağlandığı bilinmektedir. Katyonik substratlar, enzimin aktif bölgesine giden aralıktaki yer alan 14 aromatik yapıli amino asitlerle etkileşimden başka anyonik bölgede yer alan negatif yüklü amino asitler ile bağ yapmazlar (Ariel *et al* 1995). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça yüksek bir korumaya sahiptir (Ordentlich *et al.* 1993). Aromatik yapıli amino asitler içerisinde triptofan 84 (Trp 84) kritik bir önemi vardır. Trp 84'ün alanin ile yer değiştirmesi AChE enziminin reaktivitesini yaklaşık 300 kat kadar azaltır (Tougu 2001). Enzimin aktif bölgesine giden bu aralık yaklaşık 20 angstrom uzunluktadır. Aktif bölge enzimin alt kısmından 4 angstrom yukarıda bir konuma sahiptir (Harel *et al.* 1993).

ACh'n asetat ve koline hidrolizlenmesi esteratik alt birim katalitik üçlü; serin 200, glutamat 327 ve histidin 440 amino asitlerinin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu üçlü amino asit grubu, 3. amino asitin olması gereken aspartat yerine glutamat gelmesi dışında serin proteazlar ile oldukça benzer bir dizilime sahiptir (Tripathi 2008). Karboksil esterin hidroliz reaksiyonu açıl-enzim ve serbest kolinin oluşumuna neden olur. Daha sonra açıl-enzim su (H₂O) molekülü tarafından nükleofilik atağa uğrar ve histidin 440 amino asitinin yardımıyla asetik asiti serbest bırakılır ve tekrar serbest enzim oluşur (Pohanka 2011).

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

AChE, çeşitli formlarda bulunan bir glikoproteindir. Kimyasal yapıdaki çeşitliliğin bir sonucu olarak, bazı AChE formları hidrofobik iken diğerleri hidrofiliktir. Hidrofilik türler genellikle hücre içinde aşırı hücre içi ACh konsantrasyonlarını

parçalamak için çalışır. Bununla birlikte, lipid bağı (hidrofobik) çeşitler, ACh'yi bileşen parçalarına (asetat ve kolin) ayırmak için sinaptik yarıktaki veya nöromusküler kavşakta çalışan ACh inaktivasyonunun birincil ajanlarıdır. Lipid bağlantılı AChE türleri, post-sinaptik membran içine gömülür ve ACh'nin hızlı inaktivasyonunu sağlamak için post-sinaptik reseptör moleküllerine stratejik olarak yakın yerleştirilir.

Bireysel kimyasal nitelikler ve anatomik düzenlemeler, çeşitli AChE formları arasında büyük ölçüde farklılık gösterse de, tüm türler için kataliz mekanizması çarpıcı biçimde benzer kalmaktadır. Her durumda, AChE'nin aktif sitesi, her ikisi de ACh'nin bozulması için kritik öneme sahip iki alt siteden oluşur. Anyonik bölge, bir ACh molekülünü enzime bağlama görevi görür. İlk keşfedildiğinde, bu sitenin, ACh molekülünün pozitif yüklü dördüncü nitrojeniyle elektrostatik olarak etkileşime giren bir veya daha fazla negatif yüklü gruptan oluştuğu düşünülüyordu. Ancak daha yakın zamanlarda, hidrofobik etkileşimlerin, substratın bu bölgesinin enzime bağlanmasında daha önemli olmasa da eşit derecede önemli olduğu düşünülmektedir (<https://web.williams.edu/imput/synapse/pages/IVA2.html>).

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

AChE inhibitörleri AChE enziminin aktivitesini azaltarak ya da tamamen durdurarak ACh'nin yıkılmasını engeller. Böylelikle nörotransmitter görevi olan ACh'nin ortamdaki konsantrasyonunu ve bulunma süresini artırır. AChE inhibitörleri genellikle geri dönüşümlü, yarı geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olacak şekilde etki gösterirler (Pohanka 2012; Zilbeyaz *et al.* 2018).

İlaç olarak kullanılan AChE inhibitörleri genelde yarışmalı veya yarışmasız geri dönüşümlü moleküllerden seçilir. Bu inhibitörlere karbamatlar, fizostigmin, neostigmin, pyridostigmine, ambenonium, demekaryum, rivastigmin, fenantren türevleri, galantamin, kafein (yarışmasız), piperidinler, donepezil, takrin (tetrahidroaminokridin, THA), edrofonyum, Huperzin A, ladostigil, ungeremine, lactucopicrin örnek olarak verilebilir (Pohanka 2012; Zilbeyaz *et al.* 2018; Cavdar *et al.* 2019; Ozil *et al.* 2019).

Yarı-geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılır. Bu inhibitörlere organofosfatlar, ekotiofat, sarin, diazinon, ethiofencarb, propamocarb, diizopropilfluorofosfat,

malathion, soman, galantamin, cadusafos, klorprifos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, parathion, aldicarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb, pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbetamit, karbofuran, karbosulfan, chlorbufam, chlorpropham, formetanate, methiocarb, methomyl, propham, onchidal ve kumarinler örnek olarak verilebilir (Pohanka 2012).

1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları

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

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

Asetilkolinesterazın inhibisyon mekanizmasını gösteren şekil aşağıda verilmiştir:

2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları

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

kollajen yapıda üçlü heliks kuyruk ile tutunarak bu yapıyı oluşturur (Massoulie *et al.*, 1993).

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

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

Kolinesterazlar, glikoprotein yapıda olan monomer veya oligomerlerdir (Chatonnet and Lockridge 1989). İnsan serumunda BChE'nin büyük bir kısmı çözünebilir halde olan G4 formunda bulunmaktadır, ne bir glikolipid çıpa ne de kollajen kuyruğu vardır, yapısı birbirine eş dört alt birimin oluşturduğu tetramerdir (Masson and Lockridge 2010). BChE'nin bir monomerinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 90 kDa, bir dimeri ise yaklaşık 180 kDa'dır (Lockridge 1990).

Kolinesteraz inhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri (asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak da adlandırılır), asetilkolinin normal parçalanmasını bloke eden bir grup ilaçtır. Asetilkolin vücutta bulunan ana nörotransmitterdir ve hem periferik sinir sisteminde hem de merkezi sinir sisteminde işlev görür. Örneğin, asetilkolin, kasları harekete geçirmek için motor nöronlar tarafından salınır; asetilkolin ayrıca uyarılma, dikkat, öğrenme, hafıza ve motivasyonda önemli bir role sahiptir.

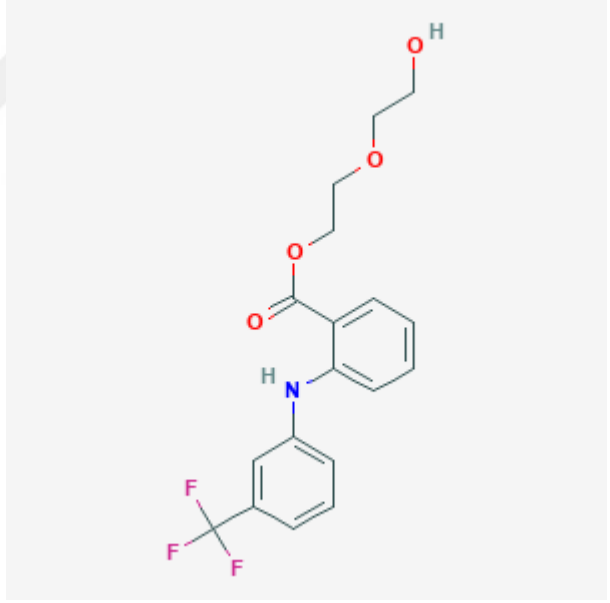
Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinin parçalanmasından sorumlu olan kolinesteraz enziminin etkisini bloke eder. Bu, sinaptik yarıktaki (iki sinir ucu arasındaki boşluk) asetilkolin seviyelerini artırır.

Kolinesteraz inhibitörlerinin ana kullanımı Alzheimer hastalarında demans tedavisi içindir. Alzheimer hastalığı olan kişilerin beyindeki asetilkolin seviyeleri azalmıştır. Kolinesteraz inhibitörlerinin kognisyon gibi bunama semptomları üzerinde orta düzeyde bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

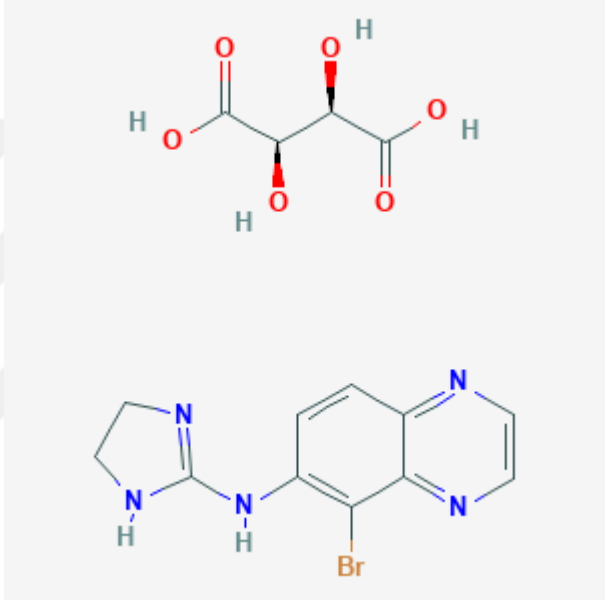
Kolinesteraz inhibitörleri vazodilatasyon, göz bebeklerinde daralma, artan ter salgısı, tükürük ve gözyaşı, yavaş kalp hızı, solunum yolunda mukus sekresyonu ve hava yollarının daralması gibi yan etkilere neden olma eğilimindedir (Anonim 1)

2.6. Çalışmada Kullanılan İlaçlar

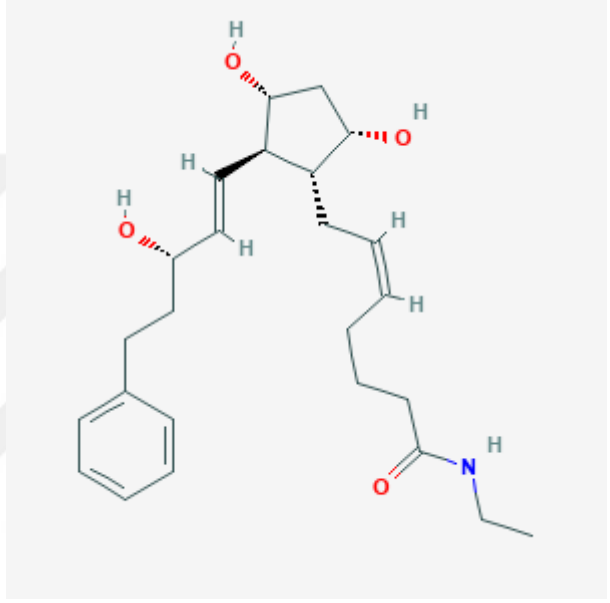
Çizelge 1.1.Etofenamat hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Etofenamat
Formülü	$C_{18}H_{18}F_3NO_4$
Molekül ağırlığı	369,3 g/mol
Molekül yapısı	 The chemical structure of Etofenamat is shown. It consists of a central benzene ring. At the 1-position, there is a trifluoromethyl group (-CF ₃). At the 2-position, there is an amine group (-NH-) connected to another benzene ring. At the 3-position, there is a carboxylate group (-COO-) connected to a third benzene ring. At the 4-position, there is an ethyl ester group (-OCH ₂ CH ₂ OH).
İlaç bilgileri	Etofenamat, kas ve eklem ağrısını tedavi etmek için kullanılır. Steroid olmayan antiinflamatuvar bir ilaçtır (NSAID).

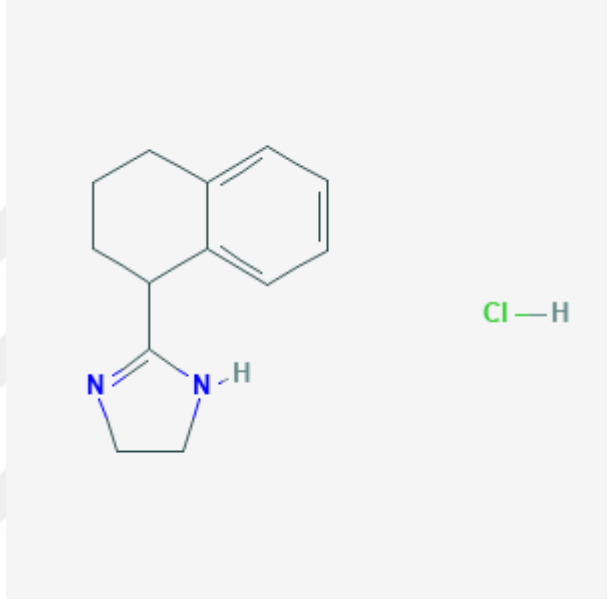
Çizelge 1.2.Brimonidin tartarat hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Brimonidin tartarat
Formülü	$C_{18}H_{16}BrN_5O_6$
Molekül ağırlığı	442,22 g/mol
Molekül yapısı	
İlaç bilgisi	Monoterapinin yetersiz göz içi basıncının (GİB) düşüşü sağladığı açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonu olan yetişkin hastalarda yüksek GİB azalması.

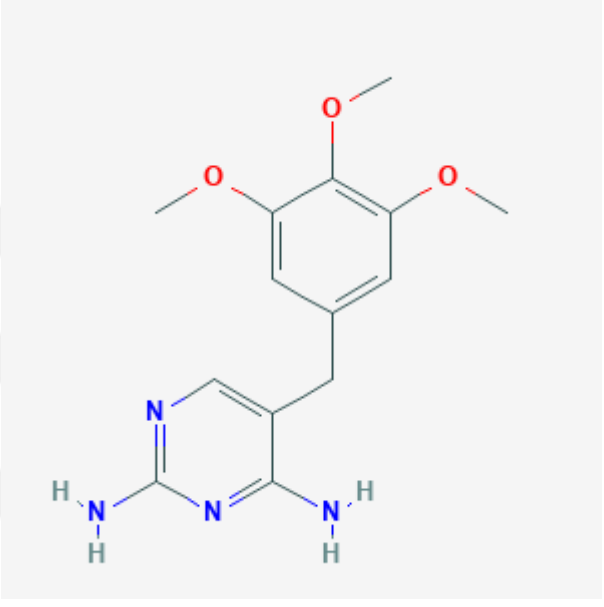
Çizelge 1.3.Bimatoprost hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Bimatoprost
Formülü	$C_{25}H_{37}NO_4$
Molekül ağırlığı	415,6 g/mol
Molekül yapısı	 The chemical structure of Bimatoprost is shown. It features a cyclopentane ring with two hydroxyl groups (one dashed, one wedged) and a side chain containing a double bond and a hydroxyl group. Another side chain is attached to the ring, ending in a benzyl group. A third side chain is attached to the ring, ending in a propanamide group.
İlaç bilgisi	Bimatoprost, açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonu olan hastalarda yüksek göz içi basıncını düşürmek için kullanılır. Bu hastalar diğer göz içi basıncı düşürücü ilaçlara tolerans göstermemeli veya diğer tedavilere yetersiz yanıt vermelidir. [L6877] Bimatoprost ayrıca kirpik hipotrikozunu tedavi etmek için endikedir.

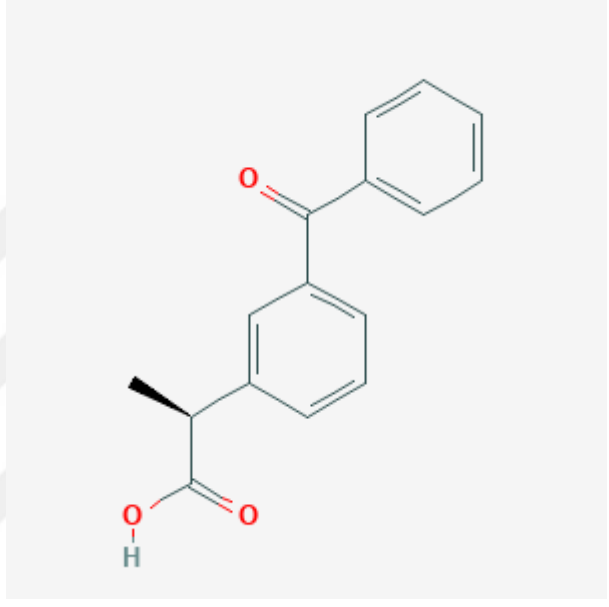
Çizelge 1.4.Tetrahidrozolin hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Tetrahidrozolin HCl
Formülü	$C_{13}H_{17}ClN_2$
Molekül ağırlığı	236,74 g/mol
Molekül yapısı	
İlaç bilgisi	Tetrahidrozolin hidroklorür, semptomimetik özelliği olan bir imidazol türevi olan tetrahidrozolinin hidroklorür tuzu formudur. Göze veya buruna lokal olarak uygulanan tetrahidrozolin, alfa-adrenerjik reseptörlere bağlanır ve bunları aktive ederek vazokonstriksiyona ve burun ve oftalmik tıkanıklığın azalmasına neden olur.

Çizelge 1.5.Trimetoprim hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Trimetoprim
Formülü	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Molekül ağırlığı	290,32 g/mol
Molekül yapısı	 The chemical structure of Trimetoprim is shown. It consists of a pyrimidine ring (a six-membered ring with two nitrogen atoms) substituted with two amino groups (-NH₂) at the 2 and 4 positions. A methoxybenzyl group (a benzene ring with three methoxy groups (-OCH₃) at the 3, 4, and 5 positions, attached to a -CH₂- group) is attached to the 6 position of the pyrimidine ring.
İlaç bilgisi	Trimetoprim, antibakteriyel ve antiprotozoal özelliklere sahip sentetik bir trimetoksibenzil-pirimidin türevidir. Bir şekilde pirimidin bakteriyel inhibitörü dihidrofolat redüktaz, sıkı bir şekilde, bakteriyel enzime trimetoprim bağlandığı, üretimini bloke tetrahidrofolata gelen dihydrofolic asit. Bu ajanın antibakteriyel aktivitesi sülfonamidlerle güçlendirilir.

Çizelge 1.6.Deksketoprofen hakkında genel bilgiler.

Etken madde adı	Deksketoprofen
Formülü	$C_{16}H_{14}O_3$
Molekül ağırlığı	254,28 g/mol
Molekül yapısı	 The chemical structure of Deksketoprofen is shown. It consists of a central benzene ring. At the 1-position, there is a carboxylic acid group (-COOH) with the hydrogen atom explicitly shown. At the 3-position, there is a chiral center marked with a wedge bond, attached to a phenyl ring. At the 5-position, there is a benzoyl group (-CO-C6H5).
İlaç bilgisi	Deksketoprofen, fenil halkası üzerinde 3 pozisyonunda bir benzoil grubu ile ikame edilmiş (S) -hidratropik asit olan bir monokarboksilik asittir. Bir siklooksijenaz inhibitörü, kas ağrısı, diş ağrısı ve dismenore gibi kısa süreli ağrıları gidermek için kullanılır. Steroid olmayan bir anti-enflamatuar ilaç, bir siklooksijenaz 1 inhibitörü, bir siklooksijenaz 2 inhibitörü ve bir narkotik olmayan analjezik olarak rol oynar. Monokarboksilik bir asittir ve benzofenonların bir üyesidir. Bir (S) -hidratropik asitten türemiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

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

Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan takrin, serum BChE ve AChE enzimlerini çok etkili bir şekilde inhibe edebildiği için bu hastalıkta ilaç olarak kullanılmaktadır (Saxane *et al.* 1997). Takrin molekülü kolinesteraz enzimlerinin aril açil amidaz (AAA) ve esteraz aktivitelerini etkileyerek inhibisyon etkisini göstermektedir (Rajesh *et al.* 2009a).

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

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

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

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmamızdayararlanılan alet ve cihazlaraşağıda belirtilmiştir.

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

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

1.0,1 M Tris-HCl, pH=8,0(AChE enzimi aktivite ölçümü için): 12,11 g Tris 950 ml distile suda çözülerek, 1 N'likHCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlandı.

2. 0,1 M KH₂PO₄ (pH=7,8) (BChE enzimi aktivite ölçümü için): 0,68 g KH₂PO₄ tartılarak 85 ml distile suda çözüldü, 1 N'likHCl ile pH=7,8'e ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

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

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

5.2 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi: 7,73 mg DTNB alınarak 10 ml 0,1 M KH₂PO₄ (pH=7,8) tamponunda çözülerek hazırlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ellman yöntemine göre AChE/BChE inhibitör etkisi ölçülmesi

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

AChE /BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

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

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki simgeler aşağıdaki gibidir;

EU / ml : 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri

ΔOD : Zamana göre absorbans farkı değişimi

T : Zaman (Dk)

13,6 : DTNB için ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam hacim (ml)

V_E : Küvete katılan enzim miktarı (ml)

3.2.2.İnhibitörler için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

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

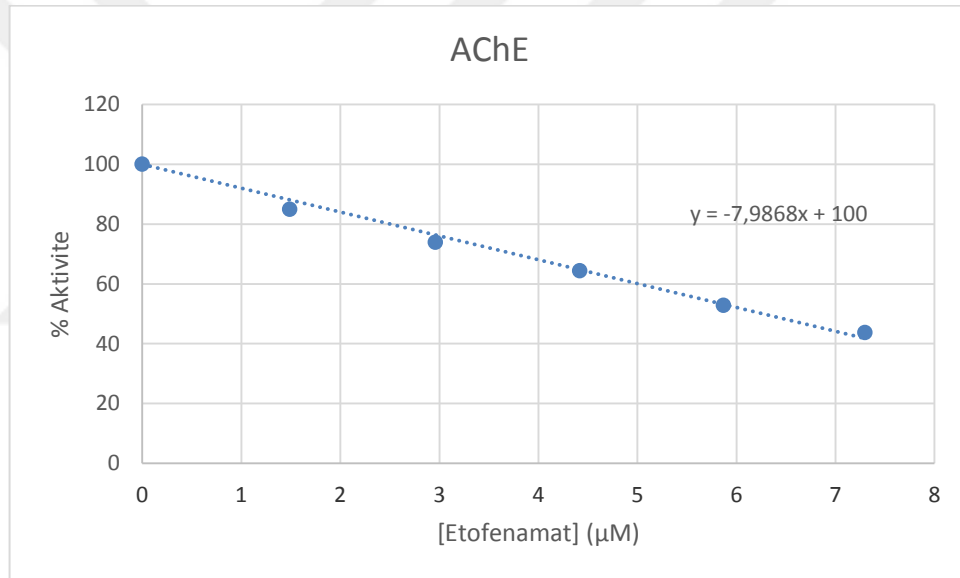
3.3.3. Test edilen maddeler için docking değerlerinin belirlenmesi çalışmaları

Tüm PDB dosyaları resb.org'dan alınmıştır. AutoDockTools programı (sürüm 1.5.7) (Sanner 1999), tüm ligandların ve enzimlerin hazırlanmasında kullanıldı. Tüm yerleştirme deneyleri için Autodock Vina programı (sürüm 1.1.2) kullanıldı (Trott and Olson 2010), her bir enzimin tüm yüzeyi araştırıldı, tamlık değeri 32 olarak belirlendi, enerji aralığı değeri 5 olarak atandı ve en iyi 5 sonucun olması istendi. Her bir enzim için her molekülde on iki deneme yapıldı ve bunların en yüksek puanlama konformasyonu PyMOL-oss programındaki (sürüm 2.4.1) reseptör proteini ile hizalandı. Etkileşimlerin değerlendirilmesi Biovia Discovery Studio Visualizer (versiyon 21.1.0.2029) programında gerçekleştirildi.

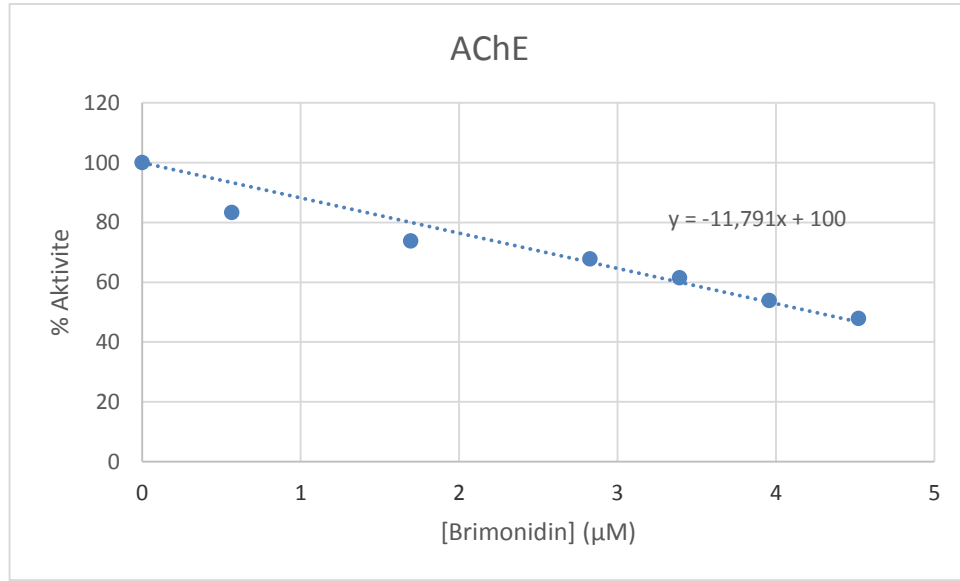
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnhibitörler İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

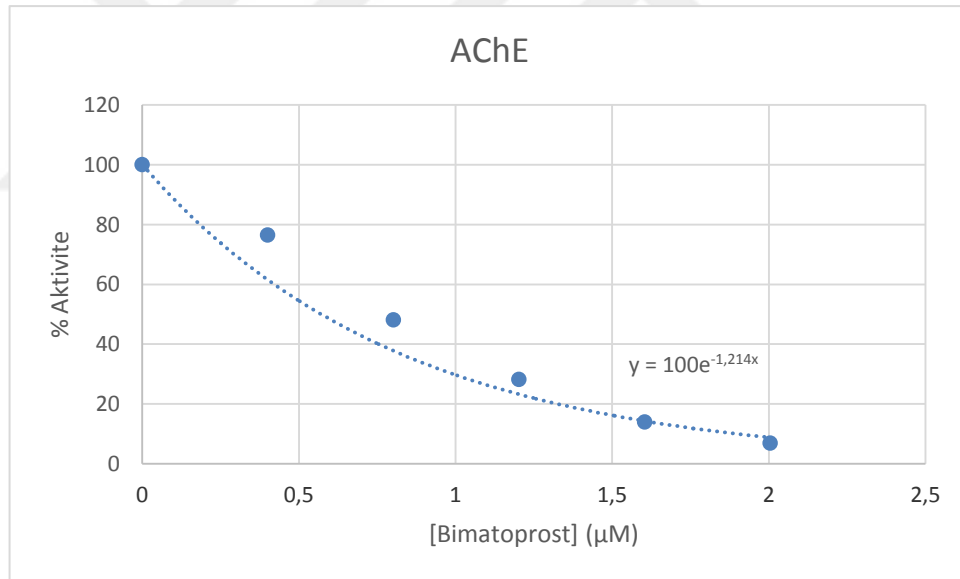
Çalışılan enzimlerin aktiviteleri üzerine etofenamat, brimonidin, bimatoprost, tetrahidrozolin, trimetoprim ve deksketoprofen ilaçlarının inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu ilaçların stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak elde edilen grafikler Şekil 4.1-4.12’de gösterildi. Eğrilerin denklemlerinden IC₅₀ değerleri hesaplandı.



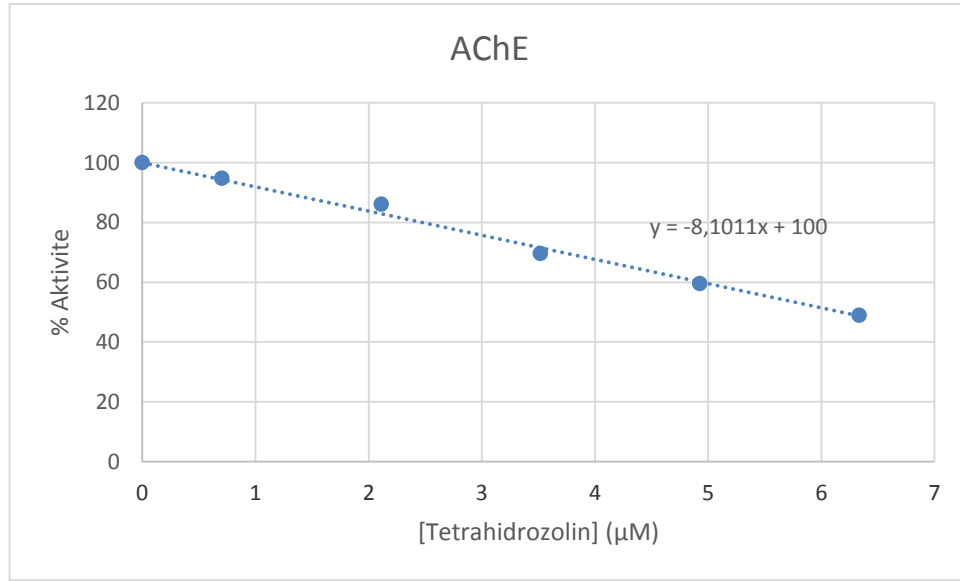
Şekil 4.1. Etofenamat ile AChE enzimini IC₅₀ garfı.



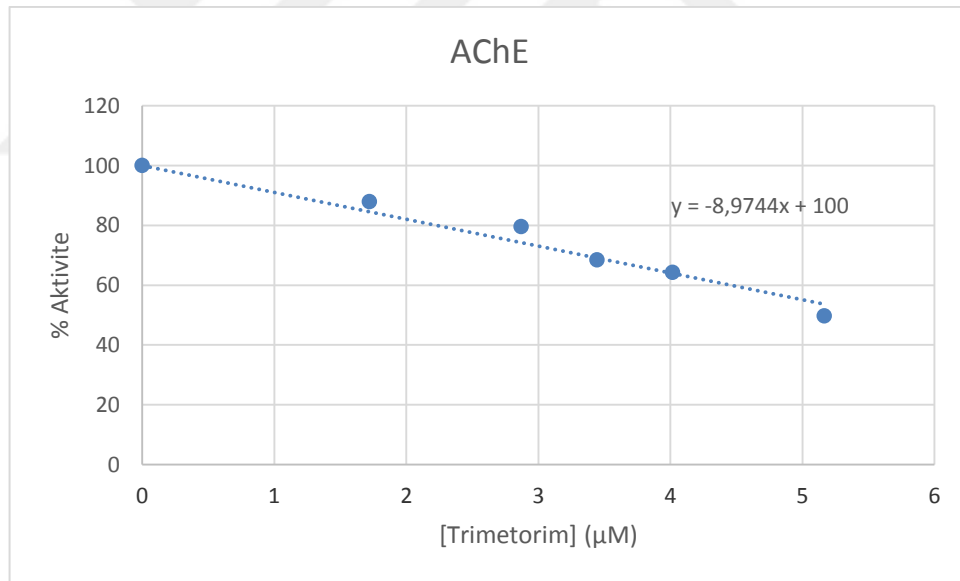
Şekil 4.2.Brimonidin ile AChE enzimini IC₅₀ garfığı.



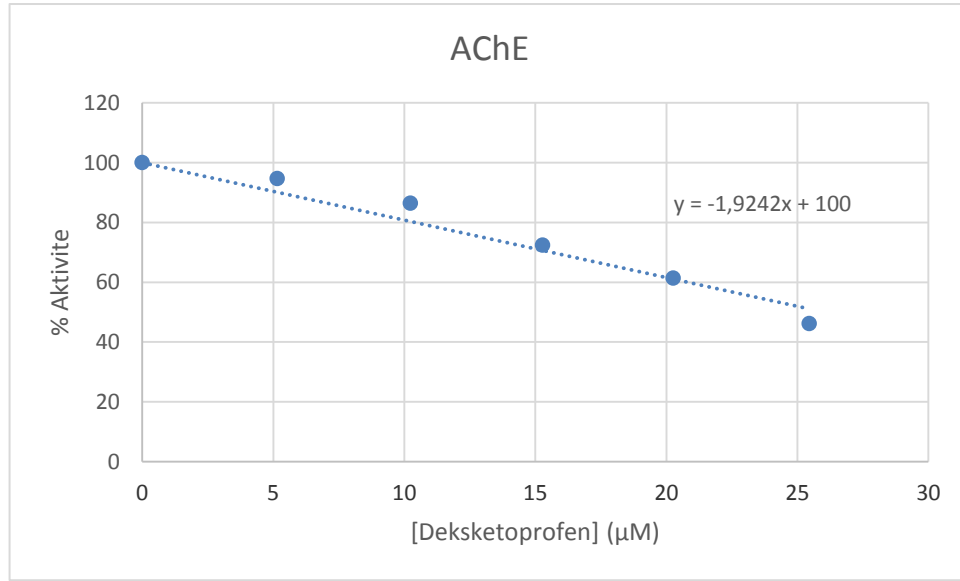
Şekil 4.3. Bimatoprost ile AChE enzimini IC₅₀ garfığı.



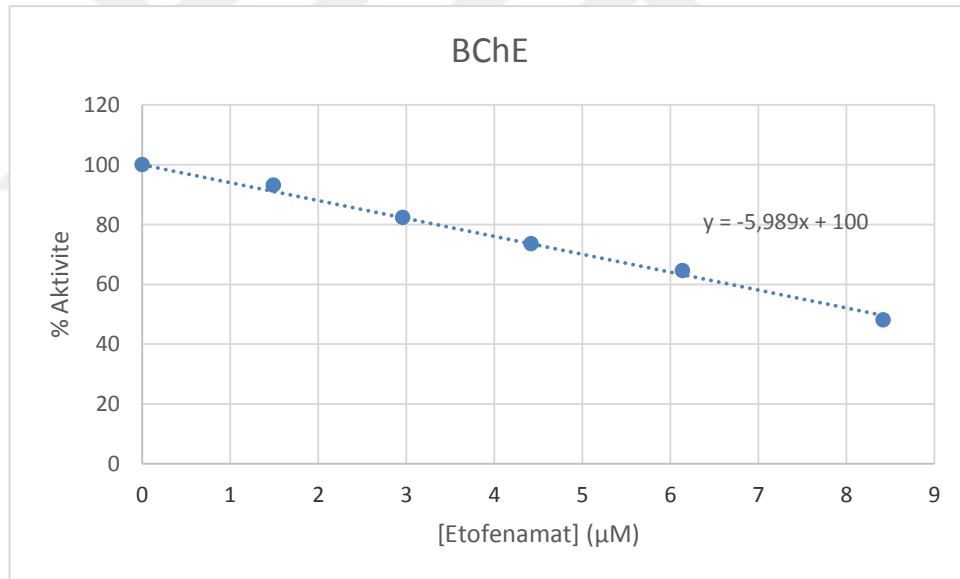
Şekil 4.4. Tetrahydrozolin ile AChE enzimini IC₅₀ garfığı.



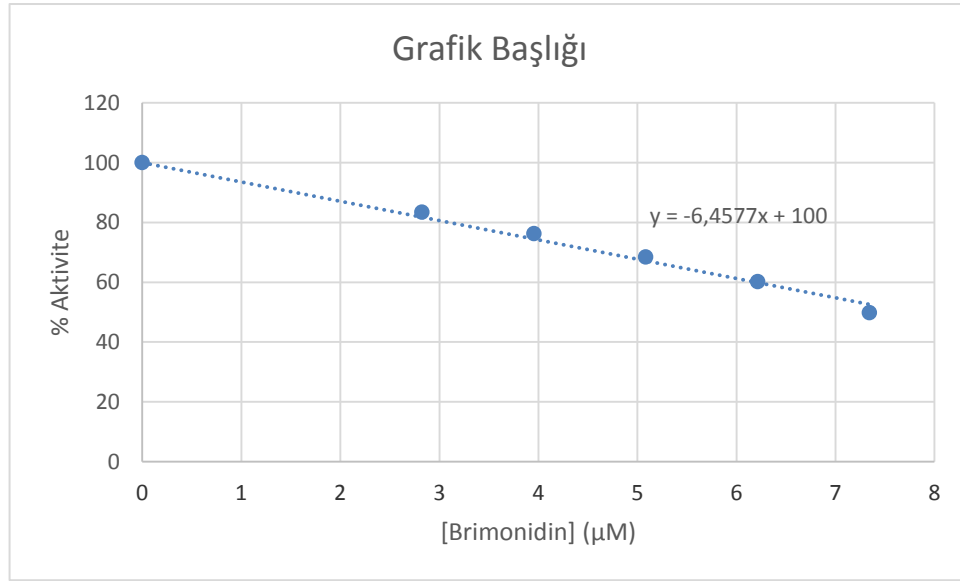
Şekil 4.5. Trimetoprim ile AChE enzimini IC₅₀ garfığı.



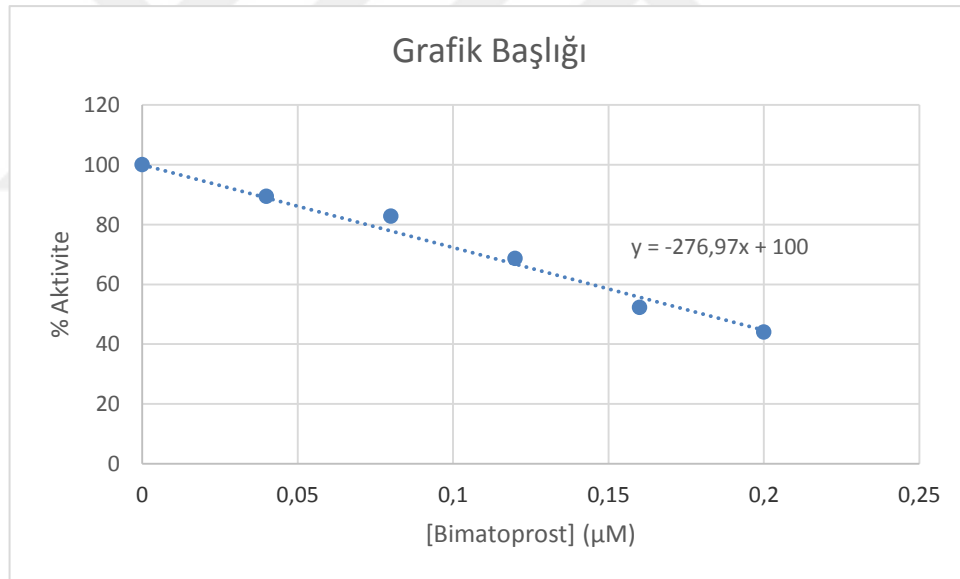
Şekil 4.6. Dekскетופן ile AChE enzimini IC_{50} garfığı.



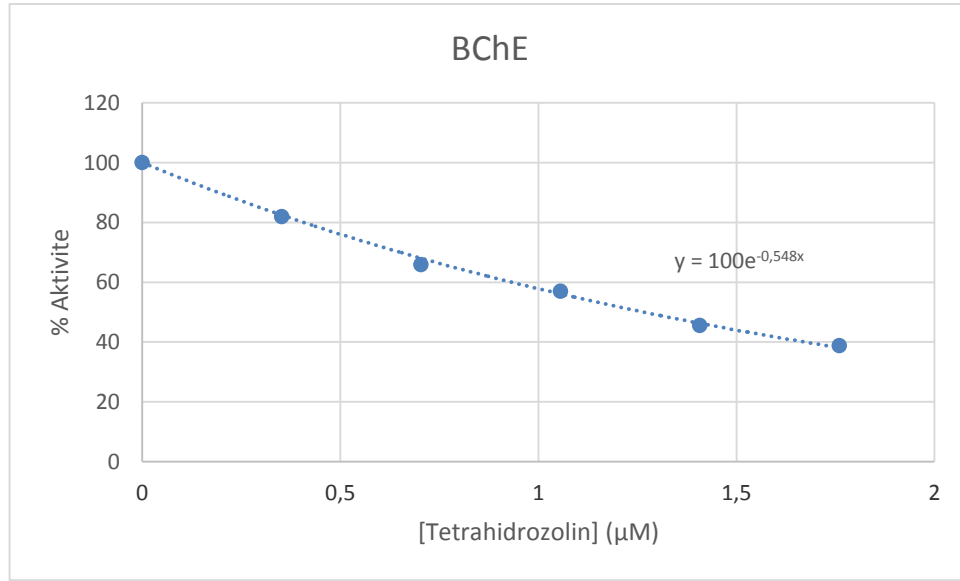
Şekil 4.7. Etofenamat ile BChE enzimini IC_{50} garfığı.



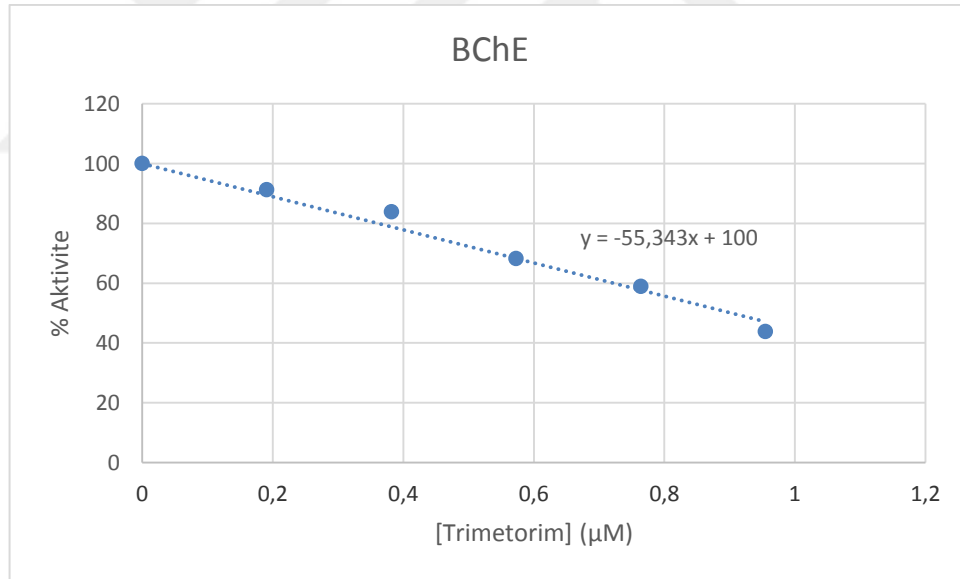
Şekil 4.8. Brimonidin ile BChE enzimini IC_{50} garfı.



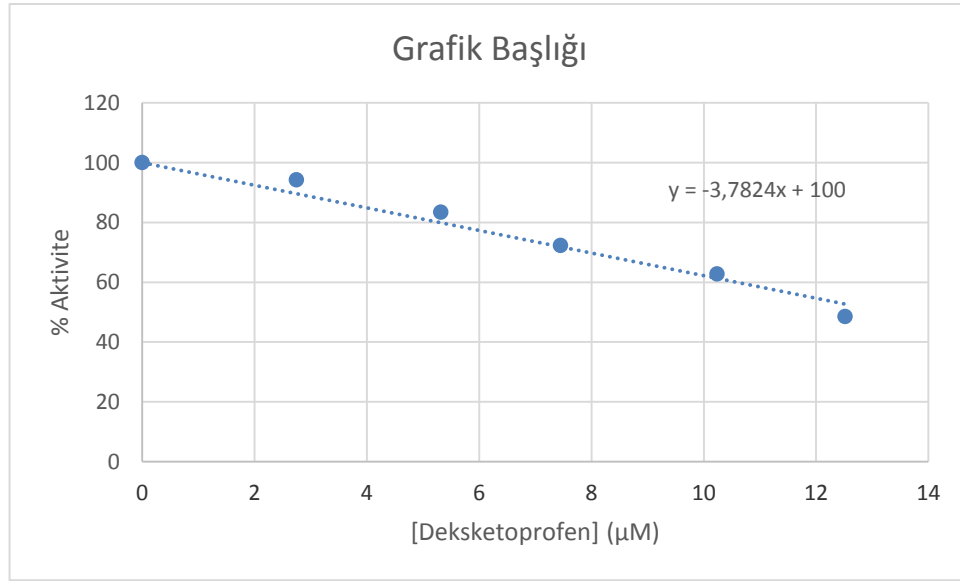
Şekil 4.9. Bimatoprost ile BChE enzimini IC_{50} garfı.



Şekil 4.10. Tetrahydrozolin ile BChE enzimini IC₅₀ garfıı.



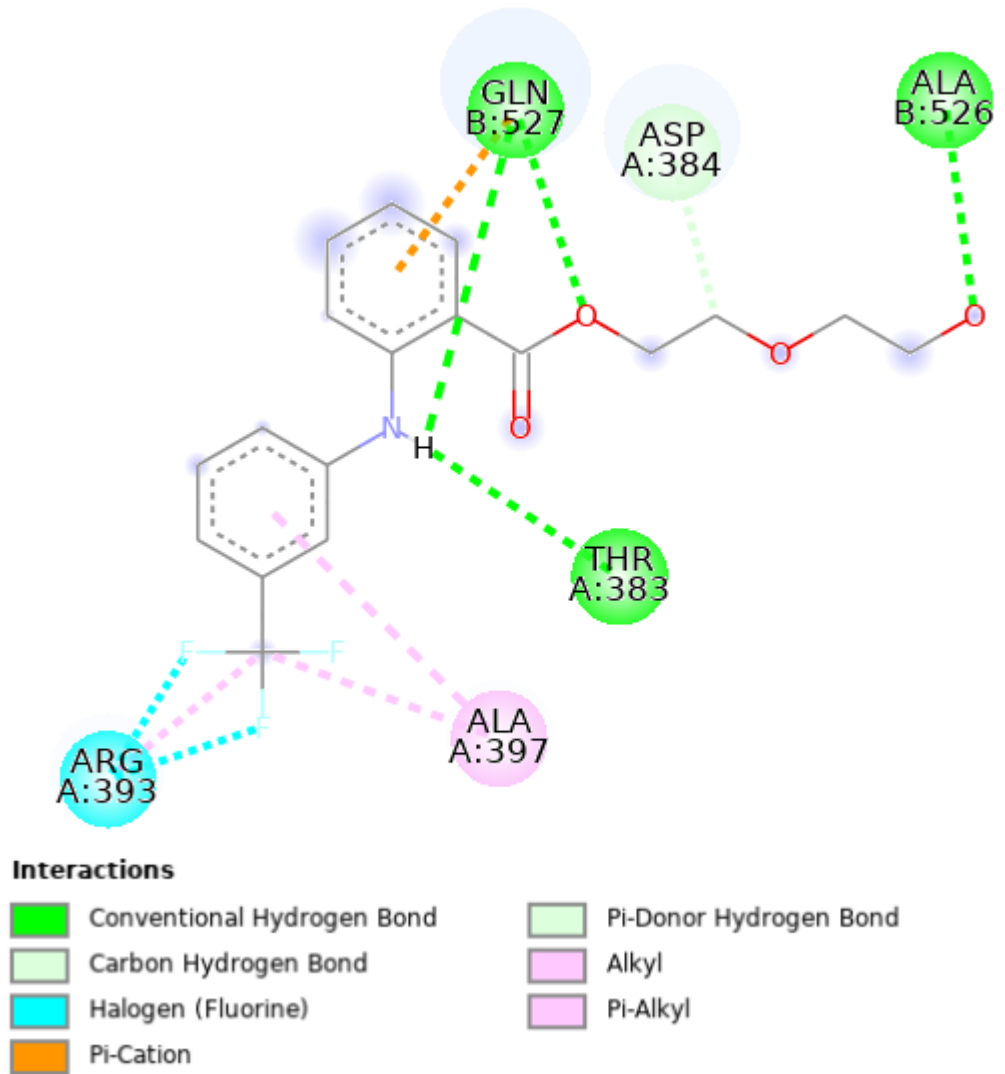
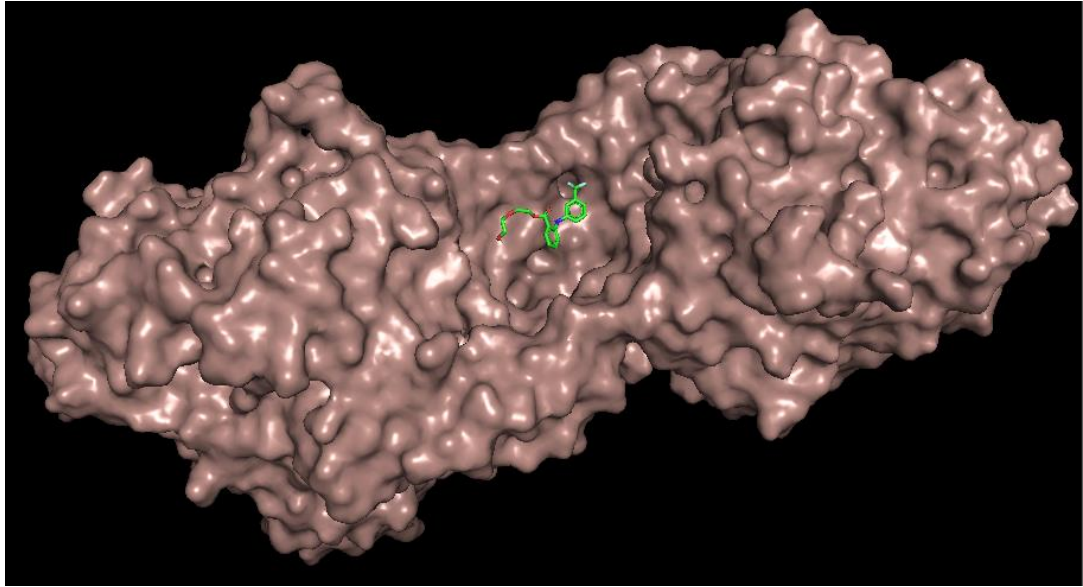
Şekil 4.11. Trimetoprim ile BChE enzimini IC₅₀ garfıı.



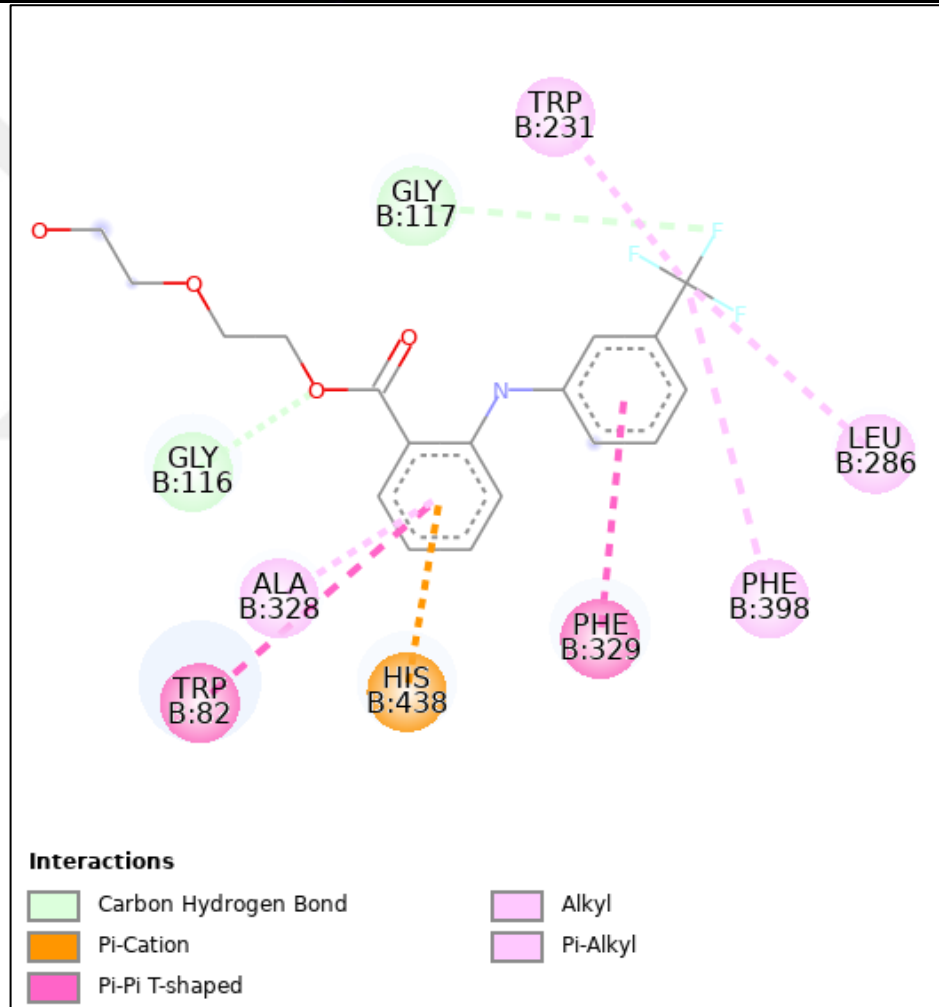
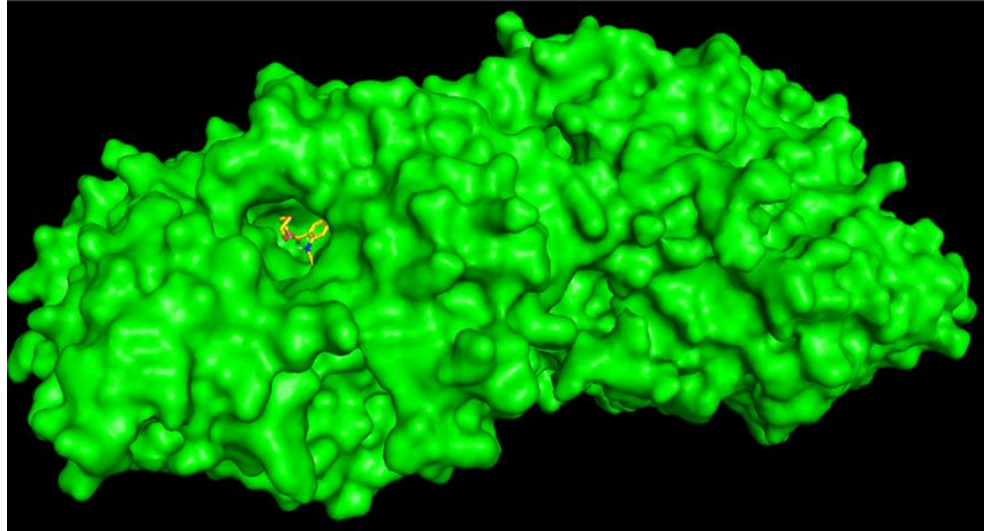
Şekil 4.12. Deksketoprofen ile BChE enzimini IC₅₀ garfı.

Çizelge 4.1. Bazı ilaç etken maddelerinin AChE ve BChE enzimleri için belirlenen IC₅₀ değerleri.

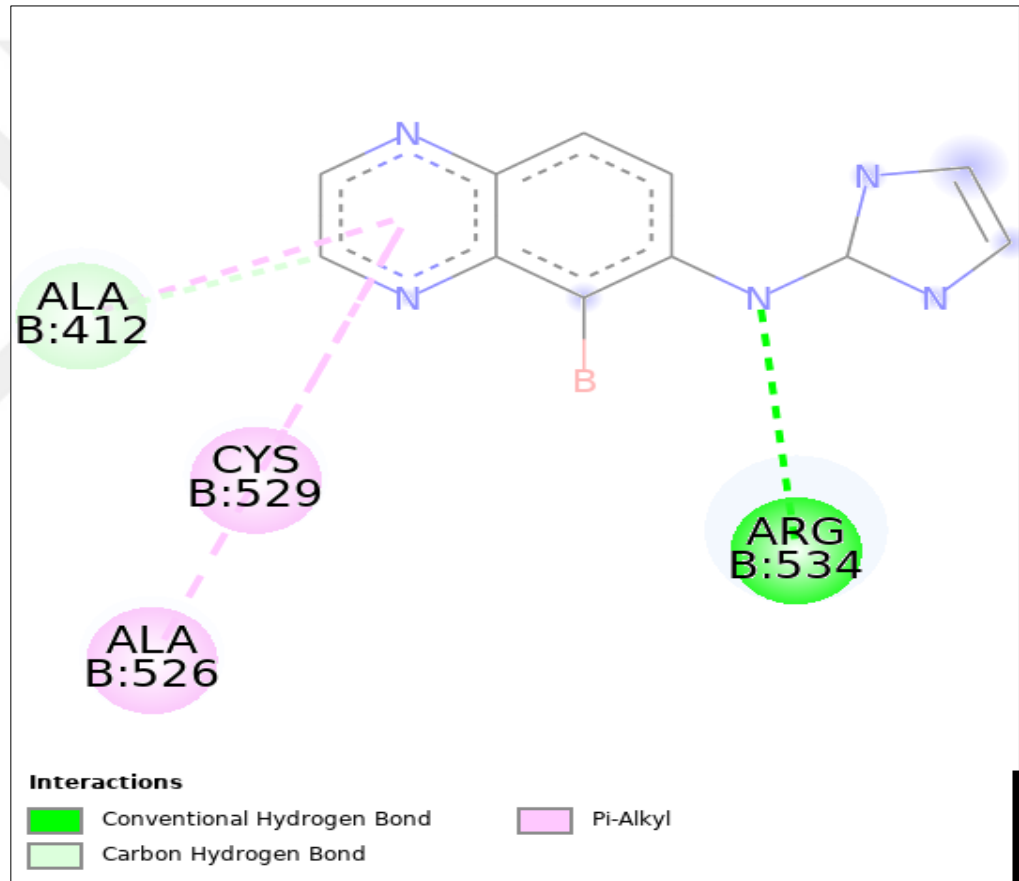
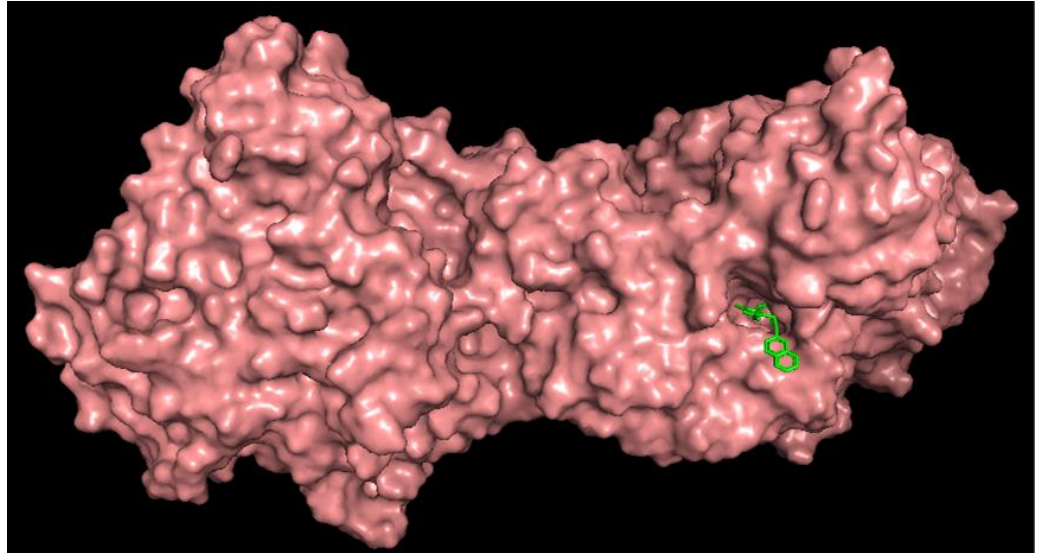
İlaç	IC ₅₀ (μM)	
	AChE	BChE
Etofenamat	6,26	8,35
Brimonidin	4,24	7,74
Bimatoprost	0,57	0,18
Tetrahidrozin	6,17	1,26
Trimetoprim	5,57	0,90
Deksketoprofen	25,98	13,22



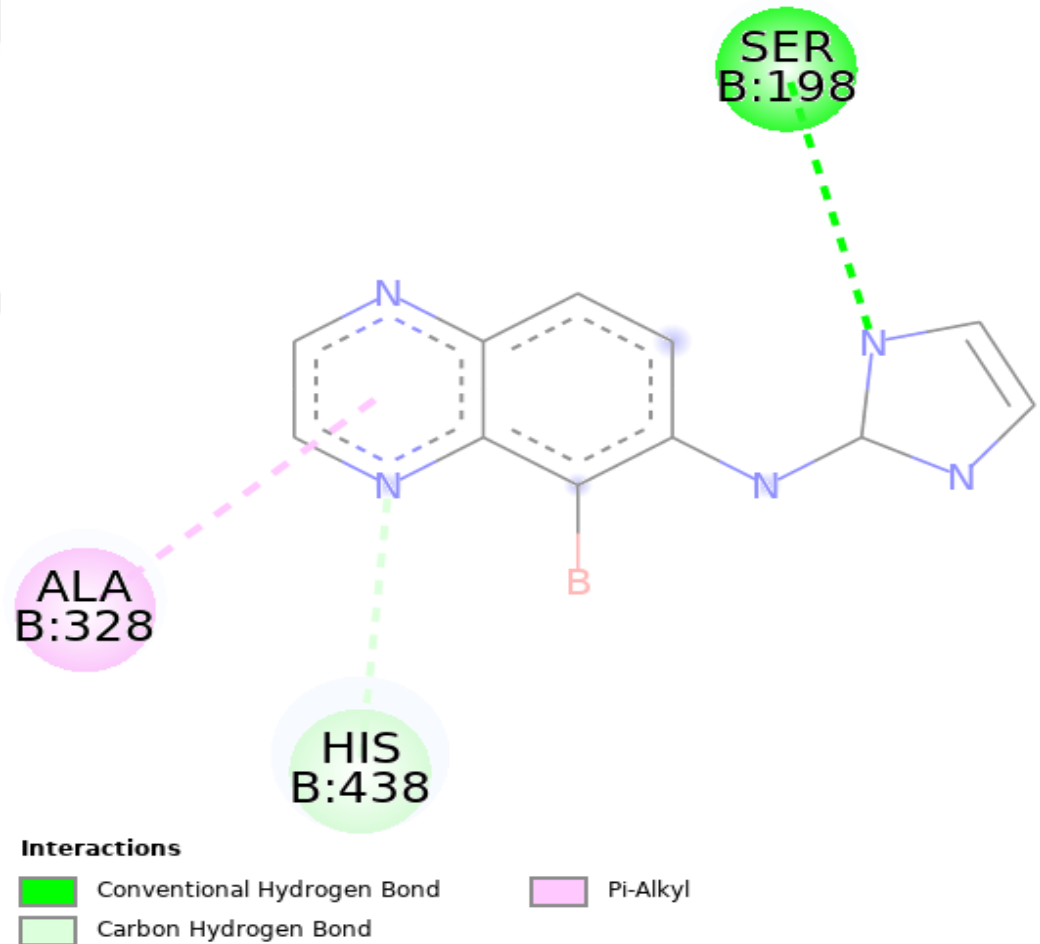
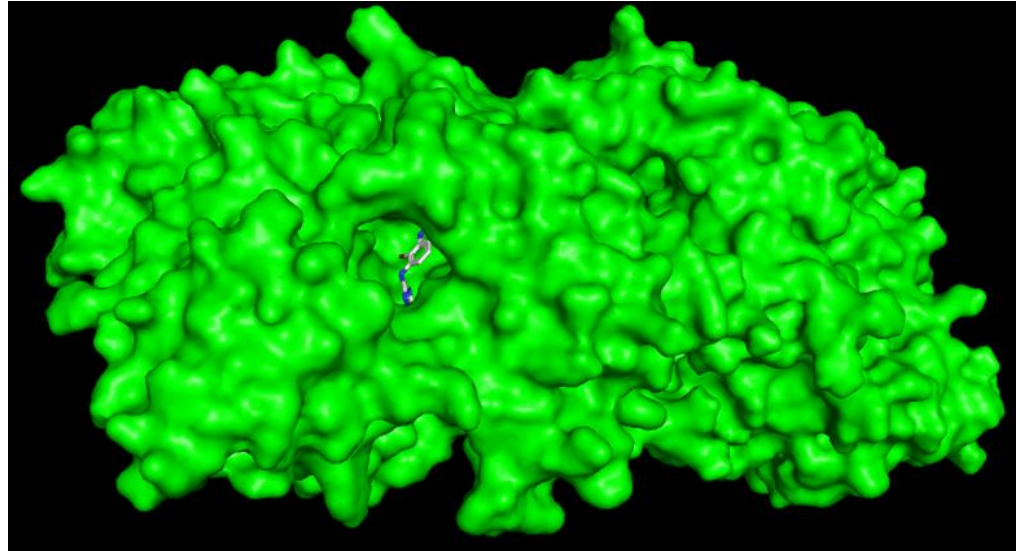
Şekil 4.13. Etofenamat AChE docking pozları.



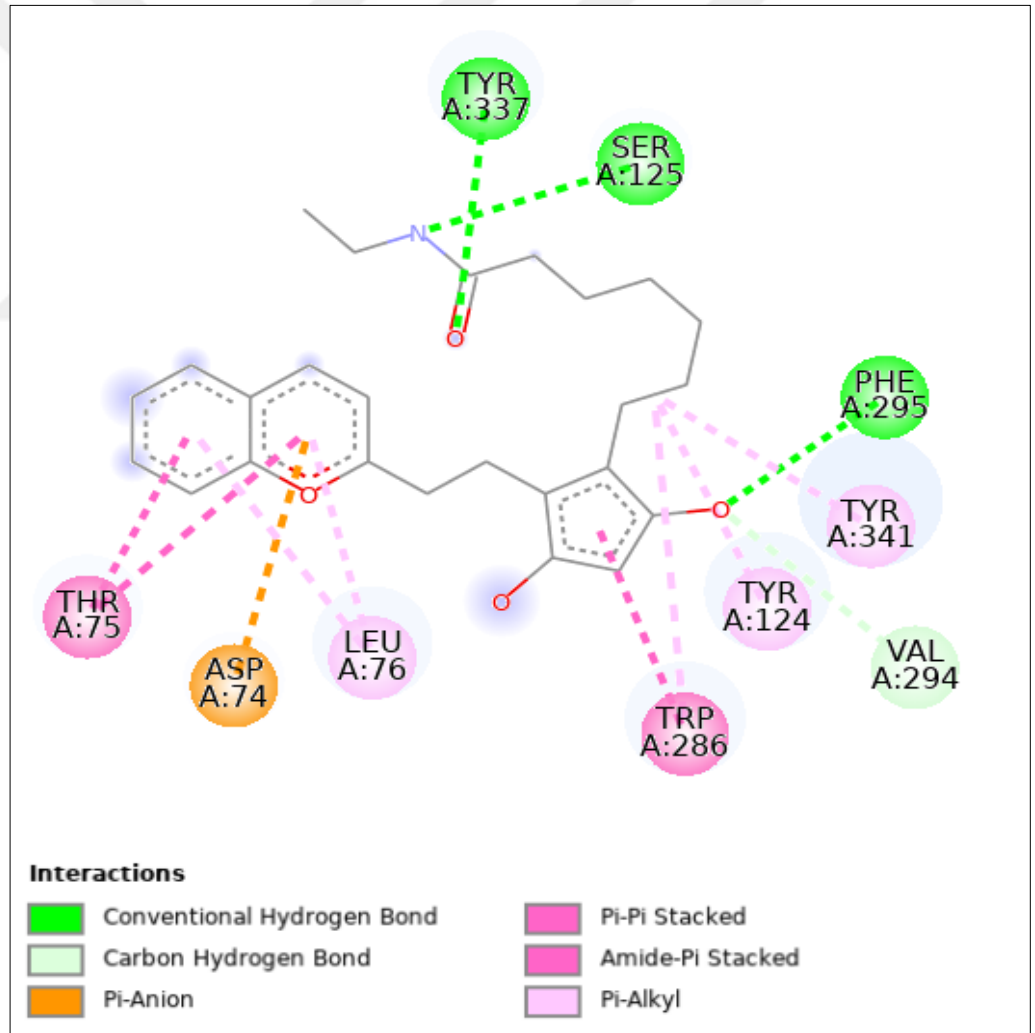
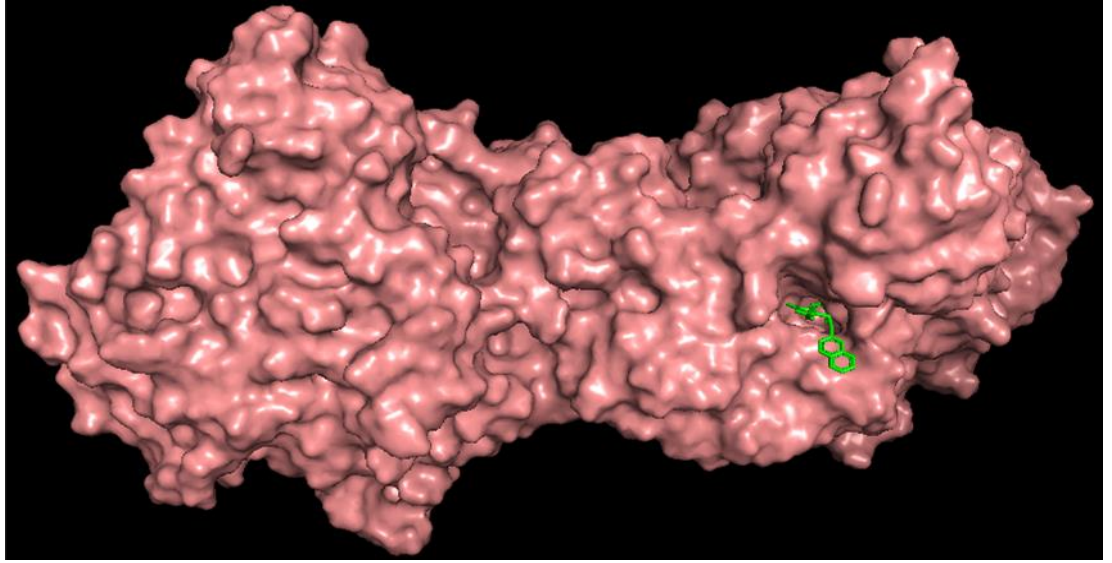
Şekil 4.14. Etofenamat BChE docking pozları.



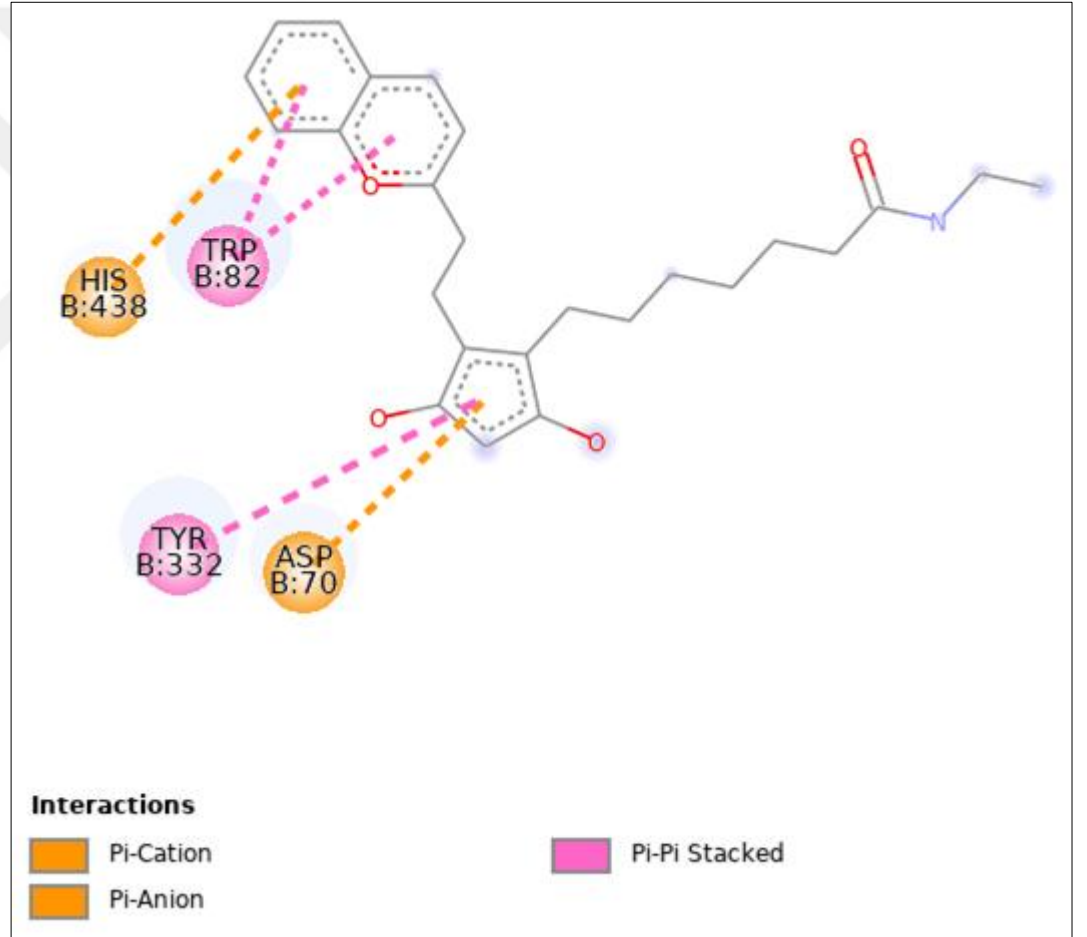
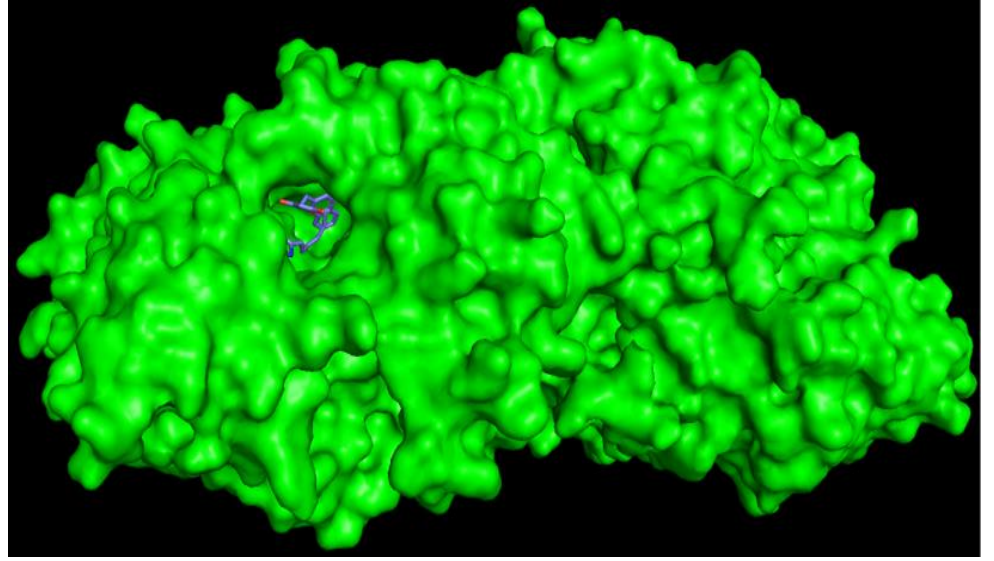
Şekil 4.15. Brimonidin AChE docking pozları.



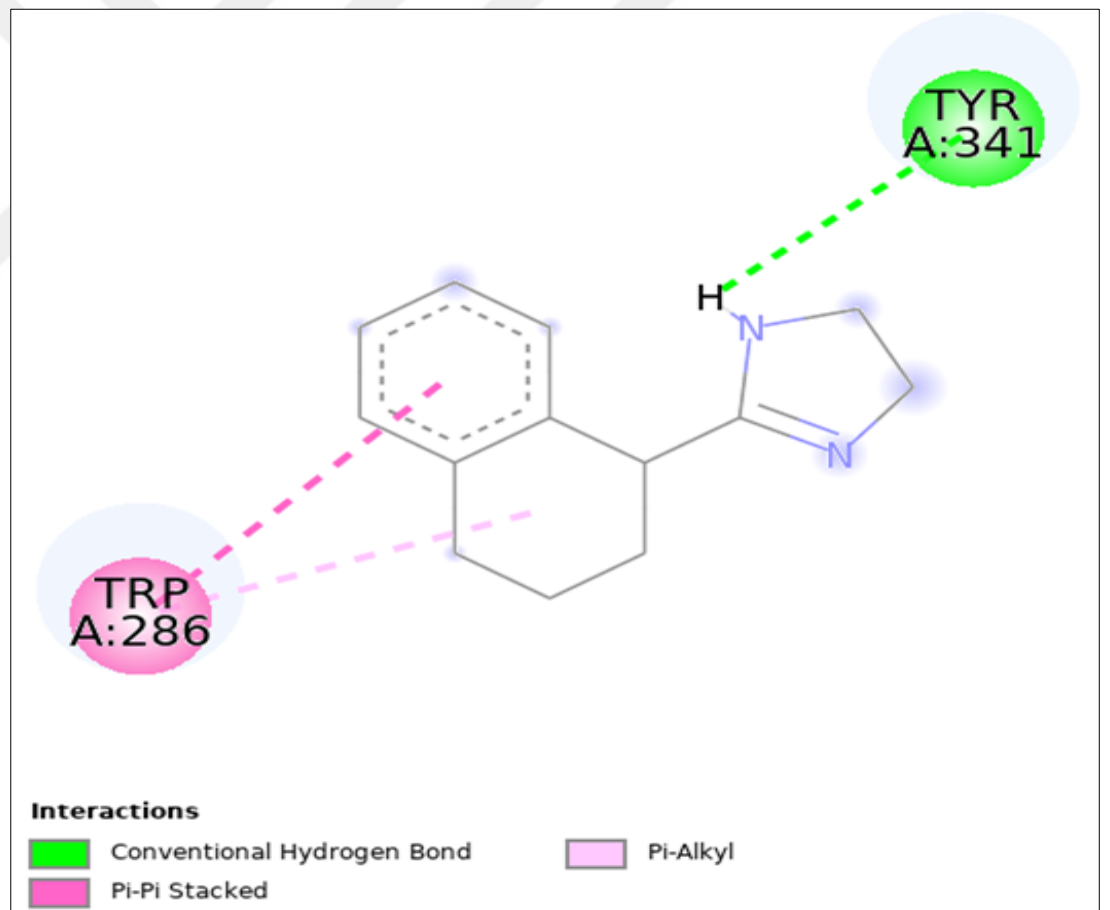
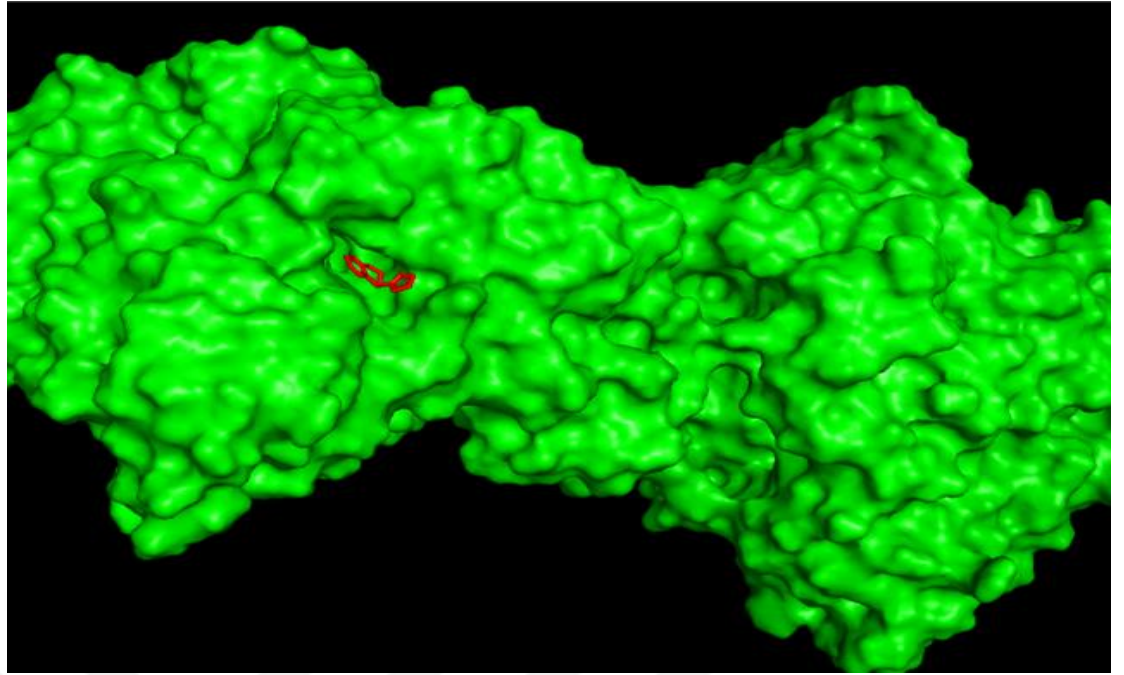
Şekil 4.16. Brimonidin BChE docking pozları.



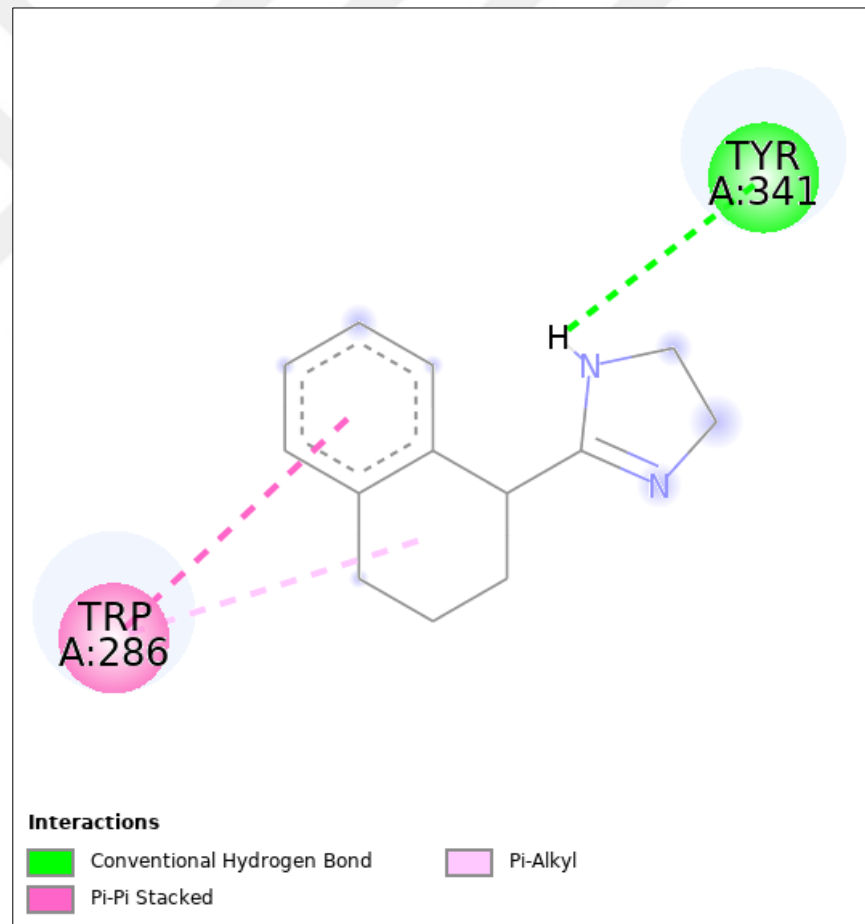
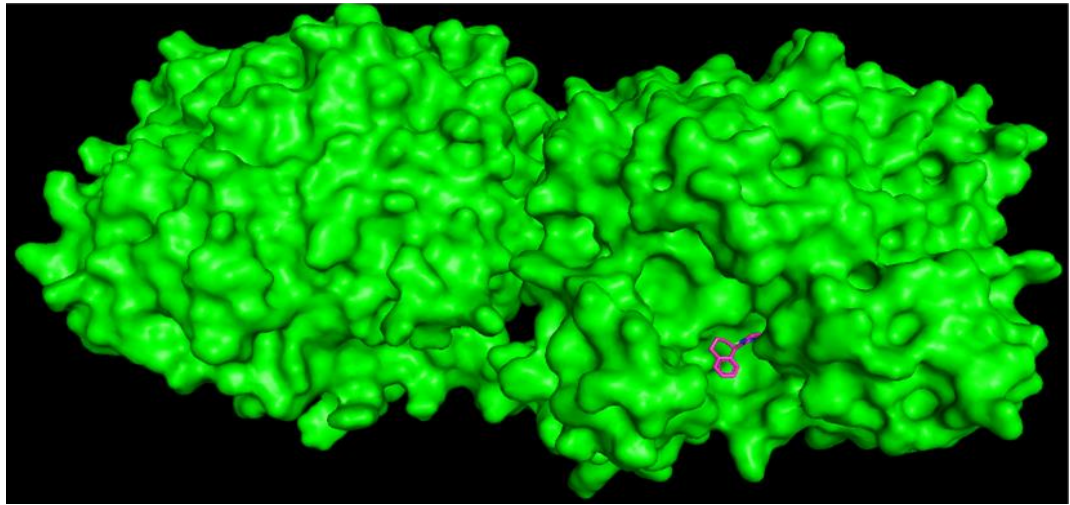
Şekil 4.17. Bimatoprost AChE docking pozları.



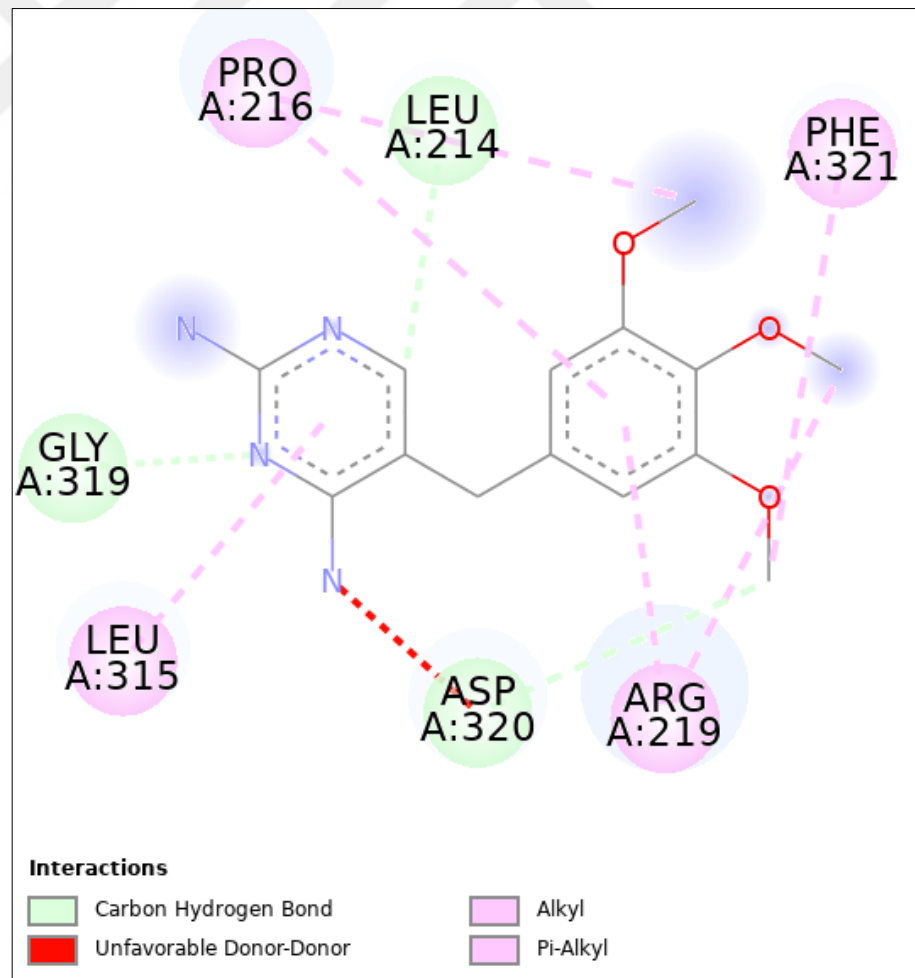
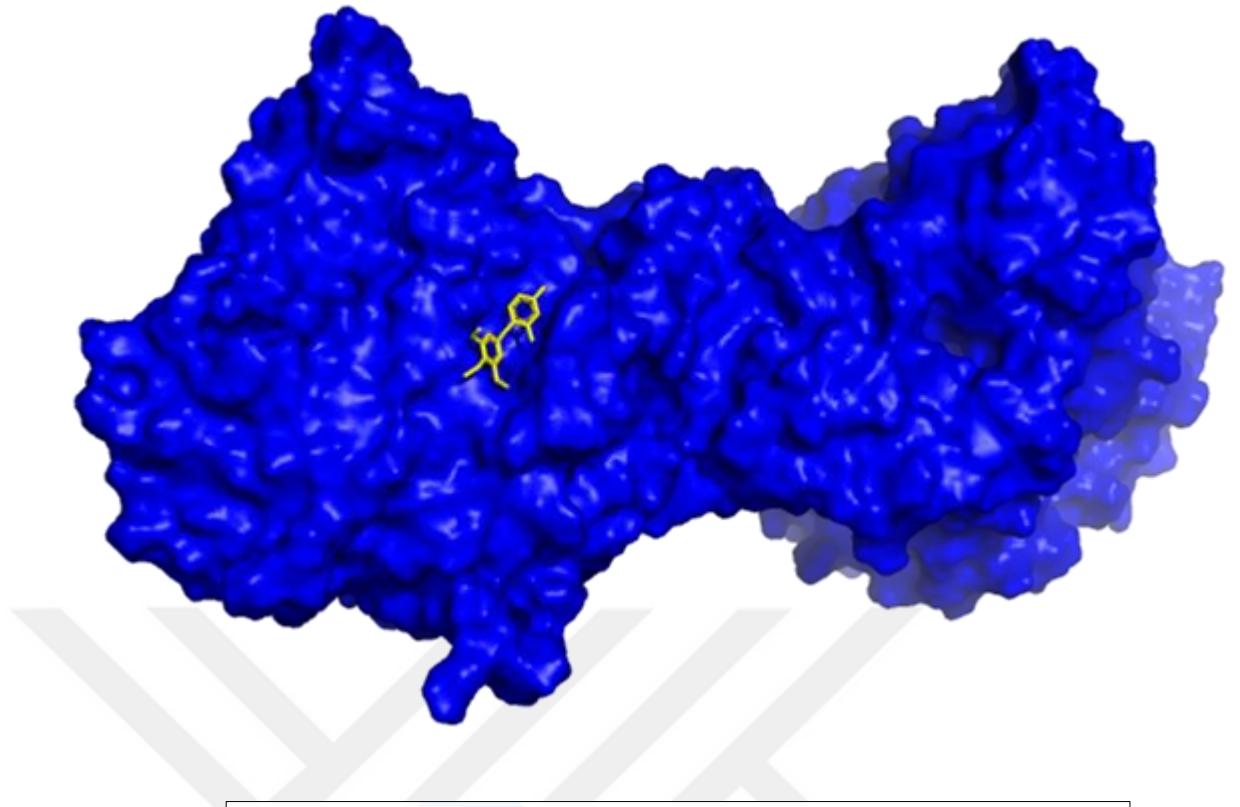
Şekil 4.18. Bimatoprost BChE docking pozları.



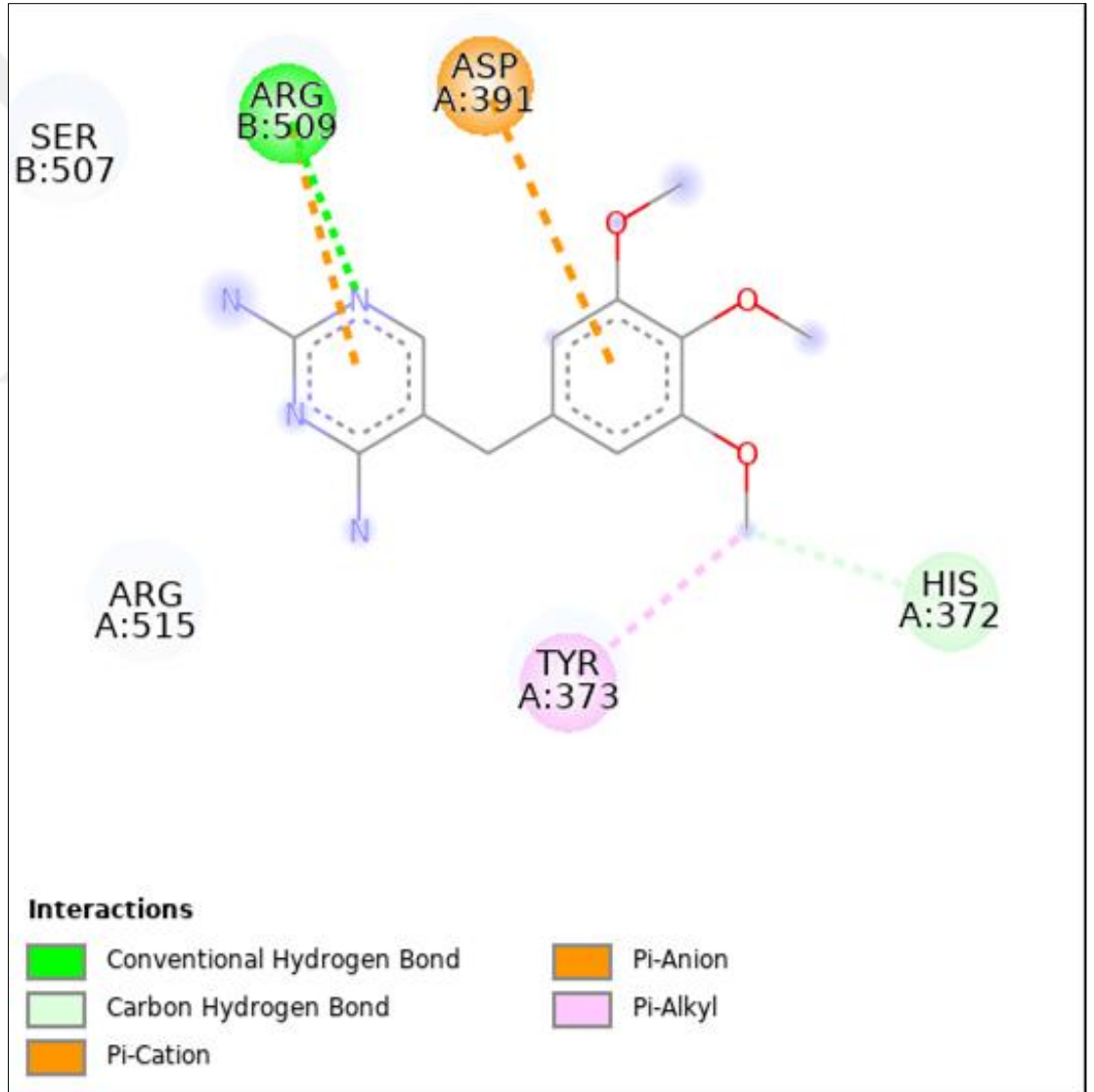
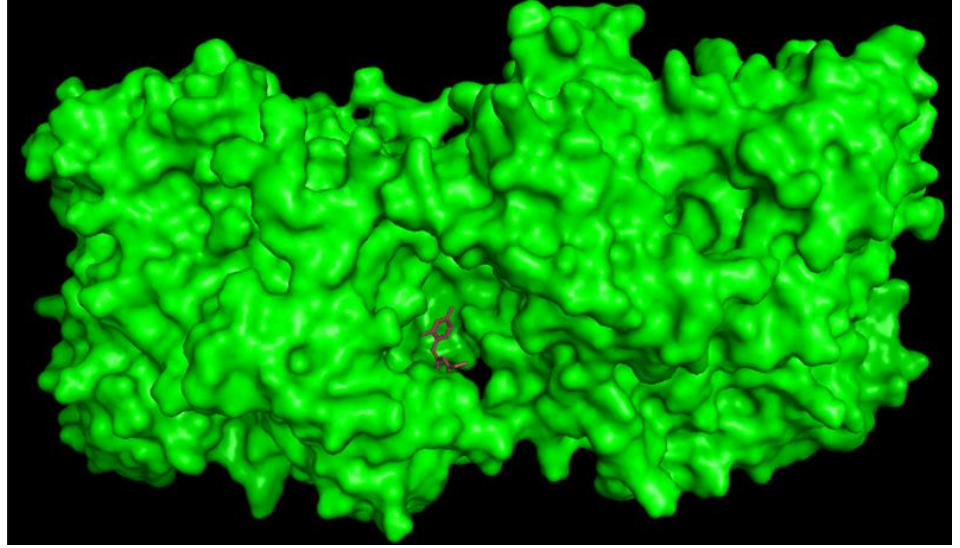
Şekil 4.19. Tetrahidrozolin AChE docking pozları.



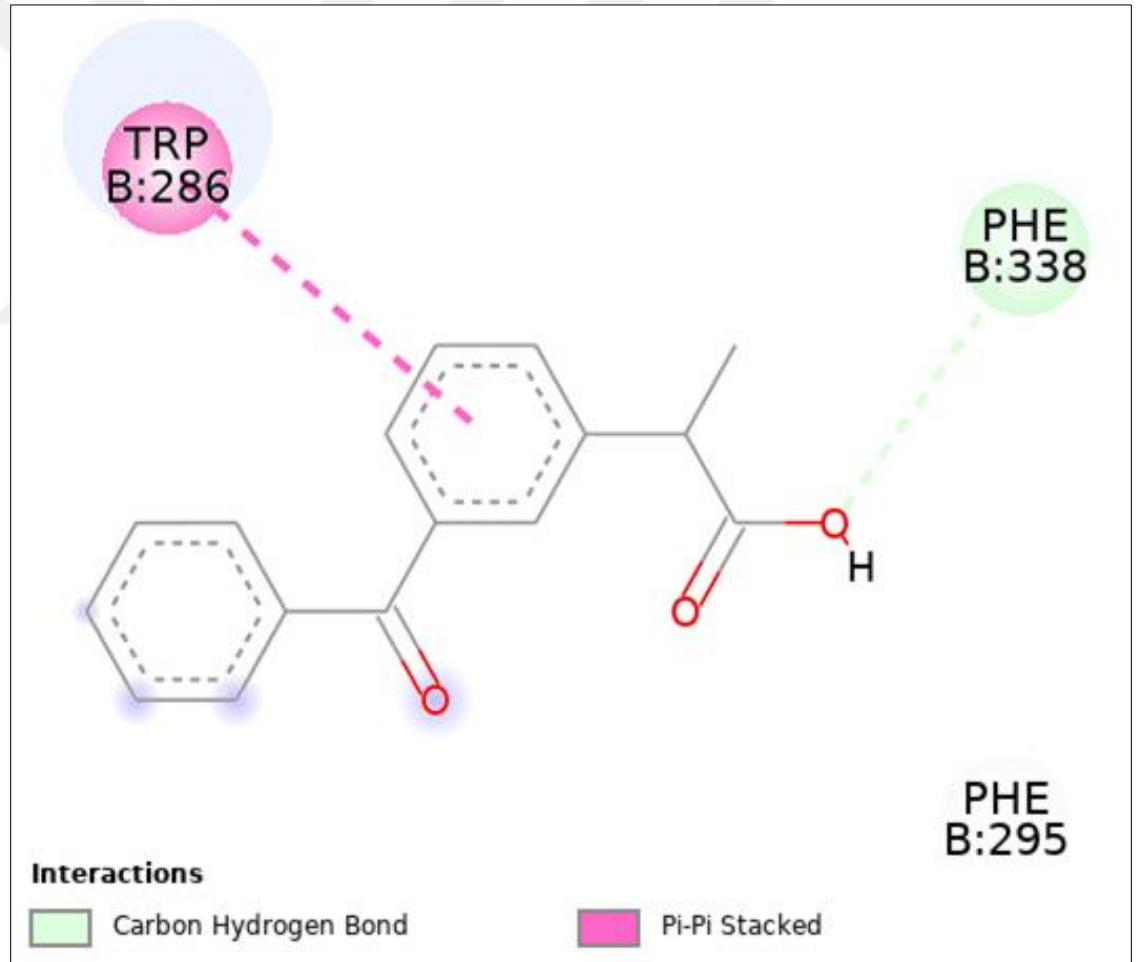
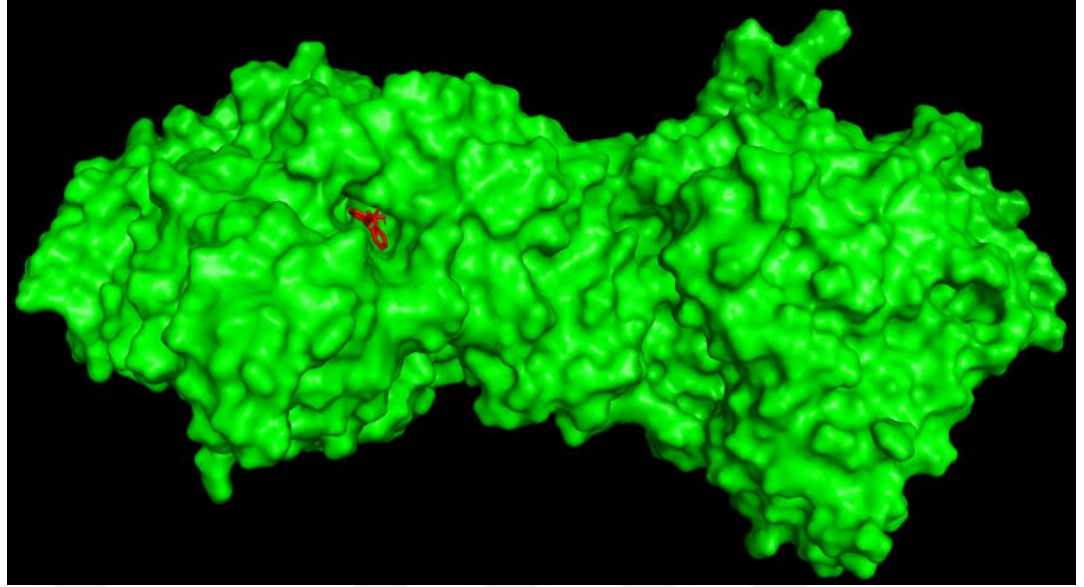
Şekil 4.20. Tetrahidrozolin BChE docking pozları.



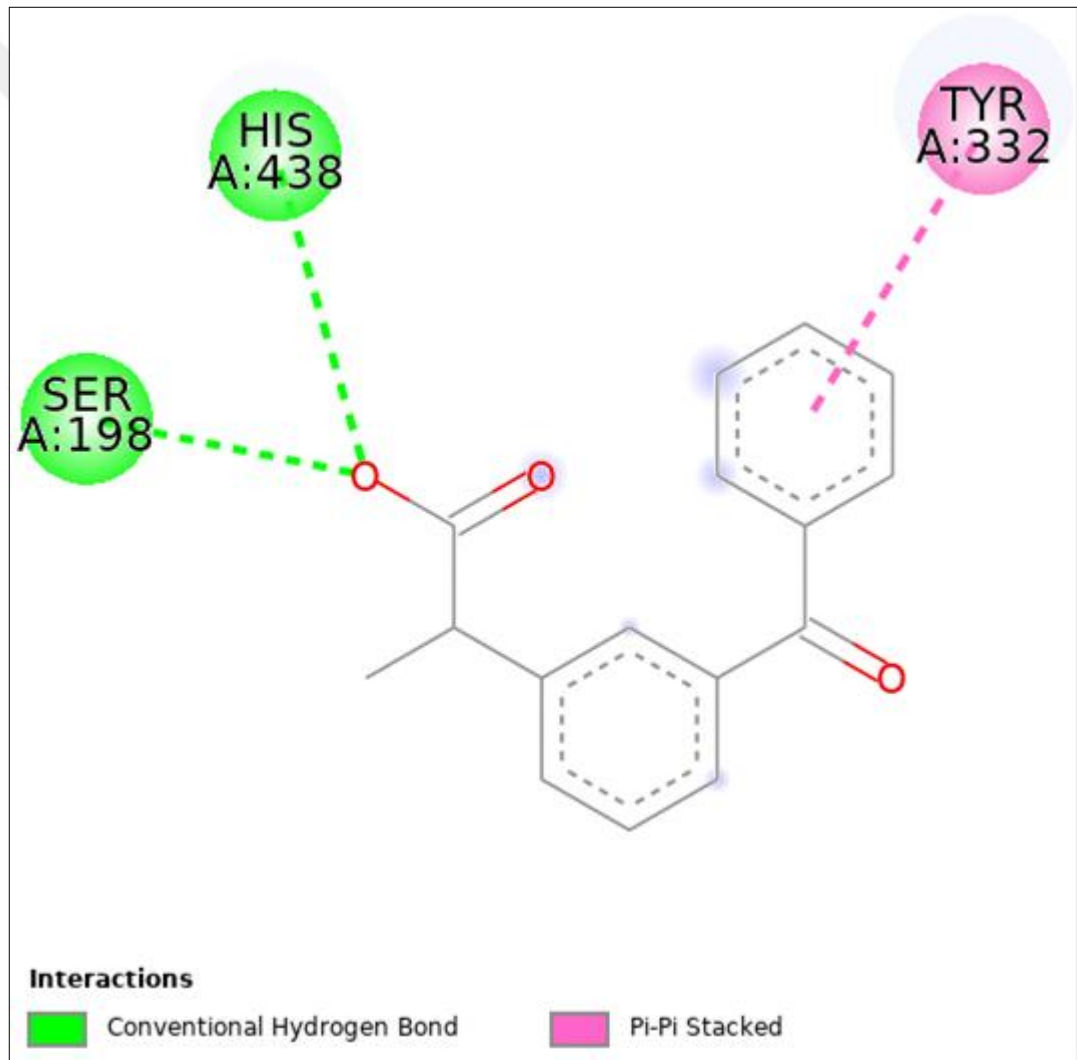
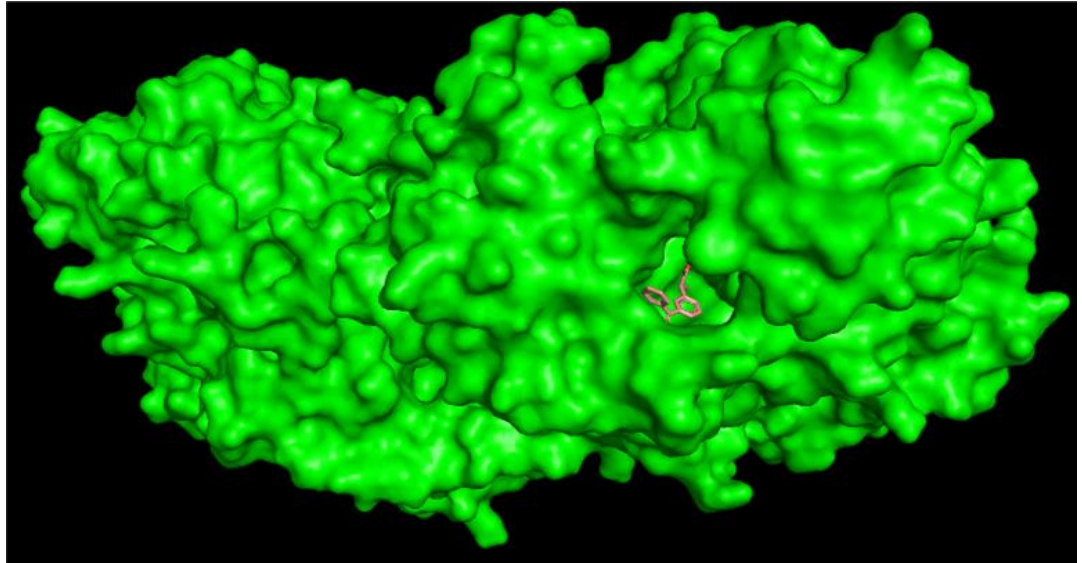
Şekil 4.21. Trimetoprim AChE docking pozları.



Şekil 4.22. Trimetoprim BChE docking pozları.



Şekil 4.23. Deksetoprofen AChE docking pozları.



Şekil 4.24. Deksketoprofen BChE docking pozları.

Çizelge 4.2. Bazı ilaç etken maddelerinin AChE ve BChE enzimleri için belirlenen docking değerleri.

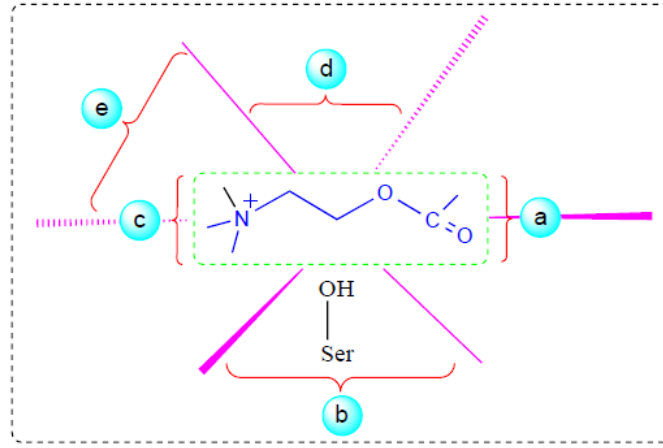
Moleküller	Afinite (kcal/mol)	
	AChE	BChE
Etofenamat	-6,2	-7,6
Brimonidin	-5,2	-6,7
Bimatoprost	-9	-7,8
Tetrahidrozin	-6,7	-6,7
Trimetoprim	-5,2	-5,2
Deksketoprofen	-8,2	-7,4

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, metabolizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve yüzde yüzlük bir ürün oluşumunu sağlayan, hiç bir yan ürün oluşumuna meydan vermeyen biyokatalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2008). Enzimatik reaksiyonlarda substratlar farklı moleküllere yani ürünlere dönüşürler. Canlı metabolizmadaki tepkimelerin neredeyse tamamının gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyar. Enzimler substratları için son derece seçici biyomoleküllerdir. Bu sebepten dolayı bir çok olası tepkimeden sadece birkaç tanesini hızlandırdıkları için bir hücrede bulunan enzim grupları o hücrede hangi metabolik yolların aktif olduğunu belirtir. Enzimler genellikle ileri ve geri tepkimeleri eşit olacak şekilde kataliz ederler. Dengeyi değil, ona ulaşma hızını değiştirirler (Keha ve Küfrevioğlu 2008; Senturk 2017).

Bunun yanında, genel olarak bahsedildiği gibi ACh gibi nörotransmitter madde miktarındaki azalma yada artmalar farklı hastalıkların görülmesine sebep olmaktadır. Örneğin ACh'nin çok fazla hidrolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı oluşmakta ve bu hastalığın tedavisi için AChE enziminin dönüşümlü inhibitörleri araştırılmakta ve yeni moleküller farklı gruplar tarafından denenmektedir (Arslan et al., 2020).

Enzim α heliks ve β tabakalarından oluşur. Sarı renk ile gösterilmiş 14 aromatik rezidü aktif bölgenin çevresinde sıralanmışlardır. Aktif bölgede bulunan Serin, Glutamat ve Histidin amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda AChE inhibisyonu, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin normal nörotransmisyonu ile etki edebilen kimyasalların nörotoksik etkilerini belirlemede kullanılır. Organofosfatların, karbamat pestisitlerin (Duysen et al. 2012), enantiyomerik inhibitörlerin (Lin et al. 1998), metallerin ve çeşitli kimyasalların AChE aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Bocquene et al. 1995; Zilbeyazet al. 2018; Cavdar et al. 2019). Ayrıca AChE'nin alifatik bileşikler ile özellikle de aromatik bileşikler tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Lin et al. 1998). Yapılan diğer bir çalışmada ise Pasifik Torpedo californica elektrik organının AChE enziminin X-ışınları ile yapılan analizi sonucu enzimin beş önemli bağlama sitesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1.Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme.

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

- a. Öncelikle bir oksianyon bölgesi tetrahedral ara ürünü stabilize eder.
- b. Daha sonra aktif bölgeyi oluşturan bir esteratik site esteratik karbonil grubuna (C-O) saldırır.
- c. Az sayıda negatif yük ve çok sayıda aromatik rezidü içeren bir anyonik substrat bağlama bölgesinde ACh'nin kuarternar anyonyum kutbunu içermektedir. Bu grup aromatik grupların elektronları tarafından farklı aktif bölge ligantları ile tercihlili etkileşim içerisinde olur.
- d. Esteratik ve anyonik bir bölgeye bitişik olan ve aynı zamanda aktif bölge-selektif aromatik bağlanma bölgesi olan bu kısım aril substratları ve aktif bölge ligantlarını bağlamada oldukça önemlidir.
- e. Son olarak periferik bir anyonik bağlama bölgesi hidrofobik bölgeye bağlanır ve aktif bölgeden grupların ayrılmasını sağlar.

Bütün yapılan bu çalışmalar açık bir şekilde mekanizma temelli inhibitörlerin dizayn ve araştırılmasına ve ayrıca AChE enziminin de etki mekanizmaları ile ilgili araştırmaları göstermektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için farklı yapılara

sahip AChE inhibitörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış AChE enzimi Şekil 5.2’de görülmektedir. Bu inhibitörler de metabolizmaya, etki mekanizmasına ve beyin selektivitesine göre değişmektedir.

AChE enzimi baskılandığında, sinir sisteminde ACh birikmeye başlar ve merkezi sinir sisteminde yüksek miktardaki ACh, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açar (Chang and Strichartz 2005).

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

Organofosforlu pestisidler de asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer alırlar. Enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Bunun sonucu olarak kolinerjik sinir kavşaklarında ACh miktarının artması, düz kaslarda kasılmaya ve salgı bezlerinde salgı yapımına neden olur (Nath and Kumar 1999). Ayrıca akuatik kirlenmede AChE aktivitesi biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Dembele *et al.* 2000).

Bu çalışmamızda farklı pestisit molekülleri ile AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon etkisi değerlendirildi. Ellman metoduna göre inhibisyon türü, IC₅₀ değerleri belirlendi (Ellman 1961). Çalışmada kullanılan kimyasalların hem AChE hem de BChE enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlendi. Bu amaçla kullanılan pestisitlerin için AChE ve BChE enzimleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 8,66-13.20 µM ve 9,33-11,70 µM aralığında olduğu belirlendi. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun ikinci basamağında ilave edilen 5,5’-ditiyo-bis(2-nitro-benzoik) asit (DTNB) ile hidrolisi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanil)benzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir (Ellman *et al.* 1961).

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

- Hali hazırda ilaç olarak kullanılan maddelerin son yıllarda farklı hastalıklar içinde kullanımının incelenmesinin ana nedeni üretiminin sanayi ölçeğinde yapılan bir ürünün sadece dozaj ayarlamasının yapılarak başka bir hastalık içinde kullanılabilmesinin büyük bir avantaj sağlamasıdır.
- Bu çalışmamızda tıbbi amaçlı kullanılan bazı ilaçların hemAChE hem de BChE enzimleri için etkili inhibitörler olup olmadıklarını belirlemektir.
- Bu araştırma sonucunda AChEüzerinde sırası ile en etkili ilaç etken maddesinden en düşüğüne doğru Bimatoprost > Brimonidin > Trimetoprim > Tetrahidrozolin > Etofenamat > Deksketoprofen şeklinde iken BChE enzimi için Bimatoprost > Trimetoprim > Tetrahidrozolin > Brimonidin > Etofenamat > Deksketoprofen şeklinde olduğu görüldü.
- Docking verilerine göre AChE enziminin afinite değerleri -5,2 ile -9 kcal/mol, BChE enzimi için ise 5,2 ile 7,8 kcal/mol aralığında olduğu hesaplandı.
- Elde ettiğimiz sonuçlara göre AChE enzimi için en etkili olan IC₅₀ değeri 0,57 µM olan bimatoprost iken, BChE enzimi için IC₅₀ değeri 0,18 µM olan bimatoprost ve 0,90 µM olan trimetoprim olduğunu belirledik.

KAYNAKLAR

- Anonim1:[https://www.drugs.com/drug-class/cholinesterase-inhibitors.html#:~:text=Cholinesterase%20inhibitors%20\(also%20called%20acetylcholinesterase,and%20the%20central%20nervous%20system](https://www.drugs.com/drug-class/cholinesterase-inhibitors.html#:~:text=Cholinesterase%20inhibitors%20(also%20called%20acetylcholinesterase,and%20the%20central%20nervous%20system). (14.02.2021)
- Ariel, N., Ordentlich A., Barak D., Bino T., Velan B., Shafferman A. (1995). The Aromatic Patch of Three Proximal Residues in the Human Acetylcholinesterase Active Centre Allows for Versatile Interaction Modes with Inhibitors. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.
- Arslan, T., Ceylan, M. B., Baş, H., Biyiklioglu, Z., Senturk, M. 2020. Design, Synthesis, Characterization of Novel Peripherally Tetra 1,2,3-Triazole Substituted Phthalocyanines and Inhibitor Effect on Cholinesterases (AChE/BChE) and Carbonic Anhydrases (hCA I, II and IX). *Dalton Transactions*. 2020, 49, 203-209.
- Augustinsson, K.B. (1971) Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bull World Health Organ*, 44 (1-3), 81-89.
- Blong, R., Bedows, E., Lockridge, O. (1997) Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J*, 327, 747-757.
- Bocquene G., Bellanger C., Cadiou Y., Galgani F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- Bourne, Y., Radic, Z., Taylor, P., Marchot, P. (2010) Conformational remodeling of femtomolar inhibitor-acetylcholinesterase complexes in the crystalline state. *J Am Chem Soc*, 132 (51), 18292-18300.
- Bourne, Y., Taylor, P., Bougis, P.E., Marchot, P. (2011) Mouse Acetylcholinesterase Catalytic Domain, Glycosylated Protein. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001maa.
- Buckley, A.W., Sassower, K., Rodriguez, A.J., Jennison, K., Wingert, K., Buckley, J., Thurm, A., Sato, S., Swedo, S. (2011). An open label trial of Donepezil for enhancement of rapid eye movement sleep in young children with Autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21, 353-357.
- Cavdar, H., Senturk, M., Guney, M., Durdagi, S., Kayik, G., Supuran, C.T., Ekinici, D. 2019. Kinetic and In Silico Studies of Some Uracil Derivatives on

- Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34 (1) 429-437.
- Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (3), 625-634.
- Chang, M.S., Strichartz, G.R., 2005. Cholinergic pharmacology (Golan, D.E and Tashjian, A.H. editörler). *Principles of Pharmacology*, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.
- Choi, KH; Wykes, T; Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. *The British Journal of Psychiatry* 203,172-178.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 233-242.
- Colovic, MB., Krstic D.Z., Lazarevic P., Tamara D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3), 315–335.
- Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49-54.
- Durmaz, L. 2015. Bazı Kumarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duysen, E.G., Cashman, J.R., Schopfer, L.M., Nachon, F., Masson, P., Lockridge, O. (2012) Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chem Biol Interact*, 195 (3), 189-198.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., et al. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7,88-95.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.

- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264 (3), 672-686.
- Harel, M., Schalk I., Ehret, L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen PH., Silman I. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (19), 9031-5.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J.; Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism: neuropsychological measures. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 21, 43-50.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., (2008) *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Sirkeci/İstanbul*.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 780-791.
- Küçükılınç, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. *Turk J Biochem*, 39, 126-131.
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. *Renkli Biyokimya Atlası*, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper., Nobel.
- Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T., Nemcsok, J., 1997. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by mediation and paraquat in alimentary canal of common carp. *Genetic Pharmacology*, 55-59.
- Lehninger Biyokimyanın İlkeleri David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Y. Murat Elçin) Palme yayıncılık, Ankara 2013.
- Lin G., Tsai Y. C., Liu H. C., Liao W. C., Chang C. H. (1998). Enantiomeric inhibitors of cholesterol esterase and acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1388, 161-174.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J Neurochem*, 39 (1), 106-110.

- Lockridge, O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9 (4), 125-128.
- Lockridge, O. (1990) Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther*, 47 (1), 35-60.
- Malfitano, A.M., Marasco, G., Proto, M.C., Laezza, C., Gazzerro, P., Bifulco, M. (2014) Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacological Research*, 88 (0), 74-83.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31-91.
- Massoulié, J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
- Massoulie, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D., Bon, S. (2008) Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175 (1-3), 30-44.
- Masson, P., Lockridge, O. (2010) Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, 494 (2), 107-120.
- Masson, P., Froment, M.T., Sorenson, R.C., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1994) Mutation His322 Asn in human acetylcholinesterase does not alter electrophoretic and catalytic properties of the erythrocyte enzyme. *Blood*, 83 (10), 3003-3005.
- Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S., Lockridge, O. (2007) A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin Chim Acta*, 378 (1-2), 128-135.
- McHardy SF, Wang HL, McCowen SV, Valdez MC. Recent developments in Acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update in the patent literature (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2017; 27 (4): 455-476.
- Nath, B.S., Kumar, P.S., 1999. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157-162.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Ordentlich, A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A. (1993). Dissection of the human

- acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Ozil, M., Balaydin, H.T., Senturk, M. 2019. Synthesis of 5-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*. 86, 705-713.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. ve ark. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 273-277.
- Pohanka (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc*, 155 (3), 219-229.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.
- Rajesh, R.V., Chitra, L., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009a) The aryl acylamidase activity is much more sensitive to Alzheimer drugs than the esterase activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic brain. *Biochimie*, 91 (9), 1087-1094.
- Rajesh, R.V., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009b) High aryl acylamidase activity associated with cobra venom acetylcholinesterase: biological significance. *Biochimie*, 91 (11-12), 1450-1456.
- Ribeiz, S.R., Bassitt, D.P., Arrais, J.A., Avila, R., Steffens, D.C., Bottino, C.M. (2010). Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.
- Sanner, M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 17(1), 57-61.
- Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B.P. (1997) Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (48), 14642-14651.
- Senturk, M., *Enzyme Inhibitors and Activators*, 2017. Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1.

- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
- Sussman, J.L., Harel M., Frolova F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Taylor, D., Paton C., Shitij K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155-170.
- Tripathi, A. (2008). Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 15 (4).
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 649-652.
- Whittaker, V. (1990). The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8-13.
- Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A., Senturk, M. 2018. Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32:e22210.