



**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN
Ricania simulans'DAN ASETİLKOLİNESTERAZIN
SAFLAŞTIRILMASI VE İNHİBİSYONU**

(Doktora Tezi)

Demet KIZIL

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER**

RİZE

2022

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER danışmanlığında, Demet KIZIL tarafından hazırlanan *Doğu Karadeniz Bölgesinde Yayılış Gösteren Ricania Simulans'dan Asetilkolinesterazın Saflaştırılması ve İnhibisyonu* adlı bu tez çalışması, 22.06.2022 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Üye : Prof. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

Üye : Doç. Dr. Özlem FAİZ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER

ETİK BEYAN

Kimya Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Doğu Karadeniz Bölgesinde Yayılış Gösteren *Ricania simulans*’dan Asetilkolinesterazın Saflaştırılması ve İnhibisyonu” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve/veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

22/06/2022

Demet KIZIL

ÖN SÖZ

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'nin en önemli tarımsal ürünleri olan çay, fındık, kivi başta olmak üzere tüm tarım ürünlerinde büyük kayıplara neden olan ve popülasyonu gittikçe artan *R. simulans* zararlısından asetilkolinesteraz saflaştırılarak, yeni sentezlenmiş kimyasallar ve bazı bitki ekstraktlarıyla hedef enzim inhibisyonu üzerinden mücadele amaçlanmıştır.

Doktora tezim süresince bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşarak hoşgörü ve sabırla bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmanın başından sonuna kadar her aşamasında emeği geçen, değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER'e sonsuz teşekkür ederim.

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Kerim SERBEST'e tezimde kullanmış olduğum kimyasalların sentezi ve temininden dolayı, Sayın Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ ve Sayın Doç. Dr. Özlem FAİZ'e tez sürem boyunca yapmış oldukları yönlendirme ve bilgilendirmeden dolayı, Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Temel GÖKTÜRK'e, çalışmamda kullandığım böceklerin tanımlanması ve toplanmasındaki katkılarından dolayı, ayrıca Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimine maddi desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşamın her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan sevgili annem Sabiha TÜRKER, babam Selahattin TÜRKER, ablam Derya KANTARCI'ya, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Şenol KIZIL'a ve doktora sürecimle birlikte büyüyen, beni her zaman sabır ve özlemle bekleyen canım çocuklarım Su Ada KIZIL ve Ata Türker KIZIL'a ayrıca teşekkür ederim.

“Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: 1184” (“This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University. Project Number: 1184”)

Demet KIZIL

Rize/2022

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Literatür Özeti	2
1.2. Asetilkolin.....	9
1.3. Asetilkolin Metabolizması	10
1.4. Kolinesterazlar	13
1.5. Asetilkolinesteraz.....	13
1.5.1. Asetilkolinesterazın Görevi ve Önemi	15
1.5.2. Asetilkolinesterazın Yapısı ve Aktif Merkezi.....	16
1.5.2.1. Katalitik Aktif Bölge (CAS).....	19
1.5.2.2. Periferik Aromatik Bölge (PAS)	19
1.5.2.3. Oksianyon Boşluğu.....	20
1.5.2.4. Açıl ve Kolin Bağlama Bölgesi	20
1.5.2.5. Ω -döngüsü (Omega Döngüsü).....	20
1.5.3. Asetilkolinesterazın İnhibitörleri	21
1.6. <i>Ricania simulans</i>	32
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	35
2.1. Materyal	35
2.2. Yöntem.....	35
2.2.1. Kullanılan Cihazlar	35

2.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.2.3. Kullanılan Çözeltiler	36
2.2.3.1. Tampon Çözeltiler	36
2.2.3.2. Substrat Çözeltileri	37
2.2.3.3. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	37
2.2.3.4. Sodyum Dodesil Sülfat Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	38
2.2.3.5. Diyaliz Membranlarını Aktifleştirme Çözeltileri	39
2.2.3.6. İnhibitör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	39
2.3. Deneysel Çalışmalar.....	40
2.3.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması	40
2.3.2. Edrofonyum-Sefaroz 6B Afinite Kolonun Hazırlanması.....	40
2.3.3. Enzim Örneklerinin Kolona Uygulanması.....	40
2.3.4. Protein Tayini.....	41
2.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	41
2.3.6. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Tayini.....	42
2.3.7. pH'ın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi ...	43
2.3.8. Sıcaklığın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	43
2.3.9. ACHE İnhibisyonu.....	44
2.3.10. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması.....	44
2.3.11. Silika Jel Kolonunun Hazırlanması ve Zeytin Yapağı Ekstrağının Kolona Uygulanması.....	45
2.3.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC) Oleuropein Analizi	45
2.4. Bulgular.....	46
2.4.1. <i>Ricania simulans</i> Ergin ve Nimflerinden ACHE'nin Saflaştırılmasına Ait Bulgular.....	46
2.4.2. <i>Ricania simulans</i> Ergin ve Nimf ACHE'lerine Ait Kinetik Veriler	50
2.4.3. İnhibisyon Çalışmalarına Ait Bulgular	55
2.4.3.1. Bazı Kimyasalların ACHE'nin İnhibisyonuna Ait Bulgular ...	55

2.4.3.2. Bazı Bitki Ekstraktlarıyla ACHE'nin İnhibisyonuna Ait	
Bulgular	63
2.4.3.3. Bitki Ekstraktlarının HPLC Analiz Bulguları	68
3. SONUÇLAR	83
3.1. Tartışma ve Sonuçlar.....	83
3.2. Öneriler.....	91
KAYNAKÇA.....	92



Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Kimya

Tez Türü : Doktora Tezi

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER

Hazırlayan : Demet KIZIL

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 105

ÖZET

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *Ricania simulans*'DAN ASETİLKOLİNESTERAZIN SAFLAŞTIRILMASI VE İNHİBİSYONU

Bu çalışmada, *Ricania simulans*'ın (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) nimf ve erginlerinden asetilkolinesterazın saflaştırılması ve enzim inhibisyonu üzerinden bu zararlıyla mücadele amaçlanmıştır.

Asetilkolinesterazlar, Edrofonyum-Sepharose 6B afinite kolonuyla *Ricania simulans*'ın ergin ve nimflerinden, tek aşamada saflaştırılmıştır. Saflaştırılan asetilkolinesterazların, asetiltiyokolinyodat substratı varlığında bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Enzimler, 40,0 °C'de ve pH 8,0'de en yüksek asetilkolinesteraz aktivitesi göstermiştir. *Ricania simulans* asetilkolinesterazlarının K_m , V_{maks} ve k_{cat} değerleri sırasıyla erginler için 0,04±0,01 mM, 2.000,0±250 EU/mg protein ve 104,5±13 dk⁻¹, nimfler için 0,02±0,01 mM, 500,0±52 EU/mg protein ve 30,3±6,4 dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Asetilkolinesterazın bilinen inhibitörleri takrin ve edrofonyum klorür ile yapılan çalışmalarda erginler için sırasıyla IC₅₀ değerleri 18,0±0,3 ve 1,2±0,4 µM, nimfler için 2,4±0,3 ve 0,6±0,09 µM olarak belirlenmiştir. Yeni sentezlenmiş bileşiklerle yapılan inhibisyon çalışmalarında, *Ricania simulans* asetilkolinesterazın erginlerinde en etkili olan [Zn(HL)(bipy)(OClO₃)] bileşiğinin IC₅₀ değeri 3,2±0,8 µM; nimfler için en etkili olan [Ni(HL)(bipy)(OClO₃)] bileşiğinin IC₅₀ değeri 4,6±0,8 µM olarak tespit edilmiştir. Doğal bitki ekstraktlarıyla yapılan inhibisyon çalışmalarında, bu asetilkolinesterazlarda en etkili olan zeytin yaprağı su ekstreğinin erginler ve nimfler için sırasıyla IC₅₀ değerleri 20,3±1,2 ve 16,2±0,8 µg kuru madde/mL olarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının düşük konsantrasyonlarda etki göstermesi ve suyla ekstrakte edilmiş olmaları, bu tezde ön plana çıkan sonucu oluşturmaktadır. Bu çevre dostu ekstraktlarla kimyasal ilaçlara gereksinim duyulmadan, bu ve benzer zararlılarla hem nimf hem de ergin aşamasında mücadele edilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Ricania simulans*, ACHE, Saflaştırma, ACHE İnhibisyon, IC₅₀

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Chemistry

Thesis Type : Ph.D. Thesis

Supervisor : Dr. Öğr. Üyesi Barbaros DİNÇER

Author : Demet KIZIL

Year : 2022

Pages : 105

ABSTRACT

PURIFICATION AND INHIBITION OF THE ACETYLCHOLINESTERASE FROM *Ricania simulans* SPREADING IN THE EASTERN BLACK SEA REGION

In this study, it was aimed to be purified the acetylcholinesterases from the nymphs and adults of *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae) and to struggle this pest through the enzyme inhibition.

The acetylcholinesterases were purified in a one-step from the adults and nymphs of *Ricania simulans* by Edrophonium-Sepharose 6B affinity column. Some kinetic properties of the purified acetylcholinesterases were investigated in the presence of acetylthiocholiniodate substrate. The enzymes showed the highest acetylcholinesterase activity at 40.0 °C and pH 8.0. The K_m , V_{max} and k_{cat} values of *Ricania simulans* acetylcholinesterases were calculated as 0.04 ± 0.01 mM, $2.000.0 \pm 250$ EU/mg protein and 104.5 ± 13 min⁻¹ for adults, 0.02 ± 0.01 mM, 500.0 ± 52 EU/mg protein and 30.3 ± 6.4 min⁻¹ for nymphs, respectively. In the studies with tacrine and edrophonium chloride, known inhibitors of acetylcholinesterase, IC₅₀ values were determined as 18.0 ± 0.3 and 1.2 ± 0.4 µM for adults, 2.4 ± 0.3 and 0.6 ± 0.09 µM for nymphs, respectively. In the inhibition studies with newly having been synthesized compounds, it was determined that the IC₅₀ value of the compound [Zn(HL)(bipy)(OCIO₃)], which is the most effective in adults of *Ricania simulans* acetylcholinesterase, was 3.2 ± 0.8 µM, and the IC₅₀ value of [Ni(HL)(bipy)(OCIO₃)] compound, which is the most effective for nymphs, was 4.6 ± 0.8 µM. In the inhibition studies with the natural plant extracts, the IC₅₀ values of the olive leaf water extract, which was the most effective on these acetylcholinesterases, were determined as 20.3 ± 1.2 and 16.2 ± 0.8 µg dry matter/mL for adults and nymphs, respectively. The result that stands out in this thesis was that the plant extracts effected at low concentrations and they were extracted with water. Without the need for chemical pesticides, it may be struggled by these environmentally friendly extracts with these and similar pests, in either the nymph or adult stages.

Keywords: *Ricania simulans*, ACHE, Purification, ACHE Inhibition, IC₅₀

KISALTMALAR

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrad derece
Å	:	Angström
ACH	:	Asetilkolin
ACHE	:	Asetilkolinesteraz
ACHEI	:	Asetilkolinesteraz İnhibitör
ACHR	:	Asetilkolin Reseptör
AH	:	Alzheimer hastalığı
ATC	:	Asetiltiyokolin
BCHE	:	Bütilkolinesteraz
BSA	:	Sığır Serum Albümin
CAS	:	Katalitik Aktif Bölge
ChAT	:	Kolin Asetiltransferaz
CHE	:	Kolinesteraz
CoA	:	Koenzim A
DFP	:	Diizopropilflorofosfat
dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DTNB	:	5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
eeACHE	:	<i>Electric eel</i> Asetilkolinesteraz
EU	:	Enzim Ünitesi
g	:	Gram
huACHE	:	İnsan Asetilkolinesteraz
huBCHE	:	İnsan Bütilkolinesteraz
IC ₅₀	:	Enzim Aktivitesini Yarıya Düşüren İnhibitor Konsantrasyonu
kDa	:	Kilo Dalton
m	:	Metre
M	:	Molar

m-	:	Meta
mA	:	Molekül Ağırlığı
mACHR	:	Muskarinik Asetilkolin Reseptör
mAU*s	:	Pik Alanı
mg	:	Miligram
MG	:	Miyastenia Gravisin
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
nACHR	:	Nikotinik Asetilkolin Reseptör
nm	:	Nanometre
nM	:	Nanomolar
OE	:	Oleuropein
OHA	:	Oksianyon Boşluğu
OML	:	Ω -döngüsü
OP	:	Organofosfatlı pestisitler
p-	:	Para
PAS	:	Periferal Aromatik/Anyonik Bölge
<i>Pp</i>	:	<i>Pardosa pseudoannulata</i>
<i>R. simulans</i>	:	<i>Ricania simulans</i>
s	:	Saniye
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>Tc</i>	:	<i>Torpedo californica</i>
β	:	Beta
γ	:	Gama
μ L	:	Mikrolitre
μ M	:	Mikromolar
μ mol	:	Mikromol

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazların adları, markaları ve modelleri	35
Tablo 2. SDS-PAGE’de kullanılan yığma ve ayırma jellerinin bileşenleri ve oranları	42
Tablo 3. Oleuropein için HPLC yöntem koşulları	46
Tablo 4. <i>Ricania simulans</i> ekstratlarından ACHE'nin afinite kromatografisiyle saflaştırılmasının özeti	49
Tablo 5. <i>Ricania simulans</i> ACHE 'lerinin ATC varlığında kinetik parametreleri.....	52
Tablo 6. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşik listesi.....	55
Tablo 7. Takrin ve edrofonyum klorür varlığında elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	56
Tablo 8. <i>Ricania simulans</i> ACHE’leri için bazı kompleksler varlığında elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	58
Tablo 9. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bitki ekstratlarının listesi	63
Tablo 10. <i>Ricania simulans</i> ACHE’lerinin bitki ekstraktlarının varlığında IC ₅₀ değerleri	64
Tablo 11. Bitki ekstraktlarının ve zeytin yaprağı fraksiyonlarının alıkonma zamanları	69
Tablo 12. Bitki ekstraktlarının IC ₅₀ değerleri ve OE miktarları	81
Tablo 13. Zeytin yaprağı fraksiyonlarının IC ₅₀ değerleri ve OE miktarları	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Asetilkolin sentezi	9
Şekil 2. ACHE'nin açılasyon ve deaçilasyon prosesleri ile katalitik reaksiyonu	10
Şekil 3. ACH'nin ACHE tarafından hidroliz mekanizması.....	12
Şekil 4. ACHE gen şeması.....	14
Şekil 5. <i>Torpedo californica</i> ACHE'nin literatürdeki üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 6. Asetilkolinesteraz mekanizması	16
Şekil 7. TcACHE'nin aktif bölge geçidinin şematik görünümü.....	17
Şekil 8. ACHE'nin temsili yapısı ve fonksiyonel bölgeleri.....	18
Şekil 9. ACH hidrolizinin parçalanma ürünlerinin çıkarılmasında yer alan üç olası ACHE bölgeleri	21
Şekil 10. Nöronların diğer nöronlara, kas veya salgı bezleri gibi nöron olmayan hücrelere mesaj iletimine olanak tanıyan özelleşmiş bağlantı noktaları olan sinapsların gösterimi	22
Şekil 11. Organofosfatlı pestisitlerin genel yapısı	23
Şekil 12. Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin saldırı mekanizmaları	25
Şekil 13. Karbamatların genel yapısı	25
Şekil 14. Fizostigminin genel yapısı.....	27
Şekil 15. Takrinin genel yapısı	27
Şekil 16. Takrinin seçili aminoasitlerle etkileşimi.....	28
Şekil 17. Donapezilin genel yapısı	28
Şekil 18. Rivastigminin genel yapısı	29
Şekil 19. Galantaminin genel yapısı	30
Şekil 20. Huperzin A'nın genel yapısı	30
Şekil 21. Edrofonyum klorürün genel yapısı	31
Şekil 22. Oleuropein genel yapısı	31
Şekil 23. <i>Ricania simulans</i> erginleri	33
Şekil 24. <i>Ricania simulans</i> nimfleri.....	34
Şekil 25. <i>Ricania simulans</i> yumurtaları	34
Şekil 26. Ellman metodunun reaksiyon mekanizması	43

Şekil 27. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonunda ergin <i>R. simulans</i> ' tan asetilkolinesterazın saflaştırılması	47
Şekil 28. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonunda nimf <i>R. simulans</i> 'tan asetilkolinesterazın saflaştırılması	47
Şekil 29. Protein tayini için çizilen standart çalışma grafiği	48
Şekil 30. Enzim örneklerinin sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (A; Moleküler ağırlık markörleri, B; ergin homojenatı, C; Erginlerin saflaştırma ACHE'si, D; nimf homojenatı, E; Nimfin saflaştırma ACHE'si)	49
Şekil 31. Enzimlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan Rf-molekül ağırlığı grafiği.....	50
Şekil 32. Substrat olarak ATC kullanılarak çizilen ergin <i>R. simulans</i> ACHE'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 33. Substrat olarak ATC kullanılarak çizilen nimf <i>R. simulans</i> ACHE'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 34. <i>Ricania simulans</i> 'ın erginlerinden saflaştırılan ACHE üzerinde pH'ın etkisi	52
Şekil 35. <i>Ricania simulans</i> 'ın nimflerinden saflaştırılan ACHE üzerinde pH'ın etkisi	53
Şekil 36. <i>Ricania simulans</i> 'ın erginlerinden saflaştırılan ACHE üzerinde sıcaklığın etkisi.....	54
Şekil 37. <i>Ricania simulans</i> 'ın nimflerinden saflaştırılan ACHE üzerinde sıcaklığın etkisi.....	54
Şekil 38. K komplekslerinin genel molekül yapısı	55
Şekil 39. Ergin ACHE'sinin takrin varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	56
Şekil 40. Nimf ACHE'sinin takrin varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	56
Şekil 41. Ergin ACHE'sinin edrofonyum varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	57
Şekil 42. Nimf ACHE'sinin edrofonyum varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	57

Şekil 43. Ergin ACHE'sinin K-1 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	58
Şekil 44. Ergin ACHE'sinin K-2 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	59
Şekil 45. Ergin ACHE'sinin K-3 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	59
Şekil 46. Ergin ACHE'sinin K-4 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	60
Şekil 47. Ergin ACHE'sinin K-5 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	60
Şekil 48. Nimf ACHE'sinin K-1 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	61
Şekil 49. Nimf ACHE'sinin K-2 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	61
Şekil 50. Nimf ACHE'sinin K-3 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	62
Şekil 51. Nimf ACHE'sinin K-4 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	62
Şekil 52. Nimf ACHE'sinin K-5 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği	63
Şekil 53. Ergin ACHE'sinin kuru zeytin yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	64
Şekil 54. Nimf ACHE'sinin kuru zeytin yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	65
Şekil 55. Ergin ACHE'sinin kuru ceviz yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	65
Şekil 56. Nimf ACHE'sinin kuru ceviz yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	66
Şekil 57. Ergin ACHE'sinin kuru ceviz yeşil kabuğu su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	66
Şekil 58. Nimf ACHE'sinin kuru ceviz yeşil kabuğu su ekstraktı varlığında elde edilen	

inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	67
Şekil 59. Ergin ACHE'sinin kuru çınar yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	67
Şekil 60. Nimf ACHE'sinin kuru çınar yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği.....	68
Şekil 61. Oleuropein standartının HPLC kromatogram görüntüsü.....	69
Şekil 62. Ham zeytin yaprağı su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü.....	70
Şekil 63. Ham ceviz yaprağı su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü	70
Şekil 64. Ham ceviz yeşil kabuğu su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü....	71
Şekil 65. Ham çınar yaprağı su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü	71
Şekil 66. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 1. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	72
Şekil 67. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 2. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	72
Şekil 68. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 3. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	73
Şekil 69. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 4. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	73
Şekil 70. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 5. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	74
Şekil 71. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 6. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	74
Şekil 72. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 7. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	75
Şekil 73. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 8. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	75
Şekil 74. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 9. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	76
Şekil 75. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 1. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	76
Şekil 76. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 2. fraksiyonun	

HPLC kromatogram görüntüsü.....	77
Şekil 77. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 3. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	77
Şekil 78. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 4. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	78
Şekil 79. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 5. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	78
Şekil 80. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 6. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	79
Şekil 81. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 7. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	79
Şekil 82. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 8. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	80
Şekil 83. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 9. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.....	80

GİRİŞ

Doğu Karadeniz Bölgesi çay, fındık ve kivi üretimi bakımından Türkiye'nin en önemli bölgelerinden birisidir. Karadeniz Bölgesi kivi üretiminin en önemli merkezi durumunda olup, 12.112 dekar üretim alanı ve 17.841 tonluk üretim ile Türkiye üretiminin % 61'ini karşılamaktadır (Ak, Güçlü, Eken ve Sekban, 2015; Kontaş, 2012). Çayda ise Türkiye'nin toplam üretiminin % 97'sini karşılamaktadır. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bu ürünlerde mücadeleyi gerektirecek önemli zararlılar mevcut değilken son zamanlarda nimf ve erginleri birçok yabancı ve kültür bitkisinde zararlı olan *Ricania simulans* (*R. simulans*) görülmekte ve zararının popülasyonu gittikçe büyümektedir. Zararının en önemli konakçılarının mürver, fasulye, kivi, yabancı böğürtlen, ortanca, incir, kızılgaç, karayemiş, çay ve üzüm olduğu belirlenmiştir (Ak vd., 2015; Göktürk ve Mıhlı, 2015). Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen ürünlerin en önemlisi olan çayda kimyasal gübre dışında herhangi bir kimyasal girdi kullanılmamaktadır. Tarım arazilerinin genel yapısı nedeniyle birçok üründe yetiştiricilik çay ile birlikte yapıldığı için *R. simulans*'a karşı kimyasal mücadeleye yönelik tedbirler düşünülmemektedir (Ak, Güçlü ve Sekban, 2013). Oysaki bu tür zararlılar için en yaygın kullanılan yöntem kimyasal haşere kontrolüdür. Fakat mücadelede genel olarak kullanılan organofosfatlı insektisitler çok zehirli kimyasal maddelerdir. Tüm dünyada ciddi kirliliğe yol açmaktadırlar ve büyük bir sağlık ve çevre sorunu oluşturmaktadır (Poirier vd., 2017). Bu nedenle son zamanlarda zararlılarla mücadele için hedef enzim inhibisyonu çalışmaları üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nin en önemli tarımsal ürünleri olan çay, fındık, kivi başta olmak üzere tüm tarım ürünlerinde büyük kayıplara neden olan ve gittikçe popülasyonu artan *R. simulans* zararlısından asetilkolinesteraz (ACHE) saflaştırılarak, yeni sentezlenmiş kimyasallar ve bazı bitki ekstraktları ile hedef enzim inhibisyonu üzerinden mücadele amaçlanmıştır

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Literatür Özeti

Kolinesterazların varlığı Dale tarafından 1914'de öne sürülmüş ve 1926'da Loewi ve Navratil tarafından yapılan deneyle kurbağa kalplerinde asetilkolinesterazın varlığı doğrulanmıştır. Henry Dale, kolin esterlerini parçalayan bir enzim olan ACHE'nin, otonomik ve somatik motor sinir sistemlerinde nörotransmisyonunda rol oynadığını ve ACHE inhibitörü olan fizostigmin faaliyetinin hedefi olduğunu öne sürmüştür. ACHE'nin saflaştırılması ve karakterizasyonu için çoğunlukla elektrikli yılan balığı ile memeli beynine odaklanılmıştır (Nachmansohn, 1970). 1937'de Marnay ve Nachmansohn, nöromusküler kavşaklarda *Torpedo* ve *Electrophorus*'un elektrik organlarında yüksek konsantrasyonlarda ACHE gözlemişlerdir (Taylor, 1991; Massoulié, Pezzementi, Bon, Krejci ve Vallette, 1993; Katz ve Barohn, 2021). Oldukça aktif bir ACHE çözeltisi ilk olarak 1939'da Nachmansohn ve Lederer tarafından *Torpedo marmorata*'nın elektrik dokusundan elde edilmiştir. Sadece 30 mg protein içeriğine sahip 1 kg dokunun, saatte 2-4 kg asetilkolin (ACH) metabolize ettiği fark edildiğinde bu malzemenin enzimi izole etmedeki olağanüstü değeri ortaya çıkmıştır. 1940'larda *Electrophorus electricus*'un elektrik dokusundan ekstrakte edilen enzim çözeltisinin birkaç yüz kat saflaştırılmasıyla, saatte mg protein başına 440 mmol ACH metabolize eden spesifik aktivite elde edilmiştir (Leuzinger ve Baker, 1967).

Ham homojenatlar ACHE'den başka enzimler de içerir ve bu enzimler tarafından, ACHE inhibitörlerinin (ACHEI) indirgendiği veya alıkonulduğu yada her ikisinin birden olduğu komplikasyonlardan kaçınmak için ACHE'nin saflaştırılması gerekir. Bunun için değerlendirilmiş olan iyon değişim kromatografisi, amonyum sülfat çökeltilmesi ve jel filtrasyon gibi bazı saflaştırma süreçleriyle bir miktar saflaştırma sağlanmış, fakat ACHE aktivitesinde göz ardı edilemeyecek kayıplara neden olmuştur. Bu nedenle afinite kromatografisinin, ACHE'yi diğer proteinlerden ayırmak için en etkili yöntem olduğu belirtilmiştir (Xu ve Bull, 1994b).

ACHE'nin inhisyonunun çeşitli hastalıkların tedavisinde ve zararlı haşerelerin kontrolünde farmakolojik uygulamaları olduğu kanıtlanmıştır (Bal vd., 2020). ACHE, böceklerden memelilere kadar çeşitli türlerde ve ayrıca bitki türlerinde geniş çapta analiz edilmiştir. ACHE, aktif bölge içindeki serin kalıntısını kovalent olarak fosforile ederek veya karbamilleyerek enzim aktivitesini inhibe eden organofosfat ve karbamat

insektisitler, sinir gazları ve farmakolojik ajanlar için ana hedef noktasıdır (Fournier ve Mutero, 1994; Bourne, Taylor ve Marchot, 1995; Gómez, Nieto-Cerón, Campoy, Muñoz-Delgado ve Vidal, 2003; Xiao, Dou, Li ve Wang, 2010; Kim ve Lee, 2018). Substrat ve inhibitör özgülüğü çalışmaları, ACHE'nin muhtemelen böceklerdeki tek kolinesteraz (CHE) olduğunu göstermektedir (Xu ve Bull, 1994a).

Literatürde farklı yöntemler kullanarak çeşitli kaynaklardan izole edilen ACHE'lerin saflaştırma oranları 13 ile 38.961 arasında değişiklik göstermektedir. Bu kaynaklardan izole edilen bu ACHE'ler en yüksek aktiviteyi pH 7,0-9,0 ve 35-40 °C sıcaklıklar arasında göstermekte olup molekül ağırlıkları 25 ile 63,5 kDa arasında değişmektedir.

Mytilus galloprovincialis'dan ACHE, amonyumsülfat ile ön saflaştırma işlemi yaptıktan sonra edrofonyum-Sefaroz 6B kolonuyla % 3 verimle 13 kat saflaştırılmıştır. Çalışmada substrat olarak ATC kullanmış, 35 °C sıcaklıkta ve pH 7,5'ta maksimum aktivite gösteren ACHE'nin K_m ile V_{maks} değerleri sırası ile 1,3 mM ve 0,183 mM/dk/mg olarak hesaplanmış, molekül ağırlığı ise 51 kDa olarak belirlenmiştir (Duranay, Anil, Hasbal ve Özsoy, 2019).

Nordin vd., (2022) *Diodon hystrix*'den ACHE'yi prokainamid-afinite kromatografisi kullanılarak % 66,67 verimle 20,42 kat saflaştırmışlardır. Enzim 30 °C sıcaklıkta ve pH 9,0'da maksimum aktivite göstermiştir. *Diodon hystrix*'den saflaştırılan ACHE'nin spesifik aktivitesi 2297.50 U/mg, ATC varlığında K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 1,171 mM ve 405×10^3 µmol/dak/mg olarak rapor edilmiştir (Nordin, Abdulla, Ahmad ve Sabullah, 2022).

Son vd., (2002) Japon bıldırcın beyninden ACHE'yi afinite kromatografisi ile saflaştırmışlar ve iki farklı dolgu malzemesi kullanmışlardır. Dolgu malzemesi olarak konkalavin-A Sefaroz kullanıldığında % 27,1 verimle 33,9 kat saflaştırdıkları ACHE'nin toplam protein miktarını 7,7 mg, spesifik aktivitesini 0,24 U/mg protein olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada dolgu malzemesi olarak edrofonyum-Sefaroz kullanıldığında ise % 4,3 verimle 10.416 kat saflaştırılan enzimin toplam protein miktarı 0,002 mg, spesifik aktivitesi 2.500 U/mg protein, molekül ağırlığı ise yaklaşık 62,5 kDa olarak belirlenmiştir (Son, Shin, Choi ve Park, 2002).

Keana ve Ryan, (1999) *Galleria mellonella* beyninden ACHE'nin saflaştırılmasında, afinite ile anyon değişim kromatografisini art arda kullanarak

ACHE'yi iki aşamada % 32'lik verimle 283 kat saflaştırmışlardır. İzole edilen ACHE'nin spesifik aktivitesi 0,395 U/mg, toplam protein miktarı 0,19 mg/mL olarak belirlenmiştir (Keana ve Ryan, 1999).

Xiao vd., (2010) depolanmış ürün zararlısı olan *Liposcelis entomophila*'dan ACHE'yi afinite kromatografisi ile % 61,4 verimle 587 kat ACHE saflaştırmışlar ve molekül ağırlığını 55 kDa olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılan ACHE'nin K_m değeri 0,37 mM, V_{maks} değeri 748,78 nmol/dk/ mg olarak hesaplanmıştır (Xiao vd., 2010).

Zhu ve Brindley, (1992) afinite yöntemi ile *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae)'dan % 55,9 verimle 615,9 kat ACHE saflaştırmışlardır. Saflaştırılan ACHE'nin toplam protein miktarı 0,234 mg, spesifik aktivitesi 38,80 U/mg, ATC substratının varlığında K_m değerini $6,9 \times 10^{-5}$ M, V_{maks} değerini 42,9 U/mg, optimum şartlarını ise 37,0 °C ve pH 8,0 olarak belirlemişlerdir (Zhu ve Brindley, 1992).

Guedes vd., (1998) *Rhyzopertha dominica*'dan afinite kromatografisiyle % 54 verimle 771 kat saflaştırdıkları ACHE'nin molekül ağırlığını 56 kDa, spesifik aktivitesini 4,7 μ mol/dk/mg, toplam proteini miktarını ise 0,33 mg olarak belirlemişlerdir. ATC substratının varlığındaki V_{maks} değeri 18,7 μ mol/dk/mg, K_m değeri ise 24,2 μ M olarak rapor etmişlerdir (Guedes, Zhu, Kambhampati ve Dover, 1998).

Ju-Chun Hsua vd., (2008) *Bactrocera dorsalis*'dan yaklaşık 1.500 kat % 20 verimle saflaştırdıkları ACHE'nin molekül ağırlığının 59,7 kDa olduğunu belirtmişlerdir (Hsu, Wu, Haymer, Liao ve Feng, 2008).

Gao ve Zhu, (2001) *Schizaphis graminum* (Rondani)'den % 12 verimle 2.253 kat ACHE izole etmişlerdir. pH 7,0'de en yüksek aktivite gösteren bu enzimin, ATC varlığında V_{maks} değerini 78,0 μ mol/min/mg, K_m değerini 57,6 μ M olarak belirlemişlerdir (Gao ve Zhu, 2001).

Gao vd., (1998)'nin yaptıkları çalışmada *Diabrotica virgifera*'dan afinite kromatografisiyle % 22,6 verimle 20.420 kat saflaştırdıkları ACHE'nin, spesifik aktivitesi 169,49 U/mg, toplam proteini ise 0,028 mg bulunmuştur. Aynı çalışmada ATC varlığında V_{maks} değeri 184,81 U/mg protein, K_m değeri 19,65 μ M olarak belirtilmiştir (Gao, Rao, Wilde ve Zhu, 1998).

Pamuk yaprak biti *Aphis gossypii*'den % 30,3 verimle, 35.100 kat saflaştırdıkları ACHE'nin molekül ağırlığını 63,5 kDa olarak belirlemişlerdir (Li ve

Han, 2002).

Zhu ve Clark, (1994) yaptıkları çalışmada Colorado patates böceğinden afinite kromatografisiyle % 51 verimle 38.961 kat ACHE saflaştırmışlardır (Zhu ve Clark, 1994).

Xu ve Bull, (1994a) yaptıkları çalışmada Horn Fly (Diptera: Muscidae)'dan saflaştırdıkları ACHE'nin 37 °C'lik bir inkübasyon sıcaklığında ATC'ye karşı en yüksek aktiviteyi pH 7,5'da sergilediğini, pH 5,5 - 7,5 arasında lineer olarak artan pH'ın 7,5'dan sonra ise yavaş yavaş düştüğünü belirtmişlerdir. Bu enzimin molekül ağırlığını 54 kDa, ATC için K_m değerini $(9,2 \pm 0,35) \times 10^{-6}$ M, V_{maks} değerini $239,8 \pm 10,8$ U/mg olarak belirlemişlerdir (Xu ve Bull, 1994a).

Birman, (1985) *Electrophorus* ACHE ve *torpedo* ACHE ile yaptığı çalışmada ATC varlığında K_m değerlerini sırasıyla 80 ± 7 μ M ve 77 ± 3 μ M olarak belirlemişlerdir (Birman, 1985).

Yapılan başka bir çalışmada *Blaffella germanica* (Diptera: Blattellidae)'dan saflaştırılan ACHE aktivitesinin sıcaklık arttıkça arttığı ve en yüksek aktivitenin 40 °C'de gözlemlendiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada hem asidik, hem de bazik ortamlarda aktivite gösteren ACHE'nin optimum pH'sı ise 8,0 olarak belirlenmiştir (Prabhakaran ve Kamble, 1996).

Mohamed vd., (2020) yaptıkları bir çalışmada *Rhynchophorus ferrugineus*'den monomerik formda iki izoenzim ACHE saflaştırmışlar ve spesifik aktivitelerini 3504.3 ve 2.979 U/mg protein, molekül ağırlıklarının ise 32 ve 54 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Monomerik formlara sahip her iki izoenzimin, pH 8,0 ve 40 °C'de optimum aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Mohamed vd., 2020).

Dudai ve Silman, (1974) *Electrophorus electricus*'un elektrik organından saflaştırdıkları ACHE'nin molekül ağırlığını 25 - 59 kDa olarak belirlemişlerdir (Dudai ve Silman, 1974).

Xu ve Bull, (1994b) *Horn Fly* (Diptera: Muscidae) boynuz sineklerinin kafa, göğüs ve karın homojenatlarındaki ACHE aktivitelerini ve protein içeriklerini analiz etmişlerdir. Toplam vücut ACHE aktivitesinin % 72,9'unu baş, % 24,4'ünü göğüs ve % 2,7'sini karnın oluşturduğunu ayrıca kafadaki ACHE spesifik aktivitesinin, mg protein bazında sırasıyla göğüs ve karındakilerden 7 ve 32 kat daha fazla olduğunu raporlamışlardır (Xu ve Bull, 1994b).

Yeni ilaçların keşfi ve geliştirme sürecindeki ön çalışmalar, aday bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin *in vitro* değerlendirilmesini içerir. Enzim inhibitörü taraması için en yaygın yaklaşım, aday bileşiklerin varlığında enzim aktivitesinin azalmasının ölçülmesidir. ACHE inhibitörlerinin *in vitro* taranması için, asetiltiyokolin pH 8,0'de ACHE ve inhibitör varlığında asetik asit ve tiyokolin oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu yöntemde, tiyokolin ile reaksiyona girdiğinde ditiyobisnitrobenzoattan (Ellman reaktifi) türetilen sarı bir anyon 412 nm'de izlenir. ACHE'nin aktivitesini ve inhibitörlerin varlığındaki düşüşünü ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemdir (Martín-Blosca, Asensi-Bernardi, Villanueva-Camañas, Sagrado ve Medina-Hernández, 2009).

Literatürde çeşitli kimyasal ve bitki ekstraktlarının, farklı kaynaklardan elde edilen ACHE'ler üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

ACH, beyindeki bilgilerin kaydedilmesi, depolanması ve hatırlanmasında kilit rol oynayan beynin kimyasal ara ürünlerinden biri olduğu için, yıkımını önleyen herhangi bir faktör, bir anti-Alzheimer ilacı olarak kabul edilebilir. *Citrus aurantium* özünde bol miktarda bulunan α -terpineol ve α -pinen gibi aromatik moleküllerin ACHEI etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Pasandideh ve Arasteh, 2021).

Blattella germanica (Linnaeus) ergin ACHE için takrin ile yapılan inhibisyon çalışmasında IC₅₀ değeri 68 nM olarak bulunmuştur (Mutunga, Anderson, Wong, Carlier ve Bloomquist, 2009).

Mentha pulegium L.'nin çeşitli fraksiyonlarıyla hazırlanan ekstraktlarından etil asetat fraksiyonu güçlü bir ACHE inhibisyon etkisi göstermiş ve IC₅₀ değeri 3,13±0,05 µg/mL olarak raporlanmıştır. En düşük ACHE inhibisyon etkisi dietil eter fraksiyonunda gözlenmiş ve IC₅₀ değeri 144,59±0,49 µg/mL, n-bütanol fraksiyonu ise galantamine (IC₅₀ = 6,27±1,15 µg/mL) yakın bir inhibisyon etkisi göstermiş ve IC₅₀ değeri 32,28±1,34 µg/mL olarak belirlenmiştir. Etil asetat ile yapılan fraksiyonun standart olarak kullanılan galantaminden daha iyi inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Abbou vd., 2022). *Mentha pulegium* ile yapılan diğer ACHE inhibisyon çalışmalarında; Gülçin vd., (2020), metanol ekstraktı ile yaptıkları çalışmada IC₅₀ değerini 40,76 µg/mL; Mata vd., (2007), ethanol ile yaptıkları çalışmada ise 534 µg/mL olarak belirlemişlerdir (Abbou vd., 2022; Gülçin vd., 2020; Mata vd., 2007).

Albuquerque vd., (2021) tıpta kullanılan *Lycopodiella cernua* L. isimli geleneksel çin bitkisinde bulunan çeşitli bileşiklerin, ACHE'ye karşı inhibitör aktivetelerini incelemişlerdir. Çalışmada bu bitkiden, iki serratene tipi triterpenoid ve yeni bir hidroksi doymamış yağ asidi tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin ACHE için IC₅₀ değerlerini sırasıyla 10,67±0,66 mM, 9,98±0,29 mM ve 0,22±0,03 mM olarak rapor edilmiştir (Ferreira, Albuquerque, Cardoso, M.S. Silva ve Silva, 2021).

Yapılan diğer bir çalışmada kafein, ellagik asit, enginar ekstraktı, donepezil ve benzoik asitin in vitro fare beyninden izole edilen ACHE'nin inhibisyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Kafeinin 1,013 mg/mL IC₅₀ değeri ile rekabetçi olmayan bir inhibisyon, ellagik asit ve enginar ekstraktının sırasıyla, 1,927 ve 5,705 mg/mL'lik IC₅₀ ile rekabetçi inhibisyon, donepezil ise 0,0034 mg/mL IC₅₀ ile karışık inhibisyon modları sergilediklerini, ancak benzoik asitin herhangi bir anti-ACHE sergilemediğini belirlemişlerdir (Abd El-Aziz, Eldin Awad, Shehata ve El-Sohaimy, 2021).

Pasandideh ve Arasteh, (2021) yaptıkları çalışmada, 40 mg/mL *Citrus aurantium* ekstraktının ACHE enzimi üzerinde % 47,04'lük inhibitör etkisiyle IC₅₀ değerini 42,8 mg/mL olarak hesaplamışlardır. Pozitif kontrol için kullandığı ACHE'nin bilinen inhibitörlerinden bir olan rivastigminin IC₅₀ değerini ise 2,18 mg/mL olarak belirlemişlerdir (Pasandideh ve Arasteh, 2021).

Guo vd., (2020) *electric eel* (ee) ACHE kullanarak yaptıkları bir çalışmada takrin ve donepezilinin IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0,02 ve 0,008 µM olarak belirtmişlerdir (Guo vd., 2020).

Oliveira vd., (2019) yaptıkları çalışmada, benzoik asit türevlerinin ACHE'a karşı inhibisyon etkisinden yoksun olduğunu fakat metoksi gruplarının eklenmesiyle, inhibisyon etkisinin arttığını belirlemişlerdir. Genel yapısı R₁-CH=NO-R₂ olan sentezledikleri farklı nitron süstitüentlerinden (tert-butil, benzil ve sikloheksil), tert-butil parçasına sahip bileşiklerin önemli ACHE inhibitör aktivite sergilediğini, metoksi süstitüentlerinin mevcudiyeti ve sayısı ile aralayıcı uzunluğunun ACHEI etkisine önemli katkılarının olduğu belirtilmiştir. m- veya p-OCH₃ ikame edicilerinin eklenmesi benzer inhibitör potansiyellere yol açsa da, 3,4,5-trissüstitüe ve özellikle 3,4-dimetoksiden türetilmiş bileşikler için önemli gelişme gözlemlenmiştir. İki metoksi fonksiyonu ve altı karbonlu bir alifatik zincire sahip olan türev 3,4-dimetoksi türevli bir bileşik ACHE'ye karşı rekabetçi olmayan bir inhibisyon etki mekanizması

göstermiş ve IC_{50} değeri $8,3 \pm 0,3$ mM; K_i değeri ise 5,2 mM, 3,4,5-trissüstitüe türevlerinden ise daha yüksek IC_{50} (bu türevlerden elde edilmiş en düşük IC_{50} değeri $17,2 \pm 1,3$ mM değerlerine sahip olduğu rapor edilmiştir. (Oliveira ve diğerleri, 2019).

Güzel vd., (2019) eeACHE'nin mangan ve nikel ftalosiyenin kompleksleri ile yaptıkları inhibisyon çalışmalarında IC_{50} değerlerini sırasıyla 185,52 ve 196,11 nM olarak bildirmiştir (Güzel vd., 2019).

Aydın ve Akıncıoğlu, (2019) oleuropeinin (OE) ACHE ve bütilkolinesteraz (BCHE)'lar üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırmışlar ve çalışma sonuçlarına göre oleuropein, ACHE ve BCHE için sırasıyla $0,07293 \pm 0,011621$ μ M ve $0,0675 \pm 0,0391$ μ M aralığında K_i değerleri ile güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Ayrıca oleuropeinin IC_{50} değerleri ACHE ve BCHE enzimleri için sırasıyla 0,3157 μ M ve 0,0878 μ M olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, takrine kıyasla oleuropeinin ACHE ve BCHE'nin etkili bir inhibitörü olduğunu göstermektedir (Aydın ve Akıncıoğlu, 2019).

Sarria vd., (2016) yaptıkları çalışmada flavonon-metal komplekslerinin eeACHE, insan asetilkolinesteraz (huACHE) ve insan bütilkolinesteraz (huBCHE) aktivitelerine etkisini araştırmışlar ve sentezlenen komplekslerin farklı organizmalardaki ACHE'ler üzerinde farklı etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Saf flavonlar ve bunların imin türevlerinin ACHE'ler üzerine inhibisyon etkisi göstermediklerini, bipiridin türevli metal komplekslerin ise bu üç enzim türü içinde en iyi inhibisyon sonuçları verdiğini raporlamışlardır (Sarria vd., 2016).

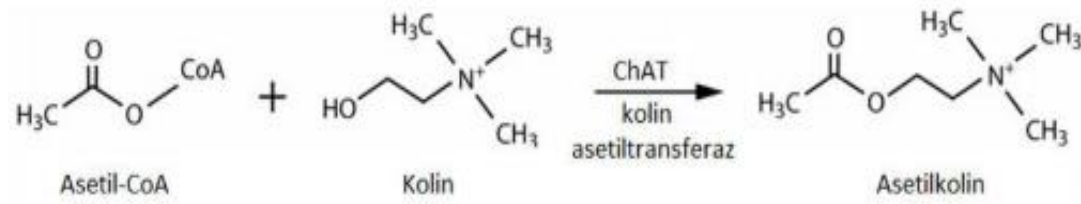
Andrisano vd., (2001) takrin ve edrofonyum klorür ile huACHE inhibisyonu üzerine yaptıkları çalışmada IC_{50} değerlerini sırasıyla 0,45 mM ve 4,33 mM olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmadaki kinetik verilerde huACHE pH 8,0'de maksimum aktivite göstermiştir (Andrisano, Bartolini, Gotti, Cavrini ve Felix, 2001).

Rampa vd., (2000) insan eritrosit ACHE'nin inhibisyonu üzerine yaptıkları çalışmada takrinin IC_{50} değerini 0,25 μ M olarak bildirmişlerdir (Rampa vd., 2000).

Yapılan bir çalışmada huperzine A'nın bir inhibitör olarak ACHE'ye (IC_{50} : 0,082 mM) olan etkisi, BCHE (IC_{50} : 74,43 mM) olan etkisinden 1000 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Hostettmann, Borloz, Urbain ve Marston, 2006).

1.2. Asetilkolin

Asetilkolin, nöron sinapsları arasında sinir sinyallerini ileten en önemli nörotransmitterlerden biridir (Li vd., 2020). ACH, presinaptik sinir terminalinde kolin ve asetil koenzim A (asetil-CoA)'dan kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından sentezlenir (Şekil 1) (Whitmore vd., 2020). Asetil kaynağı, sinir ucundaki mitokondrilerde sentezlenen asetilCoA'dır. Kolin kaynakları ise; sinir aralığında asetilkolin yıkımıyla, vücutta fosfolipid yıkımıyla açığa çıkan ve diyetle alınan kolinidir. Kolin sinir ucuna sinaps veya kavşak aralığından aktif transportla alınmaktadır. Kolinin asetillenmesi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir (Orak, 2011).

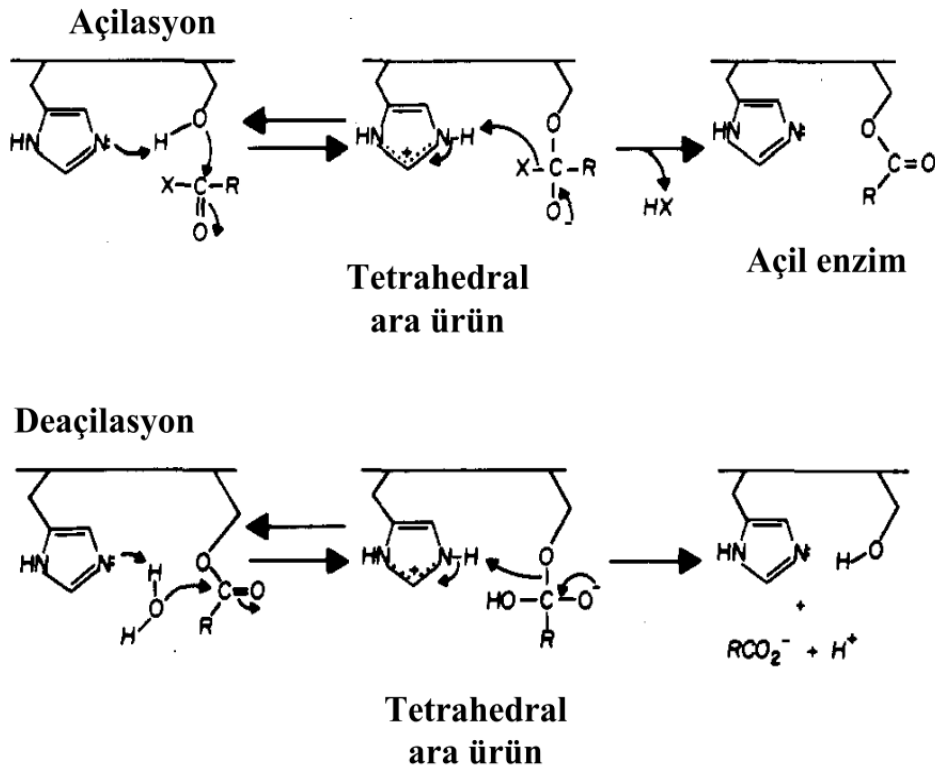


Şekil 1. Asetilkolin sentezi

Asetilkolin, bir akson terminalinden salındığında, sinapsın diğer tarafındaki bir alıcıya bağlanmak için sinaptik boşluk boyunca hareket ederek bir elektrik uyarısını iletir. Presinaptik nöron ucunda, elektriksel bir dürtü veziküllerde biriken ACH'nin salınımını ekzositoz yoluyla sinaptik boşluğa tetikler. ACH daha sonra postsinaptik nöron yüzeyindeki bir ACH reseptörüne (ACHR) bağlanır ve ACH-ACHR bağlanması, postsinaptik nörona sonraki uyarıları indükler. Son olarak, reseptör tarafından tekrar sinaptik aralığa salınan ACH, asetilkolinesteraz tarafından hızla parçalanır. ACHE, asetilkolinin hızlı hidrolizi ile nöronal uyarıların iletimini sonlandırır (Patočka, Kuča ve Jun, 2004; Sagane vd., 2005). ACH son zamanlarda hayvanlarda, mantarlarda, bakterilerde ve bitkilerde nöronal olmayan bir dizi dokuda tanımlanmıştır. Bitkilerin bir sinir sistemi olmamasına rağmen, hem ACH hem de ACH hidrolize edici aktivite, bitki aleminde geniş çapta kabul görmüştür (Sagane vd., 2005). Asetilkolinin hücre içi etkilerine, nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu aracılık eder (Patočka vd., 2004).

1.3. Asetilkolin Metabolizması

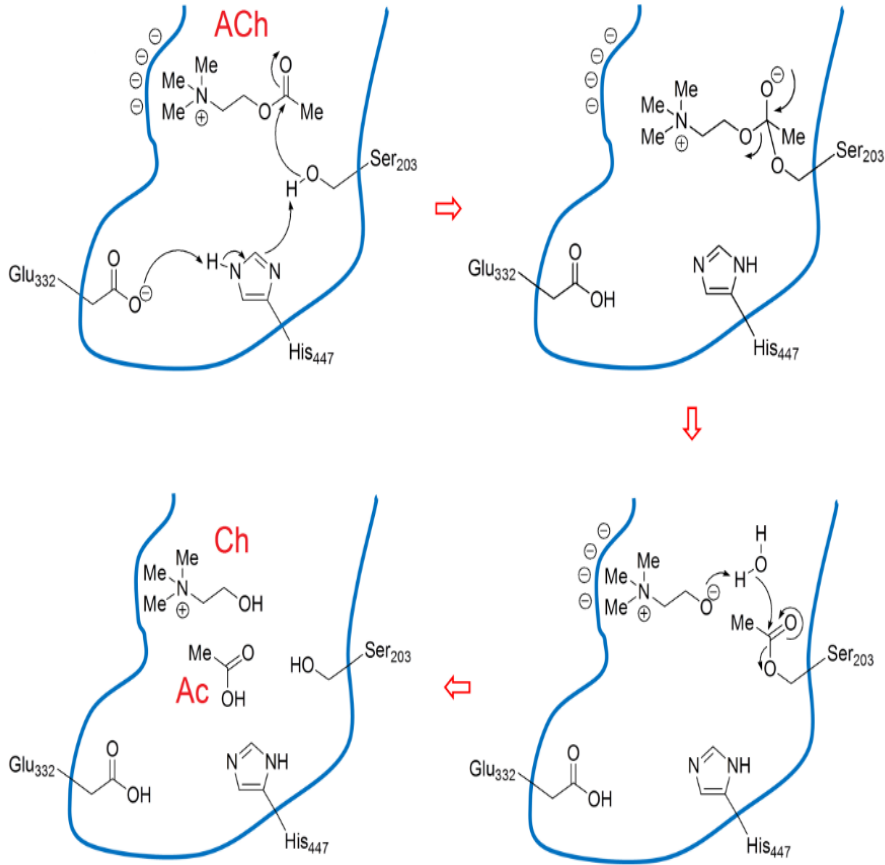
Asetilkolin, enzim yüzeyinin altında dar ve derin boşluğun 20 Å dibinde uzanan ACHE aktif bölgesinin esteratik kısmında dönüştürülür. Bölge, asetilkolinin hidrolizinde yer alan üç önemli amino asit kalıntısından oluşur. Bu amino asitler bir elektriksel yük düzenleme sistemine sahiptir ve substratın enzime bağlanması sırasında, ACH'in asetil grubu ile bu amino asit kalıntıları arasında bir etkileşim gerçekleşmektedir. Asetilkolinin aktif bölgede doğru pozisyonu anyonik bölge tarafından, asetilkolinin dördüncül amonyum iyonu ile etkileşmesi yolu ile kontrol edilir (Radić, Pickering, Vellom, Camp ve Taylor, 1993; Temel, 2008; Pohanka, 2012). ACHE'nin ACH ile reaksiyon mekanizmasında, açılasyon ve deaçilasyon olmak üzere iki ana süreç bulunmaktadır (Şekil 2) (Duranay vd., 2019).



Şekil 2. ACHE'nin açılasyon ve deaçilasyon prosesleri ile katalitik reaksiyonu

Açılasyonun ilk adımında; Ser 203'den His447'e eş zamanlı bir proton transferiyle, histidinin imidazol azotu, serinin hidroksil grubu ile geçici bir hidrojen bağı oluşturur ve nükleofilik reaksiyonu teşvik eder. Böylelikle serinin hidroksil grubundaki oksijen atomundan, asetilkolinin karbonil grubundaki elektrofilik

karbonuna nükleofilik bir saldırı başlar. Enzim ve substrat arasında geçici olarak kovalent bir açıl bağı oluşarak birinci tetrahedral ara ürünle sonuçlanır. Bu tetrahedral ara ürün, oksianyon bölgesinde bulunan hidrojen bağları ve katalitik üçlüde bulunan glutamik asit ile elektrostatik etkileşimler tarafından stabilize edilir. Protonun ACH'nin ayrılan grubuna aktarılmasıyla bağ bölünmesi meydana gelir ve cepten kolin salınımı ile sonuçlanır (Patočka vd., 2004; Colovic, Krstic, Lazarevic-Pasti, Bondzic ve Vasic, 2013; De Souza, Rennã ve Figueroa-Villar, 2016; De Boer, Nguyen, Mao, Moore ve Sorin, 2021). Bu süreçteki bir sonraki adım olan deaçilasyon da; bir su molekülünün asetilkolinin asetil grubundaki karbonil karbonu arasındaki etkileşimiyle, oksianyon boşluğunun Gly121, Gly122 ve Ala204 artıkları tarafından stabilize edilen ikinci bir tetrahedral ara ürün meydana gelir (Şekil 3) (de Souza vd., 2016). Proton daha sonra His447'den asetilserin oksijen atomuna transfer olur ve asetik asit ve serbest ACHE ürünlerini verir (Patočka vd., 2004; Colovic, Krstic, Lazarevic-Pasti, Bondzic ve Vasic, 2013; De Souza, Rennã ve Figueroa-Villar, 2016; De Boer, Nguyen, Mao, Moore ve Sorin, 2021).



Şekil 3. ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması

İnhibitör yokluğunda substrat katalizi aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Substrat, aktif serin ile bir kovalent kompleks (tetrahedral ara ürün) oluşturmak üzere katalitik bölgeye bağlanır.
- Kolin salınımı ile birlikte tetrahedral ara ürün yıkılır, aktif merkezdeki serin asetillenir ve kolin anyonik alt bölgeye bağlanır.
- Kolin alt bölgeden ayrılır ve geçit yoluyla çıkar.
- Bir su molekülü, yeni bir tetrahedral ara ürün oluşturan asil grubunun karbonuna saldırır.
- Aktif bölgede asetat ile bağlı tetrahedral ara ürün yıkılır.
- Aktif bölgedeki asetat ayrılır ve geçit yoluyla enzimi terk eder (Valle, 2008).

1.4. Kolinesterazlar

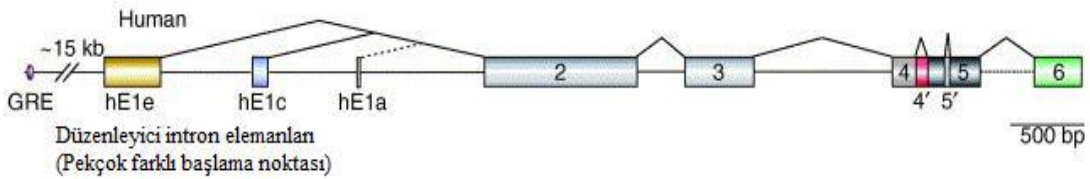
Kolinesterazlar, merkezi ve otonom sinir sistemlerinde ve nöromüsküler sinapslarda kolinerjik nörotransmitter olan ACH'nin hidrolizini katalize eden serin hidrolazlardır. Kolinerjik yolların aracılık ettiği kardiyovasküler fonksiyonunun periferik ve merkezi sinir sistemi kontrolü, kan basıncının homeostatik bakımında ve strese yanıtta kritik öneme sahiptir (Valle, 2008).

Kolinesterazlar, asetilkolinin kolinerjik sinapslarda salındıktan sonraki bir milisaniye içinde hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmasından sorumludur, böylece kas kasılmasının kesin zamansal kontrolüne izin verir (Rosenberry, 1979). Kolinesterazlar, serin esterazlardır. Kolin esterlerini diğer substratlardan daha hızlı hidrolize etmeleri ve doğal karbamat alkaloid fizostigmin (eserin) tarafından inhibe edilmeleri ile tanımlanır. Aktif serin ile reaksiyona giren diizopropilflorofosfat (DFP) gibi organofosfatlar ile geri döndürülemez şekilde inhibe edilirler (Massoulié ve diğerleri, 1993). Kolinesterazlar; asetilkolinesteraz ve psödokolinesteraz olmak üzere ikiye ayrılır. 1964 yılında Enzim Komisyonu tarafından "gerçek ve spesifik" kolinesteraz olarak asetilkolin asetilhidrolaz (EC 3.1.1.7), diğer kolinesterazlar için ise psödokolinesteraz veya bütilkolinesteraz (EC 3.1.1.8) adlarının kullanılması kabul edilmiştir. ACHE, eritrositlerde, sinir uçlarında, akciğerlerde, dalakta ve beynin tüm bölümlerinde bulunur. BCHE, plazmada, karaciğerde, düz kaslarda, bağırsaklarda, pankreasta, kalpte ve beynin beyaz maddesinde bulunur. İki enzim, temel olarak substrat özgüllükleri ve inhibitörlere karşı olan duyarlılıkları bakımından birbirinden ayırt edilebilmektedir. ACHE, asetilkolini diğer kolin esterlerinden daha hızlı hidrolize eder ve butirilkolin üzerinde çok daha az aktiftir. BCHE ise bütirilkolini asetilkolinden daha hızlı hidroliz eder (Chatonnet ve Lockridge, 1989; Patočka vd., 2004; Pohanka, 2011; Colovic vd., 2013).

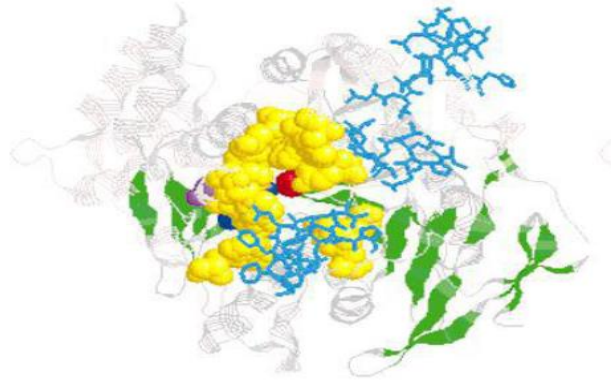
1.5. Asetilkolinesteraz

Kolinesterazların varlığı Dale tarafından 1914'de öne sürülmüş ve 1926'da Loewi ve Navratil tarafından kurbağa kalplerinde yaptıkları deney ile asetilkolinesterazın varlığını doğrulamışlardır. Henry Dale, kolin esterlerini parçalayan bir enzimin, asetilkolinesterazın otonomik ve somatik motor sinir sistemlerinde nörotransmisyonunda rol oynadığını ve bu enzimin, ilacın, yani fizostigmin faaliyetinin hedefi olduğunu öne sürmüştür. 1937'de Marnay ve Nachmansohn,

nöromusküler kavşaklarda, *Torpedo* ve *Electrophorus*'un elektrik organlarında yüksek konsantrasyonlarda asetilkolinesteraz gözlemlenmiştir (Taylor, 1991; Massoulié ve diğerleri, 1993). ACHE, sistemik olarak asetilkolin asetilhidrolaz olarak adlandırılan kolin esterlerinin hidrolizini katalize eden özel bir karboksilik ester hidrolazıdır. Diğer isimleri arasında gerçek kolinesteraz, spesifik kolinesteraz, kırmızı kan hücresi kolinesteraz, eritrosit kolinesteraz ve kolinesteraz I bulunur. ACHE; kas, sinir ve hematopoietik hücrelerde üretilir ve hızlı kataliz hızı nedeniyle en verimli enzimlerden biri olarak kabul edilir. ACHE için tercih edilen substrat, asetilkolindir (Askar, Kudi ve Moody, 2011; De Boer vd., 2021). ACHE; sinir ve kas, merkezi ve periferik dokular, motor ve duysal lifler ve kolinerjik ve kolinerjik olmayan lifler gibi birçok iletken doku türünde bulunur ve ACHE'nin aktivitesi motor nöronlarda duysal nöronlardan daha yüksektir. İskelet kasının sinir-kas kavşağında bulunan ACHE, sinir hücresinden ziyade kas tarafından sentezlenir. Uyarılabilir dokularda, ACHE ekspresyonu dokuya özgü gelişim tarafından düzenlenir ve enzim hem sinirin hem de kasın hücre dışı yüzeyinde lokalizedir. Nörotransmitter asetilkolini kolin ve asetata hızla hidrolize ederek, kolinerjik nörotransmisyonunda merkezi ve periferik sinir sistemlerinde işlev görür (Taylor, Camp ve Radic, 2009; Colovic vd., 2013; Rajesh vd., 2017; Duranay vd., 2019). ACHE geni (Şekil 4) (Işık, 2015), insanda 7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde yer alan, altı ekson içeren ve 7 kilobaz uzunluğunda bir gendir. Kolinesterazların karboksil uç kısmındaki amino asitler çeşitlilik göstermekle birlikte korunmuş durumdadır ve bu amino asitler katalitik üçlü (Şekil 5) adı verilen enzimin aktif merkezini oluşturmaktadır (Gibney, Camp, Dionne, Macphee-Quigley ve Taylor, 1990; Getman, Eubanks, Camp, Evans ve Taylor, 1992; Işık, 2015).



Şekil 4. ACHE gen şeması



Şekil 5. *Torpedo californica* ACHE'nin literatürdeki üç boyutlu yapısı

Şekil 5'de verilen *Torpedo californica* ACHE, β ve α -heliks tabakalarından oluşur. β -tabaka yeşil renklidir. Boğazı kaplayan on dört aromatik kalıntı sarı renk, katalitik üçlüyü oluşturan Serin-Glutamat-Histidin aminoasitleri ise sırasıyla; turuncu, kırmızı ve mor renk ile gösterilmiştir. Molekül yüzeyindeki geçidi çevreleyen substrat bağlama bölgeleri mavi renktedir (Oakeshott, Claudianos, Russell ve Robin, 1999).

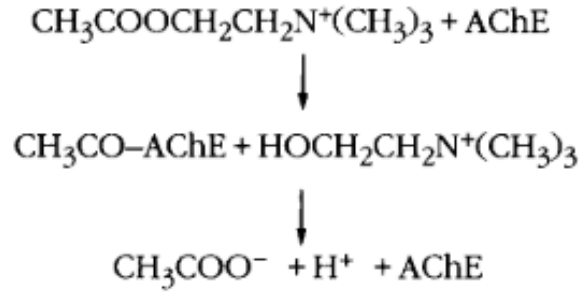
Saflaştırılmış ACHE' nin özellikleri hakkındaki bilgilerin çoğu, yılan balığı *Electrophorus electricus*'un elektrik dokusundaki ACHE' nin çalışmalarından elde edilmiştir (Askar vd., 2011). TcACHE kristal yapısı 1991'de çözüldüğünden beri, böcek ve memeli kaynaklarının yanı sıra BCHE kaynaklı TcACHE ve homolog ACHE'ler üzerinde çalışan bilim adamları, aynı katalitik üçlüyü kullanan diğer serin hidrolazlardan çok daha yüksek bir turnover sayısına sahip olan bu son derece verimli hidrolazın etki şeklini araştırmışlardır (Silman ve Sussman, 2008).

1.5.1. Asetilkolinesterazın Görevi ve Önemi

ACHE sinaps, kolinerjik ve diğer sinirsel mekanizmalardan sorumlu olan canlı organizmalardaki en önemli enzimlerden biridir (Askar vd., 2011; Bal vd., 2020). Asetilkolinesterazın başlıca biyolojik rolü, nörotransmitter asetilkolinin kolin ve asetata hızlı hidrolizi ile kolinerjik sinapslarda uyarı iletimini sonlandırmasıdır. Kolinerjik nörotransmisyonunda merkezi ve periferik sinir sistemlerinde işlev görür (Colovic vd., 2013; Duranay vd., 2019; Rajesh vd., 2017; Sussman vd., 1991). ACHE' nin katalitik hızı ACH üzerinde son derece hızlıdır ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), substrat birleşmesi ve ayrışmasında difüzyon sınırına yaklaşır (Cheng, Song, Yuan ve Xu, 2017). Turnover sayısının yaklaşık $1,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ olması nedeniyle, en etkili enzimlerden biri

olarak bilinir (Taylor vd., 2009).

Birinci aşamada enzim asetillenir ve kolin salınır (Şekil 6, Sussman ve Silman, 1992), bir su molekülü daha sonra serbest enzimi asetik asitin eşzamanlı salınımı ile yeniden üretir (Xu vd., 2010).



Şekil 6. Asetilkolinesteraz mekanizması

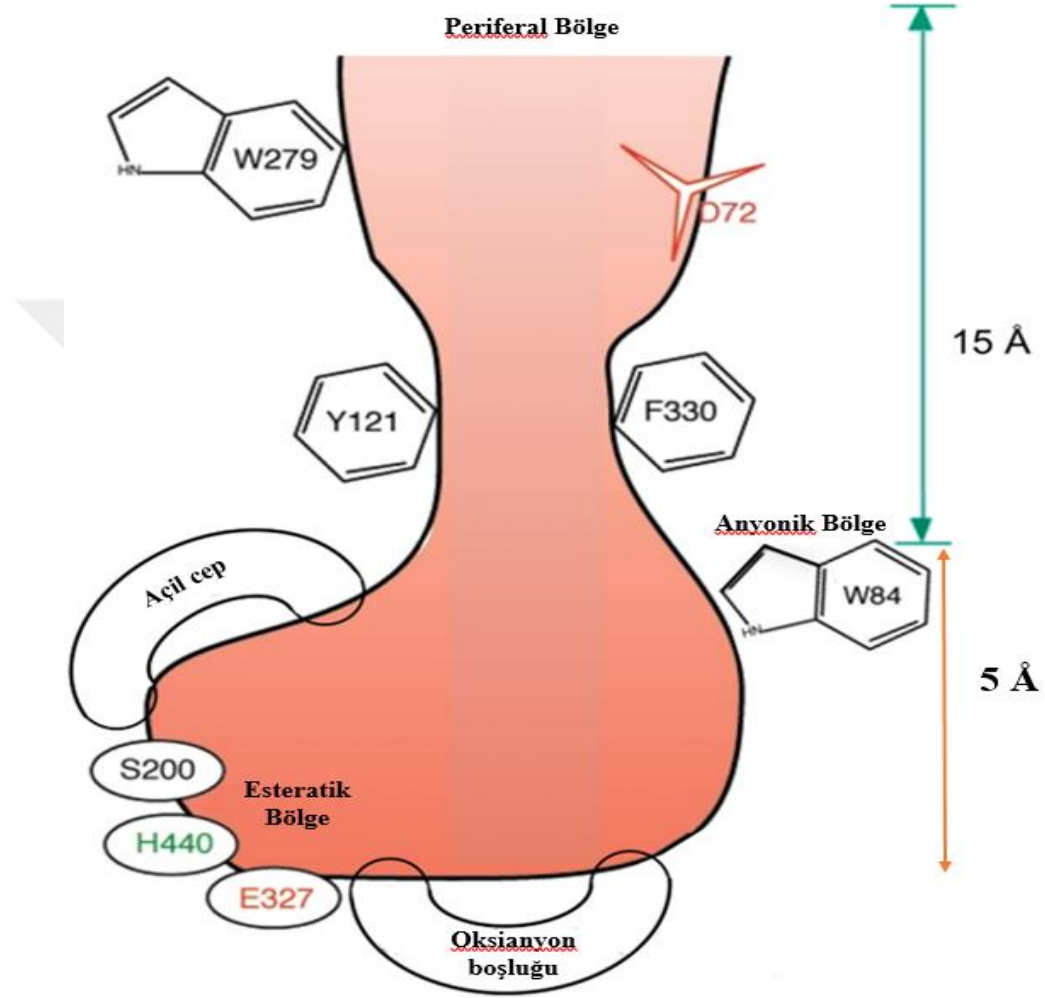
Hem omurgalıların hem de omurgasızlarda bulunan ACHE'nin ana işlevi, nörotransmitter ACH hidrolizidir, böylece nörotransmisyonu düzenler. Merkezi ve periferik sinir sistemlerindeki kolinerjik sinapslarda nörotransmitter ACH'nin etkisini sonlandıran ACHE, farmakolojik ajanların, yaygın kullanılan böcek öldürücülerin ve sinir gazlarının hedef noktasıdır (Bourne vd., 1995; Fournier ve Mutero, 1994; Kim ve Lee, 2018). ACHE'nin inhibe edici etkilerinin, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve zararlı haşerelerin kontrolünde farmakolojik uygulamaları olduğu kanıtlanmıştır; bu nedenle, inhibitör arayışı, agrokimyasal ve biyomedikal alanlar için bir ilgi konusudur (Bal vd., 2020).

1.5.2. Asetilkolinesterazın Yapısı ve Aktif Merkezi

Torpedo californica'nın elektrik organından elde edilen asetilkolinesterazın üç boyutlu yapısı, 1991'de Sussman ve diğerleri tarafından x-ışını analizi ile belirlenmiştir. Enzim monomeri, 537 amino asit içeren bir α / β proteinidir. ACHE'nin moleküler yapısı 14 α sarmal ile çevrili 12 iplikli karışık bir β tabakasından oluşur. Molekül, 45Å x 60Å x 65Å boyutlarında elips şeklindedir (Sussman vd., 1991; Colovic vd., 2013). ACHE yapısının en dikkat çekici özelliği, enzimin yarısına kadar nüfuz eden ve tabanına yakın genişleyen ~ 20 Å uzunluğunda ve ~5 Å (1 Å = 0,1 nm) genişliğinde dar ve derin geçit oluşturur (Şekil 7) (Dvir, Silman, Harel, Rosenberry ve

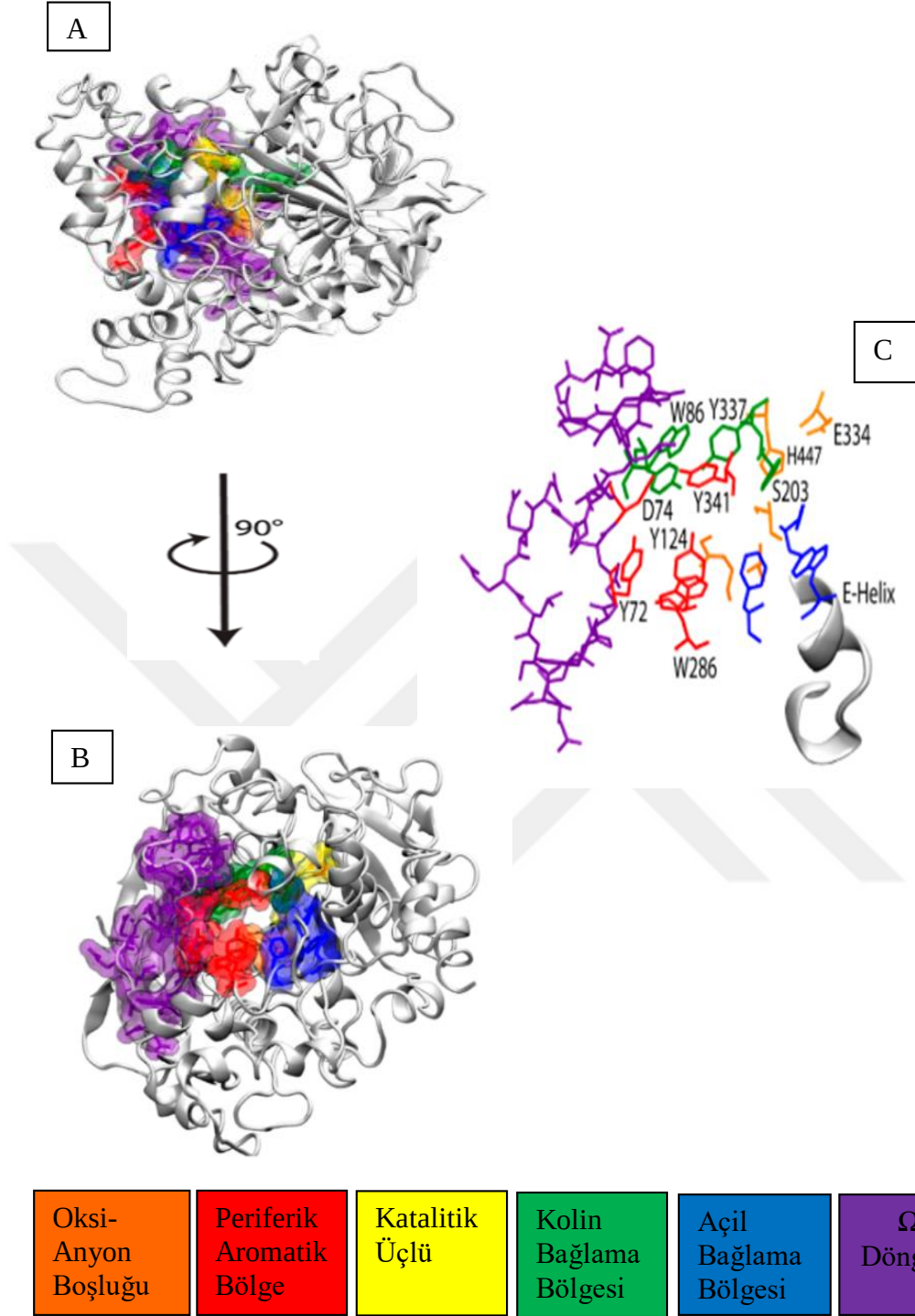
Sussman, 2010).

Asetilkolinesterazın aktif bölgesi, çok sayıda korunmuş aromatik kalıntılarla kaplı bu derin geçidin tabanında bulunur. (Bartolucci, Stojan, Yu, Greig ve Lamba, 2012; Colovic vd., 2013; Moghadam, Ashouri, Roohi ve Karimi-jafari, 2021).



Şekil 7. TcACHE'nin aktif bölge geçidinin şematik görünümü.

ACHE'nin aktif bölgesi iki alt bölgeye ayrılır: katalitik üçlü, oksianyon deliği, açıl bağlama cebi ve kolin bağlama bölgesinden oluşan; geçitin tabanındaki katalitik aktif bölge (CAS) ve geçit kenarındaki periferik anyonik bölge (PAS) (Bartolucci vd., 2012; Maček Hrvat vd., 2020). ACHE ve BCHE aktif bölgelerinin amino asit kalıntı bileşimindeki fark, BCHE'nin ACHE'den daha büyük substratları ve ligandları hidrolize etmesini veya bağlamasını sağlar (Maček Hrvat vd., 2020).



Şekil 8. ACHE'nin temsili yapısı ve fonksiyonel bölgeleri

Şekil 8'de ACHE'nin temsili yapısı verilmiş olup, A: ACHE'nin beyaz şerit modunda görselleştirmesi B: ACHE'nin dikey eksen etrafında 90° döndürülmüş görünümü C: ACHE'nin bağlanma bölgelerinin büyütülmüş görünümünü temsil etmektedir (De Boer vd., 2021).

1.5.2.1. Katalitik Aktif Bölge (CAS)

Bir ACHE'nin ilk kristal yapısı olan *Torpedo californica* ile yapılan çalışmalarda, katalitik aktif bölgenin 14 aromatik tortunun halkaları ile kaplı derin ve dar bir geçidin tabanına yakın olduğunu ortaya çıkardı. Enzimin katalitik faaliyetini düzenleyen aktif anyon ve ester özelliklerine sahiptir. Ester özelliğini serin, anyon özelliğini ise glutamik asit sağlamaktadır. Geçidin dibine gömülü olduğu için erişimi kolay olmayan CAS “katalitik üçlü” olarak bilinen Ser203, His447 ve Glu202 içerir. Bu üçlü ACH'deki ester bağlarının hidrolizinden sorumludur. CAS'ın anyonik alt ünitesi Trp84, Tyr130, Gly199, His441 ve His444 amino asitlerinden oluşur. Trp 84'ün indol yan zinciri ACH kuaterner amino grubu ile bir katyon- π etkileşimi yapar. İkinci bir amino asit olan Phe330, ligandların tanınmasında görevlidir (Xu vd., 2010; Koçancı ve Aslim, 2016; Moghadam vd., 2021). Şekil 8'de sarı renk ile gösterilmiştir (De Boer vd., 2021).

1.5.2.2. Periferik Aromatik Bölge (PAS)

PAS (Şekil 8'de kırmızı) geçidin ağzına yakın bir yerde bulunur. Onlarca yıldır, "periferik anyonik bölgeyi" belirtmek için kullanılmıştır. Son yıllarda, kolinesteraz işlevi için hayati önem taşıyan bu bağlanma bölgesinin aromatik özelliklerinden dolayı “periferik aromatik bölge” olarak atıfta bulunulmuştur. ACHE'nin PAS'ındaki önemli amino asitler arasında serin, tirozin, aspartik asit ve triptofan bulunur. PAS, esnekliğe katkıda bulunan Ω -döngüsü dahil olmak üzere proteinin yüzeyindeki birçok halka ve ikincil yapısal eleman ile temas kurarak, substrat ve ligand bağlanmasında önemli bir rol oynar. Özellikle kolin gibi pozitif yüklü türlerin boğaza taşınması için değerlidir. Asilasyon bölgesine giden yolda substratları geçici olarak bağlayarak katalitik etkinliğe katkıda bulunur. Substratın kolin bölümünün katyon- π etkileşimi yoluyla aromatik asit Trp 86'ya bağlanmasına karşılık gelir (Chen, Zhu, Zhao ve Wang, 2021; De Boer vd., 2021; Moghadam vd., 2021; Xu vd., 2010). Yüksüz ve lipofilik olan bu bölge, ACH'nin kolin kısmının pozitif dörtlü aminini ve ayrıca yarışmalı inhibitörler olarak görev yapan dörtlü ligandları (edrofonyum ve N-metilakridinyum) ve organofosfatla inhibe edilmiş ACHE'yi etkin bir şekilde yeniden aktive eden dörtlü oksimleri bağlar. Katyonik substratlar, bu bölgede negatif yüklü bir amino asit ile değil, aktif bölgeye giden geçidi kaplayan 14 aromatik tortunun etkileşimi ile bağlanır. Bu geçitteki 14 amino asidin tamamı farklı

türler arasında yüksek oranda korunmuştur. Aromatik amino asitler arasında triptofan 84 kritiktir ve alanin ile yer değiştirmesi enzim aktivitesinde 3000 kat azalmaya neden olur (Colovic vd., 2013).

1.5.2.3. Oksianyon Boşluğu

İki glisin ve bir alaninden (Gly121, Gly122 ve Ala204) oluşan oksianyon boşluğu (OAH, Şekil 8'de turuncu), substratın geçiş durumunu stabilize eden hidrojen bağı donörleri sağlar (De Boer vd., 2021; Moghadam vd., 2021). OAH'ın alkilasyon adımı sırasında ayrılan gruplar üzerinde bir çekme kuvveti uyguladığını ve OAH'nin her iki kolinesterazda ACH hidrolizi için enerji bariyerini düşürdüğü bilinmektedir. OAH'daki bu kalıntılar, ACH'nin karboksil oksijeni ile hidrojen bağı oluşturacak şekilde hizalanır. Bununda OAH' nin ara ve geçiş durumlarında etkileşimleri stabilize etmeyi kolaylaştırdığını ve hidroliz reaksiyonu sırasında üretilen negatif yükün dengelenmesine yardım ettiği belirlenmiştir (Franjesevic vd., 2019; De Boer vd., 2021).

1.5.2.4. Açıl ve Kolin Bağlama Bölgesi

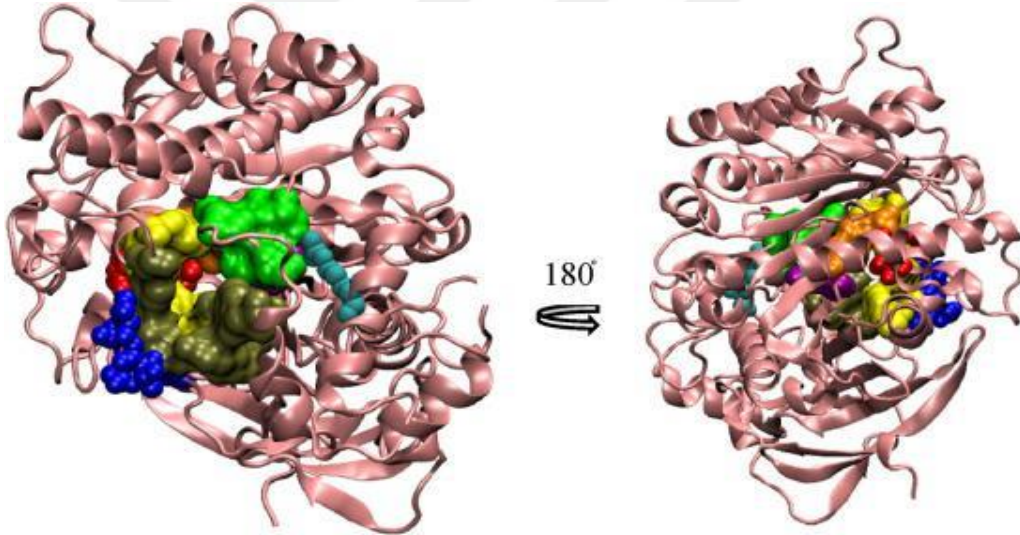
Bir ligand boğaza girdiğinde, katalitik üçlünün yakınında bulunan açıl bağlama bölgesi ve kolin bağlanma bölgesi (sırasıyla Şekil 8'de mavi ve yeşil renk), ligandın kataliz için konumlandırılmasına yardımcı olur. Açıl bağlama bölgesi, (Phe295, Phe297 ve Trp236), kolin ester serisinin daha büyük üyelerinin erişimini önleyerek substrat seçiciliğinden sorumludur ve ACH'nin asetil grubunu stabilize ettiği belirtilmiştir. Açıl bağlama bölgesi ve kolin bağlanma bölgesi; insan ACHE'sinde başlıca triptofan, tirozin ve fenilalanin'den oluşan hidrofobik bölgelerdir (De Boer vd., 2021; Moghadam vd., 2021).

1.5.2.5. Ω -döngüsü (Omega Döngüsü)

Yaklaşık 30 kalıntılı bir diziden oluşan Ω -döngüsü (OML, Şekil 8'de mor), aktif bölge geçit duvarının bir tarafı boyunca yer almaktadır. Bir substrat veya inhibitör varlığında, Ω -döngüsü, enzimin “nefes almasını” sağlamakta, geçidin boyutunu düzenlemede ve böylece ligandın aktif bölgeye geçişini sağlamada önemli bir rol oynar. OML, burulma hareketi ve parçalı birimlerin dalgalanmaları sayesinde, geçit genişlemesi gibi üç boyutlu değişikliklere uğrar (Masson vd., 1997; Shi, Boyd, Radic

ve Taylor, 2001; Cheng vd., 2017; De Boer vd., 2021).

Araştırmacılar; bir arka kapı, bir Ω -döngü kapısı ve önerilen yan kapı dahil olmak üzere, alt tabakaların vadiye girebileceği bir dizi kapı olduğunu öne sürmüşlerdir (De Boer vd., 2021). Substratların ve inhibitörlerin, uzun ve dar geçit girişi yoluyla katalitik bölgeye girdiği, ürünlerin ise ana çıkışın yanı sıra, arka kapı ve yan kapı gibi çıkabildiği alternatif kapıları vardır. Şekil 9'da ACH hidrolizinin parçalanma ürünlerinin çıkarılmasında yer alan üç olası ACHE bölgesi; arka kapı (Trp86, Gly448, Tyr449 ve Ile451), yan kapı (Asp74, Thr75, Leu76, Thr83, Glu84 ve Asn87) ve açıl döngü kapısı (Trp236, Arg247 ve Phe297) sırasıyla; kırmızı, mavi ve camgöbeği ile gösterilmiştir (Moghadam vd., 2021). Ligandların çoğu katalitik bölgeden arka kapı yoluyla çıkar, bazıları aktif bölgede tutulur ve çok azıda yan kapıdan ya da ana geçitten salınır (Cheng vd., 2017; Moghadam vd., 2021).

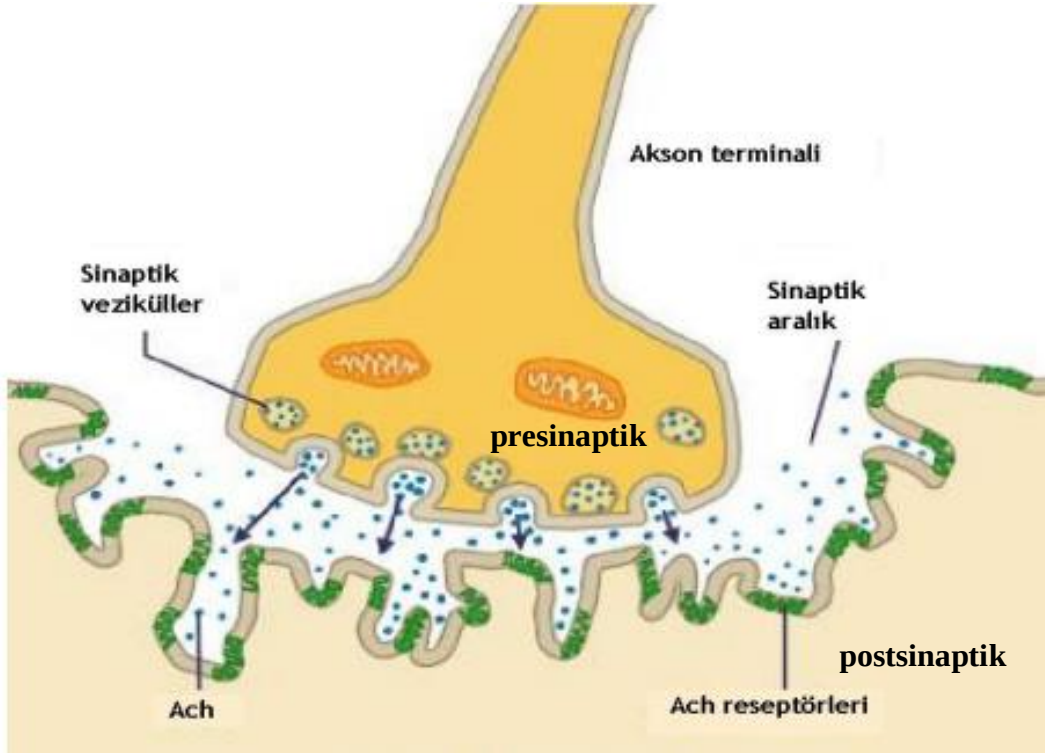


Şekil 9. ACH hidrolizinin parçalanma ürünlerinin çıkarılmasında yer alan üç olası ACHE bölgeleri

1.5.3. Asetilkolinesterazın İnhibitörleri

Asetilkolin, insan vücudunun merkezi, periferik ve otonom sinir sistemleri için önemli bir nörotransmitterdir. Presinaptik nöronda, kolin ve asetil-koenzim A'dan kolin asetiltransferaz enzimi tarafından sentezlenen ACH, presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve nörona sinir uyarısı geldiğinde veziküller içeriğini sinaptik aralığa bırakır. Sinaptik aralığa salındıktan sonra, hücre içi yanıtı tetikleyen postsinaptik zar üzerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanır (Şekil 10). Sinaptik

yarıkta postsinaptik reseptöre bağlanmayan ACH ile sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılan ACH, asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilir (Jeger, 2013).



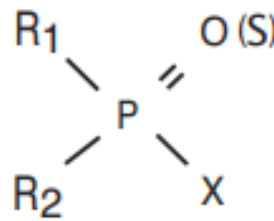
Şekil 10. Nöronların diğer nöronlara, kas veya salgı bezleri gibi nöron olmayan hücrelere mesaj iletimine olanak tanıyan özelleşmiş bağlantı noktaları olan sinapsların gösterimi

Kaynak: http://dent2.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/313_agizfizyo/7.pdf

ACHE'nin inhibisyonu asetilkolin birikimine, nikotinik ve muskarinik reseptörlerin hiperstimülasyonuna ve bozulmuş nörotransmisyonu yol açar (Li vd., 2021; Pohanka, 2011). Bu nedenle ACH seviyelerini arttırabilen bileşikler, kolinerjik reseptör ligandları veya asetilkolinesteraz inhibitörleri (ACHEI) olabilirler (Rampa vd., 2000). ACHE' nin inhibisyonu Alzheimer hastalığı (AH), miyastenia gravis, glokom, düz kas atonisi ve çeşitli otonom sinir sistemi fonksiyon bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde önemli bir terapötik etki mekanizması sahiptir (Li vd., 2021; Taylor vd., 2009). AH olan hastalarda ACH düzeylerinin yetersiz olduğu gösterilmiştir. ACH, beyindeki bilgilerin kaydedilmesi, depolanması ve hatırlanmasında kilit rol oynayan beynin kimyasal ara ürünlerinden biri olduğu için, yıkımını önleyen herhangi bir faktör, bir anti-Alzheimer ilacı olarak kabul edilebilir

(Pasandideh ve Arasteh, 2021). ACH'nin sinapstaki aktivitelerini düzeltmek ve kontrol etmek için ACHEI'ler kullanılmıştır (Abd El-Aziz vd., 2021). ACHE'in inhibisyonun sağlığa olan olumlu etkilerinin yanı sıra olumsuz etkileride olabilir. Olumsuz etkilere neden olan bazı ACHE inhibitör örnekleri arasında pestisitler, kimyasal savaş ajanları, ilaçlar ve fitokimyasallar bulunur (Li vd., 2021). Asetilkolinesteraz enziminin (ACHE, EC 3.1.1.7) birçok organofosfat ve karbamat bazlı insektisit hedefi olduğu bilinmektedir. Organofosfatlar, karbamatlar ve flavonoidler dahil olmak üzere geleneksel pestisitlerin ACHE'nin aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Li vd., 2020). Bu insektisitler, ACHE enziminin aktif bölgesinin fosforilasyon veya karbamilasyon tipi modifikasyonlarını teşvik ederek çalışır. Bu modifikasyonlar ACHE aktivitesini inhibe eder ve normalde sinir hücresi aktivitesinin uygun şekilde düzenlenmesi için gerekli olan bir adım olan asetilkolinin hidrolizini bloke eder (Hsu vd., 2008). ACHE'nin insektisitler tarafından inhibisyonu, sinirlerde aşırı heyecana, nörotransmisyonun tıkanmasına ve böceklerin ölümüne neden olur (Chai, Liu ve Wang, 2007).

Organofosfatlı pestisitler (OP), haşere kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır. OP'lerin, asetilkolinesterazın katalitik aktivitesini inhibe etme yetenekleri nedeniyle *in vivo* olarak asetilkolin birikimini indüklediği iyi bilinmektedir, bu da sonuçta sinir hücresi ölümü ve sinir sistemlerinde daha fazla işlev bozukluğu ile sonuçlanır (Zhang, Li, Sun ve Gao, 2015; Chen vd., 2021).

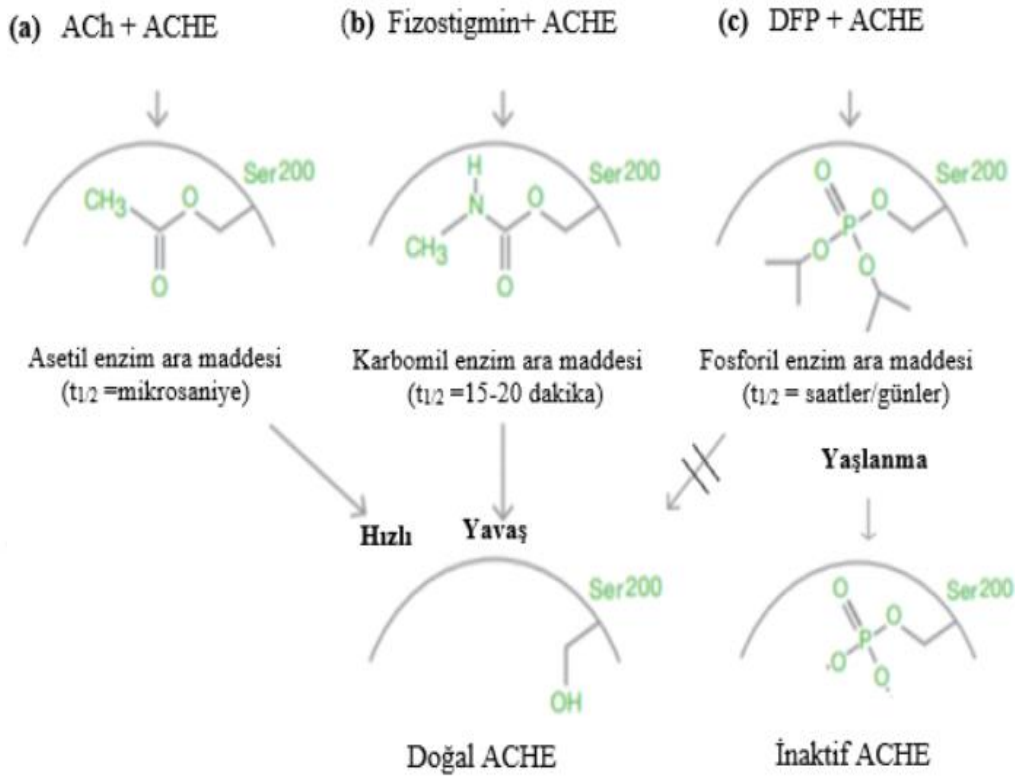


Şekil 11. Organofosfatlı pestisitlerin genel yapısı

Bir P=O parçasına sahip OP'lerin genel yapısında (Şekil 11) bulunan X (ayrılan grup): OP asetilkolinesterazı fosforile ettiğinde yer değiştirir ve hidrolize en duyarlı olan kısımdır; R₁ ve R₂ en yaygın olarak alkoksi, alkil, amino, tioalkil, vb gruplardır, diğer kimyasal gelmesi de mümkündür; oksijen ya da kükürt atomu da fosfora çift bağ ile bağlanır. Fosforotiyonat esterler (P=S) genellikle zayıf antikolinesterazlardır

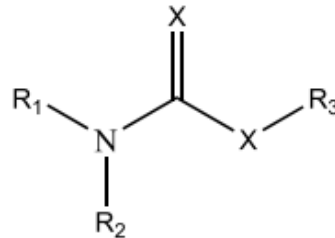
(Fukuto, 1990; Costa, 2006). Güçlü ACHE inhibitörleri olan OP'ler; geçitteki kalıntılara kovalent olarak bağlanan ve bu nedenle aktif bölgeyi terk edemeyen, geri dönüşü olmayan inhibitörler olarak kategorize edilir. OP bileşiklerinin fosfor atomu ile enzimin esteratik bölgesi arasındaki bağ, aynı enzim bölgesindeki asetatin karbonil karbonu (asetilkolin içinde) arasındaki bağdan çok daha karardır. Fosfor ile serinin hidroksil grubundaki oksijen arasında oluşan bu kovalent bağ, ACHE'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Karbon-enzim bağının kırılması birkaç mikrosaniyede tamamlanırken, fosfor-enzim bağının kırılması, OP'nin kimyasal yapısına baēlı olarak birkaç saatten birkaç güne kadar sürebilir. Fosforillenmiř ACHE'nin yeniden aktivasyonu, enzim-inhibitör kompleksi "yaşlandığında" gerçekteşmez (şekil 12-c). Yařlanma, iki alkoksi (R) grubundan birinin (enzimatik olmayan hidroliz yoluyla) kaybindan oluşur ve yaşlanma hızı alkoksi grubunun doēasına baēlıdır. Örneēin bir izopropoksi fosfat tarafından fosforile edilmiş ACHE en hızlı yaşlanır (Sussman vd., 1991; Costa, 2006; Dvir vd., 2010; Ochoa, Rodriguez ve Zuluaga, 2016; De Boer vd., 2021). Fosforillenmiř ACHE yaşlandığında, enzimin geri dönüşümsüz olarak inhibe edildiēi düşünölebilir ve aktivitesini deēiřtirmenin tek yolu, günler alabilen bir süreç olan yeni enzimin sentezidir (Costa, 2006).

şekil 12'de (Salgado, 2013) asetilkolinesteraz inhibitörlerinin saldırı mekanizmalarını gösterilmektedir. Asetikolinin ACHE tarafından mikrosaniyeler içinde hidrolize olup, enzimin tekrar serbest hale gelmesi çok kısa sürede gerçekteşmektedir (şekil 12-a). AH tedavisinde kullanılan ve geri dönüşümlü bir inhibitör olan fizostigminin etkisiyle bu hidrolizlenme işlemi gecikmekte veya yavaşlamaktadır (şekil 12-b). Bir organofosfat bileřiēi olan dizopropilflorofosfat, ACHE'lere kovalent baēlanarak fosforilasyonuna neden olup onu geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (şekil 12-c).



Şekil 12. Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin saldırı mekanizmaları

Karbamatlar, karbamik asitten (NH_2COOH) türetilen organik bileşiklerdir. Biyolojik olarak aktif karbamatların genel yapısındaki (Şekil 13, Colovic vd., 2013) X: oksijen veya kükürt, R_1 ve R_2 : genellikle organik veya alkil substitüenttir ancak hidrojen de olabilir ve R_3 çoğunlukla bir organik substitüent veya bazen de bir metal olabilir.

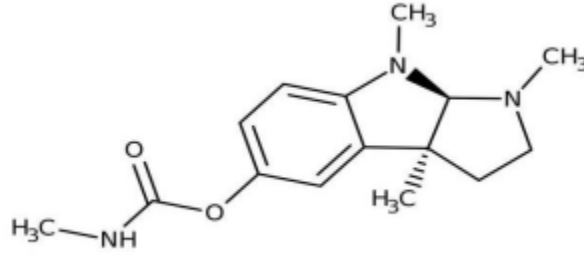


Şekil 13. Karbamatların genel yapısı

Karbamat inhibitörleri, organofosfor inhibitörleri gibi kolinesterazın aktif bölgesine bağlanır. Kovalent bağ stabil değildir ve karbamat kısmı bir süre sonra aktif bölgeden dekarbamilasyon yoluyla ACHE'den kolayca hidrolitik olarak ayrılır.

Karbamat bağlama mekanizması bazen, karbamat parçasının kendiliğinden gerçekleşen hidrolizi ve kolinesteraz aktivitesinin yeniden oluşumu nedeniyle yalancı geri dönüşümsüz olarak adlandırılır. Farmakolojik açıdan, karbamatlar ve organofosfor inhibitörleri arasında büyük bir fark vardır. Birçok karbamat kan beyin bariyerini geçmez ve karbamat parçasının onu geçmek için modifiye edilmesi veya kapsüllenmesi gerekir. Kuarterner amonyum içeren piridostigmin ve neostigmin buna örneklerdir. Kan beyin bariyeri tüm karbamatlar tarafından aşılmaz değildir, örneğin rivastigmin ve fizostigmin beyindeki ACHE'ye kolayca ulaşır. ACHE ve BCHE, bitkilerden ve mantarlardan gelen bir grup sekonder metabolit tarafından inhibe edilebilir. Galantamin ve huperzin, farmakolojide kullanılan bitki alkaloidlerinin örnekleridir. Alkaloidler α -kokain, α -solanin, tomatin, berberin, palmatin ve jatrorrhizin, kolinesterazları inhibe eden diğer metabolitlerdir. Aflatoksinler, ikincil metabolitler olarak eklenebilir (Costa, 2006; Pohanka, 2014; Vinotha Alex ve Mukherjee, 2021).

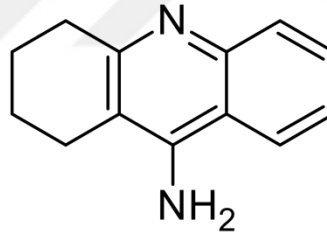
Fizostigmin, üçüncül bir amin karbamat (Şekil 14; $C_{15}H_{21}N_3O_2$) asetilkolin esteraz inhibitörüdür. Batı Afrika'da yetişen *Physostigma venenosum*'dan bir alkaloid olan fizostigmin (Antilirium®, Isopto®, eserine), bilinen en eski asetilkolinesteraz (ACHE) inhibitörüdür. 1864'te kalabar fasulyesinden izole edilmiş, 1935'te de ilk kez sentezlenmiştir. Kendiliğinden olan hidroliz, doğal enzimi ve işlevi yeniler. Fizostigmin, yalancı substrat gibi davranarak enzimlerin anyonik ve esteratik bölgeleriyle etkileşerek karbamillenmiş fonksiyonel olmayan bir enzim elde etmek üzere ACHE'yi inhibe eder. Fizostigminin üçüncül amin yapısı, kan-beyin bariyerine nüfuz etmesine ve merkezi ve periferik kolinerjik etkiler göstermesine izin verir. Kan beyin bariyerini geçme konusundaki eşsiz yeteneği, onu antikolinerjik toksisitenin merkezi ve çevresel etkilerini tersine çevirmek için paha biçilmez bir panzehir yapar. Etkinliğine rağmen, trisiklik antidepresan doz aşımı olan hastalarda fizostigmin uygulamasından sonra ani kalp durması olan hastaların yayınlanmasının ardından fizostigmin yeterince kullanılmamaktadır (Triggle, Mitchell ve Filler, 1998; Salgado, 2013; Arens ve Kearney, 2019; Batiha vd., 2020).



Şekil 14. Fizostigminin genel yapısı

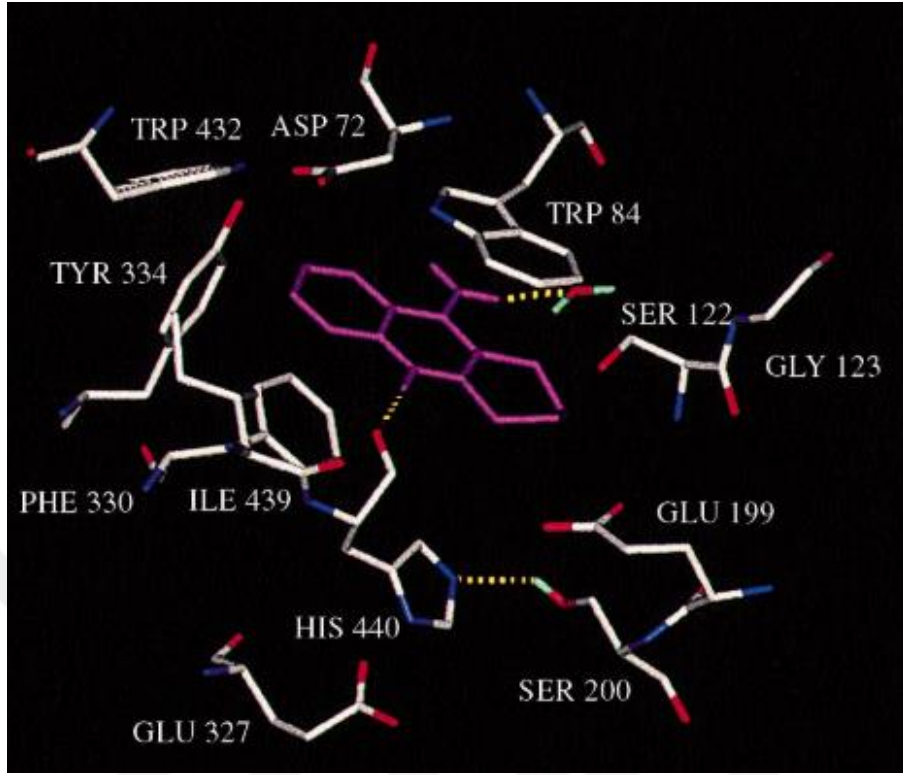
Kolinesteraz inhibitörleri (takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamin), AH' da kullanım için onaylanan ilk ilaç kategorisidir (Seltzer, 2007).

Takrin (1, 2, 3, 4-tetrahidroakridin-9-amin; Şekil 15), kan beyin bariyerini kolayca geçen ve ACHE inhibisyonu düşük fakat yine de etkili inhibisyon yoluyla Alzheimer hastalığını iyileştirmek için kullanılan oldukça etkili sentetik bir ilaçtır. Düşük biyoyararlanımı ve kısa yarı ömrü nedeniyle fizostigmin 1979'da kesildikten sonra, 1993'te takrin AD ilacı olarak reçete edilen ilk ACHE inhibitörüdür (Wagstaff ve McTavish, 1994; De Los Ríos, 2012; Pohanka, 2014).



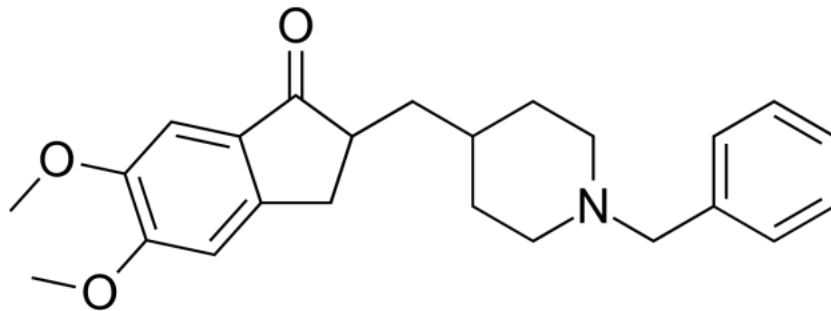
Şekil 15. Takrinin genel yapısı

Takrinin kristal yapısının araştırılmasıyla, takrinin 4-aminokinolin kısmının, enzime bağlanmasından sorumlu olan bölge olduğu anlaşılmıştır. Halka nitrojen atomu aracılığıyla His 440'ın oksijen atomuna doğrudan hidrojen bağı ile bağlıdır (Şekil 16, Rampa vd., 2000). Amino azotu bir su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. AD semptomları üzerindeki faydalı etkilerinin kanıtlarıyla birlikte, bazı durumlarda kullanımını sorunlu hale getiren birkaç olumsuz yan etki göstermesi nedeniyle, ikinci nesil ilaç donepezil'in geliştirildiği diğer birçok ACHE inhibitörü üzerinde çalışıldı ve geliştirmeye yönelik araştırma çabaları halen devam ediyor (Harel vd., 1993; Wlodek, Clark, Scott ve McCammon, 1997; Rampa vd., 2000; Zhao ve Tang, 2002).



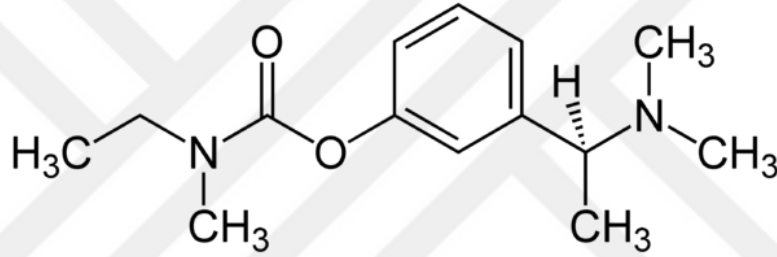
Şekil 16. Takrinin seçili aminoasitlerle etkileşimi

Donepezil, ACHE'nin spesifik, güçlü ve pipiridin tipi (Şekil 17, De Los Ríos, 2012), esas olarak rekabetçi olmayan fakat aynı zamanda bir miktar rekabetçi inhibisyonunu sergileyen karışık bir asetilkolinesteraz inhibitörü olarak tanımlanır. Orijinal olarak Eisai ve Pfizer tarafından geliştirilen Alzheimer hastalığı için oldukça etkili bir ilaç olarak Aricept ticari adı altında mevcuttur (Dooley ve Lamb, 2000; De Los Ríos, 2012; Pohanka, 2014).



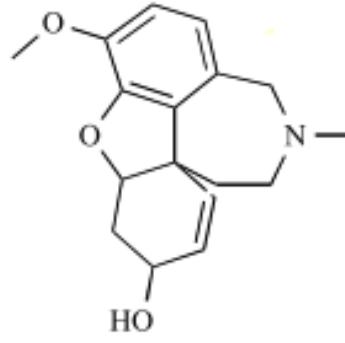
Şekil 17. Donapezilin genel yapısı

Rivastigmin, karbamilleyici, uzun etkili geri dönüşümlü ve rekabetçi olmayan bir karbamat asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Rivastigmin, hafif ile orta şiddetli Alzheimer hastalığı olan hastalarda oral tedavi olarak gösterilir. Rivastigmin, şu andaki mevcut olan ACHE'lerden farklı bir yapısal formüle (Şekil 18) sahip bir inhibitördür. Takrin ve donepezil, asetilkolinesteraz enzimine bağlanma dakikalar içinde hidrolize edildiğinden kısa etkili veya geri dönüşümlü ajanlar olarak sınıflandırılırken, rivastigmin; ACHE üzerinde 10 saate kadar uzun süreli inhibisyonu nedeniyle uzun etkili veya yalancı geri dönüşü olmayan bir ajan olarak sınıflandırılır. Klinik öncesi biyokimyasal çalışmalar, rivastigminin periferik inhibisyona göre merkezi sinir sistemi seçiciliğine sahip olduğunu göstermiştir (Spencer ve Noble, 1998; Jann ve FCCP, 2000).



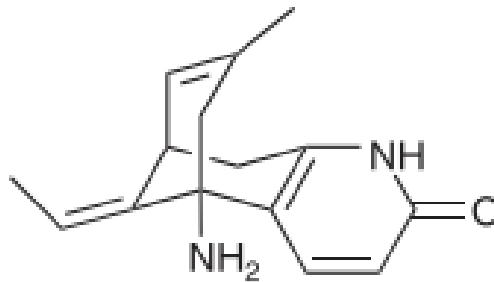
Şekil 18. Rivastigminin genel yapısı

Galantamin (Şekil 19, Colovic vd., 2013) ilk olarak 1950'lerde *Galanthus nivalis*'ten izole edildi. Alkaloid olan galantamin ikili bir etki şekline sahip olup, ACHE'nin yarışmalı bir inhibitörü ve nACHR'nin allosterik bir modülatörüdür. ACHE'nin bir inhibitörü olarak asetilkolinin bozunmasını bloke eder ve böylece mevcut ACH'nin konsantrasyonunu artırır. nACHR'nin allosterik güçlendirici ligandı olarak, reseptör tarafından üretilen iyon akışını artırır. Galantamin, ACHE ve nACHR üzerindeki ikili etkisi, ACHE'yi inhibe eden diğer pazarlanan ilaçlardan farklı olarak bir avantajdır. Aynı zamanda bu alkaloidin ACHE (IC_{50} : 1,995) için BCHE'den (IC_{50} : 12,59 μ M) daha seçici olduğu rapor edilmiştir (Hostettmann vd., 2006; Pohanka, 2014).



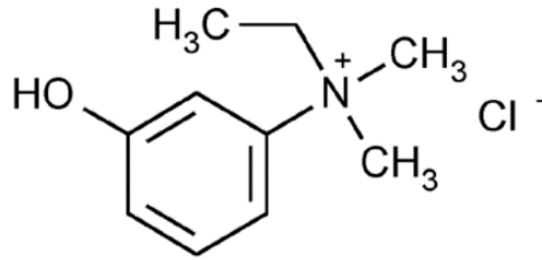
Şekil 19. Galantaminin genel yapısı

Huperzia serrata (Lycopodiaceae) geleneksel Çin tıbbında ateş, iltihabi durumların tedavisi ve hafızanın iyileştirilmesi için kullanılmış bir alkaloiddir (Şekil 20, De Los Ríos, 2012). 1980'lerin başında, huperzin A bu geleneksel ilaçtan izole edilmiştir. Ayrıca *Lycopodium selago* ve *Lycopodium varium* (Lycopodiaceae)'da bulunur. Huperzine A, rekabetçi olmayan veya karışık bir mekanizma ile hareket eden seçici bir ACHE inhibitörüdür. Huperzin A ve enzim arasındaki kompleksin oldukça yavaş ayrışması, huperzin A'nın uzun etki süresini açıklamaktadır. Ayrıca, bir inhibitör olarak ACHE (IC_{50} : 0,082 mM) olan etkisi, BCHE (IC_{50} : 74,43 mM) olan etkisinden 1000 kat daha fazladır. Bununla birlikte, Huperzine A, kan beyin bariyerini geçemeyecek kadar polarite gibi bazı dezavantajlar sunar. Huperzine A, ACHE'nin periferik anyonik bölgesine bağlanabilir ve etkinin, amiloidojenik sürecin iyileştirilmesinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. ACHE inhibisyonunun yanı sıra, huperzin A, N-metil-D-aspartat reseptörünün güçlü bir rekabetçi olmayan inhibitörüdür (Hostettmann vd., 2006; De Los Ríos, 2012; Pohanka, 2014).



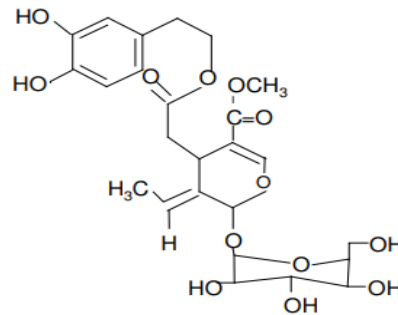
Şekil 20. Huperzin A'nın genel yapısı

Edrofonyum klorür (Şekil 21), nöromasküler kavşakta asetilkolin artışına neden olan hızlı başlangıçlı ve kısa sürede etkili, geri dönüşümlü ve yarışmalı bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Edrofonyum klorür, kısa süreli etkisi nedeniyle 1960'lardan beri otoimmün bir sinir-kas hastalığı olan miyastenia gravisin (MG) tanı testinde (tensilon testi) kullanılır ve bu test MG'li hastaların antikolinesteraz tedavisinin fazla olup olmadığını belirlemek için de kullanılır. Edrofonyum vücuttaki hem nikotinik hem de muskarinik reseptörlerde asetilkolin seviyesini arttırdığından, muskarinik reseptör aracılı yan etkiler ortaya çıkabilir. Edrofonyum kuaterner bir bileşiktir, bu nedenle kan beyin bariyerine nüfuz etme kabiliyeti düşüktür bu nedenle antikolinesterazın etkileri esas olarak merkezi sinir sisteminin dışında gerçekleşir (Naji ve Owens, 2021; Pope, 2017).



Şekil 21. Edrofonyum klorürün genel yapısı

Oleuropein (Şekil 22, Winkelhausen, Pospiech ve Laufenberg, 2005), sekoroitler adı verilen kumarin benzeri bileşiklerin çok özel bir grubuna aittir (Soler-Rivas, Espiñ ve Wichers, 2000).



Şekil 22. Oleuropein genel yapısı

Zeytin ağacının yaprakları ve çekirdekleri, antioksidan ve antimikrobiyal özellikler sergileyen oleuropein, verbascoside, ligstroside, tirosol ve hidrokstirosol gibi zeytin biyofenollerini bakımından zengindir. Zeytin ağacının tüm kısımları ve yağı oleuropein içermesine rağmen, zeytin ağacının yaprakları bu bileşiğin en zengin kaynağıdır (Ansari, Kazemipour ve Fathi, 2011). Araştırmacılar, oleuropeinin hastalığa ve böcek istilasına karşı ağaca direnç kazandırdığını belirtmişlerdir (Soler-Rivas vd., 2000). Oleuropein antikanser, nöroprotektif, kardiyoprotektif, gastroprotektif, antidiyabet, hepatoprotektif, antiobezite ve radyoprotektif gibi farmakolojik aktivitelere sahiptir. Oleuropeinin en önemli özelliği ise antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleridir. Bu nedenle glokom ve AH tedavisi için etkili bir inhibitör ve doğal kaynak olarak önerilmektedir (Aydın ve Akıncıoğlu, 2019).

1.6. *Ricania simulans*

Ricania türleri içerisinde *Orosanga japonica* (Melichar, 1898) (Homoptera: Ricaniidae) (Yalancı kelebek) dünyanın bir çok ülkesinde önemli bir zararlı böcek türü olarak kabul edilmektedir *Orosanga japonica* 2018 yılına kadar *R. simulans* olarak biliniyor iken, 2018 yılında yapılan DNA testleri sonrası bölgede yayılış gösteren türün *Orosanga japonica* (*Ricania japonica*) olduğu tescillenmiştir (Göktürk, 2020). Dünyada bitki zararlısı Hemipterler içerisinde *Ricania* türlerinden *R. simulans*, anavatanı olan Güney Asya'dan 1900'li yıllarda Rusya'ya, 1950'li yıllarda Gürcistan'a, 2006 yılında da Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'ne yayılmıştır (Göktürk ve Mihli, 2015).

Bu tarihten itibaren bölgede zarar yapmaya başlayan ve her yıl zararını arttıran *R. simulans*'ın erginlerinin gövdesi 8-11 mm uzunluğunda olup kanat açıklıkları 13-14 mm arasında değişen, kahverengi tonlarında kelebek görünümündedir (Şekil 23). Bundan dolayı yöre halkı tarafından "vampir kelebek" olarak adlandırılmaktadırlar. Beş nimf dönemine sahip olan *R. simulans*'ın son dönem nimfleri 4,5 mm boyunda ve 3 mm eninde olup süslü ve sarı tüylüdür (Şekil 24). Ağustos ayında yumurtalarını (Şekil 25) taze bitki filizlerine ve ince dalların daha çok alt kısımlarına ince yarıklar açarak bırakarak kışı yumurta döneminde geçirmektedir. Mayıs ayının sonunda nimfler, temmuz ayının başlarında ise erginler ortaya çıkmaya başlar (Göktürk, 2020; Göktürk ve Aksu, 2014; Gokturk, Kordali ve Bozhuyuk Usanmaz, 2017). Konak ayırt etmeksizin sebzeler, çalılar ve ağaçlarla beslenen bu zararlının nimfleri ve erginleri;

fasülye, mısır, lahana, biber ve patlıcan başta olmak üzere tüm tarım bitkilerinde, çalılarda ve genç ağaçların sürgünlerinde bitkilerin öz suyu ile beslenerek yaptığı direkt zararın yanında, bazı önemli bitki patojeni fungusların (*Cylindrocarpon* sp., *Fusarium* sp. ve *Pestalotiopsis quepinii*) vektörlüğünü de yapmaktadır. Büyük bir bölümü Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen çay, kivi ve fındık bu zararlı türün tehditi altındadır(Ak vd., 2013; Göktürk ve Aksu, 2014; Gokturk ve Mihli, 2016) . Bu tür zararlıların kontrolü için en yaygın seçenek kimyasal haşere kontrolüdür. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ürünlerin en önemlisi olan çayda organik tarım yapıldığı için herhangi bir kimyasal girdiye izin verilmemektedir. Bu nedenle çay ekimi için ayrılan bu bölgede *R. simulans*'a karşı kimyasal mücadele yöntemlerine izin verilmemektedir (Ak vd., 2013; Gokturk, Tozlu ve Kotan, 2018).



Şekil 23. *Ricania simulans* erginleri



Şekil 24. *Ricania simulans* nimfleri



Şekil 25. *Ricania simulans* yumurtaları

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, Artvin ilinin sahil kesimlerinden Mayıs-Eylül ayları arasında periyodik olarak *R. simulans*'ın nimfleri ve erginleri toplandı ve enzim kaynağı olarak kullanıldı. Toplanan tüm *R. simulans*'lar -20°C de muhafaza edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan tüm cihazlar, marka ve modelleriyle birlikte Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazların adları, markaları ve modelleri

Cihazın Adı	Cihazın Markası	Cihazın Modeli
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent	1260
Çalkalamalı İnkibatör	Lab. Companion	SI-600
Etüv	Memmert	UN-110
Sonikatör	QSonica	Q125
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific	Heraeus Multifugure X3R
Protein elektroforezi	Bio-RAD	Mini Protean Tetra Cell
pH metre	Thermo Scientific	Orion 3
Vorteks	Velp Scientifica	Vortex Mixer
Terazi	Precisa	XB 220A
Buzdolabı	Vestel	NF48001
Derin dondurucu	Vestel	FT280

2.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum karbonat, Sodyum hidroksit, Hidroklorik asit, Dipotasyumhidrojenfosfat, Potasyumdihidrojenfosfat, Bromofenol mavisi, Glisin, Gliserol, Sodyum asetat, Sodyum dodesil sülfat (SDS), Bakır sülfat, Hekzan, Nitrik asit (Merck firmasından satın alındı).

ATC, 5,5'-Ditiyobis (2-Nitrobenzoik asit) (DTNB), Takrin, Edrofonyum klorür, Epoksi ile aktive edilmiş Sefaroz 6B, Triton X-100, N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED), Akrilamit, N,N'-Metilen Bisakrilamit, Amonyum

persülfat (APS), Tris, Tris-HCl, Sodyum klorür, Borik asit, Potasyum sodyum tartarat, Commansie Brilliant Blue G- 250, B-Merkaptoetanol, Sığır serum albümin (BSA), Asetik asit, Metanol, Etanol, Dimetil sülfoksit (DMSO), Potasyumdikromat, Gümüş nitrat, p-formaldehit, Fosforik asit, Silikajel 60 (Sigma firmasından satın alındı).

Protein standart (14,4-98 kDa) (Bio-Techne firmasından satın alındı).

2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

2.2.3.1. Tampon Çözeltiler

- **0,1 M (pH 4,0) 100 mL Sodyum Asetat Tamponu:** 0,487 ml asetik asit ve 0,124 gram sodyum asetat yaklaşık 85 ml saf suda çözülüp, pH'sı 4'e ayarlanarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **0,1 M (pH 4,5) 100 mL Sodyum Asetat Tamponu:** 0,368 ml asetik asit ve 0,488 gram sodyum asetat yaklaşık 85 ml saf suda çözülüp, pH'sı 4,5'a ayarlanarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **0,1 M (pH 5,0) 100 mL Sodyum Asetat Tamponu:** 0,206 ml asetik asit ve 0,525 gram sodyum asetat yaklaşık 85 ml saf suda çözülüp, pH'sı 5'e ayarlanarak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **50 mM 500 mL (pH 7,0) Fosfat Tamponu:** 0,274 gram K_2HPO_4 ve 3,192 gram KH_2PO_4 yaklaşık 450 mL saf suda çözülüp, pH'sı 7,0'e ayarlanarak hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı
- **50 mM 500 mL (pH 7,0) Fosfat Tamponu:** 1,661 gram K_2HPO_4 ve 1,052 gram KH_2PO_4 yaklaşık 450 mL saf suda çözülüp, pH'sı 7,0'e ayarlanarak hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı
- **50 mM 500 mL (pH 7,4) Fosfat Tamponu:** 2,646 gram K_2HPO_4 ve 1,335 gram KH_2PO_4 yaklaşık 450 mL saf suda çözülüp, pH'sı 7,4'e ayarlanarak hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.
- **50 mM 500 mL (pH 7,4) Sodyum Fosfat Tamponu:** 2,157 gram Na_2HPO_4 ve 1,528 gram NaH_2PO_4 yaklaşık 450 mL saf suda çözülüp, pH'sı 7,4'e ayarlanarak hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- **50 mM 500 mL (pH 8,0) Fosfat Tamponu:** 3,748 gram K_2HPO_4 ve 0,476 gram KH_2PO_4 yaklaşık 450 mL saf suda çözülüp, pH'sı 8,0'e ayarlanarak hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

- **1 M Tris tamponu (pH 9,0):** 12,114 g Tris, 80 mL saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 9'a ayarlandı ve son olarak toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **0,012 M (pH 10,0) 250 mL Sodyum Borat Tamponu:** 0,1854 gram borik asitten alınarak yaklaşık 200 ml saf suda çözülüp, pH'sı 10,0'a ayarlanarak hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
- **0,012 M (pH 11,0) 250 mL Sodyum Borat Tamponu:** 0,1854 gram borik asitten alınarak yaklaşık 200 ml saf suda çözülüp 0,1M NaOH ile pH'sı 11,0'e ayarlanarak hacmi 250 ml'ye tamamlandı.
- **0,5 M NaCl (pH 7,4) 100 mL Fosfat Tamponu Çözeltisi:** 2,922 gram NaCl yaklaşık 80 ml pH 7,4 fosfat çözeltisinde çözünerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- **0,2 M Edrofonyum Klorür İçeren 0,012 M (pH 11,0) Sodyum Borat Tampon çözeltisi:** 0,66 gram edrofonyum klorür, 20 mL 12 mM (pH 11,0) borat tamponunda çözülerek 0,1M NaOH ile pH'sı 12,0'ye ayarlandı.
- **12 mM Edrofonyum Klorür Ve 0,5 M NaCl İçeren (pH 7,4) 20 mL Fosfat Çözeltisi:** 48,41 mg edrofonyum klorür alınarak 0,5 M NaCl içeren 15 mL pH 7,4 fosfat çözeltisinde çözünerek hacmi 20 mL'ye tamamlandı.
- **% 1'lik Triton X-100:** 50 µl Triton X-100 alınarak 0,1M Na₂HPO₄ pH 7,4 tamponu ile 5 mL'ye tamamlandı.

2.2.3.2. Substrat Çözeltileri

- **75 mM ATC:** 21,68 mg ATC, 1 mL 50 mM (pH 7,4) fosfat tamponunda çözüldü.
- **10 mM DTNB:** 3,96 mg DTNB, 1 mL 50 mM (pH 7,4) fosfat tamponunda çözüldü.

2.2.3.3. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **Lowry A Çözeltisi (0,1 M NaOH içinde % 2 (a/h) Na₂CO₃):** 0,4 g NaOH ve 2 g Na₂CO₃ saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.
- **Lowry B Çözeltisi (% 1 CuSO₄.5H₂O çözeltisi):** 1 g CuSO₄.5H₂O saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.

- **Lowry C Çözeltisi (% 2 Na-K Tartarat Çözeltisi):** 2 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.
- **Lowry D Çözeltisi:** 1 kısım Lowry B ve lowry C karıştırılarak hazırlandı.
- **Lowry E Çözeltisi:** 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.
- **Sığır Serum Albümin Çözeltisi (1mg/mL):** 5 mg BSA saf suda çözülüp hacmi 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.
- **0.1 M NaOH İçinde % 0,1 (a/h) SDS Çözeltisi:** 0,4 g NaOH ve 0,1 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti 4 °C'de saklandı.

2.2.3.4. Sodyum Dodesil Sülfat Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

- **SDS-PAGE Yürütme Tampon (pH 8,3):** 14,4 g glisin ve 3 g Tris bazı, 800 mL saf suda çözülerek 5 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edilip hacmi saf suyla 1000 mL'ye tamamlandı.
- **SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi:** 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 µL % 10 SDS, 100 µL % 0,1 bromofenol mavisi, 250 µL % 80 gliserol ve 60 µL 2-merkaptotanol'ün karıştırılmasıyla hazırlandı ve -20 °C'de saklandı.
- **Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (% 30) Stok Çözelti:** 29 g akrilamid'in 25 mL çözeltisi ile 1 g N,N'-metilenbisakrilamid'in 25 mL çözeltisi karıştırıldı, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- **Boya Uzaklaştırma Çözeltisi:** 30 mL metanol ve 10 mL asetik asit, toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- **Coomassie Brilliant Blue G-250, Reaktif:** 0,25 g Coomassie Brilliant Blue G250 45 mL metanol, 45 mL saf su ve 10 ml glisial asetik asit karışımında çözülmesiyle elde edildi.
- **1 M Tris-HCl Tamponu pH 6,8:** 121,14 g Tris, 800 mL saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 8,8'e ayarlandı ve son olarak toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı.
- **1,5 M Tris Tamponu pH 8,8:** 181,71 g Tris 800 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl çözeltisi ile pH'ı 8,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.
- **% 10 (a/h)'luk SDS Çözeltisi:** 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye

tamamlandı.

- **% 10 (a/h)'luk Amonyum Persülfat:** 1 g amonyum persülfat saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı ve çözelti -20 °C'de saklandı.
- **TEMED:** Orjinal şişesinden direk alınarak kullanıldı.
- **Gliserol Çözeltisi % 80 (h:h):** 80 mL gliserolün hacminin saf suyla 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- **% 0,1 (a/h)'lik Bromofenol Mavisi:** 10 mg bromofenol mavisinin saf suda çözülüp hacminin 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- **Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi:** 150 µL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 µL % 0,1 bromofenol mavisi, 250 µL % 80 gliserol ve 460 µL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20 °C'de saklandı.
- **Doğal PAGE Yürütme Tamponu (pH 8,3):** 14,4 g glisin ve 3 g Tris bazı yaklaşık 800 mL saf suda çözüldükten sonra çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

2.2.3.5. Diyaliz Membranlarını Aktifleştirme Çözeltileri

- **% 0,3' lük 500 mL NaHSO₃ Çözeltisi (a/h):** 1,5 gram NaHSO₃ alınarak 300 mL saf suda çözüldü, hacmi 500 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin sıcaklığı 80 °C'ye gelene kadar ısıtıldı.
- **% 0,2' lük 500 mL H₂SO₄ Çözeltisi (h/h):** 1 mL H₂SO₄ 100 mL saf suda çözüldü, hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

2.2.3.6. İnhibitör Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **1 mM Takrin Çözeltisi:** 2,3 mg takrin tartılarak 1 mL saf suda çözüldü.
- **1 mM Edrofonyum Klorür Çözeltisi:** 2,01 mg Edrofonyum klorür tartılarak 1 mL saf suda çözüldü.
- **1mM K Kompleks Çözeltileri:** Komplekslerin molekül ağırlıklarına göre alınacak miktar hesaplandı ve 10 mL DMSO'da çözüldü.
- **Bitki Ekstraktlarının Çözeltileri:** Bitki ekstraktları oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 2 g alınarak 20 mL suda homojenize edildi. Elde edilen homojenat 20°C'de 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı inhibisyon çalışmalarında kullanıldı.

2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması

Yaklaşık 5'er g *R. simulans* erginlerinden ve nimflerinden alınarak buz banyosu içinde 20 mL fosfat tamponunda (pH 7,4) sonikasyonla homojenize edildi. Homojenatlar, 4° C'de 90 dakika 22.000xg'de santrifüjlendi. Süpernatant, gözenek boyutu 0,45 µm olan şırınga ile filtrelendikten sonra ham ekstrakt olarak kullanıldı (Son ve diğerleri, 2002).

2.3.2. Edrofonyum-Sefaroz 6B Afinite Kolonun Hazırlanması

Epoksi ile aktive edilmiş Sefaroz 6B, sinterlenmiş bir cam filtre üzerinde saf su ile yıkandı. Jel bulamacı, 20 mM edrofonyum klorür içeren 12 mM borat tamponuna (pH 11,0) aktarıldı (1/2 oranında). Jel bulamacının pH'sı 1 M NaOH ile 12'ye ayarlandı ve 50° C'de 48 saat çalkalanarak inkübe edildi. Kolon dolgu malzemesi 1,5 x10 cm çapındaki cam kolona dolduruldu ve herbiri kolon hacminin 10 katı olacak şekilde sırasıyla 0,1M sodyum asetat tamponu (pH 4,5), 12 mM sodyum borat tamponu (pH 10,0) ve saf su ile yıkandı. Edrofonyum-Sepharose 6B kolonu, 280 nm'de absorbans vermeyene kadar saf su ile yıkandı. Kolon, 50 mM 100 mL fosfat tamponu (pH 7,4) ile dengeye getirildi.

2.3.3. Enzim Örneklerinin Kolona Uygulanması

Hazırlanan ergin ve nimf ekstraktları dengelenen bu kolona ayrı ayrı uygulandı. Daha sonra kolon, protein içeriği 280 nm'de absorbans 0,01'in altına düşene kadar 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ve 0,5 M NaCl içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı. Kolondan 20 mM edrofonyum klorür ve 0,5 M NaCl içeren 50 mM sodyum fosfat tamponunun (pH 7,4) geçirilmesi ile elüsyon gerçekleştirildi. Elüatlar 3 mL' lik hacimler halinde 20 mL/saat akış hızı ile toplandı. Her bir fraksiyon edrofonyum klorür fazlasının uzaklaştırılması için 50 mM sodyum fosfat tamponuna (pH 7,4) karşı 24 saat süreyle üç kez tampon çözeltisinin değiştirilmesiyle diyaliz edildi. Elde edilen fraksiyonlarda protein miktarı hesaplandı ve enzim aktiviteleri belirlendi. Fraksiyonların protein miktarlarına ve enzim aktivitesi değerlerine göre 2 eksenli grafikleri çizildi. Daha sonra ACHE aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek saf enzim kaynağı olarak kullanıldı (Hodgson ve Chubb,

1983; Son ve diğeri, 2002).

2.3.4. Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı (Lowry, Rosebrough, Farr ve Randall, 1951). Kalibrasyon grafiğı çizmek amacıyla protein standardı olarak Sığır Serum Albümini çözeltisi (1 mg/mL) hazırlandı ve deney tüplerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu. Standart içeren tüplerin dışında ham enzim ekstraktından 10 µL ve saf enzimden ayrı bir deney tüpüne 50 µL ilave edildi. Standartların ve örneklerin son hacimlerini 500 µL tamamlayacak şekilde 0,1 N NaOH içindeki % 0,1 (a/h) SDS çözeltisinden ilave edilip vortekslendi. BSA' nın final konsantrasyonunun 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/mL olması sağlandı. Her bir tüpe 1 mL Lowry E çözeltisi (% 2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO₄.5H₂O ve 0,1 N NaOH içerisinde % 2 Na₂CO₃) ilave edilip vortekslendi ve 10 dakika bekletildi. Standartlara ve numunelere saf su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin C Reaktifi'nden 100 µL ilave edildi, vortekslendi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. BSA standartlarının ve örneklerin, 650 nm'de absorbanslar okundu. Kalibrasyon grafiğı çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Ricania simulans'tan elde edilen asetilkolinesterazın saflık derecesinin kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi, % 5'lik yığma jeli ve % 12'lik ayırma jeli kullanarak (Tablo 2) SDS-PAGE Laemmli metoduna göre yapıldı (Laemmli, 1970). Bunun için elektrofrez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üstüne konulup ve kısıkaçlarla tutturulup jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma ve yığma jelleri hazırlandı.

Tablo 2. SDS-PAGE’de kullanılan yığma ve ayırma jellerinin bileşenleri ve oranları

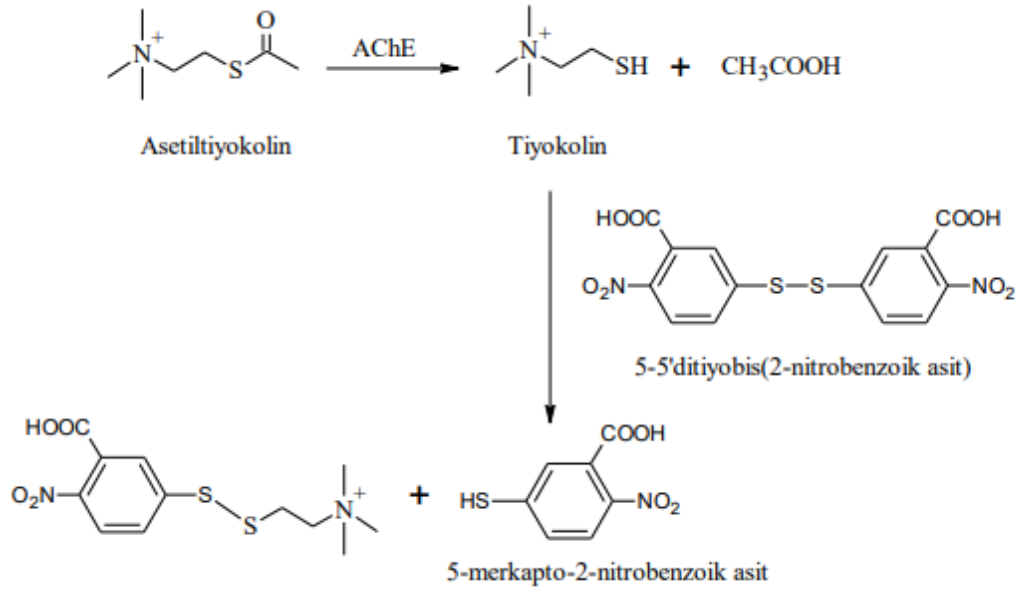
Bileşen	% 5’lik Yığma Jeli Bileşenleri (mL)	% 12’lik Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	1,4	3,3
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,33	4,0
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5
% 10 SDS	0,02	0,1
% 10 APS	0,02	0,1
TEMED	0,002	0,004

Hazırlanan elektroforez cam plakaların alt kısmına % 12’lik ayırma jeli, üst kısmına % 5’lik yığma jeli dolduruldu. Jel karışımları plakalar arasına yüklendikten sonra tank SDS yürütme tamponu ile dolduruldu. Enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile molekül ağırlıkları 14,4-98 kDa arasında değişen proteinleri içeren standart protein çözeltisinden kuyucuğun birine yükleme yapıldı. Daha sonra diğer her bir kuyucuk yaklaşık 25 µg protein içerecek şekilde, SDS-PAGE yükleme boyası ile karıştırıldı ve kaynar su banyosunda 3 dakika bekletildi. Protein numuneleri ve standart, Hamilton şırıngası kullanılarak kuyucuklara yüklendi.

Elektroforez ünitesi, güç kaynağına bağlanarak kuyucuk başına 3 mA olacak şekilde sabit akımda yürütüldü. Elde edilen jel saf suyla yıkandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue G-250 boyama çözeltisi içerisinde 3 saat bekletildi. Jel üzerinde protein bantları belirginleşene kadar boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edildi. Elde edilen jel kromatogramı, jel görüntülüne cihazında kaydedildi.

2.3.6. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Tayini

Bu tayin için kullanılan Ellman yönteminin ilk basamağında asetilkolinesteraz, substrat olarak kullanılan asetiltiyokolinin, tiyokolin ve aseteta hidrolizini katalizler. Oluşan tiyokolin ile DTNB reaksiyonundan ise sarı renkli 5-merkapt-2-nitrobenzoik asit oluşumu gerçekleşir (Şekil 26, Komersová, Komers ve Cegan, 2007; Pohanka, Hrabínova, Kuca ve Simonato, 2011). Tiyokolinin oluşum oranı, reaksiyon sonucu meydana gelen bu sarı renkli bileşiğin UV-GB spektrofotometrede 412 nm’de absorbansının okunması ile ölçülür (Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961).



Şekil 26. Ellman metodunun reaksiyon mekanizması

Enzim ünitesi (EU), 25°C’de 1 dakikada 1 µmol substratı (ATC) ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak belirlendi.

Özgül aktivite (EU/mg protein), mg protein başına düşen enzim aktivitesi olarak hesaplandı.

2.3.7. pH’ın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Asetilkolinesterazın optimum pH’sını belirlemek üzere, 0,1 M asetat (pH 4,5), 50 mM fosfat (pH 6,0, 7,0, 8,0), 1 M Tris (pH 9,0) ve 0,012 mM sodyum borat (pH 10,0, 11,0) tamponlarını kullanarak pH 4,0-11,0 sınırları arasında aktivite ölçümleri yapıldı. Değişen pH değerlerine karşılık çizilen aktivite grafiğinden en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değeri belirlendi (Zhu ve Brindley, 1992; Gao ve Zhu, 2001; Mohamed, Abdel-Gawad ve Ghazy, 2007; Xiao vd., 2010).

2.3.8. Sıcaklığın Asetilkolinesteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Asetilkolinesterazın en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değerinde, optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla, 10-80° C’ler arasında 10°C artan sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçüldü. Değişen sıcaklık değerlerine karşılık çizilen aktivite grafiğinden en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum sıcaklık değeri belirlendi (Gao ve Zhu, 2001; Mohamed vd., 2007; Xiao vd., 2010; Zhu ve Brindley, 1992).

2.3.9. ACHE İnhibisyonu

1 mM konsantrasyonunda hazırlanan stok inhibitör çözeltilerinden 10-100 µL arasında değişen hacimlerde alınarak üzerine 20'şer µl DTNB ve ATC çözeltileri ilave edilerek hacimleri 50 mM pH 8,0 fosfat tamponu ile 980 µL'ye tamamlandı. Bu karışıma, 20 µl ACHE çözeltisi eklendikten sonra, 10 dakika inkübe edildi ve ardından absorbanstaki değişim, çift ışın demetli Shimadzu UV-1800 spektrofotometresi ile köre karşı 412 nm'de ölçüldü (Ellman vd., 1961). Kör olarak, katılan enzim hacmi kadar 50 mM pH 8,0 fosfat tampon ilave edilen karışım kullanıldı. Ayrıca kompleks çözeltiler hazırlanırken kullanılan DMSO'nun inhibisyon etkisi, hesaplanan inhibisyon değerinden çıkarılarak komplekslerin inhibisyon etkisi hesaplandı. Bağlı aktivite (%) değerleri aşağıda verilen Denklem 1'e göre hesaplandı.

$$\text{Bağlı Aktivite (\%)} = \frac{\text{İnhibitör varlığındaki enzim aktivitesi}}{\text{Enzim aktivitesi}} \times 100 \quad (\text{Denklem 1}).$$

IC₅₀ değeri, ACHE aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlandı ve bu değer inhibitör konsantrasyona karşı çizilen bağlı aktivite (%) grafiği kullanılarak belirlendi. İnhibisyon çalışmalarında, asetilkolinesterazın spesifik inhibitörleri olan takrin ve edrofonyum klorür, yeni sentezlenmiş bileşikler ve doğal bitki ekstraktları kullanıldı.

2.3.10. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bursa İlinin Orhangazi ilçesinden 2021 yılında toplanan zeytin yaprakları, ceviz yaprakları, ceviz yeşil kabukları ve çınar yaprakları su ile temizlendikten sonra oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı. Kuru bitki materyallerinden 2'şer g tartılarak 20 mL saf su içerisinde 60 °C'de 24 saat boyunca ekstrakte edilerek 10.000xg'de 30 dakika santrifüjleldiler. Elde edilen çözeltilerin 60 °C'de düşük basınç altında evaporatör yardımıyla çözücülerini uzaklaştırıldı. Geri kalan kuru maddeler bir spatül yardımıyla kazınarak 0,0001 hassasiyetle tartıldılar. Miktarı belirlenen kuru maddeler 10 mL saf suyla tekrar süspansiyon edildi. Zeytin yaprağı çözeltisinin silikajel kolonuna uygulanmasından elde edilen fraksiyonlar ve diğer bitkilerin çözeltileri inhibitör kaynağı olarak kullanıldı.

2.3.11. Silika Jel Kolonunun Hazırlanması ve Zeytin Yaprağı Ekstrağının Kolona Uygulanması

10 g silikajel tartıldı ve 20 mL hekzanda 60 dakika bekletildi. 5x20 cm boyutlarındaki kolon hekzan ile 4-5 defa yıkandı. Şişirilen silikajel kolona yüklendi ve tekrar hekzanla yıkama işlemi yapıldı. Kolon 100 mL etanol:su karışımı ile dengelendi (farklı polaritedeki etanol:su (20:80, 10:90, v/v) karışımları kullanıldı). Zeytin yaprağı ekstraktından elde edilen 15 mL süpernatant yavaş yavaş kolona yüklendi. Kolondan etanol-su karışımı geçirilerek elüsyon yapıldı. Elüatlar 3 mL'lik hacimler halinde 10 mL/saat akış hızı ile toplandı. Fraksiyonların her biriyle *R. simulans* ACHE'lerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri belirlendi. Etkili olan fraksiyonların IC₅₀ değerleri hesaplanarak, HPLC analizleri yapıldı.

2.3.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC) Oleuropein Analizi

Bitki ekstraktlarındaki ve zeytin yaprağı fraksiyonlarındaki oleuropein içeriğini belirlemek için HPLC'de uygulanan kromatografik yöntem koşulları Tablo 3'e göre hazırlandı (Ansari vd., 2011). Oleuropein (% 80 saflıkta) standart maddesinin 0,3 – 9,0 mM aralığında farklı konsantrasyonlardaki kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin alıkonma zamanlarındaki pik alanları belirlenerek kalibrasyon grafiği çizildi. Ham bitki ekstraktlarının ve zeytin ekstrağından elde edilen fraksiyonların HPLC analizleri bu yöntemle göre yapılarak oleuropein konsantrasyonları belirlendi.

Tablo 3. Oleuropein için HPLC yöntem koşulları

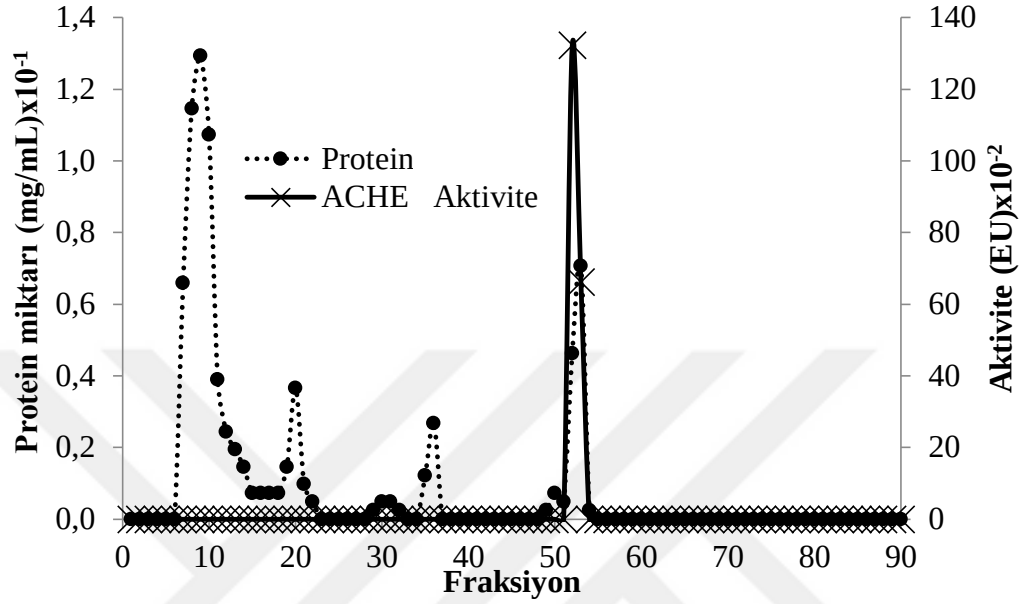
Yöntem Şartları	Oleuropein
Kolon	ACE 5 C18 (250x4,6 mm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	280 nm
Hareketli Faz	Su:Asetonitril (80;20 (h/h); pH 3)
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Akış Hızı	1mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

2.4. Bulgular

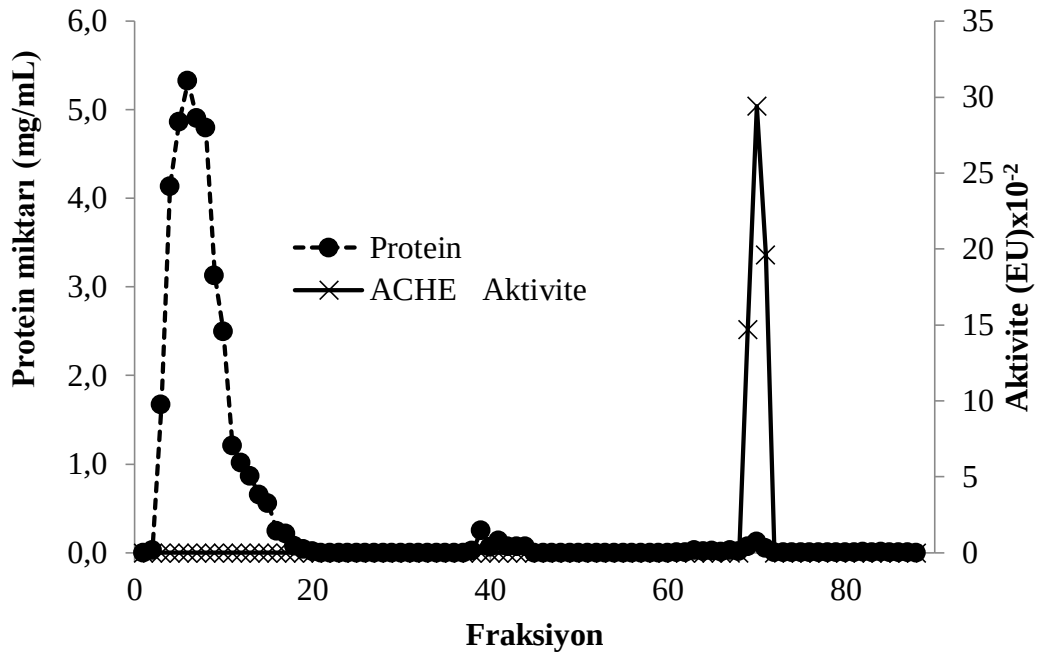
2.4.1. *Ricania simulans* Ergin ve Nimflerinden ACHE'nin Saflaştırılmasına Ait Bulgular

50,0 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile dengelenen Edrofonyum-Sefaroz 6B kolonuna, *R. simulans* erginlerinden ve nimflerinden hazırlanan ham enzim ekstraktları ayrı ayrı uygulandı. Kolon üç aşamalı olarak elüe edildi. Birinci aşamada kolondan çıkan fraksiyonlar, 280 nm'de absorbans vermeyene kadar 50,0 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile yürütüldü (Şekil 27; 1-26. fraksiyonlar, Şekil 28; 1-29. fraksiyonlar). İkinci aşamada kolon, 0,5 M NaCl içeren 50 mM fosfat tamponu ile elüsyon işlemine devam edildi (Şekil 27; 26-43. fraksiyonlar, Şekil 28; 29-58. fraksiyonlar). Bu aşamaya kadar olan tüm elüatlarda protein gözlenmesine rağmen ACHE aktivitesi gözlenmedi. Üçüncü aşamada ise kolonun elüsyonu, 12,0 mM edrofonyum klorür ve 0,5 M NaCl içeren 50,0 mM fosfat tamponu ile sonlandırıldı. Protein tespit edilen fraksiyonlarda yapılan enzim aktivitesi tayinlerinde ilk başta aktivite gözlenmedi. Bunun sebebi olarak kolonda tutulmuş olan edrofonyum moleküllerinin kısmen elüsyon sırasında enzim ile beraber ortamdan ayrıldığı ve enzimi inhibe ettiği düşünüldü. Bundan dolayı protein gözlenen tüm fraksiyonlar bir gece boyunca diyaliz edildi. Bu aşamadan sonra tüm fraksiyonlarda protein ve enzim tayinleri tekrarlandı. Bu aşamadan sonra erginler için 51-53. fraksiyonlar arasında, nimfler için 69-71. fraksiyonlar arasında ACHE aktivitesi tespit edildi (Şekil 27Şekil 28). ACHE aktivitesi gözlenen fraksiyonlar erginler ve nimfler için ayrı ayrı

birleştirildi. Birim hacim başına daha yüksek protein ve aktivite elde etmek için birleştirilen fraksiyonlar amicon filtre yardımıyla 5000 rpm’de konsantre edildi. Bu iki çözeltide, protein miktarı ve enzim aktivitesi tayinleri tekrarlandı.



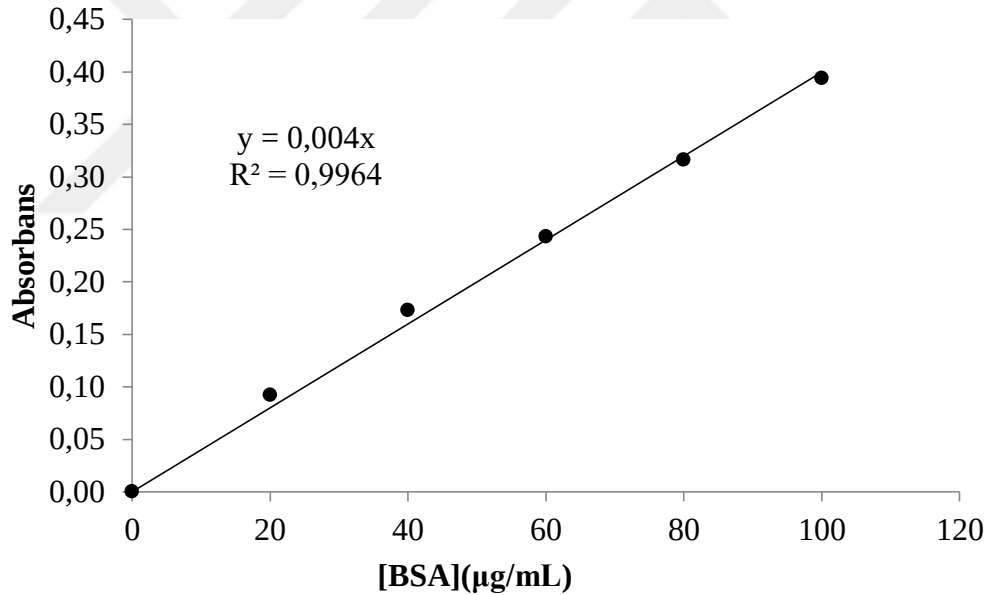
Şekil 27. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonunda ergin *R. simulans*' tan asetilkolinesterazın saflaştırılması



Şekil 28. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonunda nimf *R. simulans*'tan asetilkolinesterazın saflaştırılması

Standart olarak BSA'nın kullanıldığı farklı konsantrasyondaki çözeltiler ile çizilen standart çalışma grafiğinden $y=0,004x$ denklemine sahip $0,9964 R^2$ değerinde doğrusal bir eğri elde edildi (Şekil 29). Elde edilen doğru denkleminde fraksiyonların ve saf enzim çözeltilerinin toplam protein miktarları belirlendi (Şekil 27 ve 28; Tablo 4). Saflaştırılan ergin ACHE çözeltisinin 0,19 mg protein içerdiği ve spesifik aktivitesinin $1.635,3 \pm 168$ EU/mg protein olduğu, saflaştırılan nimf ACHE çözeltisinin 0,08 mg protein içerdiği ve spesifik aktivitesinin $6,6 \pm 1,2$ EU/mg protein olduğu belirlendi (Tablo 4).

Ricania simulans erginlerinden izole edilen asetilkolinesteraz edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonuyla % 34,2'lik bir verimle, tek adımda 251,6 kat saflaştırıldı. *Ricania simulans* nimflerinden izole edilen asetilkolinesteraz, edrofonyum-Sepharose 6B afinite kolonuyla % 2,2'lik bir verimle, tek aşamada 65,5 kat saflaştırıldı (Tablo 4).

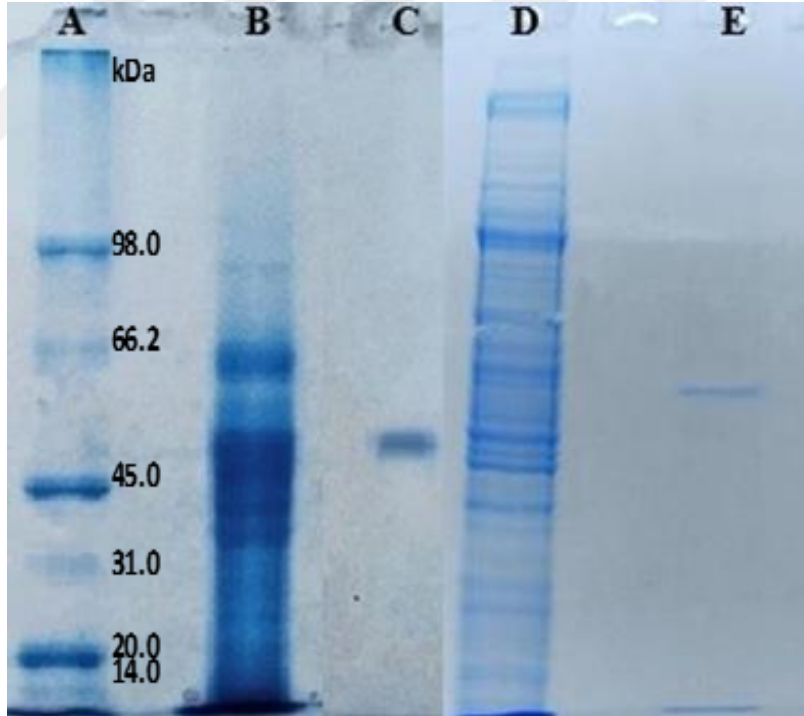


Şekil 29. Protein tayini için çizilen standart çalışma grafiği

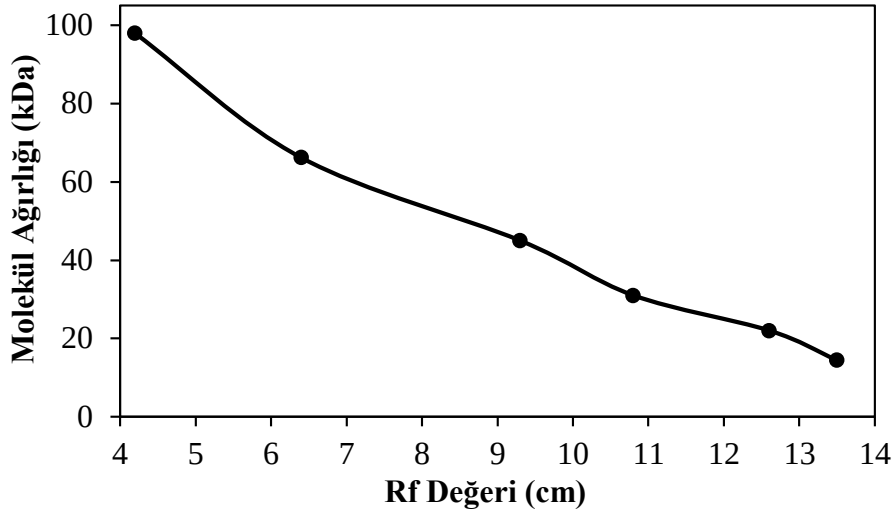
Tablo 4. *Ricania simulans* ekstratlarından ACHE'nin afinite kromatografisiyle saflaştırılmasının özeti

Evre		Hacim (mL)	Toplam aktivite (EU)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Saflaştırma oranı	Verim (%)
Ergin	Homojenat	22,5	909,0±86,7	138,8±0,9	6,5±0,8	1	100
	Afinite	6,5	310,7±31,8	0,19±0,02	1.635,3±168	251,6	34,2
Nimf	Homojenat	18,0	23,8±2,1	237,42±8,17	0,1±0,04	1	100
	Afinite	0,45	0,53±0,04	0,08±0,007	6,6±1,2	65,5	2,2

Enzimlerin saflılığını belirlemek için % 12 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı (Şekil 30). Elde edilen SDS-PAGE kromatogramında *R. simulans* ergin ve nimf ACHE'larına ait tekli protein bantları gözlemlendi (Şekil 30-C-E). Saflaştırılmış ACHE'lerin alt birim moleküler ağırlıkları, erginler için yaklaşık 52 kDa ve nimfler için yaklaşık 59 kDa olarak belirlendi (Şekil 30, 31).



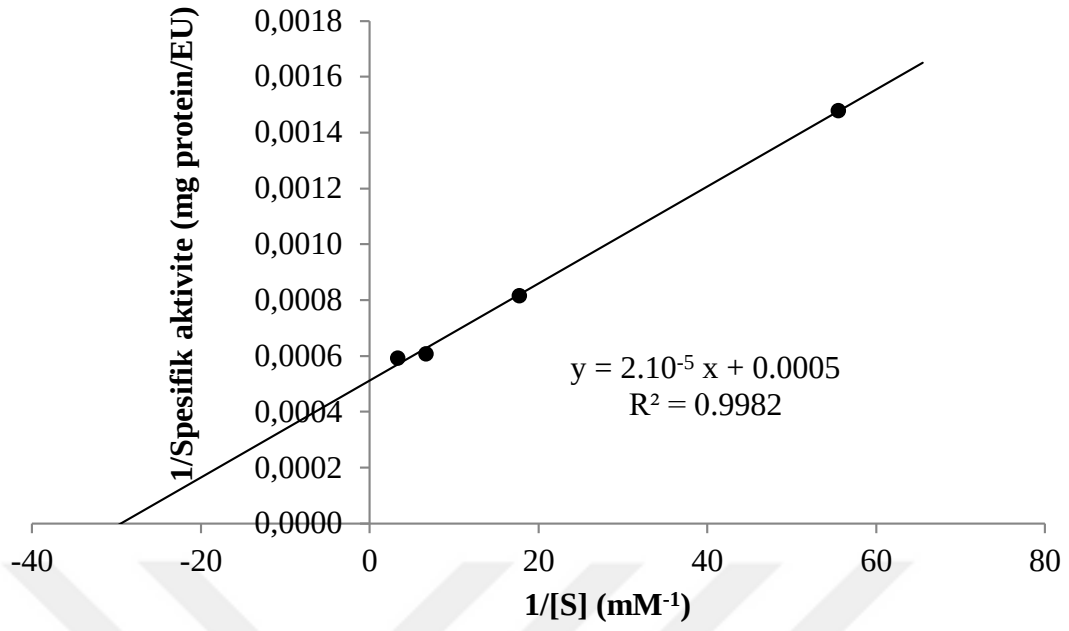
Şekil 30. Enzim örneklerinin sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (A; Moleküler ağırlık markörleri, B; ergin homojenatı, C; Erginlerin saflaştırma ACHE'si, D; nimf homojenatı, E; Nimfin saflaştırma ACHE'si)



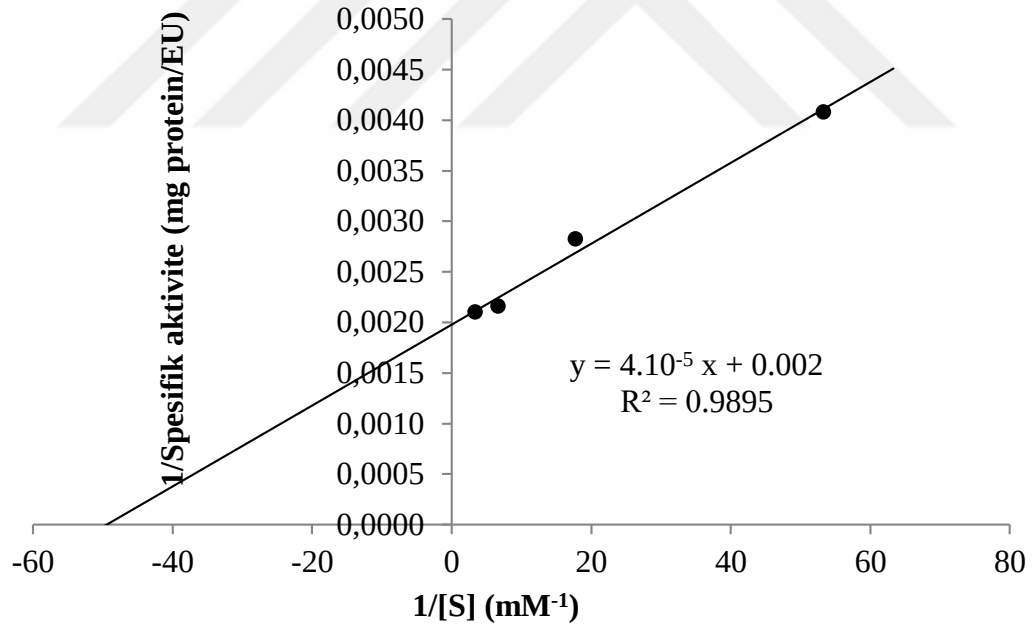
Şekil 31. Enzimlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan Rf-molekül ağırlığı grafiği

2.4.2. *Ricania simulans* Ergin ve Nimf ACHE'lerine Ait Kinetik Veriler

Ricania simulans ergin ve nimf ACHE'lerin kinetik verileri enzim konsantrasyonu sabit tutulup, farklı derişimlerdeki ATC substratı kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiği ve grafikten elde edilen doğru denkleminde yararlanılarak hesaplandı (Şekil 32 ve 33). *R. simulans* ergin ACHE'si için ATC substratı varlığında K_m , V_{maks} ve k_{kat} değerleri sırasıyla $0,04 \pm 0,01$ mM, $2.000,0 \pm 250$ EU / mg protein ve $104,5 \pm 13$ dk⁻¹ olarak tespit edildi. *R. simulans*'ın nimf ACHE'si için sırasıyla bu değerler $0,02 \pm 0,01$ mM, $500,0 \pm 50$ EU / mg protein ve $30,3 \pm 6.4$ dk⁻¹ olarak belirlendi (Tablo 5). Nimflerin ACHE'si K_m değerine bakıldığında ATC substratına daha duyarlı davrandı. Fakat ergin ACHE'sinin V_{maks} ve k_{kat} değerlerinin yüksek olduğu ve buna bağlı olarak birim zamanda daha fazla substratı ürüne çevirdiği gözlemlendi.



Şekil 32. Substrat olarak ATC kullanılarak çizilen ergin *R. simulans* ACHE'nin Lineweaver-Burk grafiği



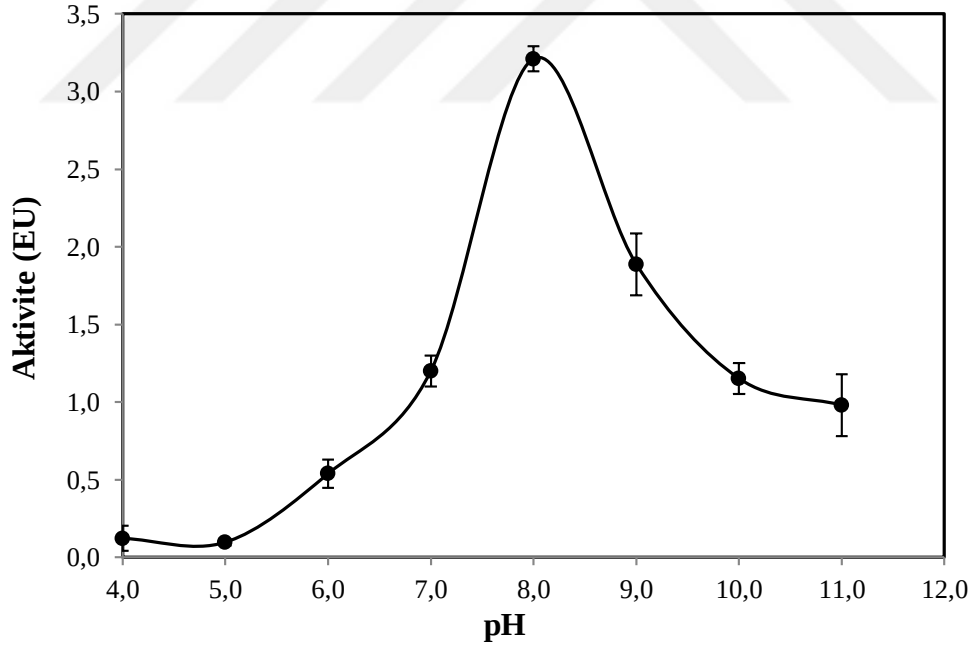
Şekil 33. Substrat olarak ATC kullanılarak çizilen nimf *R. simulans* ACHE'nin Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 5. *Ricania simulans* ACHE 'lerinin ATC varlığında kinetik parametreleri

Evre	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Vmaks (EU/mg protein)	K _m (mM)	k _{kat} (dk ⁻¹)
Ergin	8,0	40,0	2.000,0±250	0,04±0,01	104,5±13
Nimf	8,0	40,0	500,0±50	0,02±0,01	30,3±6,4

Ricania simulans erginlerinden ve nimflerinden saflaştırılan ACHE'lerin optimum pH ile sıcaklık değerleri çizilen pH-aktivite ve sıcaklık-aktivite grafiklerinden hesaplandı (Şekil 34-37). *R. simulans*'ın hem erginlerinin hem de nimflerinin ACHE'lerinin maksimum aktiviteyi pH 8,0'de ve 40 °C'de gösterdikleri belirlendi (Tablo 5).

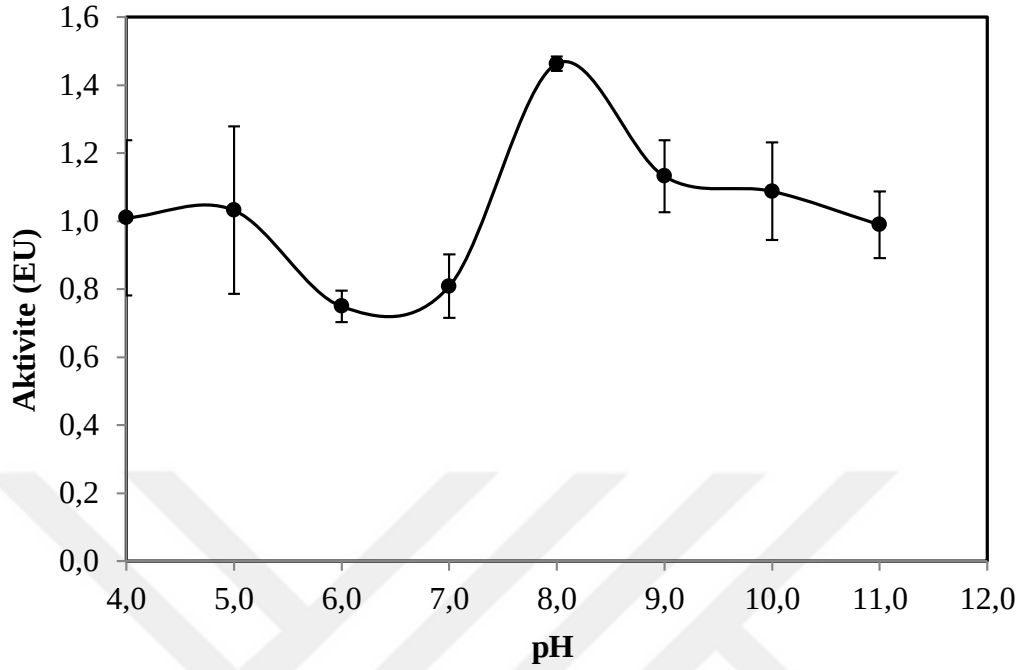
Ricania simulans'ın erginlerinin asidik koşullarda (pH 4,0-5,0) optimum pH'daki aktivitesinin yaklaşık % 3'ü kadarını gösterirken, pH 9,0'un üzerindeki alkali ortamlarda bu aktivitenin yaklaşık % 30'a kadar düştüğü belirlendi (Şekil 34).



Şekil 34. *Ricania simulans*'ın erginlerinden saflaştırılan ACHE üzerinde pH'ın etkisi

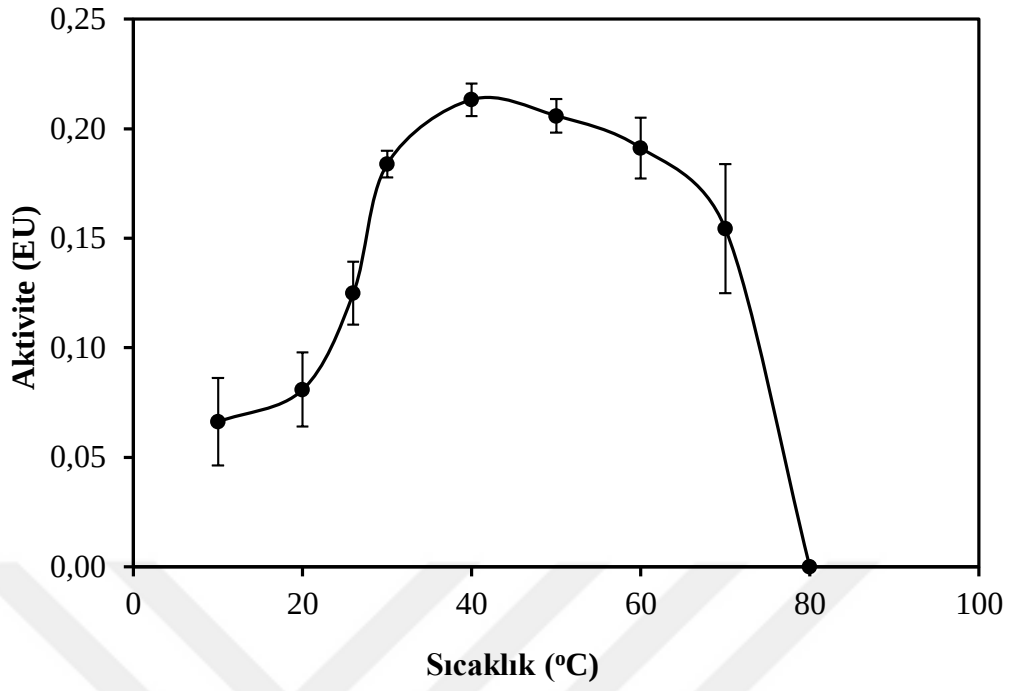
Ricania simulans nimflerinden saflaştırılan ACHE'ler asidik ortamlarda (pH 4,0-5,0) ve alkali ortamlarda (pH 9,0-11,0) en yüksek aktivitenin gözlenmiş olduğu pH 8,0'deki aktivitesinin yaklaşık % 70 oranında korumasına rağmen pH 6,0 ve 7,0'de

bu aktiviteyi yaklaşık % 50 oranında kaybettiği tespit edildi (Şekil 35).

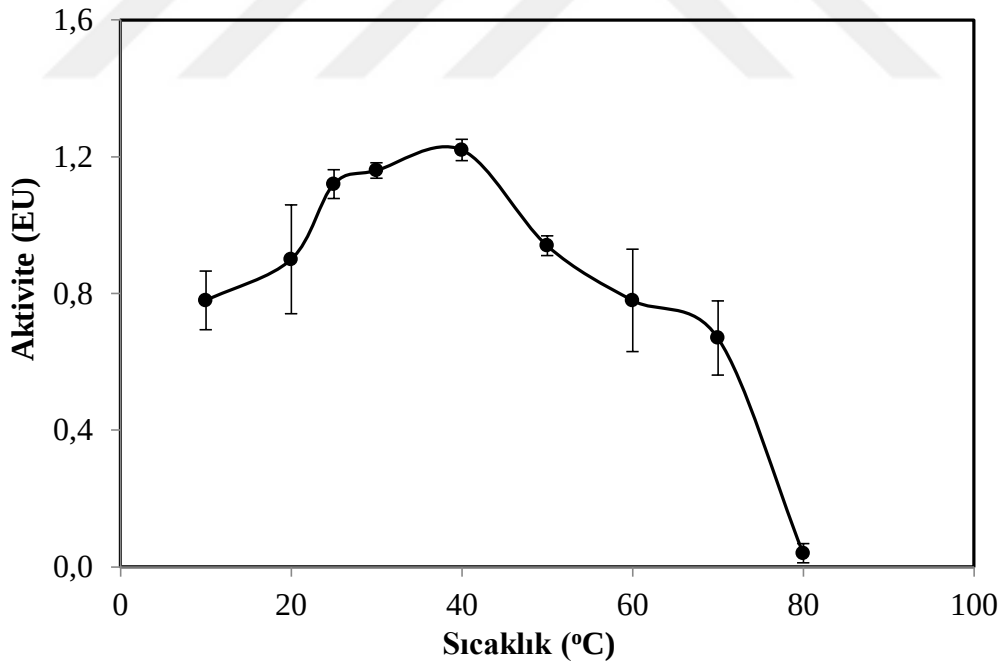


Şekil 35. *Ricania simulans*'ın nimflerinden saflaştırılan ACHE üzerinde pH'ın etkisi

Ricania simulans erginlerinin ACHE'si 20 °C'nin altındaki sıcaklıklarda en yüksek sıcaklıkta gözlenen aktivitesinin yaklaşık % 65 oranında kaybederken, nimfler ise bu aktivite kaybını yaklaşık % 45 oranında 60 °C'nin üstünde kaybettiği gözlemlendi. Her iki enziminde kadar, 80 °C'ye ulaşıldığında aktivitelerini tamamen kaybettikleri tespit edildi (Şekil 36 ve 37).



Şekil 36. *Ricania simulans*'ın erginlerinden saflaştırılan ACHE üzerinde sıcaklığın etkisi



Şekil 37. *Ricania simulans*'ın nimflerinden saflaştırılan ACHE üzerinde sıcaklığın etkisi

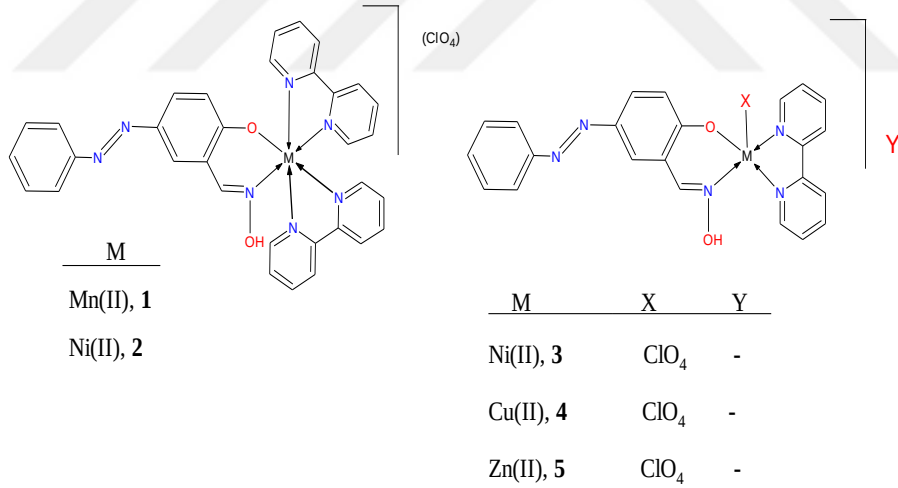
2.4.3. İnhibisyon Çalışmalarına Ait Bulgular

2.4.3.1. Bazı Kimyasalların ACHE'nin İnhibisyonuna Ait Bulgular

İnhibisyon çalışmalarında, asetilkolinesterazın bilinen yarışmalı inhibitörleri olan takrin ve edrofonyum klorür ile yeni sentezlenmiş olan bileşikler (Dural, 2019) (Tablo 6 ve Şekil 38) kullanıldı.

Tablo 6. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşik listesi

Bileşiğin kodu	Bileşiğin formülü	Bileşiğin konsantrasyonu (mM)
K-1	[Mn(HL)(bipy) ₂] (ClO ₄)	1
K-2	[Ni(HL)(bipy) ₂] (ClO ₄)	1
K-3	[Ni(HL)(bipy)(OCIO ₃)]	1
K-4	[Cu(HL)(bipy) (OCIO ₃)]	1
K-5	[Zn(HL)(bipy) (OCIO ₃)]	1

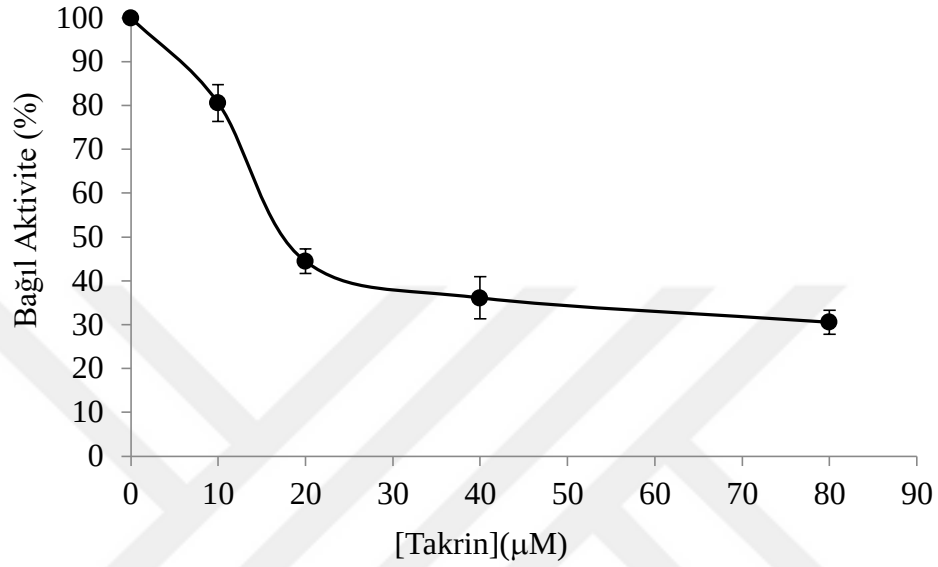


Şekil 38. K komplekslerinin genel molekül yapısı

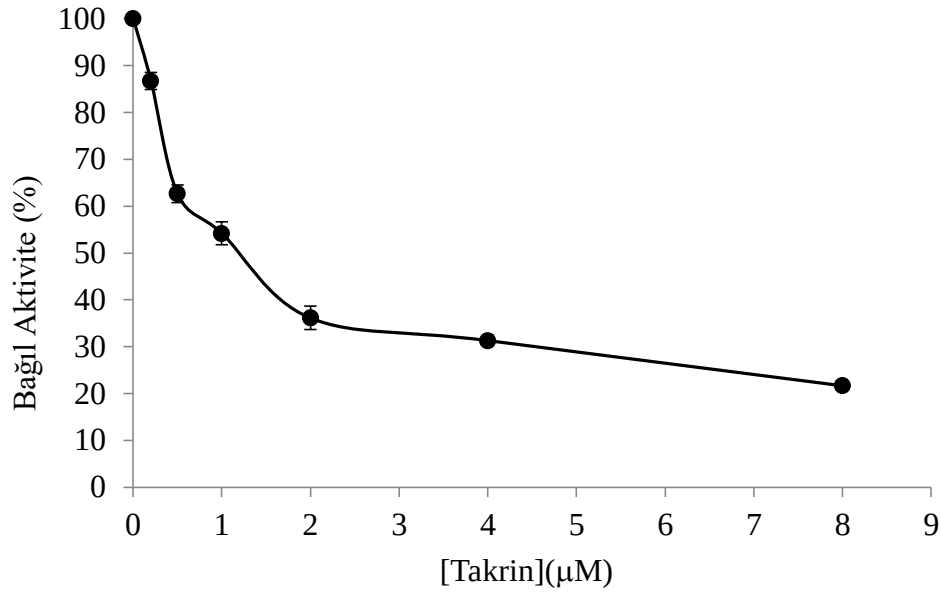
Takrin ve edrofonyumun farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri varlığında ergin ile nimflerin ACHE'lerinin aktiviteleri belirlendi ve kontrol aktivitelerine oranlanarak % inhibisyon değerleri hesaplandı (Tablo 7 ve Şekil 39-42).

Tablo 7. Takrin ve edrofonyum klorür varlığında elde edilen IC₅₀ değerleri

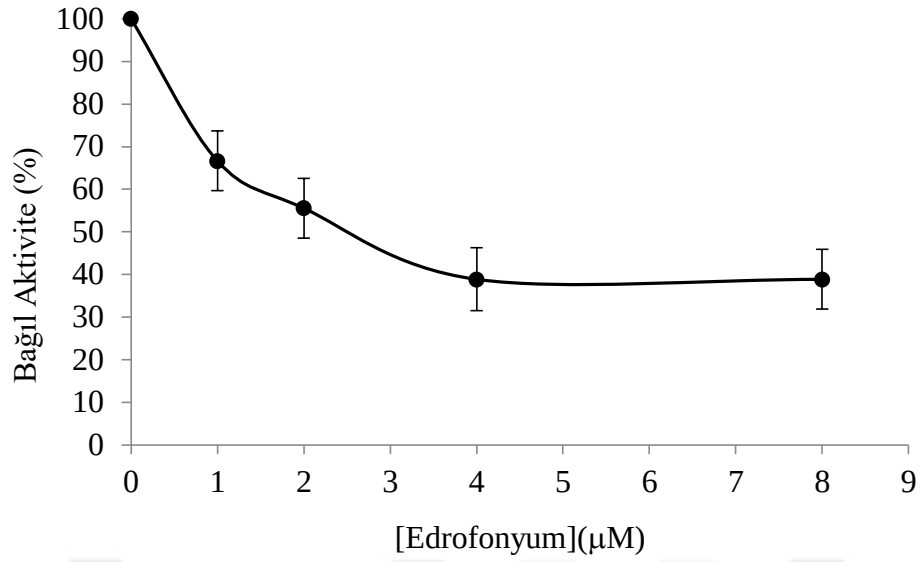
Bileşik	Ergin IC ₅₀ (μM)	Nimf IC ₅₀ (μM)
Takrin	18,0 ± 1,9	1,2 ± 0,4
Edrofonyum klorür	2,4 ± 0,3	0,6 ± 0,09



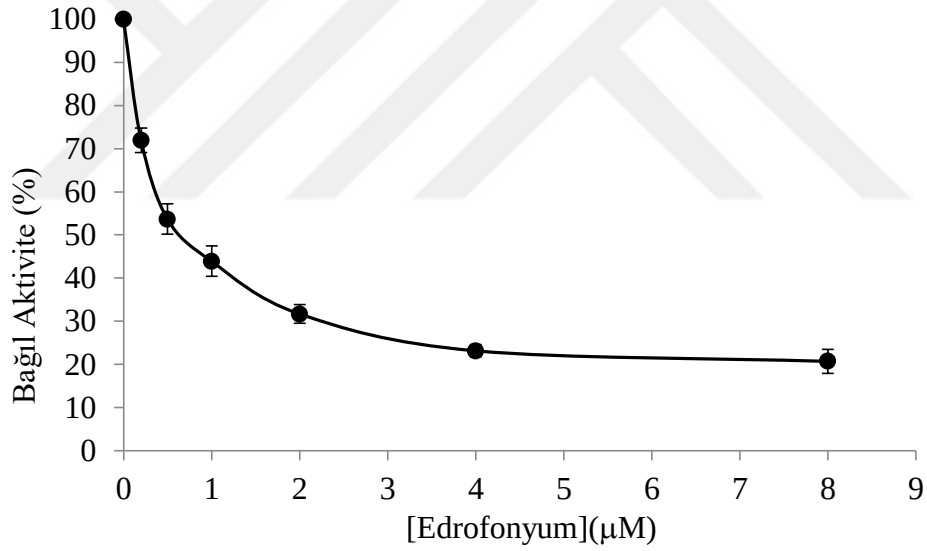
Şekil 39. Ergin ACHE'sinin takrin varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu-bağıl aktivite (%) grafiği



Şekil 40. Nimf ACHE'sinin takrin varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu-bağıl aktivite (%) grafiği



Şekil 41. Ergin ACHE'sinin edrofonyum varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



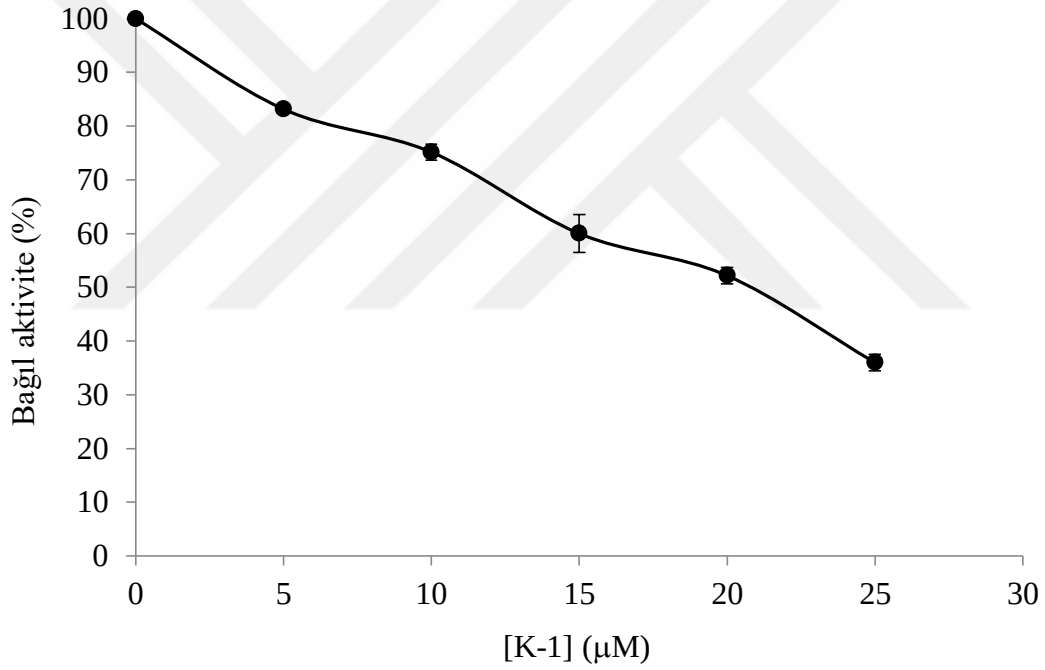
Şekil 42. Nimf ACHE'sinin edrofonyum varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği

Tablo 7'de verilen K (1-5) bileşiklerin varlığında, *R. simulans* ergin ve nimf ACHE'lerinin aktivitelerinde azalma gözlemlendi. Bu bileşiklerin ACHE aktivitesini % 50 azaltan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) belirlendi. Ergin ve nimf ACHE'lerinin IC_{50} değerleri sırasıyla K-1 kompleksi için $22,0 \pm 1,8 \mu M$ ve $5,6 \pm 1,2 \mu M$; K-2 için $14,0 \pm 1,2 \mu M$ ve $16,5 \pm 1,9 \mu M$; K-3 için $16,0 \pm 2,1 \mu M$ ve $4,6 \pm 0,8 \mu M$; K-4 için $7,2 \pm 1,4$

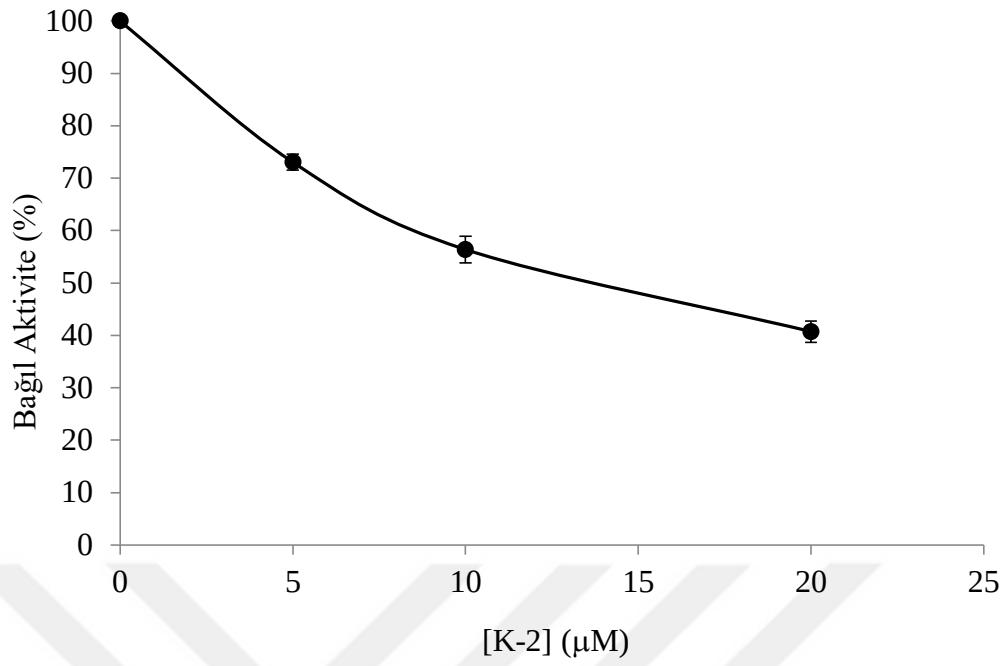
μM ve $6,4\pm0,7 \mu\text{M}$; K-5 için $3,2\pm0,8 \mu\text{M}$ ve $10,1\pm2,4 \mu\text{M}$ olarak belirlendi (Tablo 8 ve Şekil 43-52). Bipiridin-metal komplekslerinden erginlerde en etkili bileşik K-5, nimflerde ise en etkili bileşik K-3 olarak tespit edildi.

Tablo 8. *Ricania simulans* ACHE'leri için bazı kompleksler varlığında elde edilen IC_{50} değerleri

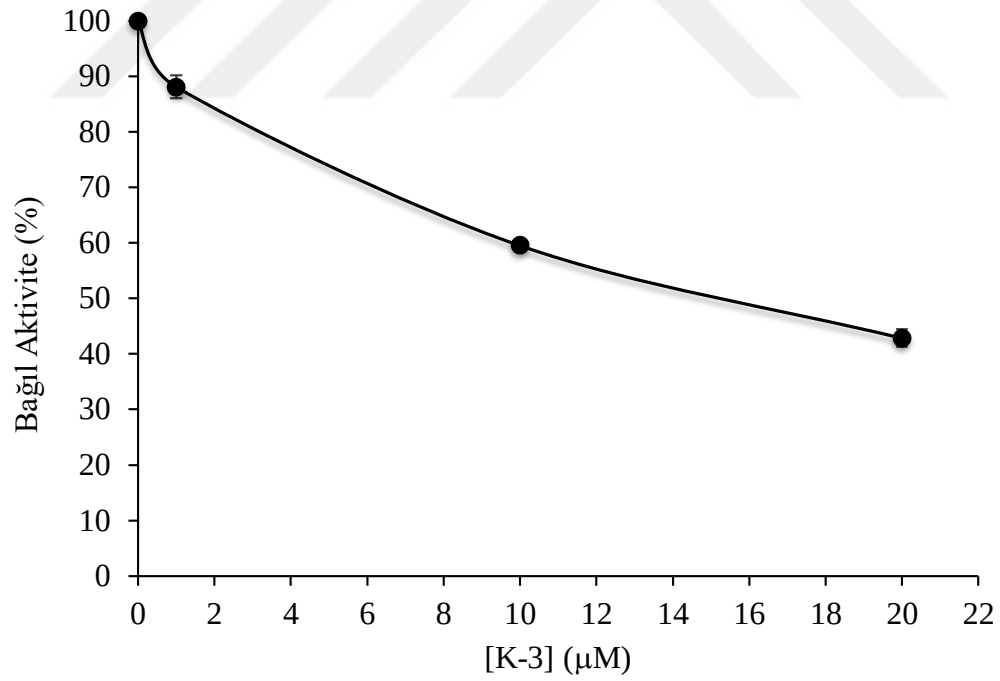
Kod	Bileşik	Ergin IC_{50} (μM)	Nimf IC_{50} (μM)
K-1	$[\text{Mn}(\text{HL})(\text{bipy})_2] (\text{ClO}_4)$	$22,0\pm1,8$	$5,6\pm1,2$
K-2	$[\text{Ni}(\text{HL})(\text{bipy})_2] (\text{ClO}_4)$	$14,0\pm1,2$	$16,5\pm1,9$
K-3	$[\text{Ni}(\text{HL})(\text{bipy}) (\text{OClO}_3)]$	$16,0\pm2,1$	$4,6\pm0,8$
K-4	$[\text{Cu}(\text{HL})(\text{bipy}) (\text{OClO}_3)]$	$7,2\pm1,4$	$6,4\pm0,7$
K-5	$[\text{Zn}(\text{HL})(\text{bipy}) (\text{OClO}_3)]$	$3,2\pm0,8$	$10,1\pm2,4$



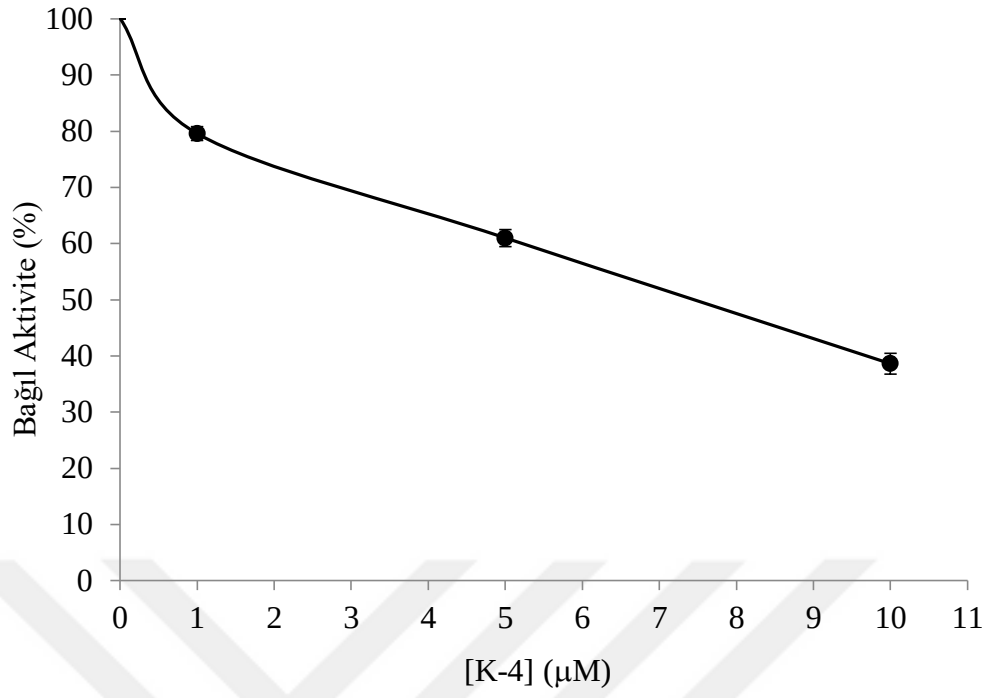
Şekil 43. Ergin ACHE'sinin K-1 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



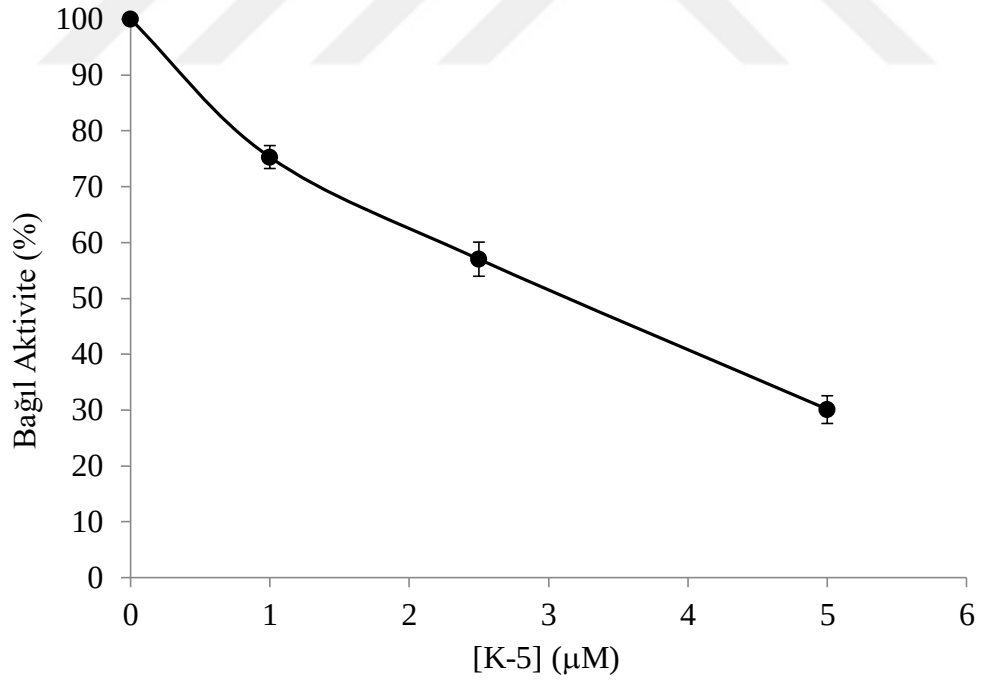
Şekil 44. Ergin ACHE'sinin K-2 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



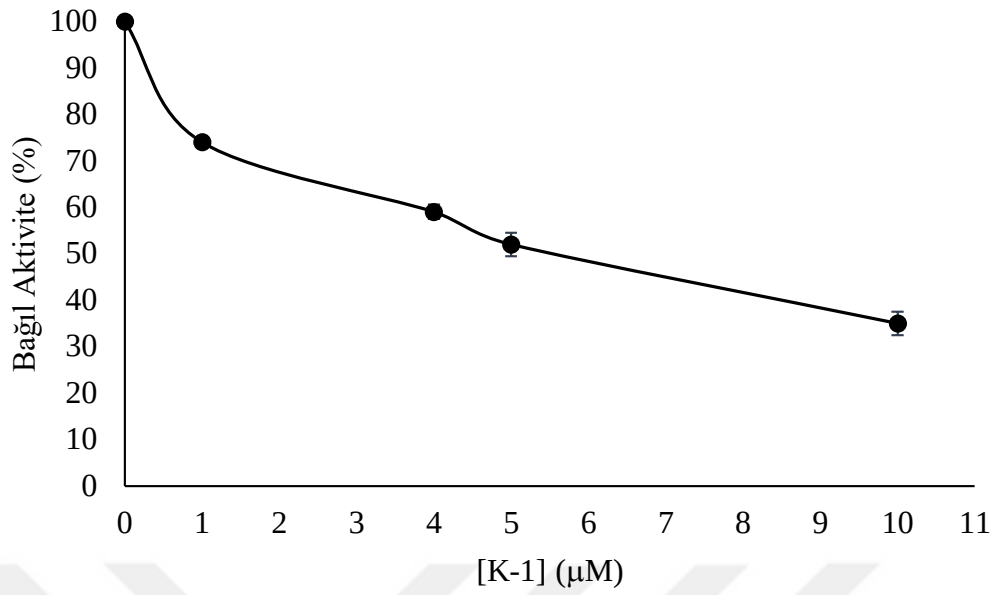
Şekil 45. Ergin ACHE'sinin K-3 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



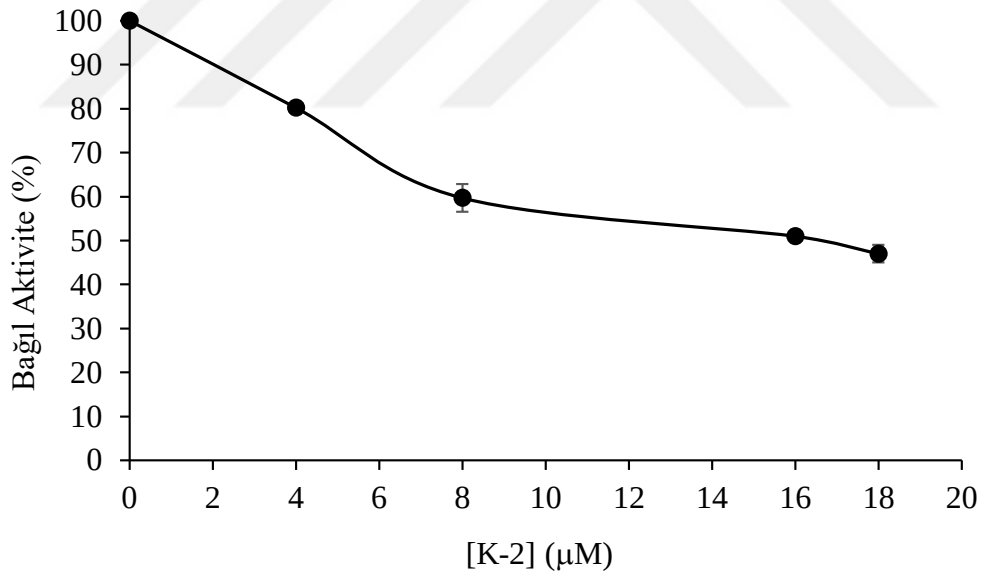
Şekil 46. Ergin ACHE'sinin K-4 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



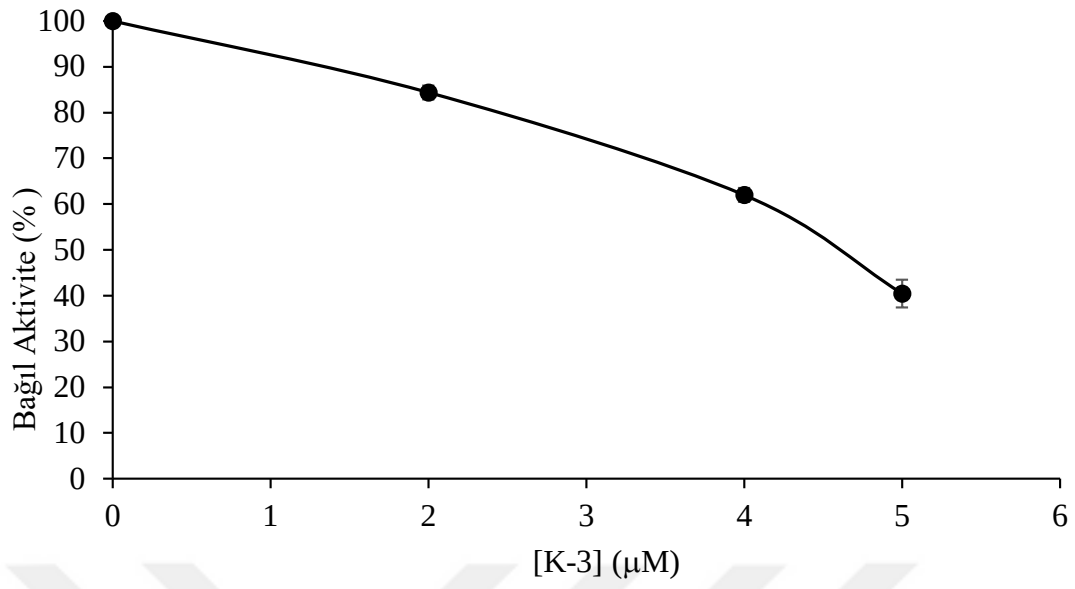
Şekil 47. Ergin ACHE'sinin K-5 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



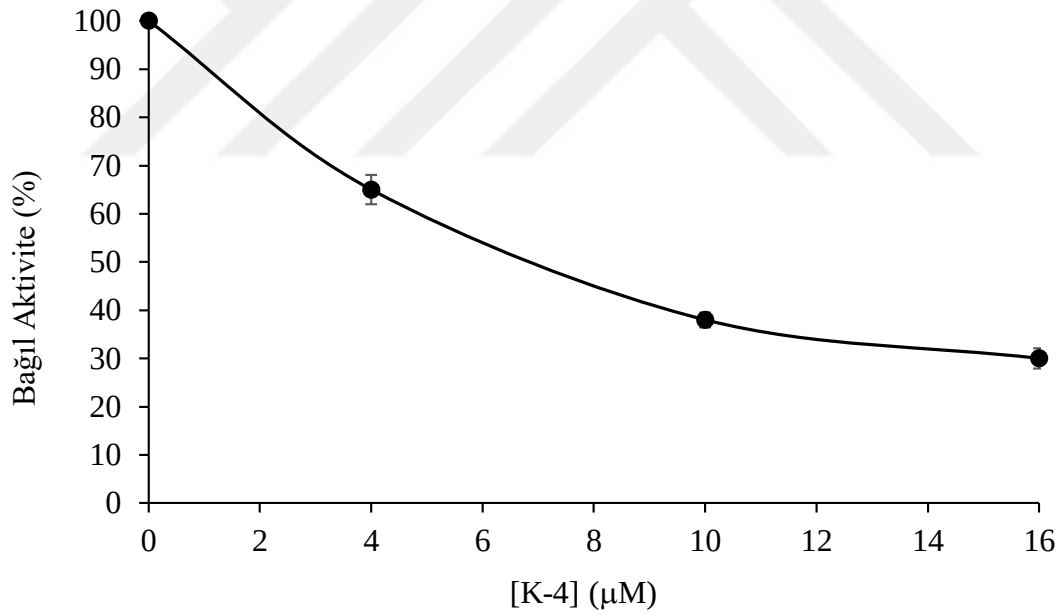
Şekil 48. Nimf ACHE'sinin K-1 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağlı aktivite (%) grafiği



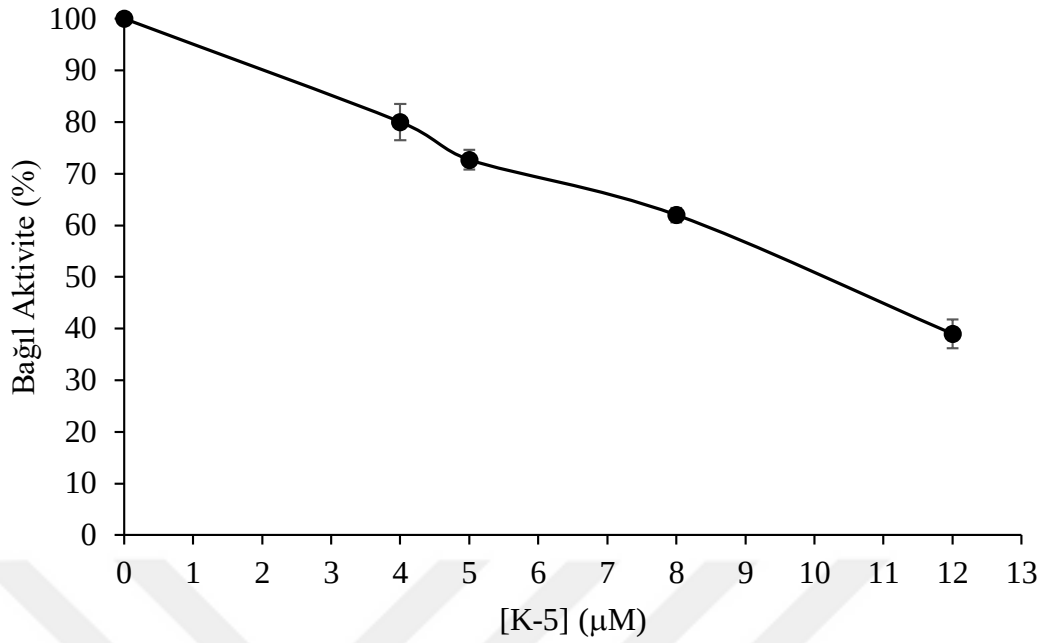
Şekil 49. Nimf ACHE'sinin K-2 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağlı aktivite (%) grafiği



Şekil 50. Nimf ACHE'sinin K-3 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



Şekil 51. Nimf ACHE'sinin K-4 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



Şekil 52. Nimf ACHE'sinin K-5 kompleksi varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği

2.4.3.2. Bazı Bitki Ekstraktlarıyla ACHE'nin İnhibisyonuna Ait Bulgular

Sentezlenmiş kimyasalların haricinde doğal ürün olarak; kuru zeytin yaprağı, kuru ceviz yaprağı, kuru ceviz yeşil kabuğu, kuru çınar yaprağı, karamürver, kaktüs ve aleovera su ekstreleri ile inhibisyon çalışmaları yapıldı. Karamürver, kaktüs ve aleovera ile yapılan ergin ve nimf ACHE inhibisyon çalışmalarında çok düşük etki gözlenirken diğer bitki ekstraktlarının oldukça iyi inhibisyon etkisi gösterdikleri gözlemlendi. Etkili olan bu bitkilerin saf suyla hazırlanan ekstraktlarının kuru madde miktarları belirlendi (Tablo 9).

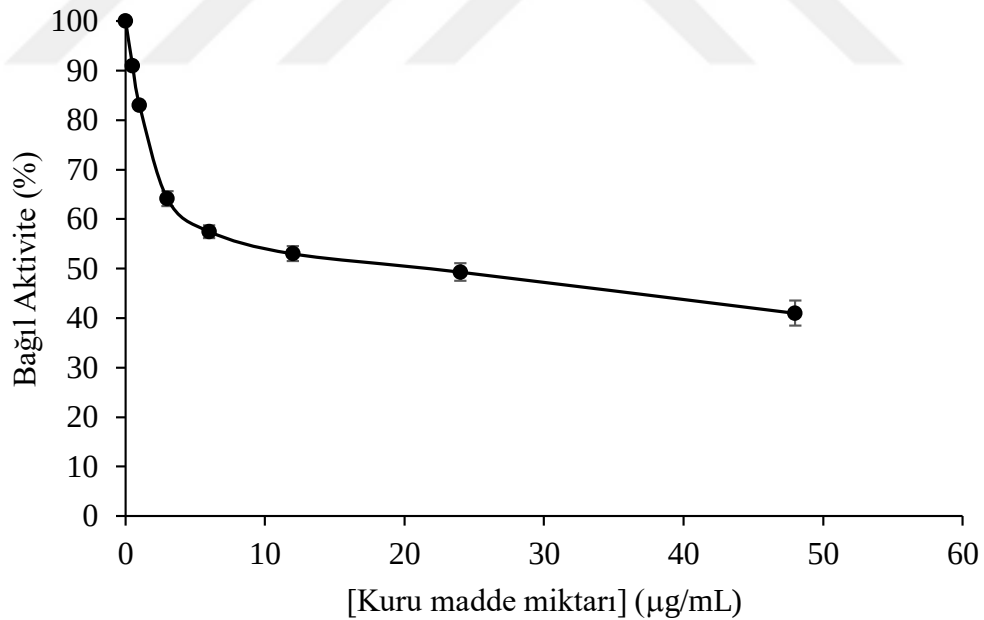
Tablo 9. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bitki ekstratlarının listesi

Bitki Türü	Ekstraksiyon Fazı	Kuru madde miktarı (μg/mL)
Kuru zeytin yaprağı	Saf su	0,94 ± 0,08
Kuru ceviz yaprağı	Saf su	1,16 ± 0,12
Kuru ceviz yeşil kabuğu	Saf su	1,41 ± 0,28
Kuru çınar yaprağı	Saf su	1,36 ± 0,18

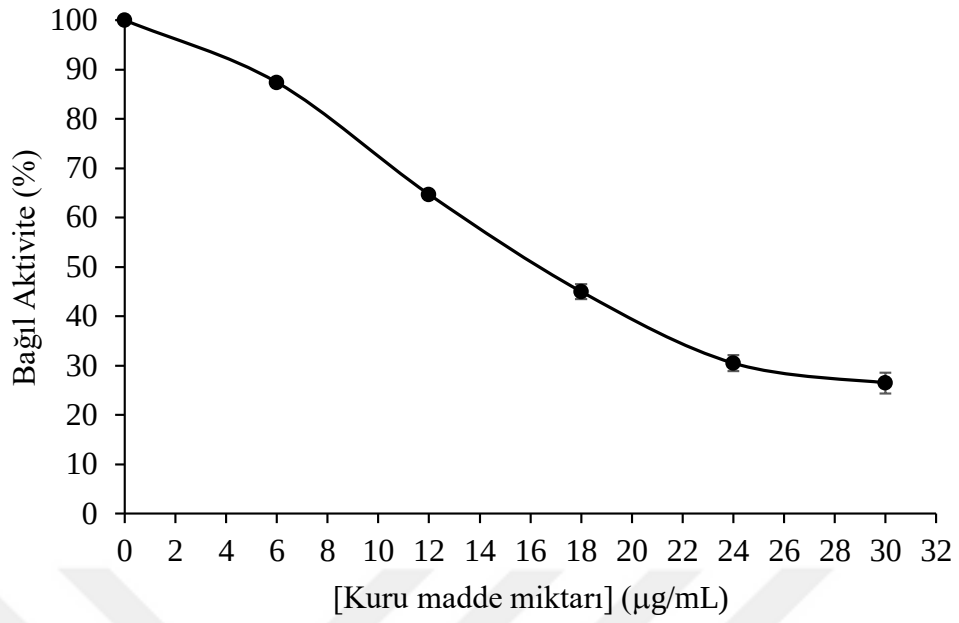
Bu bitki ekstralarının ACHE aktivitesini % 50 inhibe eden IC_{50} değeri belirlendi (Tablo 10 ve Şekil 53-60). *R. simulans* ACHE'lerinin IC_{50} değeri kuru zeytin yaprağı ekstresinin varlığında ergin için $20,3 \pm 1,2$ μg kuru madde/mL ve nimf için $16,2 \pm 0,8$ μg kuru madde/mL; kuru ceviz yaprağı ekstresi varlığında ergin için $34,1 \pm 2,0$ μg kuru madde/mL ve nimf için $58,3 \pm 2,8$ μg kuru madde/mL; kuru ceviz yeşil yaprağı ekstresi varlığında ergin için $42,3 \pm 2,1$ μg kuru madde/mL ve nimf için $56,0 \pm 4,0$ μg kuru madde/mL; kuru çınar yaprağı ekstresi varlığında ergin için $75,2 \pm 4,8$ μg kuru madde/mL ve nimf için $78,5 \pm 2,4$ μg kuru madde/mL olarak belirlendi.

Tablo 10. *Ricania simulans* ACHE'lerinin bitki ekstraktlarının varlığında IC_{50} değeri

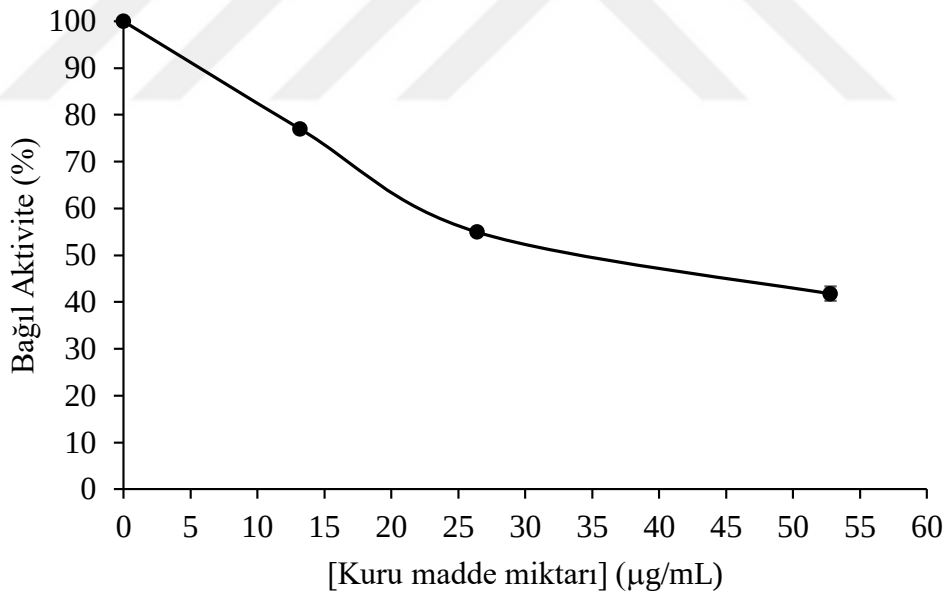
Ekstrakt	Ergin IC_{50} (μg kuru madde/mL)	Nimf IC_{50} (μg kuru madde/mL)
Kuru zeytin yaprağı	$20,3 \pm 1,2$	$16,2 \pm 0,8$
Kuru ceviz yaprağı	$34,1 \pm 2,0$	$58,3 \pm 2,8$
Kuru ceviz yeşil kabuğu	$42,3 \pm 2,1$	$56,0 \pm 4,0$
Kuru çınar yaprağı	$75,2 \pm 4,8$	$78,5 \pm 2,4$



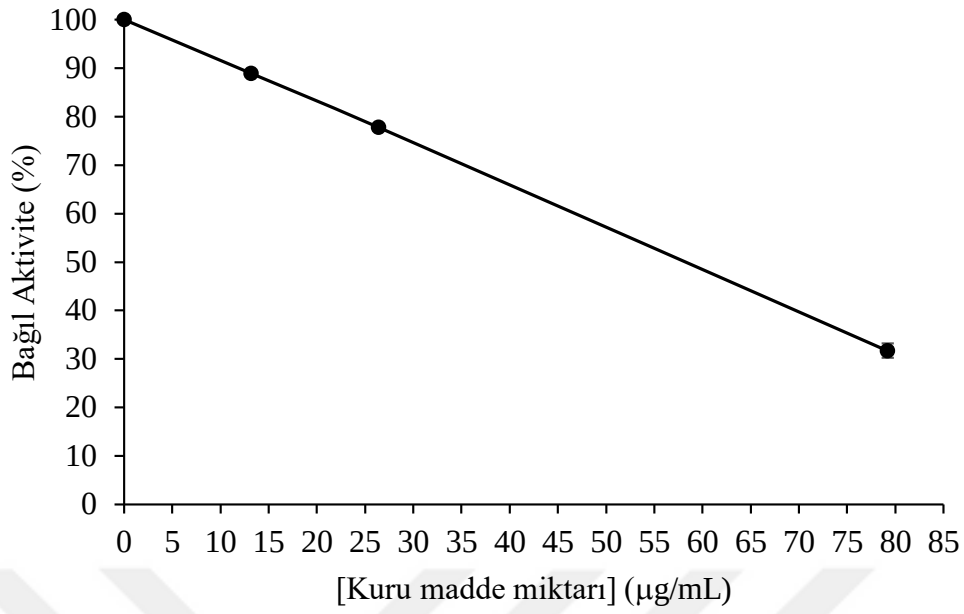
Şekil 53. Ergin ACHE'sinin kuru zeytin yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



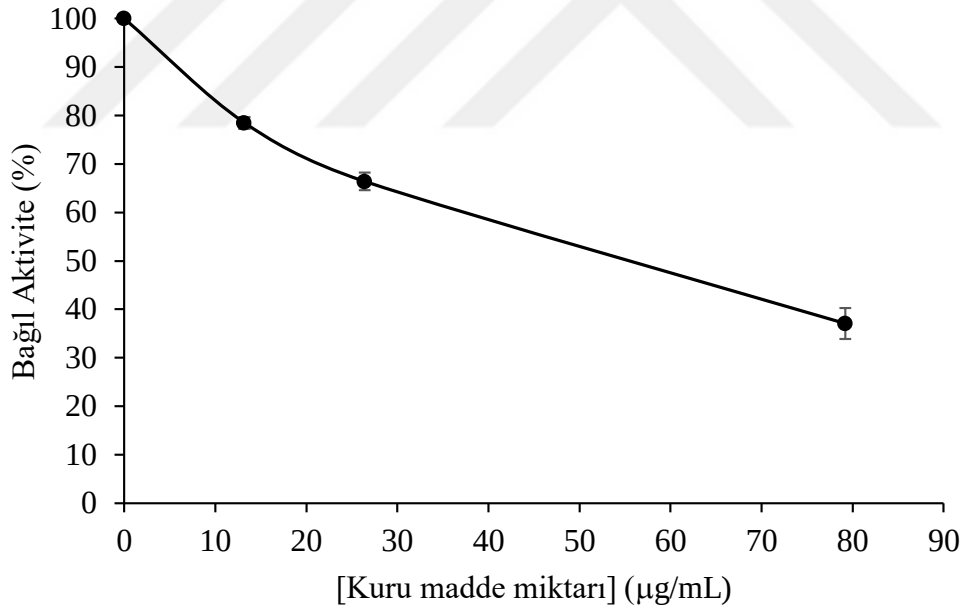
Şekil 54. Nimf ACHE'sinin kuru zeytin yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



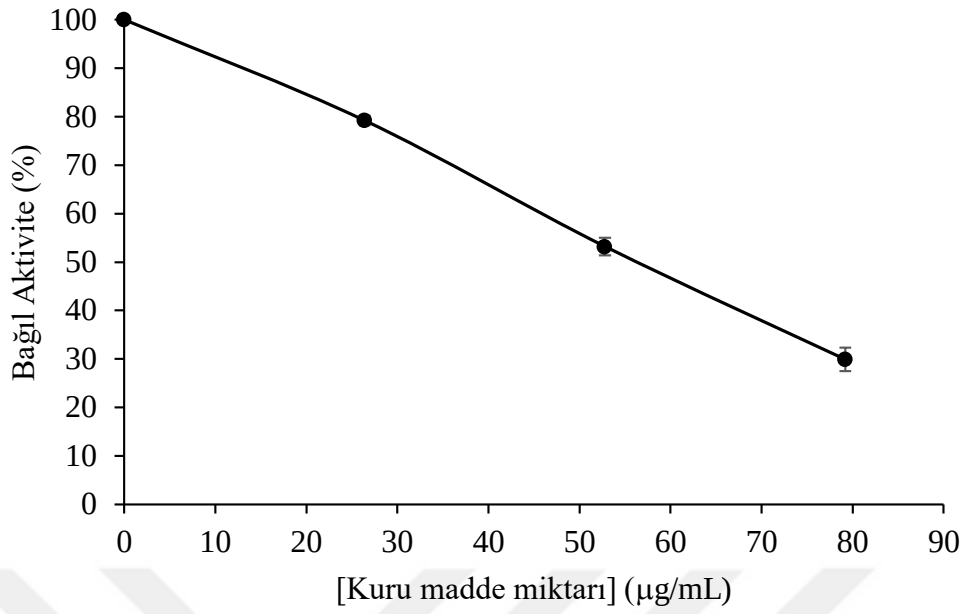
Şekil 55. Ergin ACHE'sinin kuru ceviz yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağıl aktivite (%) grafiği



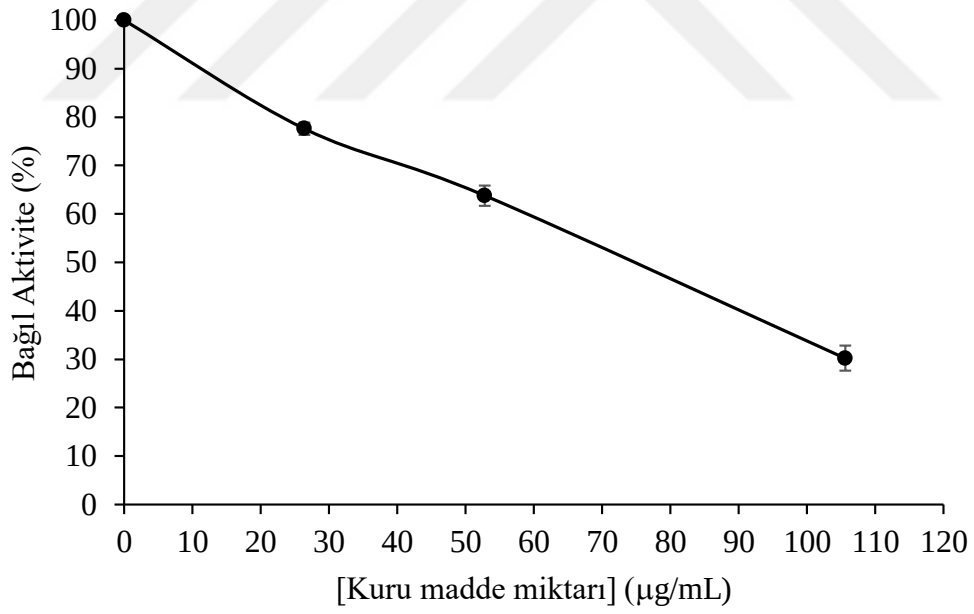
Şekil 56. Nimf ACHE'sinin kuru ceviz yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağli aktivite (%) grafiğı



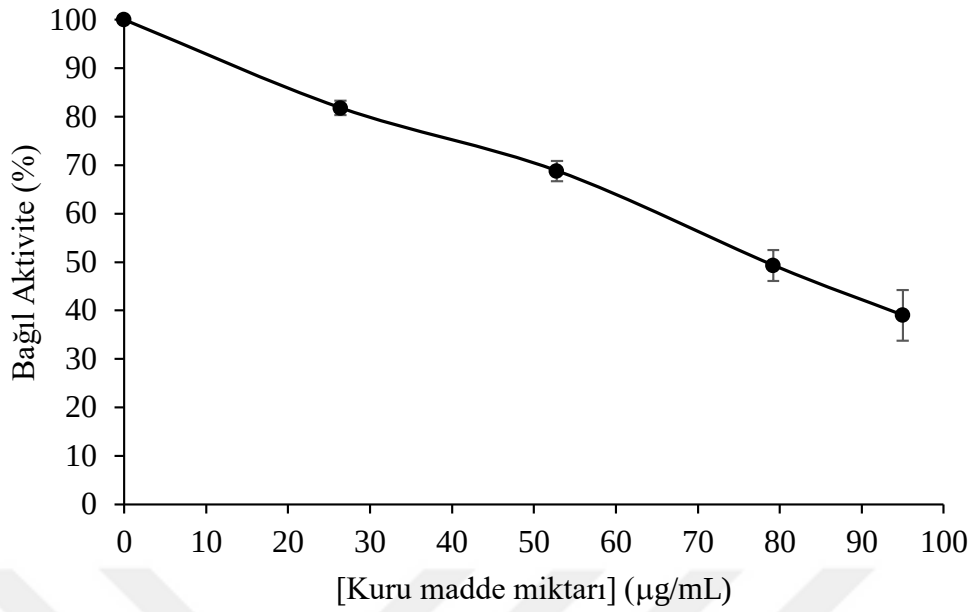
Şekil 57. Ergin ACHE'sinin kuru ceviz yeşil kabuğı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağli aktivite (%) grafiğı



Şekil 58. Nimf ACHE'sinin kuru ceviz yeşil kabuğu su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağli aktivite (%) grafiğı



Şekil 59. Ergin ACHE'sinin kuru ınar yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağli aktivite (%) grafiğı



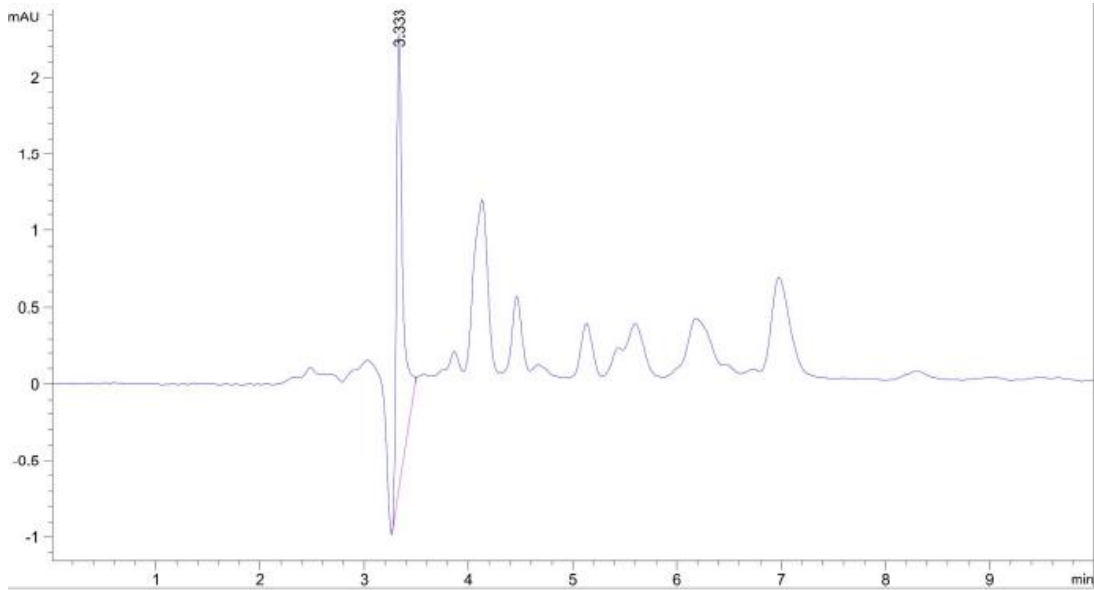
Şekil 60. Nimf ACHE'sinin kuru çınar yaprağı su ekstraktı varlığında elde edilen inhibitör konsantrasyonu- bağli aktivite (%) grafiğı

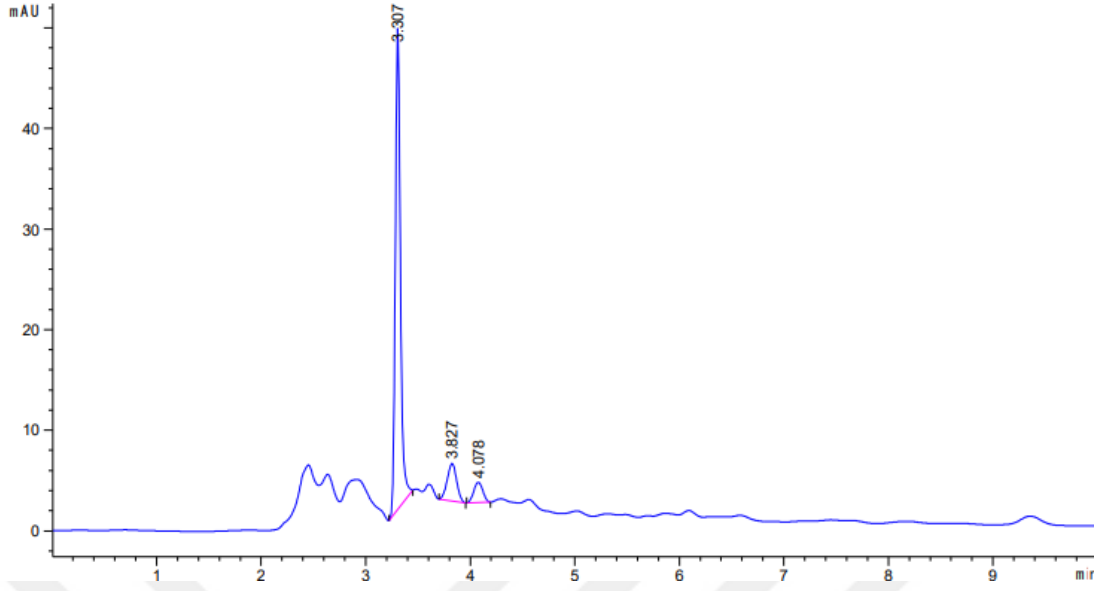
2.4.3.3. Bitki Ekstraktlarının HPLC Analiz Bulguları

Bitki ekstraktları arasında en iyi ACHE inhibisyon etkisi gösteren zeytin yaprağıının su ekstrağı, farklı polaritelerde hazırlanan hareketli faz kullanılarak silikajel kolonuyla fraksiyonlarına ayrıldı. Her bir fraksiyonun *R. simulans* ACHE'leri üzerindeki inhibisyon etkisi ve OE içerikleri HPLC yöntemiyle belirlendi. Oleuropeinin, ham bitki ekstraktlarının ve zeytin yaprağı su ekstraktının silikajel kolunundan 20:80 (h/h) ve 10:90 (h/h) oranlarında etanol:su karışımı kullanılarak elüe edilen fraksiyonların HPLC kromatogramları Şekil 61-83'de verilmiştir. Tüm bitki ekstraktlarında ve fraksiyonlarda 3 dakika civarında oleuropeine ait olan pikler gözlemlendi ve alanları hesaplandı (Tablo 11, Şekil 61 -83). Bu fraksiyonların HPLC cihazı tarafından belirlenen oleuropeinin pik alanları 20:80 (h:h) oranında hazırlanan hareketli fazıyla 1'den 9'a kadar toplanan fraksiyonlarda sırasıyla 17,12; 68,05; 86,81; 97,72; 105,61; 102,96; 53,73; 24,38; 20,47 mAU*s, 10:90 (h:h) oranında hazırlanan hareketli fazdan ise sırasıyla 17,41; 112,42; 150,45; 174,37; 144,11; 122,85; 91,24; 39,91; 23,69 mAU*s olarak belirlendi (Tablo 11).

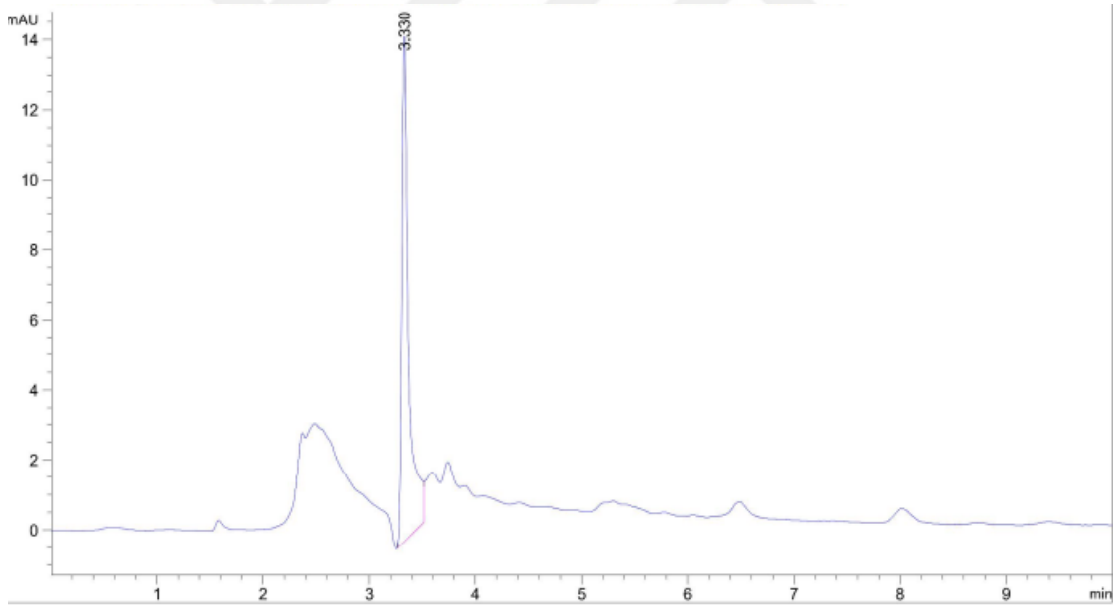
Tablo 11. Bitki ekstraktlarının ve zeytin yaprağı fraksiyonlarının alıkonma zamanları

Ekstrakt	Alıkonma zamanı (dk)		HPLC pik alanları (mAU*s)	
Zeytin yaprağı	3,307		164,37	
Ceviz yaprağı	3,330		65,46	
Ceviz yeşil kabuğu	3,340		59,68	
Çınar yaprağı	3,333		26,67	
Zeytin Yapracağı	20:80 (h/h)	10:90 (h/h)	20:80 (h/h)	10:90 (h/h)
Fraksiyonları	etanol:su	etanol:su	etanol:su	etanol:su
1. fraksiyon	3,294	4,050	17,12	17,41
2. fraksiyon	3,389	3,433	68,05	112,42
3. fraksiyon	3,746	3,319	86,81	150,45
4. fraksiyon	3,394	3,306	97,72	174,37
5. fraksiyon	3,331	3,307	105,61	144,11
6. fraksiyon	3,331	3,307	102,96	122,85
7. fraksiyon	3,335	3,309	53,73	91,24
8. fraksiyon	3,344	3,312	24,33	39,91
9. fraksiyon	3,344	3,315	20,47	23,69

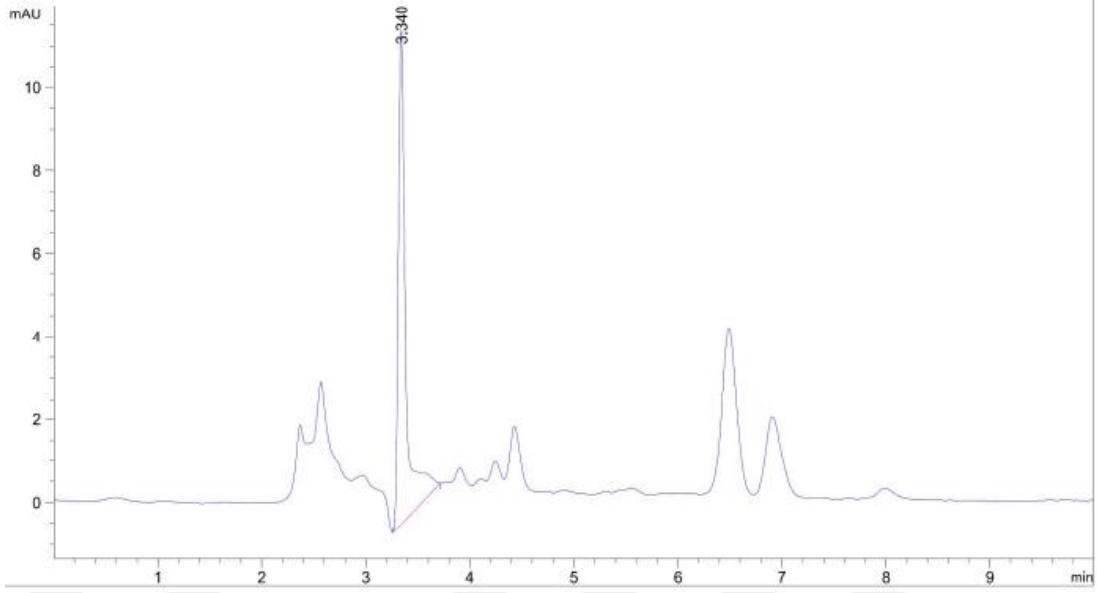
**Şekil 61.** Oleuropein standartının HPLC kromatogram görüntüsü



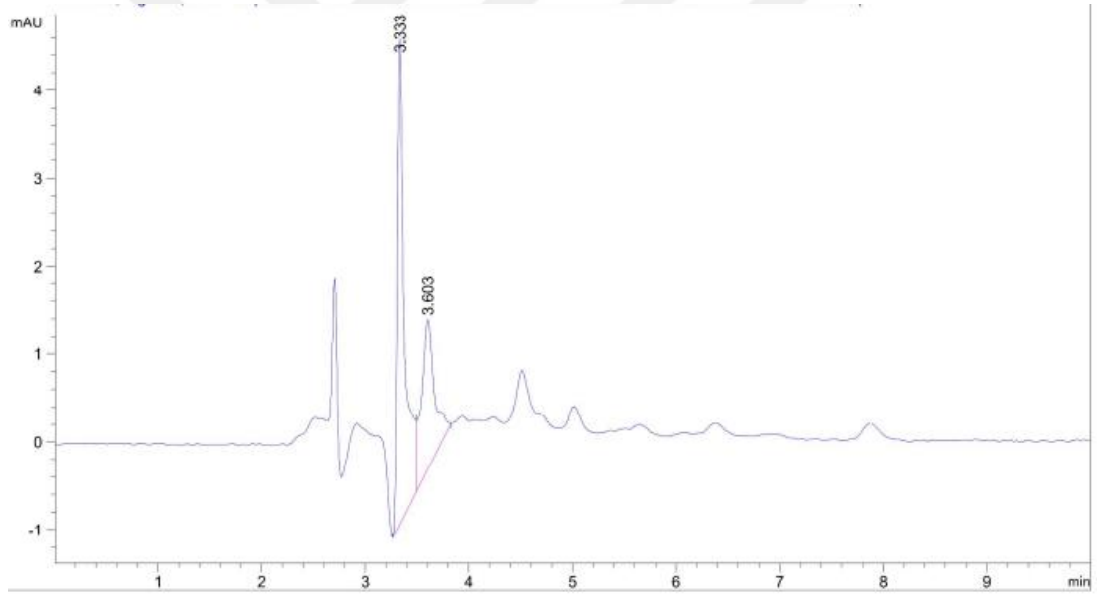
Şekil 62. Ham zeytin yaprağı su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü



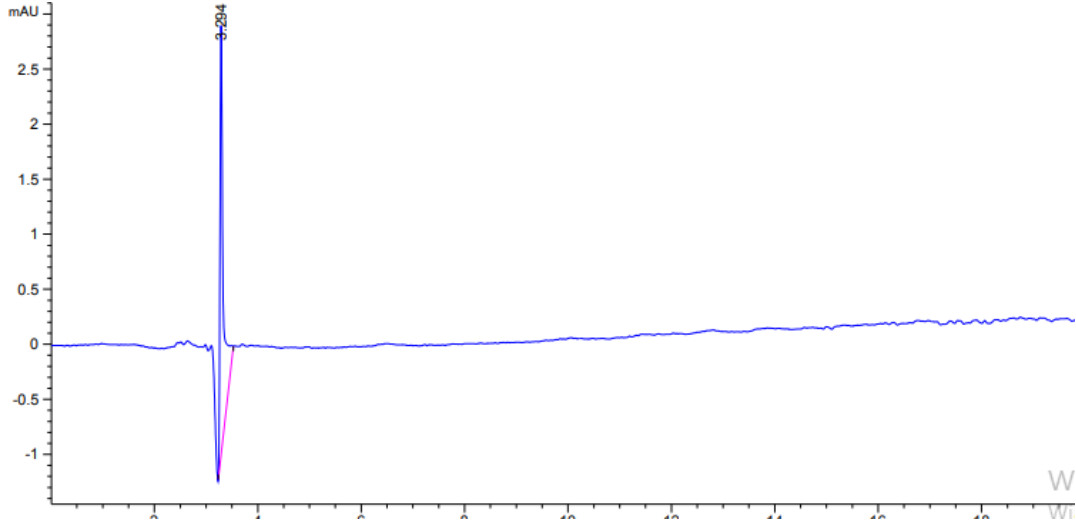
Şekil 63. Ham ceviz yaprağı su ekstrağının HPLC kromatogram görüntüsü



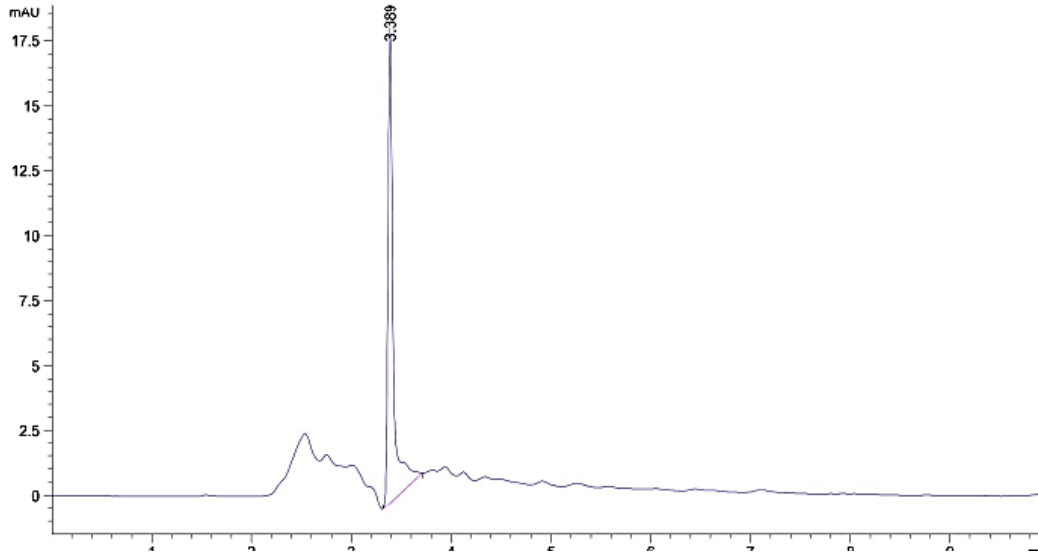
Şekil 64. Ham ceviz yeşil kabuğu su ekstreğının HPLC kromatogram görüntüsü



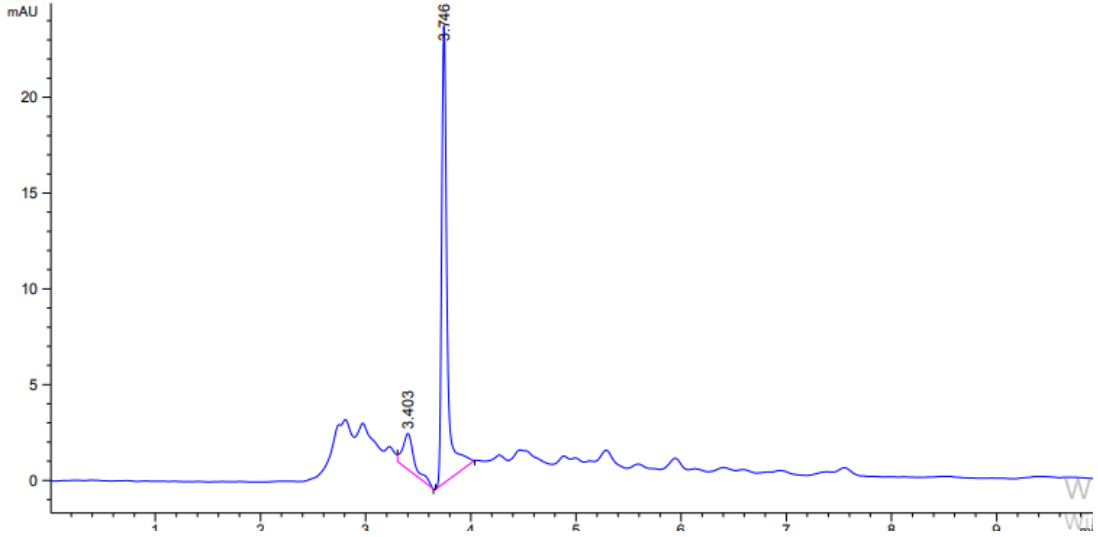
Şekil 65. Ham çınar yaprağı su ekstreğının HPLC kromatogram görüntüsü



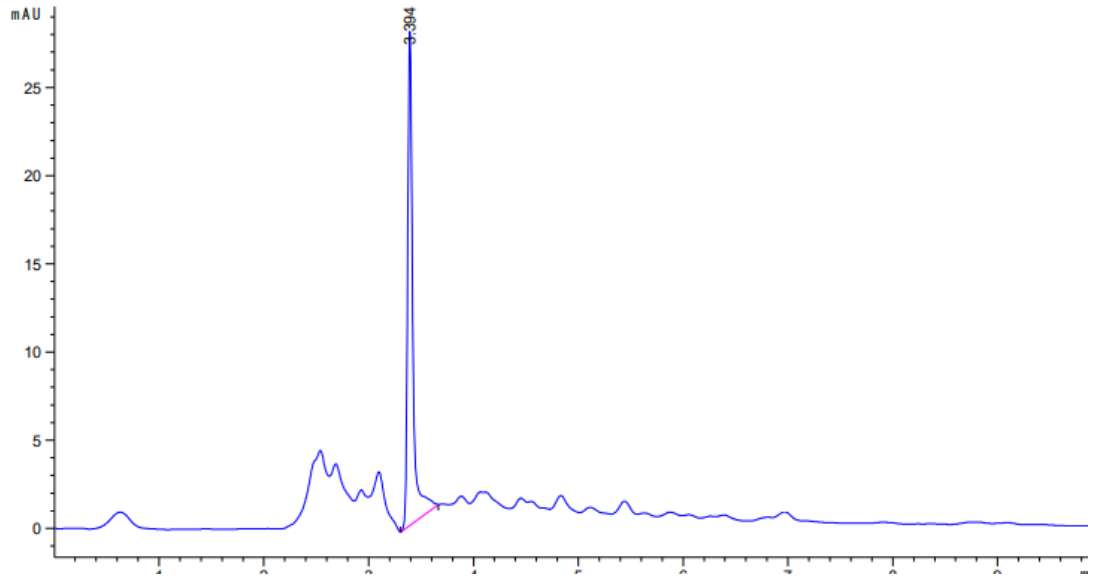
Şekil 66. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 1. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



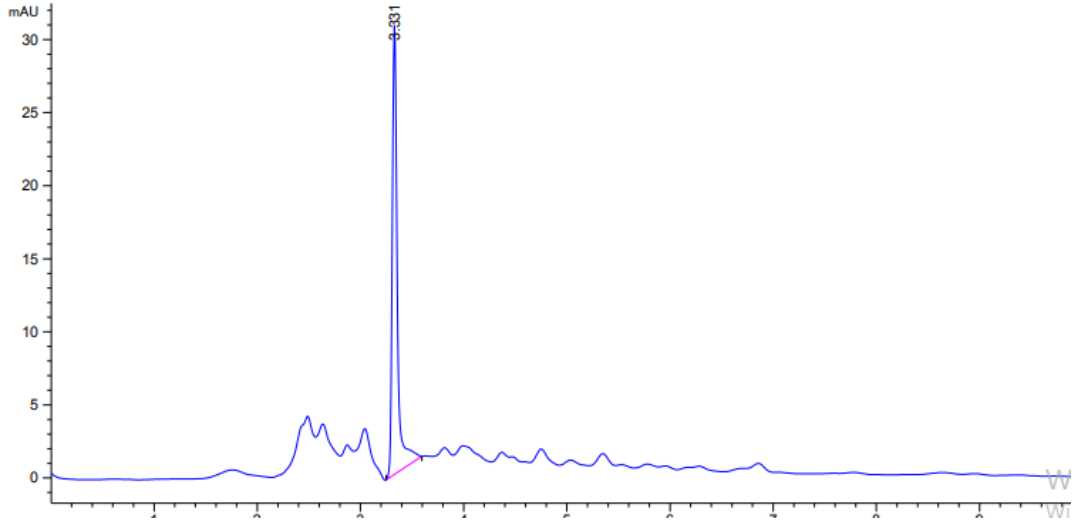
Şekil 67. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 2. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



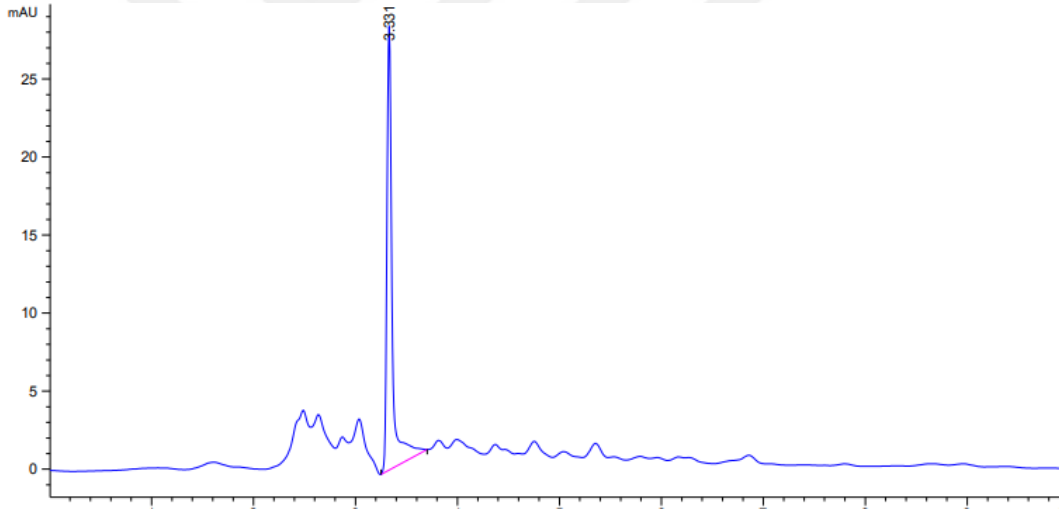
Şekil 68. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 3. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



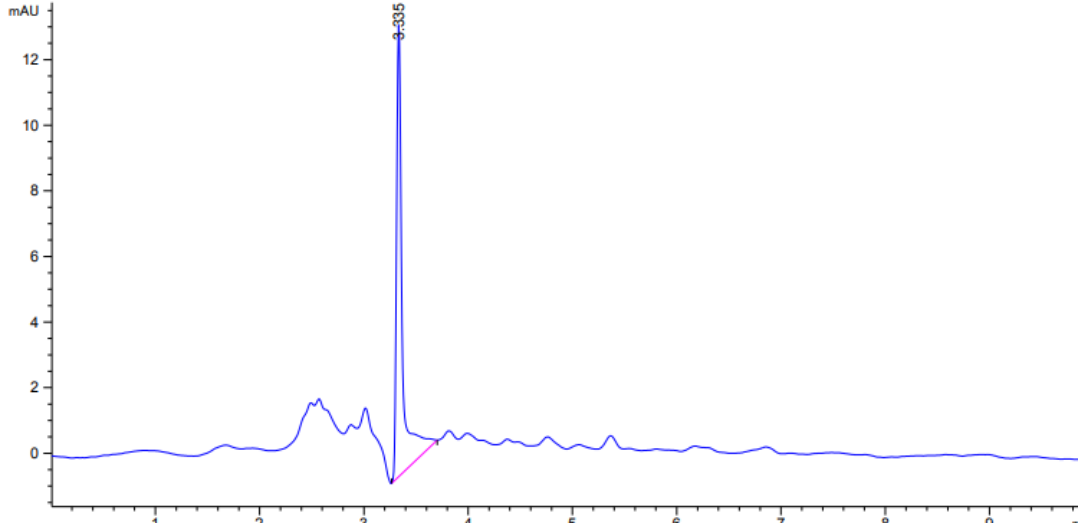
Şekil 69. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 4. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



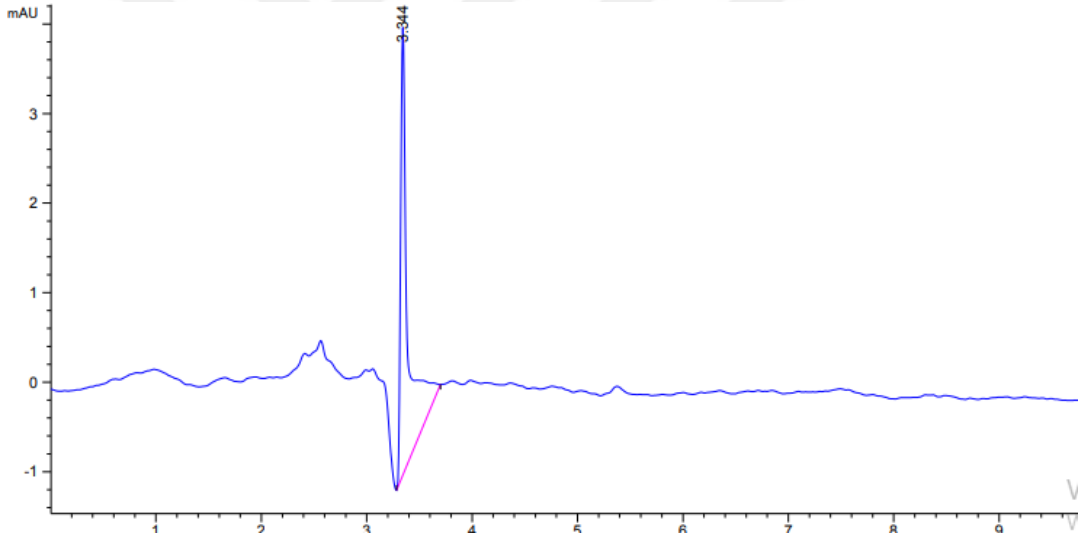
Şekil 70. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 5. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



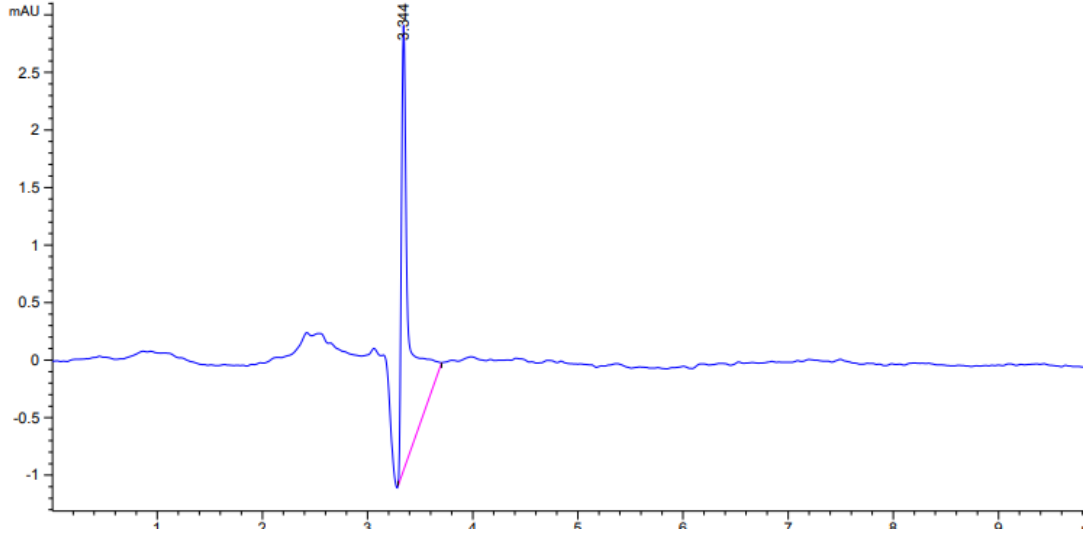
Şekil 71. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 6. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



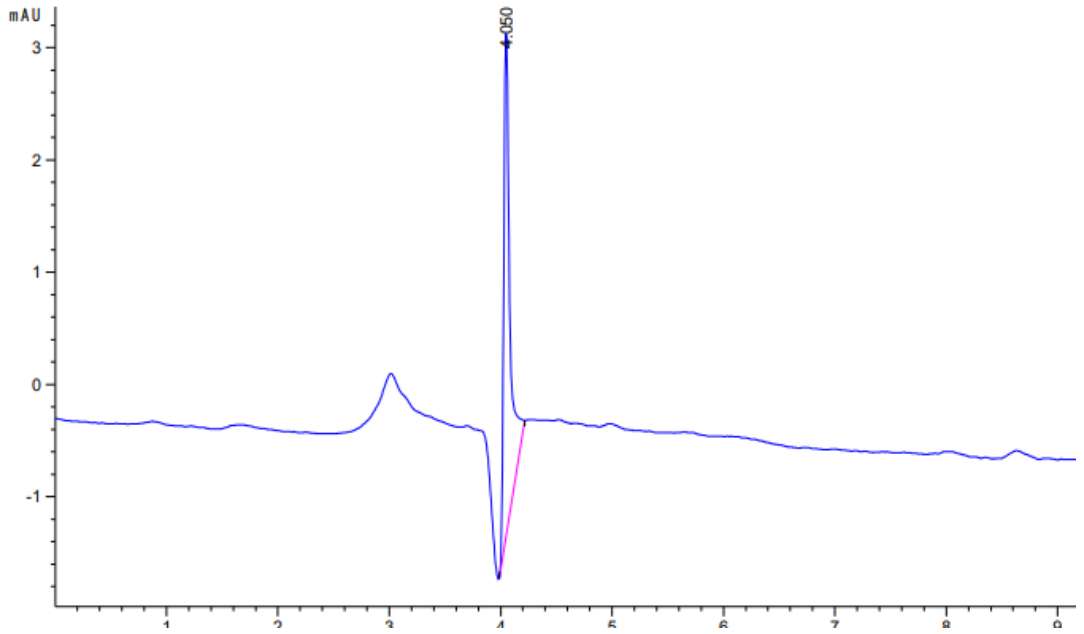
Şekil 72. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 7. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü.



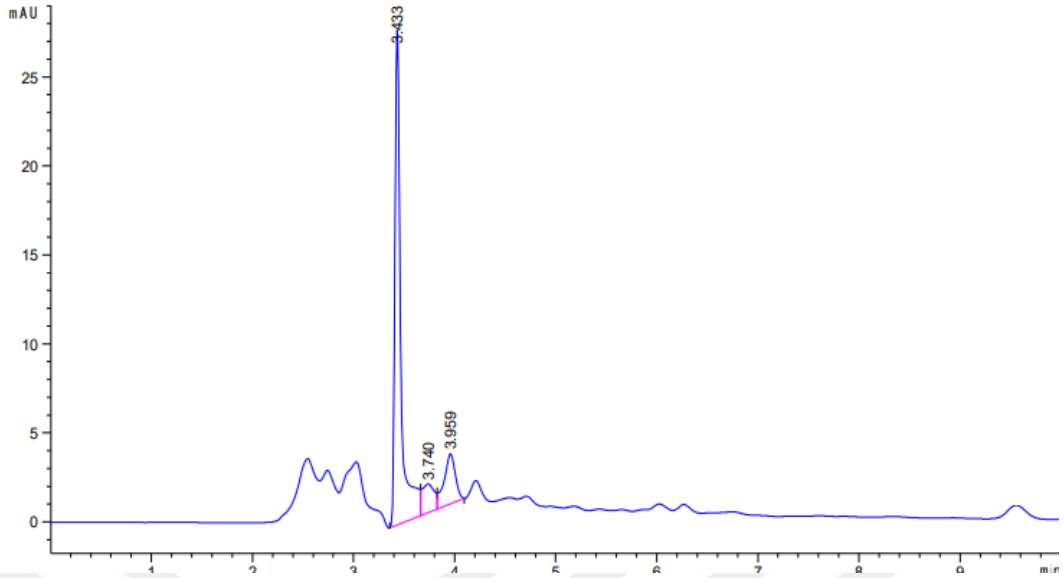
Şekil 73. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 8. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



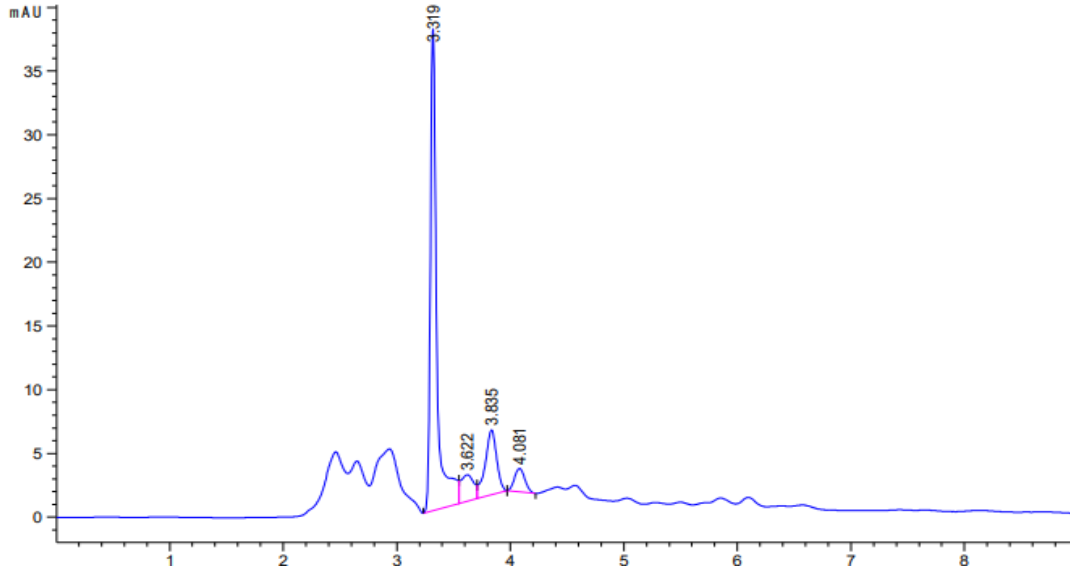
Şekil 74. Etanol:su karışımının 20:80 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 9. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



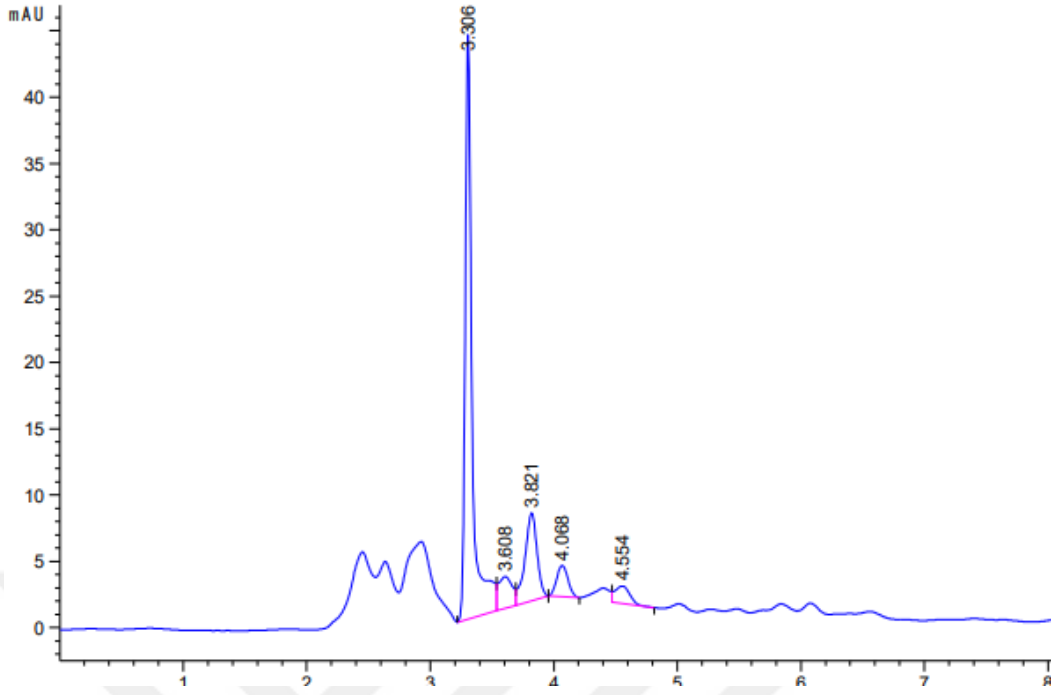
Şekil 75. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 1. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



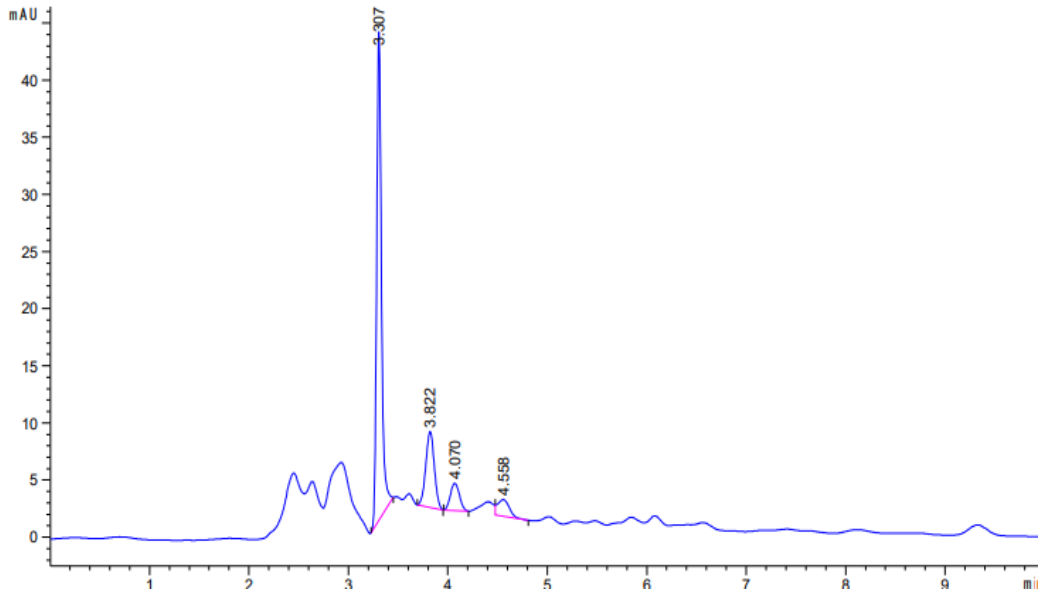
Şekil 76. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 2. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



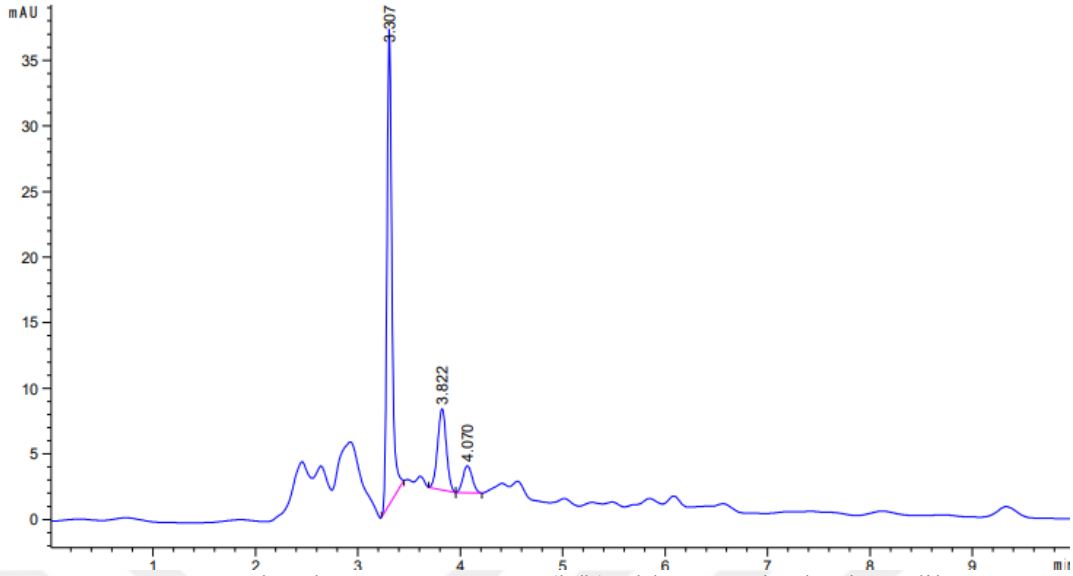
Şekil 77. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 3. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



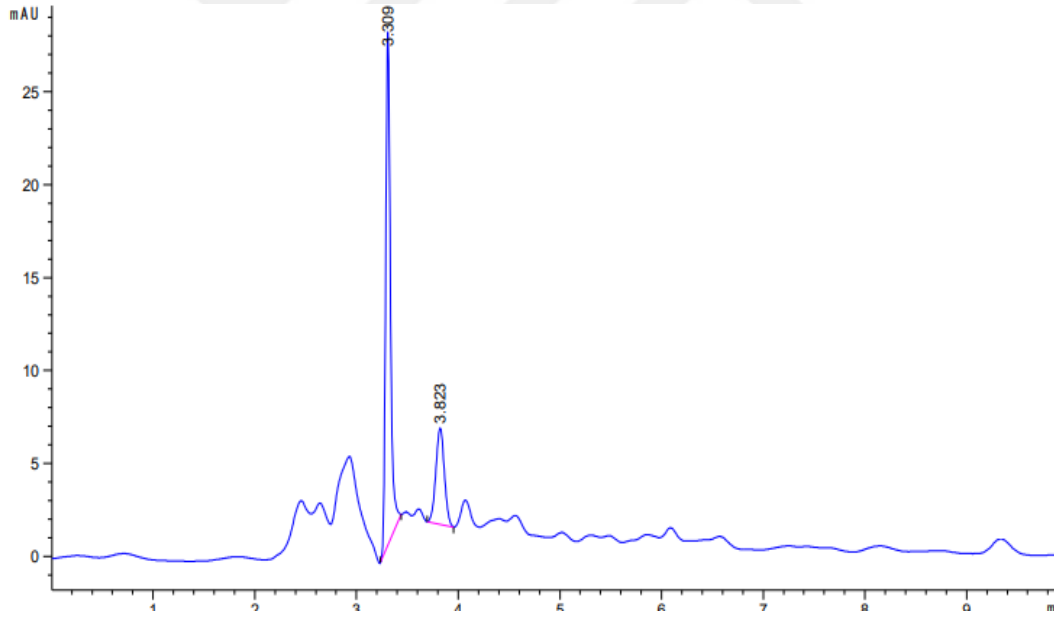
Şekil 78. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 4. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



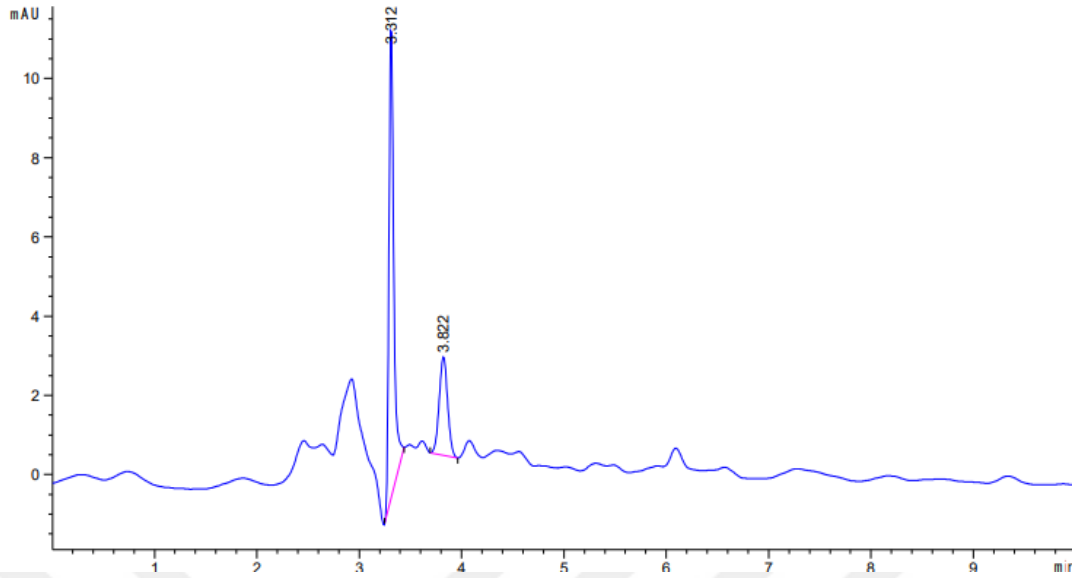
Şekil 79. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 5. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



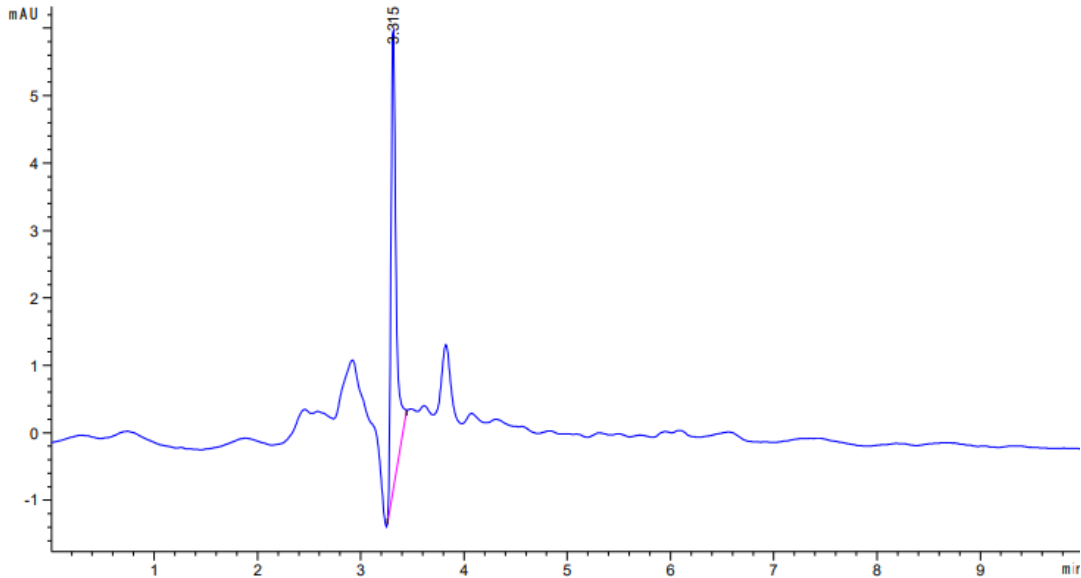
Şekil 80. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 6. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



Şekil 81. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 7. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



Şekil 82. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 8. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü



Şekil 83. Etanol:su karışımının 10:90 (h/h) olduğu şartlarda elüe edilen 9. fraksiyonun HPLC kromatogram görüntüsü

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan oleuropein çözeltilerinin HPLC analizi sonucunda belirlenen pik alanlarıyla kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafikten elde edilen denklemlerle bitki ekstraktlarının ve zeytin yaprağı fraksiyonlarının OE konsantrasyonları hesaplandı. Zeytin yaprağı, ceviz yaprağı, ceviz yeşil kabuğu ve çınar yaprağı için OE içerikleri sırasıyla 206,24; 82,13; 74,88 ve 33,46 mM; 20:80

(h:h) oranında hazırlanan 1'den 9'a kadar toplanan fraksiyonlarda sırasıyla 21,48; 85,38; 108,92; 122,61; 132,51; 129,18; 67,42; 30,53; 25,68 mM; 10:90 (h:h) oranında hazırlanan 1'den 9'a kadar toplanan fraksiyonlarda ise sırasıyla 21,84; 141,05; 188,77; 218,78; 180,82; 154,14; 114,48; 50,08; 29,72 mM olarak belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Bitki ekstraktlarının IC₅₀ değerleri ve OE miktarları

Materyal	IC ₅₀ Değerleri µg kuru madde/mL		OE Eşdeğer Konsantrasyon (mM)
	Ergin	Nimf	
Zeytin yaprağı	20,3±1,2	16,2±0,8	206,24
Ceviz yaprağı	34,1±2,0	58,3±2,8	82,13
Ceviz yeşil kabuğu	42,3±2,1	56,0±4,0	74,88
Çınar yaprağı	75,2±4,8	78,5±2,4	33,46

Bitki ekstraktları arasında en iyi ACHE inhibisyon etkisi gösteren zeytin yaprağının su ekstraktı, farklı polaritelerde hazırlanan hareketli faz ile fraksiyonlarına ayrıldı. Herbir fraksiyonun *R. simulans* ACHE'leri üzerindeki inhibisyon etkisi ve OE içerikleri HPLC yöntemiyle belirlendi. 20:80 (h:h) oranında hazırlanan etanol-su hareketli fazıyla 1'den 9'a kadar toplanan fraksiyonların IC₅₀ değerleri sırasıyla erginler için 7,2±0,7; 6,4±1,1; 5,4±0,5; 5,6±0,5; 4,8±0,3; 3,0±0,8; 6,2±1,4; 4,0±0,9; 3,7±0,9; nimfler için 5,3±0,7; 2,6±0,3; 1,4±0,3; 1,2±0,3; 1,1±0,3; 3,3±0,9; 3,6±0,9; 2,1±0,2; 4,8±1,2 µg kuru madde/mL, 10:90 (h:h) oranında hazırlanan etanol-su hareketli fazı için bu değerler sırasıyla erginlerde 2,4±0,8; 3,2±0,8; 1,8±0,6; 1,2±0,4; 1,8±0,4; 0,6±0,1; 1,6±0,1; 2,6±0,6; 5,4±0,6; nimflerde 6,4±1,2; 1,8±0,2; 1,2±0,2; 1,6±0,2; 1,3±0,2; 1,2±0,3; 1,4±0,3; 3,0±0,7; 2,0±0,5 µg kuru madde/mL olarak belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. Zeytin yaprağı fraksiyonlarının IC₅₀ değerleri ve OE miktarları

Fraksiyon	IC ₅₀ Değerleri		OE Eşdeğer Konsantrasyon (mM)	IC ₅₀ Değerleri		OE Eşdeğer Konsantrasyon (mM)
	µg kuru madde/mL (20:80)			µg kuru madde/mL (10:90)		
	Ergin	Nimf		Ergin	Nimf	
1.	7,2±0,7	5,3±0,7	21,48	2,4±0,8	6,4±1,2	21,84
2.	6,4±1,1	2,6±0,3	85,38	3,2±0,8	1,8±0,2	141,05
3.	5,4±0,5	1,4±0,3	108,92	1,8±0,6	1,2±0,2	188,77
4.	5,6±0,5	1,2±0,3	122,61	1,2±0,4	1,6±0,2	218,78
5.	4,8±0,3	1,1±0,3	132,51	1,8±0,4	1,3±0,2	180,82
6.	3,0±0,8	3,3±0,9	129,18	0,6±0,1	1,2±0,3	154,14
7.	6,2±1,4	3,6±0,9	67,42	1,6±0,1	1,4±0,3	114,48
8.	4,0±0,9	2,1±0,2	30,53	2,6±0,6	3,0±0,7	50,08
9.	3,7±0,9	4,8±1,2	25,68	5,4±0,6	2,0±0,5	29,72

3. SONUÇLAR

3.1. Tartışma ve Sonuçlar

ACHE çözeltisi ilk olarak 1939'da Nachmansohn ve Lederer tarafından *Torpedo marmorata*'nın elektrik dokusundan elde edilmiştir (Leuzinger ve Baker, 1967). ACHE'nin özellikleri hakkındaki ilk bilgiler *Electrophorus electricus* yılan balığının elektrik dokusundan amonyum sülfat fraksiyonlarıyla saflaştırılan ACHE' den elde edilmiştir (Lawler, 1961). ACHE'nin saflaştırılması ve karakterizasyonunda çoğunlukla elektrikli yılan balığının elektrik dokusu ve memeli beynine odaklanılmıştır (Nachmansohn, 1970). Farklı yöntemler kullanarak çeşitli böcek türlerinden; *Lygus hesperus* (Knight) (Heteroptera: Miridae) (Zhu, Brindley ve Hsiao, 1991), *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Zhu ve Clark, 1994), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Xiwu vd., 1998), *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Gao vd., 1998), *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (Keane ve Ryan, 1999), *Blattella germanica* (Linnaeus) (Blattodea: Blattellidae) (Prabhakaran ve Kamble, 1996), *Schizaphis graminum* (Rondani) (Homoptera: Aphididae) (Siegfried, Ono ve Swanson, 1997), *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) (Li ve Han, 2002) ve *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) (Mohamed vd., 2020) ACHE'ler saflaştırılmıştır. ACHE'nin saflaştırılması için, çeşitli yöntemler kullanılmış fakat afinite kromatografisinin, ACHE'yi diğer proteinlerden ayırmak için en etkili yöntem olduğu belirtilmiştir (Xu ve Bull, 1994b).

Literatürde çeşitli kaynaklardan farklı kolonlar ile izole edilen ACHE'lerin saflaştırma oranları 13 ile 38.961 arasında değişiklik göstermektedir. Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonuyla izole edilen *R. simulans* ACHE'lerinin saflaştırma oranları (Şekil 27 ve 28; Tablo 4) literatürdeki bu verilerle genel olarak uyum gösterdi. *Ricania simulans* ACHE'lerinin saflaştırma oranları, Japon bildircin beyninden 33,9 kat (Son vd., 2002), *Diodon hystrix*'kinden 20,42 kat (Nordin vd., 2022) *Mytilus galloprovincialis*'den 13 kat (Duranay vd., 2019) saflaştırılan ACHE'lerin saflaştırma oranlarından daha yüksektir. *Galleria mellonella*'dan 283 kat, *Liposcelis entomophila*'dan 587 kat (Xiao vd., 2010), *Latrodectus hesperus*'dan 615,9 kat (Zhu ve Brindley, 1992), *Rhyzopertha dominica*'dan 771 kat (Guedes vd., 1998), *Bactrocera dorsalis*'den 1.500 kat (Hsu vd., 2008), *Schizaphis graminum* 2.253 kat

(Gao ve Zhu, 2001), *Diabrotica virgifera*'dan 20.420 kat (Gao, Rao, Wilde ve Zhu, 1998), *Aphis gossypii*'den 35.100 kat (Li ve Han, 2002) ve Colorado patates böceğinden (*Leptinotarsa decemlineata*) 38.961 kat saflaştırılan ACHE'lere göre saflaştırma oranları daha düşüktür. Edrofonyum-Sefaroz 6B kolonu ile *Mytilus galloprovincialis* ACHE'sinin saflaştırma oranı 13 kat (Duranay vd., 2019) iken Japon bildiricini kaynak olarak kullanıldığında ise bu oran 10.416 kat (Son vd., 2002) olarak belirlenmiştir.

Edrofonyum-Sefaroz 6B afinite kolonuyla tek adımda *R. simulans* ergin ve nimflerinden saflaştırılan ACHE'ler, bazı böcek çalışmalarından elde edilen verilerle tutarlı olsa da, aynı kolon ile farklı kaynaklardan saflaştırılmış ACHE'ler ile farklılıklar gösterdi. Literatürdende anlaşılabileceği üzere aynı kaynaklardan farklı yöntemler ile yada aynı yöntem ile farklı kaynaklardan saflaştırılan ACHE'lerin saflaştırma oranları ve verimleri farklılık göstermektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında aynı yöntem ve aynı dolgu malzemesi ile saflaştırılan *R. simulans*'ın ergin ve nimf ACHE'lerinin, saflaştırma oranlarının ve verimlerinin farklı olması yukarıda bahsedilen literatürdeki verilerle uyum göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada, nimflerin toplam protein miktarının, erginlerin toplam protein miktarından yüksek olmasına rağmen, erginlerin ACHE'lerinin spesifik aktivitelerinin nimflerden daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 4). Bunun sebebi, nimflerin daha yüksek miktarda protein içermelerine rağmen daha az ACHE protein üretmesine dayandırılabilir. Saflaştırılan ACHE proteinlerinin erginlerde daha yüksek çıkması bunu kanıtlamaktadır. Nimfler konakçılarının içinde ve çevresinde daha dar bir alanda yaşamlarını sürdürürken, ergin olduktan sonra daha geniş bir alana yayılabilirler. Bu, nimf ve yetişkin habitatları arasındaki farklılıklara neden olan duyu gereksinimleri (konak tanıma, eş konumu, yumurtlama, kümelenme ve savunma gibi) karşılamak için duyu ekipmanının yanı sıra sinir sisteminin değişmesi gerektiği anlamına gelir. Bu nedenle erginlerin nimflere göre daha gelişmiş bir sinir sistemine sahip olmaları muhtemeldir (Piersanti, Rebora, Salerno ve Anton, 2020). Yapılan bir çalışmada, *Bactrocera dorsalis*'in farklı evrelerinden elde edilen ACHE'lerin aktivitelerindeki farklılıklar iki açıdan değerlendirilmiştir. Böceklerin gelişimi süresince sürekli değişen taleplerini karşılamak için protein yapısında meydana gelen bazı değişikliklerin olduğu ve spesifik enzimleri kodlayan genlerin

ekspresyon düzeyindeki farklılıkların değişikliklere neden olabileceği bildirilmiştir (Shen, Wang, Dou ve Wang, 2012). Bu çalışmada ergin ACHE'nin protein ve aktivitesinin nimflere göre daha yüksek olması literatürdeki bu bilgilerle uyumludur.

SDS-poliakrilamid jel elektroforez analizi ile *R. simulans* ACHE'lerin alt birim moleküler ağırlıkları (erginler için yaklaşık 52 kDa ve nimfler için yaklaşık 59 kDa) (Şekil 29-30), *Electric eel* (25-59 kDa) (Dudai ve Silman, 1974), *Torpedo californica* (71-82 kDa) (Lwebuga-Mukasa, Lappi ve Taylor, 1976), *Rhyzopertha dominica* (33-54 kDa) (Mohamed vd., 2020), *Mytilus galloprovincialis* (51 kDa) (Duranay vd., 2019), Horn fly (54 kDa) (Xu ve Bull, 1994a), *Liposcelis Entomophila* (55 kDa) (Xiao vd., 2010), *Rhyzopertha dominica* (56 kDa) (Guedes vd., 1998), *Bactrocera dorsalis* (59,7 kDa) (Hsu vd., 2008), Japon bıldırcın beyni (62,5 kDa) (Son vd., 2002) ve *Aphis gossypii* (63,5 kDa) (Li ve Han, 2002) gibi çeşitli kaynakların ACHE molekül ağırlıkları ile benzerlik gösterdi. Ergin ve nimf ACHE'lerinin tek altbirim proteinlerine ait molekül ağırlıklarındaki farklılık (yaklaşık 7kDa), zararlının bu evrelerde farklı ACHE izoenzimleri sentezlemelerinden kaynaklanabilir.

Çeşitli kaynaklardan izole edilen ACHE'ler en yüksek aktiviteyi pH 7,0-9,0 ve 35-40 °C sıcaklıklar arasında göstermektedir. Literatürdeki çalışmalarda ACHE'nin çoğunlukla en yüksek aktiviteyi pH 8,0'de ve 40 °C'de gösterdiği belirtilmiştir (Zhu ve Brindley, 1992; Xu ve Bull, 1994a; Prabhakaran ve Kamble, 1996; Gao vd., 1998; Gao ve Zhu, 2001; Mohamed vd., 2020; Nordin vd., 2022). Asidik ortamlarda ergin ACHE'ler oldukça düşük aktivite gösterirken, nimf ACHE'lerinin asidik ortamlarda aktivite gösterdikleri tespit edildi. Alkali ortamlarda her iki evrenin de aktivite göstermesi, bu zararlının ACHE'lerinin yüksek pH değerlerindeki değişimlerden az etkilendiği söylenebilir (Şekil 34 ve 35). Pond Wolf Spider'dan (*Pardosa pseudoannulata*) dört ACHE izoenzimi (*PpACHE1*, *PpACHE2*, *PpACHE3* ve *PpACHE4*) saflaştırılmış ve ATC substratı varlığında pH değişiminin aktiviteye etkisi araştırılmıştır. Bu izoenzimlerin optimum pH'ları 7,0 ile 8,0 arasında olmasına rağmen, pH 5,0-6,0 arasında da *PpACHE1*'in % 20-75 oranında, *PpACHE2*'nin % 55-90 oranında, *PpACHE3*'ün % 10-25 oranında ve *PpACHE4*'ün % 10-15 oranında başlangıç aktivitelerini korumuşlardır. Ayrıca, bu örümcekte izole edilen dört *PpACHE*'nin, biyokimyasal özellikleri ve insektisitlere karşı farklı hassasiyetler dahil olmak üzere çeşitli enzim aktivitesi ve inhibitör hassasiyeti gösterdiği de rapor

edilmiştir (Meng vd., 2016). Sıcaklık ile yapılan çalışmalarda da ise sıcaklık 80 °C'ye ulaştığında her iki evrenin ACHE'lerinin aktivitelerini büyük bir oranda kaybettiği belirlendi. Literatürde çeşitli kaynakların ACHE'sinin düşük sıcaklıklarda ve 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda büyük ölçüde aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Duranay vd., 2019). *R. simulans* ACHE'leri için belirlenen optimum pH (8,0) ve sıcaklık (40 °C) değerleri (Şekil 34 -37; Tablo 5) literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

Ricania simulans ACHE'lerinin K_m değerlerinin (erginler için $0,04 \pm 0,01$ mM, nimfler için $0,02 \pm 0,01$ Mm), *Mytilus galloprovincialis* (1,3 mM) (Duranay vd., 2019), *Liposcelis entomophila* (0,37 mM) (Xiao vd., 2010) ve *Heterorhabditis bacteriophora* (0,27 mM) (Mohamed vd., 2007) K_m değerlerinden daha düşük olduğu ve böylelikle ATC substratına olan afinitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. *Lygus hesperus* ($6,9 \times 10^{-5}$ M) (Zhu ve Brindley, 1992), *Diabrotica virgifera* (19,65 μ M) (J. R. Gao ve diğerleri, 1998), *Rhyzopertha dominica* (24,2 μ M) (Guedes vd., 1998), Horn fly ($9,2 \times 10^{-6}$ M) (Xu ve Bull, 1994a) ve *Schizaphis graminum* (57,6 μ M) (Gao ve Zhu, 2001) K_m değerleriyle ise uyum sağladığı tespit edildi. K_m değerlerine bakıldığında *R. simulans* nimf ACHE'lerinin bu substrata erginlerden daha duyarlı olduğu gözlemlendi.

Literatürdeki diğer çalışmalarda ATC varlığındaki ACHE için verilen V_{maks} değerleri (erginler için $2.000,0 \pm 250$ EU / mg protein ve nimfler için $500,0 \pm 50$ EU / mg protein), *L. hesperus* 42,9 U/mg (Zhu ve Brindley, 1992); *Mytilus galloprovincialis* 0,183 mM/dk/mg (Duranay vd., 2019); *Diabrotica virgifera* 184,81 U/mg protein (Gao vd., 1998); *Rhyzopertha dominica* 18,7 μ mol/dk/mg (Mohamed vd., 2020); *Liposcelis entomophila* 748,78 nmol dk⁻¹ mg⁻¹ (Xiao vd., 2010); *Schizaphis graminum* 78,0 μ mol/min/mg (Gao ve Zhu, 2001), Horn fly 239,8 U/mg (Xu ve Bull, 1994a) ve *Diabrotica virgifera* 184,81 U/mg protein (Gao vd., 1998), *R. simulans* ACHE'lerinin V_{maks} değerleriyle örtüşmektedir.

Genel olarak K_m değerlerine bakıldığında nimf ACHE'lerinin substrata çok duyarlı olduğu gözlenirse bile V_{maks} ve k_{kat} değerlerine (erginler için k_{kat} $104,5 \pm 13$ dk⁻¹ ve nimfler için k_{kat} $30,3 \pm 6,4$ dk⁻¹) göre ergin ACHE'leri birim zamanda daha fazla ürün üretebildiği gözlemlendi (Tablo 5).

İnhibitör olarak kullanılan takrin ve edrofonyum klorürün IC₅₀ değerleri erginler için sırasıyla $18,0 \pm 1,9$ ve $2,4 \pm 0,3$ μ M ve nimfler için $1,2 \pm 0,4$ ve $0,6 \pm 0,09$ μ M

olarak belirlendi (Tablo 7). *R. simulans* nimflerinin ACHE'si takrin ve edrofonyum klorüre daha duyarlıyken, erginlerin ACHE'si daha az duyarlı davrandı. Bununla birlikte, bu iki inhibitörün her iki ACHE'ye karşı da etkili olduğu gözlemlendi. *R. simulans* ACHE'lerinin inhibisyonundan elde edilen IC_{50} değerleri literatürdeki diğer verilerle uyumludur. *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) ergin ACHE için takrin ile yapılan inhibisyon çalışmasında IC_{50} değeri 68 nM (Mutunga vd., 2009), diğer bir çalışmada huACHE için referans metot ile çalışıldığında takrin ve edrofonyum klorürün IC_{50} değerlerini sırasıyla 0,25 μ M ve 5,22 μ M, ACHE kolonuyla 0,45 mM ve 4,33 mM (Andrisano vd., 2001), eeACHE için takrinin IC_{50} değeri 0,02 μ M (Guo vd., 2020), başka bir çalışmada eeACHE'sinin takrin ve edrofonyum klorürünün IC_{50} değerleri sırasıyla 9,16 μ M ve 0,68 μ M olarak (Martín-Blosca vd., 2009) ve insan eritrosit ACHE için takrinin IC_{50} değerini 0,25 μ M (Rampa vd., 2000), fare beyin dokusundaki ACHE için takrinin IC_{50} değeri 125 nM (Weinstock, 1999) olarak belirtilmiştir.

Mn(II), Ni(II), Cu(II) ve Zn(II)'nin bipiridin ligandları ile sentezlenmiş kompleksler (Dural, 2019), *R. simulans* ACHE'lerine karşı inhibisyon aktivitesi sergiledi (Tablo 8). Her iki evrede de etkili olan bu komplekslerden, erginlerde en etkili olan $[Zn(HL)(bipy)(OClO_3)]$ kompleksi ($IC_{50}=3,2\pm0,8$ μ M), ACHE'nin inhibitörü olarak bilinen edrofonyum klorüre ($IC_{50}=2,4\pm0,3$ μ M) yakın bir inhibisyon etkisi gösterdi. Etkisi en az olan $[Mn(HL)(bipy)_2](ClO_4)$ kompleksi ($IC_{50}=22,0\pm1,8$ μ M) ACHE inhibitörü olan takrine ($IC_{50}=18,0\pm1,9$ μ M) yakın bir inhibisyon gösterirken, diğer kompleksler takrine göre daha iyi bir inhibisyon etkisi gösterdi (Tablo 8). Nimflerde ise en etkili olan $[Ni(HL)(bipy)(OClO_3)]$ komplekside ($IC_{50}=4,6\pm0,8$ μ M) dahil olmak üzere, takrin ($IC_{50}=1,2\pm0,4$ μ M) ve edrofonyum klorür ($IC_{50}=0,6\pm0,09$ μ M) (Tablo 8) kadar olmasa da bu komplekslerin ACHE üzerindeki inhibisyon etkilerinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Mangan ve nikel ftalosiyanın kompleksleriyle yapılan bir inhibisyon çalışmasında eeACHE için IC_{50} değerleri sırasıyla 185,52 ve 196,11 nM olarak bildirmiştir (Güzel vd., 2019). Başka bir çalışmada sentezlenmiş bazı bakır komplekslerinin eeACHE inhibisyonundan elde edilen IC_{50} değerleri $5,45\pm0,70$ ile $64,67\pm2,20$ μ M arasında olduğu rapor edilmiştir (Zanon vd., 2019). *R. simulans* ACHE'lerinin bakır kompleksinden elde edilen inhibisyon verileri (ergin $IC_{50}=7,2\pm1,4$; nimf $IC_{50}=6,4\pm0,72$) literatürdeki verilerle örtüşmektedir. $[Cu(naringin)_2]$, $[Cu(naringenin)_2]$, $[Cu(hesperetin)_2]$, $[Cu(naringin)$

(2,2'-bipiridin)], [Cu (naringin) (fenantrolin)], [Cu (naringenin) (2,2'-bipiridin)], [Cu (hesperidin) (fenantrolin)], [Cu (hesperetin) (2,2'-bipiridin)] ve [Cu (hesperetin) (fenantrolin)] komplekslerinin insan serumu ve elektrikli yılan balığından elde edilen ACHE'lerinin aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış ve bu komplekslerin sırasıyla huACHE için IC₅₀ değerleri; 1,73 ± 0,3; 0,66 ± 0,2; 0,33 ± 0,02; 0,012 ± 0,002; 0,87 ± 0,1; 0,25 ± 0,03; 0,32 ± 0,05; 0,33 ± 0,05; 0,36 ± 0,07 µM ve eeACHE için ise 0,16 ± 0,03; 1,41 ± 0,4; 2,55 ± 0,5; 0,17 ± 0,02; 1,4 ± 0,3; 0,46 ± 0,2; 1,77 ± 0,4; 0,94 ± 0,09; 0,33 ± 0,06 µM olarak rapor edilmiştir (Sarria vd., 2016). Başka bir çalışmada Hg⁺², Ni⁺², Zn⁺², Cd⁺², As⁺⁵, Pb⁺² ve Cu⁺² adet metal iyonları, *D. hystrix* beyninden saflaştırılmış ACHE üzerinde test edilmiş ve ACHE aktivitesini sırasıyla % 5,88, % 52,94, % 54,41, % 67,65, % 70,59, % 88,24 ve % 91,18'e düşürerek bu metal iyonları tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Nordin vd., 2022). Moleküler mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte metal komplekslerinin enzimin aktif bölgesindeki CAS ve PAS'a bağlanarak ACHE'yi inhibe ettiği ileri sürülmektedir. Bu bölgelerden PAS, allosterik aktivatörlerde ve ligandın yeniden düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu bölgeye bağlanan substratların stabilizasyonu büyük ölçüde π-kasyon etkileşimiyle, kolin ester substrat spesifikliğine ise kısmen Phe295 ve Phe297 aracılık eder. Enzim-inhibitör komplekslerinin detaylı analizinden, Trp286'daki indol halkasının, ligandların doğasına göre istifleme, aromatik-aromatik ve π-kasyon dahil olmak üzere bir dizi etkileşim modu göstererek birkaç inhibitör ile doğrudan etkileşime dahil olduğu ortaya çıkmıştır. PAS'a ligand bağlanması, substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasının neden olduğu sterik engel ve CAS konformasyonlarının allosterik değişikliklerini indükleyerek ACHE aktivitesini inhibe eder. Ayrıca ağır metaller, bu bölgelerdeki histidin, triptofan, sistein ve metionin gibi amino asit kalıntılarına bağlanırlar. Histidin içindeki imidazol grubu, serbest metal iyonlarını çekmek için güçlü kasyon-π çekimi yaratır ve bunun sonucunda substrat bağlanması başarısız olur. Pozitif yüklü metal iyonları, negatif yüklü protein kalıntılarını çekerek bağlandığında, düzenli bağlanma bölgelerinin şekli değişir bu engelleyici mekanizmayı açıklamaktadır (Bondžić vd., 2020; Johnson vd., 2021; Junaid, Islam, Hossain, Ullah ve Halim, 2019; Nordin vd., 2022; Vyas vd., 2014). Literatürdeki bilgiler ve komplekslerin yapıları göz önüne alındığında, kompleks 1, 2 enzimin CAS bölgesine, kompleks 3-5 ise enzimin PAS bölgesine bağlanabilir. Elde edilen verilere

göre, koordinasyonunu tamamlamamış olan metal komplekslerinin enzimin aktif bölgesine bağlanma olasılıklarının diğerlerine göre daha güçlü olduğu ve daha yüksek bir inhibitör etkisi gösterebileceği sonucuna varılabilir.

Ricania simulans ACHE'lerinin üzerine zeytin yaprağı, ceviz yaprağı, ceviz yeşil kabuğu ve çınar yaprağının inhibisyon etkilerine bakıldı. Bunun sonucunda erginler için sırasıyla IC₅₀ değerleri sırasıyla 20,3; 34,1; 42,3; 75,2 µg kuru madde/mL, nimfler için ise sırasıyla 16,2; 58,3; 56,0; 78,5 µg kuru madde/mL olarak bulundu. Zeytin yaprağı ekstraktının her iki evredeki ACHE'ler üzerine diğer ekstraktlara göre daha yüksek bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Diğer ekstraktlar, IC₅₀ değerlerine göre erginler üzerine daha etkiliyken, zeytin yaprağı ekstraktının nimfler üzerine daha etkili olduğu belirlendi. Bitki kaynaklı insektisitler hedef olmayan organizmalar (faydalı avcılar ve parazitler) için nispeten düşük bir risk sunarlar, genellikle çevrede hızla parçalanırlar ve öldürücü olmayan dozlara maruz kalan hayvanlar tarafından kolayca metabolize edilirler. Ayrıca, tek bir aktif bileşene dayanan geleneksel böcek öldürücülerin aksine, bitki kaynaklı böcek öldürücüler hem davranışsal hem de fizyolojik süreçler üzerinde uyumlu olarak hareket eden bir dizi kimyasal bileşik içerir. Bu nedenle, zararlıların bu tür maddelere karşı direnç geliştirme şansları daha azdır (Abdellaoui vd., 2019; Adeyemi Hassan, 2010; Scott vd., 2003). Bu çalışmada kullanılan ekstraktların suyla hazırlanmış ve oldukça düşük konsantrasyonlarda etkili olması çevre açısından oldukça önem arz etmektedir. ACHE'nin inhibisyonu üzerine literatürde yer alan birçok benzer bitkisel kaynaklı çalışma mevcuttur. Pasandideh ve Arasteh, (2021) yaptıkları çalışmada, 40 mg/mL *Citrus aurantium* ekstraktının ACHE enzimi üzerindeki inhibitör etkisini en fazla % 47,04 bulundu ve IC₅₀ değerini 42,8 mg/mL olarak hesapladı. Pozitif kontrol için kullandığı ACHE'nin bilinen inhibitörlerinden bir olan rivastigminin IC₅₀ değerini ise 2,18 mg/mL olarak belirlemişlerdir (Pasandideh ve Arasteh, 2021). *Mentha pulegium* L. bitkisinin çeşitli fraksiyonlarıyla hazırlanan ekstraktlarından eeACHE için metanol ekstreğinin IC₅₀ değeri 40,76 µg/mL (Gülçin vd., 2020), etanol ekstreğinin IC₅₀ değeri 534 µg/mL (Mata vd., 2007), etil asetat ekstraktının ACHE için IC₅₀ değeri 3,13± 0,05 µg/mL, dietil eter ekstreğinin IC₅₀ değeri 144,59±0,49 µg/mL, n-bütanol ekstreğinin IC₅₀ değeri 32,28±1,34 µg/mL ve referans inhibitor olarak kullanılan galantaminin IC₅₀ değeri 6,27±1,15 µg/mL olarak belirlenmiştir (Abbou vd., 2022) Tıpta kullanılan

Lycopodiella cernua L. isimli geleneksel çin bitkisinden iki serraten tipi triterpenoid ve yeni bir hidroksi doymamış yağ asidi tanımlanmıştır. Tanımlanan bu bileşiklerin eeACHE için IC₅₀ değerlerini sırasıyla 10,67±0,66 mM, 9,98±0,29 mM ve 0,22±0,03 mM olarak belirlemişlerdir (Ferreira vd., 2021). Fare beyninden izole edilen ACHE için enginar ekstreği, kafein, ellagik asit ve referans ilaç donepezilin IC₅₀ değerleri sırasıyla 1,927, 1,013, 5,705 ve 0,0034 mg/mL olarak belirlenmiştir (Abd El-Aziz vd., 2021). *R. simulans* ACHE'lerinin zeytin yaprağı, ceviz yaprağı, ceviz yeşil kabuğu ve çınar yaprağı ekstraktlarının varlığında elde edilen IC₅₀ değerleriyle, literatürdeki benzer çalışmalarda yer alan bitki ekstraktlarının IC₅₀ değerlerinin uyumlu olduğu belirlendi.

Zeytin yaprağı su ekstraktının her iki polaritede ayrıştırılan fraksiyonlarının *R. simulans* nimf ACHE'lerine daha duyarlı olduğu tespit edildi. OE'nin alıkonma zamanlarındaki pik alanlarından belirlenen OE içerikleri en fazla olan 3-6 arasındaki fraksiyonlarda, her iki evreninde IC₅₀ değerlerinin genel olarak daha düşük olduğu bununla paralel olarak bu fraksiyonların nimf ACHE'lerini daha yüksek oranlarda inhibe ettikleri belirlendi. Literatürdeki çalışmalarda OE'nin eeACHE için kullanılan ekstraksiyon çözücüsüne bağlı olarak IC₅₀ değerleri 0,35; 0,80; 2,92; 3,60 mg/mL (Khizrieva, Borisenko, Maksimenko ve Borisenko, 2021), 101,7 µg/mL olarak belirlenmiştir (Omar, 2015). OE ile yapılan başka bir inhibisyon çalışmasında ACHE ve BCHE enzimleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,3157 µM ve 0,0878 µM olarak belirlenmiş ve takrine kıyasla oleuropeinin ACHE ve BCHE'nin etkili bir inhibitörü olduğu rapor edilmiştir (Aydın ve Akıncıoğlu, 2019). Bu fraksiyonlarla yapılan çalışmalardaki IC₅₀ değerlerinin literatürdeki verilerle uyumlu olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, *R. simulans*'ın ergin ve nimflerinden ACHE tek aşamada saflaştırıldı. Saflaştırılan ACHE'lerin kinetik verileri detaylı olarak incelendi ve literatürde yer alan ACHE'ler ile uyumlu olduğu belirlendi. Ergin ACHE'sinin ATC substratına daha duyarlıyken nimf ACHE'sinin inhibitörlere karşı daha duyarlı olduğu tespit edildi. ACHE inhibitörleri olarak bilinen takrin ve edrofonyumun yanında sentezlenmiş bazı metal komplekslerin, her iki evredeki ACHE'ler üzerine oldukça iyi inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte bazı bitkilerin su ekstraktlarının da bu enzimi inhibe ettiği gözlemlendi. Özellikle bu bitki ekstraktlarının suyla elde edilmiş ve düşük konsantrasyonlarda etkili olmaları, bu tez çalışmasında en

dikkat çekici sonucu oluşturmaktadır. Bu veriler ışığında kimyasal ilaçlara gereksinim duyulmadan bu bitkilerin suyla hazırlanan ekstraktları kullanılarak, bu ve benzer zararlılarla hem nimf hem de ergin aşamasında mücadele edilebilir. Bu sayede çevreye daha duyarlı bir mücadele yöntemi kullanılmış olacaktır.

3.2. Öneriler

Ricania simulans ergin ve nimflerinden ACHE, edrofonyum kolonu ile tek adımda saflaştırıldı. Saflaştırmada aşamasında aynı yöntemle farklı kolonlar kullanılarak veya birden fazla yöntem uygulanarak, saflaştırma oranı ve verim artırılabilir. Nimflerin her bir büyüme dönemi ayrı ayrı saflaştırılarak, tüm evreler birbiriyle karşılaştırılabilir. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan kimyasal ve bitkisel kaynaklara en duyarlı olan evrenin belirlenmesi, bu zararlıyla mücadelede daha faydalı olabilir.

Kullanılan bitki ekstraktlarında ACHE enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bir veya birden fazla etken madde içerebilir, ancak bu bileşenlerin saflaştırılması ve etkilerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi daha faydalı olabilir.

Bu veriler ışığında, bu zararlının nimflerinin ortaya çıkmaya başladığı Mayıs ayı başlarından itibaren ACHE inhibisyonunda etkisi en yüksek olan zeytin yaprağı su ekstreğinin, bu zararlının istila ettiği bölgelere periyodik olarak uygulanması önerilebilir. *R. simulans* konakçılarına periyodik olarak uygulanmasıyla, konakçılardaki ve etrafındaki inhibitor konsantrasyonu artar. Zararlının bu inhibitörü, solunum yaparak yada bitkilerden beslenerek emilimi ACHE'nin inhibe olmasına, bu da sinir iletiminin zamanla azalarak sinir sistemlerinin bloke olması muhtemeldir. Bu uygulama sayesinde bu zararlının popülasyonu kimyasal ilaçlamaya gerek kalmadan kısa sürede kontrol altına alınabilir ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde hızla yayılması engellenebilir.

KAYNAKÇA

- Abbou, F., Azzi, R., Ouffai, K., El Haci, I. A., Belyagoubi-Benhammou, N., Bensouici, C. ve Benamar, H. (2022). Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory properties of phenolic-rich fractions from the aerial parts of *Mentha pulegium* L. *South African Journal of Botany*, 146, 196–204. doi:10.1016/j.sajb.2021.10.024
- Abd El-Aziz, N. M., Eldin Awad, O. M., Shehata, M. G. ve El-Sohaimy, S. A. (2021). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase potential of artichoke phenolic compounds. *Food Bioscience*, 41, 2–7. doi:10.1016/j.fbio.2021.101006
- Abdellaoui, K., Boussadia, O., Miladi, M., Boughattas, I., Omri, G., Mhafdhi, M., ... Brahem, M. (2019). Olive leaf extracts toxicity to the migratory locust, *Locusta migratoria*: Histopathological effects on the alimentary canal and acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activity. *Neotropical Entomology*, 48, 246–259. doi:10.1007/s13744-018-0628-1
- Adeyemi Hassan, M. M. (2010). The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(11), 243–246. <http://www.academicjournals.org/journal/AJPAC/article-abstract/B76CE2E2388> adresinden erişildi.
- Ak, K., Güçlü, Ş., Eken, C. ve Sekban, R. (2015). Türkiye için yeni bir zararlı *Ricania simulans* (Walker, 1851) *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae), 39(2), 179–186.
- Ak, K., Güçlü, Ş. ve Sekban, R. (2013). Doğu Karadeniz Bölgesinde yeni bir zararlı *Ricania simulans* (Walker , 1851) (Hemiptera: Ricaniidae)’ a karşı azadirachtin ve spinosad etki maddeli biyopestisitlerin etkinliklerinin belirlenmesi, 6(1), 10–14.
- Andrisano, V., Bartolini, M., Gotti, R., Cavrini, V. ve Felix, G. (2001). Determination of inhibitors’ potency (IC₅₀) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(2), 375–383. doi:10.1016/S0378-4347(00)00571-5
- Ansari, M., Kazemipour, M. ve Fathi, S. (2011). Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8(1), 38–47. doi:10.1007/BF03246200
- Arens, A. M. ve Kearney, T. (2019). Adverse Effects of Physostigmine. *Journal of Medical Toxicology*, 15(3), 184–191. doi:10.1007/s13181-019-00697-z
- Askar, K. A., Kudi, A. C. ve Moody, A. J. (2011). Purification of soluble

- acetylcholinesterase from sheep liver by affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 336–346. doi:10.1007/s12010-011-9254-7
- Aydın, T. ve Akıncıoğlu, H. (2019). Anticholinesterase activities of oleuropein from *Olea europaea* L. *3rd International Conference On Advances In Natural & Applied Science Chemistry* içinde (s. 53).
- Bal, S., Kaya, R., Gök, Y., Taslimi, P., Aktaş, A., Karaman, M. ve Gülçin, İ. (2020). Novel 2-methylimidazolium salts: Synthesis, characterization, molecular docking, and carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 94. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103468
- Bartolucci, C., Stojan, J., Yu, Q. S., Greig, N. H. ve Lamba, D. (2012). Kinetics of *Torpedo californica* acetylcholinesterase inhibition by bisnorcymserine and crystal structure of the complex with its leaving group. *Biochemical Journal*, 444(2), 269–277. doi:10.1042/BJ20111675
- Batiha, G. E.-S., Alkazmi, L. M., Nadwa, E. H., Rashwan, E. K., Beshbishy, A. M., Shaheen, H. ve Wasef, L. (2020). Physostigmine: A plant alkaloid isolated from *Physostigma venenosum*: A review on pharmacokinetics, pharmacological and toxicological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(1-s), 187–190. doi:10.22270/jddt.v10i1-s.3866
- Birman, S. (1985). Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochemical Journal*, 225(3), 825–828. doi:10.1042/bj2250825
- Bondžić, A. M., Lazarević-Pašti, T. D., Leskovac, A. R., Petrović, S., Čolović, M. B., Parac-Vogt, T. N. ve Janjić, G. V. (2020). A new acetylcholinesterase allosteric site responsible for binding voluminous negatively charged molecules – the role in the mechanism of AChE inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151, 1–10. doi:10.1016/j.ejps.2020.105376
- Bourne, Y., Taylor, P. ve Marchot, P. (1995). Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. *Cell*, 83(3), 503–512. doi:10.1016/0092-8674(95)90128-0
- Chai, Y. X., Liu, G. Y. ve Wang, J. J. (2007). Toxicological and biochemical characterizations of AChE in *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 197–202. doi:10.1016/j.pestbp.2006.11.003
- Chatonnet, A. ve Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 260(3), 625–634. doi:10.1042/bj2600625
- Chen, Y., Zhu, Y., Zhao, Y. ve Wang, J. (2021). Fluorescent and colorimetric dual-response sensor based on copper (II)-decorated graphitic carbon nitride

- nanosheets for detection of toxic organophosphorus. *Food Chemistry*, 345, 1–8. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128560
- Cheng, S., Song, W., Yuan, X. ve Xu, Y. (2017). Gorge motions of acetylcholinesterase revealed by microsecond molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. doi:10.1038/s41598-017-03088-y
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. ve Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. doi:10.2174/1570159x11311030006
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366, 1–13. doi:10.1016/j.cca.2005.10.008
- De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J. ve Sorin, E. J. (2021). A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. *Biomolecules*, 11(4). doi:10.3390/biom11040580
- De Los Ríos, C. (2012). Cholinesterase inhibitors: A patent review (2007 - 2011). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(8), 853–869. doi:10.1517/13543776.2012.701619
- De Souza, L. G., Rennã, M. N. ve Figueroa-Villar, J. D. (2016). Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 11–23. doi:10.1016/j.cbi.2016.05.001
- Dooley, M. ve Lamb, H. M. (2000). Donepezil. A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs and Aging*, 16(3), 199–226. doi:10.2165/00002512-200016030-00005
- Dudai, Y. ve Silman, I. (1974). The molecular weight and subunit structure of acetylcholinesterase preparations from the electric organ of the electric eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 59(1), 117–124. doi:10.1016/S0006-291X(74)80182-8
- Dural, T. (2019). *Azo-oksim ligandı ve bipridin/fenantrolin uç ligandları ile karışık ligantlı geçiş metal komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Duranay, S., Anil, S., Hasbal, G. ve Özsoy, N. (2019). Purification of acetylcholinesterase from the mollusc *Mytilus galloprovincialis* Lam. and investigation of its kinetic properties. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4), 759–769. doi:10.12991/jrp.2019.185
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. ve Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 10–22. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. ve Featherstone, R. M. (1961). A new and

- rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 2–3. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- Ferreira, J. P. ., Albuquerque, M. T., Cardoso, S. M., Silva, A. M. S. ve Silva, V. L. M. (2021). European journal of medicinal chemistry dual-target compounds for Alzheimer ' s disease : Natural and synthetic AChE and BACE-1 dual-inhibitors and their structure-activity relationship (SAR). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221, 1–26. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113492
- Fournier, D. ve Mutero, A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology*, 108(1), 19–31. doi:10.1016/1367-8280(94)90084-1
- Franjesevic, A. J., Sillart, S. B., Beck, J. M., Vyas, S., Callam, C. S. ve Hadad, C. M. (2019). Resurrection and reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry - A European Journal*, 25(21), 5337–5371. doi:10.1002/chem.201805075
- Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254. doi:10.1289/ehp.9087245
- Gao, J. R., Rao, J. V., Wilde, G. E. ve Zhu, K. Y. (1998). Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 39(3), 118–125. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1998)39:3<118::AID-ARCH4>3.0.CO;2-6
- Gao, J. R. ve Zhu, K. Y. (2001). An acetylcholinesterase purified from the greenbug (Schizaphis graminum) with some unique enzymological and pharmacological characteristics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(11), 1095–1104. doi:10.1016/S0965-1748(01)00057-1
- Gao, J., Rao, J. V., Wilde, G. E. ve Zhu, K. Y. (1998). Purification and kinetic analysis of acetylcholinesterase from Western Corn Rootworm , *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera : Chrysomelidae), 39, 118–125.
- Getman, D. K., Eubanks, J. H., Camp, S., Evans, G. A. ve Taylor, P. (1992). The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics*, 51(1), 170–177.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., Macphee-Quigley, K. ve Taylor, P. (1990). Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7551–7554.
- Göktürk, T. (2020). Bazı entomopatojenlerin *Orosanga japonica* (Hemiptera: Ricaniidae) üzerindeki öldürücü etkilerinin belirlenmesi. *Türkiye Tarımsal*

- Göktürk, T. ve Aksu, Y. (2014). Morphology, biology and damage of *Ricania simulans* (Walker) 1851 (Hemiptera: Ricaniidae) which damages in the agriculture and forest areas. In *Proceedings of the 2nd Symposium of Turkey Forest Entomology and Pathology*, 282–285.
- Gokturk, T., Kordali, S. ve Bozhuyuk Usanmaz, A. (2017). Insecticidal effects of essential oils against nymphal and adult stage of *Ricania simulans* (Hemiptera: Ricanidae). *Natural Product Communications*, 12(8.5.2017), 973–976.
- Gokturk, T. ve Mihli, A. (2016). The effect of Pyrethrum and *Bacillus thuringiensis* against *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: ricanidae) in Turkey. *Annals of Agrarian Science*, 14(4), 311–314. doi:10.1016/j.aasci.2016.09.007
- Göktürk, T. ve Mihli, A. (2015). Doğu Karadeniz sahil şeridinin önemli zararlısı *Ricania simulans* (Walker) 1851 (Hemiptera: Ricaniidae)'un mücadelesi üzerine araştırmalar. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16(1). doi:10.17474/acuofd.44749
- Gokturk, T., Tozlu, E. ve Kotan, R. (2018). Prospects of entomopathogenic bacteria and fungi for biological control of ricania simulans (Walker 1851) (Hemiptera: Ricaniidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1), 75–82. doi:10.17582/journal.pjz/2018.50.1.75.82
- Gómez, J. L., Nieto-Cerón, S., Campoy, F. J., Muñoz-Delgado, E. ve Vidal, C. J. (2003). Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(7), 1109–1118. doi:10.1016/S1357-2725(03)00007-4
- Guedes, R. N. C., Zhu, K. Y., Kambhampati, S. ve Dover, B. A. (1998). Characterization of acetylcholinesterase purified from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 119(2), 205–210. doi:10.1016/S0742-8413(97)00208-9
- Gülçin, İ., Gören, A. C., Taslimi, P., Alwasel, S. H., Kılıc, O. ve Bursal, E. (2020). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(November 2019). doi:10.1016/j.bcab.2019.101441
- Guo, Y., Yang, H., Huang, Z., Tian, S., Li, Q., Du, C., ... Liu, Z. (2020). Design, synthesis, and evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase dual-target inhibitors against Alzheimer's diseases. *Molecules*, 25, 1–21. doi:10.3390/molecules25030489
- Güzel, E., Koçyiğit, Ü. M., Arslan, B. S., Ataş, M., Taslimi, P., Gökalp, F., ... Gülçin,

- İ. (2019). Aminopyrazole-substituted metallophthalocyanines: Preparation, aggregation behavior, and investigation of metabolic enzymes inhibition properties. *Archiv der Pharmazie*, 352(2). doi:10.1002/ardp.201800292
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., ... Sussman, J. L. (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), 9031–9035. doi:10.1073/pnas.90.19.9031
- Hodgson, A. J. ve Chubb, I. W. (1983). Isolation of the secretory form of soluble acetylcholinesterase by using affinity chromatography on edrophonium-sepharose. *Journal of Neurochemistry*, 41, 654–662. doi:10.1111/j.1471-4159.1983.tb04791.x
- Hostettmann, K., Borloz, A., Urbain, A. ve Marston, A. (2006). Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Current Organic Chemistry*, 10(8), 825–847. doi:10.2174/138527206776894410
- Hsu, J. C., Wu, W. J., Haymer, D. S., Liao, H. Y. ve Feng, H. T. (2008). Alterations of the acetylcholinesterase enzyme in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* are correlated with resistance to the organophosphate insecticide fenitrothion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2), 146–154. doi:10.1016/j.ibmb.2007.10.002
- Işık, M. (2015). *Alzheimer tipi demans ve koroner arter hastalarında asetilkolinesteraz gen ekspresyonu ve bazı biyomarkir düzeylerinin belirlenmesi ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenerek bazı fenolik bileşiklerin bu enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Jann, M. W. ve FCCP, P. D. (2000). Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, 20(1), 1–12.
- Jeger, R. V. (2013). Mens sana in corpore sano revisited. *European Heart Journal*, 34(33), 2580–2581. doi:10.1093/eurheartj/eh244
- Johnson, T. O., Ojo, O. A., Ikiriko, S., Ogunkua, J., Akinyemi, G. O., Rotimi, D. E., ... Adegboyega, A. E. (2021). Biochemical evaluation and molecular docking assessment of *Cymbopogon citratus* as a natural source of acetylcholine esterase (AChE)-targeting insecticides. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 28, 101175. doi:10.1016/j.bbrep.2021.101175
- Junaid, M., Islam, N., Hossain, M. K., Ullah, M. O. ve Halim, M. A. (2019). Metal based donepezil analogues designed to inhibit human acetylcholinesterase for Alzheimer's disease. *PloS One*, 14(2), 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0211935

- Katz, N. K. ve Barohn, R. J. (2021). The history of acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of myasthenia gravis. *Neuropharmacology*, 182, 1–9. doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108303
- Keane, S. ve Ryan, M. F. (1999). Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(12), 1097–1104. doi:10.1016/S0965-1748(99)00088-0
- Khizrieva, S. S., Borisenko, S. N., Maksimenko, E. V. ve Borisenko, N. I. (2021). Evaluation of different extraction techniques for the assay of anti-acetylcholinesterase activity of olive leaves (*olea europaea*). *Chimica Techno Acta*, 8(4), 9–13. doi:10.15826/chimtech.2021.8.4.03
- Kim, Y. H. ve Lee, S. H. (2018). Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and non-classical functions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1), 186–195. doi:10.1016/j.aspen.2017.11.017
- Koçancı, F. G. ve Aslim, B. (2016). Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants asetilkolinesterazın yapısı ve fonksiyonları ve bitkilerin asetilkolinesteraz inhibitör etkileri. *Manas Journal of Agriculture and Life Science*, 6(1), 19–35.
- Komersová, A., Komers, K. ve Cegan, A. (2007). New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity. *Zeitschrift für Naturforschung C. Journal of Biosciences*, 62c, 150–154. doi:10.1515/znc-2007-1-225
- Kontaş, E. (2012). Türkiye ve dünyada kivi üretimi. *Tarım Türk Dergisi*, 38, 90-92.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Leuzinger, W. ve Baker, A. L. (1967). Acetylcholinesterase, I. large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57(2), 446–451. doi:10.1073/pnas.57.2.446
- Li, F. ve Han, Z. (2002). Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii glover*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(1), 37–45. doi:10.1002/arch.10048
- Li, M., Gao, X., Lan, M., Liao, X., Su, F., Fan, L., ... Ding, X. (2020). Inhibitory activities of flavonoids from *Eupatorium adenophorum* against acetylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170(September), 104701. doi:10.1016/j.pestbp.2020.104701
- Li, S., Zhao, J., Huang, R., Travers, J., Klumpp-Thomas, C., Yu, W., ... Xia, M. (2021). Profiling the tox21 chemical collection for acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Health Perspectives*, 129(4). doi:10.1289/EHP6993
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J. (1951). Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lwebuga-Mukasa, J. S., Lappi, S. ve Taylor, P. (1976). Molecular forms of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: Their relation to synaptic membranes. *Biochemistry*, 15(7), 1425–1434. doi:10.1021/bi00652a012
- Maček Hrvat, N., Kalisiak, J., Šinko, G., Radić, Z., Sharpless, K. B., Taylor, P. ve Kovarik, Z. (2020). Evaluation of high-affinity phenyltetrahydroisoquinoline aldoximes, linked through anti-triazoles, as reactivators of phosphorylated cholinesterases. *Toxicology Letters*, 321, 83–89. doi:10.1016/j.toxlet.2019.12.016
- Martín-Blosca, Y., Asensi-Bernardi, L., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S. ve Medina-Hernández, M. J. (2009). Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet. *Journal of Separation Science*, 32(10), 1748–1756. doi:10.1002/jssc.200800701
- Masson, P., Legrand, P., Bartels, C. F., Froment, M. T., Schopfer, L. M. ve Lockridge, O. (1997). Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36(8), 2266–2277. doi:10.1021/bi962484a
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. ve Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31–91. doi:10.1016/0301-0082(93)90040-Y
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F. ve Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103(3), 778–786. doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.017
- Meng, X., Li, C., Xiu, C., Zhang, J., Li, J., Huang, L., ... Liu, Z. (2016). Identification and biochemical properties of two new acetylcholinesterases in the pond Wolf spider (*Pardosa pseudoannulata*). *Plos One*, 11(6), 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0158011
- Moghadam, B., Ashouri, M., Roohi, H. ve Karimi-jafari, M. H. (2021). Journal of Molecular graphics and modelling computational evidence of new putative allosteric sites in the acetylcholinesterase receptor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 107 (May), 107981. doi:10.1016/j.jmgm.2021.107981
- Mohamed, M. A., Abdel-Gawad, A. S. ve Ghazy, A. E. M. (2007). Purification and characterization of an acetylcholinesterase from the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 146(3), 314–324. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.001

- Mohamed, M. A., Shaalan, S., Ghazy, A. E. M., Ali, A. A., Abd-Elaziz, A. M., Ghanem, M. M. E. ve Abd-Elghany, S. A. (2020). Purification and characterization of acetylcholinesterase in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 1029–1040. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.071
- Mutunga, J. M., Anderson, T. D., Wong, D. M., Carlier, P. R. ve Bloomquist, J. R. (2009). Inhibition of *Blattella germanica* acetylcholinesterase by Bis(n)-tacrines: Prospects for the molecular design of a selective insecticide for a household pest. *ACS Symposium Series*, 1015, 41–51. doi:10.1021/bk-2009-1015.ch004
- Nachmansohn, D. (1970). Proteins in excitable membranes. *Science , New Series*, 168(3935), 1059–1066. <https://www.jstor.org/s adresinden erişildi>.
- Naji, A. ve Owens, M. L. (2021). *Edrophonium*. STATPEARL. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554566 adresinden erişildi>.
- Nordin, N., Abdulla, R., Ahmad, S. A. ve Sabullah, M. K. (2022). Acetylcholinesterase (AChE) of *Diodon hystrix* brain as an alternative biomolecule in heavy metals biosensing. *Journal of Applied Science and Engineering (Taiwan)*, 25(3), 473–480. doi:10.6180/jase.202206_25(3).0014
- Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Russell, R. J. ve Robin, G. C. (1999). Carboxyl/cholinesterases: A case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21 (12), 1031–1042. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1031::AID-BIES7>3.0.CO;2-J
- Ochoa, R., Rodriguez, C. A. ve Zuluaga, A. F. (2016). Perspectives for the structure-based design of acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 68, 176–183. doi:10.1016/j.jmgn.2016.07.002
- Oliveira, C., Bagetta, D., Cagide, F., Teixeira, J., Amorim, R., Silva, T., ... Borges, F. (2019). Benzoic acid-derived nitrones: A new class of potential acetylcholinesterase inhibitors and neuroprotective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174, 116–129. doi:10.1016/j.ejmech.2019.04.026
- Omar, S. H. (2015). *Pharmacology of Olive Biophenols in Alzheimer's Disease Prevention and Treatment*. Charles Sturt University.
- Orak, N. (2011). *Asetilkolinesteraz'ın bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu*. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pasandideh, S. ve Arasteh, A. (2021). Evaluation of antioxidant and inhibitory properties of *Citrus aurantium* L. on the acetylcholinesterase activity and the production of amyloid nano-bio fibrils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 366–372. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.043
- Patočka, J., Kuča, K. ve Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta medica*

(Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové, 47(4), 215–229. doi:10.14712/18059694.2018.104

- Piersanti, S., Reborá, M., Salerno, G. ve Anton, S. (2020). The antennal pathway of dragonfly nymphs, from sensilla to the brain. *Insects*, 11(12), 1–15. doi:10.3390/insects11120886
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, 155(3), 219–230. doi:10.5507/bp.2011.036
- Pohanka, M. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors. *British Columbia Medical Journal*, 53(8), 404–408. doi:10.1016/b978-1-4160-3597-8.00014-7
- Pohanka, M. (2014, 2 Haziran). Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences. Molecular Diversity Preservation International*. doi:10.3390/ijms15069809
- Pohanka, M., Hrabínová, M., Kuca, K. ve Simonato, J. P. (2011). Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2631–2640. doi:10.3390/ijms12042631
- Poirier, L., Brun, L., Jacquet, P., Lepolard, C., Armstrong, N., Torre, C., ... Chabrière, E. (2017). Enzymatic degradation of organophosphorus insecticides decreases toxicity in planarians and enhances survival. *Scientific Reports*, 7(1), 15194. doi:10.1038/s41598-017-15209-8
- Pope, C. N. (2017). Edrophonium. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1–4. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.97625-6
- Prabhakaran, S. K. ve Kamble, S. T. (1996). Biochemical characterization and purification of esterases from three strains of German cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 31(1), 73–86. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:1<73::AID-ARCH5>3.0.CO;2-Y
- Radić, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S. ve Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32(45), 12074–12084. doi:10.1021/bi00096a018
- Rajesh, B., Ramesh, B., Rajkiran Reddy, B., Vimala Devi, N., Gayathri, K. ve Bhargav, P. (2017). Genomics of Acetylcholinesterase (ACHE) nezyme and its related RNA content in the brain of *Hemidactylus frenatus*. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(2), 31–36. doi:10.9790/264x-03023136
- Rampa, A., Bisi, A., Belluti, F., Gobbi, S., Valenti, P., Andrisano, V., ... Recanatini, M. (2000). Acetylcholinesterase inhibitors for potential use in Alzheimer's disease: Molecular modeling, synthesis and kinetic evaluation of 11H-indeno-

- [1,2-b]-quinolin-10-ylamine derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8(3), 497–506. doi:10.1016/S0968-0896(99)00306-5
- Rosenberry, T. L. (1979). Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *Biophysical Journal*, 26(2), 263–289. doi:10.1016/S0006-3495(79)85249-2
- Sagane, Y., Nakagawa, T., Yamamoto, K., Michikawa, S., Oguri, S. ve Momonoki, Y. S. (2005). Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiology*, 138(3), 1359–1371. doi:10.1104/pp.105.062927
- Salgado, V. L. (2013). *Thechnical training manual. Insecticide Mode of Action*.
- Sarria, A. L. F., Vilela, A. F. L., Frugeri, B. M., Fernandes, J. B., Carlos, R. M., da Silva, M. F. das G. F., ... Cardoso, C. L. (2016). Copper (II) and zinc (II) complexes with flavanone derivatives: Identification of potential cholinesterase inhibitors by on-flow assays. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 164, 141–149. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.09.010
- Scott, I. M., Jensen, H., Scott, J. G., Isman, M. B., Arnason, J. T. ve Philogène, B. J. R. (2003). Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54(4), 212–225. doi:10.1002/arch.10118
- Seltzer, B. (2007). Donepezil: An update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(7), 1011–1023. doi:10.1517/14656566.8.7.1011
- Shen, G. M., Wang, X. N., Dou, W. ve Wang, J. J. (2012). Biochemical and molecular characterisation of acetylcholinesterase in four field populations of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 68(12), 1553–1563. doi:10.1002/ps.3340
- Shi, J., Boyd, A. E., Radic, Z. ve Taylor, P. (2001). Reversibly bound and covalently attached ligands induce conformational changes in the omega loop, Cys69-Cys96, of mouse acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42196–42204. doi:10.1074/jbc.M106896200
- Siegfried, B. D., Ono, M. ve Swanson, J. J. (1997). Purification and characterization of a carboxylesterase associated with organophosphate resistance in the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36(3), 229–240. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1997)36:3<229::AID-ARCH7>3.0.CO;2-O
- Silman, I. ve Sussman, J. L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 3–10. doi:10.1016/j.cbi.2008.05.035

- Soler-Rivas, C., Espiñ, J. C. ve Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013–1023. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C
- Son, J. Y., Shin, S., Choi, K. H. ve Park, I. K. (2002). Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(2), 204–210. doi:10.1016/S1357-2725(01)00082-6
- Spencer, C. M. ve Noble, S. (1998). Rivastigmine. *Adis Drug Evaluation*, 13(5), 391–411.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. ve Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872–879. doi:10.1126/science.1678899
- Sussman, J. L. ve Silman, I. (1992). Acetylcholinesterase: Structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Current Biology*, 2(11), 612. doi:10.1016/0960-9822(92)90176-b
- Taylor, P. (1991). The cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4025–4028. doi:10.1016/S0021-9258(20)64277-6
- Taylor, P., Camp, S. ve Radic, Z. (2009). Acetylcholinesterase, 5–7.
- Temel, H. E. (2008). *Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi*. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Triggle, D. J., Mitchell, J. M. ve Filler, R. (1998). The pharmacology of physostigmine. *CNS Drug Reviews*, 4(2), 87–136. doi:10.1111/j.1527-3458.1998.tb00059.x
- Valle, A. M. (2008). *The cholinesterase: a study in pharmacogenomics*. UC San Diego Electronic Theses and Dissertations. University of California, San Diego.
- Vinotha Alex, A. ve Mukherjee, A. (2021). Review of recent developments (2018–2020) on acetylcholinesterase inhibition based biosensors for organophosphorus pesticides detection. *Microchemical Journal*, 161, 105779. doi:10.1016/j.microc.2020.105779
- Vyas, N. A., Bhat, S. S., Kumbhar, A. S., Sonawane, U. B., Jani, V., Joshi, R. R., ... Joshi, B. (2014). Ruthenium(II) polypyridyl complex as inhibitor of acetylcholinesterase and A β aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 75, 375–381. doi:10.1016/j.ejmech.2014.01.052
- Wagstaff, A. J. ve McTavish, D. (1994). Tacrine: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's

- disease. *Drugs and Aging*, 4(6), 510–540. doi:10.2165/00023210-199402040-00007
- Weinstock, M. (1999). Selectivity of cholinesterase inhibition: Clinical implications for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs*, 12(4), 307–323. doi:10.2165/00023210-199912040-00005
- Whitmore, C., Lindsay, C. D., Bird, M., Gore, S. J., Rice, H., Williams, R. L., ... Green, A. C. (2020). Assessment of false transmitters as treatments for nerve agent poisoning. *Toxicology Letters*, 321, 21–31. doi:10.1016/j.toxlet.2019.12.010
- Winkelhausen, E., Pospiech, R. ve Laufenberg, G. (2005). Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Cogent Chemistry*, 24(1), 41–46. doi:10.1080/23312009.2015.1079349
- Wlodek, S. T., Clark, T. W., Scott, L. R. ve McCammon, J. A. (1997). Molecular dynamics of acetylcholinesterase dimer complexed with tacrine. *Journal of the American Chemical Society*, 119(40), 9513–9522. doi:10.1021/ja971226d
- Xiao, L. S., Dou, W., Li, Y. ve Wang, J. J. (2010). Comparative studies of acetylcholinesterase purified from three field populations of *Liposcelis entomophila* (enderlein) (psocoptera: liposcelididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 75(3), 158–173. doi:10.1002/arch.20378
- Xu, G. ve Bull, D. L. (1994a). Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: Muscidae) II: biochemical and molecular properties. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 27(2), 109–121. doi:10.1002/arch.940270204
- Xu, G. ve Bull, D. L. (1994b). Acetylcholinesterase from the horn fly (Diptera: Muscidae) distribution and purification. *Journal of Economic Entomology*, 87(1), 20–26. doi:doi:10.1093/jee/87.1.20
- Xu, Y., Colletier, J. P., Weik, M., Qin, G., Jiang, H., Silman, I. ve Sussman, J. L. (2010). Long route or shortcut? A molecular dynamics study of traffic of thiocholine within the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Biophysical Journal*, 99(12), 4003–4011. doi:10.1016/j.bpj.2010.10.047
- Zanon, V. S., Lima, J. A., Cuya, T., Lima, F. R. S., da Fonseca, A. C. C., Gomez, J. G., ... Vargas, M. D. (2019). In-vitro evaluation studies of 7-chloro-4-aminoquinoline Schiff bases and their copper complexes as cholinesterase inhibitors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191 (November 2018), 183–193. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.11.019
- Zhang, R., Li, N., Sun, J. ve Gao, F. (2015). Colorimetric and phosphorimetric dual-signaling strategy mediated by inner filter effect for highly sensitive assay of organophosphorus pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8947–8954. doi:10.1021/acs.jafc.5b03096
- Zhao, Q. ve Tang, X. C. (2002). Effects of huperzine A on acetylcholinesterase

isoforms in vitro: Comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *European Journal of Pharmacology*, 455(2–3), 101–107. doi:10.1016/S0014-2999(02)02589-X

Zhu, K. Y. ve Brindley, W. A. (1992). Enzymological and inhibitory properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* knight (Hemiptera:Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(3), 245–251. doi:10.1016/0965-1748(92)90061-I

Zhu, K. Y, Brindley, W. A. ve Hsiao, T. H. (1991). Isolation and partial purification of acetylcholinesterase from *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 84(3), 790–794. doi:10.1093/jee/84.3.790

Zhu, Kun Yan ve Clark, M. (1994). Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(5), 453–461. doi:10.1016/0965-1748(94)90040-X