



T.C.
ERZİNCAN BİNALI YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ SENTEZLENEN SCHİFF BAZI METAL
KOMPLEKSLERİNİN KOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO VE
İN SİLİCO METOTLARLA İNCELENMESİ

Esra YILDIRIM

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

FARMASÖTİK BİLİMLER
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Temmuz 2024
Her Hakkı Saklıdır.

**T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

**YENİ SENTEZLENEN SCHİFF BAZI METAL
KOMPLEKSLERİNİN KOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN SİLİCO
METOTLARLA İNCELENMESİ**

Esra YILDIRIM

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

**FARMASÖTİK BİLİMLER
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
Temmuz 2024
Her Hakkı Saklıdır.**

Bilimsel Etiğe Uygunluk

“Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Kolinesteraz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İn Vitro ve İn Silico Metotlarla İncelenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 02/07/2024

(İmza)

Esra YILDIRIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Kolinesteraz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İn Vitro ve İn Silico Metotlarla İncelenmesi

Esra YILDIRIM

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Amaç: Bu tez kapsamında AChE ve BChE enzimlerinin aktiviteleri üzerine Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan takrin ilacına alternatif olarak yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin kinetik parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal Metot: Bileşiklerin AChE, BChE aktivitesi spektrofotometrik olarak Ellman yöntemi ile belirlendi. AChE ve BChE için in vitro ihibisyon etkisini gösteren yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlendi.

Bulgular: Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin AChE için K_i değerleri $26,94 \pm 2,14$ ile $65,85 \pm 5,34$ arasında değişirken, BChE için $345,10 \pm 30,31$ ile $1187,00 \pm 62,23$ arasında olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmada kullandığımız Schiff Bazı metal komplekslerinin AChE ve BChE enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

2024, 66 Sayfa

Anahtar Kelimeler: AChE, BChE, Schiff Bazı Metal Kompleksleri.

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of the Effects of Novel Synthesized Schiff Base Metal Complexes on Cholinesterase Enzymes Activity by In Vitro and In Silico Methods

Esra YILDIRIM

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmaceutical Sciences

Supervisor: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Aim: Within the scope of this thesis, it is aimed to determine the kinetic parameters of the newly synthesized Schiff Base ligand (LH) and metal complexes (CoL₂, CuL₂, NiL₂ and ZnL₂) as an alternative to the drug tacrine used in the treatment of Alzheimer's disease, on the activities of AChE and BChE enzymes.

Material and Method: AChE and BChE activities of the compounds were determined spectrophotometrically by the Ellman method. Inhibition types were determined by calculating the IC₅₀ values and K_i constants of the newly synthesized Schiff Base ligand (LH) and metal complexes (CoL₂, CuL₂, NiL₂ and ZnL₂), which showed in vitro inhibition effects for AChE and BChE.

Result: While the K_i values of Schiff Base ligand (LH) and metal complexes (CoL₂, CuL₂, NiL₂ and ZnL₂) for AChE vary between 26.94 ± 2.14 and 65.85 ± 5.34 , for BChE it is 345.10 ± 30 . It was determined to be between 31 and 1187.00 ± 62.23 .

Conclusion: Schiff It has been determined that some metal complexes significantly inhibit AChE and BChE enzymes.

2024, 66 Pages

Keywords: AChE, BChE, Schiff Base Metal Complexes.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ yönetiminde, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, davranış ve çalışmalarını örnek aldığım; samimiyeti ve emeğinden dolayı kıymetli Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimizin her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen ve Yüksek Lisans Tez çalışmalarında kullandığım schiff bazı metal komplekslerini sentezleyerek tezime katkı sunan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'a,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimlerim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her daim gülyüz gösteren Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Köksal PABUÇÇU'ya, Sayın Doç. Dr. Esra DİLEK'e ve tüm hocalarıma,

Ardahan Üniversitesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e,

Tezimin düzenlemesine katkı sunan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitü Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Safiye YANMIŞ'a

Mardin İl Sağlık Müdürlüğü Eczacılık Birimi ekip arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında maddi manevi destekçilerim olan aileme,

Gönülden teşekkür ve saygılarımla...

Esra YILDIRIM

Temmuz, 2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	i
Bilimsel Etiğe Uygunluk.....	ii
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
TEŞEKKÜR	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	4
2.3. Aktif Bölge.....	6
2.4. Katalitik Etkinlik ve Spesifiklik.....	7
2.5. Kofaktörler ve Koenzimler	8
2.6. Düzenleme.....	10
2.7. Enzimler Nasıl Çalışır?	10
2.8. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	11
2.9. Michaelis-Menten Denklemi.....	12
2.10. Lineweaver-Burke Grafiği	14
2.11. Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu	15
2.11.1. Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon.....	15
2.11.2. Yarışmalı Olmayan İnhibisyon (Non – Kompetitif)	16
2.11.3. Yarı Yarışmalı (Uncompetitive) İnhibisyon	17
2.11.4. Karışık Tip (mix) İnhibisyon	18
2.12. Kolinesteraz (ChE).....	19
2.13. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE).....	20
2.13.1. AChE ‘ın Aktif Merkezi	21
2.13.2. AChE ‘ın Hidroliz Fonksiyonu.....	22
2.13.3. AChE’ ın Adezyon Proteini Olma Fonksiyonu	23
2.13.4. AChE’ ın Apoptozla ilişkisi.....	23
2.13.5. AChE’ ın Sinir Ağı ve Nörit Büyümesindeki Rolü	24

2.13.6. AChE Koroner Hastalığı Üzerine Etkisi.....	24
2.13.7. AChE Katalitik Olmayan Fonksiyonları.....	24
2.13.8. AChE İzofomları	24
2.14. Bütürlkolinesteraz	25
2.15. Alzheimer Hastalığı	26
2.15.1. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri	27
2.15.2. Alzheimer Hastalığının Patogenezi	27
2.16. Amiloid Kaskad Hipotezi.....	28
2.17. Tau Hipotezi.....	28
2.18. İzoprenoid Değişim.....	28
2.19. Kalsiyum Hipotezi	28
2.20. Kolinerjik Hipotez.....	28
2.21. AH Tedavi.....	29
2.22. AH Tedavisinde Kullanılan Geri Dönüşümlü AChEI' leri.....	29
2.23. Myastenia Graviste Kullanılan AChEI	31
2.24. Geri Dönüşümsüz AChEI'leri.....	33
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. LH Ligandının Sentezi	36
3.2. Metal Komplekslerinin Sentezi.....	36
3.3. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları	39
4.2. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri İçin K_I Sabitlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları.....	49
4.3. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri Moleküler Kenetlenme Çalışmalarının Sonuçları	60
5.TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Enzimle İle Katalizlenen ve Katalizlenmeyen İki Reaksiyonun Enerji Değişimi Serbest Enerji Diyagramı	11
Şekil 2.2. Enzim Katalizli Bir Reaksiyonun Hızına Substrat Konsantrasyonu Etkisi....	14
Şekil 2.3. Linewear-Burke Grafiği.....	13
Şekil 2.4. Yarışmalı Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği	16
Şekil 2.5. Yarışmasız Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği	17
Şekil 2.6. Yarı Yarışmalı Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği	17
Şekil 2.7. Karışık Tip İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafikleri.....	19
Şekil 2.8. AChE'nin Aktif Merkezinin Genel Gösterimi	22
Şekil 2.9. Asetilkolinin, Asetilkolinesteraz ile Hidrolizi.....	23
Şekil 2.10. Beyinde Nörofibriler Yumaklar ve Amiloid Plakların Gösterimi.....	27
Şekil 2.11. AH Tedavisinde Kullanılan AChE.....	30
Şekil 2.12. MG'in Tanı ve Semptomatik Tedavisinde Kullanılan AChEI'leri	32
Şekil 3.1. LH ligandının Sentez Mekanizması.....	36
Şekil 3.2. Metal komplekslerinin (CoL ₂ , CuL ₂ , NiL ₂ ve ZnL ₂) Sentez Mekanizması ...	37
Şekil 3.3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı (LH) ve Metal Kompleksleri (CoL ₂ , CuL ₂ , NiL ₂ ve ZnL ₂)'nin Kimyasal Yapıları	37
Şekil 4.1. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon]-Aktivite %Grafiği.....	42
Şekil 4.2. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	43
Şekil 4.3. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	43
Şekil 4.4. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	44
Şekil 4.5. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	44

Şekil 4.6. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	45
Şekil 4.7. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	45
Şekil 4.8. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	46
Şekil 4.9. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	46
Şekil 4.10. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	47
Şekil 4.11. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	47
Şekil 4.12. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	48
Şekil 4.13. Yeni sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	53
Şekil 4.14. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	53
Şekil 4.15. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	54
Şekil 4.16. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	54
Şekil 4.17. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	55
Şekil 4.18. Referans İlaç Takrin'in AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	55
Şekil 4.19. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	56

Şekil 4.20. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	57
Şekil 4.21. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	58
Şekil 4.22. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	58
Şekil 4.23. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	59
Şekil 4.24. Referans İlaç Takrin'in BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	59
Şekil 4.1. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CoL_2 -AChE (PDB ID: 7XN1) Kompleksinin Etkileşim Diyagramı.....	59
Şekil 4.2. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CuL_2 -BChE (PDB ID: 4BDS) Kompleksinin Etkileşim Diyagramı.....	59

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırması.....	6
Tablo 2.2. Enzimler Tarafından Oluşturulan Bazı Hız Artışları	7
Tablo 2.3. Enzimler için Kofaktör Olarak Görev Yapan Bazı İnorganik Elementler.....	9
Tablo 2.4. Özgül Atomların ve İşlevsel Grupların Geçici Taşıyıcıları Olarak Görev Yapan Bazı Koenzimler	9
Tablo 4.1. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları.....	38
Tablo 4.2. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	39
Tablo 4.3. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	40
Tablo 4.4. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	40
Tablo 4.5. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	40
Tablo 4.6. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları.....	41
Tablo 4.7. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	41
Tablo 4.8. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	41
Tablo 4.9. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	42
Tablo 4.10. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	42
Tablo 4.11. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları	42

Tablo 4.12. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan Madde Konsantrasyonları.....	43
Tablo 4.13. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	49
Tablo 4.14. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	50
Tablo 4.15. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	50
Tablo 4.16. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	50
Tablo 4.17. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	51
Tablo 4.18. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri	51
Tablo 4.19. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	51
Tablo 4.20. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	52
Tablo 4.21. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	52
Tablo 4.22. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	52
Tablo 4.23. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	53
Tablo 4.24. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri	53
Tablo 5.1. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin ve Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerleri ve K_i Sabitleri.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AChEI	Asetilkolinesteraz İnhibitörleri
AChER	Asetilkolinesteraz Reseptörleri
AH	Alzheimer Hastalığı
BChE	Bütirilkolinesteraz
ChAT	Kolinasetiltransferaz
ChE	Kolinesteraz
DMSO	Dimetilsülfoksit
ES	Enzim-Substrat Kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör Kompleksi
FDA	Food Drug Administration
GİS	Gastro İntestinal Sistem
IC₅₀	Enzim Aktivitesini %50 Oranında Azaltan İnhibitör Konsantrasyonu
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
KI	İnhibisyon Denge Sabiti
MG	Myastenia Greavis
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
V_{max}	Maksimum Reaksiyon Hız

1. GİRİŞ

Biyokimya yaşamın altında yatan biyokimyasal süreçleri araştıran bilim dalıdır. Biyokimyacılar tarafından yürütülen kapsamlı araştırmalar, canlıların su, ateş ve toprak gibi cansız varlıklarla aynı bileşenlerden oluştuğunu göstermiştir. Bu temel bileşenler karbon, oksijen, azot ve hidrojenden oluşur. Sonuç olarak bitkiler, hayvanlar ve insanlar tarafından sergilenen ayırt edici özellikler, hücresel yapılarında meydana gelen spesifik kimyasal reaksiyonların sonucudur. Kas kasılması ve gevşemesinden besinlerin enerjiye dönüştürülmesine ve ayrıca bir bitkinin bir tohumdan büyümesi ve kalıtsal özelliklerin yeni bir organizmaya aktarılmasına kadar uzanan tüm temel süreçler biyokimyasal reaksiyonlara dayanır ayrıca bu tepkiler temel yasalara bağlıdır. Canlı organizmalar, türleşme açısından cansız varlıklardan farklıdır ve bu nedenle canlı bir hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonlar, cansız bir ortamdaki kimyasal reaksiyonlardan önemli ölçüde farklıdır. Bir hücrenin karmaşık iç yapısı çok sayıda molekülden oluşurken, cansız madde basit kimyasal bileşiklerin karışımlarından oluşur. Bu fark esas olarak enzim adı verilen biyokimyasal maddelerin varlığından kaynaklanmaktadır.

İnsan organizmasında iki tip kolinesteraz tanımlanabilir. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirikolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8)'dir. Farklı kromozomlarda kodlanan bu iki enzimin aminoasit dizilimleri %65 oranında birbirlerine benzer olsa da erişkin normal bir insanın beyinde AChE daha yaygın olarak bulunmaktadır. AChE'nin beyindeki kolinesteraz aktivitesinin yaklaşık %20' sini oluşturduğu ve geri kalan %80'inin BChE'a atfedildiği tahmin edilmektedir (Greik ve ark., 2001).

Alzheimer hastalığında, çeşitli nörotransmitter sistemlerinde (kolinerjik, kolinerjik olmayan, serotonerjik, dopaminerjik, aminoasiterjik ve nöropeptiderjik) değişiklikler belirgindir ve en önemli değişiklikler kolinerjik sistemde meydana gelir. Kolinerjik hipotez, Alzheimer hastalığının asetilkolin ve kolin asetil transferaz gibi kolinerjik belirteçlerde bir azalma ile bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin kullanımı, asetilkolinin parçalanmasından sorumlu enzimin inhibisyonu ile sonuçlanır, böylece sinapta yüksek düzeyde nörotransmitterler



korunur. Asetilkolin seviyelerini arttırmak için uygulanan bir strateji, asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) aktivitesinin baskılanmasını içerir. AChE'nin kolinerjik sinyalleşmedeki işlevi iyi kurulmuş olsa da, BChE'nin kesin rolü belirsizliğini koruyor. Sağlıklı beyin hücrelerinde sinaptik asetilkolin hidrolizi esas olarak AChE tarafından gerçekleştirilirken, BChE'nin bu sürece katılımı minimumdur, ancak her iki enzim de nöron gelişimine ve kolinerjik sinyalleşmeye aktif katılımları ile tanınır. Bu bulgular, Alzheimer hastalığının erken evrelerinde bilişsel eksiklikleri iyileştirme potansiyelini göstermektedir (Camps ve ark., 2008).

Bu tezde yeni sentezlenen schiff bazı metal komplekslerinin kolinesteraz enzimleri aktivitesi üzerine etkilerinin in vitro ve in silico metotlarla incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda yan ürün oluşturmada ve kendileri değişmeden kimyasal reaksiyonları hızını artıran ve % 100 ürün verimiyle gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2015). Ribozim olarak bilinen katalitik aktiviteye sahip RNA'lar dışındaki tüm enzimler, protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en kapsamlı ve son derece uzmanlaşmış kategorisini oluşturur. Bu moleküller, tek bir dakika içinde 36 milyon molekülü değiştirebilen olağanüstü katalitik aktivite sergiler. Kinetik bir perspektiften bakıldığında, canlı organizmaları oluşturan biyomoleküller kayda değer bir stabiliteye sahiptir ve bu da kendiliğinden reaksiyonlara yanıt vermemelerini sağlar. Bununla birlikte, enzimatik katalizörler, bir hücre içindeki tüm kimyasal oluşumları kolaylaştırmada çok önemli bir rol oynar. Enzimler, yüksek derecede seçiciliği korurken reaksiyonların belirli koşullar altında gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca, yalnızca tekil bir substrat veya özdeş fonksiyonel gruplara sahip substratlarla reaksiyona giren enzimlerin yanı sıra, belirli bir maddenin izomerlerinden biriyle yalnızca etkileşime girebilen seçici özelliklere sahip enzimler de vardır. Sonuç olarak, en basit hücre bile, bu özellikler sayesinde aynı anda çok sayıda biyokimyasal reaksiyonu barındırabilir. Enzimlerin protein yapılarından oluştuğu ve kromozomal DNA tarafından kodlandığı göz önüne alındığında, tüm hücresel olayların düzenlenmesi ve kontrolü DNA düzeyinde gerçekleşir (Nelson ve Cox, 2005).

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, katalizledikleri reaksiyon türünün ya da substratın sonuna -az eki getirilmesiyle adlandırılırlar. Enzimler isimlendirilirken günlük kullanım için kısa bir isim ve detaylı olarak tanımlanması için sistematik bir isim verilmiştir. Günlük kullanım için enzim isimlerinde reaksiyonun substratına ve yapılan işin tanımına göre laktat dehidrogenaz, pürivat dekarboksilaz gibi isimler kullanılırken; tripsin, pepsin gibi günlük

kullanım için hiçbir ipucu vermeyen isimler de kullanılmıştır. Sistematik isimlendirmede “-az” eki gliseraldehit 3-fosfatdehidrogenaz enzimi gibi katalizlenen kimyasal reaksiyonun detaylı kısmına eklenerek kullanılmıştır.

Birçok enzimin keşfedilmesiyle IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji = International Union of Biochemistry and Molecular Biology) tarafından enzimlerin sınıflandırılmasında yeni bir sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yeni sisteme göre Her enzyme ait bir kod numarası vardır. Örneğin, E.C. 3.1.1.7 ile ifade edilen enzim için E.C. ön eki, “Enzim kod numarasını” tanımlar. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, İkinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam grubu, dördüncü rakam da her enzimin kendine özgü olan seri numarasını vermektedir. Burada 3 hidrolazlar grubundan olduğunu, 3.1. ester bağlarına etki ettiğini, 3.1.1. karboksilik ester hidrolazı olduğunu, 3.1.1.7. ise seri numarasını gösterir. Katalizledikleri reaksiyon türüne göre Enzimler sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır olarak sınıflandırılmış (Tablo 2.1) (Orak, 2011).

- # Oksidoredüktazlar; İndirgenme ve yükseltgenme olaylarını katalizlerler. Solunum olayında rol alan pirüvat dehidrojenaz ve fermentasyon olayında rol alan laktat dehidrojenaz gibi enzimler oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir.
- # Transferazlar sınıfındaki enzimler molekül transferinin gerçekleştiği tepkimeleri katalizlerler. Aldehit, keton, fosfat ve kükürt içeren gruplar gibi farklı alt sınıflara ayrılırlar. Kreatin kinaz, aspartat transaminaz bu gruptadırlar.
- # Hidrolazlar; reaksiyonları H^+ ve OH^- iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir. Lipaz, asetilkolinesteraz, fosfataz bu enzimlere örnektir.
- # Liyazlar; bir organik moleküldeki grupların substratlarından grup uzaklaştırıp çift bağların oluşumunu katalizler. Piruvat dekarboksilaz örnek verilebilir.
- # İzomerazlar; geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümlerinde görev alır. Örneğin; glukoz-6-fosfat izomeraz.
- # Ligazlar; Bağlanma için gerekli enerji ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanarak ki molekülün bağlanmasını kataliz ederler. Örneğin; piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Tablo 2.1. Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırması

Sınıf	Katalizlenen Tepkime Tipi
Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları)
Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirilmesiyle çift bağların oluşması
İzomerazlar	İzomerik formları oluturmak üzere moleküler içinde gruların transferi
Ligazlar	ATP' nin ayrılmasıyla eşleşmiş C-C, C-S, C-O ve C-N bağların oluşması

Biyokimya alanındaki araştırmaların çoğu tarih boyunca enzimlere odaklanmıştır. Bugüne kadar yaklaşık 2.000 enzim tanımlanmıştır. Bu enzimlerin önemli bir kısmı, kinetik özelliklerinin incelenmesine izin vererek saf formlarında izole edilmiştir. Ayrıca, 200'den fazla enzim başarıyla kristalleştirilmiştir. Bununla birlikte, genetik araştırmalar henüz keşfedilmemiş çok sayıda enzimin varlığını ortaya çıkarmıştır. Enzimler, proteinler gibi, 12.000 Da'dan 1.000.000 Da'ya kadar uzanan çok çeşitli moleküler kütleler sergiler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının korunmasına bağlıdır. Bir enzim denatüre edildiğinde veya alt birimlerine ayrıştırıldığında, katalitik aktivitesi tipik olarak kaybolur. Ek olarak, bir enzim amino asit bileşenlerine parçalanırsa, katalitik aktivitesi geri dönüşü olmayan bir şekilde yok edilir. Enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve kuaterner yapıları, katalitik işlevlerinin ayrılmaz bir parçasıdır.

2.3. Aktif Bölge

Enzim molekülleri, aktif bölge olarak adlandırılan özel bir cep veya açıklığa sahiptir. Bu aktif bölge, substratın hayati elementlerini oluşturan üç boyutlu bir yüzeyi birleştiren amino asit yan zincirlerini kapsar. Aktif bölge, substratın bağlanmasını kolaylaştırır ve bir enzim-substrat “ES” kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır.

Söz konusu kompleks daha sonra enzim ve ürünün varlığı ile karakterize edilen bir “EP” durumuna dönüşür. Enzim ve substrat arasındaki etkileşim, kovalent olmayan zayıf bağlar, yani hidrojen, elektrostatik ve Van der Waals kuvvetleri yoluyla kurulur.

2.4. Katalitik Etkinlik ve Spesifiklik

Enzimler benzer yapılar arasındaki substratlar arasında ayırım yapabilen bir veya birkaç belirli substratlarla etkileşerek ve sadece tek tip kimyasal reaksiyon katalizleyerek oldukça özgül yapılardır. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenemeyen reaksiyonlara göre 10^5 ila 10^{17} aralığında hız artışı olur (Tablo 2.2) (Lehninger, 2005).

Tablo 2.2. Enzimler Tarafından Oluşturulan Bazı Hız Artışları

Siklofilin	10^5
Karbonik anhidraz	10^7
Triozfosfat izomeraz	10^9
Karboksipeptitaz A	10^{11}
Fosfoglukomutaz	10^{12}
Süsinil CoA transferaz	10^{13}
Üreaz	10^{14}
Orotidin monofosfat dekarboksilaz	10^{17}

Böylesine yüksek seçicilik ve hız artışlarında aktivasyon enerjisinin düşüşüne neden olan enerji kaynağı 2 şekilde açıklanabilir.

Enzim kataliz reaksiyonlarının ilerlemesi sırasında, ilk işlem kovalent bağların yeniden düzenlenmesini içerir. Substratlar ile enzimin spesifik amino asit yan zincirleri, metal iyonları ve koenzimler gibi fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim, çoğu kimyasal reaksiyonun meydana geldiği yerdir. Bu etkileşim, enzim ve substrat üzerindeki katalitik fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağların oluşumuna neden olabilir ve bunları reaksiyon için etkili bir şekilde aktive edebilir. Ek olarak, substrat üzerindeki belirli gruplar geçici olarak enzimin fonksiyonel grubuna aktarılabilir.

Bu reaksiyonların yalnızca enzimin aktif bölgesinde meydana geldiğine dikkat etmek önemlidir. Enzimler, reaksiyon için alternatif bir yol sunarak aktivasyon enerjisini etkili bir şekilde azaltır, böylece hızını hızlandırır.

İkincisi, enzim ve substrat arasında meydana gelen kovalent olmayan etkileşimleri ifade eder. Aktivasyon enerjisini azaltmak için gereken enerjinin çoğu, substrat ve enzim arasındaki zayıf kovalent olmayan etkileşimlerden gelir. Enzimleri enzimatik olmayan katalizörlerin çoğundan gerçekten ayıran şey belirli bir ES kompleksinin oluşturulmasıdır. Bu kompleks içinde, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve iyonik etkileşimler gibi çeşitli kuvvetler, enzim ve substrat arasındaki protein yapısını stabilize etmek için birlikte çalışır. ES komplekslerinde her zayıf etkileşimin oluşmasıyla, etkileşimdeki stabilite seviyesini sağlayan bir serbest enerji salınımı vardır. Enzim ve substrat arasındaki etkileşimden kaynaklanan bağlanma enerjisi ΔG_B olarak bilinir. Bağlanma enerjisi, reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltmak için enzimler tarafından kullanılan birincil serbest enerji kaynağı olarak hizmet ettiğinden, bu sadece enzim-substrat etkileşimini stabilize etmenin ötesine geçer. Bu iki temel ve birbirine bağlı ilke, enzimlerin kovalent olmayan bağlanma enerjisini nasıl kullandığına dair kapsamlı bir açıklama sunar.

1. Enzimlerin sahip olduğu katalitik gücün birincil kaynağı, çok sayıda hassas bağın kurulmasından kaynaklanan önemli miktarda serbest enerjinin serbest bırakılmasıyla birlikte, enzimin kendisi ile substratı arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanmaktadır. Bağlanma için bu dikkate değer afinite hem özgülüğün hem de katalitik aktivitenin gelişimini teşvik eder.

2. Zayıf etkileşimler, reaksiyonun geçiş durumu içinde titizlikle ince ayarlanır, böylece enzimin aktif bölgeleri sadece substrat ile uyumlu değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyonlar sırasında substratların ürünlere dönüştürülmesini kolaylaştıran geçiş durumlarıyla da uyumludur (Nelson ve Cox, 2005).

2.5. Kofaktörler ve Koenzimler

Bazı enzimler katalitik görevlerini yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar.

Kofaktör, bir metal iyonu veya koenzim adı verilen karmaşık, ısıya dayanıklı organik bir bileşik olabilir. Katalitik olarak aktif enzim–kofaktör kompleksine holoenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine apoprotein; enzime ise apoenzim denir. Apoenzim biyolojik aktivite göstermez. Bu kofaktörler çok defa enzim–kofaktör kompleksinden diyalizle uzaklaştırılabilir. Bazı enzim–kofaktör kompleksleri kovalent olarak bağlıdır ve diyalizle uzaklaştırılamayacak kadar güçlüdür. Böyle kofaktörlere prostetik grup denir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Enzimler için Kofaktör Olarak Görev Yapan Bazı İnorganik Elementler

Enzimin metal içeriği	Örnek
Zn ²⁺ içeren	Alkol dehidrojenaz, Karbonik anhidraz, Karboksipeptidaz
Fe ²⁺ ve Fe ³⁺ içeren	Sitokromlar, Peroksidaz, Katalaz, Ferredoksin
Mg ²⁺ içeren	Fosfohidrolazlar, Fosfotransferazlar
Cu ²⁺ ve Cu ⁺ içeren	Tirozinaz, Sitokrom oksidaz
Mn ²⁺ içeren	Arginaz, Fosfotransferazlar
K ⁺ İçeren	Piruvat kinaz
Ni ²⁺	Üreaz
Se	Glutasyon peroksidaz

Koenzimler genellikle elektronların, atomların veya fonksiyonel grupların transferini gerçekleştirir. Sıklıkla karşılaşılan koenzimler vitamin türevi olan organik moleküllerdir. Örneğin NAD⁺ koenzimi niyasin FAD⁺ koenzimi riboflavin ve Koenzim A pantothenic asit içerir (Tablo 2.4) (Nelson ve Cox, 2005).

Tablo 2.4. Özgül Atomların ve İşlevsel Grupların Geçici Taşıyıcıları Olarak Görev Yapan Bazı Koenzimler

KOENZİM	TAŞINILAN BİRİM	Memelilerde Besinsel Öncül
NAD ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)	Nikotinik asit (Niyasin)
FAD ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)	Riboflavin(B12)
Tiyamin pirofosfat	Aldehitler	Tiyamin(B1)
Koenzim A	Açıl grupları	Pantotenik asit
Biyositin	CO ₂	Biyotin

2.6. Düzenleme

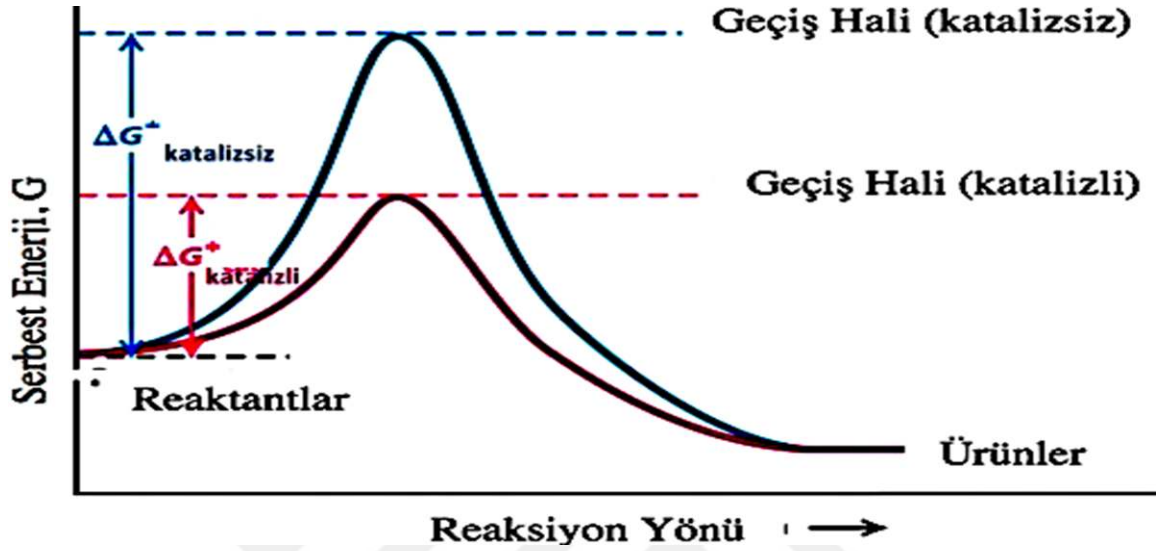
Enzimler, metabolizma içerisinde yer alan birçok metabolik yolun düzenlenmesinde kontrol görevini üstlenen en önemli faktörlerden biridir. Enzimlerin aktiviteleri bazı bileşikler tarafından artırılarak, azaltılarak ya da yok edilerek metabolik yolun hızı ayarlanmış olur. Enzimlerin aktivitelerini etkileyen bu bileşiklere modülatörler denilmektedir. Modülatörler, aktiviteyi artırıcı yönde olanlara aktivatörler denilirken, azaltıcı yönde olanlara inhibitör denilmektedir.

2.7. Enzimler Nasıl Çalışır?

Enzimatik katalizörler biyolojik sistemlerde çok önemli bir rol oynar. Katalize edilemeyen reaksiyonlar biyolojik olarak elverişli koşullar altında kademeli olarak meydana gelme eğilimindedir. Nötr pH, orta sıcaklık ve hücre içi sıvı ortamında, birçok biyolojik molekül yüksek düzeyde öngörülemezlik sergiler. Ayrıca, hücre ortamı genellikle spesifik yüklü aracılardan geçici oluşumu veya reaksiyon için gerekli oryantasyon gibi yaygın biyokimyasal reaksiyonlar için gerekli koşullardan yoksundur. Kataliz olmadan, gıda sindirimi, sinir uyarıları ve kas kasılması gibi temel işlevler verimli bir oranda ilerlemez. Enzimler, belirli bir reaksiyonu enerjik olarak destekleyen belirli bir ortam yaratarak bu zorlukları ele alır. Enzim katalizli bir reaksiyonun ayırt edici özelliği, aktif bölge olarak bilinen enzim üzerinde sınırlı bir bölgenin varlığıdır. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimin aktivitesi nedeniyle kimyasal bir dönüşüme uğrayan molekül olan substrat hayati bir rol oynar. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve kimyasal dönüşümünü kolaylaştıran amino asit kalıntılarından oluşur (Nelson ve Cox, 2005).

Biyokimyasal bir reaksiyonda, substrattan ürünlerin oluşumu enzim katalizi işlemi yoluyla gerçekleşir. Bu işlem, substrat ve ürünler arasında kararsız bir ara madde görevi gören ES kompleksinin oluşumuna yol açar. Geçiş kompleksi olarak adlandırılan ES kompleksi, kararlı bazik bileşiklere kıyasla daha fazla miktarda serbest enerjiye sahiptir. Sonuç olarak, daha kararlı bir bileşiğe dönüşmek için parçalanmaya uğrar. Bir mol substrat içindeki tüm moleküllerin geçici hale gelmesi için gereken enerji olan aktivasyon enerjisi bu süreci yönetir. de, serbest enerji diyagramı aracılığıyla hem

enzim katalizli hem de katalize edilmemiş reaksiyonlarda enerji alışverişini göstermektedir (Damodaran ve ark., 2007). Enzimle ile katalizlenen ve katalizlenmeyen iki reaksiyonun enerji değişimi serbest enerji diyagramı Şekil 2.1’de verilmiştir (Çat, 2019).



Şekil 2.1. Enzimle ile Katalizlenen ve Katalizlenmeyen İki Reaksiyonun Enerji Değişimi Serbest Enerji Diyagramı

2.8. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler hücrelerden izole edilerek test tüpü içinde yani in vitro şekilde özellikleri incelenebilir. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, reaksiyon ortamının pH'ı, aktivatörler ve inhibitörlerdir (Mohan ve ark., 2014).

Sıcaklık: Reaksiyonun hızı, sıcaklık zirveye ulaşana kadar yükseldikçe artar. Bu artış, enerji bariyerini aşmak ve reaksiyonun ürünlerini üretmek için yeterli enerjiye sahip moleküllerin miktarındaki bir artışa bağlıdır. Sıcaklıkta daha fazla yükselme, enzimin üç boyutlu konfigürasyonunun bozulmasına yol açar, onu denatüre eder ve böylece reaksiyon hızında bir düşüşe neden olur. Sıcaklıktaki bir artışa bağlı enzim aktivitesindeki azalmaya termal denatürasyon denir.

pH: H^+ konsantrasyonu reaksiyon hızını çeşitli yönlerden etkiler. İlk olarak, katalitik işlemde, enzim ve substratın belirli gruplarının bir reaksiyona girmesi için iyonize veya iyonize olmayan bir durumda var olmaları tipik olarak gereklidir. Örneğin, katalitik

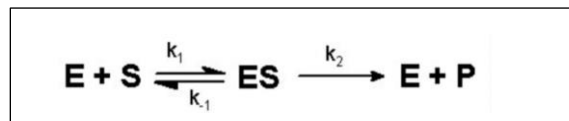
olarak aktif olmak için, enzimin bir amino grubu protonasyon gerektirebilir [NH₃⁺], böylece protonlanmış bir durum varsayılabilir. Alkali bir pH'da, bu özel grup denatürasyona uğrar ve bu da reaksiyon hızında bir azalmaya neden olur. Katalitik olarak aktif bir protein molekülünün yapısı, amino asit yan zincirlerinin özelliklerine bağlıdır ve aşırı pH değerleri enzimin denatürasyonuna yol açar. Maksimum pH değeri her enzim için değişir. Enzimin maksimum aktivite seviyesini sergilediği pH, optimum pH olarak adlandırılır. Örneğin, midede bulunan bir sindirim enzimi olan pepsin, en yüksek aktivitesini 2'lik bir pH'da gösterirken, özellikle nötr pH ortamında çalışmak üzere tasarlanmış diğer enzimler, böyle asidik bir ortamda denatürasyona uğrar.

Enzim Konsantrasyonu: Reaksiyon hızı, reaksiyon ortamında yeterli bir substrat konsantrasyonu olması koşuluyla, Michaelis-Menten kinetiğinin prensiplerine göre artan enzim konsantrasyonu ile artar. Bununla birlikte, enzim konsantrasyonu yüksek seviyelere ulaştıkça, substrat mevcudiyetindeki sınırlamalar nedeniyle reaksiyon hızı yavaşlar ve sonuçta sabit bir değere yaklaşır.

Substrat Konsantrasyonu: Bir reaksiyonun hızı, belirli bir süre içinde ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısını ifade eder. Substrat konsantrasyonu arttıkça, enzim katalizli bir reaksiyonun hızı da maksimum hıza ulaşana kadar artar. Bu noktada, reaksiyon hızı dengeye ulaşır, bu da enzimin tüm uygun bölgelerinin substrat ile doymuş olduğunu gösterir. Enzimlerin çoğu Michaelis-Menten kinetiğini takip eder ve substrat konsantrasyonuna [S] karşı reaksiyon hızını (V₀) çizirken hiperbolik bir eğri ile sonuçlanır.

2.9. Michaelis-Menten Denklemi

Michaelis-Menten denklemi, Michaelis ve Menten tarafından enzim katalizli reaksiyonların temel yönlerini kapsayan basit bir model olarak önerildi. Bu modelde, substrat enzime geri dönüşümlü olarak bağlanır ve sonunda ürüne parçalanmadan önce ES kompleksini oluşturur. Aşağıdaki diyagram, bir substrat molekülünü içeren modeli göstermektedir.



Burada S; Substrat'ı, E; Enzim'i ES; Enzim-Substrat Kompleksini ve K_1 , K_2 , K_3 : Hız sabitleri'ni gösterir.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

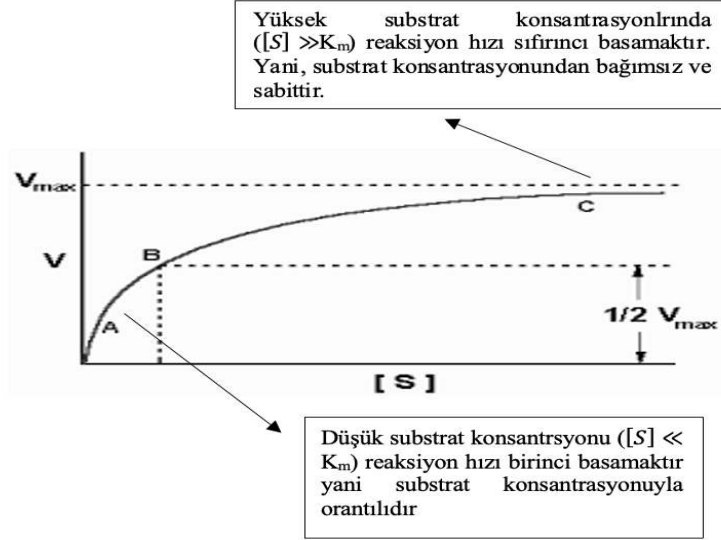
V_0 ; ilk hızı, $V_{\max}$: maksimum hızı, K_m ; Micheales sabitini= $(k_1+k_2)/ k_1$ ve $[S]$ Substrat konsantrasyonu gösterir.

Michaelis-Menten Denklemi, reaksiyon hızı ile substratın konsantrasyonu arasındaki korelasyonu gösterir. Michaelis-Menten sabiti olarak bilinen K_m , bir enzimin belirli bir substrata karşı özgülüğünü ifade eder. Enzimin söz konusu substrata olan afinitesini temsil eder. K_m , reaksiyon hızının $\frac{1}{2}$ $V_{\max}$ 'a eşit olduğu substrat konsantrasyonunun ifadesidir. K_m değeri enzim konsantrasyonundan bağımsız olarak sabit kalır. Düşük bir K_m değeri, enzimi yarı yarıya doyurmak ve $V_{\max}$ oranını elde etmek için küçük bir substrat konsantrasyonu yeterli olduğundan, enzimin substrata karşı yüksek afinitesini gösterir. Tersine, yüksek bir K_m değeri, enzimin yarı doyunluğunu sağlamak için daha yüksek bir substrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğundan, enzimin substrata karşı daha düşük bir ilgisini gösterir.

Reaksiyon hızı ve konsantrasyon arasındaki ilişki, hızın tüm substrat konsantrasyonlarında enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu şekildedir. Örneğin, enzim konsantrasyonunun yarı yarıya düşürülmesi, reaksiyon hızında başlangıç hızının yarısı olan V_0 'a karşılık gelen bir düşüşle sonuçlanır.

Reaksiyon Basamağı; $[S]$, K_m 'den çok küçükse, reaksiyonun hızı substrat konsantrasyonlarında reaksiyonun hızı substratla kabaca orantılıdır. Bu durumda reaksiyon hızını substata göre birinci basamak olduğu söylenir.

$[S]$, K_m 'den çok büyükse hız sabiti V_{max} 'a. eşittir. Bu durumda reaksiyon hızı substrat konsantrasyonundan bağımsızdır ve substarata göre sıfırıncı basamak olduğu söylenir (Şekil 2.2).

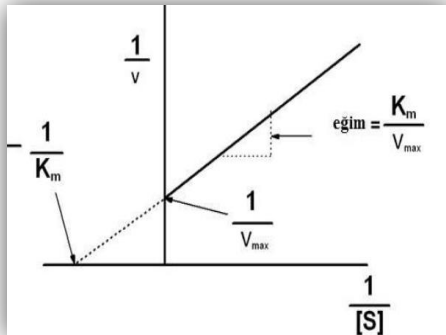


Şekil 2.2. Enzim Katalizli Bir Reaksiyonun Hızına Substrat Konsantrasyonu Etkisi

2.10. Lineweaver-Burke Grafiği

Reaksiyon hızı V_0 , substrat konsantrasyonu $[S]$ 'ye karşı çizilecek olursa hiperbolik eğrinin yüksek substrat konsantrasyonlarında yukarı eğrinin yüksek substrat konsantrasyonlarında yukarı doğru hafif eğimi nedeniyle, V_{max} 'a ne zaman ulaştığını belirlemek her zaman mümkün olmayabilir. Ancak, eğer $1/V_0$, $1/[S]$ 'ye karşı çizilecek olursa düz bir çizgi elde edilir. Bu grafiğe Lineweaver- Burke grafiği denir. K_m ve V_{max} hesaplanarak enzim nhibitörlerinin etki mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılır. X ekseniniyle kesişimi $-1/K_m$ 'e, y eksenindeki kesişimi $1/V_{max}$ değerini verir (Çolak,

2014). Şekil 2.3.'de Lineweaver-Burk grafiği verilmiştir.



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Şekil 2.3. Lineweaver-Burk Grafiği

2.11. Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

Bir inhibitör, bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyonun hızını azaltan herhangi bir madde olarak tanımlanır. Tersine çevrilebilir inhibitörler söz konusu olduğunda, hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler yoluyla enzimlerle bağlar oluştururlar. Tersine çevrilebilir bağlanma inhibitörünün çözünmesi ve enzim aktivitesinin restorasyonu, enzim-inhibitör kompleksinin seyreltilmesi üzerine meydana gelir. Geri dönüşümsüz inhibisyon ise enzim aktivitesini geri kazanamadığında ve inhibitöre kovalent olarak bağlandığında veya bir kompleks oluşturduğunda ortaya çıkar. Bu durumda, enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. Gözlenebilen iki tür inhibisyon, yarışmalı inhibisyon ve yarışmasız inhibisyonudur (Champe ve ark., 2007).

Tersinir inhibitörlerde enzim ile inhibitör arasında bir dengeye ulaşılır. Enzim-inhibitör kompleksinin (EI) K_i sabiti aynı zamanda inhibitör sabitidir" ve enzimin inhibitörlere olan afinitesini ifade eder.

2.11.1. Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon

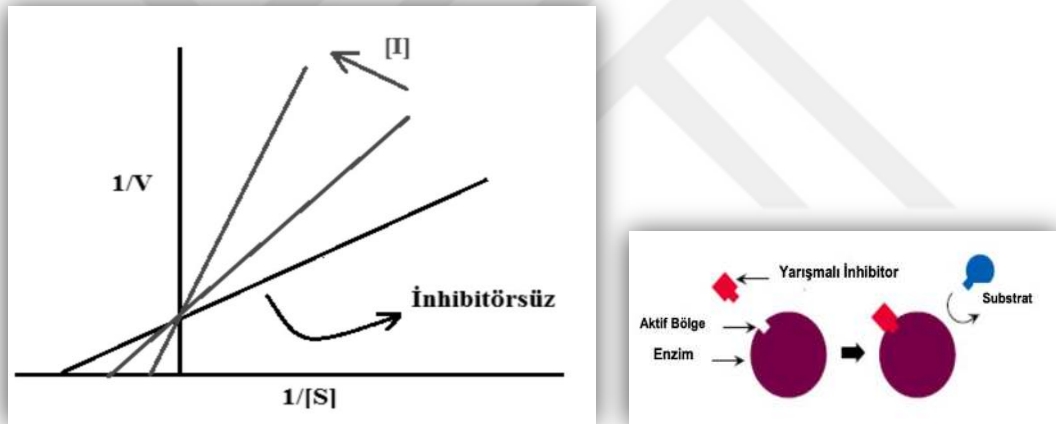
Bu inhibisyon formunda, substrat ile yapısal benzerliğe sahip olan inhibitör, substratın normalde bağlanacağı aynı yere geri dönüşümlü bir şekilde bağlanır, böylece o spesifik bölge için bir rekabete girer. Bir inhibitör aktif bölge için bir afinite gösterirse, substrata kıyasla daha büyük afinite ile bağlanırsa güçlü bir rekabetçi inhibitör olarak kabul edilirken daha az güçle bağlanırsa zayıf bir inhibitör olarak kabul edilir.

Yarışmalı inhibisyon durumlarında, inhibitör enzim-substrat kompleksine değil, yalnızca serbest enzime bağlanabilir. Sonuç olarak, inhibitör etki, substratın çevreleyen ortamdaki konsantrasyonu artırılarak azaltılabilir (Mohan ve ark., 2014).

Yarışmalı bir inhibitörün etkisi $[S]$ artırılarak ortadan kaldırılabilir. Yeterli bir inhibitör olmadan gözlenen $V_{\max}$ değerine ulaşır böylece $V_{\max}$ değişmemiş olur (Champe ve ark., 2007).

K_m üzerine etkisi; yarışmalı inhibisyon inhibe olan ve olmayan reaksiyon grafiklerinin y ekseninde $\frac{1}{2} V_{\max}$ erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir.

Linewear-Burke grafiği üzerine etkisi: Yarışmalı inhibisyon inhibe olan ve olmayan reaksiyon grafiklerinin y ekseninde $1/V_{\max}$ ’ da kesiştiği tipik bir Linewear – Burke grafiği gösterir, $V_{\max}$ değişmez. İnhibe olan ve olmayan reaksiyonlar farklı x kseni kesişmeleri göstererek yarışmalı inhibitör varlığında K_m ’in arttığına işaret ederler. Yarışmalı Bir İnhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği Şekil 2.4.’de verilmiştir.



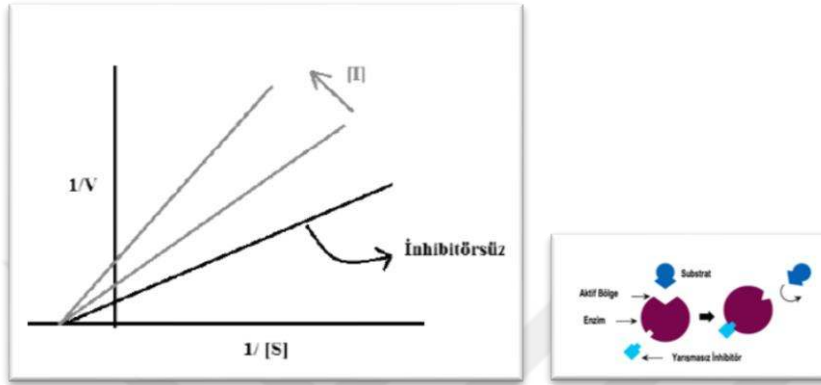
Şekil 2. 4. Yarışmalı Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği

2.11.2. Yarışmalı Olmayan İnhibisyon (Non – Kompetitif)

Bu inhibisyon tipi $V_{\max}$ üzerindeki tipik etkisiyle dikkat çeker. İnhibitör ve substrat enzimın farklı bölgelerine bağlanınca yarışmasız inhibisyon meydana gelir. Yarışmasız inhibisyon substrat konsantrasyonu artırılarak engellenemez. Bu yüzden, yarışmasız inhibitörler reaksiyonun $V_{\max}$ ’ını azaltırlar.

Yarışmasız inhibitörler substratın enzime bağlanmasını etkilemez. Bu yüzden, enzim yarışmasız inhibitör varlığında veya yokluğunda aynı K_m ’i gösterir. $1/[S]$ ’ye karşı $1/V_0$

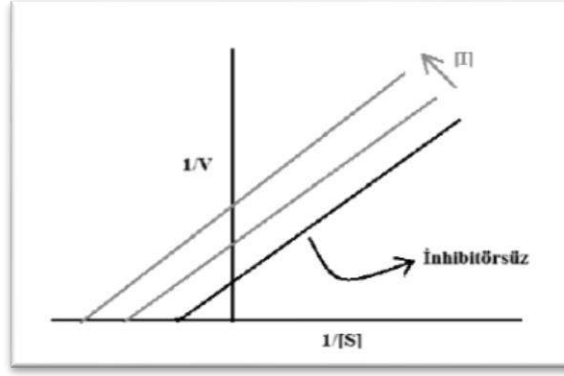
rafıgi çizilerek V_{max} 'ın yarışmasız inhibitör varlığında azaldığı, buna karşılık K_m 'in değişmediği gösterilerek, yarışmasız inhibisyon ile yarışmalı inhibisyon birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilir (Champe ve ark., 2007). Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği Şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Yarışmasız Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği

2.11.3. Yarı Yarışmalı (Uncompetitive) İnhibisyon

Yarı yarışmalı inhibitörler, yalnızca enzim ve substrat tarafından oluşturulan komplekse bağlanır. Enzimin aktif bölgesi, bu tip inhibitörler için bağlanma bölgesi değildir ve inhibitörün mutlaka substrata benzemesi gerekmez. İnhibitörün enzim-substrat kompleksi ile etkileşimi, aktive edilmiş kompleksin kullanımıyla sonuçlanır. İnhibitörün konsantrasyonu, ESI kompleksinin miktarını belirler. Ayrıca, ES kompleksinin kullanımı K_m düşüşüne yol açar. Yarı yarışmalı inhibisyonda hem K_m hem de V_{max} aynı oranda bir düşüş yaşar. Farklı bir deyişle, V_{max} 'ın K_m 'ye oranı değişmeden kalır. Yarı yarışmalı inhibisyon, $1/V_{max}$ ve $1/K_m$ 'de bir artışa neden olur. Sonuç olarak, yarı rekabetçi inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiğindeki inhibitör ve inhibitör olmayan çizgiler paraleldir. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği Şekil 2.6.'da verilmiştir.

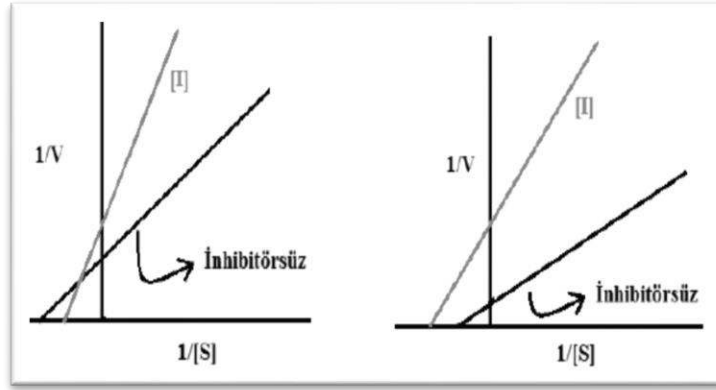


Şekil 2.6. Yarı Yarışmalı Bir İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafiği

Yarı yarışmalı inhibisyon nadirdir ancak multimerik enzim sistemlerinde ortaya çıkabilir. Yarışmalı inhibisyon kıyasla, bir metabolik yol içindeki metabolik ara ürünlerin konsantrasyonları üzerinde daha belirgin bir etki gösterme potansiyeline sahip olduğu için büyük önem taşımaktadır. Aslında, toksisitede bir artışa bile neden olabilir.

2.11.4. Karışık Tip (mix) İnhibisyon

Bazı durumlarda, bir inhibitör hem serbest enzime (ayırışma sabiti K_i ile) hem de enzim-substrat $[ES]$ kompleksine (ayırışma sabit K_i' ile) bağlanabilir. Ancak afiniteleri birbirinden farklıdır, dolayısıyla $K_i \neq K_i'$ 'dir. Burada, inhibitör bağlanması daha fazla substrat eklenerek azaltılabilir, ancak yarışmalı inhibisyonunda olduğu gibi tamamen önlenemez. Karışık tip inhibitörler bağlanmayı etkiler ve turnover(aktiviteyi) etkinliğini azaltır. Bu tip inhibisyon çoğunlukla alosterik niteliktedir. Burada inhibitör, enzim yapısında konformasyonel bir değişikliğe neden olmak için aktif bölgeden başka bir bölgeye bağlanır ve aktif bölgeye substratın afinitesini azaltır. Dolayısıyla, V_{max} azalırken K_m artar. Karışık Tip İnhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafikleri Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Karışık Tip İnhibitörün Varlığında ve Yokluğunda Enzimatik Reaksiyon Hızının Lineweaver-Burke Grafikleri

2.12. Kolinesteraz (ChE)

Esteraz/lipaz protein sınıfının α/β -hidrolaz süper ailesinin bir parçası olan kolinesterazlar serin hidrolazlardır (Cygler ve ark., 1993). Kolinesteraz (ChE) terimi, optimal koşullar göz önüne alındığında, kolin esterleri için diğer esterlere kıyasla daha hızlı bir hidroliz hızı sergileyen bir grup enzimi kapsar. Bu enzimler, yüksek ökaryotlarda esteraz ailesi içinde sınıflandırılır ve çeşitli karboksilik esterler üzerinde etki ederler (Işık, 2015).

Kolinesterazların varlığı başlangıçta 1914'te Henry Dale tarafından varsayılmıştır (Dale, 1914). Daha sonra, Marnay ve Nachmansohn 1937'de nöromusküler kavşak içindeki Torpedo ve Electrophorus'un elektrik organındaki yüksek asetilkolinesteraz konsantrasyonunu doğruladı (Trevor ve ark., 1978). İnsan vücudunda, farklı varyasyonlara ve kafa karıştırıcı isimlere sahip iki tür ChE vardır. Bunlardan biri, doğru, spesifik, doğru veya tipI ChE (veya asetilkolin asetil-hidrolaz, EC 3.1.1.7) olarak da adlandırılan AChE'dir. Bu enzim eritrositlerde, sinir uçlarında, akciğerlerde, dalakta ve beyin çeşitli bölgelerinde bulunur. Birden fazla moleküler form sergileyen zara bağlı bir glikoproteindir. BuChE (veya asilkolin asil-hidrolaz, EC 3.1.1.8) olarak bilinen diğer alt grup, spesifik olmayan veya tipII ChE olarak sınıflandırılır. BuChE plazmada bulunur ve birden fazla izoenzim varyantına sahiptir. Ek olarak, karaciğer, düz kas, bağırsaklar, serum, pankreas, kalp ve beyin beyaz maddesinde bulunur (Patočka, 2004).

AChE, asetilkolini diğer kolinesterlerden daha hızlı hidrolize ederken BChE, substrat olarak asetilkolin yerine bütirilkolini tercih eder. AChE ve BChE'yi birbirinden farklı olan bir diğer özelliği ise yüksek substrat konsantrasyon varlığında AChE'in inhibe olurken ve BChE'in aktive olmasıdır (Massolulie ve ark., 1993).

ACHE'nin birincil rolü kolinerjik nörotransmisyonu sonlandırmaktır. Bununla birlikte, asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidrolize eden BUCHE'nin tam fizyolojik işlevi bilinmemektedir (David ve ark., 2004).

2.13. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)

Asetilkolinesteraz, kolinerjik beyin sinapslarında ve nöromusküler bağlantılarda hayati bir rol oynar. Bu enzimin birincil biyolojik işlevi, katyonik nörotransmitter asetilkolini (ACh) hızla hidrolize ederek impuls iletimini sonlandırmaktır. Hidrolazlar, bir su molekülü ekleyerek veya bir su molekülü aracılığıyla molekülleri parçalayan bir enzim türüdür.

Ester, eter, peptit, asetanhidrit ve glikosil bağları gibi çeşitli bağ türleri üzerinde etki ederler. Her enzime belirli bir kod numarası verilir. AChE'nin kod numarası 3.1.1.7.'dir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu gösterir. Burada 3 hidrolazlar grubundan olduğunu, 3.1. ester bağlarına etki ettiğini, 3.1.1. karboksilik ester hidrolazı olduğunu, 3.1.1.7. ise AChE olduğunu ifade eder. Hidrolazlar, bir molekül su katmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, eter, peptit, asetanhidrit ve glikozil bağlarına etki etmektedirler. Her enzime bir kod numarası verilmiştir. AChE'nin kod numarası 3.1.1.7.'dir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu gösterir. Burada 3 hidrolazlar grubundan olduğunu, 3.1. ester bağlarına etki ettiğini, 3.1.1. karboksilik ester hidrolazı olduğunu, 3.1.1.7. ise AChE olduğunu ifade eder (Orak, 2011).

AChE, insan kromozomunda tek bir gen tarafından kodlanan, eritrositlerin membranında, akciğerlerde, kasta, dalakta, nöromusküler bağlantılarda ve gri maddede bulunan enzimdir. Enzim 575 amino asitten ibaret bir polipeptid zincirinden oluşmuş olup monomer formu 65.612 kDa molekül ağırlığındadır. AChE için optimum pH = 7.0

ve izoelektrik noktası pH 5.35'tir. Spesifitesi 1×10^{-3} M konsantrasyonundaki substrattır. Geleneksel adı, asetilkolinesteraz, sistematik adı asetilkolin asetilhidrolazdır. AChE'nin araştırmacıların bu kadar ilgisini çekmesinin tek nedeni nörotransmisyonadaki merkezi rol değildir. Enzim, ACh'yi çok yüksek bir hızda hidrolize eder ve substratın difüzyonu ve serin enzimlerinin katalitik mekanizmasının izin verdiği üst sınıra yaklaşır. AChE evrimsel mükemmel bir enzim olarak kabul edilir, çünkü substrat dönüşümündeki tüm adımlar: substrat birleşimi, kimyasal dönüşümler ve ürün ayrışması benzer hızlarda ilerler. Etkileyici katalitik gücü nedeniyle enzim, AChE'in yapısının çözülmesi ve kapsamlı sahaya yönelik mutagenез çalışmaları gibi birçok öncü çalışmaya konu olmuştur (Tougu, 2001).

AChE'nin 3 boyutlu yapısının bilgisi bu nedenle olağanüstü katalitik etkinliğini anlamak, rasyonel ilaç tasarımı ve organofosfat intoksikasyonuna yönelik terapötik yaklaşımlar geliştirmek için gereklidir.

Ayrıca AChE'nin ACh bağlanma bölgesi hakkındaki yapısal bilgi, ACh'nin muskarinik ve nikotinik ACh reseptörleri gibi diğer ACh bağlayıcı proteinler tarafından tanınmasının moleküler temelini anlamamıza yardımcı olabilir (Dvir ve ark., 2010).

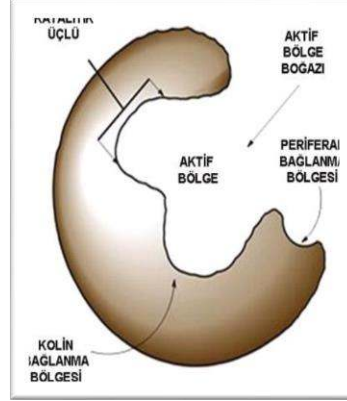
2.13.1. AChE'in Aktif Merkezi

AChE' in substrat ile etkileşimini ve hidroliz reaksiyonunu anlayabilmek için enzimin aktif merkezinden bahsetmek gerekir. AChE'in aktif merkezi iki bağlanma bölgesine sahiptir. Bunlar periferik bölge ve aktif bölgedir.

Periferik bölge, Periferik anyonik bölge olarak bilinir ve aktif çukurun ağız kısmında bulunmaktadır. Esas olarak Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 ve Tyr 334 aminoasit artığı bulundurur. Bu bölge pek çok toksin ve ilaçlar için hedeftir. Çünkü katalitik etkinliğin düzenlenmesini ve AChE' in bir çok inhibitör ile etkileşimini sağlar. AH'da bu bölge büyük öneme sahiptir (Hou, 2012).

Periferal anyonik bölge, AChE'in β amiloid yumak oluşumuna yol açan katalitik olmayan rolünün gerçekleşmesinde önemlidir. Aktif bölgenin üç alt bağlanma bölgesi bulunur. Bunlar esteratik, anyonik ve aromatik bölgelerdir. Esteratik bölgeye katalitik üçlü de denilir. Bu üçlü Ser 200, His 440 ve Glu 327 aminoasitleridir. Bu bölgede

bulunan serin ve histidin, substratın yani ACh' nin açıl grubuna geçici olarak bağlanır (Delfino, 2009). Şekil 2.8'de AChE'nin Aktif Merkezi gösterilmiştir (Işık, 2015).



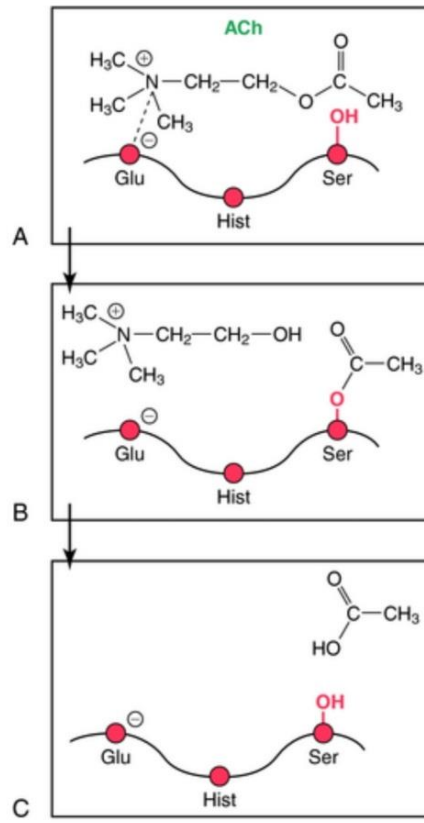
Şekil 2.8. AChE'nin Aktif Merkezinin Genel Gösterimi

2.13.2. AChE 'ın Hidroliz Fonksiyonu

ACh hücreye geri taşınmaz kullanılır, parçalanarak geri dönüştürülür. AChE saniyede yaklaşık 25000 ACh molekülünü hidroliz ederek eksitasyonu düzenler (Orak, 2011). ACh'nin enzimatik hidrolizi nükleofilik katılmalar ile asit-baz tepkimelerinden oluşur ve esteratik bölgedeki aminoasit kalıntılarının temelinde meydana gelir.

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil olarak görev alırken, ikinci basamakta enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile mükemmel bir parçalayıcı grup görevi görür (Demir ve Turkoglu, 2005).

ACh molekülünün milisaniyeler içinde hidrolize uğraması kolinerjik sinapslarda impuls iletimini sonlandırır. Sinaptik boşluğa biriken kolin, ACh sentezi için presinaptik nörona tekrar alınır. Şekil 2.9'da AChE enziminin büyük bir alanı, serin (*ser*), histidin (*hist*) ve glutamattan (*glu*) oluşan bir amino asit üçlüsü içerir. (-), enzimin anyonik bölgesini belirtir ve ser-OH, katalitik bölgeyi temsil eder. (A) ACh molekülünün kolin kısmının dördü (+) nitrojeni, ACh'nin ester kısmını katalitik bölgenin yakınına konumlandıran anyonik bölgeye çekilir; (B) ACh üzerindeki ester bağı yarılır, enzim asetillenir ve kolin salınır; (C) asetillenmiş enzimin hidrolizi asetatı hızlı serbest bırakır ve serbest enzim başka bir ACh molekülünü hidrolize edebilir (In Wecker, 2010).



Şekil 2.9. Asetilkolinin, Asetilkolinesteraz ile Hidrolizi

2.13.3. AChE' in Adezyon Proteini Olma Fonksiyonu

AChE enziminin en çok bilinen hidroliz fonksiyonundan farklı olarak birçok önemli fonksiyonu keşfedilmiştir. AChE' in adezyon proteini özelliği bulunmaktadır. Bu özellik adezyon proteinlerinin bulunmasından sonra anlaşılmıştır. Özellikle nöronal hücrelerde, fibroblastlarda morfolojik düzenleyici olarak rol oynar ve hücre matriks bilgi akışında rolü vardır (Koçancı ve Aslım, 2016).

2.13.4. AChE' in Apoptozla ilişkisi

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, asetilkolinesterazın potansiyel olarak bir apoptoz belirteci ve düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. Apoptoz, gelişimde, dejeneratif hastalıkların ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar, AChE gen ekspresyonunun tümör dokularında sürekli azaldığını ve AChE'nin, kanser teşhis potansiyel bir tanı olarak AChE'ye izin veren hücre proliferasyonunda ve hücre ölümünde yeni bir düzenleyici olduğunu ortaya koymuştur. Gelecekte bir AChE güçlendiricisinin tek başına veya geleneksel sitotoksik ilaçlar ile kombine halde

uygulanması, antikanser terapötiklerinde ümit verici bir etkinlik sağlayacaktır (Xi ve ark., 2015).

2.13.5. AChE' in Sinir Ağı ve Nörit Büyümesindeki Rolü

Hücre kültürlerindeki gözlem sonuçları, AChE'in sinir hücrelerinde akson oluşumu ve büyümesini teşvik ettiği görülmüştür. AChE'nin herhangi bir transmembran ve hücre içi etki alanı içermeksizin, enzimatik olmayan bir şekilde nörit gelişimini düzenleyebileceğini farklı çalışmalarda gözlemlenmiştir.

2.13.6. AChE Koroner Hastalığı Üzerine Etkisi

Kolinerjik belirleyici olan AChE kan damarları içinde esnekliği sağlayan asetilkolini hidroliz ettiği için koroner arter hastalığı üzerinde de bir etkiye sahiptir. AH için kullanılan bazı AChE inhibitörlerinin, kardiyovasküler hastalarda anjiyogenezin (yeni damarların oluşması) artmasında rolü olduğu bulunmuştur (Işık, 2015).

2.13.7. AChE Katalitik Olmayan Fonksiyonları

Son yirmi yıldaki araştırmalar, AChE'nin katalitik aktivitesi ve kolinerjik sinapslarda nörotransmisyonu sonlandırmadaki rolünün yanı sıra ek işlevlerini de göstermektedir. Farklı AChE izoformlarının hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve çeşitli streslere tepkileri etkilediği gösterilmiştir. AChE'nin aksonal büyümede, sinaptogenezde, hücre adezyonunda, nöronal göçte, hemopoietik stres yanıtlarında ve apoptozda önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Lionetto ve ark., 2013).

2.13.8. AChE İzoformları

AChE molekülü iki farklı protein alanından oluşur: AChE, farklı dokularda farklı ekleme formlarında eksprese edilen tek bir genin ürünüdür. AChE pre-mRNA'nın terminalinde alternatif ekleme üç varyant üretir: birincil, "sinaptik" AChE-S, stres kaynaklı, çözünür read through form (okuma) AChE-R varyantı ve eritroid dokularda ifade edilen AChE-E. Bu izoformlar aynı enzimatik aktiviteye sahip fakat C-terminal bölgelerinde farklılık gösterirler, bu da moleküler formlarını ve lokalizasyonlarını etkiler ve spesifik özellikler olur. "Sinaptik" AChE-S, beyin ve kasta temel multimerik enzimi oluşturur. Tipik olarak tetrameriktir ve sinapsta membrana bağlıdır. Çözünür,

monomerik “geçişli” AChE-R, Üçüncü tip şimdiye kadar yalnızca Torpido sp. ve fareler, diğer türlerde varsayılmıştır ve fiziksel, kimyasal stres altında indüklenir; eritrositik AChE-E, eritrosit ve lenfositlerin plazma membranını hedefleyen glikofosfatidilinositol- (GPI-) ilişkili bir dimerdir (Lionetto ve ark., 2013). AChE enzim inhibitörlerinin Alzheimer tedavisinde kullanılması, AChE-R izoformunun salınmasını sağlar. Bu durumda bilişsel fonksiyonların artmasını sağlamaktadır.

AH'da AChE moleküler formlarının kaybı ve beyin için sonuçları birçok çalışma, ölüm sonrası AH hastalarından alınan çeşitli kortikal ve subkortikal beyin bölgelerinde enzimatik olarak aktif G4 küresel formunun seçici bir şekilde kaybolduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların sonuçları, AH'li beynin seçilmiş bölgelerinde AChE'nin G4/G1 moleküler formlarının oranında bir azalma olduğunu gösterdi. G4/G1 oranındaki düşüş, AChE'nin membrana bağlı G4 formunun seçici kaybından kaynaklanmaktadır. Bu defisitlerin bölgesel dağılımı hastalığın histopatolojik özellikleriyle önemli ölçüde ilişkilidir (Fishman ve ark., 1986, Younkin ve ark., 1986, Siek ve ark., 1990).

AChE'nin membrana bağlı G4 formu tercihen kolinerjik sinapslarda eksprese edilir ve G4/G1 oranı bu bölgeler için bir işarettir (Siek ve ark., 1990). G4/G1 oranının, normal insan beynindeki presinaptik kolinerjik işaretleyici ChAT'nin aktivite düzeyi ile yüksek düzeyde ilişkili olduğu daha önce belirtilmişti (Fishman ve ark., 1986). AChE'nin G4 formu, aksonlarda taşınan toplam AChE aktivitesinin %80'ini temsil eder. Kaybı, nöron dışı olarak amiloid proteininin birikmesi ve bunun sonucunda plak oluşumu ile ve intranöronal olarak nörofibriler yumakların gelişimi ile ilişkilidir. Bu özellikler AD'nin histopatolojik belirteçleri olarak kabul edilmektedir. Yukarıdaki iki patolojik özelliğin aynı yerde lokalize olduğu öne sürülmüştür.

2.14. Bütirilkolinesteraz

Bütirilkolinesteraz (BChE) yaklaşık ağırlığı 342 000 Da olan tetramerik bir glikoproteindir (Barta ve ark., 2001). Çoğunlukla plazma, karaciğer ve kas dokularında bulunan bir enzimdir. AChE kolinerjik sinapslarda asetilkolini hidrolize ederken, BChE sinaptik aralıkta bulunmaz. Araştırmalar BChE'nin kesin bir farmkolojik rolünü tanımlayamasalar da, BChE'nin dejeneratif değişiklikler ile beyindeki Ach hidrolizi sırasında dengeleyici bir rolü olduğu bildirilmiştir (Mack ve Robitzki, 2000).

AChE'a benzer biçimde BuChE'in yapısında esteraz, aril açilamidaz ve peptidaz (proteaz) olmak üzere üç farklı enzimatik aktivite bulundurulur. Her iki enzim de farklı doku dağılımları gösteren moleküler formlara sahiptir. BuChE'nin esteraz aktivitesi, organofosfat ve karbamat inhibitörlerini AChE'ye ulaşmadan dolaşımdan uzaklaştırır, böylece AChE eksikliğinde kolinerjik nörotransmisyonun düzenlenmesine ve kokain, aspirin, amitriptilin gibi bazı ilaçların inaktivasyonuna, bambuterol ve heroin gibi bazı ilaçların aktivasyonuna katkı sağlar.

Enzimin aril açilamidaz aktivitesinin ise serotonerjik ve kolinerjik sinir iletim sistemleri arasında iletişim sağlama olduğu ileri sürülmektedir. Ek olarak, enzimin peptidaz veya proteaz aktivitesinin Alzheimer hastalığının gelişmesi ve ilerlemesinde işlevi vardır. BChE bu hastalıkta amiloid proteinin proteinin üretimine ve proteinin β -amiloid plaklara difüze olmasına neden olmaktadır. BuChE; substratın bağlanmasında ve katalizinde rol oynayan; PAS (periferik anyonik bölge), omega cep, oksainyon çukur, açıl bağlama bölgesi ve katalitik üçlü (Ser198, His438, Glu325) kısımlarını içerir.

Son araştırma bulguları, Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, hipertansiyon, insülin direnci ve hiperlipidemiden muzdarip hastaların plazmalarında (serum), kırmızı kan hücrelerinde ve lökositlerinde yüksek seviyelerde BChE ve AChE enzim aktiviteleri sergilediğini ortaya koymuştur. BChE aktivitesinin yaşla ters orantılı olduğu, serum albümin, kolesterol, trigliserit seviyeleri ve ayrıca aşırı kilo, obezite ve vücut yağ dağılımı göstergeleri ile pozitif korelasyon göstergeleri ile pozitif korelasyon göstergeleri olduğu gözlemlendi. Alzheimer hastalığı, diabetes mellitus, hipertansiyon, insülin direnci ve hiperlipidemi durumunda, butirilkolinesterazın aktivitesi hastalığın ileri evrelerinde veya bu durumlar ilerlediğinde ve tedaviye yanıt vermediğinde düşük olma eğilimindedir. Bu koşullar, bu enzimlerin hastalık süreçlerinde biyobelirteç görevi görebileceğini ima eder.

2.15. Alzheimer Hastalığı

İlk olarak 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer tarafından belgelenen nörolojik veya nörodejeneratif bir hastalıktır ve günlük yaşamda hem etkilenen bireylere hem de ailelerine önemli yükler getiren hafıza kaybı, dil bozukluğu ve ciddi bilişsel bozukluklar ile karakterize edilir. Tipik olarak, 65 yaşın üzerindeki bireyler bu durumdan

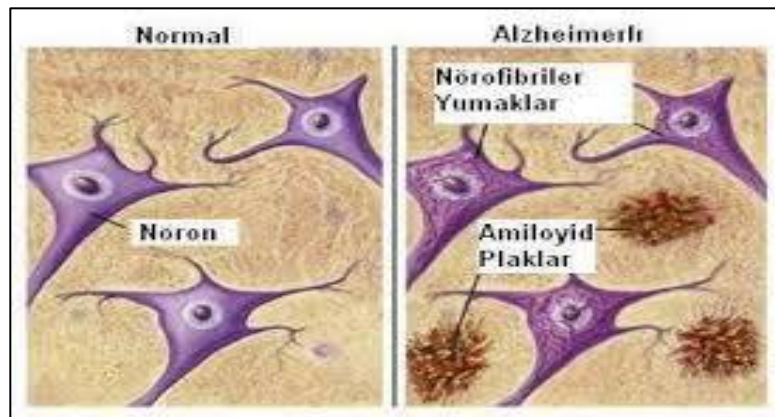
etkilenir. Bu demografide depresyon, halüsinasyonlar ve ilgisizlik gibi nöropsikiyatrik semptomları gözlemlemek oldukça yaygındır (Fakhoury, 2018). Alzheimer hastalığı (AH) demansın en yaygın nedeni olarak hizmet eder. Demans vakalarının yaklaşık yüzde 50 ila 70'i AH ile bağlantılıdır. Şu anda, dünya çapında demanstan etkilenen 36.5 milyondan fazla kişi var ve AH bu vakaların büyük çoğunluğunu oluşturuyor (Robinson ve ark., 2017).

2.15.1. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

AH'nda en büyük risk faktörü yaş faktörü olarak bilinse de ApoE4 genotipi, diyabet, obezite, kalp krizi, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, travmatik beyin hasarı ve düşük eğitim gibi diğer faktörler de AH'nın önemli risk faktörleridir. Ek olarak, ailesel AH tipik olarak 30-40 yaş arası bireylerde kendini gösterir. Erken başlangıçlı AH'nin gelişimi, amiloid plakların oluşumuna yol açan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki mutasyonlara atfedilir (Campion ve ark., 1999).

2.15.2. Alzheimer Hastalığının Patogenezi

AH'da keşfedilen ilk histopatolojik özellikler, hücrelerin dışında amiloid plakların ve hücrelerin içindeki nörofibrillerin varlığıydı (Şekil 2.10). Daha yakın zamanlarda, sinaptik dejenerasyon, hipokampal nöronların kaybı ve anöploidi gibi histopatolojik özellikler tanımlanmıştır. AH tanısı için hastanın beynini inceleyen patologlar, tanı standartlarına uyan yeterli plakları ve düğümleri gözlemler (Swerdlow, 2007).



Şekil 2.10. Beyinde Nörofibriler Yumaklar ve Amiloid Plakların Gösterimi

AH'da rol oynayan çeşitli faktörlere dayanılarak çeşitli hipotezler ortaya konulmuştur. Bunlar amiloid, tau, izoprenoid, kalsiyum ve kolinerjik hipotezlerdir.

2.16. Amiloid Kaskad Hipotezi

Yapısı 1991 yılında açıklanan amiloid beta proteini, hastaların beyinlerinin histolojik çalışmalarıyla Alzheimer hastalığının ana nedeni olarak ortaya çıktı. Bu proteinin Alzheimer hastalarının beyinlerinde biriken plakların temel bileşeni olarak hizmet ettiği öne sürülmüştür (Singh ve ark., 2013). Toksik plakların varlığı hastalığın en erken göstergesidir (Weller ve Budson, 2018).

2.17. Tau Hipotezi

Tau, hücre hücre iskeletindeki mikrotübülleri stabilize etmede rol oynayan bir proteindir. Hiperfosforilasyon, sinir hücresi gövdelerinde bu nörofibriller karışıklıkların birikmesine yol açar. Bu karışıklıklar daha sonra hücresel proteinlerle anormal şekilde etkileşime girerek normal işlevlerini bozar (Briggs ve ark., 2016).

2.18. İzoprenoid Değişim

Alzheimer hastalığında gözlenen izoprenoid değişiklikler yaşlanmanın bir sonucu olarak meydana gelenlerden farklıdır. Normal yaşlanma sürecinde, insan beyinde bir izoprenoid olan dolicol seviyesinde önemli bir artış olurken, Alzheimer hastalığında bir azalma gözlenir. Tersine, Alzheimer hastalığında önemli bir terpen olan ubikinon seviyesinde bir artış olurken, yaşlanma ubikinon seviyelerinde bir azalma ile ilişkilidir (Singh ve ark., 2013).

2.19. Kalsiyum Hipotezi

Kalsiyum düzensizliğinin AH' nın patogeneze kesin katkısı belirsizken, hastalıkta gözlenen beyin patolojisine sistemik kalsiyum değişikliklerinin eşlik ettiği bilinmektedir. Kalsiyum düzensizliği, hastalığın patogeneze katılımı nedeniyle AH' nın önlenmesi ve tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilir (Yu Jin ve ark., 2009).

2.20. Kolinerjik Hipotez

Bilinen en eski hipotez olan kolinerjik hipotez, günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların çoğunun temelini oluşturmaktadır. Bu hipoteze göre,

Alzheimer hastalığında demans semptomları ve öğrenme güçlükleri, azalmış ACh sentezine veya artan asetilkolin esterase aktivitesine atfedilebilen nörotransmitter ACh eksikliğinden kaynaklanır (Singh ve ark., 2013). Bu hipotez, AH hastalarında kolinerjik iletimi iyileştirmek amacıyla yeni terapötik yaklaşımlara ve kapsamlı araştırmalara kapı açmıştır. Bu farklı yaklaşımlar altı stratejiye yoğunlaşmıştır. Bunlar ACh öncülleri, ACh salımı, M1, M3 veya M4 reseptör agonistleri, M2 reseptör antagonistleri, nikotinik agonistleri ve AChEI'dir (Lemière ve ark., 1999).

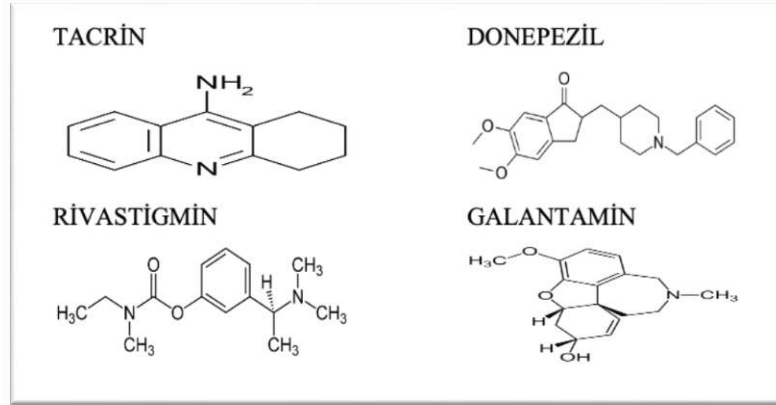
2.21. AH Tedavi

Şu anda, AH'nin ilerlemesini önlemek ve yavaşlatmak için mevcut tedaviler yetersizdir, bu nedenle etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son otuz yılda, AH mekanizması için moleküler terapiler, yaşam tarzı terapileri, klinik öncesi denemelerden klinik araştırmalara kadar çok sayıda tedavi stratejisi sunulmuştur (Hane ve ark., 2017).

Araştırmalar, AH'nin ilerlemesi ile ACh nörotransmitterinin yetersiz üretimi veya aşırı glutamat salınımından kaynaklanan sinir hasarı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir. Bu seçenekler arasında, AChEI'lerin belirti ve semptomları hafiflettiği ve hastaların genel refahını arttırdığı için AH için en etkili tedavi yaklaşımı olduğu kanıtlanmıştır.

2.22. AH Tedavisinde Kullanılan Geri Dönüşümlü AChEI' leri

AH tedavisinde kullanılan ilaçların çoğu, beynin sinapslarındaki asetilkolin seviyelerini artırma işlevi gören AChEI olarak bilinen ilaç sınıfına aittir. Bu ilaçlar, hafif ila orta derecede AH'li hastalarda semptomatik rahatlama için yaygın olarak kullanılır (Gualteri, 2000). AH tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörü ilaçlar arasında takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamin bulunur (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. AH Tedavisinde Kullanılan AChE

Tacrin: AH tedavisi için onay alan ilk kolinesteraz inhibitörü 1993'te “Tacrin”dir. Hastalarda olumlu etkiler sergilese de, birçok kişi ilacın geri çekilmesine sebep olan karaciğer anormallikleri yaşadı (Romero ve Marco-Contelles, 2017).

Donepezil: Klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, geri dönüşümlü ve spesifik bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan “Donepezil”in, amiloid plakların birikimini geciktirme ve bilişsel performansı iyileştirme ve hastalarda fonksiyonel yetenekleri stabilize etme kabiliyeti nedeniyle hafif ila orta dereceli AH için en sık reçete edilen ilaç olduğunu göstermiştir (Benjamin ve Burns, 2007).

Donepezil üzerine yapılan çalışmalar 1980'lerde başladı ve şu anda en yaygın kullanılan inhibitör olarak duruyor. İlacın dikkate değer bir avantajı, merkezi sinir sistemindeki asetilkolin esterazlara karşı yüksek özgüllüğünde yatmaktadır. Butirilkolinesteraz üzerindeki etkisi daha azdır.

Rivastigmin: AChE olarak bilinen asetilkolinin bozulmasından sorumlu enzimin etkisini inhibe ederek beyindeki kolinerjik nörotransmisyonu artırır (Birks ve Harvey, 2018). Bu güçlü ve yavaş geri dönüşümlü karbamat inhibitörü, enzimin aktif bölgesinin esteratik bölgesine bağlanarak kolinesteraz aktivitesini bloke eder. Rivastigmin hem BuChE’ı hem de AChE’ı inhibe eder. Hafif ile orta dereceli AH tedavisi için onaylanan Rivastigmine, semptomatik rahatlama için reçete edilir.

Medial septumdaki kortikal AChE'yi seçici olarak inhibe eder ve bilişsel işlevlerde olumlu sonuçlar gösterir. Bununla birlikte, yüksek dozlarda Rivastigmin alan hastalar,

plasebo alanlara kıyasla bulantı, ishal ve kusma gibi gastrointestinal yan etkilerin daha yüksek insidansı bildirmiştir.

Bunun medial septumdaki asetilkolin seviyelerindeki hızlı artışın bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Bu tür yan etkileri azaltmak için, Rivastigmin'in bir transdermal yama formülasyonu geliştirilmiştir. Bu yama, ilacın cilt yoluyla kan dolaşımına kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar, oral uygulama ile ilişkili plazma konsantrasyonundaki dalgalanmaları azaltır ve potansiyel olarak hasta toleransını iyileştirir (Szetto ve Lewis, 2016).

Galantamin: Bir alkaloid olup *Galanthus woronowii* bitkisinden izole edilmiştir. Hafif ila orta derecede Alzheimer hastalığını tedavi etmek amacıyla 2001 yılında FDA'dan onay aldı. Hızla geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörü olarak hareket eden Galantamin, hem aromatik kanal hem de anyonik alt bölge ile etkileşime girer. Galantamin, postsinaptik yarıklarda asetilkolin metabolizmasını engelleyerek, kolinerjik nörotransmisyonu etkili bir şekilde artırır. Galantaminin merkezi sinir sisteminde asetilkolinesteraz için seçicilik sergilediği ve periferik dokulardaki enzim üzerinde minimum etkiye sahiptir.

Huperzin A: Huperzia serrata bitkisinin doğal özünden türetilen bir alkaloidtir. Alzheimer hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılır. Bu bitki yaygın olarak Çin tıbbında yagin olarak kullanılır. Huperzin A, doğal kökeni ve diğer türevlere kıyasla azaltılmış toksisitesi nedeniyle tercih edilir.

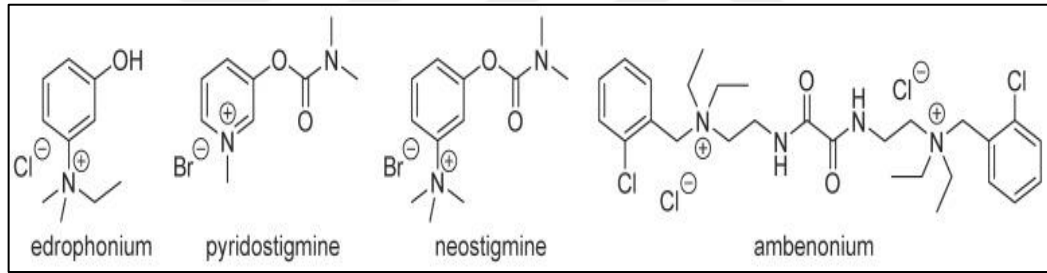
Fizostigmin: Tersiyer amin yapısında bulunan bir alkoloittir (bitkilerde bulunan azottan zengin bir bileşik). AChE'nin bir substratı olan bir karbamik asit esteridir. Oluşturduğu kararlı karbomillenmiş enzim-substrat bileşiği AChE'ı geçici olarak inhibe eder. Böylelikle tüm vücutta kolinerjik aktivitenin arttığı gözlenir.

2.23. Myastenia Graviste Kullanılan AChEI

Otoimmün bir durum olan myastenia gravis, vücudun iskelet kaslarının zayıflığı ve yorgunluğu ile karakterizedir. Vücudun antijenlere karşı üretilmesi gereken antikorların AChR 'e zarar vermesi sonucu meydana gelir. Bu hastalıktan en çok etkilenen organlar ve işlevler arasında gözler, göz kapakları, yüz ifadeleri, konuşma yutma, çiğneme,

boyun ve solunum kaslarıdır. Miyastenia gravis için tanı testleri ve semptomatik tedavi, periferik etkili AChE inhibitörlerinin kullanımı yoluyla nöromüsküler kavşakta kolinerjik iletimi düzeltmeyi amaçlamaktadır. Bu inhibitörler, sinapstaki nörotransmitter asetilkolinin hidrolizinden sorumlu enzimi hedefler.

Asetilkolinin bozulmasını engelleyerek nörotransmitter, nihayetinde nöromüsküler iletimi iyileştiren ve kas zayıflığını azaltan nikotinik AChR'yi uyarmak için daha uygun hale gelir. Miyastenia gravis tanısı için, uygulamadan hemen sonra zayıf kas gruplarının işleyişinde önemli bir iyileşmeye yol açtığı için kısa etkili AChEI edrofonyum klorür (Enlon®, Tensilon®) kullanılır. Erken ve hafif miyastenia gravisin semptomatik tedavisinde piridostigmin bromür (Mestinon), neostigmin bromür (Prostigmin®) ve ambenonyum diklorür (Mytelase®) gibi ilaçlar kullanılır. Hastalar semptomatik tedaviye yeterince yanıt vermezse, altta yatan patolojik immün yanıtı hedefleyen immünosupresif ilaçlar ile tedavi edilmelidir (Galdeano ve ark., 2018).



Şekil 2.12. MG'in Tanı ve Semptomatik Tedavisinde Kullanılan AChEI'leri

MG'in tanı ve semptomatik tedavisinde kullanılan AChEI'leri Şekil 2.12'de gösterilmiştir.

Neostigmin, AChE'yi geri dönüşümlü olarak inhibe eden sentetik bir bileşiktir ve kanın beyin bariyerini geçmesine izin vermez. Fizostigmin gibi karbamik bir esterdir, ancak kuaterner nitrojen varlığı nedeniyle daha polar bir yapıya sahiptir. Neostigmin, kas gevşeticileri içeren ameliyatlarda anti-kas gevşeticisi olarak kullanılır. Ayrıca, MG'nin semptomatik tedavisinde kullanılır ve mesane ve GIS için bir uyarıcı görevi görür. Neostigmin ayrıca tebucurarin ve diğer yetkin nöromüsküler bağlantıları bloke eden ilaçlara panzehir görevi görür.

Edrofonyum bir kuaterner amin olup myastenia gravisin tanısında kullanılmaktadır. Edrofonyumun etkileri neostigminle benzerdir. Aşırı dozu kolinerjik krize neden olabileceğinden dikkatli olunmalıdır. Antidotu atropindir. MG'in tedavisinde Pridostigmin ve ambenonyum da kullanılır.

Piridostigmin sentetik bir AChE inhibitörüdür., sinaptik yarıktaki asetilkolin nörotransmitterinin hidrolizini inhibe eder. Bu ajan, nöromusküler kavşakta asetilkolin ile asetilkolin reseptörü arasındaki etkileşimlerin sayısını artırarak etki gösterir.

Piridostigmin kan-beyin bariyerini geçemez, dolayısıyla MSS toksisitesini sınırlar ve oküler ve genelleştirilmiş MG'de hafif derecede etkili olabilir.

2.24. Geri Dönüşümsüz AChEI'leri

AChE, kovalent bağlar oluşturan sentetik organofosfat bileşiklerinin bir koleksiyonunu içerir. Bu bileşikler, ACh'nin üretildiği tüm dokularda ACh nörotransmitterinin konsantrasyonunda sürekli bir artışa neden olur. Bunların çoğu, yüksek toksik etkileri nedeniyle kimyasal silah olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin prototipi, kapsamlı bir şekilde incelenmiş olan izofluorofattır.

İzofluorofat (diizopropilfluorofosfat, DFP) bir organofosfat olup AChE'nin aktif bölgesindeki bir serin -OH'e kovalent olarak bağlanır. Bunun sonucunda enzim sentezlenmesi gerekir. Kovalent modifikasyonundan sonra fosforillenen AChE yavaş yavaş izopropil gruplarından birini bırakır. Yaşlanmak olarak adlandırılan, alkil gruplarının kaybı pralidoksim gibi ilaçların enzim ile geriye kalan ilaç arasındaki bağı koparmasını imkansız kılar. DFP 6-8 saat içinde yaşlanırken, kimyasal silahlar dakikalar hatta saniyeler içinde yaşlanır.

2.25. Schiff Bazlarının Metal Kompleksleri

Schiff bazları ilk kez 1864 yılında Alman kimyacı H. Schiff tarafından elde edilmiştir. Karbonil bileşikleri amino grupları ile kondenzasyon reaksiyonları verir ve karbon ile azot arasında bir çift bağ meydana gelir. Bu tür bileşiklere Schiff bazları (imin) adı verilir. Bu bağa da azometin bağı denir. Bu bileşikler çok zayıf bazik özellik gösterirler. Schiff bazları $R-CH=NR^1$ genel formülüyle de gösterilebilir. Bu formülde R, R^1 alkil veya

alkil süstitüentleridir. C=N grubunun en karakteristik özelliklerinden birisi metallerle kompleks teşkil etmesidir. Bu grubun bir diğér özelliğı de metal iyonlarıyla kararlı kompleks teşkil edecek kadar yeterli bazlığá sahip olmamasından dolaydır. Bu nedenle kararlı kompleksler teşkil edebilmek için molekülde kolayca hidrojen atomu verebilecek bir ilave grubun bulunmasına ihtiyaç vardır. Bu tercihen bir hidroksil grubu olmalıdır, öyle ki metal atomu ile beş veya altılı şelat halkası meydana getirsin. Metal iyonları karbonil bileşiminin primer aminlerle kondense olarak yaptığı bileşiklerle etkileşerek reaktantları bir kompleks teşkil edecek şekilde bir araya getirirler.

Koordinasyon bileşikleri sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları konusuyla birçok bilim adamı ilgilenmiş ve çeşitli kompleksler elde etmişlerdir. Schiff bazlarının yapılarında oksokrom gruplar bulunduğu takdirde, bunlardan elde edilen metal kompleksleri renkli maddeler olduklarından boya endüstrisinde özellikle tekstil boyacılığında pigment boyar maddesi olarak kullanılmaktadır ayrıca polimer teknolojisinde, ilaç sanayinde, tıpta, tarım alanında, roket yakıtı hazırlanmasında, biyolojik olayların açıklanmasında ve daha bir çok alanda bu bileşiklerden büyük ölçüde yararlanılmakta ve yeni sentezlerin yapılması yönündeki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (Değirmencioğlu, 2010).

3. MATERYAL VE METOT

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

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

EU / ml: 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri

ΔOD : Zamana göre absorbans farkı değişimi

T: Zaman (Dk)

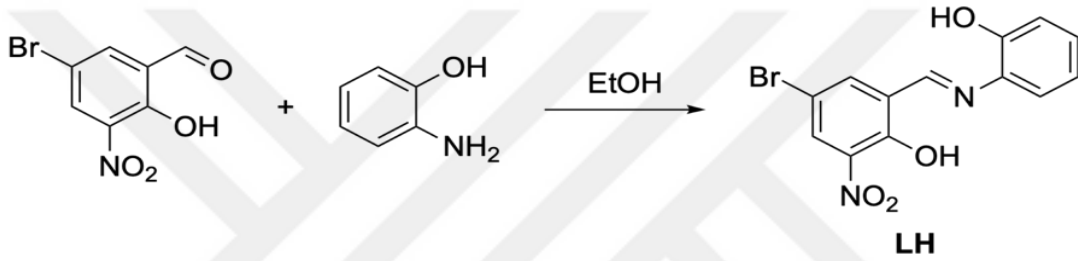
13,6: DTNB için ekstinksiyon katsayısı

VT: Toplam hacim (ml)

VE: Küvete katılan enzim miktarı (ml)

3.1. LH Ligandının Sentezi

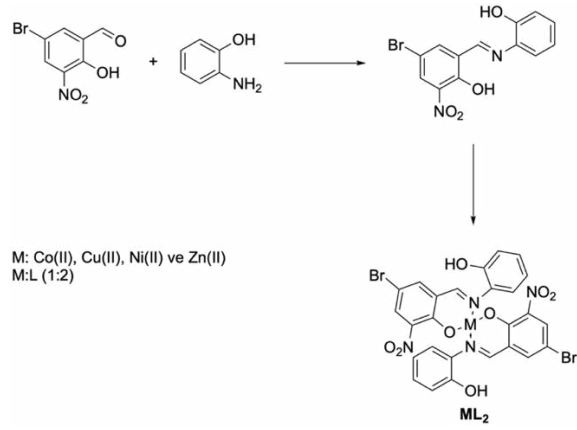
5-Brom-2-hidroksi-3-nitrobenzaldehit (2.46 g, 10 mmol), 20 mL mutlak etil alkolde çözülerek paralel sentez cihazındaki 100 mL'lik bir balona ilave edildi. Daha sonra 20 mL mutlak etil alkol içerisinde çözünmüş olan 2-aminofenol (1.09 g, 10 mmol) ve (0.01 g) *p*-toluen sülfonik asit yavaş yavaş bu çözeltiye damlatıldı. Reaksiyon 60 °C'de yaklaşık 4 saatte gerçekleştirildi. Reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı FT-IR spektrometresinde karbonil piki ile takip edildi. Sentezlenen ürün bir müddet bekletildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı. Daha sonra vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010). LH ligandının sentez mekanizması Şekil 3.1'de verilmiştir.



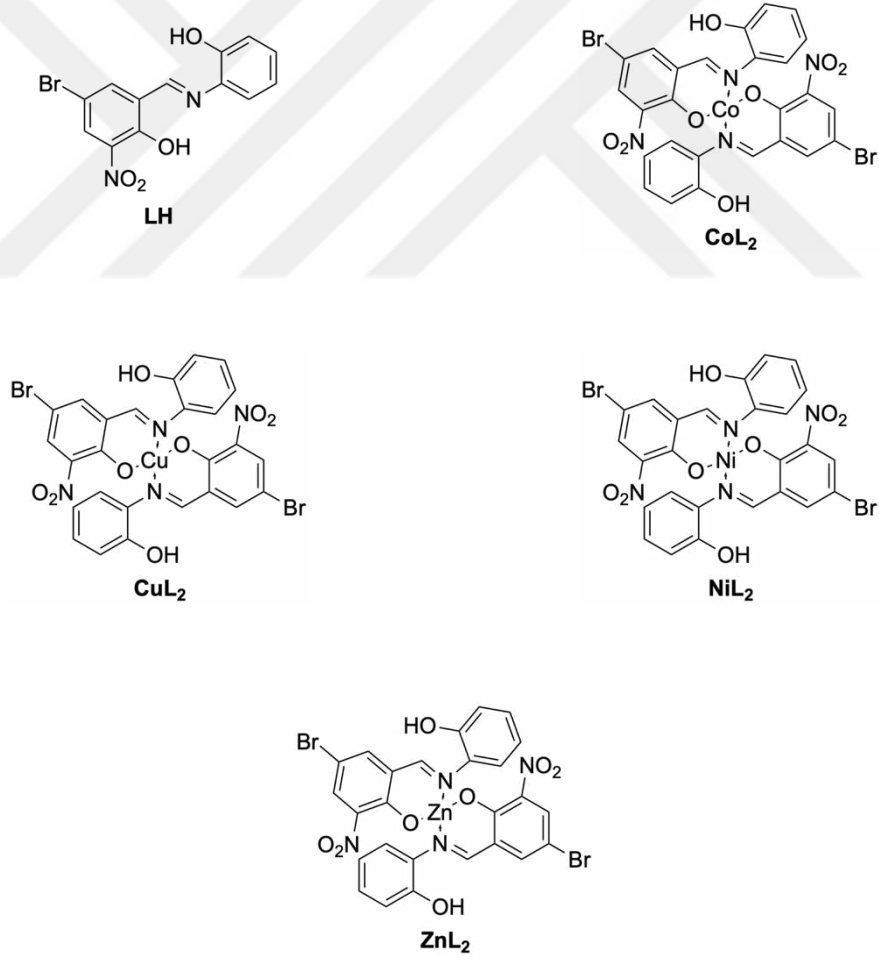
Şekil 3.1. LH ligandının Sentez Mekanizması

3.2. Metal Komplekslerinin Sentezi

Sentezlenen LH ligandı (0.594 g, 1,00 mmol), 10 mL mutlak etil alkolde çözülerek paralel sentez cihazındaki 50 mL'lik bir balona bırakıldı ve bu çözeltiye 10 mL mutlak etil alkolde çözülen metal asetatları (0.125 g, 0,50 mmol kobalt (II) asetat tetrahidrat, 0.10 g, 0,50 mmol bakır (II) asetat monohidrat, 0.124 g, 0,50 mmol nikel (II) asetat tetrahidrat ve 0.110 g, 0,50 mmol çinko (II) asetat dihidrat) damlatma hunisi vasıtasıyla damlatılarak karıştırıldı. Reaksiyon 50-60 °C'de yaklaşık 2-4 saatte gerçekleştirildi. Sentezlenen ürünler bir müddet bekletildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı. Daha sonra vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010). Metal komplekslerinin (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂) sentez mekanizması Şekil 3.2'de ve yeni sentezlenen Schiff Bazı Ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)'nin kimyasal yapıları Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.2. Metal komplekslerinin (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂) Sentez Mekanizması



Şekil 3.3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı (LH) ve Metal Kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)'nin Kimyasal Yapıları

3.3. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Moleküler yerleştirme simülasyonlarında kullanılan AChE ve BChE enzimlerinin üç boyutlu yapıları (PDB ID: 7XN1 ve 4BDS), “RCSB Protein Data Bank” web sitesinden (<https://www.rcsb.org>) elde edilerek “Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2024-2” yazılımının “Protein Preparation Wizard” modülü ile hazırlanmıştır (Dileep, 2022; Nachon, 2013). Protein hazırlama sürecinde, yalnızca enzimlerin aktif bölgelerindeki su molekülleri korunmuş ve ligandlardan 5 Å'den daha uzakta olan su molekülleri “OPLS4” kuvvet alanı kullanılarak yeniden optimize edilmiştir. Her iki proteinin yapısında kristalize olan takrin molekülü, bağlanma bölgelerinde tutulmuştur. Eksik hidrojen atomlarının tamamlanması için aynı yazılımın “Prime” modülü, amino asit kalıntılarının iyonizasyon ve tautomerik durumlarını belirlemek için ise “Epik” modülü kullanılmıştır. “LigPrep” modülü yardımıyla pH 7.0 $\pm$ 2.0'deki olası iyonizasyon durumları, tautomerler ve enantiyomerler belirlenmiştir. Ligandların minimizasyonu için “OPLS4” kuvvet alanı parametreleri uygulanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin iki boyutlu yapıları “ChemDraw 21” yazılımı kullanılarak çizilmiştir. Kenetlenme öncesinde, “Receptor Grid Generation” modülü ile bağlanma bölgelerinin haritaları çıkarılmış ve aynı yazılımın “Glide XP” algoritması kullanılarak önce takrin, ardından *in vitro* koşullarda en yüksek inhibisyon etkinliği gösteren CoL₂ ve CuL₂ bileşikleri proteinlere kenetlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları

AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler ışığında [Konsantrasyon]-Aktivite % grafikleri çizildi.

Tablo 4.1. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
44.49	71.43
62.29	56.59
80.09	49.45
97.89	39.56
115.68	30.22

Tablo 4.2. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
19.25	72.53
27.28	59.89
35.30	49.45
43.32	38.46
51.34	30.77

Tablo 4.3. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
39.82	71.43
47.78	60.44
55.74	51.10
63.71	40.11
71.67	30.22

Tablo 4.4. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
24.08	67.03
35.31	54.95
46.55	49.45
57.78	32.97
69.02	24.73

Tablo 4.5. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
31.76	63.45
39.70	57.36
47.64	49.24
55.58	32.49
63.52	26.40

Tablo 4.6. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
51.125	74.85
72.427	60.48
93.729	52.69
115.031	42.51
136.333	33.53

Tablo 4.7. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
444.93	78.43
667.40	64.71
889.86	52.94
1112.33	39.22
1334.80	31.37

Tablo 4.8. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
240.66	84.31
360.99	68.63
481.33	52.94
601.66	47.06
721.99	39.22

Tablo 4.9. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
238.90	72.55
342.42	58.82
445.94	50.98
549.46	37.25
652.98	29.41

Tablo 4.10. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

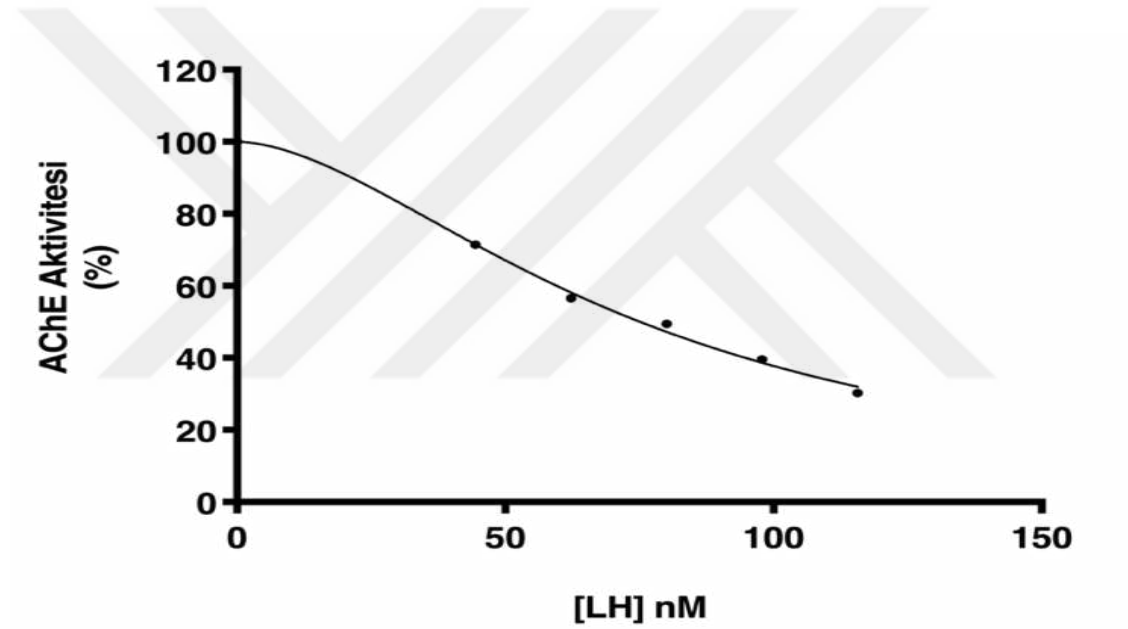
Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
288.91	76.47
417.31	62.75
545.71	52.94
674.11	45.10
802.52	33.33

Tablo 4.11. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

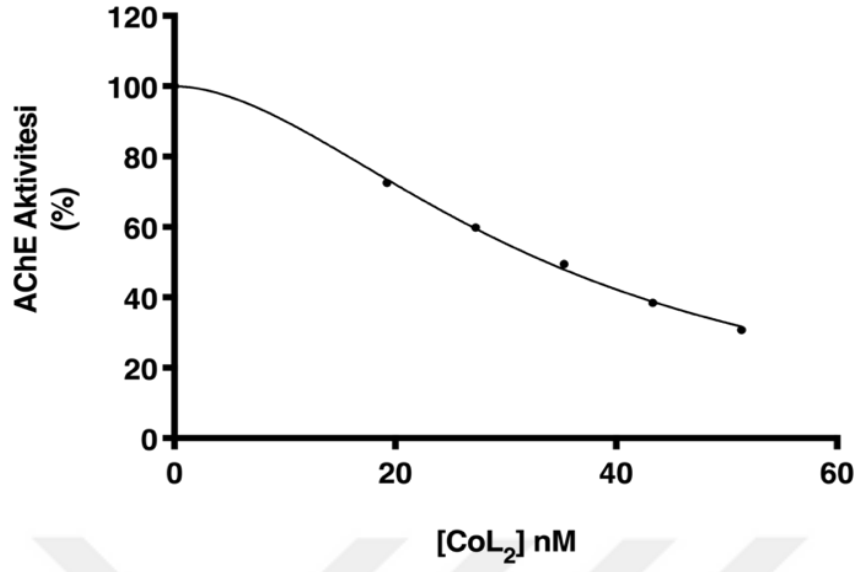
Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
285.84	77.97
412.88	61.02
539.92	50.85
666.96	37.29
794.01	27.12

Tablo 4.12. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları

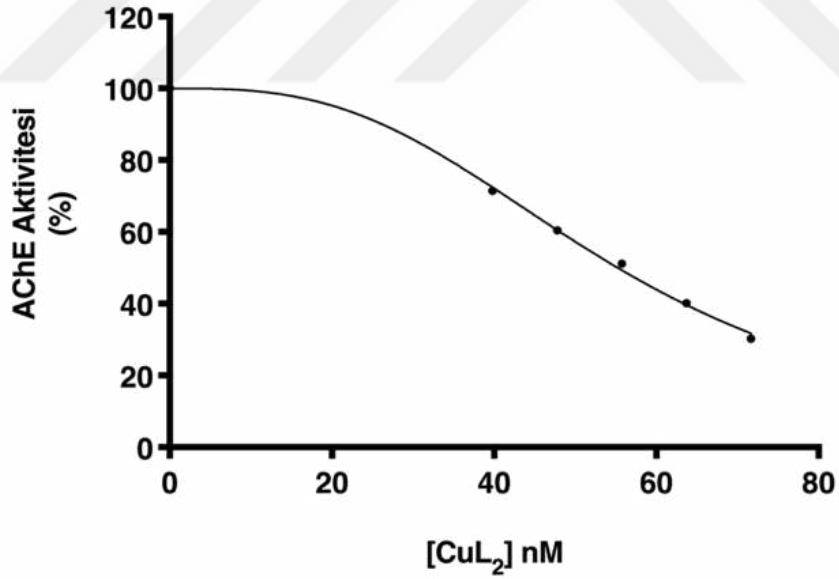
Konsantrasyon (nM)	Aktivite (%)
0	100
85.21	73.21
119.29	62.50
153.37	50.00
187.46	41.07
221.54	32.14



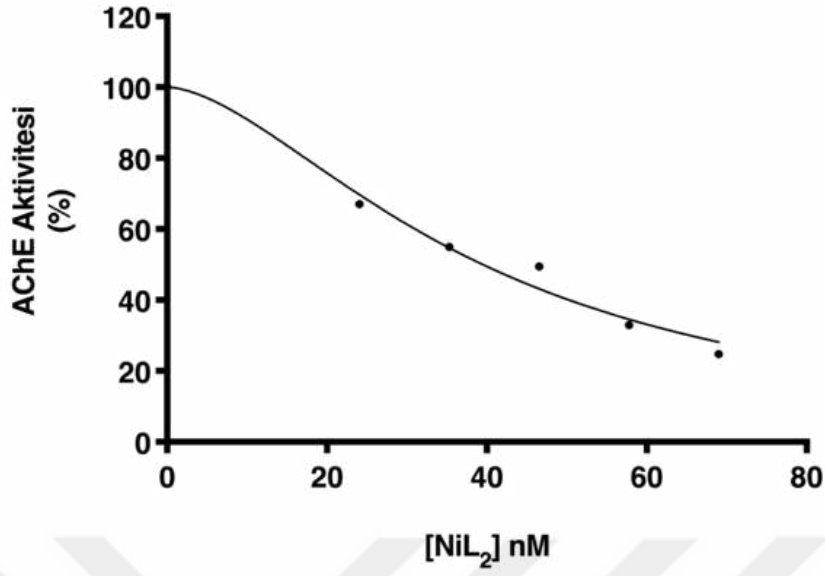
Şekil 4.3. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon]-Aktivite % Grafiği



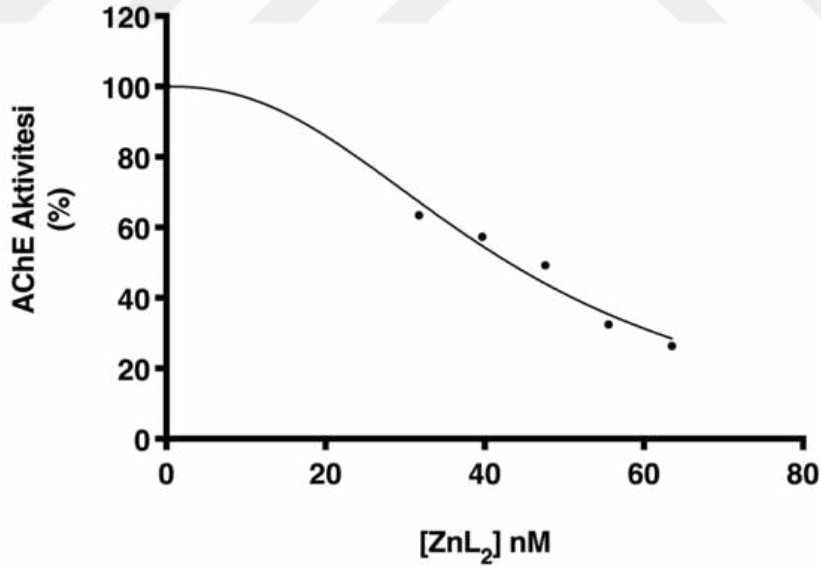
Şekil 4.4. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



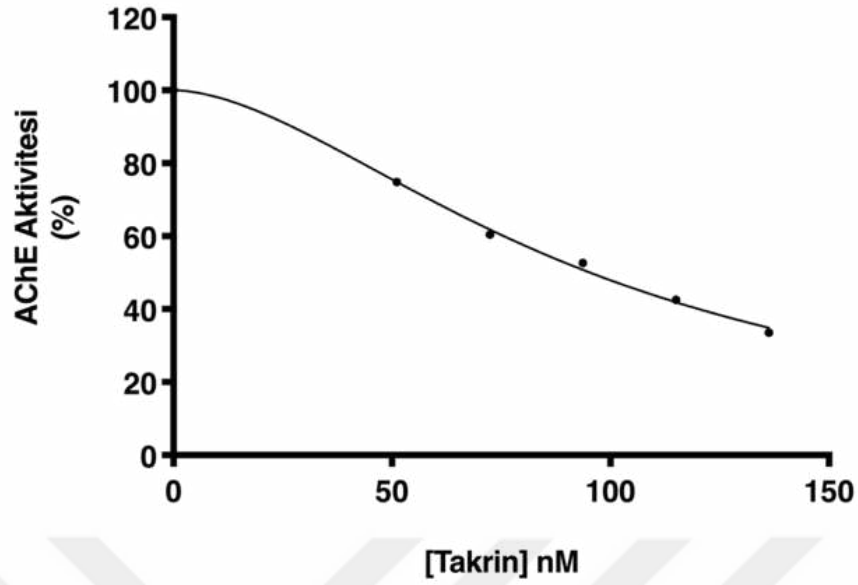
Şekil 4.5. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



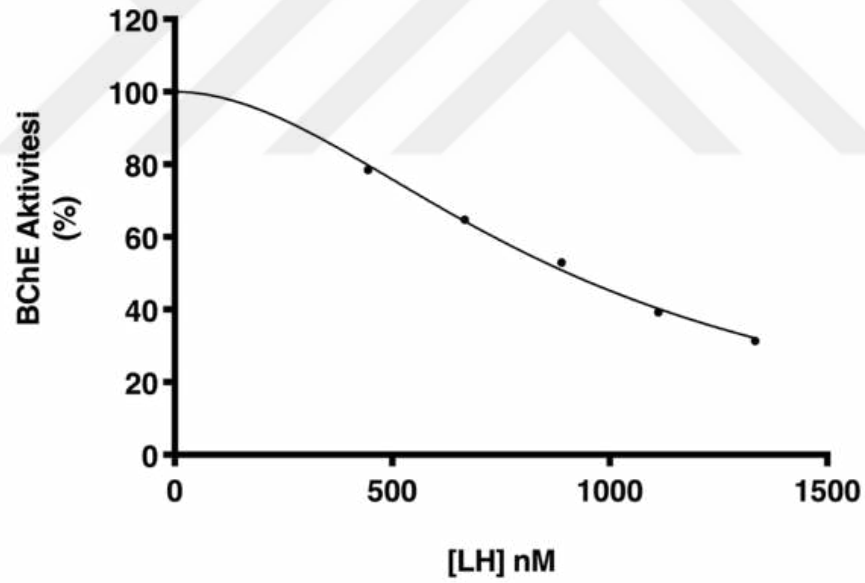
Şekil 4.6. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve *IC*₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



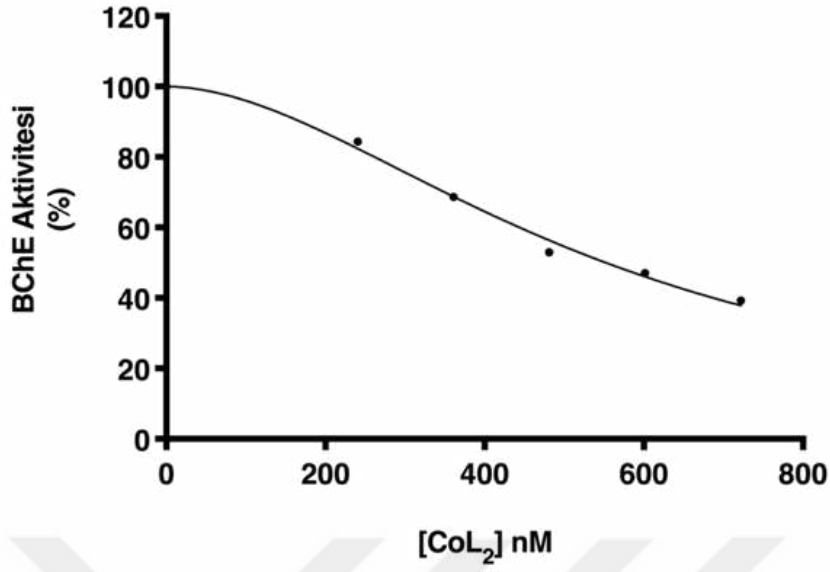
Şekil 4.7. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve *IC*₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



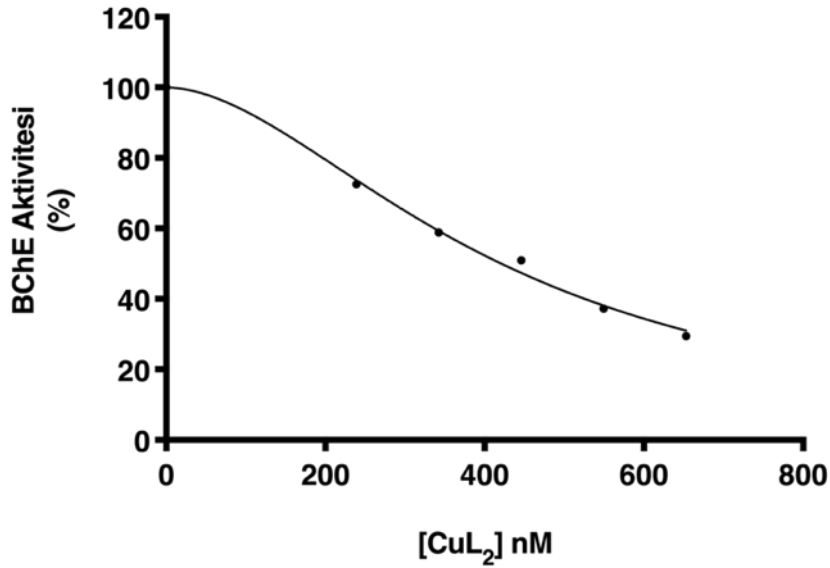
Şekil 4.8. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



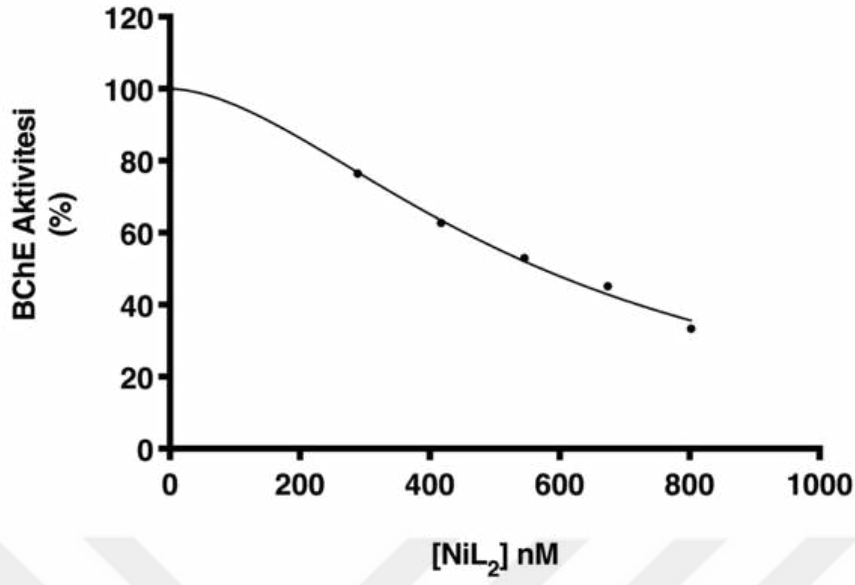
Şekil 4.9. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



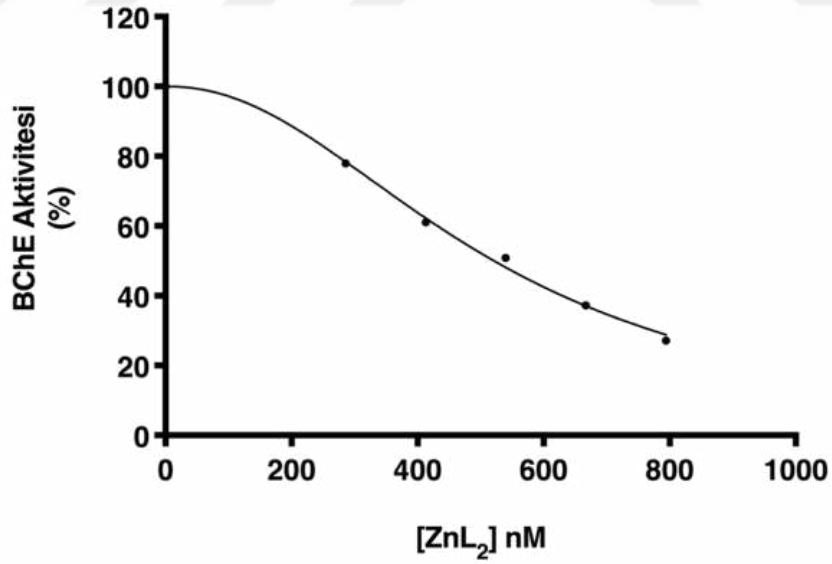
Şekil 4.10. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



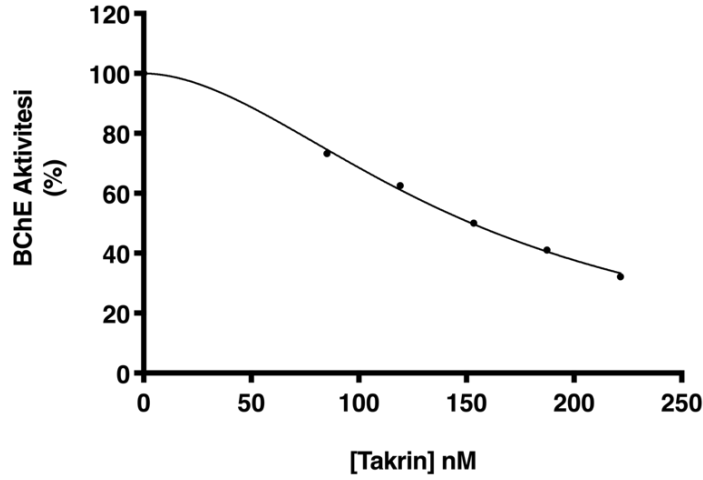
Şekil 4.11. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



Şekil 4.12. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve *IC*₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



Şekil 4.13. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve *IC*₅₀ Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği



Şekil 4.14. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi için Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği

4.2. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri için K_I Sabitlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin K_I sabitlerini tespit etmek amacıyla sabit üç uygun madde konsantrasyonu ve beş substrat konsantrasyonu belirlenerek aktiviteleri ölçüldü. Bu değerler yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_I sabitleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk 1934).

Tablo 4.13. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	47.46 nM	71.19 nM	106.78 nM
0.08	0.223	0.151	0.135	0.119
0.12	0.305	0.193	0.170	0.159
0.16	0.403	0.239	0.218	0.183
0.20	0.489	0.299	0.263	0.224
0.24	0.520	0.354	0.318	0.242

Tablo 4.14. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	22.46 nM	33.69 nM	51.34 nM
0.08	0.242	0.134	0.119	0.107
0.12	0.324	0.197	0.161	0.153
0.16	0.411	0.245	0.210	0.190
0.20	0.484	0.292	0.244	0.224
0.24	0.515	0.336	0.319	0.257

Tablo 4.15. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	20.70 nM	31.85 nM	47.78 nM
0.08	0.215	0.154	0.140	0.129
0.12	0.306	0.213	0.195	0.185
0.16	0.407	0.278	0.259	0.232
0.20	0.500	0.341	0.318	0.277
0.24	0.557	0.386	0.348	0.315

Tablo 4.16. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	24.08 nM	35.31 nM	52.97 nM
0.08	0.242	0.144	0.125	0.102
0.12	0.325	0.192	0.175	0.151
0.16	0.411	0.232	0.235	0.199
0.20	0.483	0.295	0.288	0.233
0.24	0.517	0.350	0.307	0.261

Tablo 4.17. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	25.41 nM	38.11 nM	57.17 nM
0.08	0.238	0.120	0.110	0.093
0.12	0.333	0.181	0.167	0.136
0.16	0.427	0.229	0.212	0.171
0.20	0.506	0.268	0.251	0.195
0.24	0.540	0.299	0.246	0.218

Tablo 4.18. AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	42.60 nM	63.91 nM	97.99 nM
0.08	0.223	0.123	0.116	0.102
0.12	0.289	0.206	0.179	0.161
0.16	0.365	0.268	0.240	0.212
0.20	0.443	0.318	0.284	0.239
0.24	0.458	0.363	0.316	0.260

Tablo 4.19. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	533.92 nM	800.88 nM	1201.32 nM
0.05	0.020	0.012	0.012	0.009
0.10	0.031	0.021	0.019	0.019
0.15	0.039	0.028	0.026	0.025
0.20	0.045	0.033	0.032	0.027
0.25	0.047	0.037	0.034	0.030

Tablo 4.20. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	309.65 nM	465.28 nM	697.92 nM
0.05	0.019	0.011	0.011	0.010
0.10	0.031	0.021	0.020	0.017
0.15	0.038	0.026	0.026	0.021
0.20	0.045	0.031	0.030	0.026
0.25	0.046	0.036	0.032	0.030

Tablo 4.21. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	265.97 nM	398.16 nM	597.24 nM
0.05	0.020	0.012	0.011	0.008
0.10	0.031	0.020	0.020	0.017
0.15	0.039	0.027	0.026	0.023
0.20	0.046	0.032	0.031	0.027
0.25	0.048	0.036	0.033	0.030

Tablo 4.22. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

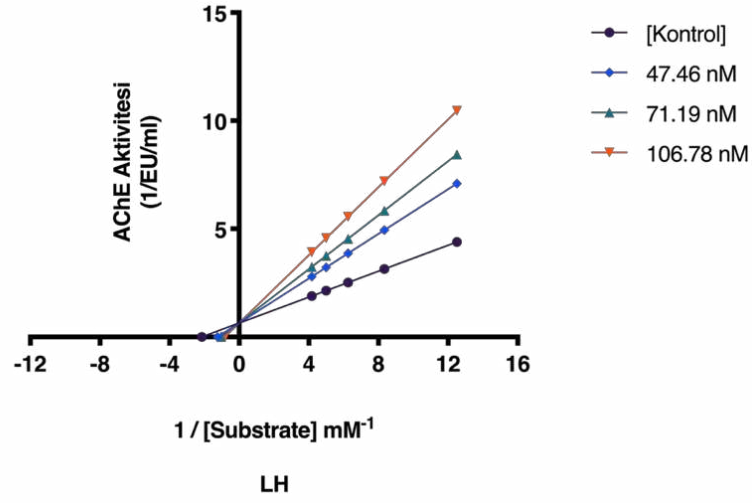
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	321.01 nM	481.51 nM	722.27 nM
0.05	0.019	0.015	0.015	0.013
0.10	0.030	0.023	0.021	0.020
0.15	0.038	0.030	0.027	0.024
0.20	0.045	0.034	0.031	0.026
0.25	0.045	0.035	0.032	0.029

Tablo 4.23. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

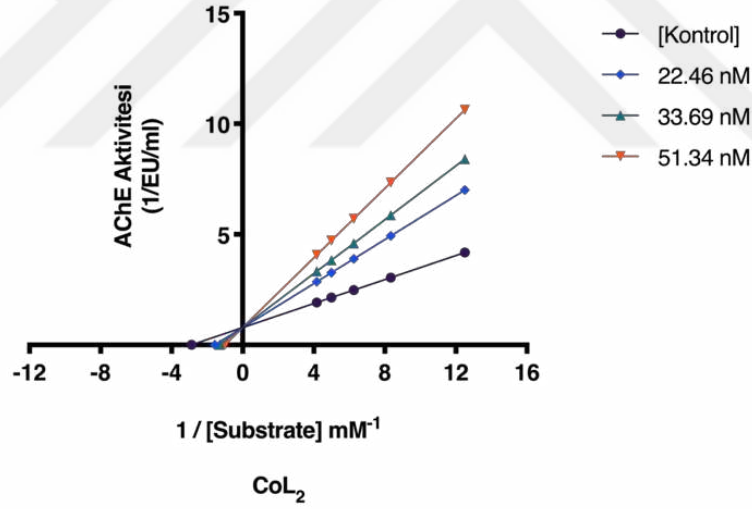
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	317.60 nM	476.40 nM	714.60 nM
0.05	0.020	0.012	0.009	0.008
0.10	0.032	0.022	0.020	0.016
0.15	0.040	0.029	0.027	0.022
0.20	0.044	0.034	0.032	0.028
0.25	0.047	0.035	0.033	0.029

Tablo 4.24. BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Referans İlaç Takrin'in K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları ile Aktivite Değerleri

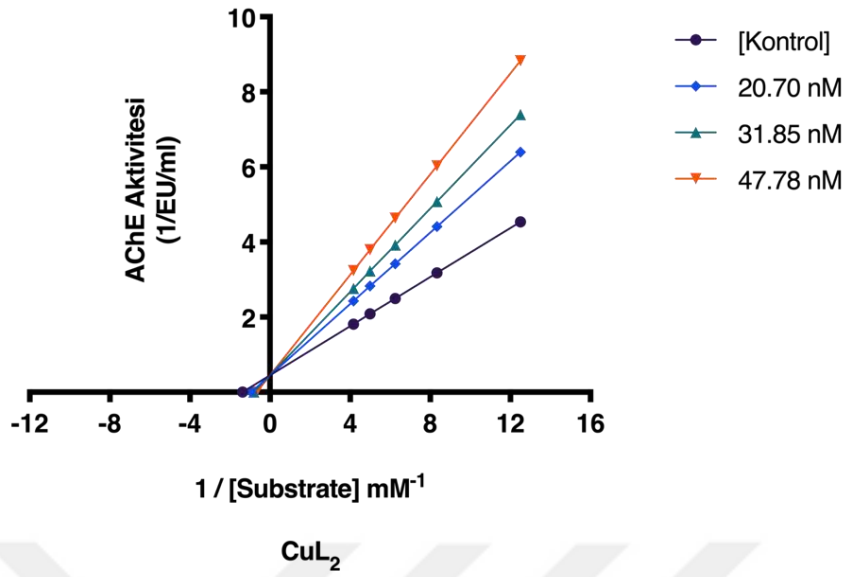
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	76.69 nM	127.81 nM	191.72 nM
0.05	0.018	0.012	0.012	0.009
0.10	0.031	0.023	0.019	0.017
0.15	0.037	0.029	0.025	0.024
0.20	0.041	0.031	0.029	0.026
0.25	0.043	0.036	0.033	0.031



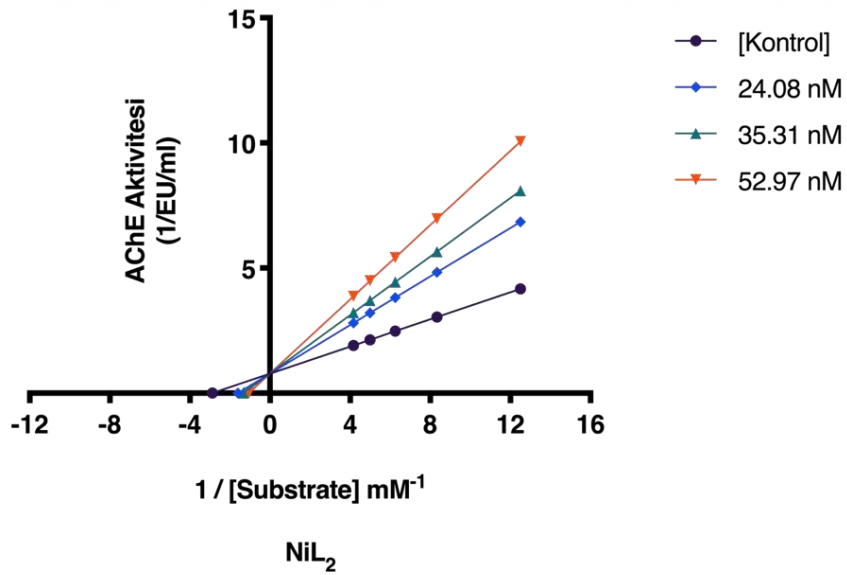
Şekil 4.15. Yeni sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



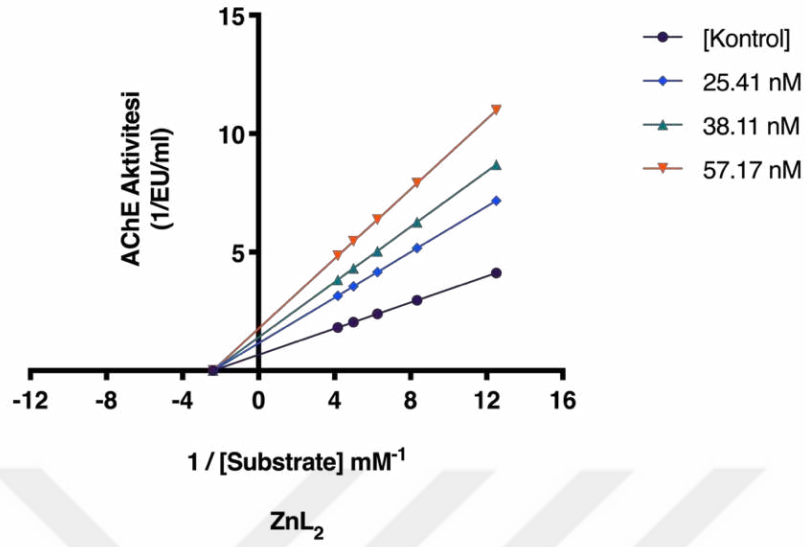
Şekil 4.16. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL₂ Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



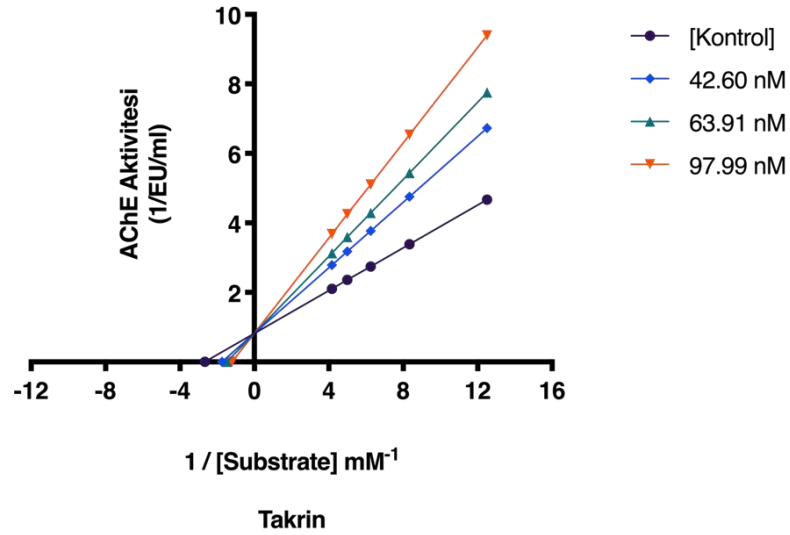
Şekil 4.17. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



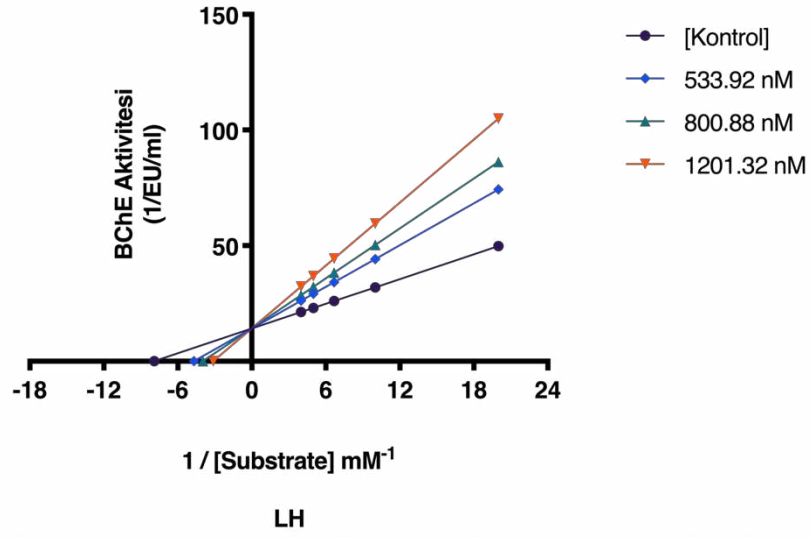
Şekil 4.18. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



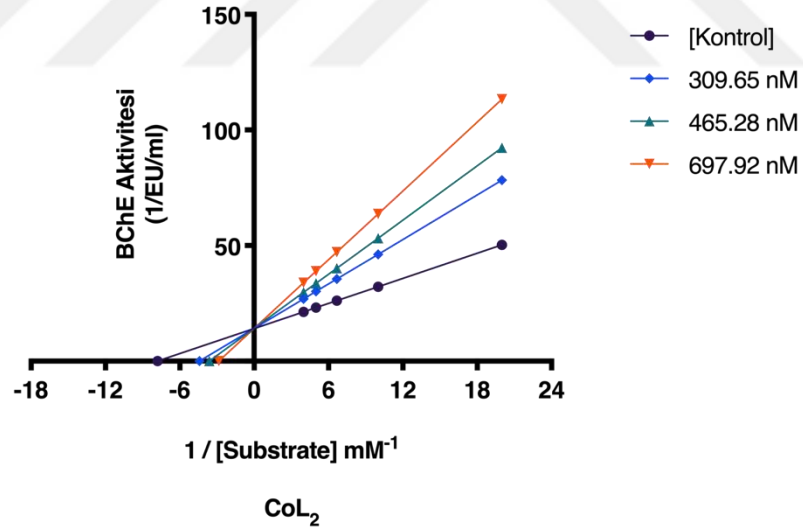
Şekil 4.19. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



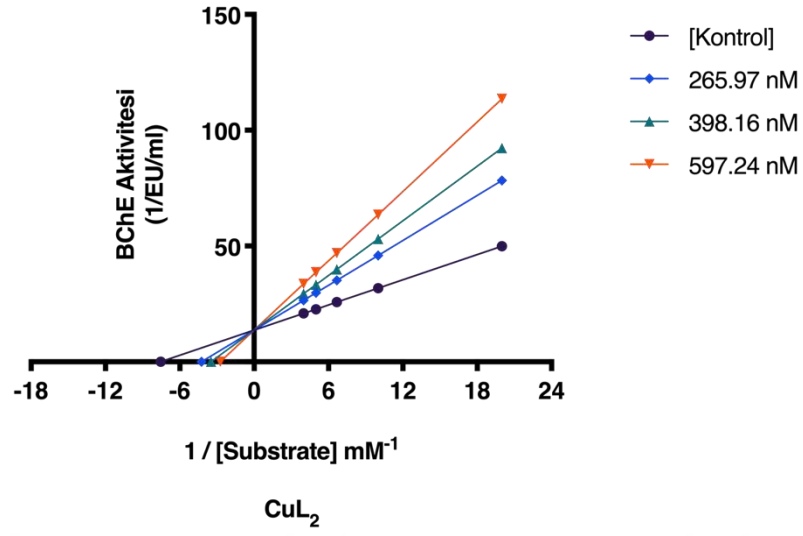
Şekil 4.20. Referans İlaç Takrin'in AChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_i Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



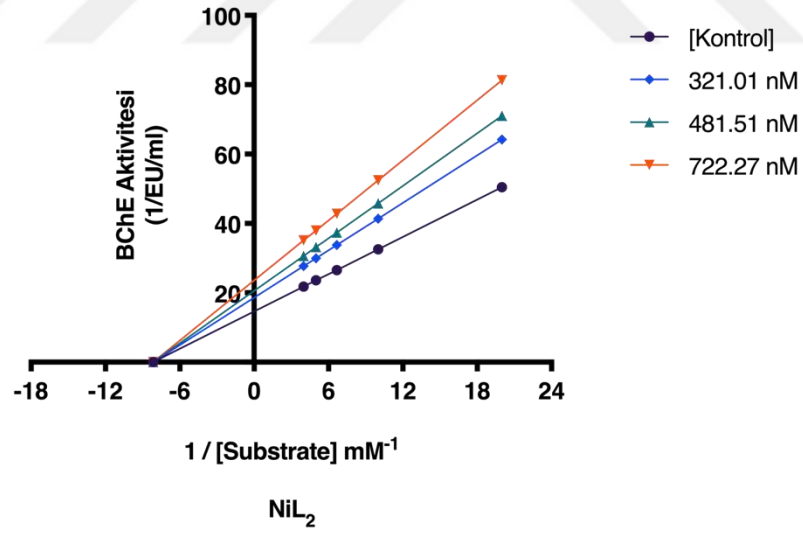
Şekil 4.21. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



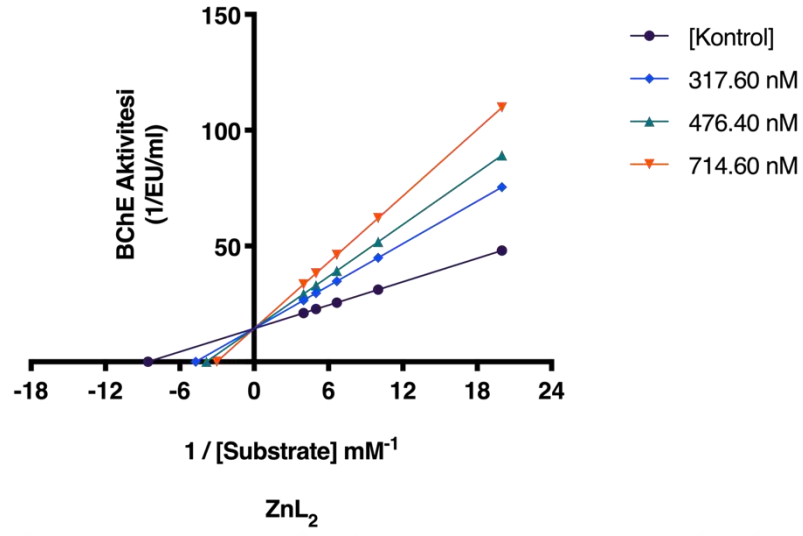
Şekil 4.22. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL₂ Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



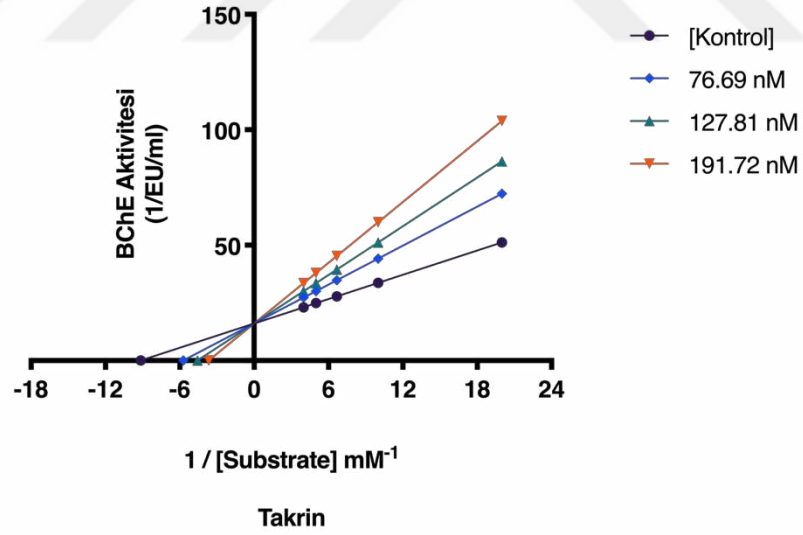
Şekil 4.23. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4.24. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



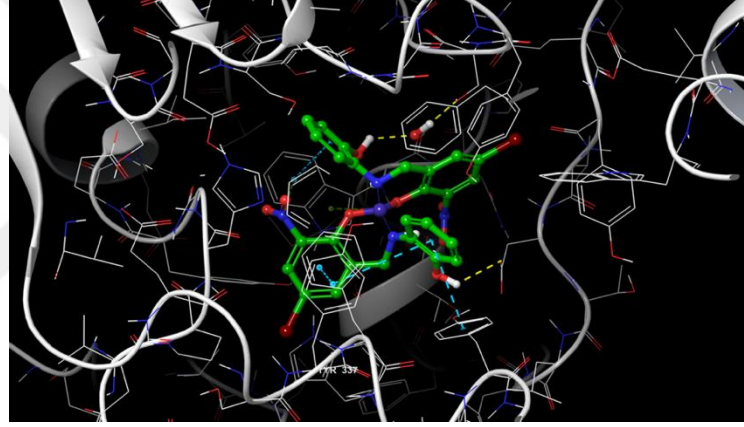
Şekil 4.25. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



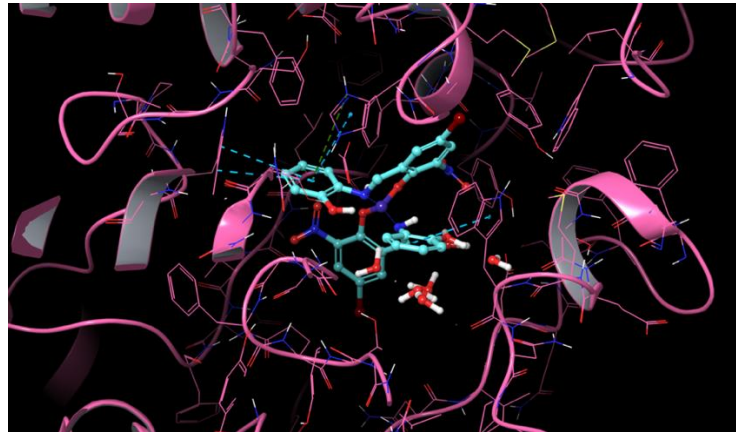
Şekil 4.26. Referans İlaç Takrin'in BChE Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi için Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği

4.3. AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri Moleküler Kenetlenme Çalışmalarının Sonuçları

Moleküler yerleştirme çalışmaları, proteinlerin ve ligandların bağlanma bölgelerini tespit ederek stabil kompleksler oluşturmayı mümkün kılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmalar, potansiyel yapı-aktivite ilişkilerinin yanı sıra ligandların proteinlere bağlanırken benimsediği konformasyon ve yönelimlerin öngörülmesine olanak tanır. Bu tezde, *in vitro* olarak inhibitör özellikleri incelenmiş olan yeni sentezlenen Schiff bazı türevlerinin AChE ve BChE enzimlerine karşı etkileşimlerini açıklığa kavuşturmak amacıyla moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.27. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CoL₂-AChE (PDB ID: 7XN1) Kompleksinin Etkileşim Diyagramı



Şekil 4.28. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CuL₂-BChE (PDB ID: 4BDS) Kompleksinin Etkileşim Diyagramı

5.TARTIŞMA

Enzimin katalitik aktivitesi, canlı organizmalar içindeki çeşitli biyokimyasal reaksiyonları yönlendirmede çok önemli bir rol oynar ve böylece biyokimyacıların dikkatini çeker. Araştırmacılar tarafından, hastalıkların etiyolojisini daha iyi anlamayı amaçlayan enzimler alanını araştırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Enzimlerin araştırılması, sağlık hizmetlerinden endüstriyel sektörlere kadar çok çeşitli pratik uygulama alanları bulmuştur.

Asetilkolinesteraz inhibitörleri, Myastenia Gravis, glokom ve Alzheimer hastalığı gibi durumların tedavisinde kullanılır. Klinik araştırmalarda, bu ilaçların bilişsel işlevler üzerinde kısmen terapötik bir etki yarattığı veya Alzheimer'ın ilk ve orta aşamalarındaki bireylerde bilişsel gerilemeyi engellediği belgelenmiş durumlar olmuştur. Bununla birlikte, bu umut verici sonuçlar tüm Alzheimer hastalarının% 30-40'ında ortaya çıksa da, diğer hastalarda etkisiz kalmıştır.

Bir demans şekli olan Alzheimer hastalığı, son zamanlarda giderek daha yaygın hale geldi ve kesin bir tedavisi yok. Bu hastalıkta rol oynayan birincil nörotransmitter, beyinde nörotransmisyonun azalmasına yol açan önemli bir azalış gösteren asetilkolindir. Bu durumu ele almak için, yalnızca asetilkolin parçalanmasından sorumlu enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu yoluyla elde edilebilecek bir başarı olan asetilkolinin bozulmasını azaltmak zorunludur. Butirilkolinesterazın (BChE) kesin farmakolojik işlevi henüz bilimsel araştırma yoluyla kesin olarak tespit edilmemiş olsa da, çalışmalar serebral dejenerasyonun ortasında asetilkolin hidrolizi sırasında bu enzimin potansiyel bir stabilize edici rolü olduğunu göstermektedir. Yaşlanan bir küresel popülasyonda kritik bir halk sağlığı sorunu olarak artan Alzheimer hastalığının yaygınlığı göz önüne alındığında, bu durumla ilgili araştırma çabaları son yirmi yılda önemli ölçüde yoğunlaşmıştır. Şu anda, kesin bir tedavi yönteminin yokluğu, mevcut ilaçların hastalığın ilerlemesini durdurma ve yalnızca semptomatik rahatlama sunma konusundaki sınırlı kapasitesi ile birleştiğinde, araştırmacıları Alzheimer hastalığına karşı potansiyel etkinliğe sahip yeni ve etkili terapötik ajanları keşfetmeye teşvik etmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tablo 5.1. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin ve Referans İlaç Takrin'in IC_{50} Değerleri ve K_i Sabitleri

İnhibitör	AChE					BChE				
	IC_{50} (nM)	R^2	K_i (nM)	R^2	İnhibisyon tipi	IC_{50} (nM)	R^2	K_i (nM)	R^2	İnhibisyon tipi
LH	75.17 ± 1.40	0.9964	65.85 ± 5.34	0.9872	Yarışmalı	905.60 ± 13.27	0.9976	762.00 ± 71.18	0.9872	Yarışmalı
CoL ₂	33.71 ± 0.38	0.9986	26.94 ± 2.14	0.9887	Yarışmalı	552.30 ± 13.55	0.9933	402.80 ± 37.62	0.9869	Yarışmalı
CuL ₂	55.25 ± 0.47	0.9979	45.55 ± 3.62	0.9872	Yarışmalı	421.10 ± 9.62	0.9945	345.10 ± 30.31	0.9885	Yarışmalı
NiL ₂	39.50 ± 1.86	0.9831	30.38 ± 2.35	0.9891	Yarışmalı	572.30 ± 11.02	0.9959	1187.00 ± 62.23	0.9894	Yarışmasız
ZnL ₂	43.06 ± 1.42	0.825	34.38 ± 1.51	0.9893	Yarışmasız	521.40 ± 8.62	0.9966	395.60 ± 37.12	0.9876	Yarışmalı
Takrin	95.41 ± 1.48	0.9973	79.99 ± 6.40	0.9880	Yarışmalı	152.40 ± 1.89	0.9982	129.00 ± 11.98	0.9879	Yarışmalı

Bu tez kapsamında kullanılan, yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)'i Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra Tuna YILDIRIM tarafından sentezlenmiştir.

Sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksleri AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri spektrofotometrik olarak Ellman yöntemi ile belirlendi. Sentezlenen tüm Schiff Bazı metal kompleksleri AChE ve BChE enzimlerini inhibe ettiği görüldü. Sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)'nin K_i sabitlerini tespit etmek amacıyla sabit üç uygun madde konsantrasyonu ve beş substrat konsantrasyonu belirlenerek aktiviteleri ölçüldü. Bu değerler yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i sabitleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934). K_i sabiti düşük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan, enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)'nin IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlendi.

Sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin ve eferans ilaç olarak kullanılan Tacrin'in AChE için IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında $\text{CoL}_2 < \text{NiL}_2 < \text{ZnL}_2 < \text{CuL}_2 < \text{LH} < \text{Tacrin}$ olduğu görüldü. İnhibisyon etkisin artış sırası $\text{CoL}_2 > \text{NiL}_2 > \text{ZnL}_2 > \text{CuL}_2 > \text{LH} > \text{Tacrin}$ olarak belirlendi.

AChE için bu sıralama göz önüne alındığında sentezlenen Schiff Bazı metal komplekslerinden en iyi inhibitörün CoL_2 olduğu belirlendi.

Sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin ve referans ilaç olarak kullanılan Tacrin'in BChE için IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında Tacrin $< \text{CuL}_2 < \text{ZnL}_2 < \text{CoL}_2 < \text{LH} < \text{NiL}_2$ olduğu görüldü. İnhibisyon etkisinin artış sırası Tacrin $> \text{CuL}_2 > \text{ZnL}_2 > \text{CoL}_2 > \text{LH} > \text{NiL}_2$ olarak belirlendi. BChE için bu sıralama göz önüne alındığında sentezlenen Schiff Bazı metal komplekslerinden en iyi inhibitörün CuL_2 olduğu sonucuna varıldı.

Schiff Bazı metal komplekslerinin kolinesteraz inhibitörü olarak geliştirilmesi, Alzheimer, Myastenia gravis gibi hastalıkların tanı ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Barta, C., Sasvari-Szekely, M., Devai, A., Kovacs, E., Staub, M., and Enyedi, P. (2001). Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Molecular Genetics And Metabolism*, 74, 484-488.
- Benjamin, B., and Burns, A. (2007). Donepezil for Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 7(10), 1243-1249.
- Birks, J. S., and Harvey, R. J. (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of systematic reviews*, 6, CD001190.
- Briggs, R., Kennelly, S. P., and O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical medicine (London, England)*, 16(3), 247-253.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., and Raux, G. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *The American Journal of Human Genetics*, 65(3), 664-670.
- Camps, P., Formoso, X., and Goldeano, C. (2008). Novel donepezil-based inhibitors of acetyl and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase induced β -amiloid aggregation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12), 3588-3598.
- Canpolat, E., 2003, İmin ve Oksim İçeren Ligandların Sentezi, Karakterizasyonu ve Bu Ligandların Bazı Metal Komplekslerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Champe, P.C., Harvey R.A., and Ferrier D.R. (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya* (Üçüncü baskıdan çeviri Çeviri Editörü: Ulukaya, E.), İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Yayıncılık, s.53-66.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K., and Doctor, B. P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2(3), 366-382.
- Çat, M. (2019)., *Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılabilecek Yeni Sentezlenmiş Bileşikler İle Asetilkolinesteraz Enziminin İnhibisyonunun İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Dale, H. H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 6(2), 147-190.
- Damodaran, S., Parkin, K.L. and Fennema, O.R. (2007). Fennema's Food Chemistry. *United States of America: CRC Press*, 333-393.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., (2004), Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer's disease the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21(7), 453-478.

- Değirmencioğlu S.M. (2010) *Bazı Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Delfino, R.T., Ribeiro, T.S. and Figueroa-Villar, J.D., (2009). Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20(3), 407-428.
- Demir, H., Turkoglu, V. (2005) Effects of neostigmine methylsulphate on enzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plazma, muscle and liver in vivo. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 32(1), 25-30.
- Dileep, K. V., Ihara, K., Mishima-Tsumagari, C., Kukimoto-Niino, M., Yonemochi, M., Hanada, K., Shirouzu, M., and Zhang, K. Y. J. (2022). Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. *International journal of biological macromolecules*, 210, 172–181.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., and Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10-22.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., JRVA., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-90.
- Fakhoury, M., (2018). Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropsychopharmacol*, 16(5), 508-518.
- Fishman, E.B., Siek, G.C., MacCallum, R.D., Bird, E.D., Volicer, L., and Marquis, J.K., 1986. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. *Annals of Neurology*, 19, 246–252.
- Galdeano, C., Coquelle, N., Cieslikiewicz-Bouet, M., Bartolini, M., Pérez, B., Clos, M. V., Silman, I., Jean, L., Colletier, J. P., Renard, P. Y., and Muñoz-Torrero, D. (2018). Increasing Polarity in Tacrine and Huprine Derivatives: Potent Anticholinesterase Agents for the Treatment of Myasthenia Gravis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 634.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K. and Lahiri, D.K., 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*, 17, 159-165.
- Gualteri, F. (2000). Cholinergic receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74, 85-89.
- Hane, F. T., Robinson, M., Lee, B. Y., Bai, O., Leonenko, Z., and Albert, M. S. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 57(3), 645–665.
- Hou. S, Ou, Z., Chen, Q., and Wu, B., (2012). Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of goldnanoparticles and acetylcholinesterase on the solgel/ multi-walled carbonnanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 33, 44-49.

- In Wecker, L., In Crespo, LM, Brody, TM, In Dunaway, G., In Faingold, C., and In Watts, S. (2010). *Brody'nin insan farmakolojisi: Molekülerden kliniğe*. Philadelphia: Mosby/Elsevier.
- Increasing Polarity in Tacrine and Huprine Derivatives: Potent Anticholinesterase Agents for the Treatment of Myasthenia Gravis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 634.
- Işık, M. (2015). *Alzheimer Tipi Demans ve Koroner Arter Hastalarında Asetilkolinesteraz Gen Ekspresyonu ve Bazı Biyomarkır Düzeylerinin Belirlenmesi ve Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesinin Belirlenerek Bazı Fenolik Bileşiklerin Bu Enzim Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Koçancı, F.G., and Aslım, B. (2016) Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plant. *Manas Journal of Agriculture and Life Science*, 6(1), 19-35.
- Lemière, J., Van Gool, D., and Dom, R. (1999). Treatment of Alzheimer's disease: an evaluation of the cholinergic approach. *Acta neurologica Belgica*, 99(2), 96–106.
- Lineweaver, H. and Burk, D., (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., and Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013, 321213.
- Mack, A. and Robitzki, A., 2000. The Key Role of Butyrylcholinesterase During Neurogenesis and Neural Disorders: An Antisense- 5 Butyrylcholinesterase-DNA Study. *Progress in Neurobiology*, 60, 607-628.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., and Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*, 41(1), 31–91.
- Michaelis, L. and Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.
- Mohan, C. Lang, K., and Mutneja, M. (2014) *An introduction to inhibitors and their biological applications (first edition)*. USA: EMD. Millipore.
- Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., and Renard, P. Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393-399.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Üçüncü Baskıdan çeviri, Çeviri Editörü: Kılıç, N.). Ankara: Palme Yayıncılık, s.444.
- Orak, N. (2011). *Asetilkolinesteraz'ın Bazı Bitkiler Tarafından İnhibisyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

- Patočka, J., Kuča, K., and Jun, D. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase—important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47(4), 215-228.
- Robinson, M., Lee, B. Y., and Hane, F. T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 57(2), 317–330.
- Romero, A., and Marco-Contelles, J. (2017). Recent Developments on Multi-Target-Directed Tacrines for Alzheimer's Disease. I. The Pyranotacrines. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(31), 3328–3335.
- Siek, G. C., Katz, L. S., Fishman, E. B., Korosi, T. S., and Marquis, J. K. (1990). Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biological psychiatry*, 27(6), 573–580.
- Singh M., Kaur M., Kukreja H., Chugh R., and Silakari, O. (2013). Acetylcolinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 165-188.
- Swerdlow, R. H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 347–359.
- Szeto, J. Y., and Lewis, S. J. (2016). Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Current neuropharmacology*, 14(4), 326–338.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 1(2), 155-170.
- Trevor, A.J., M.A., Gordon, Parker, K.K., and Chan, S.L. (1978). Acetylcholinesterases. *Life Sciences*, 23, 1209-1220.
- Tuna, S. (2010) *Aromatik Amin İçeren Schiff Bazı Ligandlarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin İncelenmesi*. (Doktora Tezi), Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Tüzün, C. (1993). *Medikal Biyokimya*. Ankara: Palme Yayınları, s.69.
- Weller, J., and Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 7.
- Xi, H. J., Wu, R. P., Liu, J. J., Zhang, L. J., and Li, Z. S. (2015). Role of acetylcholinesterase in lung cancer. *Thoracic cancer*, 6(4), 390–398.
- Younkin, S.G., Goodridge, B., Katz, J., Lockett, G., Nafziger, D., Usiak, M.F., and Younkin, L.H. (1986). Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. *Federation Proceedings*, 45, 2982–2988.
- Yu, J. T., Chang, R. C., and Tan, L. (2009). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Progress in Neurobiology*, 89(3), 240–255.

ÖZGEÇMİŞ

Esra YILDIRIM, Mardin'in Kızıltepe ilçesinde doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimini Kızıltepe'de Türkiye Yol-İş Sendikası İlköğretim okulunda tamamladı. 2012 yılında Mardin Anadolu Öğretmen Lisesine yerleşti. 2021 yılında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu. 2021-2022 yılları arasında yardımcı eczacılığını Mardin'in Kızıltepe İlçesinde bulunan Müftüoğlu eczanesinde tamamladı. Mardin Kızıltepede bulunan Ceng Eczanesinde 2 ay mesul müdürlük yaptı. 2022 yılı Kasım ayında Mardin İl Sağlık Müdürlüğüne Eczacı olarak atanmış olup görevine devam etmektedir.

