

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNDE BAZI BİTKİ YAĞLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Orhan ERBOĞA

AĞRI

Ağustos-2021

Her hakkı saklıdır

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNDE BAZI BİTKİ YAĞLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Orhan ERBOĞA

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI

Ağustos-2021

Her hakkı saklıdır

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz Enzimleri Üzerinde Bazı Bitki Yağlarının Etkilerinin İncelenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

☒ Tezimin 3 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

27.08.2021

Orhan ERBOĞA



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



TEZ ONAY FORMU

ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI BİTKİ YAĞLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Orhan ERBOĞA tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

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

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI BİTKİ YAĞLARININ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Orhan ERBOĞA

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Bitkilerden doğal olarak elde edilen yağlar yüzlerce yıldır geleneksel tedavide kullanılan en etkili araçlardan biri olmuştur. Bir çok hastalığın tedavisinde yararlanılan direkt olarak yada karışımın bir parçası olarak doğal bitki yağları önemli bir bileşen olmuştur. Çalışmamızda çörek otu yağı, nane yağı, limon yağı, hint yağı ve lavanta yağının AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddeler için IC_{50} değerleri hesaplandı.

2021, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: Çörek otu yağı, Nane yağı, Limon yağı, Asetilkolinesteraz, Butirilkolinesteraz, İnhibisyon

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PLANT OILS ON ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE ENZYMES

Orhan ERBOĞA

Ağrı İbrahim Çeçen University

Graduate Education Institute

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Naturally extracted oils from plants have been one of the most effective tools used in traditional therapy for hundreds of years. Natural plant oils, used directly or as part of the mixture, have been an important component in the treatment of many diseases. In our study, the inhibition effects of black seed oil, peppermint oil, lemon oil, castor oil and lavender oil on AChE and BChE enzymes were examined. For this purpose, IC_{50} values were calculated for these substances which show inhibition effect on enzyme activities.

2021, 43 page

Keywords: Black seed oil, Peppermint oil, Lemon oil, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Inhibition

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler	1
1.2. Asetilkolinesteraz.....	4
1.2.1.Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması.....	4
1.2.2.Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	6
1.2.3.Asetilkolinesteraz inhibitörleri.....	7
1.2.4.AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları.....	7
2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları.....	8
2.6. Çalışmada Kullanılan Pestisitler.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	17
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	17
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2. 1. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi	18
3.2.2. Denenen Bitki Yağlar için IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1. İnhibitörler İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	20
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR	37

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin temel elde ediliş şekli	2
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın katalitik bölgesi.....	5
Şekil.1.3. Asetilkolinin yapısı.....	5
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.....	6
Şekil 4.1. Çörek otu yağı ile AChE enziminin IC ₅₀ garfıği	23
Şekil 4.2. Nane yağı ile AChE enziminin IC ₅₀ garfıği	24
Şekil 4.3. Limon yağı ile AChE enziminin IC ₅₀ garfıği	24
Şekil 4.4. Hint yağı ile AChE enziminin IC ₅₀ garfıği	25
Şekil 4.5. Lavanta yağı ile AChE enziminin IC ₅₀ garfıği	25
Şekil 4.6. Çörek otu yağı ile BChE enziminin IC ₅₀ grafiği	26
Şekil 4.7. Nane yağı ile BChE enziminin IC ₅₀ garfıği	26
Şekil 4.8. Limon yağı ile BChE enziminin IC ₅₀ garfıği	27
Şekil 4.9. Hint yağı ile BChE enziminin IC ₅₀ garfıği	27
Şekil 4.10. Lavanta yağı ile BChE enziminin IC ₅₀ garfıği	28
Şekil 5.1. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme.....	30
Çizelge 4.1. Bazı bitki yağlarının AChE ve BChE enzimleri için belirlenen IC ₅₀ değerleri	28

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

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

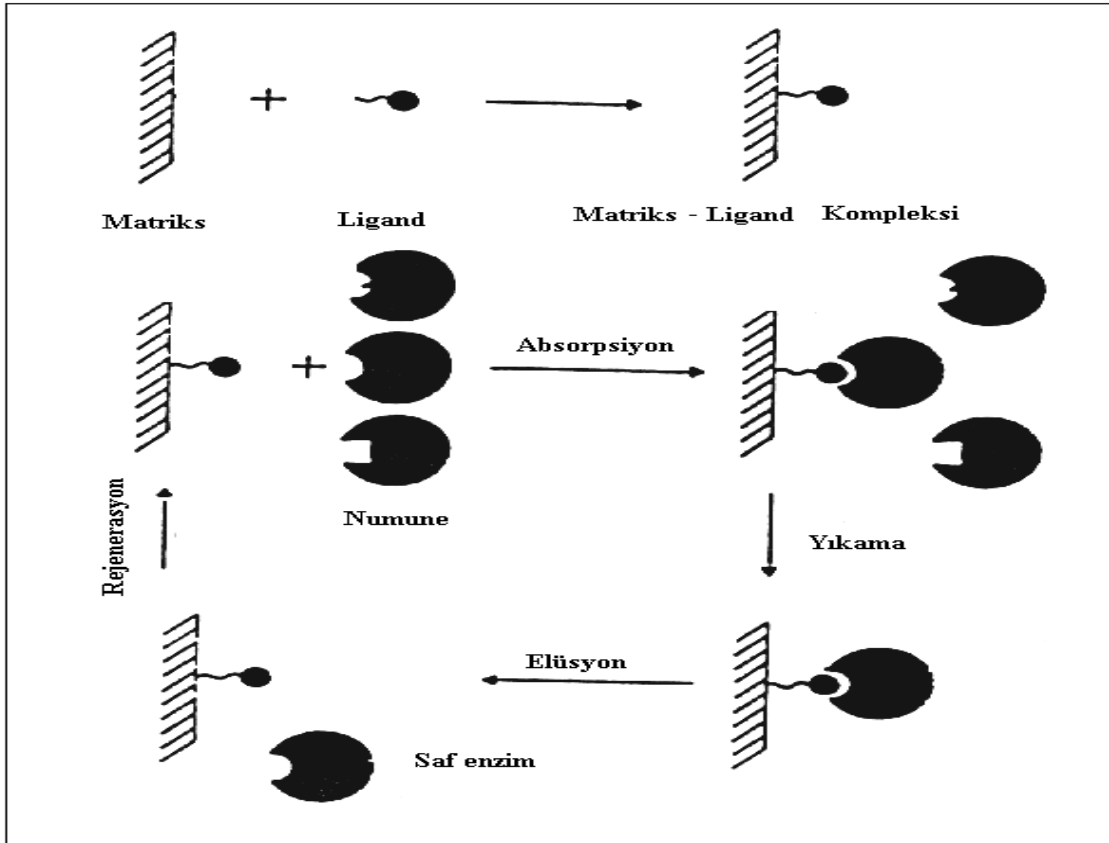
Çeşitli organizmalar kendilerine özgü olan proteinleri içerdikleri gibi, hücre türleri de yüzlerce farklı protein içermektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli sıcaklık ve pH değerlerinde gösterebilmektedirler. Bu durumdan dolayı bir proteinin tek başına saf olarak bir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

Saflaştırmak için genel olarak enzimlerin;

1. Moleküler ağırlıkları,

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

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



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin temel elde ediliş şekli.

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

Enzimlerin etkileştiği maddeye substrat adı verilir. Substratlar enzimlerle etkileştikten sonra ürüne dönüşür sonrasında ürün ve enzim birbirinden ayrılır. Reaksiyon esnasında enzimlerin üç boyutlu yapısında değişiklik olabilir fakat reaksiyon sonunda başlangıç formuna dönerler. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarına ilaveten hücrelerde metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenlerler. Bazı enzimlerin adlandırması substrat adının sonuna “-az” soneki getirilerek yapılırken, bazı enzimlerde ise ilk bulan bilim insanının koyduğu isimlerle tanınır. Örneğin; üreaz, fosfataz, pepsin, tripsin v.b. gibi. Ancak verdiğimiz bu örneklerin çoğu enzimlerin katalizledikleri fonksiyonlar hakkında sınırlı bilgi verdiğinden Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) sınıflandırmayı sistematik bir şekilde yapmaktadır. Ayriyeten her bir enzim için enzim konseyi tarafından belirlenen 4 rakamlı bir kod numarası belirlenmiştir (Lehninger 2000; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

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

Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgüllüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (sınıf 1), bir redoks sisteminden diğerine indirgeyici ekivalentleri katalizlerler. Transferazlar (sınıf 2) bir substrattan diğerine hidrojen dışındaki diğer fonksiyonel grupların transferini katalizlerler. Çoğu oksidoredüktazların ve transferazların koenzimlere gereksinimi vardır. Hidrolazlarda (sınıf 3) grup transferinde rol alırlar ancak alıcı her zaman bir su molekülüdür. Liyazlar (sınıf 4) bir çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. İzomerazlar (sınıf 5) geometrik, optik ya da yapısal izomerlerin

birbirine dönüştürülmesini kataliz eden enzimlerdir. Ligazlar (sınıf 6, sentetazlar) tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle, her zaman nükleosit trifosfatların hidrolizi ile birlikte gerçekleşir (Koolman *et al.* 2003; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

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

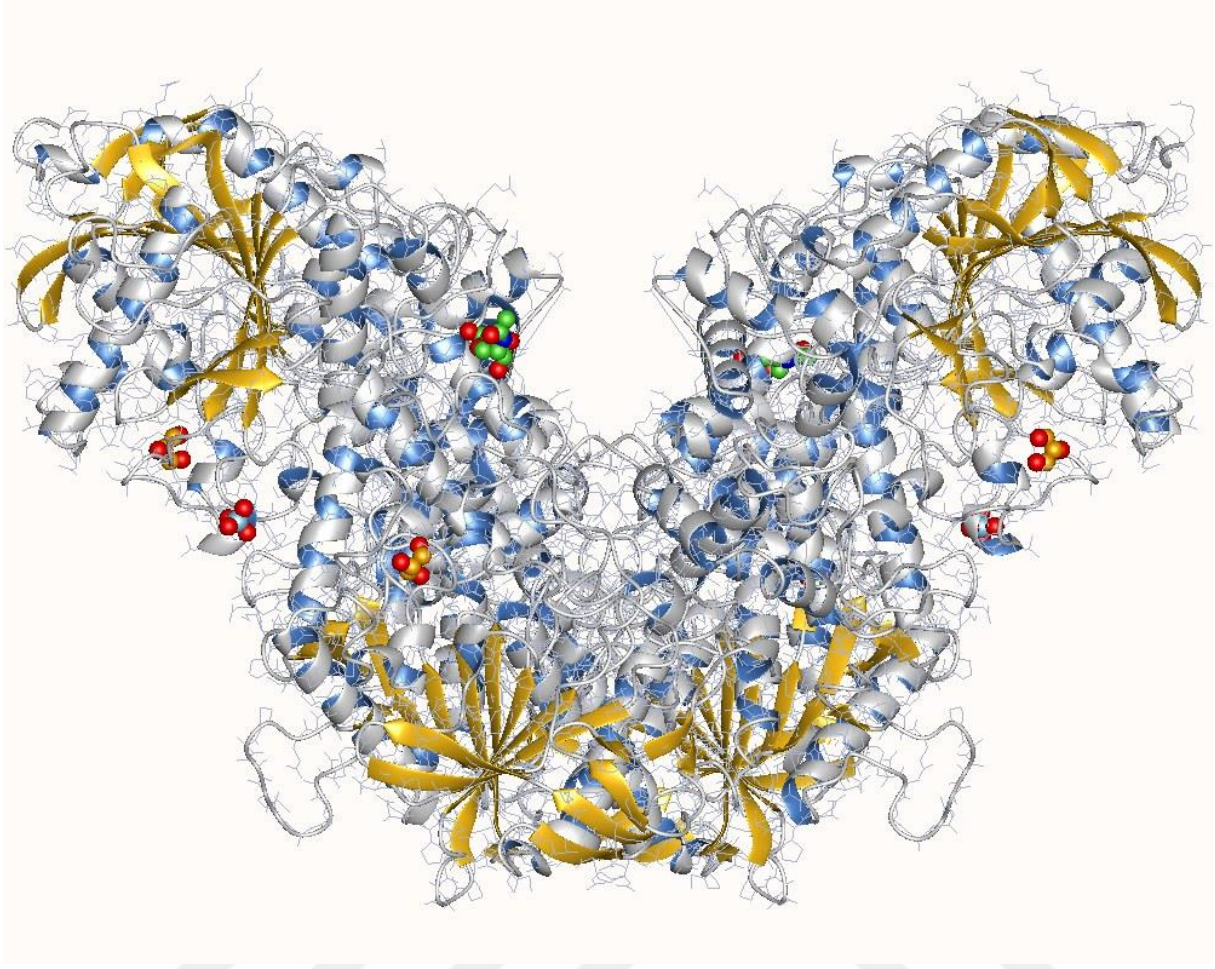
Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir. Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

Substrat konsantrasyonu

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

1.2. Asetilkolinesteraz

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

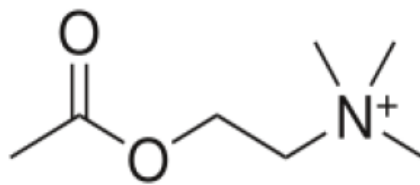


Şekil 1.2. Asetilkolin esterazın katalitik bölgesi (Bourne *et al.*, 2011)

1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

AChE enzimi çok yüksek bir aktiviteye sahiptir yaklaşık olarak saniyede 25.000 ACh'ı parçalayabilir. AChE enzimin aktif bölgesi iki alt birimden oluşmaktadır bunlar; Ayonik alt birim ve katyonik alt birim olarak adlandırılır. AChE'nin yapısı ve reaksiyon mekanizması enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (Susman *et al.* 1991).

Enzimin mekanizmasının daha iyi anlaşılması için önemli bir nörotransmitter madde ve enzimin substratı olan asetilkolinin kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 1. 3. Asetilkolinin yapısı.

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



Şekil 1. 4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

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

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

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

AChE, çeşitli formlarda bulunan bir glikoproteindir. Kimyasal yapıdaki çeşitliliğin bir sonucu olarak, bazı AChE formları hidrofobik iken diğerleri hidrofiliktir. Hidrofilik türler genellikle hücre içinde aşırı hücre içi ACh konsantrasyonlarını parçalamak için çalışır. Bununla birlikte, lipid bağlı (hidrofobik) çeşitler, ACh'yi bileşen parçalarına (asetat ve kolin) ayırmak için sinaptik yarıktaki veya nöromüsküler kavşakta çalışan ACh inaktivasyonunun birincil ajanlarıdır. Lipid bağlantılı AChE türleri, post-sinaptik membran içine gömülür ve ACh'nin hızlı

inaktivasyonunu sağlamak için post-sinaptik reseptör moleküllerine stratejik olarak yakın yerleştirilir.

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

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

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

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

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

1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları

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

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

2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları

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

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

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

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

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

Kolinesteraz inhibitörleri

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

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

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

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

2.6. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar olan uçucu sıvı aroma maddeler, doğal kaynaklardan, genellikle bitkilerden elde edilirler. Basit bir anlamda yağ değildirler, ancak genellikle yağlarla suda zayıf bir çözünürlüğü paylaşırlar. Uçucu yağların genellikle bir kokusu vardır ve bu nedenle gıda aromalarında ve parfümerde kullanılır. Genellikle koku ekstraksiyon teknikleriyle (damıtma, soğuk presleme veya Solvent ekstraksiyonu gibi) hazırlanırlar. Uçucu yağlar, aroma

yağlarından (yağlı bir çözücü içindeki uçucu yağlar ve aroma bileşikleri), infüzyonlardan ayırt edilir. Tipik olarak uçucu yağlar, genellikle yüzlerce ayrı aroma bileşiğinin oldukça karmaşık karışımlarıdır (https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_essential_oils).

2.7. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Yağlar

Çörek otu yağı

N. sativa tohumlarından elde edilir ve çok sayıda terapötik yararı nedeniyle geleneksel tıpta 2.000 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır.



Çörek otu yağının potansiyel sağlık yararları

Geleneksel tedavide, çörek otu yağı (ÇÖY)'nin farklı sağlık sorunlarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Önerilen bütün geleneksel tıptaki kullanımlarında etkinliği kanıtlanmamış olsa da, ÇÖY ve bitki bileşikleri sağlık için çeşitli faydalarla ilişkilendirilmiştir. ÇÖY antioksidanlar bakımından zengindir - hücreleri, serbest radikal adı verilen kararsız moleküllerin neden olduğu hasara karşı korumaya yardımcı olan bitki bileşikleri içerir. Araştırmalar, iltihabı azaltabileceklerini ve kalp hastalığı, AH'ı ve kanser gibi durumlara karşı koruyabileceklerini gösterdiğinden, antioksidanlar sağlık için önemlidir (Zhang *et al.*, 2015).

Özellikle ÇÖY, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip timokinon açısından zengindir. Sonuç olarak, araştırmalar bu bileşiğin beyin sağlığını koruyabileceğini ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yardımcı olabileceğini göstermektedir (Akram Khan and Afzal,

2016). Astım, solunum yollarınızın astarının şiştiği ve etrafındaki kasların büzülüp nefes almanızı zorlaştırdığı kronik bir durumdur. Araştırmalar, ÇÖY'in ve özellikle yağdaki timokinonun, hava yolundaki iltihabı azaltarak ve kasları gevşeterek astımın tedavisinde yardımcı olabileceğini göstermiştir. Astımlı 80 yetişkinde yapılan bir çalışma, 4 hafta boyunca günde iki kez 500 mg çörek otu yağı kapsülü almanın astım kontrolünü önemli ölçüde iyileştirdiğini bulmuştur (Koshak *et al.* 2017).

Diyabetli bireyler için, sürekli olarak yüksek kan şekeri seviyelerinin böbrek hastalığı, göz hastalığı ve felç dahil olmak üzere gelecekteki komplikasyon riskini artırdığı gösterilmiştir. Tip 2 diyabetli kişilerde yapılan birkaç çalışma, günde 2 gram ezilmiş tam siyah tohum dozunun, açlık kan şekeri düzeylerini ve 2-3 ay boyunca ortalama kan şekeri düzeylerinin bir ölçüsü olan hemoglobin A1c (HbA1c) düzeylerini önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir (Kaatabi *et al.* 2015).

Çoğu çalışma kapsüllerde çörek otu tozu kullanırken, ÇÖY'in kan şekeri seviyelerini düşürmeye yardımcı olduğu da gösterilmiştir. Tip 2 diyabetli 99 yetişkinde yapılan bir çalışmada, 20 gün boyunca ÇÖY'in günde hem 1/3 çay kaşığı (1.5 mL) hem de 3/5 çay kaşığı (3 mL), plaseboya kıyasla HbA1c seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü buldu (Rachman *et al.* 2017) .

Nöroinflamasyon, beyin dokusunun iltihaplanmasıdır. AH ve PH gibi hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. İlk test tüpü ve hayvan araştırmaları, çörek otu yağındaki timokinonun nöroinflamasyonu azaltabileceğini öne sürüyor. Bu nedenle, AH veya PH gibi beyin bozukluklarına karşı korunmaya yardımcı olabilir. 40 sağlıklı yaşlı yetişkinde yapılan bir çalışmada, 9 hafta boyunca günde iki kez 500 mg *N. sativa* kapsülü aldıktan sonra hafıza, dikkat ve biliş ölçülerinde önemli gelişmeler bulundu (Bin Sayeed *et al.* 2013).

Nane yağı

Nane, nane ailesindeki aromatik bir bitkidir. Bahçe nanesi, nane ve su nanesi arasında bir melezdir. Dünyanın birçok bölgesinde doğal olarak bulunabilir. Nane esansiyel yağı, nane bitkisinin yapraklarından elde edilebilir ve çeşitli farklı amaçlar için kullanılır.



Nane yağının potansiyel sağlık yararları

irritabl bağırsak sendromu (IBS) tedavisinde plaseboya kıyasla nane yağı kapsüllerinin etkinliğini inceledi. Araştırmacılar, nane yağı ile yapılan tedavinin karın ağrısını ve IBS'nin diğer semptomlarını iyileştirdiğini buldu. Nane yağının IBS ve diğer gastro intestinal (GI) koşullarının semptomlarını hafifletmeye yardımcı olduğu spesifik yollar büyük ölçüde bilinmemektedir. Çocuklarda ve ergenlerde GI durumları için bitkisel ilaçlarla ilgili çalışmaların bir başka incelemesi, nane yağının, plaseboya kıyasla karın ağrısının süresini, sıklığını ve şiddetini azaltmada etkili olduğunu buldu (<https://www.healthline.com/health/benefits-of-peppermint-oil#uses>).

Keklik üzümü yağı ve mentol, gerilim tipi baş ağrıları, migren baş ağrıları ve diğer nedenlerden kaynaklanan ağrıları tedavi etmek için kullanılmıştır. Migren tedavisi için yüzde 10 mentol solüsyonunun topikal uygulamasına baktı. Alın ve şakaklara uygulandıklarında, katılımcıların plaseboya kıyasla daha uzun süre ağrı kesici ve daha az mide bulantısı ve ışık duyarlılığına sahip olduğunu buldular. Migren için bir tedavi jeli kullanımını araştırdı. Jel, bileşenlerinden biri olarak mentol içeriyordu ve migren başladığında cilde uygulandı. Araştırmacılar, uygulamadan iki saat sonra en az bir şiddet seviyesinde önemli bir iyileşme olduğunu buldular. Nane yağı tabletlerinin yutma güçlüğü çeken ve kalp dışı göğüs ağrısı olan kişiler üzerindeki etkisini inceledi. Katılımcıların yarısından fazlası semptomlarında bir iyileşme olduğunu bildirdi (<https://www.healthline.com/health/benefits-of-peppermint-oil#uses>).

Limon yağı

Limon esansiyel yağı, aynı zamanda bir ev sağlığı ilacı olarak da hizmet veren tamamen doğal bir bileşendir. Taze limon kabuğundan, yağ salınırken kabuğunu delerek döndüren bir "soğuk presleme" işlemiyle çıkarılır. Limon esansiyel yağı seyreltilebilir ve topikal olarak cildinize uygulanabilir, ayrıca havaya yayılabilir ve solunabilir. Bazı insanlar, bitkinlikle savaşıyor, depresyona yardımcı olan, cildinizi temizleyen, zararlı virüsleri ve bakterileri öldüren ve iltihabı azaltan bir bileşen olarak limon esansiyel yağını kullanır.



Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, limon esansiyel yağının, üç stres testi deneyi sırasında güçlü bir sakinleştirici ve ruh hali iyileştirici ajan olduğunu gösterdi. Aynı çalışma, limon esansiyel yağının stresi azaltmada lavanta ve gül gibi diğer esansiyel yağlardan daha etkili olduğu sonucuna varmıştır (Komiya *et al.* 2006).

Limon yağı, cildinizde gelişebilecek zararlı bakterileri öldürebilen birkaç esansiyel yağdan biridir. Limon esansiyel yağının *Staphylococcus aureus* gibi bakteri türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Küçük yaraları bölgesel olarak temizlemek için iyi bir seçimdir (Man *et al.* 2019).

Diğer araştırmalar limon esansiyel yağının bakterilere neden olan enfeksiyona karşı etkisini doğruladı 2017'de ve 2018'de in vitro ve in vivo araştırmalar da yapılan bir laboratuvar

alışması da dahil olmak üzere cilt iltihabını önleyebildiğiğösterildi (Ogbechie et al. 2017; Kumar Maurya et al. 2018).

Limon esansiyel yağı bazen aromaterapide doğal bir analjezik olarak kullanılır. Bu yağın anti-stres ve antidepresan etkilerinin, vücudumuzun acımızı paniklemeden yorumlamasına nasıl yardımcı olduğu ile ilgili olabilir. Daha kolay nefes almanıza ve boğaz ağrısını yatıştırmanıza yardımcı olabilir (<https://www.healthline.com/health/lemon-essential-oil#feel-energized>).

Biraz dinlenirken odanızda tatlı, keskin kokusunu serbest bırakmak için limon yağı içeren bir difüzör kurmayı deneyin. Limon yağının sakinleştirici özellikleri hem zihninizi hem de boğazınızdaki kasları gevşetmeye yardımcı olabilir.

Soğuk algınlığını yatıştırıcı limon yağı aromaterapisini destekleyen çok fazla klinik veri yoktur, ancak limon suyunun C vitamini ve antioksidan özelliklerinin biraz daha kolay nefes almanız gerektiğinde faydalı olduğunu biliyoruz. Aromaterapi ile boğaz ağrısını tedavi ettiğinizde limon esansiyel yağının özelliklerinin aynı şekilde çalışması mümkündür.

Limon esansiyel yağı ruh halinizi canlandırır, ancak aynı zamanda beyin gücünüzü artırmak için de işe yarayabilir. Dördüncü sınıf öğrencileriyle yapılan küçük bir araştırmada, limon yağının yayıldığı bir sınıfta dil derslerine katılan öğrenciler sınavlarında çok daha iyi performans gösterdi. Başka bir çalışmada ise limon gibi uçucu yağlarla yapılan aromaterapinin Alzheimer hastalığı olan kişilerin bilişsel işlevlerini iyileştirebileceği sonucuna varıldı (Jimbo et al. 2009).

Lavanta yağı

Lavanta yağı, lavanta bitkisinden elde edilen uçucu bir yağdır. Ağızdan alınabilir, cilde sürülebilir ve aromaterapi ile solunabilir. Lavanta yağı cilde çeşitli şekillerde fayda sağlayabilir. Akneyi azaltma, cildi aydınlatmaya yardımcı olma ve kırısklıkları azaltma özelliğine sahiptir.



Fareler üzerinde yapılan bir hayvan çalışması, saç büyümesi için lavanta esansiyel yağı kullanma konusunda umut vaat ettiğini göstermiştir. Çalışma, lavanta esansiyel yağı uygulamasının saç büyümesini destekleyebileceğini gösterdi (Lee *et al.* 2016).

Çalışmalar, lavanta esansiyel yağının, özellikle genel anksiyete bozukluğu (GAD) ile mücadele edenlerde, stresi ve kaygıyı hafifletmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir. Lavanta, merkezi sinir sistemini sakinleştirmeye yardımcı olur ve sonuç olarak anksiyeteyi, stresi ve depresyonu hafifletmeye yardımcı olabilir. Bazı çalışmalar, lavanta yağının, benzodiazepinler ve SSRI'lar olarak bilinen antidepresanlar gibi reçeteli anksiyete ilaçları ile karşılaştırılabilir veya hatta daha etkili olduğunu göstermiştir. Bir difüzör kullanmak, lavanta yağıyla masaj yapmak ve birkaç damla lavanta yağı ile banyo yapmak, lavanta yağının rahatlatıcı faydalarını elde etmenin basit yolları olabilir (López *et al.* 2017).

Lavanta yağının uyku için kullanımı, özellikle iyi uyku hijyeni alışkanlıklarıyla birleştirildiğinde, uyku kalitesini iyileştirmeye yardımcı olmak için yapılan birkaç çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, bir çalışma, doğum sonrası dönemde anneler tarafından lavanta aromaterapisinin kullanımının bu dönemde kadınlarda uyku kalitesini artırmaya yardımcı olduğunu da göstermiştir. Bu çalışmada, kaplara konulan pamuk toplarına lavanta esansiyel yağı uygulanmıştır. Anneler lavanta yağı kokusunu 10 kez teneffüs ederek kabı sabaha kadar başucunda tuttu. Bir kontrol grubu bir plasebo kullandı. Diğer çalışmalar, lavanta esansiyel yağının, yoğun bakım ünitesinde olanlar ve demanslı yaşlı yetişkinler de dahil olmak üzere

birçok birey grubu için uykuyu iyileştirmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir (Lillehei *et al.* 2015).

Ağrı tedavisi için geleneksel yöntemlerle birlikte lavanta yağı kullanmak ağrının başarılı bir şekilde tedavi edilmesine yardımcı olabilir. Çeşitli ağrı türleri ve aromaterapinin kullanımı üzerine yapılan birkaç çalışmanın gözden geçirilmesi ve meta-analizi, aromaterapiyi bir ağrı yönetimi planının bir parçası olarak dahil etmenin ağrı yönetimi seçeneklerine güvenli ve uygun maliyetli bir katkı olabileceğini göstermiştir. Başka bir çalışma, lavanta aromaterapisinin dismenorenin (ağrılı adet kanaması) neden olduğu ağrıyı iyileştirmeye yardımcı olmanın olumlu bir yolu olabileceğini gösterdi. Yine başka bir çalışma, diz osteoartritinin neden olduğu ağrı için lavanta yağı masajının faydalarını tartıştı (Nikjou *et al.* 2016).

Fareler kullanılarak yapılan bir araştırma çalışması, lavanta esansiyel yağının insan prostat kanseri hücrelerinin büyümesini engellediğini gösterdi. Lavantanın ana bileşiklerinden biri olan Linalool'un hem tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etmede hem de apoptoza (kanseri hücresi ölümü) neden olmasında birincil ajan olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın belirttiği gibi, lavanta yağının potansiyel bir anti-tümör tedavisi olarak kullanma konusunda daha fazla araştırma potansiyeli var (Zhao *et al.* 2017).

Hint yağı

Hint yağı (HY) için belki de en iyi bilinen tıbbi kullanımlardan biri doğal bir müshildir.



HY uyarıcı bir müshil ilacı olarak sınıflandırılır, yani bağırsaklarda bulunan materyali iten kasların hareketliliğini artırarak bağırsakların temizlenmesine yardımcı olur. Ağızdan tüketildiğinde, HY ince bağırsakta parçalanır ve HY'daki ana yağ asidi olan risinoleik asidi serbest bırakır. Risinoleik asit daha sonra bağırsak tarafından emilerek güçlü bir müshil etkisi gösterir (Tunaru *et al.* 2012).

Yaralara HY sürmek, iyileşmeyi destekleyen ve yaraların kurumasını önleyen nemli bir ortam yaratır. Klinik ortamlarda yaraları tedavi etmek için kullanılan popüler bir merhem olan Venelex, HY ve Myroxylon ağacından elde edilen bir balsam olan Peru balsamı içerir (https://www.healthline.com/nutrition/castor-oil#TOC_TITLE_HDR_4).

HY, doku büyümesini uyarır, böylece yara ve çevre arasında bir bariyer oluşarak enfeksiyon riskini azaltır. Ayrıca kuruluğu ve yara iyileşmesini geciktirebilen ölü deri hücrelerinin birikmesini de azaltır (Rowe *et al.* 2009).



2. KURAMSAL TEMELLER

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

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

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

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

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

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

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Tez çalışmamızda yararlanılan alet ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

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

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

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

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

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

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

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

3.2. Yöntem

3.2.1. Ellman yöntemine göre AChE/BChE inhibitör etkisi ölçülmesi

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

AChE / BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

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

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki simgeler aşağıdaki gibidir;

EU / ml : 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri

ΔOD : Zamana göre absorbans farkı değişimi

T : Zaman (Dk)

13,6 : DTNB için ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam hacim (ml)

V_E : Küvete katılan enzim miktarı (ml)

3.2.2. Denenen Bitki Yağları için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

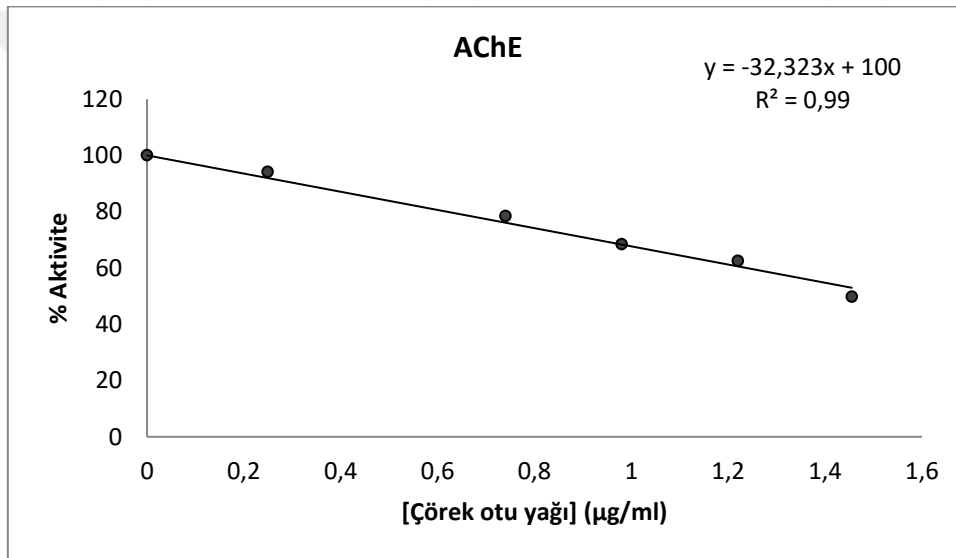
Bazı bitki yağlarının (çörek otu yağı, nane yağı, limon yağı, hint yağı ve lavanta yağının) farklı konsantrasyonlarında aktiviteleri ölçülerek % aktivite - [I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).



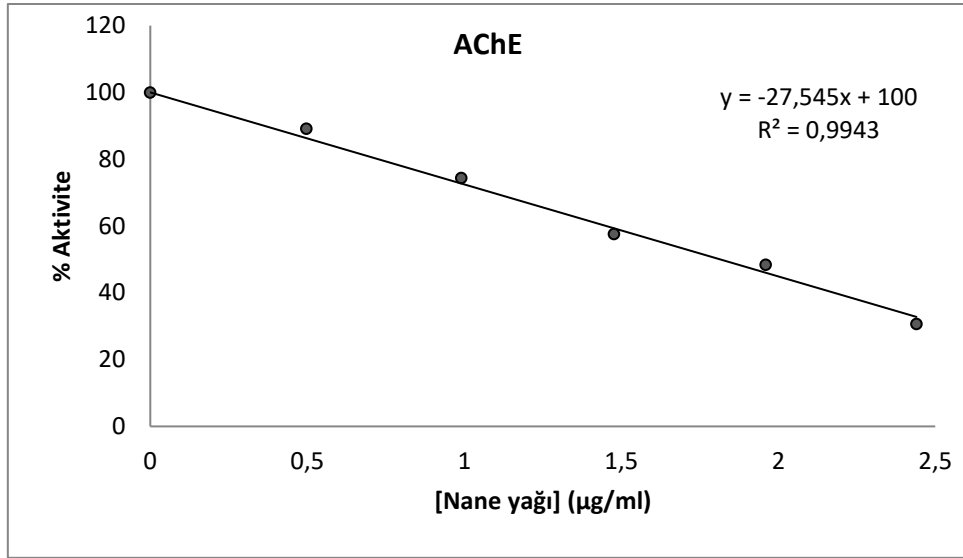
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnhibitörler İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

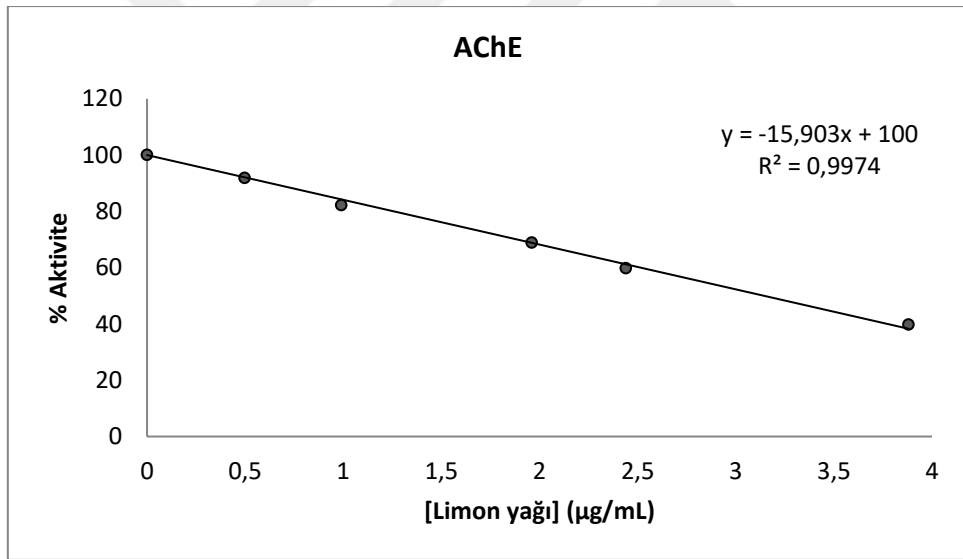
Çalışılan enzimlerin aktiviteleri üzerine çörek otu yağı, nane yağı, linon yağı, hind yağı ve lavanta yağının inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu yağların stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak AChE ve BChE enzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak elde edilen grafikler Şekil 4.1-4.10'de gösterildi. Eğrilerin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.



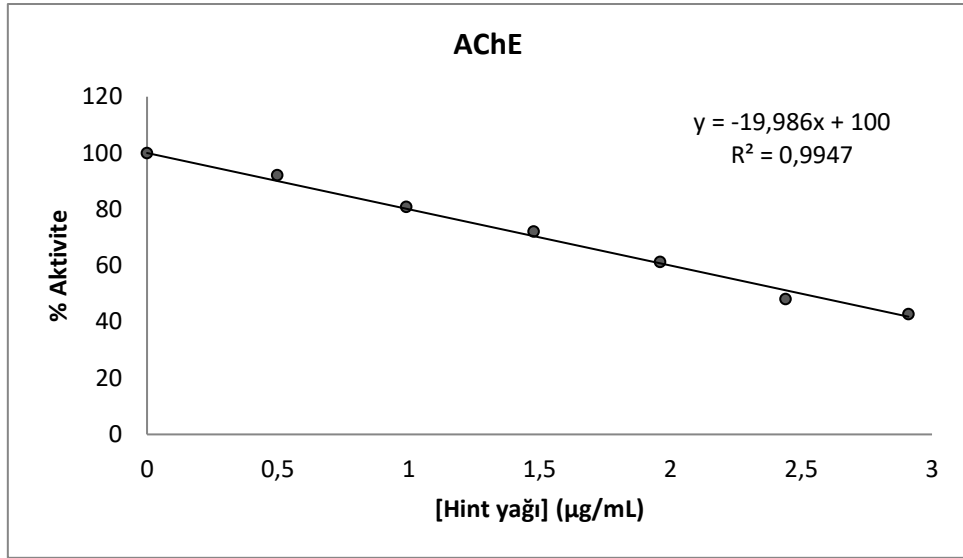
Şekil 4.1. Çörek otu yağı ile AChE enziminin IC₅₀ grafiği.



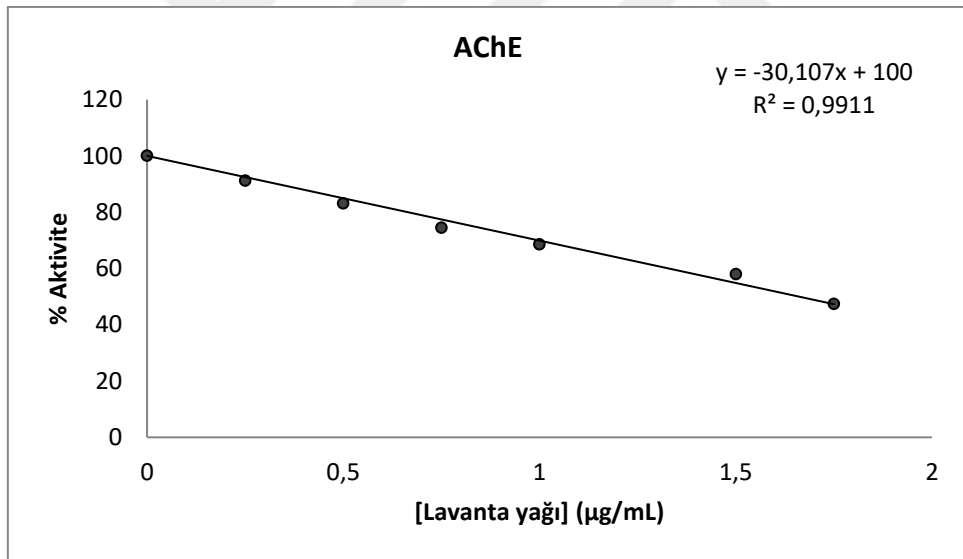
Şekil 4.2. Nane yağı ile AChE enziminin IC₅₀ garfığı.



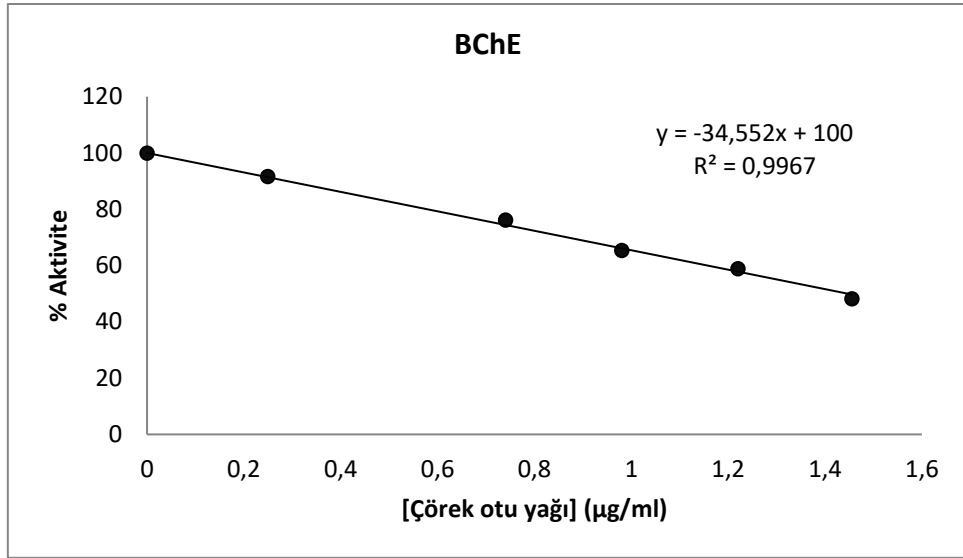
Şekil 4.3. Limon yağı ile AChE enziminin IC₅₀ garfığı.



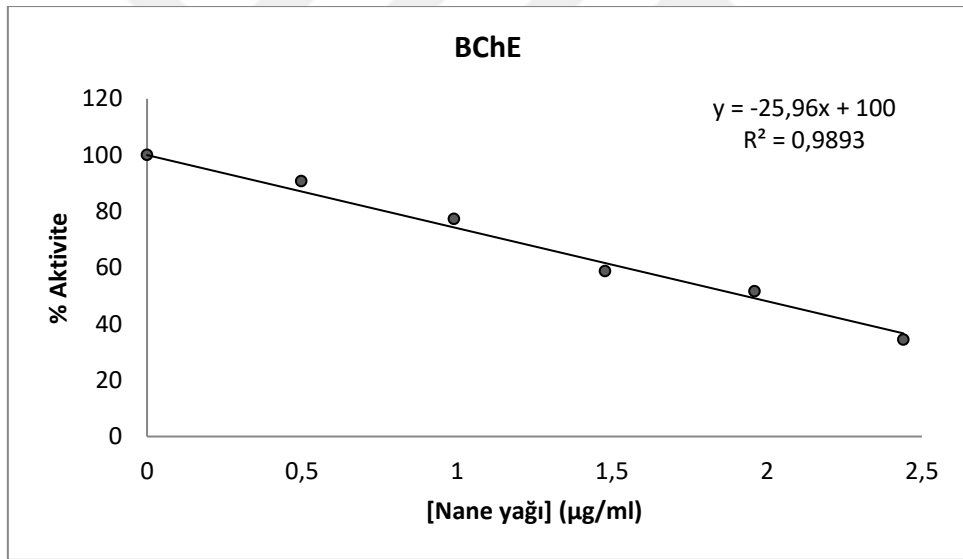
Şekil 4.4. Hint yağı ile AChE enziminin IC₅₀ garfıı.



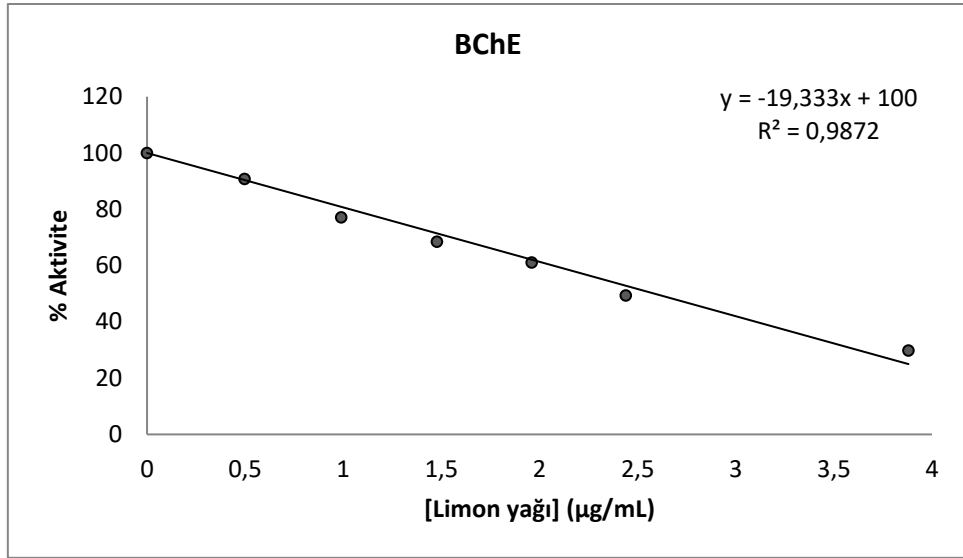
Şekil 4.5. Lavanta yağı ile AChE enziminin IC₅₀ garfıı.



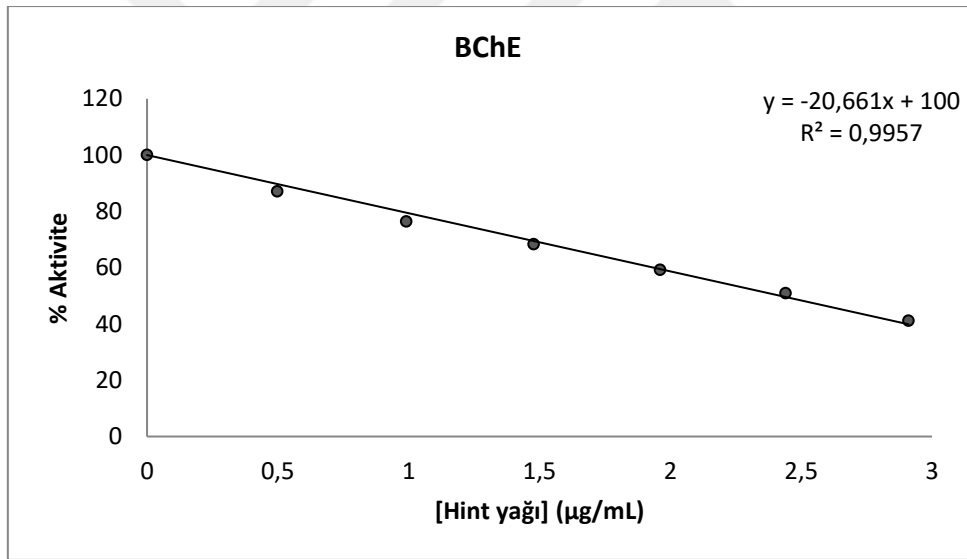
Şekil 4.6. Çörek otu yağı ile BChE enziminin IC₅₀ garfığı.



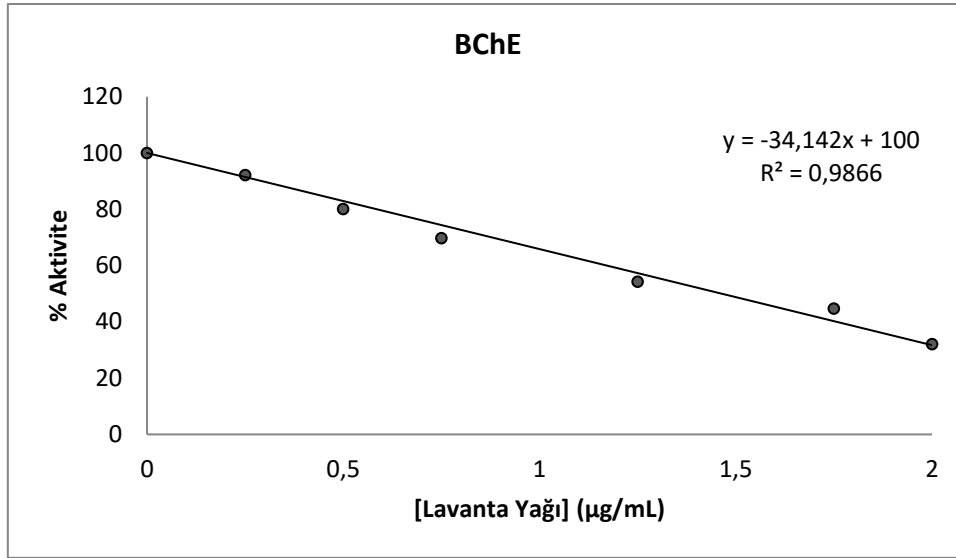
Şekil 4.7. Nane yağı ile BChE enziminin IC₅₀ garfığı.



Şekil 4.8. Limon yağı ile BChE enziminin IC₅₀ garfıı.



Şekil 4.9. Hint yağı ile BChE enziminin IC₅₀ garfıı.



Şekil 4.10. Lavanta yağı ile BChE enziminin IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.1. Bazı bitki yağlarının AChE ve BChE enzimleri için belirlenen IC₅₀ değerleri.

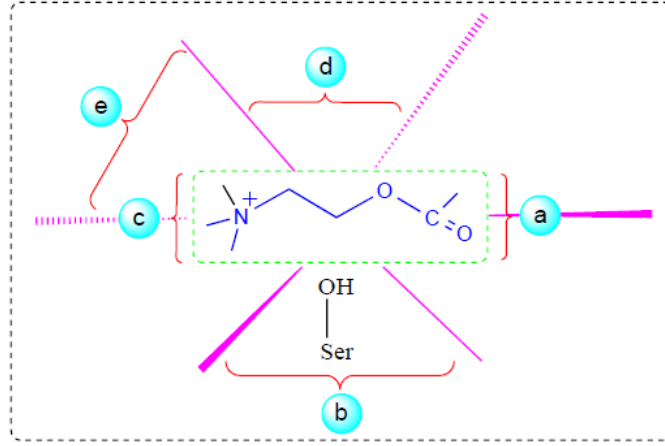
İnhibitör	IC ₅₀ (µg/mL)	
	AChE	BChE
Çörek otu yağı	1,547	1,157
Nane yağı	1,815	1,926
Limon yağı	3,144	2,586
Hint yağı	2,502	2,420
Lavanta yağı	1,660	1,464

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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

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

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



Şekil 5.1. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme.

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

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

Bütün yapılan bu çalışmalar açık bir şekilde mekanizma temelli inhibitörlerin dizayn ve araştırılmasına ve ayrıca AChE enziminin de etki mekanizmaları ile ilgili araştırmaları göstermektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için farklı yapılara sahip AChE inhibitörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks

yapmış AChE enzimi Şekil 5.2’de görülmektedir. Bu inhibitörler de metabolizmaya, etki mekanizmasına ve beyin selektivitesine göre değişmektedir.

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

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

Genellikle altmış yaşın üzerindeki hastalarda ilerleyici zihinsel işlev bozukluğunun en sık nedeni olarak görülen AH, nörodejeneratif etki gösteren bir hastalıktır (Geula and Mesulam 1999). Bu hastalığın kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte kolinerjik eksikliğin giderilmesi amacıyla ACh’nin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisi için en çok kullanılan yöntemdir. Bu amaca yönelik olarak en fazla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Geula and Mesulam 1999; Cavdar *et al.* 2019). AH’nin ileri dönemlerinde beyindeki AChE enziminin aktivitesi % 55-67 oranında azalırken, BChE enzim aktivitesi artmaktadır (Perry et al. 1978).

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

Bu çalışmamızda farklı pestisit molekülleri ile AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon etkisi değerlendirildi. Ellman metoduna göre inhibisyon türü, IC₅₀ değerleri belirlendi (Ellman 1961). Çalışmada kullanılan kimyasalların hem AChE hem de BChE enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlendi. Bu amaçla kullanılan pestisitlerin için AChE ve BChE enzimleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 8,66-13.20 µM ve 9,33-11,70 µM aralığında olduğu belirlendi. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun

ikinci basamağında ilave edilen 5,5'-ditiyo-bis(2-nitro-benzoik) asit (DTNB) ile hidrolisi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanil)benzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermektedir (Ellman *et al.* 1961).

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

- Hali hazırda geleneksel tıpta ilaç olarak kullanılan bitkilerin uçucu yağları yada esansiyel yağları son yıllarda farklı hastalıklar içinde kullanımının incelenmesinin ana nedeni üretiminin sanayi ölçeğinde yapılan bir ürünün sadece dozaj ayarlamasının yapılarak başka bir hastalık içinde kullanılabilmesinin büyük bir avantaja sağlamasıdır.
- Bu çalışmamızda geleneksel tıpta kullanılan bazı bitki esansiyel yağlarının hem AChE hem de BChE enzimleri için etkili inhibitörler olup olmadıklarını belirlemektir.
- Bu araştırma sonucunda hem AChE hem de BChE enzimleri üzerinde sırası ile en etkili esansiyel yağın en yüksekten en düşüğüne doğru Çörek otu yağı > Lavanta yağı > Nane yağı > Hint Yağı > Limon Yağı şeklinde oldukları tespit edildi.
- Elde ettiğimiz sonuçlara göre AChE enzimi için en etkili olan IC₅₀ değeri 1,547 µg/mL olan çörek otu yağı ve 1,660 µg/mL olan lavanta yağı iken, BChE enzimi için IC₅₀ değeri 1,157 µg/mL olan çörek otu yağı olduğunu belirledik.

KAYNAKLAR

- Akram Khan M, Afzal M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: Part 2 Recent advances. *Inflammopharmacology*. 2016;24(2-3):67-79.
- Anonim 1: [https://www.drugs.com/drug-class/cholinesterase-inhibitors.html#:~:text=Cholinesterase%20inhibitors%20\(also%20called%20acetylcholinesterase,and%20the%20central%20nervous%20system](https://www.drugs.com/drug-class/cholinesterase-inhibitors.html#:~:text=Cholinesterase%20inhibitors%20(also%20called%20acetylcholinesterase,and%20the%20central%20nervous%20system). (14.02.2021)
- Ariel, N., Ordentlich A., Barak D., Bino T., Velan B., Shafferman A. (1995). The Aromatic Patch of Three Proximal Residues in the Human Acetylcholinesterase Active Centre Allows for Versatile Interaction Modes with Inhibitors. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.
- Arslan, T., Ceylan, M. B., Baş, H., Biyiklioglu, Z., Senturk, M. 2020. Design, Synthesis, Characterization of Novel Peripherally Tetra 1,2,3-Triazole Substituted Phthalocyanines and Inhibitor Effect on Cholinesterases (AChE/BChE) and Carbonic Anhydrases (hCA I, II and IX). *Dalton Transactions*. 2020, 49, 203-209.
- Arslan GG, Eşer I. An examination of the effect of castor oil packs on constipation in the elderly. *Complement Ther Clin Pract*. 2011 Feb;17(1):58-62.
- Augustinsson, K.B. (1971) Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bull World Health Organ*, 44 (1-3), 81-89.
- Bin Sayeed MS, Asaduzzaman M, Morshed H, Hossain MM, Kadir MF, Rahman MR. The effect of *Nigella sativa* Linn. seed on memory, attention and cognition in healthy human volunteers. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jul 30;148(3):780-6.
- Blong, R., Bedows, E., Lockridge, O. (1997) Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J*, 327, 747-757.
- Bocquene G., Bellanger C., Cadiou Y., Galgani F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- Bourne, Y., Radic, Z., Taylor, P., Marchot, P. (2010) Conformational remodeling of femtomolar inhibitor-acetylcholinesterase complexes in the crystalline state. *J Am Chem Soc*, 132 (51), 18292-18300.
- Bourne, Y., Taylor, P., Bougis, P.E., Marchot, P. (2011) Mouse Acetylcholinesterase Catalytic Domain, Glycosylated Protein. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001maa.
- Buckley, A.W., Sassower, K., Rodriguez, A.J., Jennison, K., Wingert, K., Buckley, J., Thurm, A., Sato, S., Swedo, S. (2011). An open label trial of Donepezil for enhancement of

- rapid eye movement sleep in young children with Autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21, 353-357.
- Cavdar, H., Senturk, M., Guney, M., Durdagi, S., Kayik, G., Supuran, C.T., Ekinici, D. 2019. Kinetic and In Silico Studies of Some Uracil Derivatives on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34 (1) 429-437.
- Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (3), 625-634.
- Chang, M.S., Strichartz, G.R., 2005. Cholinergic pharmacology (Golan, D.E and Tashjian, A.H. editörler). *Principles of Pharmacology*, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.
- Choi, KH; Wykes, T; Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. *The British Journal of Psychiatry* 203,172-178.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 233-242.
- Colovic, MB., Krstic D.Z., Lazarevic P., Tamara D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3), 315–335.
- Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49-54.
- Durmaz, L. 2015. Bazı Kumarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duysen, E.G., Cashman, J.R., Schopfer, L.M., Nachon, F., Masson, P., Lockridge, O. (2012) Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chem Biol Interact*, 195 (3), 189-198.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., et al. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7,88-95.

- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.
- Ghazikhanlou Sani, K., Jafari, M. R., & Shams, S. (2010). A comparison of the efficacy, adverse effects, and patient compliance of the sena-graph®syrup and castor oil regimens for bowel preparation. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 9(2), 193–198.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264 (3), 672-686.
- Harel, M., Schalk I., Ehret, L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen PH., Silman I.(1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (19), 9031-5.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J.; Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism: neuropsychological measures. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 21, 43-50.
- Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, Inoue M, Urakami K. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*. 2009 Dec;9(4):173-9.
- Kaatabi H, Bamosa AO, Badar A, Al-Elq A, Abou-Hozafa B, Lebda F, Al-Khadra A, Al-Almaie S. *Nigella sativa* improves glycemic control and ameliorates oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: placebo controlled participant blinded clinical trial. *PLoS One*. 2015 Feb 23;10(2):e0113486.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., (2008) *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Sirkeci / İstanbul*.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 780-791.
- Kumar Maurya, A., Mohanty, S., Pal, A., Singh Chanotiya, C., Umrao Bawankule, D. (2018) The essential oil from *Citrus limetta* Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 86-94.
- Küçükılınç, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. *Turk J Biochem*, 39, 126-131.
- Komiya M, Takeuchi T, Harada E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behav Brain Res*. 2006 Sep 25;172(2):240-9.

- Koolman, J., Klaus-Henrich, R. and Jürgen, W., 2003. Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper., Nobel.
- Koshak A, Wei L, Koshak E, Wali S, Alamoudi O, Demerdash A, Qutub M, Pushparaj PN, Heinrich M. Nigella sativa Supplementation Improves Asthma Control and Biomarkers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytother Res.* 2017 Mar;31(3):403-409.
- Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T., Nemcsok, J., 1997. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by mediation and paraquat in alimentary canal of common carp. *Genetic Pharmacology*, 55-59.
- Lee, B. H., Lee, J. S., & Kim, Y. C. (2016). Hair Growth-Promoting Effects of Lavender Oil in C57BL/6 Mice. *Toxicological research*, 32(2), 103–108. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.2.103>
- Lehninger Biyokimyanın İlkeleri David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Y. Murat Elçin) Palme yayıncılık, Ankara 2013.
- Lillehei, A. S., Halcón, L. L., Savik, K., & Reis, R. (2015). Effect of Inhaled Lavender and Sleep Hygiene on Self-Reported Sleep Issues: A Randomized Controlled Trial. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 21(7), 430–438. <https://doi.org/10.1089/acm.2014.0327>
- Lin G., Tsai Y. C., Liu H. C., Liao W. C., Chang C. H. (1998). Enantiomeric inhibitors of cholesterol esterase and acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1388, 161-174.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J Neurochem*, 39 (1), 106-110.
- Lockridge, O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9 (4), 125-128.
- Lockridge, O. (1990) Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther*, 47 (1), 35-60.
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring Pharmacological Mechanisms of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Central Nervous System Targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 280. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00280>
- Malfitano, A.M., Marasco, G., Proto, M.C., Laezza, C., Gazzerro, P., Bifulco, M. (2014) Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacological Research*, 88 (0), 74-83.

- Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 8(1), 15. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E.,Vallette, F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31-91.
- Massoulié, J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
- Massoulie, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D.,Bon, S. (2008) Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175 (1-3), 30-44.
- Masson, P., Lockridge, O. (2010) Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, 494 (2), 107-120.
- Masson, P., Froment, M.T., Sorenson, R.C., Bartels, C.F.,Lockridge, O. (1994) Mutation His322 Asn in human acetylcholinesterase does not alter electrophoretic and catalytic properties of the erythrocyte enzyme. *Blood*, 83 (10), 3003-3005.
- Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S.,Lockridge, O. (2007) A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin Chim Acta*, 378 (1-2), 128-135.
- McHardy SF, Wang HL, McCowen SV, Valdez MC. Recent developments in Acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update in the patent literature (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2017; 27 (4): 455-476.
- Narayanan S, Van Vleet J, Strunk B, Ross RN, Gray M. Comparison of pressure ulcer treatments in long-term care facilities: clinical outcomes and impact on cost. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2005 May-Jun;32(3):163-70.
- Nath, B.S., Kumar, P.S., 1999. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157-162.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Nikjou, R., Kazemzadeh, R., Rostamnegad, M., Moshfegi, S., Karimollahi, M., & Salehi, H. (2016). The Effect of Lavender Aromatherapy on the Pain Severity of Primary Dysmenorrhea: A Triple-blind Randomized Clinical Trial. *Annals of medical and health sciences research*, 6(4), 211–215. https://doi.org/10.4103/amhsr.amhsr_527_14

- Ogbechie, A., Abioye, A., Shen, J. and Laird, K. (2017) Antimicrobial activity of *Litsea cubeba*, *Rosmarinus officinalis* and *Citrus lemon* essential oils against five skin-infection related pathogens. Trends in Natural Product Research Meeting, Lille France.
- Ordentlich, A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of Biological Chemistry*. 268 (23), 17083-17095.
- Ozil, M., Balaydin, H.T., Senturk, M. 2019. Synthesis of 5-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*. 86, 705-713.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. et al. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 273-277.
- Pohanka (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc*, 155 (3), 219-229.
- Rachman, P.N. R., Akrom, Darmawan, E. (2017) The efficacy of black cumin seed (*Nigella sativa*) oil and hypoglycemic drug combination to reduce HbA1c level in patients with metabolic syndrome risk. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 259 (2017) 012018.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.
- Rajesh, R.V., Chitra, L., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009a) The aryl acylamidase activity is much more sensitive to Alzheimer drugs than the esterase activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic brain. *Biochimie*, 91 (9), 1087-1094.
- Rajesh, R.V., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009b) High aryl acylamidase activity associated with cobra venom acetylcholinesterase: biological significance. *Biochimie*, 91 (11-12), 1450-1456.
- Ribeiz, S.R., Bassitt, D.P., Arrais, J.A., Avila, R., Steffens, D.C., Bottino, C.M. (2010). Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.

- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E.; (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition Pharmaceutical Press, London, England 2009, 126.
- Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B.P. (1997) Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (48), 14642-14651.
- Senturk, M., *Enzyme Inhibitors and Activators*, 2017. Edited by Murat Senturk. Publisher: INTECH. ISBN 978-953-51-3058-1.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
- Sussman, J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A Prototypic Asetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Taylor, D., Paton C., Shitij K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155–170.
- Tripathi. A. (2008). Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 15 (4).
- Tunaru, S., Althoff, T. F., Nüsing, R. M., Diener, M., & Offermanns, S. (2012). Castor oil induces laxation and uterus contraction via ricinoleic acid activating prostaglandin EP3 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9179–9184.
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 649-652.
- Whittaker, V. (1990). The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8-13.

Zhang YJ, Gan RY, Li S, Zhou Y, Li AN, Xu DP, Li HB. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules*. 2015, 27;20(12):21138-56.

Zhao, Y., Chen, R., Wang, Y., Qing, C., Wang, W., & Yang, Y. (2017). In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of Lavender *angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. *Integrative cancer therapies*, 16(2), 215–226. <https://doi.org/10.1177/1534735416645408>

Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A., Senturk, M. 2018. Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32:e22210.

