

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZI
VE ERİTROSİT ASETİLKOLİNESTERAZININ
STATİN TÜREVLERİ İLE ETKİLEŞİMİNİN
İNCELENMESİ**

Bio. Meltem ATAY

Biyokimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ankara

2014

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZI
VE ERİTROSİT ASETİLKOLİNESTERAZININ
STATİN TÜREVLERİ İLE ETKİLEŞİMİNİN
İNCELENMESİ**

Bio. Meltem ATAY

Biyokimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Ebru BODUR

Ankara

2014

Anabilim Dalı :Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :İnsan Serum Bütirilkolinesterazı ve Eritrosit
 Asetilkolinesterazının Statin Türevleri ile
 Etkileşiminin İncelenmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı : Meltem ATAY
 Savunma Sınavı Tarihi :25.08.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr.Ediz DEMİRPENÇE
 TOBB ETÜ Üniversitesi
 Tez danışmanı: Doç.Dr.Ebru BODUR
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç.Dr.Yasemin AKSOY
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç.Dr.Z.Günnur DİKMEN
 Hacettepe Üniversitesi
 Üye: Doç.Dr.Ayşe ERCAN
 Hacettepe Üniversitesi

E. Demirpençe (imza)

E. Bodur (imza)

Y. Aksoy (imza)

A. Ercan (imza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

E. Façillioğlu (imza)

Prof.Dr. Ersin FAÇİLLİOĞLU

Müdür

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nın olanakları ile hazırlanmıştır. Çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı, hocaları, çalışanları ve öğrencilerine teşekkürü borç bilirim.

Bilimsel çalışmaların temel prensiplerini büyük bir sabır ve özveriyle öğreten, yüksek lisans eğitimim boyunca 'bilim insanı' olma yolunda bana engin tecrübeleriyle rehberlik eden, tanıştığımız ilk andan beri ve bu araştırma süresince destekleyici, motive edici, yapıcı önerileriyle bana her an yardımcı olan ve varlığıyla bana güç veren sevgili hocam Doç. Dr. Ebru BODUR'a sonsuz teşekkür ederim. Dilerim ki ben de öğrencilerime onun gibi şefkatli, anlayışlı bir danışman olurum.

Ayrıca, beni Biyokimya ile tanıştıran ve yürekten destekleyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE ve Prof. Dr. Asuman ÖZKARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim ve çalışmalarım sırasında önerileriyle ufkumu geliştiren sayın Prof. Dr. Kamer KILINÇ, Prof. Dr. Gülberk UÇAR, Doç. Dr. Yasemin AKSOY ve Doç. Dr. Günnur DİKMEN ve Dr. Behram SARKARATI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince göstermiş oldukları anlayış ve desteklerden dolayı Dr. Esra BÜBER, Dr. Merve Sibel GÜNGÖREN, Brishna DAWLATY ve Mehmet ÖZCAN'a teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Çalışmada kullanılan statinlerin teminine yardımcı oldukları için Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK ve Doç. Dr. Hakan EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bana inanıp güvenen ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Atay, M. İnsan Serum Bütirilkolinesterazı ve Eritrosit Asetilkolinesterazının Statin Türevleri ile Etkileşiminin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014.

Statinlerin Kolinesterazlarla etkileşimlerini araştırmak amacıyla, Bütirilkolinesteraz (BKE; E.C.3.1.1.8) insan serumundan asitli diyaliz, DEAE Trisakril M ve Prokainamid Sefaroz 4B kromatografisi basamaklarının ardından 867.93 kez saf elde edildi. Saflaştırılan insan serum BKE'sinin asetiltiyokolin (ATK), bütiriltiyokolin (BTK), propiyoniltiyokolin (PTK) ve benzoyilkolin (BZK) substratları ile substrat seçiciliği, atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin adlı statin türevleri ile inhibisyon kinetiği çalışıldı. İnsan eritrosit AKE'nin (AKE; E.C.3.1.1.7) ATK ve yukarıda belirtilen statinlerle kinetiği çalışıldı. "Systat 12 non-lineer" regresyon analizi ile insan serum BKE'nin ATK, BTK, PTK ve BZK için K_m değerleri μM cinsinden 216 ± 74 , 62 ± 37 , 155 ± 40 ve $24 \pm 8 \mu M$; eritrosit AKE'nin ATK için K_m değeri $65 \pm 16 \mu M$ olarak bulundu. BKE'nin ATK, BTK, ve PTK için K_{ss} değerleri; 2.38 ± 0.39 , 1.06 ± 0.47 ve, $4.53 \pm 0.45 \text{ mM}$ olarak; BKE'nin K_{cat} değerleri ise sırasıyla; 9.92 ± 0.71 , 26.56 ± 8.18 , 8.18 , $10.56 \pm 1.78 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplandı. BKE'nin ATK, BTK, PTK ve BZK için b değerleri 2.12 ± 0.30 , 1.02 , 7.49 ± 0.26 ve 10.780 ± 1.80 olarak. BKE'nin ATK, BTK, PTK ve BZK için bk_{cat} değerleri sırasıyla; 21.06 , 27.10 , 61.23 ve $113.85 \times 10^3 \text{ dak}^{-1}$ olarak; k_{cat}/k_m değerleri sırasıyla ise; 45.94 , 428.50 , 52.74 ve $0.43 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplandı. V_m değerleri ise sırasıyla; 26.34 ± 2.22 , 27.85 ± 2.84 , 46.08 ± 3.55 , $118.73 \pm 19.84 \mu \text{mol}^{-1} \cdot \text{dak} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}$ olarak hesaplandı. İnsan serum BKE'nin atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin için IC_{50} değerleri; 7.24 ± 0.27 , 14.20 ± 0.30 , 1.03 ± 0.19 ve $17.60 \pm 0.09 \mu M$; K_i değerleri ise 492.54 ± 55.12 , 198.65 ± 27.18 , 194.68 ± 55.24 ve $228.91 \pm 43.78 \mu M$; olarak saptandı. Sonuç olarak statinlerin Kolinesterazlarla oluşturduğu inhibisyonun tipi ilk defa bu çalışma ile ortaya çıkarıldı. Kullanılan statinlerin tümü insan serum BKE'nin non-kompetitif inhibitörü olarak bulundu. Eritrosit AKE için, lovastatin hariç diğer statinlerde inhibisyon gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Kolinesterazlar, Atorvastatin, Lovastatin, Rosuvastatin, Simvastatin.

ABSTRACT

Atay, M. Effects of Statins on Human Serum Butyrylcholinesterase and Erythrocyte Acetylcholinesterase. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Biochemistry Program, Master's Thesis, Ankara, 2014. To investigate effects of statins on cholinesterases, Butyrylcholinesterase (BChE; E.C.3.1.1.8) was purified from human plasma through acid dialysis, DEAE-Tris Acryl M ion exchange and Procainamide-Sepharose 4B chromatography steps. The fold of the process was 867.93. Substrate selectivity of the purified human serum BChE was determined with acetylthiocholine (ATCh), butyrylthiocholine (BTCh), propionylthiocholine (PTCh) and benzoylcholine (BZCh). Inhibition kinetics of statins, atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin and simvastatin, with human serum BChE were studied. The ATCh substrate kinetics and inhibition kinetics of the statins, were also analysed with human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7). Via Systat 12.0 nonlinear regression analysis, the K_m values of purified human serum BChE for the substrates ATCh, BTCh, PTCh and BZCh were found as 216 ± 74 , 62 ± 37 , 155 ± 40 and, 24 ± 8 μM . K_m value of human erythrocyte AChE for ATCh was found as 65 ± 16 μM . BChE K_{ss} values for ATCh, BTCh, and PTCh were found as 2.38 ± 0.39 , 1.06 ± 0.47 , 4.53 ± 0.45 mM. and the K_{cat} values of BChE for ATCh, BTCh, PTCh and BZCh were found as; 9.92 ± 0.71 , 26.56 ± 8.18 , 8.175 , $10.56 \pm 1.78 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$. And their corresponding b values were found as 2.12 ± 0.3 , 1.02 , 7.49 ± 0.26 , 10.78 ± 1.80 . The calculated bk_{cat} values of BChE for the ATCh, BTCh, PTCh, BZCh were 21.06 , 27.10 , 61.23 , $113.86 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ whereas k_{cat}/k_m values were found as 45.94 , 428.50 , 52.74 , $0.434 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. V_m values of BChE for ATCh, BTCh, PTCh and, BZCh; 27.85 ± 2.84 , 46.08 ± 3.55 , 26.34 ± 2.22 , $118.73 \pm 19.84 \mu\text{mol}^{-1} \text{ min.mg.prot}$, respectively. The IC_{50} values were of BChE for atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin and simvastatin found as 7.24 ± 0.27 , 14.20 ± 0.30 , 1.03 ± 0.19 , 17.60 ± 0.09 μM whereas their K_i values were 492.54 ± 55.12 , 198.65 ± 27.18 , 194.68 ± 55.24 and, 228.91 ± 43.78 μM . Inhibition types of statins on cholinesterases were defined for the first time. Hence, the statins used in this research, were determined as non-competitive inhibitors of human serum BChE. For erythrocyte AChE not all the statins but only Lovastatin was found as an inhibitor.

Key words: Cholinesterases, Atorvastatin, Lovastatin, Rosuvastatin, Simvastatin

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolinesterazların Tarihçesi ve Özellikleri	3
2.2. Kolinesterazların Genetik Özellikleri	5
2.3. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları	9
2.4. Kolinesterazların Glikozillenmesi.....	11
2.5. Kolinesterazların Alt Birimlerindeki Disülfid Bağları ve Sisteinler.....	12
2.6. Kolinesterazların Aktif Merkezi	13
2.7.Kolinesterazların Reaksiyon Mekanizması.....	14
2.7.1. Kolinesterazlar ve Substratlarının Reaksiyon Mekanizması.....	14
2.7.2. Kolinesterazların Çeşitli İnhibitörleri ile Tepkime Mekanizmaları	17
2.8. Kolinesterazların Farklı Aktivite Özellikleri	19
2.9. Kolinesterazların Fizyolojik Önemi.....	20
2.10.Statinlerin Genel Özellikleri	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Kimyasallar	24
3.1.2. Aletler.....	24

3.2. Yöntemler.....	25
3.2.1. Örneklerdeki Protein Miktarının Ölçümü	25
3.2.2. İnhibisyon Çalışmaları	25
3.2.3. İnsan Serum BKE Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.2.4. İnsan Serum BKE Saflaştırma Basamakları	27
3.2.5. Elektroforetik İncelemeler	28
3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler	28
4. Bulgular.....	29
4.1. İnsan Serum BKE'nin Saflaştırılma Basamakları.....	29
4.1.1. Asitli Diyaliz	29
4.1.2. DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi	29
4.1.3. Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi.....	30
4.2. İnsan Serum BKE'nin Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi	33
4.3. Kinetik Çalışmalar	35
4.3.1. Kolinesterazların Pozitif Yüklü Substratları ile Kinetiği	35
4.3.2. İnsan Serum BKE ile Statinlerin İnhibisyon Kinetikleri.....	41
4.3.3. İnsan Eritrosit AKE ile Statinlerin İnhibisyon Kinetikleri.....	46
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR	54
EKLER.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Aril açıl amidaz
AKE	Asetilkolinesteraz
ATK	Asetiltiyokolin
ATOR	Atorvastatin
BKE	Bütirilkolinesteraz
BTK	Bütiriltiyokolin
BZK	Benzoyilkolin
BW284C51	1,5 bis-(4-allildimetilaminopropil) pentan-3-on dibromür
DTNB	5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA
IC ₅₀	Maksimum inhibisyonun yarısını oluşturan inhibitör konsantrasyonu
iso-OMPA	Tetraizopropil pirofosfoamid
LOVA	Lovastatin
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PTK	Propiyoniltiyokolin
ROSU	Rosuvastatin
SIM	Simvastatin

ŞEKİLLER

2.1. AKE geni şeması.....	5
2.2. BKE geni şeması.....	6
2.3. AKE'nin moleküler yapısı	7
2.4 Kolinesterazların moleküler biçimleri	9
2.5. BKE tetramerinin globüler yapıs	10
2.6. BKE'nin disülfid bağları.....	12
2.7. BKE'nin aktif merkez girintisinin amino asit dizilimi.....	13
2.8. BKE'nin aktif merkez yapısı.....	14
2.9. BKE'nin reaksiyon modeli şeması.....	15
2.10.Kolinesterazların substrat hidrolizi	15
2.11.Kolinesterazların reaksiyon mekanizması.....	16
2.12.Substrat varlığında BKE'nin inhibisyon şeması	17
2.13.BW284C51 ve iso-OMPA'nın molekül yapıları	18
2.14. Çeşitli organofosfatların molekül yapıları	18
2.15.Süksinilkolin , süksametonyum klorürün yapısı	19
3.1.Ellman reaksiyonu.....	26
4.1.DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi elüsyon profili	30
4.2.Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi elüsyon profili	32
4.3.Natif BKE- PAGE gümüş boyama	34
4.4.Natif BKE- PAGE, aktivite boyama	34
4.5.BTK derişiminin BKE üzerindeki etkisi	36
4.6.BTK ile Lineweaver-Burk grafiğı.....	36
4.7.PTK derişiminin BKE üzerindeki etkisi	37
4.8.PTK ile Lineweaver-Burk grafiğı	37

4.9.ATK derişiminin BKE üzerindeki etkisi.....	38
4.10.ATK ile Lineweaver-Burk grafiği,.....	38
4.11.BZK derişiminin BKE üzerindeki etkisi.....	39
4.12.BZK ile Lineweaver-Burk grafiği.....	39
4.13.ATK derişiminin AKE üzerindeki etkisi.....	40
4.14.ATK ile Lineweaver-Burk grafiği.....	41
4.15.Atorvastatin- BKE, IC ₅₀ ve % aktivite grafikleri.....	42
4.16.Atorvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiği.....	42
4.17. Rosuvastatin-BKE, IC ₅₀ ve % aktivite grafikleri.....	43
4.18.Rosuvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiği.....	43
4.19.Lovastatin-BKE, IC ₅₀ ve % aktivite grafikleri.....	44
4.20.Lovastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiği.....	44
4.21.Simvastatin-BKE, IC ₅₀ ve % aktivite grafikleri.....	45
4.22.Simvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiği.....	45
4.23.Lovastatin-AKE % aktivite grafiği	46
5.1.Kolinesterazların kinetik mekanizması	48

TABLOLAR

2.1 İnsan BKE ‘nin fenotipleri.....	8
2.2 Çalışmada kullanılan Statinler	23
4.1 İnsan serum BKE saflaştırma basamakları	33
4.3 BKE’nin farklı substratlarla elde edilen kinetik parametreleri	40
4.4 AKE’nin ATK ile elde edilen kinetik parametreleri	41
4.5 Statinlerin BKE ile elde edilen IC ₅₀ değerleri ve inhibisyon tipleri	46

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kolinesterazlar, pek çok dokuda, plazma ve vücut sıvılarında bulunan enzimlerdir. Substrat özgüllüğü ve inhibitör hassasiyetlerine göre asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (1-3). Asetilkolinesteraz (AKE, E.C. 3.1.1.7) beyin, kas ve eritrosit zarında bulunan asıl kolinesterazdır (4). Asetilkolinin kolinerjik sinapstan salımından sonra kolinesterazlar aracılığıyla parçalanması sonucu sinir iletimi sonlanmaktadır (5). Bütirilkolinesteraz ise (BKE, E.C. 3.1.1.8) kolin esterlerini ve bu bileşiklerin tiyol analoglarını, ksenobiyotikleri, nitroasetanilidleri, aspirin, amitriptilin, benaktizin, drofenin gibi ilaçları; süksinildikolin, pestisitler, insektisitler gibi karbamat esterlerini ve çeşitli organofosfatları yıkabilen, serumdaki ana detoksifiye edici enzimlerdendir (1-7). Pek çok farklı bileşiği hidroliz edebilmesine rağmen, BKE'nin doğal substratı bilinmemektedir (7). Ancak, en uygun substratı bütirilkolindir (8). Bütirilkolin, sıgır kornea epitelinde ve beyinde bulunmaktadır, işlevi bilinmemekle birlikte, nörotransmitter özellikte bir madde olduğu düşünülmektedir (9).

BKE karaciğerde sentezlenip plazmaya verilmekte ve insanda serum proteinlerinin yaklaşık % 0.01'ini oluşturmaktadır (10). Ayrıca toksik bileşiklerin AKE'ye ulaşmadan detoksifiye edilmesi BKE'nin önemli bir özelliğidir (11,12). BKE beyin, kalp, akciğer, damar, kas, plazma, dalak, karaciğer, ince barsak, tükürük ve deri olmak üzere pek çok farklı dokuda yer almaktadır (11).

AKE ve BKE'nin kollajen benzeri kuyruğu olan asimetric A₄, A₈, A₁₂ moleküler yapıları, G₄ tetramer globüler yapısı, amfifilik veya non-amfifilik özellikte olabilen G₁, G₂ monomer ve dimer yapıları bilinmektedir(10). İnsan vücut sıvılarında BKE, G₄ tetramer halde bulunmaktadır (13).

AKE'nin aktif bölgesinde bulunan ondört aromatik amino asitten altısı BKE'de alifatik amino asittir (14). Böylece BKE, bütirilkolin gibi büyük açıl grubu içeren substratları katalizleyebilmektedir (15). Bu durum, BKE'nin aktif bölgesinin AKE'den daha geniş olmasını sağlarken, her iki enzimin inhibitörleri arasında farklılıklara yol açmaktadır. 1,5-bis (4-allildimetilamonyumfenil) pentan-3-bir dibromür (BW284C51) özgül olarak AKE'yi inhibe ederken; tetraizopropilpiro-

fosforamid (iso-OMPA), ethopropazin ve bambuterol, BKE'yi inhibe etmektedir (8-17).

Atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, pravastatin, pitavastatin ve rosuvastatin funguslardan elde edilen veya sentetik olarak üretilen başlıca statinlerdir. Statin türevi ilaçlar, HMG-KoA redüktaz (3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz, E.C. 1.1.1.34) enzimini kompetitif olarak inhibe edererek kan kolesterol düzeyini normal seviyelere düşürmektedir (12-15).

Bütirilkolinesteraz, doğrudan kolesterol veya kolesterol esterlerinin karşılıklı etkileşimi ile lipid metabolizmasında etkili olabilmektedir (15). Kolinesteraz aktivitesi ile triaçilgliserol düzeyleri, obezite, koroner arter hastalıkları, tip 2 diyabetes mellitus ve karaciğer yağlanması arasında ilişki olduğunu ortaya çıkaran çalışmalar yapılmaktadır (13). Ek olarak bütirilkolinesteraz geni olmayan farelerde yüksek yağ içerikli diyetin, obeziteye yol açtığı düşünülmektedir (16).

HMG-KoA redüktaz inhibitörlerinin ve statinlerin, kolinesterazlar üzerinde inhibe edici özelliklerinin olduğu düşünülmektedir. Statin ve benzeri lipid azaltıcı ajanların, yalnızca kolesterol seviyesini azaltmakla kalmadıkları aynı zamanda Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olarak da etkinliklerinin olduğu bilinmektedir ayrıca lipid metabolizması, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve inme gibi rahatsızlıklar için de koruyucu- önleyici ajan olabilecekleri yeni araştırmaların konusudur.

Bu çalışmanın amacı statinlerden atorvastatin, lovastatin, simvastatin, ve rosuvastatin'in insan serumundan saflaştırılan BKE ve insan eritrosit AKE'si ile kinetik etkileşimlerini incelemek ve kolinesterazların lipid metabolizması ile ilişkisine ışık tutmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kolinesterazların Tarihçesi ve Özellikleri

Kolinesterazlar, kolin esterlerinin hidrolizini gerçekleştirebilme özelliğine sahip enzimler olarak tanımlanmışlardır (17). Asetilkolinesteraz, ilk olarak kurbağa vagus sinirinde asetilkolini ortadan kaldıran enzim olarak bulunmuş, at serumundan saflaştırılarak tanımlandıktan sonra kolin-esteraz adını almıştır (5,17). Farklı substrat derişimleri ile yapılan çalışmalar sonucunda kinetik özellikleri farklı, iki çeşit kolinesteraz olduğu düşünülmüştür (17). Bunlardan birincisi, düşük substrat konsantrasyonlarında en iyi aktivite gösteren ve yüksek substrat derişimlerinde inhibe olan insan eritrositlerinde bulunan kolinesterazdır, ikincisi substrat derişimi arttıkça aktivitesi artan ve insan serumunda bulunan kolinesterazdır (5,17,18). Daha sonra yapılan çalışmalar, eritrosit enziminin yalnızca kolin esterlerini substrat olarak kullanabildiğini gösterdiğinden bu enzim “gerçek kolinesteraz”, serum enzimi ise kolin olmayan esterleri de hidroliz edebildiğinden “psödo kolinesteraz” olarak adlandırılmışlardır, ancak bu adlandırma enzimler için yeterince özgül değildir (19). Çalışmalarda bu belirsiz adlandırılmadan dolayı oluşabilecek kargaşayı önlemek gerekmektedir (17). Bu amaçla, Uygulamalı ve Teorik Kimya Birliğinin Uluslararası Biyokimyasal İsimlendirme Komitesi (IUPAC) ve Uluslararası Biyokimya Birliği (IUBMB), eritrosit enzimini “asetilkolinesteraz” (gerçek kolinesteraz, eritrosit kolinesterazı, asetilkolin asetilhidrolaz AKE, E.C. 3.1.1.7) serum enzimini ise “Bütirilkolinesteraz” (psödokolinesteraz, serum kolinesterazı açilkolin açilhidrolaz, kolinesteraz, BKE, E.C.3.1.1.8) olarak sınıflandırmıştır (17, 20).

Kolinesterazlar, asetilkolinin kolinerjik sinapslardan salınır salınmaz hızla yıkımı ve kolinerjik sistemin kontrolünü sağlayan enzimlerdir (5, 17).

Ayrıca kolinesterazlar, kolin esterlerini diğer substratlara oranla daha hızlı bir şekilde hidroliz etme veya fizyostigmin (eserin) adı verilen bir doğal karbamat alkaloidi tarafından inhibe edilme özellikleri ile tanınırlar (2). Asetilkolinesterazın (AKE) asetilkolini hidroliz hızı substratların moleküler difüzyonunun teorik limitinin en yüksek değerine ulaşmaktadır (5,21). Bu durum kolinesterazların bilinen en hızlı enzimler olduğunu göstermektedir (2). Bütirilkolinesteraz (BKE) bütirilkolini hızlı bir şekilde hidroliz eder, ayrıca asetilkolini de hidroliz edebilmektedir (5,22).

Kolinesterazlar en iyi fizyolojik pH'da diğer bir deyişle pH 7.4'de aktivite göstermektedir ve tepkime mekanizmaları aktif bölgedeki serin rezidüsü aracılığıyla gerçekleşmektedir (5,22). Diisopropilflorofosfat (DFP) kolinesterazların aktif merkezinde bulunan serin rezidüsünü alkilleyerek kolinesterazları geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir (5,20). Tripsin, kimotripsin ve kan pıhtılaştırma faktörleri de DFP ile inhibe edilen diğer serin proteazlardır (20).

İnsektisitler ve sinir gazları gibi organofosfatlar, fenotiyazin türevleri, kolinesterazların özgül inhibitörleridir (17,23). Kolinesterazların inhibitörleri ile etkileşimleri de farklıdır; AKE'nin seçici inhibitörü 1,5 bis-(4-allildimetilaminopropil) pentan-3-on-dibromür (BW284C51) iken BKE'nin özgül inhibitörü (RS)-5-[2-(ter-butilamino)-1-hidroksietil]benzen-1,3-di bis(dimetil karbamat) (bambuterol) ve N'N'-di-isopropilfosfordiamidik anhidrit (tetraizopropilpirofosforamid, -iso-OMPA)'dır (5,16). AKE ve BKE çeşitli dokularda farklı seviyelerde bulunmaktadır (5). Yetişkin insanlarda serum AKE seviyesi 8 ng/ml iken, BKE seviyesi 3300 ng/ml olarak tanımlanmıştır (16). AKE sinir sistemi ve kas dokusunda yüksek miktarda vardır, gelişimin ilk dönemlerinde BKE'de düşük seviyede bu dokularda bulunmaktadır (5). AKE başta merkezi sinir sistemi, kas sinir kavşağı ve sempatik sinirler ve ter bezleri olmak üzere tüm kolinerjik sistemde BKE'ye oranla daha fazla miktarda bulunan enzimdir (21).

Serum BKE'si karaciğerde sentezlendikten sonra dolaşıma salınmaktadır (5,17). Karaciğerde sentezlenme özelliğinden dolayı BKE, klinik araştırmalarda karaciğer fonksiyonu belirteci olarak kullanılmaktadır (17). Akut hepatit, akut siroz ve karaciğer metastazlarında serum kolinesteraz aktivitesi düşmektedir bu durum hepatik protein sentezinin bozulduğunun bir işaretidir (10,17). Nörinoma, meningioma ve gliomalar gibi beyin tümörleri, lösemiler ve ovaryum karsinomlarında da BKE seviyesi ve aktivitesinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir, bu durum BKE'nin enzimatik katalizden farklı işlevleri olabileceğini düşündürmektedir (24).

AKE'nin kolinerjik iletimdeki etkileri açık bir şekilde aydınlatılmıştır ancak BKE'nin fizyolojideki yeri ve önemi yeterince açık olmamakla birlikte anestetik bir etken madde olan süksinilkolinin yıkılması, eroin, aspirin (25) ve fizyostigmin hidrolizi, bambuterolün aktiveştirilmesi gibi tepkimeleri katalizlediği bulunmuştur

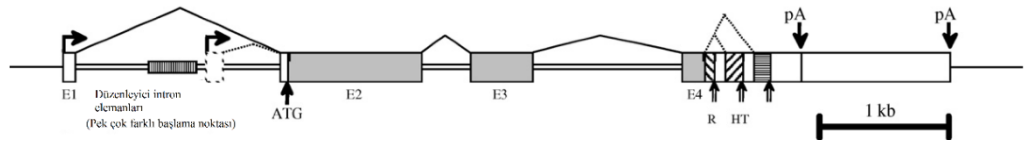
(5,23). Bu özelliklerinden dolayı BKE pek çok bileşiği geri dönüştürücü ve detoksifiye edici bir enzim olarak tanımlanmaktadır (5). İnsanlarda kas gevşetici süksinilkolinin hidroliz edilememesinden kaynaklı anestezide geçirilen uykuda kalma süresindeki artış BKE aktivitesinin düşük olması ile ilişkilidir (5,17). Süksinilkolin kas-sinir kavşağındaki reseptörlere bağlanmak için asetilkolin ile yarışır, her ikisi de kas liflerinde depolarizasyona yol açar ancak asetilkolinin AKE tarafından hızla hidrolizi ile uyarılar iletilebilmektedir (16,17). Süksinilkolin ise AKE tarafından hidroliz edilemediğinden dolayı, sinir iletimi yavaşlamaktadır, verilen dozun büyük bir bölümü serumda bulunan BKE aracılığıyla hidroliz edilene kadar, kas gevşetici etki devam etmektedir (17).

2.2. Kolinesterazların Genetik Özellikleri

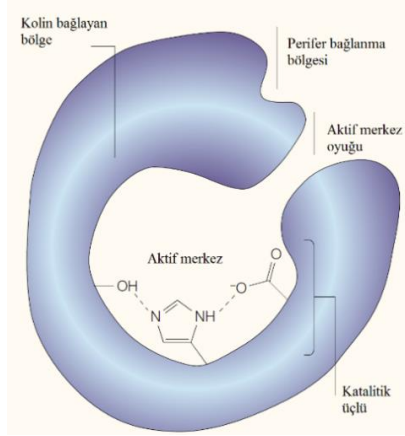
Omurgalı canlılarda AKE ve BKE'yi kodlayan iki farklı kolinesteraz geni bulunmaktadır (10). Kolinesterazlar birden fazla transkripsiyon başlatma bölgesi içeren, alternatif gen dizilimlerine izin verebilen özellikte bir gen bölgesi tarafından kodlanmaktadır (26). Sentezlenen kolinesterazların katalitik bölgeleri ve amino asit sayıları aynı olmakla birlikte, farklı karboksil uç peptit dizilimlerine sahiptirler (10).

İntron elemanları arasındaki başlama noktalarının çeşitliliğinden kaynaklı farklı gen bölgelerinin birleştirilmesi sonucu kolinesterazlarda çeşitli özelliklerde moleküler formlar oluşmaktadır (10,26).

AKE geni, insanda 7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde yer alan, altı ekson içeren ve 7 kilobaz uzunluğunda bir gendir (27,28). AKE'nin kolinerjik sinir iletiminin düzenlenmesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (27). AKE gen lokusunda oluşan ve protein ekspresyonunu etkileyen mutasyonlar çeşitli patolojik koşullara sebep olmaktadır (28).



Şekil 2.1. AKE geni şeması (10).



Şekil 2.3. AKE'nin moleküler yapısı (11) .

Bu farklı AKE varyantlarından AKE-S hücre çoğalmasının ve apoptozun kontrolünü sağlamaktadır, ayrıca AKE-R ile birlikte AKE-S varyantları Alzheimer hastalığı ile yakından ilişkilidir (32).

Alternatif kırılma (splicing) varyantlarına ek olarak, eritrosit AKE'nin genetik varyantı saptanmıştır (4,33). Eritrosit AKE'si aynı zamanda YT kan grubu antijeni olarak da adlandırılmaktadır (33) . YT1 kan grubunda AKE dizisinde His332 (CAC) bulunurken YT2 kan grubunda Asn332 (AAC) yer almaktadır (34) . AKE genindeki polimorfizmler AKE'nin amino asit dizilişini, elektroforetik ve kinetik özelliklerini etkilememektedir, buna rağmen uyumsuz YT kan transfüzyonlarında farklı antijene karşı antikor gelişmektedir (33,34).

BKE'nin klinik olarak kullanılan kas gevşeticilerden olan süksinilkolini hidroliz etme özelliğinde gözlenen farklılıklar sonucu atipik BKE varyantı keşfedilmiştir (30,35). Atipik varyant taşıyan hasta, standart miktarda süksinilkolin enjeksiyonu yapıldığında bile geç uyanmaktadır, soluk alıp verme ile ilgili tüm kaslar paraliz olduğundan yapay solunum cihazına bağlanarak solunumun devam ettirilmesi gereksinimini duymaktadır, aksi halde hastanın yaşamı tehlikeye girmektedir (35). Atipik varyant, hastalardan alınan serum örneğinin dibukain inhibisyon testi ile tanımlanabilmektedir (36,37). Serum BKE'nin dibukain inhibisyon miktarına göre hastaya verilecek süksinilkolin dozu ayarlanabilmekte ve oluşabilecek komplikasyonların önlenmesi sağlanmaktadır (30,35).

Serum BKE aktivitelerinin ölçümü; dibukain ile florür inhibisyon düzeylerinin değerlendirilmesiyle, süksinilkolin hassasiyetine yol açan BKE fenotipleri ile ilişkin bilgiler elde edilmiştir (30,38). Zamanla, enzimin aktivite değişimine karşı oluşan yanıtı dayanan fenotipleme tekniklerinin güvenilirliği azalmış, modern DNA analizi teknikleri ile DNA düzeyinde analitik varyant analizleri yaygınlaşmıştır (30,39).

Tablo 2.1. İnsan BKE'nin fenotipleri (30) .

<i>İnsan Serum BKE'nin Genetik Varyantları</i>	
Adı ve Özelliği	Gen Sıklığı
Normal BKE	0.870
K varyantı (Normale göre 1/3'ü düzeyinde)	0.113
Sessiz BKE Varyantı (çeşitli tiplerde)	1/100000
Florüre Karşı Dirençli Varyant	1/150000
J Varyantı (Normale göre 2/3'ü düzeyinde)	Nadir
H Varyantı (Normale göre aktivitesi % 90 az)	Nadir
Newfoundland Varyantı	Nadir
Cynthiana Varyantı (normale göre yüksek aktivite)	4 aile
Alman Yüksek Aktiviteli BKE Varyantı	2 aile
Güney Afrika Varyantı	1 aile

BKE geninde farklı mutasyonlar sonucu oluşan ve özellikleri aydınlatılmış olan BKE varyantları; atipik BKE ve florüre dirençli BKE'dir (17,35). Bu varyantlar, normal genetik özellikteki BKE'ye oranla, dibukain ve sodyum florüre karşı daha az inhibisyon göstermeleri özelliğiyle tanınırlar (29). Atipik BKE alleli Asp70 yerine glisin geçmesi sonucu oluşurken, florüre karşı dirençli BKE varyantı Thr243'ün yerine metiyonin geçmesi veya Gly390'ın yerine valin geçmesi gibi çeşitli heterojen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (29,30).

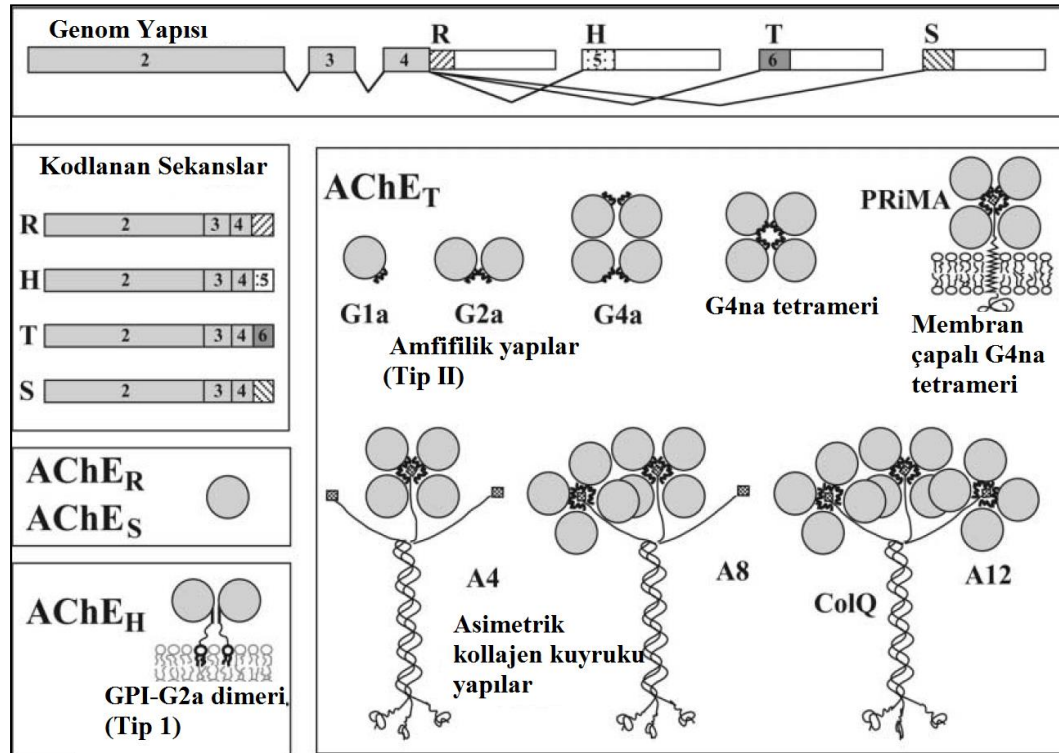
Atipik BKE, 574 amino asit kodlayan BKE geninin 1722 nükleotitten oluşan baz dizisindeki nokta mutasyonu sonucunda oluşmaktadır (30,40). Bu mutasyon 209(GAT->GGT) 70. aspartat amino asitinin yerine glisin kodlanmasına sebep

olmaktadır (30). Asidik bir amino asit rezidüsünün eksilmesi sonucu anyonik bölgenin aktifliği azalmakta; böylece enzimin kolin esterlerine olan afinitesi düşmektedir (30,41).

2.3. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları

Kolinesterazlar farklı moleküler formlarına, çözünürlük özelliklerine, kuarterner yapılarına ve alt birim sayılarına göre sınıflandırılmaktadırlar (5,26). Tip I G_2 yapısındaki AKE glikofosfatidilinositol çıpası içermektedir (5). Tip II G_1 ve G_2 yapısındaki AKE ve BKE ise hidrofobik bir çıpa ile zara tutunmaktadır (5,10). A_{12} asimetrik yapısında disülfid bağı içeren üç katalitik alt birim birbirine, kollajen yapıda üçlü heliks kuyruk ile tutunmaktadır (5).

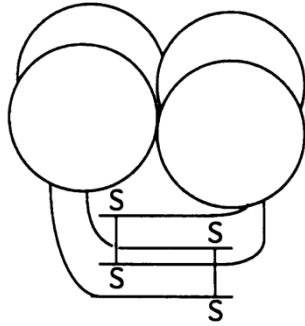
İnsan ve büyük baş hayvanların beyindeki kaudat çekirdek AKE'si G_4 tetramerleridir, ayrıca asimetrik kollajen kuyruklu AKE memeli kas dokusunda bulunmaktadır, (Şekil 2.4) (16,43).



Şekil 2.4.Kolinesterazların Moleküler Biçimleri (16).

İnsan serum BKE'si ise Şekil 2.5'de şematize edildiği gibi, iki disülfid bağı ile birbirine bağlanmış dimerlerden oluşan G_4 tetrameri halinde bulunmaktadır (16,42) . Amfifilik globüler yapıdaki kolinesterazlar (G^a), hidrofobik bir bölge içermeleri ile amfifilik olmayan globüler yapılardan (G^{na}) ayırt edilmektedirler (5,10).

Kolinesterazlar, glikoprotein yapıda olan monomer veya oligomerlerdir (5). İnsan serumunda BKE'nin büyük bir kısmı çözünebilir halde olan G_4 formunda bulunmaktadır, ne bir glikolipid çıpa ne de kollajen kuyruğu vardır, yapısı birbirine eş dört alt birimin oluşturduğu tetramerdir (7). Bu tetramerin moleküler ağırlığı ise 342.136 kDa'dır (20,43). BKE'nin bir monomerinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 90 kDa, bir dimeri ise yaklaşık 180 kDa'dır (20). Bu veriler jel filtrasyonu, DFP veya paraoxon titrasyonu, ultrasantrifügasyon gibi teknikler ile de doğrulanmıştır (16,20).



Şekil 2.5. BKE tetramerinin globüler yapısı ve Cys 571 disülfid bağları (42).

Glikofosfolipid çıpası içeren dimerlerden tip I (G_2^a Tip I) amfifilik özellikteki diğer yüzey proteinleri gibi hücre yüzeyinde bulunmaktadır (5). Diğer pek çok omurgalının hemotopoetik hücresinde bulunan AKE ile benzer yapıya sahip, insan eritrosit AKE'si de G_2^a Tip I, katalitik alt birimindeki amino asit dizisinin C ucuna amid bağı ile bağlı etanolamin-glikan-fosfatidilinositol çıpası (GPI) içermektedir (5,12).

G_2^a Tip II, çözünebilir özellikte glikolipid çıpa içermeyen ve deterjanlarla etkileştiğinde agregat oluşturmayan bir dimerdir (5,44). Dördüncül yapıları çok benzer olan amfifilik özellikteki G_1 monomerleri ve G_2 dimerleri özellikle kas ve beyin olmak üzere pek çok farklı dokuda bulunmaktadır, fare ince bağırsak mukozası BKE'si bu yapıya örnektir (5).

Asimetrik kolinesterazlar üçlü heliks yapıda, Q adı verilen üç adet kollajen benzeri kuyruk içermesi özellikleriyle tanınırlar (10,26). Her bir kollajen Q birimi bir katalitik tetramere bağlıdır, buna göre bir katalitik tetramer içeren molekül A_4 , iki katalitik tetrameri olan asimetrik yapı A_8 ve üç katalitik tetramer içeren moleküler yapı ise A_{12} adını alır, kollajen kuyruklu A_{12} katalitik yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir (5,10).

Asimetrik yapıdaki kolinesterazların iyonik etkileşimleri, çözünübilirlikleri farklıdır, örneğin bazal laminada bulunan G formundaki kolinesterazlar A yapısındakilere oranla glikozaminoglikanlar ve heparin ile daha az etkileşebilmektedirler (5,13).

2.4. Kolinesterazların Glikozillenmesi

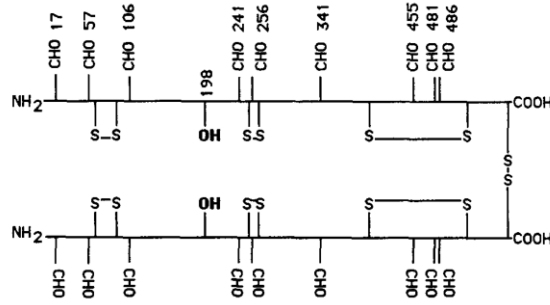
Kolinesterazların amino asit sekansları, Edman degradasyonu ve cDNA klonlaması ile elde edilmiştir(17), AKE ve BKE'nin her ikisi de glikoprotein özelliktedir (16). Şekil 2.4'de BKE disülfid bağıyla bağlı iki alt birimden oluşmuş şekilde şematize edilmiştir, ağırlığı yaklaşık 65.092 kDa kadar olan BKE'nin (2,3) her bir alt biriminde 574 amino asit bulunmaktadır (4). AKE'nin dört adet karbohidrat grubu bulunmaktadır ve bunlar asparajin rezidülerine bağlıdır (16). BKE üzerine eklenen karbohidrat zincirleri monomerin ağırlığının % 23,9'unu oluşturmaktadır ve glikozillenmiş bir monomerin ağırlığı yaklaşık 85.534 Da'ya çıkmaktadır (5,10). AKE'nin ise yaklaşık % 10 -15'i karbohidratlardan oluşmuş haldedir (5,18).

İnsan AKE yüzeyinde üç adet, BKE yüzeyinde 4-9 adet *N*-glikozillenme bölgesi bulunmaktadır (5). Gelişim sırasında tunikamisin ile *N*-glikozillenmenin baskılanması olgun AKE oluşumunu engellemektedir (5,16).

Kolinesterazların glikan zincirleri dokulara göre farklılık göstermektedir, Örneğin G_2 moleküler yapısındaki insan ve dana eritrosit AKE'si, beyinde bulunan G_4 AKE'ye oranla daha fazla karbohidrat zinciri içermektedir, bu durum BKE'de de benzerdir (5). Kolinesterazların yüzeylerindeki glikan zinciri miktarı, onların substratlarına olan ilgisini de değiştirmektedir, çünkü bu tip yapılar enzimin yüzeyindeki yükün farklılaşmasına sebep olmaktadır, böylece bölgesel elektrostatik etkileşimler değişmektedir (5,10).

2.5. Kolinesterazların Alt Birimlerindeki Disülfid Bağları ve Sisteinler

Disülfid bağlarının pozisyonu ve aktif merkezin amino asit dizilimi açısından kolinesterazların serin proteazlar ailesi ile ortak özelliği bulunmamaktadır (45,46). Katalitik mekanizmaları, aktif merkezde bulunan serin amino asidi rezidülerinin konumu, tripsin ve histidin gruplarının sıralanması ve amino asit dizilimleri açısından BKE ve AKE, tripsin benzeri serin proteazlar ile homolog yapıdadır (45). Örneğin, kolinesterazlarda aktif merkezdeki serin rezidüsü etrafında yer alan GESAG (Glisin-Glutamin-Serin-Alanin-Glisin) dizisi pek çok canlıda korunmuş durumdadır (16,45). Kolinesterazların substrat özgüllüğünü sağlayan anyonik bölgelerin varlığı ve bu bölgelerin aktif merkezindeki amino asit sekansları türler arasında; AKE ve BKE’de, ayrıca çeşitli BKE varyantlarında farklılık göstermektedir (16,43).

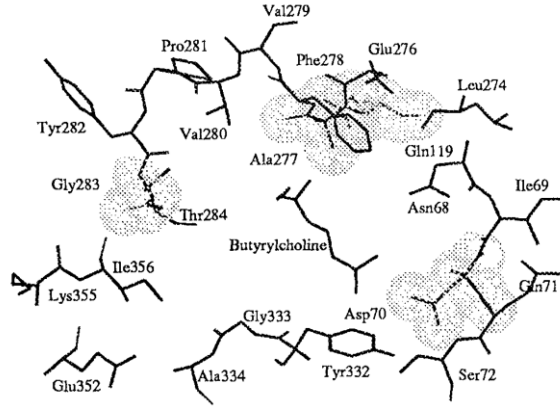


Şekil 2.6. BKE'nin disülfid bağları şeması (20).

G₄ yapısında bulunan kolinesterazların her bir alt biriminde 8 adet sistein amino asiti bulunur (2). Bu sisteinlerden 6 tanesi Cys 65-92, 252-263 ve 400-519 olmak üzere molekül içindeki üç disülfid köprüsünü oluştururlar (Şekil 2.1.7) (2,7). Bu molekül içi disülfid bağları, kolinesterazların sekonder yapısını oluşturmaktadır (45). Karboksil ucunun yakınındaki Cys 571, eş alt birimde bulunan Cys 571 ile zincirler arası bir disülfid bağı kurmaktadır (20) ve üç boyutlu kararlı bir yapı kazanmaktadır (45), böylece kolinesteraz alt birimleri dimerler dimeri şeklinde, G₄ moleküler formunda bir arada tutulabilmektedir (2,7).

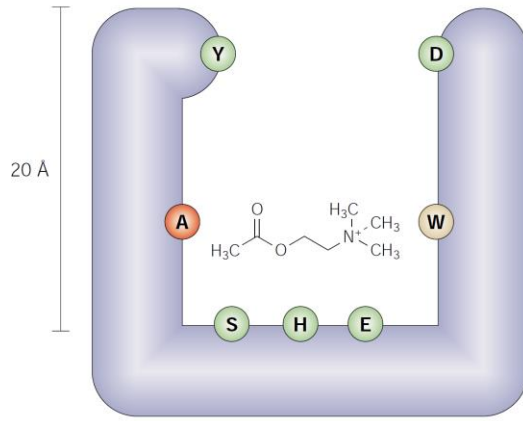
2.6. Kolinesterazların Aktif Merkezi

Protein ailesi analizi çalışmalarında, AKE ile homolog yapıda bir serin proteaz ailesi proteinine rastlanmamış olması kolinesterazların serin proteazlardan farklı amino asit dizilimlerine sahip olduklarını kanıtlamıştır (13). Kolinesterazların C uç kısmındaki amino asitler çeşitlilik göstermekle birlikte korunmuş durumdadır ve bu amino asitler katalitik üçlü adı verilen enzimin aktif merkezini oluşturmaktadır (16).



Şekil 2.7. BKE aktif merkez girintisinin amino asit diziliminin gösterimi (41).

Her asetilkolinesteraz molekülünün alt birimi başına bir adet aktif merkezi bulunmaktadır, perifer anyonik bölge ve merkezdeki esteratik bölge aktif merkezin ana bileşenleridir (47,48). Anyonik bölgede glutamat rezidüsü, esteratik bölgede serin amino asidine ait -OH grubu ve imidazol halkası mevcuttur (47,49). Esteratik bölgeye ek olarak aktif merkezde açıl bölgesi ve kolin bağlama alt bölgesi bulunmaktadır (47). İnsan serum BKE'sindeki 423. ve 438. histidin rezidüleri, tavşan karaciğer mikrozom esterazı ve *Drosophila* esteraz 6 olmak üzere pek çok canlıda korunmuştur (16). Serin proteazların genel özelliği olan katalitik Asp-His-Ser katalitik üçlüsünün BKE'nin aktif merkezinde de bulunduğu bilinmektedir (20). Asp 91 ise tüm kolinesterazlarda katalitik bölgenin üçüncü amino asididir (16). AKE'nin her bir katalitik merkezi reaktif bir serin amino asiti rezidüsü içermektedir (45). BKE, DFP ile etkileşim sonucunda aktivitesini kaybetmekte ve aktif merkezde yer alan N terminal ucundan sayıldığında 198. sıradaki serin amino asiti alkilenlenmektedir, bununla birlikte esteratik bölgede bulunan histidin fosforillenmektedir (5,17,50).



Şekil 2.8. BKE'nin aktif merkezi yapısı; BKE'nin aktif bölgesinde bulunan ve temel aktivitesini sağlayan katalitik üçlü serin (S), histidin (H) ve glutamik asitten (E) oluşmaktadır (13).

Şekilde asetilkolin örneği olarak gösterilen substratın açıl grubu açıl cebi ile uyumludur (51). Substratta bulunan kuarterner azot triptofan (W) amino asiti tarafından oluşturulan anyonik bölge ile etkileşime geçer ve aktif merkezin girişinde bulunan aspartik asit (A) ve tirozin (Y) aracılığıyla substratlar aktif merkezle etkileşime geçmesi için yönlendirilir (13,41).

2.7.Kolinesterazların Reaksiyon Mekanizması

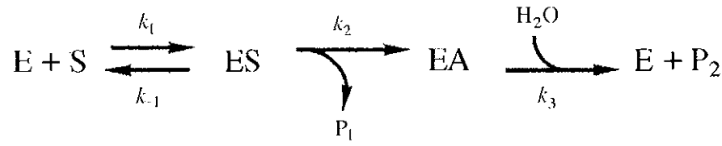
2.7.1. Kolinesterazlar ve Substratlarının Reaksiyon Mekanizması

Kolinesterazların substrat seçicilikleri farklılık göstermektedir, AKE doğal bir nörotransmitter olan asetilkolini diğer büyük açıl kuyruklu kolin esterlerine oranla hızla hidroliz edebilmekte iken BKE ise bütirilkolin başta olmak üzere sentetik substratları hızla hidroliz edebilmektedir (16).

Kolinesterazların aktif merkezleri esteratik ve anyonik olmak üzere iki ana alt birimden oluşmaktadır, bu bölgede kolin bağlayıcı alt birim katyonik ligandlara daha kolay bağlanabilmektedir, anyonik bölgelere bağlanmayı sağlayan kısım ise periferik anyonik bölge olarak adlandırılmaktadır (52). Periferik anyonik bölgenin aktivasyonu veya inaktivasyonu enzimlerin substrat derişimlerine gösterdiği seçiciliği kontrol etmektedir (53).

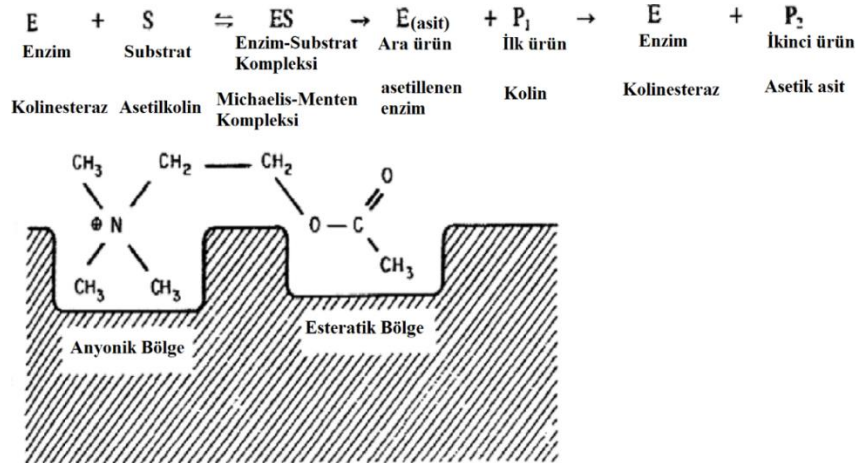
Yüksek substrat konsantrasyonlarında AKE inhibe olurken BKE aktive olmaktadır, BKE'nin periferik anyonik merkezinde yer alan Ala328, Asp70 ve Trp82 amino asitleri substrat aktivasyonu durumundan sorumludurlar (54). BKE'de periferik anyonik bölge ve aktif merkez arasında allosterik etkileşimleri ve BKE'nin substrat aktarımını kontrol eden bir omega “Ω” ilmeği bölgesi bulunmaktadır (55).

Düşük bütirikolinesteraz konsantrasyonlarında, BKE'nin reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir (56).



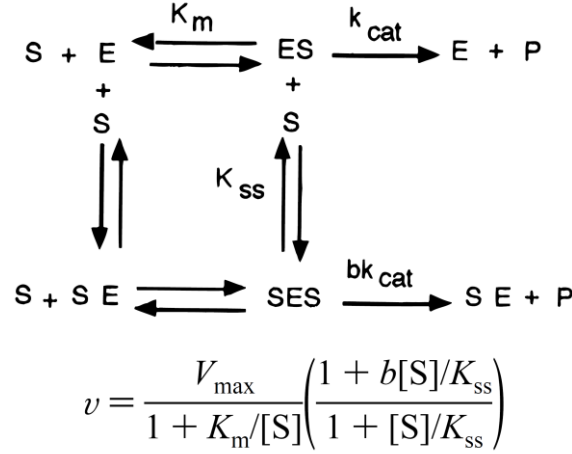
Şekil 2.9. BKE'nin reaksiyon modeli (56).

Asetilkolinesterazın aktif merkezinde yer alan anyonik bölge asetilkoline bağlandığında asetilkolinin yapısında bulunan ester bağı enzimin esteratik bölgesine yaklaşır ve hidroliz sırasında asetil grubunun esteratik bölgedeki serin rezidüsüne bağlanması mümkün olmaktadır (47).



Şekil 2.10. Kolinesterazların substrat hidrolizi (47).

Kolinesterazlarda substrat inhibisyonu ve aktivasyonu görüldüğünden, reaksiyon mekanizması klasik Michaelis-Menten kinetiğine uymaz (2). AKE'nin ATK ile etkileşiminde substrata olan ilgi Haldane kinetiği ile açıklanırken, BKE'nin substratları ile etkileşimi ise Aldrige-Reiner'in açıkladığı şekildedir (105,109) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Kolinesterazların reaksiyon mekanizması (56).

Şekil 2.11.'de açıklanan modelde, substrat iki farklı bölgeye bağlanır ve enzim allosterik davranış gösterir. Şekilde gösterilen S, substratı; E, kolinesterazları; SE, enzim substrat kompleksini; SES, üçlü kompleksi; K_{ss} SE ve SES komplekslerinin disosiyasyon katsayısını, yüksek substrat derişiminde b ise üçlü kompleksin ürüne dönüşebilme verimini, k_{cat} ise enzimin turnover sayısını belirtir. S'nin E'ye ve ES'ye bağlanabildiği durumda b değeri 0 ile 1 arasındaysa substrat inhibisyonundan, b değeri 1'e eşitse Michaelis-Menten davranışından; b değeri 1'den büyük ise substrat aktivasyonundan söz edilir (54,56).

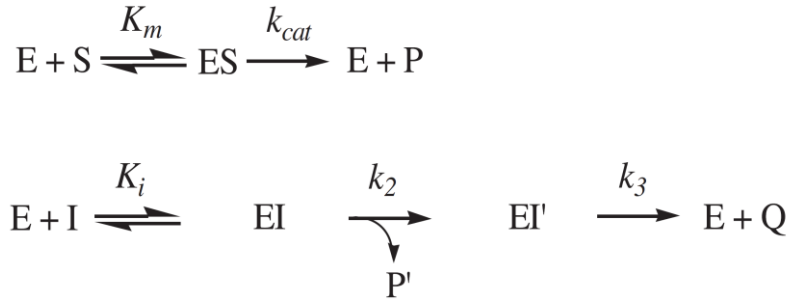
Genellikle yüksek substrat derişimlerinde kolinesterazlar substrat inhibisyonu ve aktivasyonuna yatkın olduğundan, üç fazlı kinetik davranış gösterdikleri bilinmektedir (56). Substratları ile etkileşimleri incelendiğinde AKE'de substrat aktivasyonu gözlenirken, BKE'de substrat inhibisyonu davranışı gözlenir, diğer bir deyişle negatif kooperativite davranışına raslanmaktadır (105). Negatif kooperativite, bir aktif merkeze substrat bağlanmasının enzimde meydana getirdiği konformasyonel değışim sonucunda ikinci substrat molekülüne karşı ikinci aktif merkezin afinitesinin azalması olarak açıklanır (54). Ayrıca Hill grafiğı ile de bu

negatif kooperativite davranışı gösterilebilmektedir. Kolinesterazların periferik anyonik bölgesi ve aktif merkez girintisinde yer alan amino asit rezidülerindeki farklılık, kinetik mekanizmalarını açıklamaktadır (2).

Asetillenen enzimin serbest enzim ve asetik asite hidrolizi çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir, aktif merkez başına saniyede yaklaşık olarak 10000 asetilkolin molekülü hidroliz edilebilmektedir (34,47). Benzer şekilde BKE'nin deaçilasyon hızı açilasyon hızından yavaş olup, substrat difüzyon hızına eşittir (5). Kolinesterazlar, bu özellikleriyle en hızlı enzimlerdir (2).

2.7.2. Kolinesterazların Çeşitli İnhibitörleri ile Tepkime Mekanizmaları

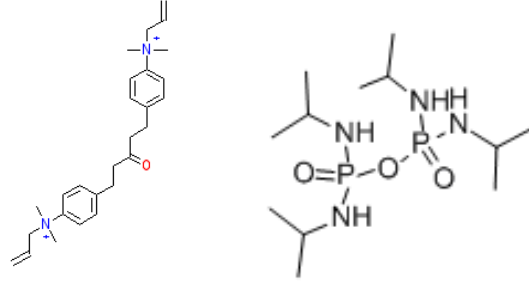
Pek çok aril karbamat kolinesterazları inhibe etmektedir ayrıca BKE için karbamatlar psödo substrat veya inhibitörler olarak tanımlanmaktadır (57). Karbamatların enzimin “katalitik üçlü”na ve bütiril grup bağlayan bölgesi ile etkileşerek inhibe ettiği öne sürülmektedir (58).



Şekil 2.12. Substrat varlığında BKE'nin inhibisyon şeması; E, BKE; S, bütiriltiyokolin; ES, açilenzim ara ürünü, I inhibitör, EI, enzim-inhibitör tetrahedral ara ürünü, EI' karbamoyil enzim ara ürününü, P tiyokolini, P'fenoller gibi bir pseudo substratı, Q karbamik asit gibi bir ikincil ürünü göstermektedir (58).

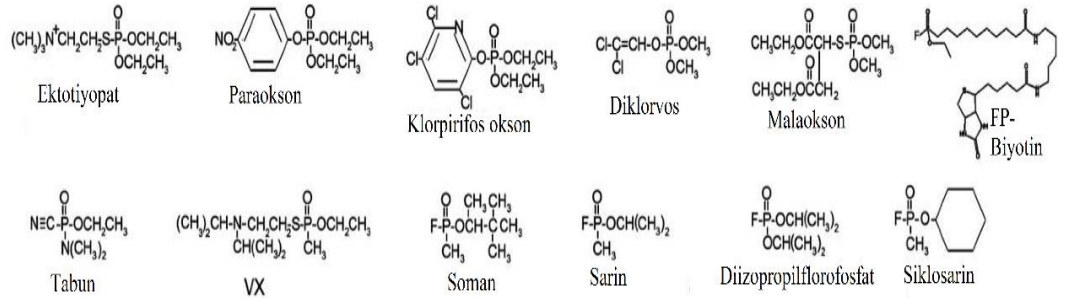
BW284C51 seçici biskuaterner AKE inhibitörüdür, BKE'yi de inhibe etmekle birlikte BKE'ye olan ilgisi AKE'ye oranla 400 kat daha düşüktür (2,54). Kolinesterazların bu substrata olan ilgisi amino uç kısmındaki amino asitlere bağlıdır, AKE'nin amino asit diziliminde 72 ve 124. sırada yer alan amino asitler; tirozin rezidüleridir, BKE'de ise bunların yerini asparajin ve glutamin amino asit rezidüleri

almıştır, bu durum BKE'nin BW284C51 ile yüksek oranda inhibe edilemeyişiini açıklamaktadır (2,59). İso-OMPA, insan serum BKE'nin seçici ve geri dönüşümsüz inhibitörü olan yüksüz yapıda bir alkil fosfattır (2). Yüksek dozlarda bile AKE'nin inhibisyonuna sebep olmamaktadır (60).



Şekil 2.13 BW284C51 ve iso-OMPA'nın molekül yapıları (61,62).

Organofosfatlar kolinesterazların etkili inhibitörleridir (63). Pek çoğu insektisitler, pestisitler ve ilaçlar olarak kullanılmakla birlikte bazı tipleri kimyasal savaş silahlarıdır (64). Kolinesterazların aktif merkezlerinde bulunan Ser 198 rezidüsünü fosforilleyerek veya fosfonilleyerek kademeli olarak inhibisyona yol açmaktadırlar, fosfillenen kolinesterazlar hidrofobik hale geçerek substrat hidrolizi yapamamaktadırlar (65). Ancak oksimler gibi olduça nükleofilik bileşikler tarafından tekrar aktive edilebilmektedirler (66).

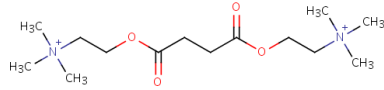


Şekil 2.14. Çeşitli organofosfatların molekül yapıları (7).

Edrofonyum, Dekametonyum ve Propidyum BW284C51'e benzer etki gösteren bis-kuaterner ligandlardır (34,54). Dekametonyum BKE'nin kompetitif inhibitörü iken, AKE için karışık tipte inhibisyon göstermektedir (54). Propidyum ise AKE'nin periferik anyonik bölgesini inhibe ederken aktif bölge ile etkileşemeyen bir ligand olmakla birlikte BKE'nin aktif bölgesine bağlanabilmektedir (54,67).

Takrin, serum BKE'yi ve AKE'yi etkili bir şekilde inhibe edebilen ve bu özelliği sayesinde Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bir bileşiktir (54). Takrin kolinesterazların esteraz ve aril açıl amidaz (AAA) aktivitelerini inhibe etmektedir (68).

Huperzin A, terpenlerin seskuiterpen sınıfından, doğal olarak oluşan bir alkaloiddir ve kolinesterazları inhibe etme özelliklerinden dolayı Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadırlar (68). Kolinesterazların AAA aktivitesini inhibe edici özelliği bulunmaktadır (68,69).



Şekil 2.15 Süksinilkolin , süksametonyum klorür (70).

Süksinilkolin kas sinir iletimini engellemek amaçlı kullanılan bir ligandır, nikotinik asetilkolin reseptörünü yarışmalı olarak inhibe ederek kas gevşemesini sağladığından tıbbi müdahale işlemlerinde anestezi ajanı olarak kullanılır (71,72). Atipik BKE varyantları süksinilkolin ile inhibe olmadığından, süksinilkolin apnesi adı verilen klinik durum ortaya çıkmaktadır (72).

2.8. Kolinesterazların Farklı Aktivite Özellikleri

Asetilkolin salgılanmayan dokularda AKE ve BKE salgılanması oldukça ilginçtir, çeşitli araştırmalar sonucunda AKE ve BKE'nin esteratik aktivitesinden farklı aktiviteleri olduğu gözlenmiştir (16). AKE, Amidaz - peptidaz aktivitesi ile amiloid öncülü proteinleri hidroliz etmektedir (32). Bu aktivite Alzheimer hastalığının

patolojisinde önem kazanmaktadır (68). Ayrıca amidaz ve peptidaz aktivitesi ile BKE ağrı yanıtı iletiminde görev alan P maddesini hidroliz edebildiği bildirilmiştir (73).

Kolinesterazlar sentetik bir substrat olan o-nitroasetanlinid'de bulunan amid bağını kırarak o-nitroanilin ve asetata hidroliz edebilmektedirler, bu aktivite aril açilamidaz aktivitesi (AAA) olarak adlandırılır (74). Serum BKE'nin AAA aktivitesi çeşitli BKE inhibitörleri ve serotonin tarafından inhibe edilirken tiramin tarafından aktive edilmektedir (75). Ayrıca BKE'nin esterez aktivitesindeki azalma AAA aktivitesinde artışa sebep olmaktadır, bunu doğrular şekilde tümörlerde ve demans durumunda miktarı artan BKE'nin AAA aktivitesi yüksek bulunmuştur (75). AKE'nin AAA aktivitesi takrin, fizyostigmin gibi güçlü kolinesteraz inhibitörleri ile inhibe edilebilmektedir. Bu kimyasalların kolinesterazlar üzerinde güçlü terapotik etkileri olduğunu doğrulamakta ve Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabilirliklerini desteklemektedir (76).

2.9. Kolinesterazların Fizyolojik Önemi

AKE tüm kolinerjik bağlantılarda, sinaptik membrana bağlı olarak bulunmaktadır ve sinapslardan salınan asetilkolini hızla hidroliz etmektedir (47,77). Eritrosit membranı üzerinde yer alan ve bir integral membran proteini olarak karakterize edilen eritrosit AKE'nin fizyolojik fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir (78,79).

Kolinesteraz proteinleri ile nöroglinler gibi sinaptik hücre yüzeyi tutunma proteinleri arasında yapısal bir benzerlik söz konusudur, bunun bir sonucu olarak gelişimsel dönemde AKE, hücre-hücre arası etkileşimleri kolaylaştırıcıdır, özellikle AKE'nin laminin-1 ile etkileşmesi integrin reseptörlerini aktive etmektedir (15,19).

BKE ise yapısal olarak AKE'ye benzemekle birlikte AKE'den farklı olarak oldukça çeşitli fizyolojik görevler üstlenmektedir (80). BKE serumda bulunduğu ve karaciğerde sentezlendiği için, beslenme düzeyi, inflamasyon varlığı, nörofizyolojik bozukluklar ve tümör gelişimi gibi pek çok patolojik durumda dokulardaki, özellikle serumdaki düzeyi değişmektedir (81). Total protein ve albümin düzeyleriyle beraber karaciğer sentez kapasitesinin göstergesi olup, pek çok metabolik hastalıkta, tanı koydurucu belirteçlerden biri olarak kullanılmaktadır (82). Kolinesterazlarla ilişkilendirilen hastalıklar başlıca; astım, Myasthenia gravis, Alzheimer hastalığı,

kokain zehirlenmesi, organofosfat zehirlenmeleri, anestezi apne, romatroid artrit ve küçük hücreli akciğer kanseri olarak özetlenebilir (83) .

Sağlıklı kadın ve erkeklerde yapılan araştırmalarda AKE ve BKE seviyelerinin yaş ve beden kitle inteksi (BMI) ile değiştiği bulunmuştur, BMI artışı ve serum BKE düzeyleri yakından ilişkilidir (48). Metabolik sendromda serum BKE aktivitesinde kısa süreli artışlar görülmektedir (83). Serum BKE düzeylerinin kolesterol ve triaçilgliserol düzeyleriyle beraber artıp azalması BKE'yi obezite ve metabolik sendromla bağdaştırmıştır, ayrıca lipid ve glukoz metabolizmasının düzenleyen bazı konjugatların, özellikle statinlerin serum BKE aktivitesini düşürücü etkisi olabileceği bulunmuştur (82). Bu özelliklerinden dolayı metabolik sendrom tedavisinde ve şişmanlıkta yüksek trigliserit düzeylerini dengelemek amacıyla statinlerin kullanılabileceği önerilmiştir (48,82).

Alzheimer hastalığı, bilişsel yeteneklerde bozulma, hafızada azalma ve kişilik değişimleri gibi semptomları olan bir nörodejeneratif rahatsızlıktır (84). Kolinerjik sinir iletiminin bozulması ve beyinde yüksek oranda amiloid β peptidinin sentezlenmesiyle karakterize edilir (83). Alzheimer hastalığında beyinde AKE seviyeleri düşerken BKE seviyelerinde artış olmakta, yüksek kolinesteraz aktivitesinden dolayı asetilkolinesteraz seviyelerinde düşme gözlenmektedir (23,68). Bu hastalığın tedavisinde kolinesteraz inhibitörleri kullanılmakta böylece asetilkolin kontrastasyonu normal seviyelere getirilerek bilişsel ve davranışsal bozukluklar belli bir oranda tedavi edilebilmektedir (85). Plazmadaki yüksek kolesterol seviyeleri, beyinde amiloid β peptit oluşumunu tetikleyebilmektedir, kolesterol düşürücü olarak kullanılan statinlerin de beyindeki kolesterol seviyesini düşürerek ve artan BKE aktivitesini inhibe ederek Alzheimer hastalığından koruyucu olabileceği yeni araştırma konularındandır (86,87).

Felç beyinde belirli bir bölgeyi besleyen kan damarlardaki kan akışının durması sonucu bu bölgedeki hücrelerin hasar görmesiyle oluşur (84). Felç durumunda, özellikle iskemik felçte, beyinde diğer inflamasyon işaretçileriyle beraber, AKE aktivitesi değiştiği çalışmalarda gösterilmiştir, değişen AKE aktivitesi ve diğer inflamatuvar etkiler ve kolinerjik inflamasyon sinyallerini uyarmaktadır (85). Merkezi sinir sisteminde görülen bu değişiklik sonucunda serum aktivitesi normal BKE'ye göre

düşük olan BKE K varyantı sentezi artmaktadır (83). Bu durum diğer inflamasyon belirteçleri ile birlikte göz önüne alındığında, serum BKE düzeyleri inme için tanı koymaya yardımcı ve inme sonrasında hastanın hayatta kalma ihtimalinin tahmini için belirteç olarak değerlendirilebilmektedir (83,88).

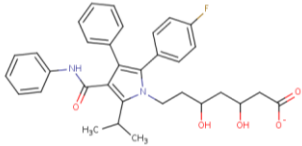
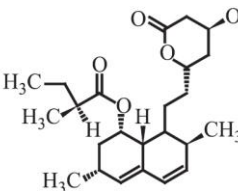
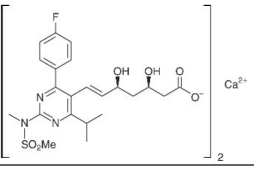
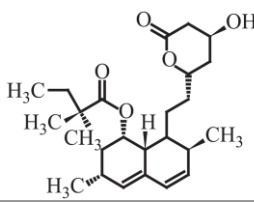
Serum BKE seviyelerinin hasta ve sağlıklı insanlarda yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (72). Serum BKE kardiyovasküler hastalıklarda kritik durumda olmayan hastaların ölüm oranının tahmininde önemli bilgiler sunmakta, bu bağlamda BKE, kardiyovasküler hastalıklar için kolay ulaşılabilir bir işaretçi olabileceği düşünülmektedir (89).

2.10.Statinlerin Genel Özellikleri

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG CoA) redüktaz enziminin inhibe ederek kolesterol sentezini baskılayan, böylece kandaki kolesterol düzeylerini kontrol etmeyi hedefleyen ilaçlardır (85,90). HMG CoA redüktaz, kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı kontrol basamağında bulunan enzimdir ve 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A'yı mevalonata dönüştürmektedir (86). Kandaki kolesterol seviyesinin belirli bir düzeyde tutulabilmesi için mevalonat sentezinin dolayısıyla HMG CoA redüktazın inhibe edilmesi metabolizma açısından oldukça önemlidir (85,86). Piyasada bulunan ve en çok kullanılan statinler arasında atorvastatin, simvastatin, lovastatin ve fluvastatin lipofilik iken pravastatin hidrofilik olarak sınıflandırılmaktadır (91).

Statinlerin bir kısmının BKE'yi inhibe etme özelliğinden daha önceki çalışmalarda söz edilmiştir ancak kinetik sabitleri elde edilmemiş, inhibisyon tipleri daha önce araştırılmamıştır (90). Kolinesterazların statinler ile etkileşimini aydınlatmak amacıyla, bu çalışmada statinlerden atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin kullanılmıştır.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan statinler (70,85).

Statin	Preparat adı	Üretici Firma	Yapısal Formül	Kimyasal Sınıfı	Kan beyin bariyerinden geçişi
Atorvastatin	Lipitor	Pfizer		Difenilpirol	Geçemez
Lovastatin	Mevacor	Merck		Delta valerolakton	Geçebilir
Rosuvastatin	Crestor	AstraZeneca		Fenilpirimidin	Geçemez
Simvastatin	Zocor	Merck		Delta valerolakton	Geçebilir

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

B Rh⁺insan serumu Hacettepe Üniversiteleri Hastaneleri Kan Merkezi'nden temin edilmiştir.

Asetiltiyokolin iyodür (ATK), bütiriltiyokolin iyodür (BTK), propiyoniltiyokolin iyodür (PTK), benzoyilkolin iyodür, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit), 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS), sığır serum albümini (BSA), asetik asit, metanol, akrilamid, N-N' metilen bis-akrilamid, tetrametiletilediamin (TEMED), Dimetil sülfoksit (DMSO), glisin, trizma-baz, hidrokorik asit (HCl) Sigma–Aldrich'den (ABD); insan eritrosit asetilkolinesterazı Sigma- Aldrich'den (ABD); Prokainamid Sefaroz 4B fast flow kolonu GE Healthcare Life Sciences (ABD)'den, Gümüş nitrat (AgNO₃), sodyum hidroksit (NaOH), %95 etanol, sodyum karbonat (Na₂CO₃), amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄, rubenaik asit, bromfenol mavisi, gliserol, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) Merck'den (Almanya); sodyum tiyosülfat (Na₂S₂O₃), sodyum asetat, amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ Analar'dan (İngiltere); potasyum mono hidrojen fosfat (K₂HPO₄) ve sodyum klorür (NaCl) Panreac'dan (İspanya), bakır sülfat (CuSO₄) İlsan İstanbul'dan, Bradford Reaktif kiti, Biorad (ABD)'den temin edilmiştir. Atorvastatin Dr Reddy's Lab (Hindistan), Lovastatin ve Simvastatin, Merck (Almanya), Rosuvastatin MSN Lab (Hindistan)'dan sağlanmıştır.

3.1.2 Aletler

Bu çalışmada spektrofotometrik analizlerde, Shimadzu UV1700, Shimadzu UV mini 1200 model spektrofotometre ve Spectramax M2 mikropilaka okuyucusu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer cihazlar, Mettler Toledo analitik terazisi, Consort pH metre, Gilson pipetler ve pipet uçları, Sorvall RC-5B Superspeed santrifüjü, Gilson peristaltik pompa ve Biorad fraksiyon kollektörleri, Centricon-Milipore Filtre, Biorad mini protean 3 elektroforez kiti ve güç kaynağıdır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Örneklerdeki Protein Miktarının Ölçümü

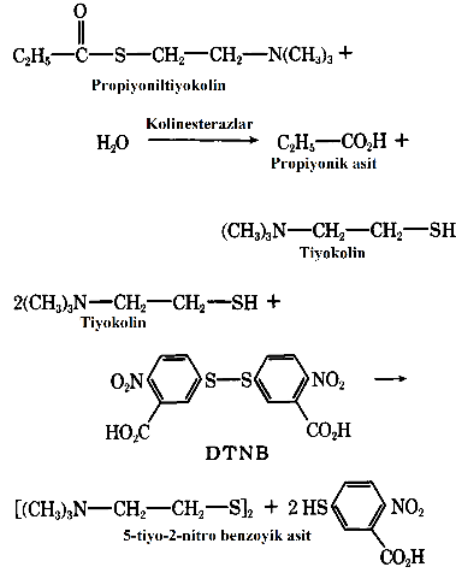
İnsan serum BKE saflaştırma basamakları sırasında elde edilen fraksiyonlarda protein olup olmadığı 280 nm’de gözlenen absorbans değişimleri üzerinden yapıldı. Saflaştırma basamaklarından alınan kademe örneklerinde hem 280 nm’de hem de 260 nm’de absorbans ölçümleri yapılarak Warburg-Christian’ın önermiş olduğu katsayılara göre fraksiyonların içerdiği protein miktarları hesaplandı (92). Ek olarak, Bradford’ un önermiş olduğu Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının seyreltik asit çözeltisinde proteinlere bağlanarak renk değiştirmesi temeline dayanan yöntemi ile protein derişimleri elde edildi (93). Bu iki yöntemle elde edilen sonuçlar birbirini doğrular niteliktedir.

3.2.2. İnhibisyon Çalışmaları

Kinetik çalışmalar için kullanılan statinler uygun çözücülerde çözüldükten sonra çeşitli final konsantrasyonlarda aktivite ortamına eklenerek kinetik veriler elde edildi. Statinlerden Atorvastatin, Simvastatin ve Lovastatin % 50 asetonitrilde (85), Rosuvastatin ise % 1 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren MOPS pH 7.4 tamponunda çözüldü (29). Statinlerin yarı ömürleri fizyolojik ortamda 12 saatten az olduğundan, inhibitör çözeltileri kinetik çalışmalardan hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.2.3. İnsan Serum BKE Aktivitesinin Belirlenmesi

Kolinesteraz aktivitesi Ellman ve arkadaşlarının önermiş olduğu yöntemin temellerine göre uygulanmıştır (94). Ellman yöntemi, substrat olan tiyokolin esterlerinin kolinesterazların etkisi sonucu ortaya çıkması ve bu bileşiklerin Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB’ye bağlanması sonucu oluşan bileşiğin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (94,95).



Şekil 3.1. Ellman reaksiyonu (94).

Çalışmada tiyokolin esterleri olarak asetiltiyokolin (ATK), bütiriltiyokolin (BTK) ve propiyoniltiyokolin (PTK) kullanıldı. Kolinesterazların aktivitesi tiyokolin esterleri ile DTNB'nin indirgenmesi sonucu oluşan sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asit miktarının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile elde edildi. 2-nitro-5-tiyobenzoik asit'in molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon_{412}=1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı (18). Spektrofotometrede 37°C'de 1 dk inkübasyon sonunda, ortama substratın en son eklenmesiyle başlatılan reaksiyonlar 35 sn boyunca izlendi.

Tiyokolin esterlerine ek olarak, Benzoyilkolin (BZK) ile de BKE aktivitesi ölçümü yapıldı. BZK'nın BKE tarafından hidrolizi sonucu açığa çıkan benzoyik asitin absorbansı 240 nm'deki absorbans azalışı üzerinden ölçüldü (91,92). Benzoyik asitin hidrolizinde molar absorbtivite katsayısı $\epsilon_{240}=6700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı (92). Ortam sıcaklığı 37°C'de sabit tutuldu, ölçümler 180 sn boyunca yapıldı ve reaksiyon, ortama enzimin pipetlenmesiyle başlatıldı (91).

Tüm çalışmalar en az üç kez tekrarlandı. İlk hızlar mg enzim proteini başına dakikada oluşan µmol ürün (IU/mg protein) olarak hesaplandı.

Enzim saflaştırma basamakları için kullanılan aktivite ortamı final 100 mM MOPS, pH 7.4 0.25 mM DTNB, 1 mM PTK içerir. Tüm saflaştırma basamaklarının + 4°C'de yapılmasına özen gösterildi.

3.2.4. İnsan Serum BKE Saflaştırma Basamakları

DEAE Trisakril M Anyon Değiştirici Kromatografisi

20 ml hacmindeki insan serumu 5 L hacmindeki 25 mM sodyum asetat pH 5.5'e karşı 17 saat diyaliz edildi, diyalizat 15000xg'de santrifüj edildikten sonra önceden 25 mM sodyum asetat pH 5.5 tamponu ile dengelenmiş olan DEAE Trisakril M (r=1.4 cm, h=5.5 cm, V=33.84 ml) kolonuna 40 ml/saat akış hızında yüklendi. Kolona tutunmayan proteinlerin 25 mM sodyum asetat pH 5.5 ile yıkanarak uzaklaştırılmasının ardından 200 ml hacminde 0-0.5 NaCl içeren 25 mM sodyum asetat pH 5.5 gradiyenti ile 6.7 ml'lik fraksiyonlar halinde örnekler toplandı (96-98). Örneklerdeki protein miktarları 280 nm'de kuvartz küvet kullanılarak ölçüldü (31). Fraksiyonlardaki aktivite ölçümleri Ellman ve arkadaşlarının yönteminde açıklandığı şekilde 412 nm'de yapıldı.

Prokainamid Sefaroz 4B Afinite Kromatografisi

DEAE Trisakril M anyon değiştirici kolonundan elde edilerek birleştirilen örnek, iki kez tampon değiştirilmek suretiyle toplamda 10 L 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 tamponu ile gece boyu diyaliz edildi. Diyalizin ardından örnek önceden 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 ile dengelenmiş olan Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi kolonuna (r=0.9 cm h= 9.4 cm V= 23,91 ml) 20 ml/saat akış hızında yüklendi. Yükleme işlemini takiben, kolona bağlanmayan proteinler 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından kolona 100 ml hacminde lineer 0-1M NaCl, 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 gradiyenti bağlandı ve yaklaşık 3.5 ml hacminde fraksiyonlar alınarak saflaştırma işlemine devam edildi. Örneklerdeki protein miktarları 280 nm'de kuvartz küvet kullanılarak ölçüldü (31). Fraksiyonlardaki aktivite ölçümleri Ellman ve arkadaşlarının yönteminde açıklandığı şekilde 412 nm'de gerçekleştirildi.

3.2.5. Elektroforetik İncelemeler

Natif PAGE yöntemi ile örneklerin incelenmesi

Gümüş boyama işlemi saflaştırma sonrasında, afinite kolonundan ayrılan örneklerdeki saflığının gösterilmesi amacıyla (99), aktivite boyama işlemi ise kolinesterazın yapısı ve etkinliğinin gösterilmesi amacıyla uygulandı (100).

Saflaştırma basamakları boyunca alınan kademe örnekleri ve elde edilen saf enzim numuneleri kuyucuk başına 5 µg protein uygulanarak, % 4 yükleme jeli, % 7 ayırıcı jel kompozisyonuna sahip natif-PAGE (poliakrailamid jel elektroforezi) işlemine tabi tutuldu (101). Elektroforezin ardından elde edilen jellerden biri Blum ve ark.'ın açıkladığı şekilde gümüş boyama yöntemi ile boyandı (99), diğer jel ise Juul ve ark.'ın tarif ettiği şekilde kolinesteraz aktivite boyama basamaklarına göre boyanarak sonuçlar elde edildi (100,102).

3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler

Enzimlere ait IC₅₀ ve diğer kinetik parametrelerin analiz ve hesaplanması sırası ile Graphpad Prism 6.05 (versiyon 2014) ve Systat (versiyon 12, 2011) kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi ile saptandı.

4. BULGULAR

4.1. İnsan Serum BKE'nin İki Basamaklı Kromatografik Yöntem ile Saflaştırılması

Çalışmada kullanılan B Rh⁺ insan serumunda başlangıçta 137 ünite/protein BKE bulunduğu tespit edildi. Asitli diyaliz, DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi ve Prokainamid sefaroze 4B afinite kromatografileri ardından % 10.62 verim ile 13.81 Ünite, 867.9 kez saflaştırılmış insan serum BKE elde edildi.

4.1.1. Asitli Diyaliz

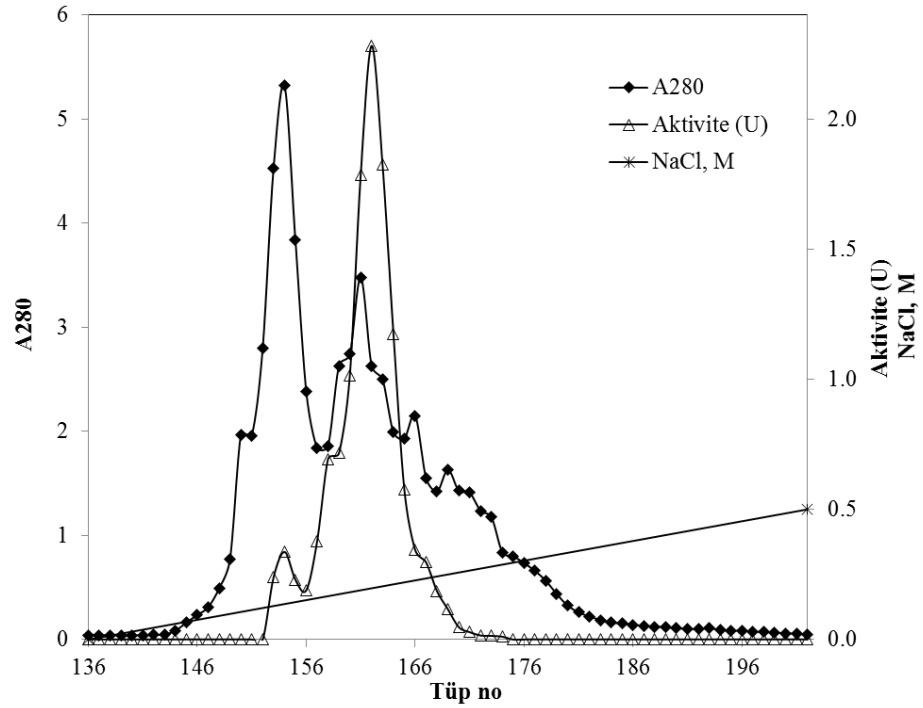
Hacettepe Üniversiteleri Hastaneleri Kan Merkezi'nden alınmış olan B Rh⁺ insan serumu oda sıcaklığında eritildikten sonra 20 mL serum örneği alındı. 20 mL insan serumu 5L hacmindeki 25 mM sodyum asetat pH 5.5 tamponuna karşı 17 saat boyunca diyaliz edildi. Başlangıç BKE aktivitesi 137 ünite olarak hesaplandı.

4.1.2. DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi

DEAE Trisakril M (poli-N-tris[hidroksimetil] metil akrilamid zayıf bazik özellikte anyon değiştirici kromatografi için kullanılan bir reçinedir, 40-80 µm partikül boyutunda olup kapasitesi 320-370 meq/L'dir. Bu çalışmada, DEAE Trisakril M kolonu (r=1.4 cm, h=5.5 cm, V=33.84 ml) yaklaşık 150 ml 25 mM sodyum asetat pH 5.5 tamponu ile dengelendi ve akış hızı 40 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. 21 ml hacmindeki diyalizat 40 ml/saat akış hızında kolona yüklendi ve kolon tutunmayan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 25 mM sodyum asetat pH 5.5 tamponu ile yıkandı. Fraksiyon kollektörü 10 dakikada 1 tüp değiştirecek şekilde ayarlandı ve 6.7 ml hacminde fraksiyonlar alındı. Fraksiyonların 280 nm'de absorbans değerleri ve 412 nm'de kolinesteraz aktiviteleri tarandı. 280 nm'deki absorbans değerleri 0.050'nin altına düştüğünde V=500 ml, 0-0.5 M NaCl 25 mM sodyum asetat pH 5.5 lineer tuz gradiyenti kolona bağlandı.

Δ 412/dk ölçümlerinde final 100 mM MOPS, 0.25 mM DTNB, 1 mM PTK ve 50 µL örnek içeren aktivite ortamının hacmi 1ml'dir. Ölçümler 37°C'de ortama PTK'nın en son eklenmesiyle başlatılıp reaksiyon 35 sn boyunca okunarak Δ 412/dk değerleri elde edildi.

Yükleme, yıkama ve NaCl gradiyenti fraksiyonlarında 280 nm’de protein taraması ve $\Delta 412/\text{dk}$ BKE aktivite ölçümleri yapıldı. Bu ölçümlere göre çizilen elüsyon profili Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi elüsyon profili.

DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi kolonundan 85 Ünite/mg.protein BKE elde edildi.

4.1.3. Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi

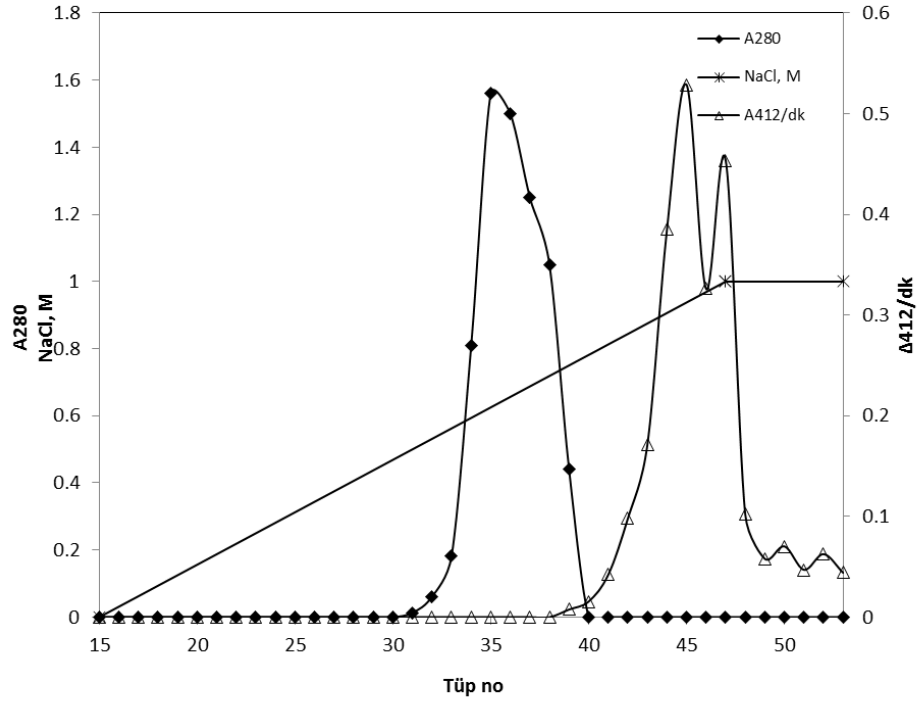
Prokainamid Sefaroz 4B, (4- amino-N-(2-dimetilaminoetil) benzamid) prokainamid ligandı takılı $6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ boyutlarında prokainamid bağlayabilen globüler proteinleri ayırmak için uygun olan bir afinite kolonudur, ortalama partikül boyutu 90 μm olup ligand konsantrasyonu 23 $\mu\text{mol/ml}$ 'dür. Prokainamid farmasötik antiaritmik özellikte bir ajandır, aynı zamanda kolinesterazları geri dönüştürülebilir şekilde inhibe etmektedir.

DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi elüsyon profiline göre yüksek aktivite ve düşük protein düzeylerine sahip örnekler birleştirildi. Bu örneklerin

Prokainamid Sefaroz 4B kolonu ile daha iyi etkileşebilmesi ve kolona tutunabilmesi amacıyla iki kez tampon değiştirilmek suretiyle toplamda 10 L 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 tamponu ile gece boyu diyaliz edildi. Diyalizat önceden 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 tamponu ile dengelenmiş olan Prokainamid Sefaroz 4B ($r=0.9$ cm $h=9.4$ cm $V=23,91$ ml) kolonuna 20 ml/saat akış hızında yüklendi ve kolona tutunmayan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 25 mM potasyum fosfat pH 7.4 tamponu ile yıkandı. Fraksiyon kollektörü 10 dakikada 1 tüp değiştirecek şekilde ayarlandı ve 3.3 ml hacminde fraksiyonlar alındı. Fraksiyonların 280 nm’de absorbens değerleri ve 412 nm’de kolinesteraz aktiviteleri tarandı. 280 nm’deki absorbens değerleri 0.050’nin altına düştüğünde $V=100$ ml, 0-1 M NaCl 25 mM potasyum fosfat pH 7.4, lineer tuz gradiyenti kolona bağlandı.

$\Delta 412/\text{dk}$ ölçümlerinde final 100 mM MOPS, 0.25 mM DTNB, 1 mM PTK ve 50 μL örnek içeren aktivite ortamının hacmi 1ml’dir. Ölçümler 37°C’e ortama PTK’nın en son eklenmesiyle başlatılıp reaksiyon 35 sn boyunca okundu ve $\Delta 412/\text{dk}$ değerleri elde edildi.

Yükleme, yıkama ve NaCl gradiyenti fraksiyonlarında 280 nm’de protein taraması ve $\Delta 412/\text{dk}$ BKE aktivite ölçümleri yapıldı. Bu ölçümlere göre çizilen elüsyon profili şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi elüsyon profili

Saflaştırma sonucunda Prokainamid Sefaroz 4B afinite kolonundan 13.81 Ünite/protein BKE elde edildi.

Tablo 4.1. İnsan Serum BKE saflaştırma basamakları

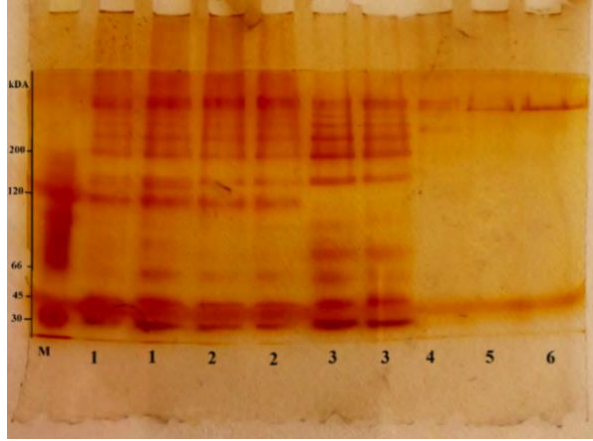
Saflaştırma Basamakları	Total Aktivite (Ü)	Total Protein (mg)	Özgül Aktivite (Ü/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Serum	130.01	1814.32	0.07	100.00	1.00
Asitli Diyaliz (pH 5.5)	102.71	1280.80	0.08	78.99	1.12
DEAE Trisakril M kromatografisi	36.93	30.59	1.20	30.41	10.20
Prokainamid Sefaroz 4BAfinite kromatografisi	13.81	0.22	62.20	10.62	867.93

Elde edilen saf enzimler 4000xg'de konsantre edilerek -20°C'de saklandı.

4.2. İnsan Serum BKE'nin Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi

BKE'nin saflık kontrolü için % 4'lük yükleme jeli, % 7.5'luk ayırıcı jel içeren natif poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez tamponları ve poliakrilamid jeller Laemmli ve arkadaşlarının önerdiği şekilde yapıldı ancak ortama SDS ve redükleyici ajan olarak β -merkapto etanol eklenmedi. (103). Böylece saflaştırma basamakları boyunca alınan kademe örneklerinin protein kompozisyonları natif olarak gözlemlendi. Bu amaçla jellerden bir tanesi gümüş boyama ile boyanırken diğeri kolinesteraza özgü aktivite boyama basamaklarına tabi tutuldu.

Saflaştırılan enzimlerdeki protein derişimleri 0.5 μ g'dan düşük olduğu için tüm kademe örnekleri de buna uygun olarak seyreltildi ve bu denli düşük protein miktarının görülebilir olmasını sağlayan gümüş boyama yöntemi basamakları uygulandı (99).



Şekil. 4.3. Natif BKE- PAGE gümüş boyama.

Jel üzerinde gösterilen örnekler soldan sağa: M molekül ağırlığı belirteci, 1 numaralı kuyular serum örnekleri, 2 numaralı kuyular asitli diyaliz basamağı örnekleri, 3 numaralı kuyular DEAE Tris Acryl M anyon değiştirici kromatografisi örneği; 4, 5, ve 6 numaralı kuyular Prokainamid Sefaroz 4B afinite kromatografisi sonrası elde edilen saf enzim fraksiyonlarıdır.



Şekil 4.4. Natif BKE- PAGE, aktivite boyama.

Jel üzerinde gösterilen örnekler soldan sağa: M molekül ağırlığı belirteci 1 numaralı kuyular serum örnekleri, 2 numaralı kuyu asitli diyaliz basamağı örneği, 3

numaralı kuyu DEAE Trisakril M anyon değiştirici kromatografisi basamağından alınan örnek; 4,5 ve 6 numaralı kuyular Prokainamid Sefaroz 4 B afinite kromatografisiyle elde edilen saf enzim fraksiyonlarıdır, aktivite boyaması görüntüsü de bu bulguyu doğrulamaktadır.

Aktivite boyama işlemi Juul ve arkadaşlarının önerdiği şekilde yapıldı, substrat olarak final 3 mM olacak şekilde PTK kullanıldı (100). Örnekler incelendiğinde serum örneğinin monomer, dimer ve tetramer olmak üzere üç farklı BKE yapısından oluştuğu saptandı Saflaştırma basamakları ilerledikçe sadece tetramer yapıda olan BKE edildi.

4.3. Kinetik Çalışmalar

4.3.1. Kolinesterazların Pozitif Yüklü Substratları ile Kinetiği

Kinetik çalışmalarda elde edilen saf BKE kullanıldı.

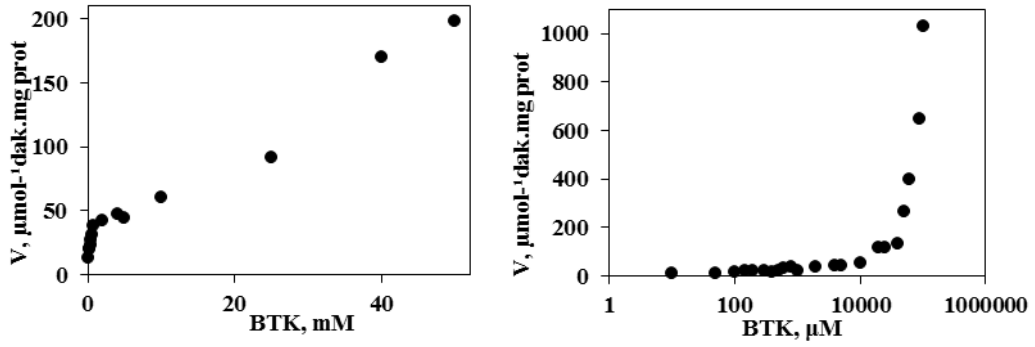
İnsan eritrosit AKE'si 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve % 0.1'lik Triton X 100 içeren 20 mM Tris pH 7.4'de çözöldü.

Tüm ölçömlerde aktivite karışımında final 100 mM MOPS pH 7.4 , 0.25 mM DTNB, 18 µg olacak şekilde BKE veya 15 µg olacak şekilde AKE kullanıldı. Kullanılan substrat derişimleri ATK, BTK ve PTK için 0.01 mM-100 mM, BZK için 5-200 µM arasındaki değerlerdir. Kinetik ölçömlerde, aktivite ortamına eklenen enzimlerin 1 dk boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra ortama substrat eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı ve reaksiyon 35 sn boyunca izlendi.

4.3.1.1 İnsan Serum BKE'nin Pozitif Yüklü Substratlar ile Davranışının İncelenmesi

BTK kinetiği

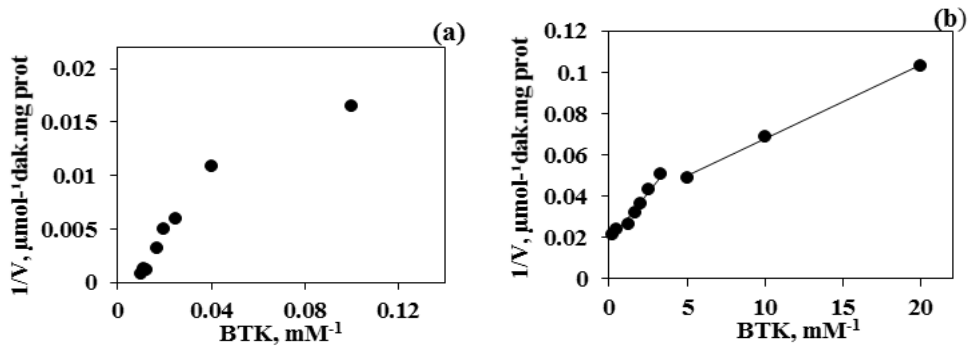
Nihai olarak 0-100 mM BTK, 100 mM MOPS pH 7.4 , 0.25 mM DTNB, 18 µg insan serum BKE'si içeren aktivite karışımında ölçölen ilk hızların, BTK derişimlerine karşı Michaelis-Menten grafiği çizildi (şekil 4.5). Eğrinin hiperbol olmadığı ve insan serum BKE'nin BTK'ye karşı negatif kooperativite gösterdiği saptandı (105) (Tablo 4.3).



Şekil 4.5. BTK derişiminin BKE üzerindeki etkisi

BTK için Systat non-linear regresyon programı ile $K_m = 0.062 \pm 0.037$ mM, $K_{ss} = 1.062 \pm 0.470$ mM, $b = 1.020$, $k_{cat} = 26.567 \pm 8.177 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$, $b k_{cat} = 27.098 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 428.500 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

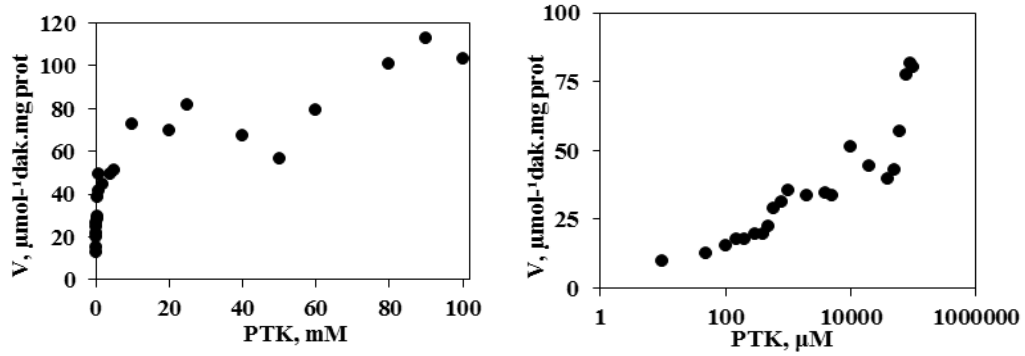
Çalışılan BTK derişimlerinin Lineweaver-Burk grafiğı şekil 4.6'da gösterilmiştir. Lineer bölge kullanılarak V_m değeri $27.850 \pm 2.844 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak.mg prot}$ olarak hesaplandı .



Şekil 4.6. BTK için Lineweaver-Burk grafiğı, (a) 4-100 mM arası derişimleri, (b) Lineer bölgenin BTK derişimlerini kapsamaktadır.

PTK kinetiğı

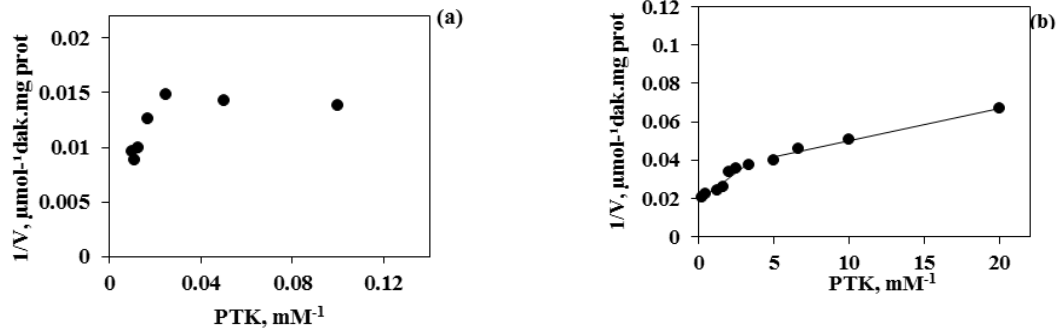
BTK ile aynı deney koşullarında çalışılarak elde edilen PTK verilerine ait Michaelis-Menten grafiğı Şekil 4.7'de görölmektedir. BKE'nin PTK'ye karşı da negatif kooperativite göstermektedir (100) (Tablo 4.3).



Şekil 4.7. PTK derişiminin BKE üzerindeki etkisi.

Systat non-lineer regresyon programı ile PTK'nin $K_m = 0.155 \pm 0.040$ mM, $k_{ss} = 4.530 \pm 0.452$ mM, $b = 7.490 \pm 0.258$, $k_{cat} = 8.175 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ $b k_{cat} = 61.231 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 52.742 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

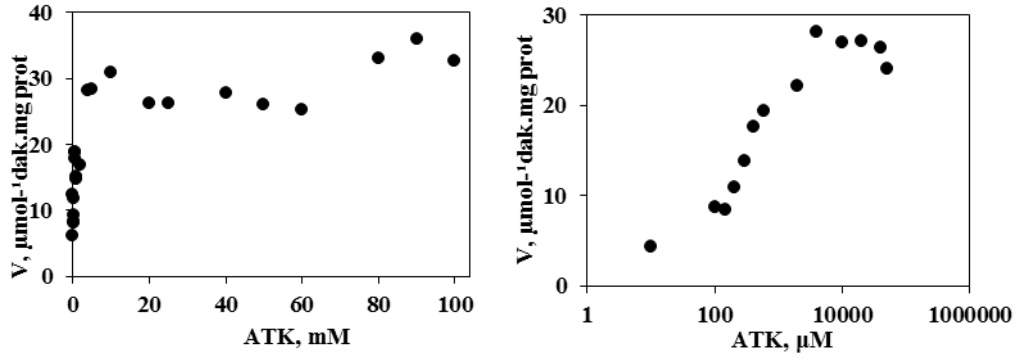
Çalışılan PTK derişimlerinin Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Lineer bölge kullanılarak V_m değeri $46.082 \pm 3.547 \text{ µmol}^{-1} \text{ dak.mg prot}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.8. PTK için Lineweaver-Burk grafiği, (a) 4-100 mM arası derişimleri, (b) Lineer bölgenin PTK derişimlerini kapsamaktadır.

ATK kinetiği

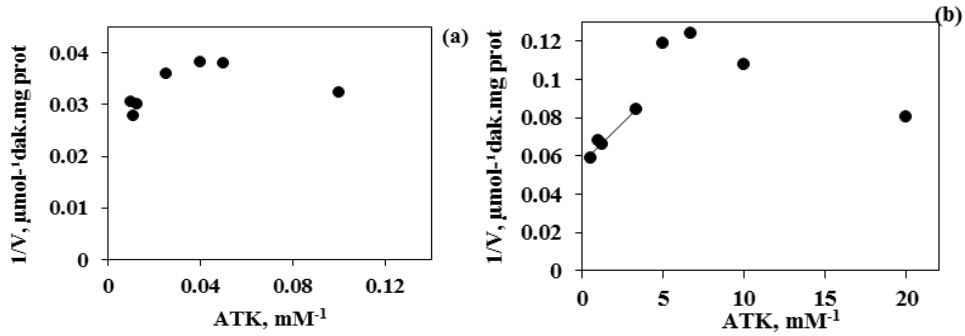
BTK ile aynı deney koşullarında çalışılarak elde edilen ATK verilerine ait Michaelis-Menten grafiği Şekil 4.9'da görülmektedir. BKE'nin ATK'ye karşı da negatif kooperativite göstermektedir (100) (Tablo 4.3).



Şekil 4.9. ATK derişiminin BKE üzerindeki etkisi.

ATK için, Systat non-lineer regresyon programı ile $K_m = 0.216 \pm 0.074$ mM, $k_{ss} = 2.380 \pm 0.394$ mM, $b = 2.122 \pm 0.300$, $k_{cat} = 9.923 \pm 0.705 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $b k_{cat} = 21.057 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 45.940 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

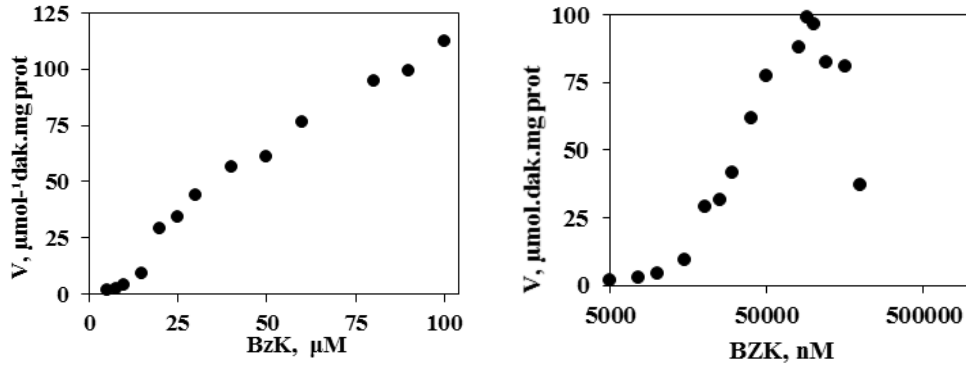
Çalışılan ATK derişimlerinin Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.10'da gösterilmiştir. Lineer bölge kullanılarak V_m değeri $26.336 \pm 2.215 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak.mg prot}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.10. ATK için Lineweaver-Burk grafiği, (a) 4-100 mM arası derişimleri, (b) Lineer bölgenin ATK derişimlerini kapsamaktadır.

BZK kinetiği

Nihai olarak 0-200 µM BZK, 100 mM MOPS pH 7.4, 0.25 mM DTNB, 18 µg insan serum BKE'si içeren aktivite karışımında ölçülen ilk hızların, BZK derişimlerine karşı Michaelis-Menten grafiği çizildi (Şekil 4.11). Eğrinin diğer pozitif yüklü substratlardan farklı olarak hiperbol olduğu gözlemlendi, yüksek BZK derişimlerinde substrat aktivasyonu ve inhibisyonu saptandı (105) (Tablo 4.3).

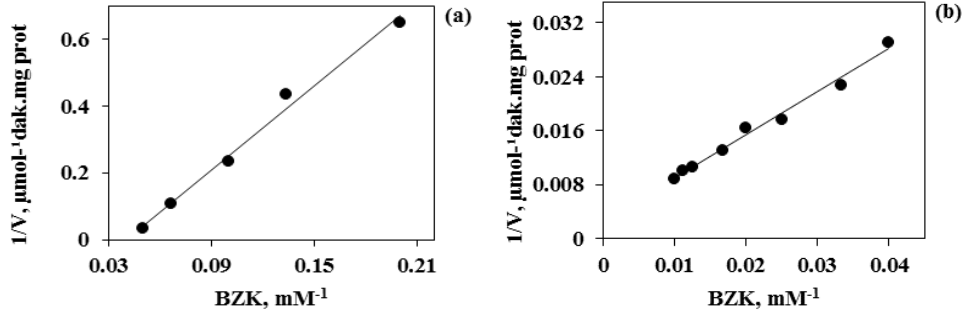


Şekil 4.11. BZK derişiminin BKE üzerindeki etkisi.

Systat non-lineer regresyon programı ile, BZK için $K_m = 0.024 \pm 0.008$ mM,

$b = 10.780 \pm 1.800$, $k_{cat} = 10.562 \pm 1.778 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $bk_{cat} = 113.858 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 0.434 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

Çalışılan BZK derişimlerinin Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.12'de gösterilmiştir. Lineer bölge kullanılarak V_m değeri $118.731 \pm 19.840 \text{ µmol}^{-1} \text{ dak.mg prot}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.12. BZK için Lineweaver-Burk grafiği. (a) 5-20 µM arası BZK derişimlerini, (b) 40-100 µM arası BZK derişimlerini içermektedir.

Substratların BKE ile yatışkın durum kinetikleri, substrat aktivasyonu ve inhibisyonu davranışını açıklayacak şekilde aşağıdaki denklem kullanılarak modellendi (106).

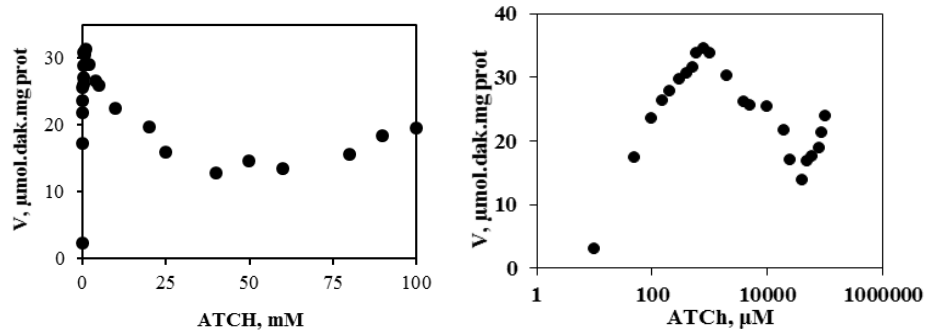
$$V = k_{cat} + (bk_{cat} [S] / K_{ss}) / (1 + K_m / [S])(1 + [S] / K_{ss})$$

Tablo 4.3. BKE'nin farklı substratlarla elde edilen kinetik parametreleri

Substrat	K_m (mM)	K_{ss} (mM)	b	K_{cat} (10^3 min^{-1})	bk_{cat} (10^3 min^{-1})	k_{cat}/k_m ($10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
ATK	0.216 ± 0.074	2.38 ± 0.394	2.122 ± 0.300	9.923 ± 0.705	21.057	45.940
BTK	0.062 ± 0.037	1.062 ± 0.470	1.02	26.567 ± 8.177	27.098	428.500
PTK	0.155 ± 0.040	4.530 ± 0.452	7.49 ± 0.258	8.175	61.231	52.742
BZK	0.024 ± 0.008	-	10.78 ± 1.800	10.562 ± 1.778	113.858	0.434

4.3.1.2 İnsan Eritrosit AKE'nin ATK Kinetiği

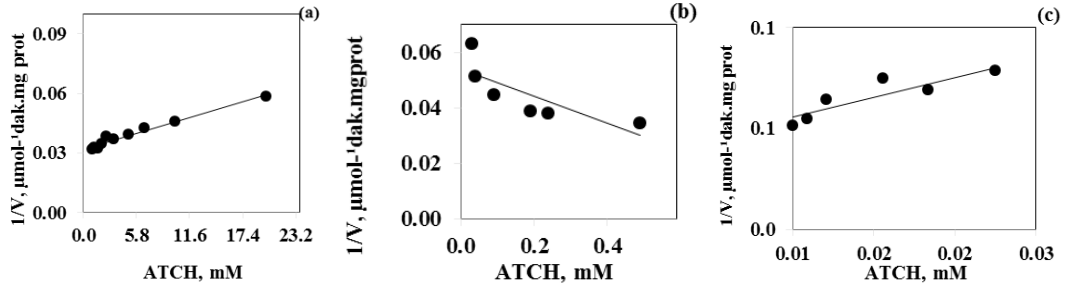
Sonuç olarak 0-100 mM ATK, 100 mM MOPS pH 7.4, 0.25 mM DTNB, 15 μg insan eritrosit AKE'si içeren aktivite karışımında ölçülen ilk hızların, ATK derişimlerine karşı Michaelis-Menten grafiği çizildi (Şekil 4.9). Eğrinin hiperbol olmadığı ve insan eritrosit AKE'nin ATK'ye karşı negatif kooperativite gösterdiği saptandı (105) (Tablo 4.3).



Şekil 4.13. ATK derişiminin AKE üzerindeki etkisi.

ATK için, Systat non-lineer regresyon programı ile $K_m=0.065 \pm 0.016$ mM, $K_{ss}=5.619 \pm 2.539$ mM, $b=0.067 \pm 0.031$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3).

Çalışılan ATK derişimlerinin Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.14'de gösterilmiştir. Lineer bölge kullanılarak V_m değeri $118.731 \pm 19.840 \mu\text{mol}^{-1}.\text{dak.mg}$ prot olarak hesaplandı.



Şekil 4.14. ATK için Lineweaver-Burk grafiği. (a) 0.01-1mM arası ATK derişimlerini, (b) 2-25mM arası , (c) 40-100 mM arası ATK derişimlerini içermektedir.

ATK'nin AKE ile yatışkın durum kinetiği inhibisyonu davranışını açıklayacak şekilde aşağıdaki denklem kullanılarak modellendi (2).

$$V = (v_m / (1 + K_m / S)) * (((1 + b * S) / k_{ss}) / (1 + (S / k_{ss})))$$

Tablo 4.4. AKE'nin ATK ile elde edilen kinetik parametreleri

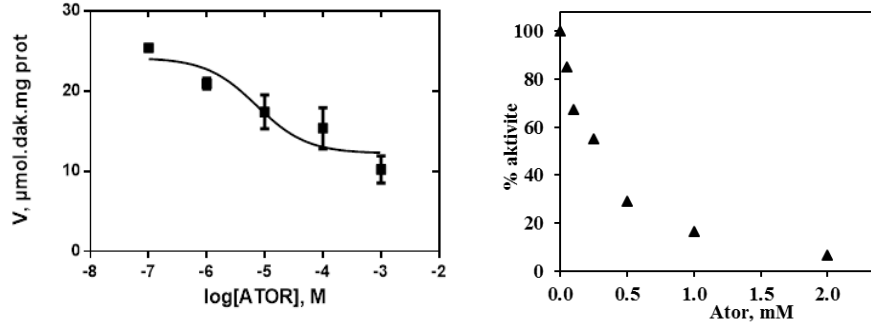
Substrat	K_m (mM)	K_{ss} (mM)	b
ATK	0.065 ± 0.016	5.619 ± 2.539	0.067 ± 0.031

4.3.2. İnsan Serum BKE ile Statinlerin İnhibisyon Kinetikleri

Çalışmada atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin'in BKE aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. İnhibisyon çalışmaları için lineer bölgeye karşılık gelen 0.1-2 mM BTK aralığı seçilmiştir. İnhibitörlere ait IC_{50} çalışmalarında ise BKE için final 1 mM BTK, AKE için 0.5 mM ATK derişimleri kullanılarak sonuçlar elde edildi.

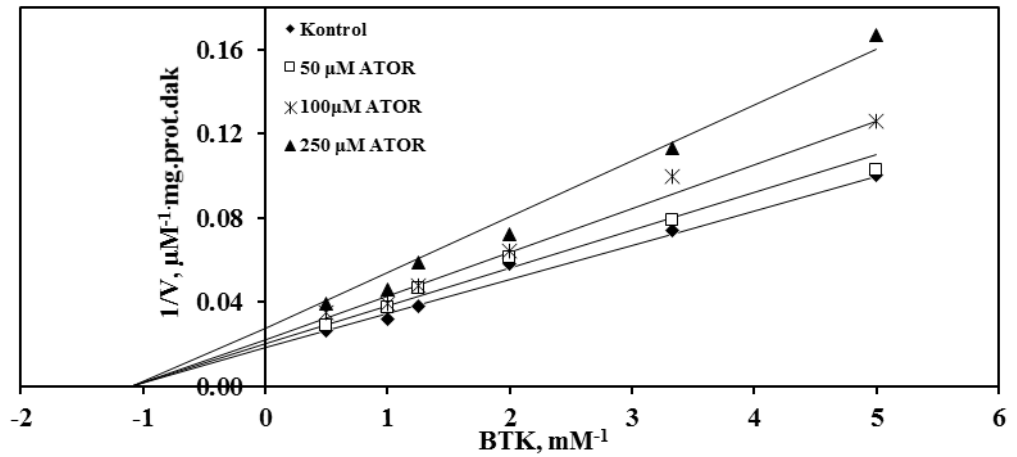
Atorvastatin ile Elde Edilen Kinetik Parametreler

0.0001-2 mM arasındaki atorvastatin'in insan serum BKE'si üzerindeki etkisi araştırıldı. Artan inhibitör derişimlerine karşı hız grafiğı çizildi (Şekil 4.15). Graphpad non-lineer regresyon analizi ile $IC_{50}=7.24 \pm 0.27 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.15. Atorvastatin- BKE, IC_{50} ve % aktivite grafikleri.

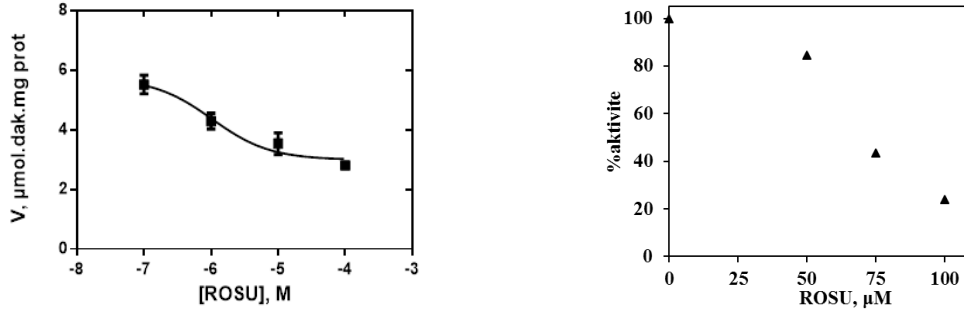
Artan atorvastatin derişimlerine karşı 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1 ve 2 mM BTK derişimlerindeki ilk hız ölçümleri yapıldı, $1/V$ değerlerine karşı $[I]$ derişimleri grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil 4.16). Elde edilen grafiğı göre atorvastatin insan serum BKE'yi non-kompetitif şekilde inhibe ettiğı gözlemlendi. Systat non-lineer regresyon analizi ile, $K_i = 492.54 \pm 55.12$ değeri elde edildi. (Tablo 4.5).



Şekil 4.16. Atorvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiğı.

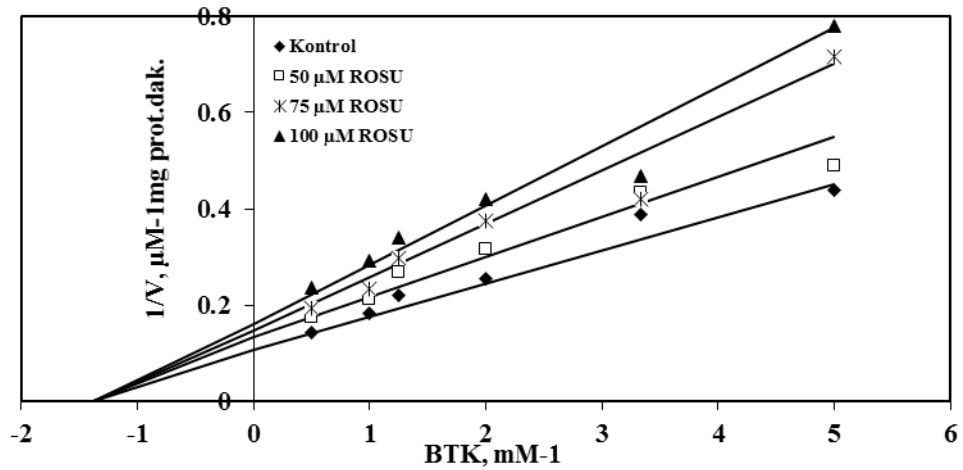
Rosuvastatin ile Elde Edilen Kinetik Parametreler

0.0001-0.1 mM arasındaki rosuvastatin'in insan serum BKE'si üzerindeki etkisi araştırıldı, artan inhibitör derişimlerine karşı hız grafiğı çizildi. (Şekil 4.19) . Non lineer regresyon analizi ile $IC_{50}=1.03 \pm 0.19 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.17. Rosuvastatin-BKE, IC_{50} ve % aktivite grafikleri.

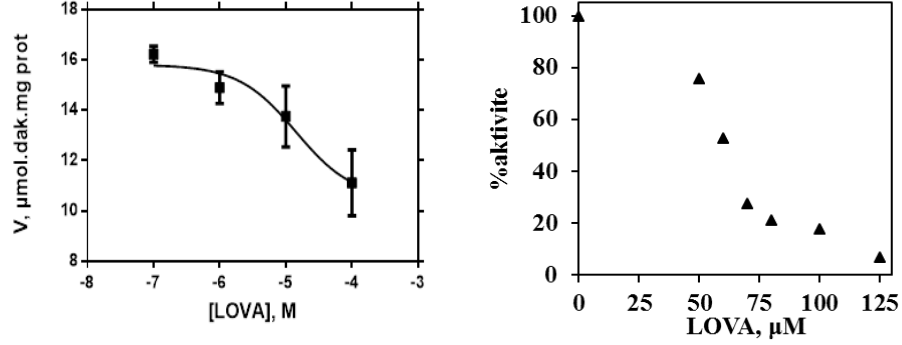
Artan rosuvastatin derişimlerine karşı 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1 ve 2 mM BTK derişimlerindeki ilk hız ölçümleri yapıldı, $1/V$ değerlerine karşı $[I]$ derişimleri grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil 4.20). Elde edilen grafiğı göre rosuvastatinin insan serum BKE'yi non-kompetitif şekilde inhibe ettiğı gözlemlendi. Non-lineer regresyon analizi ile $K_i = 194.68 \pm 55.24 \mu M$ olarak hesaplandı (Tablo 4.5).



Şekil 4.18. Rosuvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiğı.

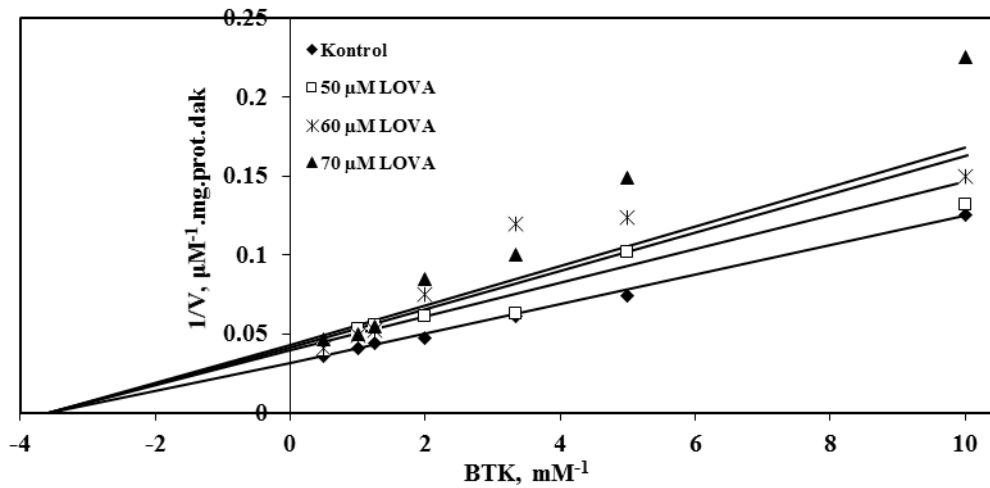
Lovastatin ile Elde Edilen Kinetik Parametreler

0.0001-0.2 mM arasındaki lovastatin'in insan serum BKE'si üzerindeki etkisi araştırıldı, artan inhibitör derişimlerine karşı hız grafiğı çizildi (Şekil 4.17). Non lineer regresyon analizi ile $IC_{50}=14.20 \pm 0.30 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.19. Lovastatin-BKE, IC_{50} ve % aktivite grafikleri.

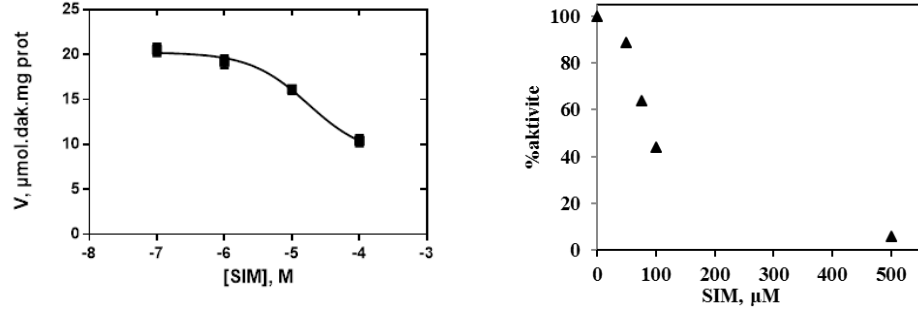
Artan lovastatin derişimlerine karşı 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1 ve 2 mM BTK derişimlerindeki ilk hız ölçümleri yapıldı, $1/V$ değerlerine karşı $[I]$ derişimleri grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil 4.18). Elde edilen grafiğı göre lovastatin insan serum BKE'yi non-kompetetif şekilde inhibe ettiğı gözlemlendi. Non-lineer regresyon analizi ile, $K_i = 198.65 \pm 27.18 \mu M$ olarak hesaplandı (Tablo 4.5).



Şekil 4.20. Lovastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiğı.

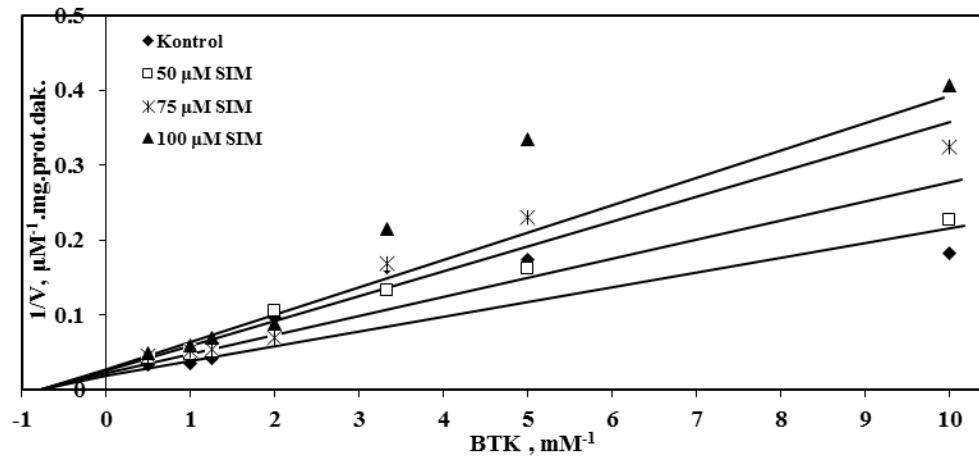
Simvastatin ile Elde Edilen Kinetik Parametreler

0.0001-1 mM arasındaki simvastatin'in insan serum BKE'si üzerindeki etkisi araştırıldı, artan inhibitör derişimlerine karşı hız grafiğı çizildi (Şekil 4.21). Non-lineer regresyon analizi ile $IC_{50} = 17.60 \pm 0.09 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.21. Simvastatin-BKE, IC_{50} ve % aktivite grafikleri.

Artan simvastatin derişimlerine karşı 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1 ve 2 mM BTK derişimlerindeki ilk hız ölçümleri yapıldı, $1/V$ değerlerine karşı $[I]$ derişimleri grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil 4.22). Elde edilen grafiğı göre simvastatin insan serum BKE'yi non-kompetitif şekilde inhibe ettiğı gözlemlendi. Non-lineer regresyon analizi ile, $K_i = 228.91 \pm 43.78$ olarak hesaplandı. (Tablo 4.5)



Şekil 4.22. Simvastatin-BKE, Lineweaver-Burk grafiğı.

Statinlere ait IC_{50} değerleri Graphpad Prism 6.05 (2014), K_i değerleri Systat (versiyon 12, 2011) non lineer regresyon analizi programı ile hesaplanıp ve Tablo 4.5’de gösterildi.

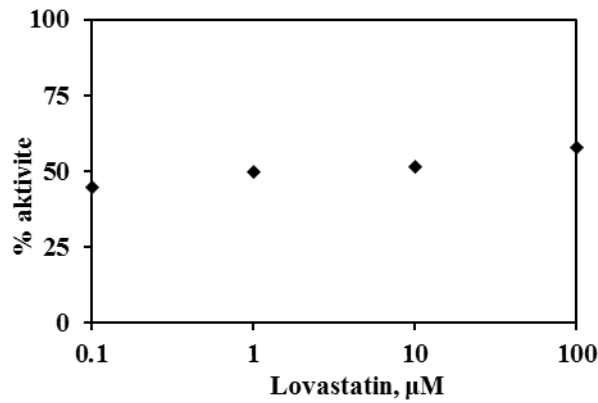
Tablo 4.5. Statinlerin BKE ile IC_{50} k_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	IC_{50} , μM	K_i , μM	İnhibisyon tipi
Simvastatin	17.60 ± 0.09	228.91 ± 43.78	Non-kompetitif
Lovastatin	14.20 ± 0.30	198.65 ± 27.18	Non-kompetitif
Atorvastatin	7.24 ± 0.27	492.54 ± 55.12	Non-kompetitif
Rosuvastatin	1.03 ± 0.19	194.68 ± 55.24	Non-kompetitif

4.3.3. İnsan Eritrosit AKE ile Statinlerin İnhibisyon Kinetikleri

Atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin 0.0001-0.1 mM derişimlerinde hazırlandı ve insan eritrosit AKE aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. Atorvastatin, rosuvastatin ve simvastatin derişimlerinin enzimin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı bulundu.

Yalnız 1 μM lovastatin derişiminde AKE’nin aktivitesinde yaklaşık %50 oranında düşme gözlemlendi. Bu % 50 inhibisyon etkisinin artan lovastatin derişimlerinde de aynı şekilde devam ettiği görüldü.



Şekil 4.23. Lovastatin-AKE % aktivite grafiği.

TARTIŞMA

Serum kolinesterazları, dolaşımdaki toksik bileşikleri detoksifiye edebilme özellikleri ile tanınırlar ancak BKE'nin fizyolojik rolü tümüyle açıklanabilmiş değildir (19). BKE pek çok bileşiği geri dönüştürücü ve detoksifiye edici bir enzim olarak tanımlanmaktadır ve farmakolojik açıdan önem taşımaktadır (6).

Yaptığımız çalışmada, insan serum BKE'si ve eritrosit AKE'si tiyollü substratlar ile Michaelis-Menten kinetiğine uygunluk göstermedi. Davranışların daha çok negatif kooperativite olarak adlandırılan ve substrat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte substrata olan ilginin değiştiği bir duruma uyduğu gözlemlendi. (105). BKE'nin negatif kooperativite gösteren allosterik bir enzim oluşu, yüksek ve düşük substrat derişimlerinde Lineweaver-Burk doğrularının lineerlikten sapması ile de açıklanmaktadır (şekil 4.5) Daha önce yapılan çalışmalar ile Kolinesterazların tepkime mekanizmalarını açıklayan yaklaşımlar açıklanmıştır, bu mekanizmalardan bölüm 2.7.'de bahsedilmiştir. Yüksek substrat derişimlerindeki enzimin enzim substrat kompleksi oluşturma efektifliği katsayısı (b değeri), substratın açıl grubu arttıkça büyür, bu değerin 1'den büyük olması BKE'nin pozitif yüklü substratlar negatif kooperativite davranışı gösterdiğine işaret etmektedir.

Tablo 4.3'te verilen K_m değerleri incelendiğinde insan serum BKE'sinin substratlarına olan afinitesinin açıl grubun zincir uzunluğu arttıkça $ATK < PTK < BTK$ yönünde arttığı görülür. İnsan serum BKE, pozitif yüklü diğer bir substrat olan BZK ile sigmoidal bir davranış göstermiştir. Bu davranış Hill grafiği ile daha açık bir şekilde gösterilebilir.

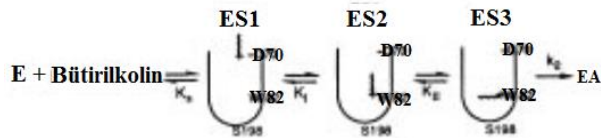
Kolinesterazların aktif merkezinin yer aldığı girinti 20 Å derinliğindedir. (41). Aktif merkez girintisini oluşturan amino asitler AKE'de aromatik yapıda, BKE'de ise alifatiktir (6,59). Kolinesterazlarda, periferik anyonik ve esteratik bölgelere ait aspartik asit ve triptofan her iki kolinesterazda da korunmuştur. AKE'de Asp72. ve Trp84. pozisyonda iken BKE'de Asp70 ve Trp 82. konumundadır. (55-58). Kolinesterazlarda, Asp70 karşısında bulunan Tyr332 arasında hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu bağ hareketli omega "Ω" ilmeğinde yer alan Cys65 ve Cys92 ile etkileşir. AKE'de pozitif yüklü substratlar periferik anyonik bölgedeki Trp279, Tyr70 ve Tyr121' bağlanma eğilimi göstermektedir, ayrıca AKE'de Tyr341 aktif merkez yüzeyinden katalitik

merkeze substrat iletimini sağlamaktadır. Kolinesterazların aktif merkezinde yer alan tirozin kalıntıları yapılarında bulunan hidroksil gruplarının da etkisiyle substrat veya inhibitörlerle katyon π etkisi ile enzim ile oluşturulan kompleks kararlı bir yapı kazanmaktadır (55-58,107).

Memelilerin AKE'sinde pozitif yüklü substratlarının açıl gruplarının esteratik bölgesine komşu açıl bağlayan cebe yerleşmesini kısıtlayan Phe 298 ve Phe 290 yerine BKE'de bu amino asitlerin sırasıyla Leu ve Val olması nedeniyle uzun açıl gruplu kolin esterlerine afinitesinin daha fazla olduğu ileri sürülmektedir (2,5,56).

Bu çalışmada bulguların substrat sıralaması da açıl grubu daha büyük olan substratlara olan BKE afinitesinin arttığını doğrulamaktadır.

Kinetik çalışmalarda kullanılan pozitif yüklü substratlar, öncelikle BKE'deki Asp70'e bağlanarak enzim substrat kompleksini oluştururlar. Bu bağlanma konformasyon değişikliğine neden olarak, bağlı substratın kolin bağlayıcı bölgedeki Trp82 ile etkileşime geçmesine sebep olur. Açıl bağlayıcı bölgede tutulan substratın ester bağı 'katalitik üçlü' Ser198, His438 ve Glu325 tarafından hidroliz edilir (41,56). Bu üçlünden His438'in imidazol halkası, Glu325 ve Ser198'e elektron aktararak Ser198'in $-OH$ grubunu nükleofil kılarak, substratların açıl gruplarına atak yapabilecek şekilde aktifleştirir (56). Kolinesterazların substrat hidrolizini açıklayan bu işlem, yük aktarımı sistemi olarak da adlandırılır (56-58).



Şekil 5.1 Kolinesterazların tepkime mekanizması, şekilde bütirilkolin ile ES kompleksi oluşturan BKE'nin aktif merkez girintisi şematize edilmiştir (41).

BKE için, Tablo 4.5 'te verilen IC_{50} değerleri incelendiğinde $ROSU < ATOR < LOVA < SIM$ olarak sıralanır. K_i değerleri ise incelendiğinde $ROSU < LOVA < SIM < ATOR$ yönünde artar. Çalışmada kullanılan Statinlerin tümü non-kompetitif inhibitör davranışı göstermiştir ve aralarından rosuvastatin en etkili inhibitör olarak bulunmuştur.

Simvastatin ve lovastatin yapısında bulunan lakton halkasının BKE'yi inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (85). Lovastatin, simvastatine oranla daha küçüktür, merkezdeki heksahidro naftalen çekirdeği her ikisinde de piran halkası ve butanoik asit kökü ile ilişkilidir. Ancak lovastatinde metil-bütanoik asit bulunurken simvastatinde ise dimetilbutanoik asit yer almaktadır. Naftalen kökünü bütanoik asite bağlayan ester bağı lakton halkası oluşturacak niteliktedir, bu lakton halkası katyon- π etkileşimi kurmak için zemin hazırlar. Lakton halkası oluşumuna daha yatkın olduğundan lovastatin, simvastatine oranla daha etkili bir BKE inhibitörüdür.

Ayrıca, lovastatin ve simvastatin yapısında yer alan naftalen halkası Bodur ve ark. tarafından araştırılan Benaktizin ve Drofenin adlı bileşiklere benzer şekilde iki adet fenil halkasından oluşur (6). Bu halka moleküllere hidrofobik özellik verir; simvastatin de lovastatinden bir metil grubu fazla içermesi ile daha hidrofobik bir bileşiktir. Enzimin hidrofobik boyun kısmı ile etkileşen bu iki bileşiğin bulunduğu ortamda, sterik etkileşimden dolayı substrat hidrolizi yavaşlar. Simvastatin ve lovastatin'e ait Lineweaver-Burk sonuçları grafiklendiğinde uyumsuz çıktığından bu çalışmalar daha sonra tekrarlanacaktır.

Atorvastatin ve rosuvastatinin kolinesterazlarla etkileşim mekanizmaları bu güne kadar araştırılmamıştır. BKE aktif merkezinde, atorvastatin'in pirol halkası, florofenil ve fenil grupları, periferik anyonik bölgedeki tirozinler gibi aromatik halkalı rezidüleri, açıl bölgesindeki Trp82'ye non kovalent etkileşimlerde bulunabilir.

BKE için rosuvastatin ile en düşük K_i ve IC_{50} değerleri elde edilmiştir. Rosuvastatinin florofenil ucundaki flor, metilmetan sülfonamid yapısındaki kükürt, pirimidin yapısında bulunan azot grupları BKE'nin aktif merkezindeki amino asitlerle özellikle periferik anyonik site veya omega " Ω " ilmeğinde bulunan amino asitlerle katyon π etkileşimine girmiş olabilirler. Ayrıca rosuvastatinin florofenil ucu, periferik anyonik sitede bulunan tirozin veya aspartat ile özgül olmayan etkileşimlere girerek inhibisyona sebep olabilir. Çalışmada rosuvastatinin % 1 DMSO'da çözölmüş olması da rosuvastatin-BKE etkileşimlerini kolaylaştırıcı etkisi olabilir, çünkü DMSO'nun BKE üzerinde inhibitör etkisi yoktur.

Atorvastatin ve rosuvastatinin yapıları incelendiğinde daha önce Bodur ve ark. tarafından araştırılan klorojenik asit ile benzer yapılar içerir (108). Klorojenik asite

benzer şekilde atorvastatin ve rosuvastatin de non-kompetitif inhibitörler olarak saptanmıştır.

Statinlerden yalnızca lovastatinin AKE üzerinde % 50 sabit inhibisyona yol açtığı gözlemlendi. Bu durum AKE aktif merkez girintisinde yer alan fenilalanin rezidüleri ile lovastatin arasında katyon π etkileşimlerinin yanı sıra, kovalent bağlanmanın da olabileceğini düşündürür. Sonuç olarak, statinlerin AKE substratı olması da olasıdır. Daha ayrıntılı etkileşimler progresif inhibisyon çalışmaları ve moleküler *docking* modellemeleri ile açıklanacaktır.

Statinlerin en büyükten en küçüğe doğru moleküler ağırlıkları sıralandığında LOVA < SIM < ROSU < ATOR sıralaması elde edilir. Buna göre en büyük moleküler ağırlığa sahip statinlerden olan rosuvastatinin aktif merkez girintisi büyük olan BKE'yi inhibe edebilir olması beklenmektedir, bu bulguyu doğrular şekilde en düşük ağırlıkta ve en küçük moleküler yapıda olan lovastatin AKE'yi inhibe etmiştir. Lovastatin, yapısının küçük oluşu ile aktif merkez girintisi hacmi küçük olan AKE'nin periferik anyonik bölgesine pozitif yüklü bir substrat gibi bağlanan bütanoik asit bölgesi ile % 50 inhibisyon etkisini sağlayabildiği söylenebilir.

Statinler, iskemi, kalp krizi, ve metabolik sendrom gibi rahatsızlıkların tanı ve tedavisinde kullanılır. Kolinesterazların da son dönemde lipit metabolizmasıyla ilişkili rolleri olduğuna dair bulgulara artmaktadır. Metabolik sendromda BKE aktivitesinde düzensiz olarak artma görülürken, iskemi ve kalp krizinde BKE aktivitesindeki artışın kolinerjik sinir iletimini ve ilişkili inflamasyon belirteçlerini uyardığı bildirilmiştir (83,104). Ayrıca iskemi, kalp krizi, ve metabolik sendrom gibi hastalıklarda kolinesteraz aktivitelerinde değişkenlik gözlenmektedir. Kolinesterazlar çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda seviyesi değişen ve hastalık seyrinin belirlenmesinde ve tedavisinde belirteç olarak kullanılan enzimlerdir (91). Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri seçici değildir. Statinler MSS'de HMG-CoA reduktazı inhibe edip kolesterol seviyelerini düzenleyerek amiloid plak oluşumunu baskırlar. Amiloid plak oluşumunu kontrol altına alınmasıyla beraber kolinesteraz inhibisyonu gerçekleşmesi, nörodejeneratif hastalıklardaki asetilkolin yetersizliğini ortadan kaldırabilir. Bu nedenle, Statin/kolinesteraz inhibisyon mekanizmasının

açıklanması nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisinde klinik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, statinlerin inhibisyon tipleri araştırıldı ancak zamana bağımlı progresif inhibisyon çalışması, farklı pH'larda enzim-inhibitör etkileşimlerinin incelenmesi ve aktif merkeze bağlanma konumunun belirlenmesi yapılmadı. BKE'nin statinler ile inhibisyon mekanizmasını açıklamak için bu çalışmaların yapılması gerekmektedir. BKE üzerinde çalışılan tüm statinlerin non-kompetitif inhibisyon gösterdiği bulundu. BKE aktif merkezinde statinler ile etkileşen amino asit rezidülerinin aydınlatılması bundan sonra yapılacak çalışmalar açısından önemlidir. Bu amaçla moleküler *docking* çalışmaları ile elde edilen kinetik bulgular desteklenmelidir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. BKE, insan serumundan 867.93 kez saflaştırıldı. BKE'nin saflığı Natif PAGE gümüş ve aktivite boyama yöntemleri ile doğrulandı.
2. İnsan serum BKE'nin BTK ile $K_m = 0.062 \pm 0.037$ mM, $K_{ss} = 1.062 \pm 0.470$ mM, $b = 1.020$, $k_{cat} = 26.567 \pm 8.177 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $bk_{cat} = 27.098 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 428.500 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \text{d}^{-1}$ değerleri Systat non-lineer regresyon analizi programı ile bulundu.
3. İnsan serum BKE'nin PTK için $K_m = 0.155 \pm 0.040$ mM, $k_{ss} = 4.530 \pm 0.452$ mM, $b = 7.490 \pm 0.258$, $k_{cat} = 8.175 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $bk_{cat} = 61.231 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 52.742 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \text{d}^{-1}$ sonuçları Systat non-lineer regresyon analizi programı ile hesaplandı.
4. İnsan serum BKE'nin ATK ile $K_m = 0.216 \pm 0.074$ mM, $k_{ss} = 2.380 \pm 0.394$ mM, $b = 2.122 \pm 0.300$, $k_{cat} = 9.923 \pm 0.705 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $bk_{cat} = 21.057 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 45.940 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \text{d}^{-1}$ değerleri Systat non-lineer regresyon analizi programı ile hesaplandı.
5. İnsan serum BKE'nin BZK için $K_m = 0.024 \pm 0.008$ mM, $b = 10.780 \pm 1.800$, $k_{cat} = 10.562 \pm 1.778 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $bk_{cat} = 113.858 \times 10^{-3} \text{d}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 0.434 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \text{d}^{-1}$ sonuçları Systat non-lineer regresyon analizi programı ile bulundu.
6. İnsan serum BKE'nin BTK için $V_m = 27.850 \pm 2.844 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak} \cdot \text{mg prot}$, PTK için $V_m = 46.082 \pm 3.547 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak} \cdot \text{mg prot}$, ATK için $V_m = 26.336 \pm 2.215 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak} \cdot \text{mg prot}$, BZK için $V_m = 118.731 \pm 19.840 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dak} \cdot \text{mg}$ olarak hesaplandı.
7. İnsan eritrosit AKE'nin ATK için K_m değeri 0.065 ± 0.016 mM olarak hesaplandı.
8. Graphpad non-lineer regresyon analizi programı ile atorvastatin için $IC_{50} = 7.24 \pm 0.27 \mu\text{M}$, rosuvastatin için $IC_{50} = 1.03 \pm 0.19 \mu\text{M}$, lovastatin için $IC_{50} = 14.20 \pm 0.30 \mu\text{M}$, ve simvastatin için $IC_{50} = 17.60 \pm 0.09 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.
9. Systat non-lineer regresyon analizi programı ile atorvastatin, lovastatin, rosuvastatin ve simvastatin BKE'nin non-kompetitif inhibitörleri olduğu bulundu. Atorvastatin için $K_i = 492.54 \pm 55.12 \mu\text{M}$, rosuvastatin için $K_i = 194.68 \pm 55.24 \mu\text{M}$,

lovastatin için $K_i = 198.65 \pm 27.18 \mu\text{M}$, , simvastatin için $K_i = 228.91 \pm 43.78 \mu\text{M}$ değerleri hesaplandı.

10. İleride, kolinesterazların statinlerle etkileşim mekanizmasını aydınlatmak adına farklı pH'larda enzim-inhibitör-substrat etkileşimleri araştırılmalıdır. Yapılan kinetik çalışmalar farklı grafiklenme yöntemleri ile gösterilmeli, ve böylece inhibisyon mekanizmaları hakkında daha geniş fikir edinilmesi sağlanmalıdır.

11. Statinlerin kolinesterazlar üzerindeki inhibisyon mekanizması, en güncel araştırma yöntemlerinden biri olan moleküler *docking* analizi yöntemleri ile analiz edilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1.Yıldız, Ö., Bodur, E., Çokuğraş, A.N.,Özer, N. (2004) The effects of some anti-tumoral drugs on rat intestinal butyrylcholinesterase. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem]*, 29 (4), 286-289.
- 2.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.
- 3.Bodur, E., Yildiz, O., Ozer, N., Cokugras, A.N. (2008) Steady-State Kinetics of Rat Intestinal Butyrylcholinesterase., *Turkish Journal of Biochemistry*,33 (2), 41-44.
- 4.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.
- 5.Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E.,Vallette, F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31-91.
- 6.Bodur, E., Neşe Çokuğraş, A.,Tezcan, E.F. (2001) Inhibition Effects of Benactyzine and Drofenine on Human Serum Butyrylcholinesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386 (1), 25-29.
- 7.Masson, P.,Lockridge, O. (2010) Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, 494 (2), 107-120.
- 8.Augustinsson, K.B. (1971) Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bull World Health Organ*, 44 (1-3), 81-89.
- 9.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.
10. 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.
 11. Soreq, H., Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
 12. Malfitano, A.M., Marasco, G., Proto, M.C., Laezza, C., Gazzero, P., Bifulco, M. (2014) Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacological Research*, 88 (0), 74-83.
 13. Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C. (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (2), 131-138.
 14. Pisanti, S., Picardi, P., Ciaglia, E., D'Alessandro, A., Bifulco, M. (2014) Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacological Research*, 88 (0), 84-98.
 15. Soreq, H. (2008) Introduction: cholinesterases, from molecular complexity to non-hydrolytic functions. *FEBS J*, 275 (4), 603.
 16. Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (3), 625-634.
 17. Brown, S.S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., Woronick, C.L. (1981) The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv Clin Chem*, 22, 1-123.
 18. La Du, B.N., Dewald, B. (1970) Genetic regulation of plasma cholinesterase in man. *Adv Enzyme Regul*, 9, 317-332.
 19. Layer, P.G., Allebrandt, K., Andermann, P., Bodur, E., Boopathy, R., Bytyqi, A.H. ve diğerleri. (2005) On the multifunctionality of cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 157-158, 37-41.
 20. Lockridge, O. (1990) Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther*, 47 (1), 35-60.
 21. Brown, D.A. (2006) Acetylcholine. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S120-126.

22. Alles, G.A., Hawes, R.C. (1940) Cholinesterases in the blood of man. *Journal of biological chemistry*, 133 (2), 375-390.
23. Darvesh, S., Macdonald, I.R., Martin, E. (2013) Selectivity of phenothiazine cholinesterase inhibitors for neurotransmitter systems. *Bioorg Med Chem Lett*, 23 (13), 3822-3825.
24. Garcia-Ayllon, M.S., Saez-Valero, J., Munoz-Delgado, E., Vidal, C.J. (2001) Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. *Neuroscience*, 107 (2), 199-208.
25. Masson, P., Froment, M.T., Fortier, P.L., Visicchio, J.E., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1998) Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochim Biophys Acta*, 1387 (1-2), 41-52.
26. Massoulié, J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
27. Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, P. (1990) Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (19), 7546-7550.
28. Getman, D., Eubanks, J., Camp, S., Evans, G., Taylor, P. (1992) The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American journal of human genetics*, 51 (1), 170.
29. Primo-Parmo, S.L., Bartels, C.F., Wiersema, B., van der Spek, A.F., Innis, J.W., La Du, B.N. (1996) Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene. *Am J Hum Genet*, 58 (1), 52-64.
30. La Du, B.N., Bartels, C.F., Nogueira, C.P., Hajra, A., Lightstone, H., Van der Spek, A. ve diğerleri. (1990) Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin Biochem*, 23 (5), 423-431.
31. Perry, C., Sklan, E.H., Birikh, K., Shapira, M., Trejo, L., Eldor, A. ve diğerleri. (2002) Complex regulation of acetylcholinesterase gene expression in human brain tumors. *Oncogene*, 21 (55), 8428-8441.

- 32.Greenberg, D.S., Toiber, D., Berson, A.,Soreq, H. (2010) Acetylcholinesterase variants in Alzheimer's disease: from neuroprotection to programmed cell death. *Neurodegenerative Diseases*, 7 (1-3), 60-63.
- 33.Bartels, C.F., Zelinski, T.,Lockridge, O. (1993) Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (3) gene accounts for YT blood group polymorphism. *Am J Hum Genet*, 52 (5), 928-936.
- 34.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.
- 35.Simpson, N.E.,Kalow, W. (1965) Comparisons of two methods for typing of serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. *Am J Hum Genet*, 17, 156-162
- 36.Garry, P.J. (1971) Serum cholinesterase variants: examination of several differential inhibitors, salts, and buffers used to measure enzyme activity. *Clin Chem*, 17 (3), 183-191.
- 37.Elamin, B. (2003) Dibucaine inhibition of serum cholinesterase. *J Biochem Mol Biol*, 36 (2), 149-153.
- 38.Masson, P., Adkins, S., Gouet, P.,Lockridge, O. (1993) Recombinant human butyrylcholinesterase G390V, the fluoride-2 variant, expressed in Chinese hamster ovary cells, is a low affinity variant. *J Biol Chem*, 268 (19), 14329-14341.
- 39.Rubinstein, H.M., Dietz, A.A., Lubrano, T.,Garry, P.J. (1976) E1j, a quantitative variant at cholinesterase locus 1: immunological evidence. *Journal of Medical Genetics*, 13 (1), 43-45.
- 40.Lockridge, O., Bartels, C.F., Vaughan, T.A., Wong, C.K., Norton, S.E.,Johnson, L.L. (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (2), 549-557.
- 41.Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F., Froment, M.T., Schopfer, L.M.,Lockridge, O. (1997) Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding

- of succinyldithiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (8), 2266-2277.
42. Blong, R., Bedows, E., Lockridge, O. (1997) Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J*, 327, 747-757.
 43. Lockridge, O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9 (4), 125-128.
 44. Beauregard, G., Roufogalis, B.D. (1979) Characterization of lipid-protein interactions in acetylcholinesterase lipoprotein extracted from bovine erythrocytes. *Biochem. J*, 179, 109-117.
 45. MacPhee-Quigley, K., Vedvick, T.S., Taylor, P., Taylor, S.S. (1986) Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. *J Biol Chem*, 261 (29), 13565-13570.
 46. Lockridge, O., Eckerson, H.W., La Du, B.N. (1979) Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 254 (17), 8324-8330.
 47. Nair, V.P., Hunter, J.M. (2004) Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 4 (5), 164-168.
 48. Bulut, S., Bodur, E., Colak, R., Turnagol, H. (2013) Effects of conjugated linoleic acid supplementation and exercise on post-heparin lipoprotein lipase, butyrylcholinesterase, blood lipid profile and glucose metabolism in young men. *Chem Biol Interact*, 203 (1), 323-329.
 49. Rosenberry, T.L., Scoggin, D. (1984) Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (9), 5643-5652.
 50. Lockridge, O., La Du, B.N. (1986) Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical, and atypical-silent genotypes. *Biochem Genet*, 24 (5-6), 485-498.
 51. Malany, S., Sawai, M., Sikorski, R.S., Seravalli, J., Quinn, D.M., Radic, Z. ve diğ erleri. (2000) Transition state structure and rate determination for the

- acylation stage of acetylcholinesterase catalyzed hydrolysis of (acetylthio) choline. *Journal of the American Chemical Society*, 122 (13), 2981-2987.
52. Augustinsson, K.-B., Bartfai, T., Mannervik, B. (1974) A steady-state kinetic model of butyrylcholinesterase from horse plasma. *Biochem. J*, 141, 825-834.
53. Botti, S.A., Felder, C.E., Lifson, S., Sussman, J.L., Silman, I. (1999) A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase. *Biophys J*, 77 (5), 2430-2450.
54. 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.
55. Masson, P., Xie, W., Froment, M.T., Lockridge, O. (2001) Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the Omega loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*, 1544 (1-2), 166-176.
56. Masson, P., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1996) Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem*, 235 (1-2), 36-48.
57. Silva, D., Chioua, M., Samadi, A., Agostinho, P., Garcao, P., Lajarin-Cuesta, R. ve diğ erleri. (2013) Synthesis, pharmacological assessment, and molecular modeling of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitors: effect against amyloid-beta-induced neurotoxicity. *ACS Chem Neurosci*, 4 (4), 547-565.
58. Chiou, S.Y., Weng, T.T., Lin, G.Z., Lu, R.J., Jian, S.Y., Lin, G. (2014) Molecular docking of different inhibitors and activators to butyrylcholinesterase. *J Biomol Struct Dyn*.
59. Vellom, D.C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N.A., Camp, S., Taylor, P. (1993) Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32 (1), 12-17.

60. Liston, D.R., Nielsen, J.A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S.B., Hubbard, S.T. ve diğeri. (2004) Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, 486 (1), 9-17.
61. Chemical Book. (2014). Ağ Sitesi: <http://www.chemicalbook.com/>
62. IUPHAR. (2014). Guide to Pharmacology, Ağ Sitesi: <http://www.guidetopharmacology.org/>
63. Masson, P., Fortier, P.L., Albaret, C., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1997) Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Biochem J*, 327 (Pt 2), 601-607.
64. Sit, R.K., Fokin, V.V., Amitai, G., Sharpless, K.B., Taylor, P., Radic, Z. (2014) Imidazole aldoximes effective in assisting butyrylcholinesterase catalysis of organophosphate detoxification. *J Med Chem*, 57 (4), 1378-1389.
65. Masson, P., Froment, M., Bartels, C., Lockridge, O. (1997) Importance of aspartate-70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. *Biochem. J*, 325, 53-61.
66. Wong, L., Radic, Z., Brüggemann, R.J., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P. (2000) Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis. *Biochemistry*, 39 (19), 5750-5757.
67. 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.
68. Rajesh, R.V., Chitra, L., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009) 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.
69. Rajesh, R.V., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009) High aryl acylamidase activity associated with cobra venom acetylcholinesterase: biological significance. *Biochimie*, 91 (11-12), 1450-1456.

70. Drugbank. (2014). **drugbank.ca**, Ağ
71. Abernethy, M.H., George, P.M., Melton, V.E. (1984) A new succinylcholine-based assay of plasma cholinesterase. *Clin Chem*, 30 (2), 192-195.
72. 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.
73. Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J Neurochem*, 39 (1), 106-110.
74. Weitnauer, E., Robitzki, A., Layer, P.G. (1998) Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chick than in horse, but much lower than in fetal calf serum. *Neuroscience letters*, 254 (3), 153-156.
75. Boopathy, R., Rajesh, R.V., Darvesh, S., Layer, P.G. (2007) Human serum cholinesterase from liver pathological samples exhibit highly elevated aryl acylamidase activity. *Clin Chim Acta*, 380 (1-2), 151-156.
76. Darvesh, S., McDonald, R.S., Darvesh, K.V., Mataija, D., Mothana, S., Cook, H. ve diğ erleri. (2006) On the active site for hydrolysis of aryl amides and choline esters by human cholinesterases. *Bioorg Med Chem*, 14 (13), 4586-4599.
77. Bernsohn, J., Barron, K.D., Hess, A.R. (1962) Multiple Nature of Acetylcholinesterase in Nerve Tissue. *Nature*, 195 (4838), 285-286.
78. Hall, E.R., Brodbeck, U. (1978) Human erythrocyte membrane acetylcholinesterase. Incorporation into the lipid bilayer structure of liposomes. *European Journal of Biochemistry*, 89 (1), 159-167.
79. Metz, J., Van Rensburg, N.J., Stevens, K., Hart, D. (1961) Acetylcholinesterase and the Life-span of the Erythrocyte. *Nature*, 190 (4782), 1208-1209.
80. Johnson, G., Moore, S.W. (2012) Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem Int*, 61 (5), 783-797.

81. Polachini, C.R., Spanevello, R.M., Casali, E.A., Zanini, D., Pereira, L.B., Martins, C.C. ve diğerleri. (2014) Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*, 266, 266-274.
82. Santarpia, L., Grandone, I., Contaldo, F., Pisanisi, F. (2013) Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 4 (1), 31-39.
83. Ofek, K., Soreq, H. (2013) Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chem Biol Interact*, 203 (1), 113-119.
84. Gonzalez-Naranjo, P., Perez-Macias, N., Campillo, N.E., Perez, C., Aran, V.J., Giron, R. ve diğerleri. (2014) Cannabinoid agonists showing BuChE inhibition as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, 73, 56-72.
85. Darvesh, S., Martin, E., Walsh, R., Rockwood, K. (2004) Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clinical Biochemistry*, 37 (1), 42-49.
86. Cibičková, L.u. (2011) Statins and their influence on brain cholesterol. *Journal of Clinical Lipidology*, 5 (5), 373-379.
87. Cibickova, L., Radomir, H., Stanislav, M., Norbert, C., Helena, Z., Daniel, J. ve diğerleri. (2009) The influence of simvastatin, atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids*, 74 (1), 13-19.
88. Bas, D.F., Topcuoglu, M.A., Gursoy-Ozdemir, Y., Saatci, I., Bodur, E., Dalkara, T. (2012) Plasma 3-nitrotyrosine estimates the reperfusion-induced cerebrovascular stress, whereas matrix metalloproteinases mainly reflect plasma activity: a study in patients treated with thrombolysis or endovascular recanalization. *Journal of Neurochemistry*, 123, 138-147.
89. Goliasch, G., Winter, M.-P., Ruetzler, K., Heinz, G., Lang, I., Maurer, G. ve diğerleri. (2014) Serum butyrylcholinesterase predict survival following

- extracorporeal membrane oxygenation after cardiovascular surgery. *Journal of the American College of Cardiology*, 63 (12_S).
- 90.Cibickova, L., Palicka, V., Cibicek, N., Cermakova, E., Micuda, S., Bartosova, L. ve diğ erleri. (2007) Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res*, 56 (6), 765-770.
 - 91.Cibickova, L., Hyspler, R., Ticha, A., Cibicek, N., Palicka, V., Cermakova, E. ve diğ erleri. (2008) Cholesterol synthesis in central nervous system of rat is affected by simvastatin as well as by atorvastatin. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63 (11), 819-822.
 - 92.Warburg, O., Christian, W. (1941) *Bimhem*, Z 310, 384-421.
 - 93.Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
 - 94.George, P.,Abernethy, M. (1983) Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clinical chemistry*, 29 (2), 365-368.
 - 95.Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr.,Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
 - 96.Sarkarati, B., Cokugras, A.N.,Tezcan, E.F. (1999) Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by Cd²⁺, Zn²⁺ and Al³⁺: comparison of the effects of metal ions on cholinesterases. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 122 (2), 181-190.
 - 97.Lockridge, O., Schopfer, L.M., Winger, G.,Woods, J.H. (2005) Large Scale Purification of Butyrylcholinesterase from Human Plasma Suitable for Injection into Monkeys; a Potential New Therapeutic for Protection against Cocaine and Nerve Agent Toxicity. *J Med Chem Biol Radiol Def*, 3, nihms5095.
 - 98.Bodur, E. (2010) Human serum butyrylcholinesterase interactions with cisplatin and cyclophosphamide. *Biochimie*, 92 (8), 979-984.

99. Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (2), 93-99.
100. Juul, P. (1968) Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin Chim Acta*, 19 (2), 205-213.
101. Yildiz, O., Bodur, E., Cokugras, A.N., Ozer, N. (2004) Partial purification and characterization of soluble isoform of butyrylcholinesterase from rat intestine. *Protein J*, 23 (2), 143-151.
102. Masson, P., Bec, N., Froment, M.T., Nachon, F., Balny, C., Lockridge, O. ve diğ erleri. (2004) Rate-determining step of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of benzoylcholine and benzoylthiocholine. Volumetric study of wild-type and D70G mutant behavior. *Eur J Biochem*, 271 (10), 1980-1990.
103. Cannon-Carlson, S., Tang, J. (1997) Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Analytical biochemistry*, 246 (1), 146-148.
104. Assayag, E.B., Shenhar-Tsarfaty, S., Ofek, K., Soreq, L., Bova, I., Shopin, L. ve diğ erleri. (2010) Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. *Molecular Medicine*, 16 (7-8), 278.
105. I.R., S. (1975). *Enzyme Kinetics*. Toronto: John Wiley.
106. Boeck, A.T., Schopfer, L.M., Lockridge, O. (2002) DNA sequence of butyrylcholinesterase from the rat: expression of the protein and characterization of the properties of rat butyrylcholinesterase. *Biochem Pharmacol*, 63 (12), 2101-2110.
107. Nachon, F., Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Colas, C., van Dorsselaer, A., Goeldner, M. (1998) Trp82 and Tyr332 Are Involved in Two Quaternary Ammonium Binding Domains of Human Butyrylcholinesterase as Revealed by Photoaffinity Labeling with [3H]DDF†. *Biochemistry*, 37 (29), 10507-10513.

108. Neşe Çokuğraş, A., Bodur, E. (2003) Comparative effects of two plant growth regulators; indole-3-acetic acid and chlorogenic acid on human and horse serum butyrylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77 (1), 24-33.
109. Aldridge, W.N., Reiner, E. (1972) Enzyme Inhibitors as Substrates. London: North Holland Publishing Company.

EKLER



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
 Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -908

04 Eylül 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 03.09.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/13
Proje No : GO 14/142 (Değerlendirme Tarihi 05.03.2014)
Karar No : GO 14/142 - 46

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Ebru BODUR'un sorumlu araştırmacısı olduğu Meltem ATAY'ın tezi olan GO 14/142 kayıt numaralı ve "İnsan Serum Bütirilkolinesterazı ve Eritrosit Asetilkolinesterazının Statin Türevleri ile Etkileşiminin İncelenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | |
|---|---------|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | İZİNLİ | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | GÖREVLİ | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | İZİNLİ | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftoğlu (Üye) | İZİNLİ | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | İZİNLİ | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | İZİNLİ | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| İZİNLİ | | |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |