

ASETİLKOLİNESTERAZ'IN ÖNEMİ ve İNHİBİTÖRLERİ

Importance of Acetylcholinesterase and Its Inhibitors

Aysel GÜVEN*

Geliş Tarihi : 15.02.2000

ÖZET

Asetilkolinesteraz (AChE), dokularda serbest veya fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan lipotrofik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen nonspesifik bir enzimdir. Asetilkolin (ACh) sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücreğine, sinir implusu taşıma görevinin yanında sinir ve kas lifleri boyunca bioelektriksel akımın oluşmasını da sağlayan biyolojik önemi büyük olan bir esterdir. Dış çevre ile lifin iç kısmı arasında konsantrasyon farklarının oluşması neticesinde Na⁺ iyonunun geçişi ve elektrik akımının meydana gelmesi ACh esteri sayesinde olmaktadır.

Pestisitler; bitki hastalıkları, zararlı böcekler ve yabancı otlar gibi tarımsal ürünlerin azalmasına sebep olabilecek çeşitli etmenlere karşı kullanılan kimyasal bileşenlere verilen addır. Pestisitlerin kullanılması bir yandan tarımsal üretimi artırırken diğer yandan da dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedir.

Eğer organizmaya organik fosforlu, klorlu, karbonatlı veya diğer bazı kimyasal ya da biyolojik maddeler girerse, bu maddeler asetilkalinin reseptörlerle birleşmesini önlerler. Bunlar sinir ve kasların birleşme yerindeki taşıyıcıları çeşitli şekilde etkilerler. AChE'yi inhibe ederek ACh'in sinirlerle kasların birleşme bölgelerinde uzun süre kalarak kasların sinirlere cevabını uzatırlar. Bu bileşiklerin yaygın kullanımı çeşitli dirençli türlerin ortaya çıkmasını sağlarken canlı organizmada dengesiz kas ve sinir fonksiyonlarına neden olurlar.

Anahtar Sözcükler: Asetilkolin, Asetilkolinesteraz, Pestisit, Kolinesterazın inhibisyonu.

SUMMARY

Acetylcholinesterase (AChE), a non specific enzyme is found alone or connected with phospholipids in tissues and has a lipotrophic effect and to hidrolises the Acetylcholine (ACh). ACh on important biological ester, carries impulse between neurons and from neuron to target tissue and so provides bioelectrical current to the muscle fiber. The concentration difference between the internal and external phase of fiber and relasing of Na⁺ ions between these phases and as a consequence of these actions made by ACh esters.

Chemical compounds used against plant illness, harmful insects and wild grass in the agriculture are called as pesticide. Pesticides provide an increase in agricultural production, but they also effect human health indirectly.

If organic phosphate, chlor, carbamate or some other chemical and biologic agents are taken by the living organisms, these agents prevent to connection of ACh with receptor. These compounds effect the carries at the point of neuron and muscle contact in different ways. Due to the inhibition of AChE, ACh remains on neuron and muscle impact points for a long period and extends the respence of muscle to neurone. Extendant use of these components leads to occurance of some resistant species and uncoordinated muscle and neuron functions.

Key Words: Acetylcholine, Acetylcholinesterase, Pesticids, Inhibition of cholinesterase.

GİRİŞ

Enzim; organizmadaki metabolik olayları hızlandıran protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Organizmada organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla gerçekleşmektedir (1). Enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonun tipine ve reaksiyon mekanizmalarına göre çeşitlilik göstermektedirler.

Asetilkolin esteraz; dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan li-

potrofik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen non spesifik bir enzimdir.

Bugün artan nüfusa paralel olarak besine duyulan ihtiyaç, özellikle ekonomisi tarıma dayalı ülkelerin çoğunda önemli bir problem olmaya başlamıştır. Nüfusun besin ihtiyacını karşılamak amacıyla üretimi en kısa zamanda ve en az maliyette sunmak için kimyasal maddelere başvurulmaktadır. Ürünün kalite ve kantitesini artırmak amacıyla pestisitler kullanılmaktadır.

* Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kars-TÜRKİYE

Ürün artışına yönelik kullanılan pestisitlerin etki mekanizmaları belirli sınırlar içerisinde olmalıdır. Bu sınırlar aşıldığında ürün artışına karşılık pestisidler çevre için rezüdi (kalıntı) gibi önemli problemler oluşturmaktadır.

Pestisidler ve bazı sentetik kimyasal ilaçlar besin zinciri yoluyla kullanım alanlarının çok dışına ulaşarak hayvanlara ve bunların üzerinde beslenen insanlara kadar ulaşmaktadır. Bu maddeler tüm canlılarda olumsuz metabolik bozukluklara sebep olmaktadır. Bu olumsuzluklardan biri de enzim sistemleri üzerindeki etkileridir. Organizmadaki metabolik olaylardan sorumlu olan enzimlerin pestisidlerin etkisiyle aktivitelerinin sınırlandırıldığına dair pek çok çalışma mevcuttur.

Sinir uyarılarının nakledilmesinde önemli rol oynayan AChE'in özellikle klorlu, fosforlu, karbonatlı pestisidler ile bazı kimyasal maddeler tarafından inhibisyonu ve bu durumun canlıda meydana getirebileceği sonuçlar literatürler ışığı altında sunulmaya çalışıldı.

ASETİLKOLİNESTERAZ

AChE ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedo marmoneta) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır. Kolinesteraz Asetilkolin'i hidrolize etme yeteneğine sahip nonspesifik bir esterazdır. Özellikle karaciğerde oluşur. Kolinesteraz aktivitesi erkeklerde 0.52 ile 1.39 U/L kadınlarda ise 0.38 ile 1.25 U/L arasında değişir, Normalde erkeklerde kolinesteraz aktivitesi kadınlara oranla daha yüksektir. Serum kolinesterazının artmasına *hiperkolinesterazemi*, azalışına ise *Hipokolinesterazemi* denir. Bununla beraber tek bir defa kolinesteraz tayini normal değerlerin geniş değişim göstermesinden dolayı yorumlanma sırasında güçlükler neden olur. Doğru bir yorum ancak seri halinde tayinlerle mümkündür. Çünkü kolinesteraz spesifik bir enzim değildir (2).

Asetilkolini etkileyen ve birbirine yapısal yakınlığı olan iki önemli enzim vardır. Bunlar AChE ve asetilkolin asilhidralazdır.

Gerçek kolinesteraz (asetilkolin esteraz) sistematik adıyla EC 3.1.1.7 dir ve eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında, beyin gri cevherinde bulunmuştur (2,3).

Asetilkolin asilhidralaz (acylcholine acyl-

hydrolase) tipi ise benzoil kolinesretraz veya psödo-kolinesteraz ya da kolinesteraz II olarak adlandırılır ve sistematik ismi EC 3.1.1.8 dir. Bu enzimde karaciğer, pankreas, kalp, serum ve beyinin beyaz cevherinde bulunmakta olup biyolojik rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Ayrıca düşük miktarda da olsa serobrospinal sıvıda bulunduğu belirlenmiştir (4).

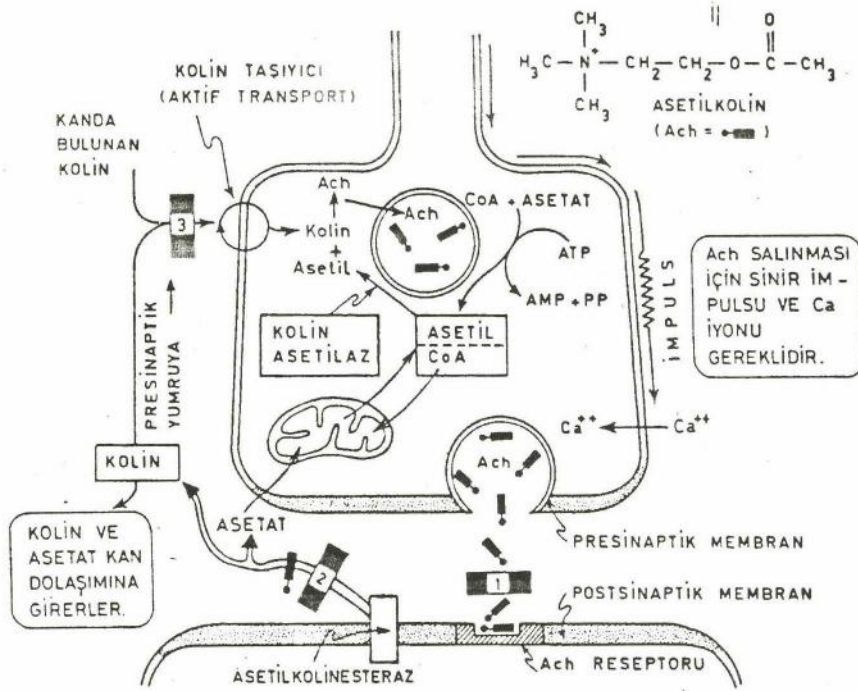
Bu iki enzimin substratlara karşı spesifitelerinin farklı olduğu, progtismin ve physostigmin alkaloidler tarafından inhibe edildikleri bildirilmiştir (5). Bunun dışında birçok dokuda farklı substratların hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin farklı olması serum ve eritrositlerdeki AChE'in farklı tiplerini olduğunu göstermektedir. Butyrylthiocholine'in (BChE) hidrolizi sonucu thiocholin'in oluşmasını sağlayan butyrylcholin esteraz enzimi gibi (6) serumdaki enzim, benzoil kolini etkilediği halde asetil-β metilkolini hidroliz etmez. Eritrositlerdeki enzim ise asetil-β metilkolini etkilerken benzoilkolini etkilemez (3).

Asetilkolin, Yapısı ve Biyolojik Önemi

ACh biyolojik rolü büyük olan bir esterdir. Önceleri sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine sinir implusu taşıma görevi olduğu, ancak daha sonraki çalışmalarda bu görevinin yanında sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu tespit edilmiştir (7).

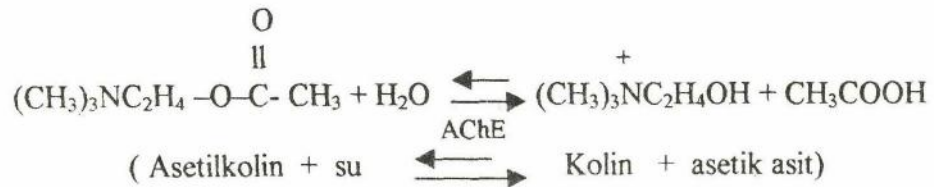
Omurgalılarda ve diğer hayvanlarda birbirine yakın sinir hücreleri arasındaki dar aralıklardan sinirsel uyarıların atılarak taşınmasında rol oynadığı gibi bu uyarımlar da kas hücrelerinin kasılmasını başlatır. Sinirsel uyarıların taşınması ve kas hücrelerinin kasılması elektrokimyasal olaylardır. Elektrikçe yüklü iyonlar sinir ve kas hücrelerini kaplayan membranlar boyunca akar ve bir sinir uyarılmasıyla uzun sinir lifleri boyunca bir iyon akışı bir sinapsa ulaşıncaya kadar devam eder. Orada sinir hücresindeki ufak baloncuklar içinde depo edilmiş olan taşıyıcı ACh'in serbest kalması sağlanır.

ACh sinaps boyunca diffüzenir ve yakındaki sinir lif membranına bağlanır. Bu bağlanma olur olmaz hücre membranı boyunca sodyum (Na) ve potasyum (K) iyonları yer değiştirir. Böylece ikinci bir sinir hücresinde sinirsel uyarım başlamış olur (8).



Şekil I. Nörotransmitter Asetilkolin'in etki mekanizması (7).
Figure I. The impact mechanism of nörotransmitter Acetylcholine.

Sinir uçları tarafından salgılanan ACh, görevini yaptıktan sonra AChE enzimi tarafından hidrolizlenerek kolin ve asetata ayrılır.



Kolin presinaptik hücre tarafından alınır ve ACh sentezinde kullanılır. ACh mitokondride sentezlenir. Akson yoluyla presinaptik yumruya gelir vezikül membranı hücre gövdesinde şekillenir. Birçok omurgalı hayvanda ACh hücre gövdesinde iken böcek kolinesterazının çoğu sinir iletimi merkezinde bulunmuştur (9).

Asetilkolinesterazın İnhibisyon Mekanizması ve Pestisitlerin Etkileri

Organik fosforlu, klorlu, karbomatl ve diğer bazı kimyasal ya da biyolojik maddeler sinir sis-

temini etkileyen bileşikler sınıfına girerler. Bu bileşiklerin genel özelliği sinir ve kasların birleşme bölgelerinde salgılanan ve sinirsel uyarıları sinir sistemi boyunca taşıyarak kaslara veya ilgili dokulara ulaşmasını sağlayan taşıyıcıları etkilemesidir (10,11).

Organofosfat ve karbomatl pestisidler, ACh'in analogları olarak davranırlar. Fakat enzim komplekslerine dönüşümsüz bağlanırlar. Bu bileşiklerin yaygın kullanımının çeşitli dirençli türlerin ortaya çıkmasına sebep olduğu bildirilmiştir (8,10,12).

Yapılan bir çalışmada (20) ölümcül bir kimyasal olan O-ethyl S-C₂ (diszopropilamin) etil/posfonotiyonat (aynı zamanda UX olarak adlandırılan) ile Torpedo californica'nın etkileşimi araştırılmıştır. Çalışmada bu bileşik serinin aktif bölgesine *phosphonylating* tarafından bağlanarak enzimi inhibe ettiği belirtilmiştir.

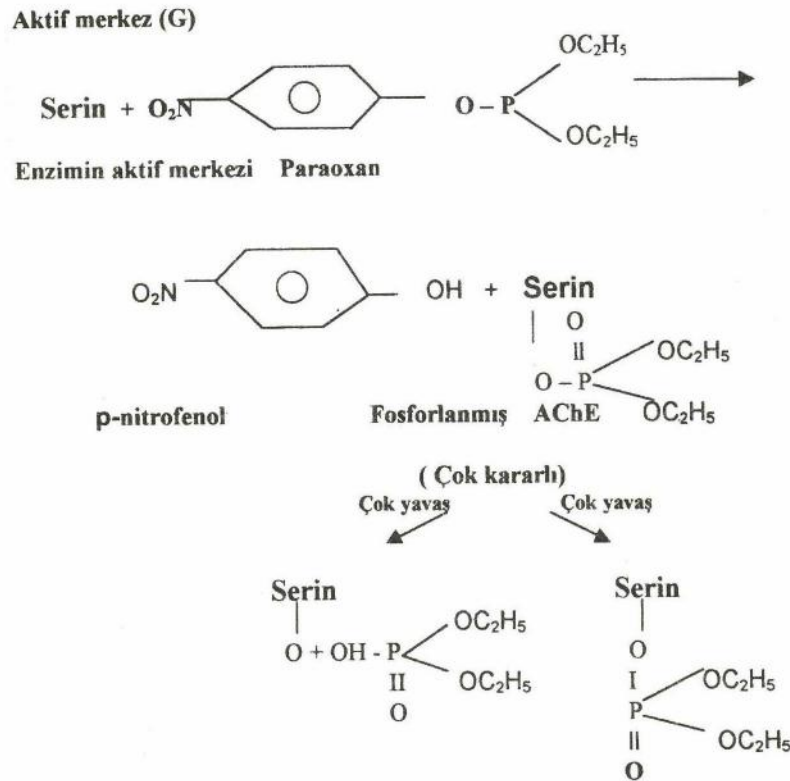
Kolinesteraz düzeyleri karaciğer fonksiyon testi olarak, haşarat ilaçları ile zehirlenmelerin muhtemel bir göstergesi ve atipik enzim şekilleri bulunan hastaların saptanmasında yararlıdır. Serum enzim düzeylerinin azalması akut infeksiyonlarda, akciğer embolisinde, adale distrofisinde ve cerrahi amelyatlardan sonra görülür.

Kolinesteraz aktivitesini inhibe eden organik fosforlu bileşiklerin arasında, parathion, ve tetra-

raetil pirofosfat gibi bir çok organik haşarat ilacı vardır. Şüphesiz bu maddeler sinirsel dokunun tüm kolinesterazını inaktive edecek yeterlilikte absorbe oldukları zaman ölüm meydana gelir.

Tarım ve endüstride kullanılan organofosfat (Ops) bileşenlerinin hemen gelişen zehir etkisinin AChE'nin inhibisyonunu izlediği, bazen de organofosfatların Neuropathy'nin (OPIDN) gelişmesine sebep olduğu ve neurophthynin zehire maruz kaldıktan sonra oluştuğu belirtilirken bu belirtilerin türler arasında farklılık gösterdiği de bildirilmiştir. Bu inhibitörlerin insan ve tavuk hareket sistemlerinde etkileri büyük olduğu halde, laboratuvar sıçanlarında etkinin yok denecek kadar az olduğu görülmüştür (5).

Şekil 3. Enzimin organik fosforlu bir pestisit olan paraoxan ile tepkimesi (16).
Figure 3. The reaction of organic phosphate enzyme with paraoxan.



Bir karbomat pestisiti olan karbofuran, çeşme suyundan çıkarıldıktan sonra test edilmiş ve kolinesteraz aktivitesini çok iyi inhibe ettiği bulunmuştur (21).

Elektrik yılan balığının AChE aktivitesi sulu organik çözücülerin varlığında yapılan inhibisyonun dönüşümlü ve açıkça rekabetçi olduğunu gösterilmiştir. Sonuçlar antikolinesterik hidrofobik inhibitörlerin ölçümlerinin belirlenmesine de olanak sağlamıştır (22). Enzimleri inhibe eden pestisitler ve bazı kimyasal maddelerin omurgahlarda enzimin hidrofobik dağılımının inhibisyonu için önemli iken böceklerde önemli olmadığı belirtilmiştir (23).

Ahtopot beyni, dana ön beyni ve insan eritrositlerden çıkarılan oniki tane alkil ve aril grubu bileşik, AChE'a değişen inhibisyonlar göstermiştir. İnhibitörler substrat ile yarışma içinde olup, asetilkolin tarafından hidrolize edilmiştir. Ratlarda yapılan bir çalışmada (24) 9-amino 1, 2, 3, 4 tetrahydroacridine (THA)'nın AChE inhibisyonuna önemli ölçüde neden olduğu ve kliniksel bir vasıta olarak rol oynadığı ve Alzheimer hastalığı için hizmet edebilecek nitelikte maddeler olduğuna işaret edilmiştir. Bu yeni bileşikler AChE aktivitesi gösterip Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilir ilaçların oluşumuna uygulanabileceği bildirilmiştir (25).

Kurt ayağı (Club moss)'ından ekstrakte edilen (-) Huperzine A(HpA)'nın Çin'de yaygın halk ilacı olarak kullanılan ve aksiyon niteliğinde olan AChE'in kuvvetli bir inhibisyonu olduğu bulunmuştur. HpA'nın substrata karşı yüksek affinite ve olağanüstü uyum gösterdiği gözlenmiştir (25).

Yapılan bir diğer çalışmada (6) Butirilkinesteraz performansını belirlemek için biyolojik alıcıların Paraoxon'la inhibisyonu su, toluen, heksane, heptane ve nonane içinde çalışılmıştır. İnhibitör genişliğinin hidrofobik çözeltilerde arttığı (tolue> hexane> heptane) görülmüştür. Suda elde edilen inhibisyon ise heptan ile aynı olduğu, nonane içinde düşük bir inhibisyon olacağı beklenmiştir. Paraoxon'un sulu örneklerinden heptane kadar sıvı-sıvı etkileşimi metodun duyarlılığının belli bir şekilde artmasını sağlamıştır. Heptan bileşiği için de 5 dakikalık inkübasyonlardan sonra biyolojik alıcı

% 20 oranında inhibe olmuş ve 0.03 μ mol'lik paraoxan konsantrasyonu bu metodla belirtilen en düşük değer olmuştur (6).

İnhibitörlerin varlığı, AChE'in aktivitesinin ve hidrojen peroksit üretimini düşmesine neden olmaktadır (26,27).

Lui ve ark. (28), marul ve domates gibi 96 sebze ve meyveyi test etmişler ve AChE üzerine inhibitör etkisinin % 6 dan daha az olduğunu, bunun da bu sebzelerde <0.1 mg/kg karbofuran'ın varlığından kaynaklandığını belirtirken Güney Doğu Asya'da yaygın insektisit olarak kullanılan bir oranofosfat grubu methamidophos'a'nın < 3 mg/kg olarak sebzelerde bulunduğu tespit etmişlerdir.

Bütün bu çalışmalar göstermiştir ki tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, yerleşik alanların ve endüstriyel atıklar içerisinde toksik kimyasal maddelerin çeşitli yollarla akarsu göl ve denizlere karışması sonucu sulara yaşayan balıklar ve aynı su ile sulanan büyük ve küçük baş hayvanlarda ve bunlarla beslenen insanlarda çeşitli olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Pestisid kalıntıları çevre kirlenmesinin yanında toprağın mikrobiyal aktivitesi ve verimliliğini de düşürmektedir. Bu bileşikler canlıdaki makro ve mikro florayı ve bunların enzimatik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Yüksek dozda pestisid kalıntısı içeren gıdaların insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda akut ve kronik zehirlenmelere sebep olduğu örneklerle ispatlanmıştır. Aynı zamanda kimyasal maddelerin de AChE aktivitesi üzerine farklı yönlerde etkili olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kaya N: Biyokimya. Atatürk Üniv. Yay No: 743. Kars Vet Fak Yay No: 2 Ders Kitapları Serisi 2. 38. 1993.
2. Aras K, Erşen G: Tibbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Ankara Üniv Basımevi. Ankara. 198-203. 1988.
3. Nachmansohn D, Lededer E: Chemical and molecular basis of nerve activity. *Bull Soc Chim Biol.* 21. 797. 1939.
4. Govindappa T, Govardhan L, Jyothi PS, Veerabhadrapa PS: Purification and characterisation of acetylcholinesterase isozymes from the latex of *synalenum grontii* hook. *Indian J Biochem Biop.* 24. August. 209-217. 1987.

5. Ehrlich M: Neurotoxic esterase inhibition-predictor of potential for organophosphorus-induced delayed neuropathy. Biomarkers for agrochemicals and toxic substances-applications and risk assessment. 643: 79-93, 1996.
6. Skladal P, Krejci J: Performance of the amperometric biosensor with immobilized butyrylcholinesterase in organic solvents. *Collection of czechoslovak chemical communication*. 61(7): 985-99, 1996.
7. Wilson IB, Nachmansohn D: In "Ion transport across membranes" (HT Clarke Ed). Academic Press, New York, 35, 1954.
8. Noyan A: Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. Meteksan Anonim Şirket. Ankara. 240-242, 1996.
9. Fournier D, Berrada S, Bongibault V: Molecular-genetics of acetylcholinesterase in insecticide-resistant *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance*. 645: 17-27, 1996.
10. Telefone A: An amperometric biosensor for the determination of organophosphorus pesticides. *TJ Chem*. 20(3): 253-257, 1996.
11. Nair HK, Lee K, Quinn DM: M-(NNN)-Tri-methylammonio/Trifluoroacetophenone-A. Femtomolar inhibitor of acetylcholinesterase. *J American Chem Soc*. 115(22): 9939-9941, 1993.
12. Yamamoto K, Swada Y, Iga T: Sensitive determination of ambenonium in plasma using inhibitory activity to acetylcholinesterase. *Biological Pharma Ceutical Bulletin*. 16(3): 280-283, 1993.
13. Han SY, Sweney JE, Bachman ES, Schweiger EJ, Forloin G, Coyle JT, Davis BM, Joullie MM: Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor and its derivatives-A potential application in alzheimers-disease., 1992.
14. Sugimoto H, Tsuchiya Y, Sugumi H, Higurashi K, Karibe N, Imure Y, Yasaki A, Araki S, Yamanishi Y, Yamatus K: Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors-1 Benzyl-4-(2-Phthalimi doethyl) piperidine and related derivations. *J Medicinal Chemistry*. 35(24): 4542-4548, 1992.
15. Chen YPL, Nielsen J, Hedberg K, Dunaiskis A, Jones S, Russo L, Johnson J, Ives J, Liston D: Syntheses, resolution, and structure-activity-relationships of potent acetylcholinesterase inhibitors 8-carbopysostigmine analog. *J Medicinal Chemistry*. 35(8): 1429-1434, 1992.
16. Türkoğlu V, Çamaş H, Çelik İ: In vitro inhibition bovine erythrocyte acetylcholinesterase by some commercial pesticides. *J Environ Scin Healt, Part A*. 1645-1649, 1997.
17. Nachmansohn D, Rothenberg MA: Hydrolysis of butyrylcholine in the serum cholinesterase. *Science* 100, 454, 1944.
18. Reiner E: Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbonylated cholinesterase. *Bull, WHO*, 44: 109-12, 1971.
19. Namba T, Nolte CT, Jachrel J, Grob D: Poisoning due to organophosphate insecticides acute and chronic manifestations. *Am J Med*, 50: 4475-92, 1971.
20. Albaret C, Lacoutiere S, Ashman WP, Froment D, Fortier PL: Molecular mechanic study of nerve agent o-ethyl-S9-C2-(Diisopropylamine/ ethyl methylphosphonothioate (UX) bound proteins-structure fonction and genetics. 28(4): 543-555, 1997.
21. Moris P, Alexandre I, Roger M, Remacle J: Chemiluminescence assays of organophosphorus and carbamate pesticides. *Analytica Chimica ACTA*. 302(1): 53-59, 1995.
22. Ronsini N: Effect of solvents on acetylcholinesterase I. anticholinergic esterase-activity of hydrophobic inhibitors. *Analisis*, 22(5): 249-56, 1994.
23. Pang YP, Hang F, Quiram P, Jelacic T, Brimijoin S: Synthesis of alkylene linked bis-tha and alkylene linked benzyl-tha as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *Journal of the chemical society-perking transactions*. 2: 171-76, 1997.
24. Pang YP, Hang F, Quiram P, Jelacic T, Brimijoin S: Synthesis of alkylene linked bis-tha and alkylene linked benzyl-tha as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *Journal of the Chemical Society-perking Transactions*. 2: 171-76, 1997.
25. Boyle NAJ, Talesa V, Giovannini E, Rosi G, Norton SJ: Synthesis and study of thiocarbonate derivatives of choline as potential of acetylcholinesterase. *J Medicinal Chemistry*. 40(19): 3009-13, 1997.
26. Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP, Sussman JL: (-) Huperzine A. *Nature Structural Biology*. 4(1): 57-63, 1997.
27. Salamoun J, Remien J: Detection of anticholinergic agents in drinking water this use of tandem packed bed reactors with human red-blood-cell acetylcholinesterase and choline oxidase in a switching flow system. *International Journal of Environmental analytical Chemistry*, 57(2): 163-175.
28. Lui J, Funther A, Bilitewski U: Detection of methamidophos in vegetables using a photometric flow-injection system. *Environmental Monitoring and Assesment*, 44(1-3): 375-382.