

ACETYLCHOLIN VE CHOLINESTERAZ

Sükrü Gürtunca*

Giriş

Karaciğer esterazları gibi yalın olan esterazlar salt yalın alifatik esterlerin hidrolizini katalize ederler. Cholin esterlerine karşı etkinlikleri yoktur.

Cholin esterlerine karşı etkin olan anzimler "cholinesteraz" genel adı altında toplanmıştır. Bu deyim, ilk kez acetylcholin ile butyrylcholin hidrolizini katalize eden ve at serumunda bulunan bir anzim için kullanılmıştır. Cholinesteraz deyimini zamanla genişliyerek, attan başka öbür hayvanların da sinir dokusunda, alyuvar ve kan serumunda bulunan ve acetylcholin hidrolizini katalize eden bütün anzimleri içine alan bir anlam kazanmıştır^{1,8,14,18,22,25}.

Fizyolojik görevleri ve bioşimik durumlarına göre cholinesterazlar gerçek ve yalancı cholinesteraz olmak üzere iki büyük tipe ayrılır. Gerçek cholinesteraz sinir ve kas dokusu ile alyuvarlarda lokalize olmuştur. Görevi nöromusküler kavşakta ortaya çıkan acetylcholini parçalamaktır. Alyuvarlardaki anzim acetylcholin hidrolizini katalize ettiği halde butyrylcholine karşı etkin değildir. Yalancı cholinesterazların varlığına birçok dokuda raslanır, fakat bunlar daha çok glia, yürek kası, karaciğer, deri, bağırsak ve plazmada toplanmış durumdadır. İnsanda kan serumunda bulunan anzim acetylcholine göre butyrylcholini daha çabuk hidrolize eder.

Stedman, acetylcholine karşı etkin olan cholinesteraza alpha-cholinesteraz ve butyrylcholini hidrolize edene de beta-cholinesteraz demektedir. Birinci kategoriye giren anzimlerin *in vivo* metabolizma sırasında oluşan acetylcholine karşı koruyucu ödevleri vardır. Acetylcholin metabolizmasında baş rolü bu anzimler oynar. İkinci kategoridekilerin *in vivo* görevleri henüz kesin bir aydınlık kazanmamıştır. Yalancı cholinesterazlar da birçok cholin esterlerini olduğu gibi acetylcholini de hidrolize ederler, fakat hidrolizin seyri çok daha yavaştır.

* A.Ü. Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Dr. Asistanı, Ankara-Türkiye.

Gerçek cholinesterazlar noncholin esterlerle benzoylcholini hidrolize etmez. Yalancı cholinesterazlar propionyl ve butyrylcholini çabucak hidrolize etmelerine karşın acetyl-beta-methylcholini hidrolize etmezler. Ama burada bir ayraç açıp şunu da belirtmek gerekir ki, bir tipteki bir anzim her bakımdan çeşitli hayvan türlerinde identik değildir^{5, 7, 13, 16, 19, 21, 24}.

Wilson ve Bergman'a göre cholinesteraz anzimlerinde iki etkin yan bulunur. Bunlar anionik ve esteratik yanlar olarak adlandırılmıştır. Birbirinden bağımsız olarak ele alınamayacak olan bu yanlar, inhibitör özelliğinde olan özdeklerin bağlanmalarını sağlarlar. Bağlanma biçimlerine göre de inhibitör özdekler üç öbeğe ayrılır:

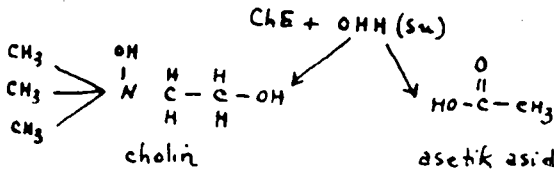
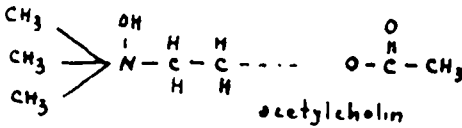
I- Anionik yan seçen inhibitörler. Quaterner amonyum tuzları ve cholin gibi.

II- Esteratik yana bağlanan inhibitörler. Di-isopropyl-phosphorofluoridate gibi.

III- Hem anionik ve hem de esteratik yanın her ikisine birden bağlanan inhibitörler. Neostigmin ve physostigmin bu öbçe girer.

Beta-cholinesteraz tipindeki anzimlerde anionik bir yanın varolup olmadığı sorunu uzun süre tartışma konusu olmuştur. Gerek gerçek ve gerekse yalancı cholinesteraz üzerine olsun, anticholinesteraz özdeklerin pek çoğu aynı derecede potent özelliği taşımaktadır. Bu özdeklerin farmakolojik etkileri bişimik anzim sisteminin dengesini bozmakla belirir^{2, 6, 9, 10, 15, 20, 23, 27, 28}.

Gerçekte acetylcholin yalın organik şimik bir özdektir, ama canlının yaşamasında çok büyük bir yükü üzerinde taşımaktadır. İstemli kaslarla sinirler arasındaki ilişkiyi düzenliyen odur. Bazı istemsiz kaslarla -bağırsaklar, bronşlar, göz, bazı bezler- sinirler arasındaki ilişkiyi sağlıyan yine acetylcholindir. Organizma içinde yapılan bu mediator ödevini yapar yapmaz hemen parçalanmaya hükümlüdür.



Sinir impulsu sinir ucuna ulaştığı anda hemen az bir miktarda acetylcholin açığa çıkar. Böylece impuls kasa ya da beze geçer sinirden. Artık acetylcholinin görevi bitmiştir, cholinesteraz anzimi aracılığı ile komponentleri olan cholin ile asetik aside ayrılır^{12, 13, 18, 22}

Bu olay dakikanın milyonda birinin bir anında olup biter. Cholin esterlerinin hidrolizi demek kendilerine uyumluk gösteren asitle birlikte serbest cholinin açığa çıkması demektir.

Organizma içine organik fosforlu insektisidlerden biri girecek olursa cholinesteraz çalışması ya inhibe, ya da bloke edilmiş olur. Bu durumda organizma içinde acetylcholinin etkisi süreklilik kazanır.

Cholinesteraz anzimi de tıpkı acetylcholin gibi sürekli olarak organizma içinde hazırlanır. Bunun iki anlamı vardır. Küçük miktarda anzim inhibitörü özelliği taşıyan organik fosforlu bir insektisidin etkisi sürekli olamaz, çünkü cholinesteraz yitimini organizma çabucak onaracak güçtedir. İkinci durumda, yani cholinesteraz inhibisyonu ileri bir evrede de olsa, fakat organik fosforlu insektisidin etkisi sürekli değilse, cholinesteraz etkinliği kısa bir süre geçince normal düzeye erişebilir. Cholinesteraz inhibisyonu, anzimin aktif merkezinde bulunan bazı grupların doğrudan doğruya fosforillasyonu ve asid anion liberasyonu biçiminde kendini gösterir. Normal koşullarda plazma anziminin inhibisyonu aşırı bir evreye de erişse yine de klinik belirtilerin ortaya çıkmasına yetmez. Fakat stres durumunda olay ters yönde bir gelişme gösterir. Köpeklerde cholinesteraz inhibisyonundan sonra acetylcholin injeksiyonu yapılırsa belirgin cholinergic semptomların ortaya çıktığı görülür¹⁶.

Evcil sineklerde cholinesteraz anziminin en çok toplandığı organ beyindir. Bir gram ağırlığındaki sinek başında saatte bir gram acetylcholinin hidrolizini sağlayacak oranda anzim bulunmaktadır. Evcil sinek başında etkin cholinesteraz anziminin varlığını saptayıp ortaya koymak için aşağıda ayrıntıları verilmiş bulunan deneyler yapılmış ve bunlarda organik fosforlu insektisidle zehirlenmenin mekanizması üzerinde durularak bazı açıklamalar yapılmıştır.

Materyal ve Metot

60 adet evcil sinek (*Musca domestica* Linnaeus) başı alınarak soğuk çözelti ile buzlu karıştırıcı içinde iyice ezilerek homojen duruma getirildi. Dört tane tüp alındı ve her tüpe ayrı ayrı olmak üzere bu homogenattan 1 ml miktarında kondu. Ayrı olarak birinci tüpe 1 ml. çözelti ve 1 ml de acetylcholin bromür (10^{-2} M) çözeltisi

ilâve edildi. Karışım yavaş yavaş fakat iyice karıştırıldıktan sonra yarım saat oda ısısında bırakıldı. İkinci tüpe 1 ml tetraethylpyrofosfat (10^{-4} M) çözeltisinden konarak bir dakika süre ile hafif hafif çalkandıktan sonra yukarıdaki oranda acetylcholin bromür çözeltisinden de 1 ml miktarında ilâve edildi. Hafifçe yine çalkandıktan sonra yarım saat süre ile bu karışım da oda ısısında bekletildi. Üçüncü tüpe de konuş sırası değiştirilerek aynı çözeltilerden aynı miktarlarda kondu. Dördüncü tüpe salt çözelti kondu ve tanık olarak ayrıldı.

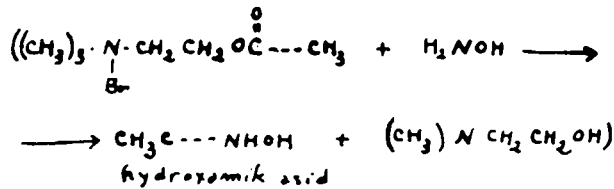
İnkubasyon süresinin bitiminde her tüpten 1 ml miktarında örnek alınarak temiz tüplere kondu. Sonra ilk üç tüpe ardarda olmak üzere aşağıdaki ayraçlar belirtilen miktarlarda uygulandı.

- Taze olarak hazırlanmış alkali hydroxylamin ayracından 2 ml ($2M$ $NH_2OH + 3.5M$ $NaOH$).
- Hydroklorik asid çözeltisinden 1 ml ($1: 2H_2O$).
- Demir üç klörür çözeltisinden 1 ml (0.37 M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ HCl'de).

Tanık olarak kullanılan dördüncü tüpe de tepkime ayraçlarından eşit miktarlarda kondu. Yalnız ayrıl olarak hydroklorik asid çözeltisi alkali hydroxylamin çözeltisinden sonra ilâve edildi.

Ortamda acetylcholin varsa bu tepkimeler sonunda karakteristik olarak *erguvan moru esmer* bir renkle kendini belli eder. Birinci tüpteki acetylcholin cholinesteraz enzimi tarafından parçalanmış ve komponentlerine ayrılmış durumdadır. Renk oluşumu yalnız ikinci tüpte görülmüştür, çünkü tetraethylpyrofosfat cholinesteraz enzimini etkisiz bıraktığı için acetylcholin açıkta kalmıştır. Üçüncü tüpte acetylcholin daha önce enzim tarafından parçalanmış olduğundan yine renk oluşumu olumsuzdur.

Yukarıda söz konusu edilen renk tepkimesinin ortaya çıkışı hydroxamik asidin oluşumu ve bunun demir üç klörür çözeltisi ile renkli bileşik vermesinden ileri gelir.



Tartışma ve Sonuç

Genel olarak memeli hayvanlarda organik fosforlu insektisidlerin ve öbür insektisid özelliği taşıyan bazı özdeklerin temel etki mekanizması, bunların cholinesteraz anzimini inhibe etme gücünde olmaları ile açıklanmıştır^{4, 10, 11, 22, 23}.

İnsektlerde ise cholinesteraz anziminden başka bazı esterazların inhibisyonunun da organik fosforlu insektisidlerle zehirlenmede büyük ölçüde payı olduğu görüşü ortaya konmuştur²⁶. İnsektlerde sinir sisteminin cholinerjik mekanizma yolu ile çalışamayacağı ileri sürülmüştür. Oysa evcil sineklerde de cholinesteraz enziminin varlığı ile şimik mediator acetylcholinin varlığı bilinen bir şeydir. İnsektler üzerindeki gözlemler sonunda tartışma konusu edilen sorunları üç noktada toplamak olanağı vardır:

I- İnsektler vücut boşluklarına, ya da açıktan sinir sistemine yerleştirilen acetylcholinin yüksek dozlarına karşı duygunluk göstermekten yoksundurlar.

II- İnsektlerin anticholinesteraz bir özdekle zehirlenmeleri gözlemlenebilir, ama cholinesteraz etkinliğinin de bundan zarar görmediği ortadadır.

III- Bazı özdekler, örneğin atropin, memeli hayvanlarda anticholinesteraz etkiyi kaldırdığı halde buna benzer etkiyi evcil sineklerde üzerinde göstermemektedir.

Ancak, Hoyle'un buluşundan sonra birinci ve üçüncü soruları yanıtlamak olanağı elde edilmiştir. Hoyle'a göre evcil sineklerde sinir sistemini çepçevre saran bir kılıf vardır ve bu kılıf bazı yüksek iyonize özdekler için seçkinlikle geçirgen değildir. Gerek atropin ve gerekse acetylcholin insekt kanında yüksek iyonize bileşikler durumundadır. Bu nedenden ötürü etkileri açıkça belirememektedir. Koruyucu kılıf kaldırıldıktan sonra sinirin 10^{-4} acetylcholin ile kolayca uyarıldığı görülür²².

Bu durum anticholinesteraz özdeklerin cholinesteraz anzimini inhibe etmekle zehirlenmeyi meydana getiren mekanizma olduğu görüşünü güçlendirdiğine göre, evcil sineklerde organik fosforlu insektisidlerle zehirlenmenin oluşumunun görülebilmesi için bütün anzimini inhibe edilmesinin gerekmediği görüşündeyim. Kaldı ki, organik fosforlu bileşiklerle zehirlenmiş evcil sineklerde cholinesteraz inhibisyonunun çok hızlı olduğu da saptanmıştır. Denememizde tetraethylpyrofosfat ile de bu olay gözlemlenmiştir. Yaşayabilen sineklerde cholinesteraz düzeyinin normal bulması için bir günün geçmesi

gerektir. Evcil sinekler üzerinde yapılan denemeler, memeli hayvanlardan ayrı olarak *in vitro* cholinesteraz inhibisyonundan sonra gerek gerçek ve gerekse yalancı cholinesterazın ölmüş sineklerde inhibe edilmiş durumda kaldığını, recovery'nin meydana gelmediğini ortaya çıkarmıştır. Bu anzimler ancak oximlerle yeniden etkinlik kazanabilmektedir¹⁷. Zehirlemeden önce ölmeyen sineklerde yeni anzim sentezi yapılır^{5, 6, 21}. Bu olay iki evre gösterir. Birinci evre hızlı gelişmekte, fakat kısa sürmektedir. Burada tepkime organik fosforlu bileşiğin karakterine uyar³. İkinci evrede yeni alyuvarların oluştuğu göze çarpar, bu evreye beyin proteini de katılır. Organik fosforlu bileşiğin bu dönemde bir rolü yoktur.

Özet

Evcil sinek başlarının yüksek oranda etkin cholinesteraz anzimini tuttuğu acetylcholinli ortamda hydroxamik asidin demir üç klörür çözeltisi ile renkli bir bileşik vermesi temeline dayanan bir metodla tanıtıldı. Evcil sineklerde organik fosforlu insektisidlerin hangi mekanizma ile zehirlenmeyi meydana getirdiği konusu tartışıldı.

Summary

Acetylcholine and Cholinesterase

The presence of active cholinesterase in the head of the house fly has been demonstrated by a color reaction based upon the formation of hydroxamic acid which then reacts with ferric chloride solution to form a colored complex. Possible mechanisms underlying the effect of the organic phosphate insecticides are discussed.

Literatür

- 1 - **Augustinsson, K.B. and Olsson, B.** (1959): *Esterase in the Milk and Blood Plasma of Swine*. Biochem. J., 71, 484.
- 2 - **Bergman, F. and Segal, R.** (1954): *The Relationship of Quaternary Ammonium Salts to the Anionic Sites of True and Pseudo-Cholinesterase*. Biochem. J., 58, 692.
- 3 - **Blaber, R.C. and Creasey, N.H.** (1959): *The Recovery of Brain and Erythrocyte Cholinesterase Activity Following Organic Phosphorus Poisoning*. Biochem. J., 71, 7.

- 4 - **Casida, J. E., Augustinsson, K. B. and Gunnell, J.** (1960): *Stability, Toxicity and Reaction Mechanism with Esterase of Certain Carbamate Insecticides.* J. Econ. Entomol., 53, 205.
- 5 - **Davison, A.N.** (1955): *The Conversion of Schradan and Parathion into Inhibitors of Cholinesterase by Mammalian Liver.* Biochem. J., 61, 302.
- 6 - **Diggle, W.M. and Gage, J.C.** (1951): *Cholinesterase Inhibition in vitro by Parathion, E605.* Biochem. J., 49, 491.
- 7 - **Frear, D.E.H.** (1960): *Pesticide Handbook.* College Science Publishers. State College. Pa.
- 8 - **Gerebtzoff, M.A.** (1960): *Cholinesterase.* Pergamon Press. New York, N.Y.
- 9 - **Güley, M.** (1961): *Organik Fosforlu İnektisidle Husule Gelen Zehirlenme Olayı dolayısıyla bu Bileşiklerin Laboratuvar İmkânlarımız İçinde Tesbiti Üzerinde Araştırma.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 7 (2), 217.
- 10 - **Gürtunca, Ş.** (1961): *Zehirlerin Etkimleri ve Zehirlenmelerin Sağıtımı Üzerine.* T.V.H.D. Derg., 31, 172.
- 11 - **Gürtunca, Ş.** (1965): *Systemik İnektisidler.* T.V.H.D.Derg., 35, 482.
- 12 - **Hazleton, L.W.** (1955): *Review of Current Knowledge of Toxicity of Cholinesterase Inhibitor Insecticides.* J. Agr. Food Chem., 3,312.
- 13 - **Kearns, C. W.** (1956): *The Mode of Action of Insecticides.* Ann. Rev. Entomol., 1, 125.
- 14 - **Kosolapoff, C.M.** (1950): *Organic Phosphorus Compounds.* John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 15 - **Krueger, R.H., O'Brien, R.D. and Dauterman, W.C.** (1960): *Relationship between Metabolism and Differential Toxicity in Insects and Mice of Diazinon, Dimethoate, Parathion and Acethion.* J. Econ. Entomol., 53, 25.
- 16 - **Lehman, H., Silk, E. E. and Liddell, J.** (1961): *Pseudocho-linesterase.* Brit. Med. Bull., 17, 3.
- 17 - **Mengle, D.C. and O'Brien, R.D.** (1960): *The Spontaneous and Induced Recovery of Fly-brain Cholinesterase After Inhibition by Or-ganophosphates.* Biochem. J., 75, 201.
- 18 - **Metcalf, R.L.** (1948): *Mode of Action of Organic Insecticides.* National Academy of Sciences. Washington. D.C.

- 19 - **Metcalf, R.L., Fukuto, T.R. and March, R.B.** (1959): *Toxic Action of Dipterex and DDVP to the House Fly.* J. Econ. Entomol., 52, 44.
- 20 - **O'Brien, R.D.** (1956): *The Inhibition of Cholinesterase and Succinoxidase by Malathion and its Isomer.* J.Econ. Entomol., 49, 484.
- 21 - **O'Brien, R.D., Thorn, G.D. and Fisher, R.W.** (1958): *New Organic Phosphorus Insecticides Developed on Rational Principles.* J. Econ. Entomol., 51, 714.
- 22 - **O'Brien, R.D.** (1960): *Toxic Phosphorus Esters.* Academic Press. New York and London.
- 23 - **Özkazanç, A. N.** (1962): *Pestisid İlaçlar.* A.Ü.Vet.Fak.Derg., 9, (1), 73.
- 24 - **Radeleff, R.D. and Woodward, G.T.** (1956): *Cholinesterase Activity of Normal Blood of Cattle and Sheep.* Vet. Med., 51, 512.
- 25 - **Stevart, C. P. and Stolman, A.** (1961): *Toxicology. Mechanism and Analytical Methods.* Vol. 2. Academic Press. Nev York.
- 26 - **Seume, F.W., Casida, J.E. and O'Brien, R.D.** (1960): *Effects of Malathion and Parathion Separately and Jointly upon Rat Esterase in vivo.* J., Agr. Food Chem., 8, 43.
- 27 - **Wilson, I.B. and Bergman, F.** (1950): *The Active Surface of Acetylcholine Esterase Derived from Effects of pH on Inhibitors.* J. Biol. Chem., 185, 479.
- 28 - **Wilson, I.B., Bergman, F. and Nachmansohn, D.** (1950): *Mechanism of the Catalysis of Acylation Reactions.* J. Biol. Chem., 186, 781.

Yazı "Dergi Yazı Kurulu"na 9/11/1965 günü gelmiştir.