



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**7,8-DİHİDROKSİFLAVONUN
İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro*
ARAŞTIRILMASI**

Seçkin KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../.....
Seçkin KAYA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	3
2.2. Karbonik Anhidraz	4
2.2.1. Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması	7
2.2.1.1. Alfa- Karbonik Anhidrazlar (α -CA'lar)	8
2.2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri	13
2.3. Fenolik Bileşikler	14
2.3.1. Flavonoidler	15
2.3.1.1. 7,8-Dihidroksiflavon (7,8-DHF)	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler	21
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	22
3.3. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.4. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Tayini	24
3.5. 7,8-DHF ve AZM'nin Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi	26
3.6. 7,8-DHF ve AZM'nin hCAI ve hCAII İzoenzimleri İçin IC ₅₀ /AC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması	27

4. BULGULAR	28
4.1. 7,8-DHF'nin hCAI İzoenzimi Üzerine Etkisi	28
4.2. AZM'nin hCAI İzoenzimi Üzerine Etkisi	29
4.3. 7,8-DHF'nin hCAII İzoenzimi Üzerine Etkisi	31
4.4. AZM'nin hCAII İzoenzimi Üzerine Etkisi	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
6. KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	54



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. IUBMB Enzim komisyonunun (EC) enzim sınıflandırması ve katalizlediği reaksiyonlar	4
Tablo 2. Bazı flavonoid veya non-flavonoidlerin hCAI ve hCAII enzimleri için K_1 değerleri (Esteraz aktivitesi için)	17
Tablo 3. 7,8-DHF'nin bazı özellikleri	18
Tablo 4. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri	21
Tablo 5. Deneylerde kullanılan kimyasalların üretici firmaları ve ürün kodları	22
Tablo 6. Esteraz aktivitesi için kullanılan çözelti miktarları (1 mL)	27
Tablo 7. 7,8-DHF'nin farklı konsantrasyonları için hCAI izoenziminin yüzde aktivite tablosu	28
Tablo 8. AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCAI İzoenziminin yüzde aktivite tablosu	30
Tablo 9. 7,8-DHF'nin farklı konsantrasyonları için hCAII izoenziminin yüzde aktivite tablosu	31
Tablo 10. AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCAII izoenziminin yüzde aktivite tablosu	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Enzimlerin yapısı	3
Şekil 2.	Karbonik anhidrazın hidrasyon mekanizması	5
Şekil 3.	A) hCAII'nin yapısı B) hCAII'nin aktif bölgesinde Zn^{2+} 'nin koordinasyonu	6
Şekil 4.	Bazı karbonik anhidrazların nefronlardaki rolleri	12
Şekil 5.	Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	15
Şekil 6.	Flavonoidlerin iskelet yapısı	16
Şekil 7.	p-Nitrofenil asetatin karbonik anhidraz tarafından hidrolizi	25
Şekil 8.	7,8-DHF-hCAI izoenzimi için yüzde aktivite grafiği	29
Şekil 9.	AZM-hCAI izoenzimi için yüzde aktivite grafiği	30
Şekil 10.	7,8-DHF-hCAII izoenzimi için yüzde aktivite grafiği	32
Şekil 11.	AZM-hCAII izoenzimi için yüzde aktivite grafiği	33

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

7,8-DHF	7,8-Dihidroksiflavon
A₃₄₈	348 Nanometrede Absorbans
AC₅₀	Yarı Aktivasyon Konsantrasyonu
AD	Alzheimer Hastalığı
Akt	Protein Kinaz B
ATP	Adenozin Trifosfat
AZM	Asetazolamid
Aβ	Beta Amyloid
b	Işık Yolu
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CA	Karbonik Anhidraz
CAA	Karbonik Anhidraz Aktivatörü
CAIn	Karbonik Anhidraz İnhibitörü
cm	Santimetre
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CoA	Koenzim A
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DOPA	3,4-Dihidroksi-L-Fenilalanin
EA	Enzim Aktivitesi
EC	IUBMB Enzim Komisyonu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
hCA	İnsan Karbonik Anhidraz
HGMD	İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı
Hsn	Histamin
IC₅₀	Yarı İnhibisyon Konsantrasyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
K_A	Aktivasyon Sabiti
kDa	kiloDalton
K_i	İnhibisyon Sabiti
L	Litre

M	Molar
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
mCA	Fare Karbonik Anhidraz
MDA	Malondialdehid
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normal
NBCe1	Elektrojenik Na ⁺ Bikarbonat Yardımcı Taşıyıcı
NBCn2	Elektronötr Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Yardımcı Taşıyıcı
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ Değiştirici 1
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ Değiştirici 3
nm	nanometre
nM	Nanomolar
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDB	Protein Veri Bankası
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
P_i	İnorganik Fosfat
PLCγ	Fosfolipaz C Gama
p-NP	para -Nitrofenol
p-NPA	para-Nitrofenil Asetat
PubChem CID	PubChem Bileşik Kimlik Numarası
SOD	Süperoksit Dismutaz
t	time (Süre)
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
TrkB	Tropomiyosin reseptör kinaz B
U	Ünite
U	Ünite
v	Örnek hacmi
V	Toplam Hacim
vb.	Ve Benzeri

Simgeler

μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$\text{\AA}$	Angstrom
α	alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
δ	Sigma
ε	Epsilon
ζ	Zita
η	İta
θ	Tita
ι	İota
κ	Kappa

Formüller

CO_2	Karbondioksit
HCO_3^-	Bikarbonat iyonu
OH^-	Hidroksit İyonunu
$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	7,8-Dihidroksiflavon (7,8-DHF)
NaOH	Sodyum Hidroksit
H_2SO_4	Sülfürik asit
H_2CO_3	Karbonik Asit

ÖZET

7,8-Dihidroksiflavonun İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine Etkisinin *in vitro* Araştırılması

Karbonik anhidraz (CA) karbondioksitin hidrasyonunu sağlayan bir metaloenzimdir. Memelilerde 16 izoenzimi keşfedilen CA'ların 15'i insanda da bulunur. İnsan karbonik anhidraz I (hCAI) ve II (hCAII) eritrosit izoenzimleri olarak bilinirler. Bu iki izoenzim kan pH'ını düzenlenmesinde, sıvı elektrolit dengesinin sağlanmasında, solunum ve sindirimde de rol alırlar. Asetazolamid (AZM) başta olmak üzere sülfonamid sınıfı ilaçlar CA inhibitörleridir ve glokom tedavisi için kullanılmaktadır. CA'lar için izoenzim seçici inhibitör ve aktivatör arayışı sürmektedir.

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler çok zengin bir sınıfa sahiptir. Antioksidan, antidiyaretik, antialerjik, antimikrobiyal, antispazmotik, antiviral, antitromboz ve antihipertansif gibi etkiler gösterebilirler. 7,8-Dihidroksiflavon (7,8-DHF) fenolik bileşiklerin flavonoid alt sınıfının bir üyesidir. Bu bileşik Tropomiyosin reseptör kinaz B'nin agonistidir. CA üzerinde etkisi daha önce araştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, esteraz aktivitesi yöntemini kullanarak 7,8-DHF'nin hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Pozitif kontrol olarak AZM kullanıldı. Suda çözünürlüğü düşük olan 7,8-DHF'nin, %17'lik DMSO (Dimetil sülfoksit)'da 0-3 mM arasında farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. 7,8-DHF için belirtilen konsantrasyonlar arasında hCAI ve hCAII izoenzimleri %50 ve daha altında inhibisyon gözlenmedi. 7,8-dihidroksiflavonun hCAI ve hCAII için IC₅₀ değerleri hesaplanmadı. 3 mM olan maksimum 7,8-DHF konsantrasyonunda hCAI ve hCAII izoenzimleri için sırasıyla %14.1 ve %14.7 oranında inhibisyon gözlemlendi.

Sonuç olarak 7,8-DHF'nin hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisinin olmadığı görüldü.

Anahtar Sözcükler: BDNF, Enzim Kinetiği, Esteraz Aktivitesi, Fenolik Bileşik, TrkB

ABSTRACT

***in vitro* Investigation of the Effect of 7,8-Dihydroxyflavone on Human Carbonic Anhydrase I and II Isoenzymes**

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that provides hydration of carbon dioxide. Of the 16 isoenzymes discovered in mammals, 15 of the CAs are also found in humans. Human carbonic anhydrase I (hCAI) and II (hCAII) are known as erythrocyte isoenzymes. These two isoenzymes are also involved in the regulation of blood pH, fluid electrolyte balance, respiration and digestion. Sulfonamide class drugs, especially acetazolamide (AZM), are CA inhibitors and are used for the treatment of glaucoma. The search for isoenzyme-selective inhibitors and activators for CAs continues.

Phenolic compounds found in plants have a very rich class. They can show effects such as antioxidant, antidiarrheal, antiallergic, antimicrobial, antispasmodic, antiviral, antithrombosis and antihypertensive. 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF) is a member of the flavonoid subclass of phenolic compounds. This compound is an agonist of Tropomyosin receptor kinase B. Its effect on CA has not been investigated previously.

In this thesis, we investigated the *in vitro* effects of 7,8-DHF on hCAI and hCAII isoenzymes using the esterase activity method. AZM was used as a positive control. Solutions of 7,8-DHF, which has low water solubility, were prepared in 17% DMSO (Dimethyl sulfoxide) at different concentrations between 0-3 mM. Among the concentrations indicated for 7,8-DHF, no inhibition of hCAI and hCAII isoenzymes of 50% or less was observed. Therefore, IC₅₀ values for hCAI and hCAII of 7,8-dihydroxyflavone were not calculated. It showed inhibition of 14.1% and 14.7% for hCAI and hCAII isoenzymes, respectively, at a maximum concentration of 7,8-DHF of 3 mM.

As a result, 7,8-DHF had no significant inhibition effect on the esterase activity of hCAI and hCAII isoenzymes.

Keywords: BDNF, Enzyme Kinetics, Esterase Activity, Phenolic Compound, TrkB

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karbondioksit (CO₂) molekülü neredeyse bütün canlı dokularda farklı metabolik süreçlerde üretilen, ayrıca karboksilasyon gibi bazı reaksiyonlarda ise substrat olarak kullanılan bir moleküldür. Bu dengenin sağlanması için intra- ve ekstra-selüler sıvılarda karbondioksit konsantrasyonu belli bir oranda bulunur. Karbondioksit konsantrasyonunun homeostaz sınırının altında veya üstünde olması toksik etki yaratabilir. Bu nedenle canlılar bu ve benzer elzem durumlar için farklı mekanizmalar geliştirmiştir (1–3).

Karbonik anhidraz karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü iki yönlü katalizleyen bir metaloenzimdir. Tek hücreli canlılardan çok hücreli canlılara kadar çok geniş yelpazedeki canlı gruplarında bulunabilir. Bu kadar çeşitli canlı gruplarında keşfedilmiş olması onun farklı şekillerde sınıflandırılmasını sağlamıştır. Bazı canlılarda karbonik anhidrazın birden fazla alt sınıfı bulunabilir fakat memelilerde şimdiye kadar sadece alfa sınıfı karbonik anhidrazlar (α -CA'lar) bulunmuştur. Bu sınıfta bulunan 16 izoenzimin 15'i insanda da keşfedilmiştir. İnsanda çok farklı dokularda değişken oranda bulunan bu izoenzimler bulundukları dokularda önemli roller üstlenmektedir (4). Karbonik anhidrazın ilk keşfedilen izoenzimlerinden ikisi olan insan karbonik anhidrazı I ve II (hCAI ve hCAII) eritrositlerde bol miktarda bulunan sitozolik izoenzimlerdir (5, 6). hCAI nispeten hCAII'den daha fazla miktarda bulunsada hCAII'nin katalitik aktivitesi çok daha yüksektir. Eritrositlerin toplam karbonik anhidraz aktivitesini neredeyse eşit oranda paylaşmaktadırlar (7). hCAI eksikliğinin fizyolojik olarak önemli etkileri bulunmasa bile hCAII eksikliği ciddi sorunlar teşkil etmektedir (8). Bunun haricinde karbonik anhidrazın bazı hastalıklar ile ilişkisi göstermiştir (9, 10).

Enzim inhibisyonuna dayalı tasarlanmış bazı ilaçlar tıpta uzun yıllardır kullanılmaktadır (11–19). Asetazolamid [N-(5-Sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide] (PubChem CID: 1986), dorzolamid (PubChem CID: 5284549) gibi sülfonamid sınıfı bazı ilaçlar karbonik anhidrazın inhibisyonunu sağlayarak diüretik ve antiglokom olarak hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (20). Sülfonamidler dışında daha farklı kimyasal yapıya sahip CA inhibitörleri de keşfedilmiştir (21). Fakat bunların birçoğunun hem yan etkilerinin bulunması (22, 23) hem de karbonik anhidrazın birçok izoenzimi için birbirine yakın düzeylerde afinite göstermesi ilaç olarak kullanılması için bir engel oluşturmaktadır. Bunun için CA izoenzim seçici inhibitörlerin keşfi ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. (24).

Karbonik anhidrazın sadece inhibisyonu değil aktivasyonu da son zamanlarda önem kazanmıştır. Özellikle merkezi sinir sistemi/nöronlarda bol miktarda bulunan izoenzimlerinin keşfi ile, bu hücrelerin sağkalımı veya yenilenmesi için homeostazının sağlanmasında CA izoenzimlerinin önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir. CA izoenzimlerinin aktivasyonunun araştırılması özellikle nörodejeneratif hastalıklar gibi bazı hastalıklar için heyecan verici bir araştırma konusu olmuştur. Yine bu çalışma alanı içinde çok zengin bir sınıfa sahip olan karbonik anhidrazın izoenzim seçici aktivatörleri daha da önem arz etmektedir (25–31).

Bitkilerin daha çok savunma amacıyla sentezledikleri fenolik yapıli bileşiklerin tıpta tedavi amacıyla kullanılması için çalışmalar devam etmektedir. Genel olarak anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-obezite etkileri ve daha birçok patolojide bu bileşiklerin faydalı etkileri bildirilmiştir (32–34). Çok fazla sayıda ve çeşitte bulunan fenolik bileşikler farklı şekillerde sınıflandırılrsa da flavonoidler fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bir flavonoid olan 7,8-dihidroksiflavon (7,8-DHF) TrkB (Tropomiyosin reseptör kinaz B) agonisti olmasından dolayı araştırmalar çoğunlukla bu konuda yoğunlaşmıştır (35).

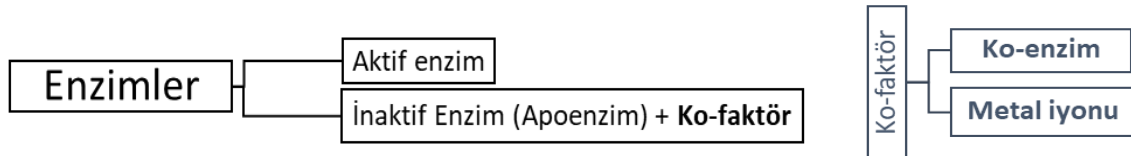
Fenolik bileşiklerin CA izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin göstermiş olması ayrıca çok farklı kimyasal yapıya sahip moleküller içeriyor olması karbonik anhidrazlar için hedeflenen izozim seçici inhibitör/aktivatör için bu bileşikleri iyi bir hedef yapmaktadır. Yaptığımız literatür araştırmasında 7,8-DHF'nin karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında 7,8-DHF'nin hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Tüm organizmalar canlılığını/soyunu devam ettirmek için sindirim, boşaltım, savunma, üreme ve daha birçok sistem geliştirmişlerdir. Bu sistemlerde keşfedilmiş ve hala da çalışılan sayısız biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir. Bunların önemli bir kısmı kendiliğinden gerçekleşebilse de çoğu zaman organizmanın ihtiyacını karşılayabilecek hıza ulaşamamaktadır. Bunun içinde “biyolojik katalizörler” olarak da bilinen “enzimler”, reaksiyonda herhangi bir değişiklik yapmadan yüksek verimlilikle organizmanın ihtiyacına göre reaksiyonu hızlandırmaktadır (11, 12, 36). Enzimin katalizlediği moleküllere substrat, bunun sonucunda oluşan moleküllere de ürün denilmektedir.

Neredeyse tüm enzimlerin yapısını temel olarak proteinden oluşturur (RNA metabolizmasında rol alan bazı katalizörler hariç). Enzimler sadece protein yapısında olabileceği gibi reaksiyonu gerçekleştirmek için proteine ilaveten koenzim (organik bir molekül) veya bazı metal iyonlarına da ihtiyaç duyulabilir. Kofaktör (Şekil 1) olarak bilinen bu molekül/iyonlar enzimin aktivitesinde çok önemli rol oynar. Bu kofaktörler proteine çok sıkı bağlar ile bağlandığında “prostetik grup” olarak bilinir (11, 36–38).



Şekil 1. Enzimlerin yapısı

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim keşifleri ve enzimler ile ilgili çalışmaların artması sonucunda IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği)’de bulunan bir komisyon tarafından enzimler sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma enzimlerin katalizledikleri reaksiyona göre 6 ana sınıfa daha sonrasında ise her biri farklı alt gruplara ayrılmıştır (Tablo 1). Her enzim noktalar ile ayrılmış 4 farklı sayıdan oluşmaktadır. Bu sayılardan ilki 6 ana sınıftan bunu takip eden diğer sayılar ise yine enzimi tanımlayan alt sınıfları belirtir (11, 38). Örneğin katalitik olarak en aktif enzimlerden biri olan Karbonik Anhidraz enzimi EC 4.2.1.1 enzim koduna sahiptir. Buna göre 4. (Liyazlar) ana sınıfına, bunlardan da C-O

bağlarını katalizleyen ve dehidratazların dahil olduğu 2. alt gruptadır. Diğer iki sayı ise enzimi tanımlayıcı alt grup numaralarıdır. Enzim komisyonu tarafından kabul edilen enzimler IUBMB tarafından oluşturulan “www.enzyme-database.org/” web sitesinde kaynakları ile bulunmaktadır (39).

Tablo 1. IUBMB Enzim komisyonunun (EC) enzim sınıflandırması ve katalizlediği reaksiyonlar (Palmer ve Bonner’den, 36; Keha ve Küfrevioğlu’ndan, 38)

EC No	Enzim Sınıfı	Katalizlediği Reaksiyonlar
EC 1	Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme/indirgenme (redoks) tepkimeleri
EC 2	Transferazlar	Fonksiyonel grupların (örn. bir metil grubu) transferi
EC 3	Hidrolazlar	Çeşitli bağların hidrolizi
EC 4	Liyazlar	Substrattan farklı grupların ayrılması/bağların kesilmesi
EC 5	İzomerazlar	İzomerasyon reaksiyonları
EC 6	Ligazlar (Sentetazlar)	Enerji kullanarak yeni bağların sentezi

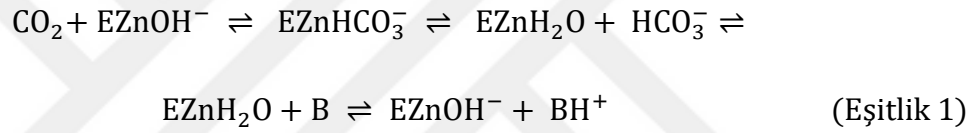
2.2. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz, IUBMB’nin (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğinin) enzim veri tabanında EC 4.2.1.1 enzim koduna ile tanımlanmıştır. Karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz, karboksianhidraz, karbonik anhidraz A, karbonat hidrolizaz gibi farklı şekillerde isimlendirilebileceği gibi en sık “Karbonik Anhidraz” kullanılmaktadır. Karbonik anhidrazın sistematik isimlendirmesi “Karbonik asit hidrolizaz” şeklindedir (40).

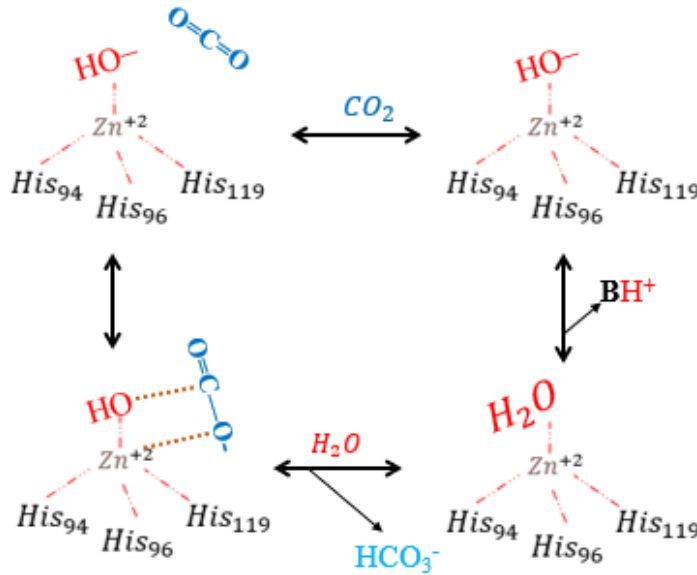
Karbonik anhidraz temel olarak canlı organizmalarda $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ dönüşümünü yani geri dönüşümlü olarak karbondioksitin hidrasyonunu, bikarbonatın ise dehidrasyonunu katalizler. Karbondioksitin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyonu non-enzimatik olarak kendiliğinden gerçekleşebilir. Bunun hızı yaklaşık olarak $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ’dir fakat çok yavaş olduğundan organizmanın ihtiyacını karşılayabilecek düzeyde değildir. Bundan dolayı farklı canlılar farklı sınıfta Karbonik anhidraz enzimlerini kullanarak bu reaksiyonu çok daha hızlı ve işlevsel kılarlar. Örneğin insan eritrositlerinde bulunan hCAII (insan

karbonik anhidrazı II) izoenzimi CO_2 hidrasyon turnover sayısını $1.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ 'a yükseltir (28, 41).

Hidrasyon yönünde reaksiyon, bikarbonatın salınması ve protonun salınması şeklinde iki aşamada gerçekleştiği kabul edilmektedir. Bunlardan ilk aşama enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} üzerinden gerçekleşir. Çinkoya bağlı hidroksitin CO_2 'ye nükleofilik saldırısı sonucunda bikarbonatın zayıf bir şekilde bağlandığı Enzim-Zn- HCO_3^- kompleksi oluşur. Elde edilen bu kompleks bir su molekülünün atağı ile bikarbonat iyonu serbest kalır ve Enzim-Zn- H_2O kompleksi oluşur. İkinci aşamada Enzim-Zn- H_2O bir protonu vererek Enzim-Zn- OH^- 'i tekrar kullanılmak üzere oluşur. Proton, bir proton alıcısına veya enzimin kendi yapısında bulunan bir kalıntıya (B) aktarılabilir (42, 43). Bu proton alıcısının hCAII izoenzimi için His₆₄'deki imidazol halkası olduğu düşünülmektedir (44).

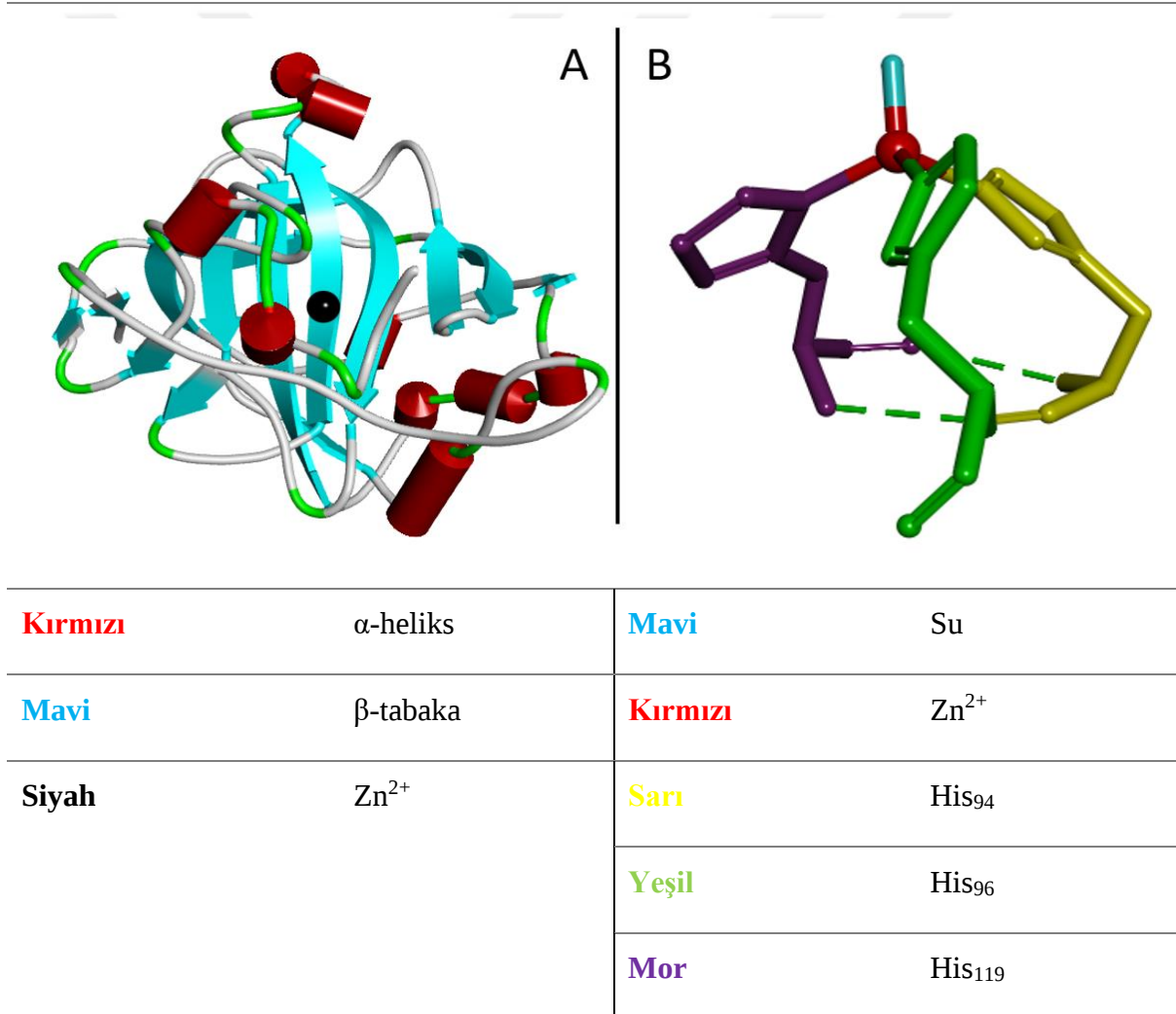


Oluşan bikarbonat iyonu $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ veya $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ gibi farklı taşıyıcılarla çeşitli fizyolojik gereksinimleri karşılamak üzere kullanılır (21).



Şekil 2. Karbonik anhidrazın hidrasyon mekanizması

Genel olarak insanlarda bulunan çoğu CA (karbonik anhidraz) izoformu (CAVI, IX ve XII hariç), yedi sağ el yönünde α -heliks ve 10 β -tabaka (iki paralel ve sekiz anti-paralel) oluşan bir bükülmüş β -tabakasından oluşan monomerik formlarda bulunur (45, 46). Birçoğu fosfat veya şeker grupları ve disülfid bağları içermezler (22). Ayrıca CA'nın aktif bölgesinde, bazı istisnaları olmakla birlikte, genellikle Zn^{2+} bulunur (42). İnsanlarda da bulunan α -CA'ların 16 izoenzimlerinin çoğunun aktif alanında bulunan üç His kalıntısı ve bir H_2O molekülü/ OH^- iyonu ile tetrahedral olarak Zn^{2+} ile koordine edilmiştir. Aktivitesini de bu Zn^{2+} iyonu üzerinden gerçekleştirdiğinden metaloenzim ailesinin bir üyesidir (Şekil 3) (47, 48).



Şekil 3. A) hCAII'nin yapısı B) hCAII'nin aktif bölgesinde Zn^{2+} 'nin koordinasyonu [PDB (Protein Data Bank): 1CA2 (49, 50), Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 programı ile çizilmiştir]

Örneğin bu tez çalışmasında kullanılacak olan hCAII (α sınıfı CA) izoformu, merkezi konumdaki çinko His₉₄, His₉₆ ve His₁₁₉ rezidüleri ve bir su/hidroksit ile tetrahedral yapıyı oluşturur (Şekil 3B). Bu izoenzimin aktif bölgesinin bulunduğu boşluk/cep yaklaşık 15 Å çapında ve merkeze doğru uzanan bir koni şeklinde tanımlanabilir. Bu boşluk iki farklı ortama bölünmüştür. Çinkonun bir tarafında, enzimin merkezine yakın bölgede, bir grup hidrofobik aminoasit (yani Val₁₂₁, Val₁₄₃, Leu₁₉₈, Thr₁₉₉-CH₃, Val₂₀₇ ve Trp₂₀₉) bulunurken çinkonun diğer tarafında, merkezden daha uzak tarafta, hidrofilik amino asitlerle (yani Tyr₇, Asn₆₂, His₆₄, Asn₆₇, Thr₁₉₉-Oyl ve Thr₂₀₀-Oyl) kaplıdır. Bu iki zıt rezidülerin bulunması enzimin substratını veya ürününü yönlendirerek reaksiyonun hızını etkilemektedir (42, 51).

2.2.1. Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması

Karbonik anhidrazın varlığına dair daha öncesinde bazı ipuçları keşfedilmiş olmasına rağmen (5, 52), bu enzim ilk kez Meldrum, N.U. ve , Roughton F.J.W. tarafından 1933 yılında eritrositlerden saflaştırılmıştır. Bu enzimin aktif bölgesinde bir Zn²⁺ içerdiği ve yaklaşık 30 kDa (kiloDalton) molekül ağırlığında olduğu belirlenmiştir (53). Ardından biri sığır (1960'da) olmak üzere birkaç memeli izoenzimi karakterize edilmiştir (52, 54). CA'lar memeliler dışında daha sonra birçok bitki ve ökaryotik alglerde de bulunmuştur (46). Böylece, CA izoenzimlerinin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunabileceği keşfedilmiştir (45). Tanımlanan iki CA sınıfı (β - ve γ -CA) ile üç ana CA sınıfının amino asit dizileri ve kristal yapılarının karşılaştırılması sonucunda farklı olduğunu ve bağımsız olarak evrimleştiği ileri sürülmüştür (47). Bu üç alt sınıfın keşfinden sonra farklı alt sınıflarda keşfedilerek sekiz farklı alt sınıf (α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι -CA) tanımlanmıştır.(55, 56). Birçok enzimde olduğu gibi CA'nın sınıflandırılması birinci (primer), ikinci (sekonder), üçüncü (tersiyer) ve dördüncü (kuarterner) yapıları, aktif bölgenin yapısı ve katalitik özellikleri esas alınarak yapılmıştır (57).

Bazı CA sınıfı enzimler bazı canlı alemlerine atfedilmiş olsa da artık bu genel olarak kabul edilmemektedir. Örneğin α -CA'nın hayvanlara, β -CA'nın bitkilere ve öbakterilere, ayrıca γ -CA'nın yalnızca arkebakterilere özgü olduğu genel fikri özümsemiş olsa da artık bu görüş kabul görmemektedir. Çünkü bazı bitkilerde α -CA ve γ -CA'lar, bazı hayvanlarda β -CA, E. Coli'de hem β - hem de γ -CA sınıfı bulunmaktadır. Ayrıca birkaç organizmada birden fazla CA tipinin varlığı da gözlenmiştir (47). İlginç bir şekilde şimdiye kadar memelilerde sadece α -CA sınıfı bulunmuştur (46).

Bitki, hayvan ve diğer alemlerde bulunan CA'lar farklı sınıflarda olsalar bile benzer moleküler özelliklere sahiptir (43). Bu izoenzimler fonksiyonel olarak özdeş biyokatalizörlerdir. CA ailesinin fonksiyonel benzerliğinin nedeni aktif Zn^{2+} merkezinden 4 Å kadar olan aminoasit dizilerindeki benzerlik olduğu, enzimler arasındaki aktivite farkının aktif bölgeden uzakta bulunan kalıntılardan dolayı olduğu düşünülmektedir (47).

2.2.1.1. Alfa- Karbonik Anhidrazlar (α -CA'lar)

Memelilerde şimdiye kadar sadece α -CA'lar bildirilmiştir. α -CA'nın da alt sınıfında 16 izoenzim bulunmaktadır. Bunlar Romen rakamlarıyla sırasıyla I-XV arasında isimlendirilmiştir. Mitokondriyal iki CA izoformu keşfedilmiş ve bunlar CAVA ve CAVB diye isimlendirilmiştir. Bu 16 izoenzimin CAXV hariç 15'i insanda bulunur ve bunlar İnsan Karbonik Anhidrazı (hCA, human Carbonic Anhydrase) şeklinde tanımlanırken CAXV izoformu insanda bulunmayıp sadece farede bulunur bundan dolayı fare Karbonik Anhidrazı (mCAXV, mouse Carbonic Anhydrase XV) şeklinde sınıflandırılmıştır (21, 57).

İnsanda kodlanan bu 15 CA'nın 12'si aktif merkezinde çinko içererek katalitik aktivite gösterir (58, 59). Bunlardan beş tanesi (CAI, II, III, VII ve XIII) sitozolik, dört tanesi (CAIV, CAIX, CAXII ve CAXIV) membrana bağlı, ikisi (CAVA ve CAVB) mitokondriyal, CAVI ise salgılanabilen izoformdur (21, 57). Bunlar dışında kalan 3 tanesi (CAVIII, CAX ve CAXI) enzim aktivitesi göstermemektedir. Bundan dolayı Karbonik Anhidraz ile ilişkili protein (CARPVIII, CARPX ve CARPXI) şeklinde de tanımlanmakta ve sitoplazmada bulunmaktadır (52, 60).

Karbonik Anhidraz II (CAII)

Karbonik anhidrazın ilk tanımlandığı yıllarda CAI, CA B olarak tanımlandığı gibi CAII ise CA C olarak bilinmekteydi. Fakat günümüzde CA ailesinin keşfinin genişlemesiyle artık bu tanımlama tercih edilmemektedir (61, 62). CAII hem ilk tanımlanan CA izoenzimlerinden biri olduğu için hem de çok yüksek aktiviteye sahip olduğundan aksi belirtilmedikçe karbonik anhidraz denildiğinde ilk akla gelen izoenzimdir. CAII, o kadar fazla çalışılmıştır ki CA ailesini temsil edebilecek düzeydedir (63).

Kırmızı kan hücrelerinde 1933 (53) yılında karbonik anhidrazın varlığı tespit edilmiş olsa da, 1961 yılında insan CAII izoenzimi saflaştırılmıştır (64) ve 1972 yılında ise yapısı tanımlanmıştır. Yaklaşık $41 \times 41 \times 47$ Å³ boyutlarında (diğer çalışmada ise $42 \times 39 \times 55$ Å³ (49), $50 \times 40 \times 40$ Å³ (65)) elips şeklinde olup 29,3 kDa molekül ağırlığına sahip

monomerik bir enzimdir. Diğer izoenzimlerde de olduğu gibi molekülün dışından içine doğru yönelen, merkezinde Zn^{2+} iyonu bulunan koni şeklinde bir aktif boşluğu bulunmaktadır (66). Toplam 260 rezidüsü bulunan CAII, tek bir polipeptit zincirinden oluşur. İlk yıllarda farklı görüşler olsa da herhangi bir disülfid bağı içermemektedir (62). Polipeptit zinciri 10 β -tabakasıyla ikiye bölünmüştür (Şekil 3A). β -tabakasına bir tarafında neredeyse dik uzanan altı adet polipeptit zinciri ve $COOH^-$ ucu bulunur. Bu altı segment birbiriyle anti-paraleldir. β -tabakasının diğer tarafında ise molekülün N-terminal ucu ve aktif bölgesi bulunur. hCAII'nin aktif bölgesi yüzeyinde yaklaşık 15 Å genişliğinde ve molekülün ortasına doğru 15 Å (başka bir çalışmada ise 8 Å olarak ölçülmüştür (67)) daralarak uzanan koni şekline benzer bir boşluktan oluşur. Bu hayali koninin en ucunda, moleküldeki iki β -tabakanın yapısında bulunan üç histidil kalıntısı ile koordine olan Zn^{2+} iyonu bulunur. Zn^{2+} iyonu fizyolojik pH'ta tetrahedral yapısını korumak için dördüncü koordinasyonunu ise OH^-/H_2O ile yapar (Şekil 3B) (49, 66). Aktif bölgesini oluşturan hayali koninin yaklaşık yarısını hidrofobik diğer yarısı ise hidrofiliktir. 91, 121, 131, 135, 141, 143, 198, 202, 204, 207 ve 209 konumlarında bulunan kalıntılar hidrofobik bölgeyi oluştururken; 62, 64, 67 ve 92 konumlarındakiler ise hidrofilik bölgeyi oluşturur (65). Hidrofobik rezidülerden biri olan His₆₄'ün enzim katalizinde önemli rolü olan proton katalizinde rol aldığı düşünülmektedir. Hatta CAI ve CAII'ye göre oldukça düşük turnover sayısına sahip olan CAIII'ün bu konumunda Lys₆₄ bulunması bu fikri destekler niteliktedir (65). Fakat CAII'de His₆₄'e yönelik yapılan bazı mutasyon çalışmaları sonucunda kataliz hızı çok az değişmesi bu fikrin doğruluğunu tartışmalı hale getirmiştir (49). Enzim aktif bölgesinin CAI'de olduğu gibi hidrofilik ve hidrofobik iki zıt yapıdan oluşması substratın enzimle daha kolay birleşmesi yani katalitik hızını arttırdığı düşünülmektedir (67).

hCAII, diğer sitozolik izoformlar olan hCAI, hCAIII, hCAVII ve hCAXIII ile sırasıyla %60, %58, %56 ve %60 oranında yüksek bir dizi benzerliğine sahiptir. Bu benzerliğin dışında enzimin katalitik aktivitesi için önemli olan yapıları da korunmuştur (65).

CAII; insan eritrositleri (68), insan trombositleri (69), rhesus maymunu (*Macaca Mulata*), sığır (*Bos taurus*) eritrositleri (70, 71), koyun karaciğeri (72), kedinin bazı dokuları (73) ve eritrositleri (*Felis domesticus*) (71), köpek (*Canis familiaris*) (71, 74), at (*Equus ferus caballus*) (71, 75), tavşan (76), Gine domuzu (*Cavia porcellus*) ve gelincik

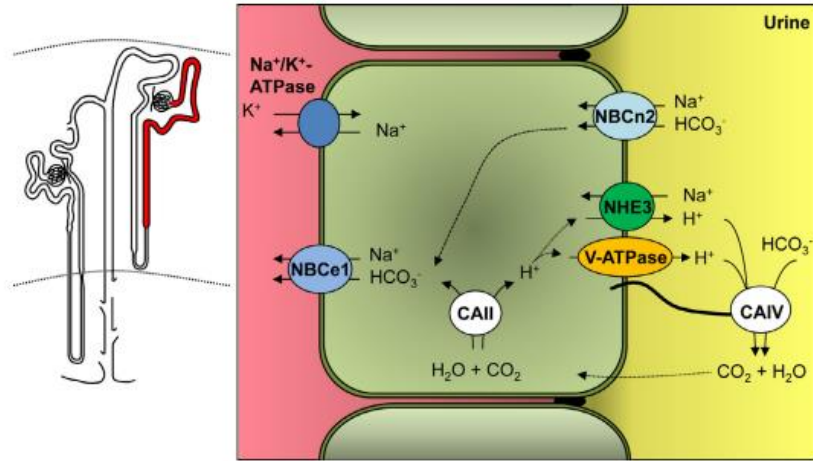
(*Mustela furo*) (71) gibi memelilerin eritrositleri ve daha birçok canlı ve dokuda bulunmuştur. CAII insanda eritrositler dışında gastrointestinal sistemde (77–79); parotis ve submandibuler bezleri, yemek borusu, mide, duodenum ve kolon, safra kanalları, safra kesesi, pankreas kanalları ve özofagus epitellerinde, merkezi sinir sisteminde (80–83), gözde (84), nefronların birçok segmentinde (proksimal tübül, inen ince kol, çıkan kalın kol ve toplama kanalında) (85), kemik dokusunda (86), karaciğer (7, 87), spermatozoa (88), duktus deferens epitel, seminal vezikül (89) ve plasenta (90) gibi çok çeşitli doku ve sistemlerde bulunur.

CAII'nin temel rolü, birçok dokuda pH'ı ve sıvı-elektrolit dengesini sağlamak, farklı mekanizmalar için bikarbonat ve H^+ ihtiyacını karşılamaktır (81). CO_2/HCO_3^- üretildiği dokulardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Hücrelerde oluşan CO_2 , kan dolaşımına oradan da eritrositlere yayılır. Hızlı izoform olan CAII başta olmak üzere eritrositlerde bulunan karbonik anhidrazlar tarafından hidratlanır. Ortaya çıkan HCO_3^- , membranı geçemediğinden eritrositin hücre zarında bulunan anyon taşıyıcılarla (AE1) Cl^- anyonu karşılığında plazmaya transfer edilir. Bikarbonat plazmada dolaşım ile birlikte akciğerlere kadar taşınır. CO_2 olarak alveolleri geçmesi için süreç tekrar tersine döner. Anyon taşıyıcılarla eritrositlere taşınır dehidrate olur böylece oluşan CO_2 eritrosit membranı ve pulmoner kılcal damarları geçerek alveollere difüzyonla taşınmış olur. Böylece kanda taşınan CO_2 miktarı artmış olur. Ekspirasyonla akciğerlerdeki CO_2 dışarı atılır (65, 91, 92). CAII dışında CAI de eritrositlerde bulunur. Miktar olarak CAII daha az bulunsada CAI'in aktivitesi CAII ye göre daha düşüktür. CAI yavaş izoform olarak bilinirken CAII hızlı izoform olarak bilinir (65).

Seminifer tübüllerde karmaşık süreçler sonucu spermatogenez ile spermatozoa oluşur. Burada oluşan spermatozoa hareketsiz olduğu için döllenme sürecine katılması mümkün görülmemektedir. Spermatozoa tübüler epidimise geçer ve burada bir ay kalabilir. Olgunlaşma evresinde buradaki epitel hücrelerin salgılarından özellikle pH'tan çok etkilenir. Epidimiste intraselüler HCO_3^- konsantrasyonu düşük ve pH yaklaşık 6,8 yani asidik olduğundan spermler hala hareketsizdir. Ejekulasyondan sonra seminal plazmada HCO_3^- konsantrasyonunun artışıyla alkali ($pH > 7.00$) olduğundan, sperm sitoplazmasının pH'ının artmasıyla (alkalileşmesiyle) sperm hücresinde hareketlilik artar. Böylece çevre doku ve sıvıdaki pH değişikliği spermin hareketliliğini etkiler. Sperm hücresi hareketlilik kazanmış olsa da çiftleşme esnasında vajinal ortam asidiktir. Bu ortamda sperm hareketinin

azaltılması beklenir fakat seminal veziküller sekresyonu esnasında yüksek konsantrasyonda HCO_3^- iyonu salgılayarak vajinal asitliği nötralize eder (93, 94). Böylece döllenme için gerekli olan sperm hareketliliğini korumuş olur. Erkek üreme kanalının birçok yerinde bikarbonat sekresyonu ve pH düzenlenmesi CA'lar tarafından sağlanır. Böbrekte de olduğu gibi epitel hücrelerin membranı ve spermatozoada bulunan bazı iyon taşıyıcı moleküllerle birlikte sitozolde CAII izoformu, hücre dışında ise membrana bağlı olarak CAIV izoformu bikarbonat/ CO_2 dönüşümünü sağlayarak hücre içi/hücre dışı pH ve HCO_3^- konsantrasyonunu düzenleyerek sperm hareketliliğine büyük ölçüde katkıda bulunur (89, 95–97).

Böbreklerin de asit-baz dengesini sağlamada önemli rolleri olduğu bilinir. Bu asit baz homeostazisini iki farklı yolla koruduğu düşünülmektedir. Bunlardan biri özellikle diyetle alınan protein metabolizmasının son ürünlerinin asidik olması ve yine diyet ürünü olan bazı içeriklerin bazik olması kan pH'ını etkilemektedir. Fakat böbrekte hücre içi ve hücre dışında bulunan tampon sistemleri ile asit-baz dengesi korunur. Bu dengeyi korumak için yeni bikarbonatlara ihtiyaç vardır. Homeostazisi sağlamak için ihtiyaç duyulan bikarbonatın neredeyse hepsi böbrek epitel hücreleriyle geri emilir (98). Glomerüllerden süzülen kanın hepsi proksimal tübül kanalına aktarılır. Transepitelyal bikarbonat taşınmasında proksimal tübül esas hücrelerinde bulunan NHE3 (Na^+/H^+ Değiştirici 3) veya H^+ -ATPaz taşıyıcılarıyla proton lümene aktarılır. H^+ ve HCO_3^- iyonları, karbonik anhidrazın membrana bağlı izoenzimlerinden biri olan CAIV (apikal CA) enzimiyle katalizlenerek CO_2 ve H_2O molekülleri oluşur. CO_2 difüzyonla tekrar proksimal tübül hücrelerine alınır. Sitozolik izoform olan CAII ile tekrar hidratlanarak Tekrar bikarbonat ve proton oluşturur. Böylece oluşan proton taşıyıcılarla tekrar lümene taşınabilir. Oluşan HCO_3^- iyonu ve Na^+ iyonu NBCe1 (Electrogenic Na^+ Bicarbonate Cotransporter) taşıyıcı proteinle kana geri verilir. Lümende bulunan bikarbonatın bir kısmı da NBCn2 (Electroneutral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter) taşıyıcı proteini ile hücreye ardından yine NBCe1 ile kana taşınabilir (Şekil 4). Böylece bikarbonatın geri emilimi sağlanmış olur. Bikarbonatın %70-85'i bu şekilde proksimal tübülden, geri kalanı da Henle kulpunun çıkan kalın kolundan geri emilir (99, 100). CAIV izoenzimi de aktivite göstermesine rağmen nefronlardaki toplam CA aktivitesinin %95'i CAII tarafından sağlanır (85).



Şekil 4. Bazı karbonik anhidrazların nefronlardaki rolleri (Wagner'den, 99)

NHE1 (Na^+/H^+ Değiştirici 1) ile sitozolik izoform CAII etkileşim içindedirler. Bu etkileşim fosforilasyon ile düzenlenir. Mitojenik sinyalleşme ile düzenlenen bu etkileşim CAII'nin taşıyıcıya bağlanmasını kolaylaştırarak NHE1 aktivitesini en azından kısmen artırır (85).

Sindirim sistemi kanalının apikal yüzeyinde Na^+ , Cl^- gibi iyonlar ve kısa zincirli yağ asitlerinin emilimi esnasında hücre içi bikarbonat iyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önce anlatıldığı gibi HNE, AE vb gibi taşıyıcılarla taşınan bu iyon ve moleküler karşılığında sindirim kanalına bikarbonat iyonu salgırlar. Bu hücreler hücre içi ve hücre dışı pH'ı korumak ayrıca absorpsiyonun devamlılığını sağlamak amacıyla membrana bağlı CA izoenzimleriyle HCO_3^- ve H^+ 'ı CO_2 ve H_2O 'ya katalizler. Oluşan CO_2 molekülü difüzyonla hücre zarını kolayca katetebilir. Böylece özellikle CAII başta olmak üzere sitoplazmik izoformlar tarafından reaksiyonun tersi katalizlenerek pH dengesi, bikarbonat ve proton iyonları ihtiyacı karşılanmış olur (101).

CAII izoformu başta olmak üzere karbonik anhidrazın bilinen bir diğer önemli rolü ise bikarbonat/karbon dioksit kullanan karboksilasyon reaksiyonlarının substrat ihtiyacını karşılamaktır. Aşağıda kısaca belirlenen reaksiyonları katalizleyen Piruvat Karboksilaz (EC 6.4.1.1), Asetil-CoA Karboksilaz (EC 6.4.1.2), Karbamil Fosfat Sentetaz I (EC 6.3.4.16), Fosfoenol Piruvat Karboksilaz (EC 4.1.1.31), Karbamil Fosfat Sentetaz II (EC 6.3.5.5), Ribuloz-1,5-Bisfosfat Karboksilaz (EC 4.1.1.39) gibi enzimler bikarbonata ihtiyaç duyarlar (39, 102). Böylece CAII ve diğerler izoenzimler karbohidrat, protein, lipid, üre ve

nükleotit metabolizması gibi birçok metabolik sürece substrat sağlayarak veya açığa çıkan metabolik ürünün tamponlanmasında rol alır (4, 101, 103, 104).

Neredeyse bütün proteinlerde olduğu gibi CAII enziminde de mutasyonlar bulunmuştur. İlk mutasyon 1983 yılında Sly ve arkadaşları (105) tarafından osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon bulguları belirlenen bir ailede yapılan araştırmalar sonucunda CAII bulunmamasıyla tanımlanmıştır. Bu duruma karbonik anhidraz Eksikliği Sendromu denilmiştir. Çok kısa bir süre sonra 1985 (106) yılında Almanya-İtalya, Belçika, Amerika Birleşik Devletleri, Suudi Arabistan, Fransa, Kuveyt, asıllı 12 ailede CAII eksikliği belirlenmiştir. Bunlar dışında Türkiye, Çin ve Japonya'daki bazı ailelerde de CAII eksikliği bulunmaktadır (107, 108). Zamanla daha ayrıntılı yapılan incelemeler doğrultusunda bu hastalarda osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon en belirgin bulgular olsa da bunlar dışında kraniyal sinir sıkışması, zekâ geriliği, psikomotor gerilik, ergenlik döneminde iskelet kırıkları, gelişim geriliği, boy kısalığı, yüz şekil bozukluğu (belirgin alın, belirgin yanaklar, mikrognati, diş dizilim bozukluğu), ovalositozlu anemi, parmakların kollar ve bacaklara göre kısa olması, retinal değişiklikler gibi belirtilerden biri veya birkaçı birlikte görülebilir. Bu belirtiler doğum ile görülen belirtiler değildir. Bireyin bebeklik döneminden sonra çocukluk ve yetişkinlik döneminde gelişen belirtilerdir (86, 105–107, 109–117). 2017 yılına kadar belirlenen mutasyonlar The Human Gene Mutation Database (HGMD) (118)'de bulunmaktadır. Bu mutasyonların bulunduğu kişilerin ebeveynlerinin yakın akraba olması birçok genetik hastalıkta olduğu gibi akraba evliliğinin bu mutasyonların genetik olarak taşınmasında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (106, 108, 119, 120).

2.2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Karbonik anhidrazın tanımlanması, saflaştırılması ve yapısının aydınlatılmasıyla birlikte inhibisyon çalışmaları da başlamıştır. Bilinen en yaygın iki CA inhibitör (CAIn) grubundan ikisi anyonlar ve sülfonamidlerdir. Bu her iki grup substratların da bağlandığı aktif bölgedeki Zn^{2+} iyonu ile etkileşime girerek protein-inhibitör kompleksini oluşturur. Protein-substrat kompleksinin oluşmasını engellendiği için enzim aktivite göstermemektedir. Aktif bölgedeki bazı diğer kalıntılar da hidrojen bağı oluşturarak bu yapıya destek sağlamaktadır (63, 121). Bunlar dışında pirazolin/pirazol, selenol, pürin/pirimidin, ftalazin, imidazol, oksadiazol, kinazolin, indol/izatin, amino ve dipeptit bazlı CA inhibitörleri de bulunmaktadır (21).

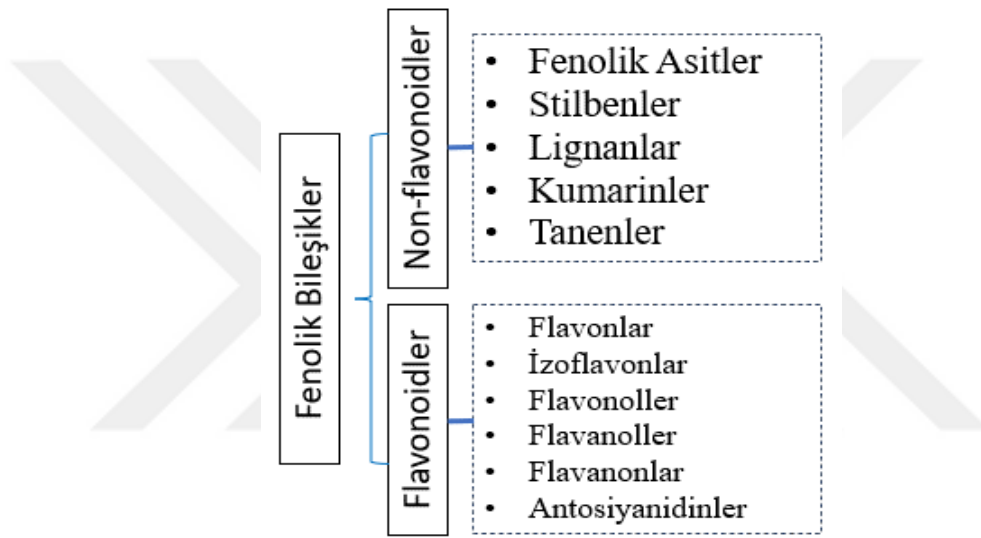
80 yıldan fazla bir süre önce keşfedilen bir CA inhibitörü (20) olan sülfonamidler ($R-SO_2NH_2$) klinikte 60 yıldan fazla bir süredir diüretik ve antiglokom olarak kullanılmaktadır. Bunlar dışında son zamanlarda antikonvülsan, antiobezite, antikanser, analjezik ve antienfektif (antifungal, antibakteriyel ve antiprotozoan) etkileri de bulunmaktadır (4, 24, 58, 122, 123). Klinikte ve CA araştırmalarında kullanılan, CA İnhibitörleri arasında ilk akla gelen Asetazolamid [N-(5-Sulfamoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide] (PubChem CID: 1986) klinikte kullanım için FDA (U.S. Food and Drug Administration/Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) onaylıdır (124–126). Asetazolamid dışında Methazolamid, Dorzolamid, Brinzolamid, Diclofenamid, Ethoxazolamid, Zonisamid, Indisulam bileşikleri klinikte kullanılan CA inhibitörlerindendir (21). İnsanda bulunan 13 aktif izoform çok farklı dokuda dağılım gösterdiği için izoform seçici ve yan etkisi daha az olan inhibitör arayışı artmaktadır (24).

Karbonik anhidraz aktivatörleri (CAA) inhibitörleri kadar araştırma konusu olmayıp şimdiye kadar klinikte rutin olarak kullanılmamaktadır. Fakat CA izoformlarının yapısının aydınlatılması ve teknolojik gelişmeler sonucunda ilgi odağı olmuş ve son yıllarda karbonik anhidrazın aktivatör çalışmaları hız kazanmıştır. CA için ilk keşfedilen aktivatörlerden biri histamindir (Hsn) (127). “Yavaş” sitozolik izoform olan CAI’e 2.1 μM aktivasyon sabitiyle (K_A) yüksek afinite gösterirken “hızlı” izoforma (CAII) ise daha düşük afinite (125 μM) gösterir. Histamin ve histidinin (D- ve L-) modifiye edilerek farklı aktivatörler de geliştirilmiştir (5, 60, 128–130). CA aktivatörlerinin klinikte kullanım amaçlarından biri CA eksikliği (örneğin hCAII eksikliği) bulunan ve ciddi sağlık problemlere sahip bireylerin tedavisidir. Bu sorunlardan etkilenen birey sayısının az olması ve tedavi maliyetlerin yüksek olmasından dolayı bu konudaki araştırmalar kısıtlı kalmıştır (28, 131).

2.3. Fenolik Bileşikler

Fitokimyasal bileşiklerin bugüne kadar tahıllar, meyve, sebze, tohum, bazı bitkiler ve bunların endüstriyel ürünlerinden toplam binden fazla türü keşfedilmiştir. Bu bileşikler antioksidan, antidiyaretik, antialerjik, antimikrobiyal, antispazmotik, antiviral, antitromboz ve antihipertansif aktivite gösterebilirler (132, 133). Çeşitli sayılarda aromatik halka/fenol grubu içeren fitokimyasallar fenolik bileşikler olarak gruplandırılır. Fenolik bileşikler yapısında en az bir hidroksil ve aromatik halka (fenol) içeren organik bileşiklerdir (134). Bu bileşikler tüketilebilen ve tüketilemeyen birçok besin/bitkinin yapısında bulunabilir. Bu

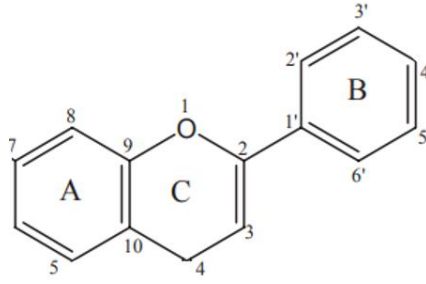
bileşikler bitkilerde çoğalma, savunma gibi mekanizmalarda rol alırlar. Ayrıca, fenolik bileşik bulunduran bazı besinlerin tüketilmesiyle birlikte insanlarda da önemli yararlı etkiler sağlanır. Fenolik bileşikler kimyasal yapısına, tüketim durumuna, içerdiği fenol sayısına, biyolojik etkilerine, çözünübilirliğine, bulunduğu besin/bitkilerin çeşidine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir (135). Fenolik bileşiklerin en büyük grubunu oluşturan flavonoidler ve diğerleri (non-flavonoidler) şeklinde sınıflandırma yapmakta mümkündür. Non-flavonoidler; fenolik asit, stilben, lignan, kumarin, tanen gruplarından oluşmaktadır (Şekil 5) (136, 137).



Şekil 5. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

2.3.1. Flavonoidler

Fenolik bileşiklerin önemli bir bölümünü oluşturan flavonoidler biyoflavonoidler olarak da bilinirler. Genel olarak flavon, izoflavon, flavonol, flavanol, flavanon ve antosiyanidin olarak sınıflandırılabilir (Şekil 5) ve bulundukları bitkilere renk kazandırır (136, 137). Flavonoidler tipik olarak $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletine sahip A-, B- ve C-halkalarından oluşmaktadır (Şekil 6) (134). Daha spesifik olarak bir benzopiran (kromen, A-C) parçasına bağlı aromatik bir halka flavonoidlerin temel yapısını oluşturur (135).



Şekil 6. Flavonoidlerin iskelet yapısı

Flavonoidler anti-inflamatuar, anti-oksidan özellikleri içerdikleri aromatik halkalar ve hidroksil grubu sayısına göre değişmektedir. Serbest radikallere karşı kararlı bir durum sergilemesi sonucunda elektron vererek etki göstermektedirler (133). Bunlar dışında kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde de rol alarak anti-diyabetik ve anti-obezite etkisi de gösterebilmektedirler (138). Ayrıca tüketilen besinlere katkı maddesi olarak eklenerek oluşturulan fonksiyonel besinlerden de benzer faydalar sağlanabilmektedir (139).

Flavonoidlerin her bir alt grubu farklı şekillerde anti-inflamatuar/anti-kanser etki gösterse de, genel olarak çeşitli nedenlerle (sitokinler, oksidatif stres, radyasyon, tütün kullanımı vb.) inflamasyon sürecini başlatan NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B) yolunun inhibisyonunu sağlayarak transkripsiyon düzeyinde etki etmektedirler. Bu şekilde etki gösteren flavonoidlerin bazıları şunlardır: luteolin, apigenin, Chrysin, quercetin, mirisetin, naringenin, genistein, equol gibi (140).

Yapılan çalışmalarda luteolin (3',4',5,7-Tetrahidroksiflavon) ve diosmetin (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon) dışında diğer bazı fenolik bileşiklerin hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerine 2.02-11.38 μ M (mikromolar) arasındaki IC₅₀ (yarı inhibisyon konsantrasyonu) değerleri ile inhibisyon yaptıkları gösterilmiştir (22). Flavonoidlerin hCAI ve hCAII izoenzimlerine esteraz aktivitesine farklı düzeylerdeki inhibisyonları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Bazı flavonoid veya non-flavonoidlerin hCAI ve hCAII enzimleri için K_i değerleri (Esteraz aktivitesi için)

Bileşik	hCAI (K_i μ M)	hCAII (K_i μ M)	Referans
Kuersetin	3.6	2.4	(141)
Kateşin	6.8	6.2	
Apigenin	4.1	2.7	
Luteolin	2.2	0,74	
Morin	12.8	4.4	
Fenol	17.3	7.4	(22)
Katekol	4014	11.4	
Tirozol	9.17	14.21	
Hidroksitirosol	4.66	12.75	
Luteolin	1.82	5.16	
Diosmetin	3.25	5.02	(142)
Kafeik asit	5.92	5.65	
Luteolin 7-O-glikozit	1.66	1.49	
Apigenin 7-O-glikozit	2.74	2.83	
Resveratrol	4.47	2.86	
Silimarın	7.12	6.93	(142)
Dobutamin	9.25	7.21	

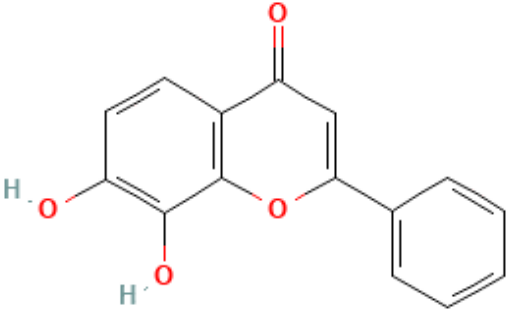
Yaptığımız literatür araştırmasında yine bir flavonoid olan 7,8-DHF'nin karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisini araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

2.3.1.1. 7,8-Dihidroksiflavon (7,8-DHF)

Tropoflavin olarak da bilinen 7,8-dihidroksiflavon (7,8-DHF) *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens* ve çuha çiçeği yapraklarında doğal olarak bulunmaktadır (143). İsminden de anlaşılacağı gibi yapısında iki hidroksil grubu içeren flavonol

grubuna dahil bir flavonoiddir. Suda sınırlı oranda çözülen 7,8-DHF glikozilasyon ve metilasyon gibi farklı işlemlerle çözünürlüğü değiştirilebilir, fakat bu işlemlerin biyoyararlılığa nasıl etki ettiği yeterince araştırılmamıştır (144). Etanol, DMSO (Dimetil sülfoksit) ve DMF (Dimetilformamid) gibi çözücülerde daha iyi çözünmektedir (145). Tedavi edici etkisini araştırmak amacıyla yüksek konsantrasyonda bu çözücülerde çözülmesi hücre canlılığını olumsuz etkileyebilmektedir (146).

Tablo 3. 7,8-DHF'nin bazı özellikleri

	Tropoflavin	
	7,8-dihidroksiflavon	
	7,8-dihidroksi-2-fenil-4H-kromen-4-on	
	7,8-dihidroksi -2-fenil-4H-1-benzopiran-4-on	
	PubChem CID	1880
(www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	Moleküler Formül	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
	Moleküler Ağırlık	254.24 g/mol
	Fiziksel Özellik	Soluk sarı (toz)

7,8-DHF TrkB (Tropomiyosin reseptör kinaz B)'nin agonisti ve onu aktive eden BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör)'ün de mimetiğidir (35, 147). Nörotrofinler nöronların gelişimi, farklılaşması ve sağ kalımında görev alan bir protein ailesidir. CNS (Merkezi Sinir Sistemi)'de en yaygın bulunan nörotrofin BDNF'dir. Aksonal ve dentritik büyümede rol alır (148). BDNF, TrkB bulunan hücrelerde ekstraselüler alandan bu reseptöre bağlanarak reseptör dimerizasyonu ve ardında oto-fosforilasyon sonuçta hücre içi bir dizi sinyal iletimini başlatır. Bu sinyalleşmenin başlamasıyla fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) yolu, PLCγ (Fosfolipaz C Gama) yolu ve MAPK (Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz) yolunu aktive edilerek hücre için önemli sinyaller tetiklenmiş olur (149). Bu sinyal yollarının etkilenmesi sonucu sinir hücreleri büyür, olgunlaşır ve nöronlar arası ağ oluşturma yetenekleri artar (150). Nöronlarda bu süreçlerin gerçekleşiyor olması BDNF ve

TrkB sinyal yolunun öğrenme, hafıza, duygu düzenleme ve diğer bilişsel işlevler gibi birçok beyin fonksiyonunda önemini ortaya koymaktadır. Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için bu molekül ve yolak ilgi çekici bir alandır (151).

BDNF/TrkB sinyal yolağının AD ve diğer nörodejeneratif hastalıkları ile ilişkisinin bulunması, TrkB agonisti olan 7,8-DHF molekülünün bu süreçlerle olan ilişkisine dair merakları artırmıştır. 7,8-DHF'nin BDNF'ye göre boyutunun daha küçük olup uzun yarılanma ömrüne sahip olması ve kan-beyin bariyerini geçebiliyor olması onu klinik uygulamalarda da kullanılabilmesi için destekler niteliktedir (149). AD için yapılan çalışmalarda 7,8-DHF nöronal sağ kalıma destek olduğu ve hafıza düşüşünü engellemekte önemli olabileceği bulunmuştur (152). Başka bir çalışmada AD hastalığı gelişiminde önemli bir rolü olan kortikal A β (Beta Amyloid) plak birikimini azalttığı bulunmuştur (153).

7,8-DHF benzer şekilde olumlu etkileri olsa da oral alımda absorpsiyonun sınırlı olması sebebiyle genellikle invaziv yollarla uygulanmaktadır. Per-oral biyoyararlılığını arttırmak ve farmakokinetik özelliklerini arttırmak amacıyla pro-ilaç çalışmaları yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (154).

7,8-DHF sadece nörodejeneratif hastalıklarda değil nöron hasarı, depresyon gibi diğer beyin-sinir hastalıklarında da olumlu sonuçlar vermektedir. Örneğin travmatik beyin hasarında davranışsal ve moleküler işlev bozukluğunu azaltır ve hasar sonrası biliş düzeyinde olumlu sonuçlar verir (155). Başka bir çalışmada 7,8-DHF oluşturulan hafif kronik stres modelinde antidepresan etkiler göstermiştir (156). İskemik inmede glukoz ve oksijen yokluğu sonucu gelişen nöronal hasarda 7,8-DHF tedavisi TrkB/Akt (Protein Kinaz B)sinyal yolunu aktif ederek nöronlarda koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (157). Ayrıca güçlü antioksidan aktivitesi ile nöroprotektif etki sağlamaktadır (146).

7,8-DHF sinir sistemi dışında da olumlu etkileri vardır. Kafeterya diyeti ile indüklenmiş bir metabolik sendrom modelinde 7,8-DHF insülin duyarlılığını artırdığı, metabolik anormallikleri iyileştirdiği, karaciğer ve pankreasta endoplazmik retikulum stresini azalttığı, apoptozu hafiflettiği (158) ve aynı diyetle indüklenen obezitede renal oksidatif stresi de azalttığı bulunmuştur (159). Bir diğer çalışmada yaşlı farelerde MDA (malondialdehid) seviyesini düşürüp SOD (Süperoksit Dismutaz) konsantrasyonlarını arttırarak karaciğerde oksidan stresi azaltmıştır. Sağlıklı yaşlanma için yararlı bir ajan olarak önerilmiştir (160).

Sonuç olarak gerek TrkB agonisti olmasından dolayı nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmesi amacıyla trend olan, gerek diğ er birçok flavonoid gibi antioksidan etki göstermiş olmasından dolayı, tez çalışmasında son zamanlarda ilgi odağı olan 7,8-DHF'nin hCAI ve hCAII aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler

Tez çalışmamızda kullandığımız cihaz, ekipman ve malzemelerin marka/modelleri Tablo 4’te belirtilmiştir.

Tablo 4. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri

Cihaz, Ekipman ve Malzeme	Marka/Model
Saf su cihazı	ELGA PURELAB® Classic
Soğutucu dolap	Hotpoint Ariston NMTL 1928 FW
Hassas terazi	METTLER TOLEDO AB204-S Analitik Terazi
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vorteks Genius 3
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA RH BASIC 2
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Yarı-otomatik pipet (1-20 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (20-200 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (100-1000 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (1-5 mL)	Eppendorf
pH-metre	HANNA Instruments HI 2211 pH/ORP Meter
Kuvartz Spektrofotometre Küveti	Agilent Technologies

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmamız da Tablo 5'te belirtilen kimyasallar ve çözeltiler kullanılmıştır. Bunların üretici firmaları ve ürün kodları belirtilmiştir.

Tablo 5. Deneylerde kullanılan kimyasalların üretici firmaları ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firmalar ve Ürün Kodları
İnsan eritrosit karbonik anhidraz I	Sigma-Aldrich C4396-1MG
İnsan eritrosit karbonik anhidraz II	Sigma-Aldrich C6165-5MG
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma-Aldrich T1503-1KG
p-Nitrofenil Asetat	Sigma-Aldrich N8130
Asetazolamid	Sigma-A-6011
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma
H ₂ SO ₄ (Sülfürik asit)	Sigma
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Thermo Scientific Oxoid BR0014G
Aseton	Sigma, 650501
7,8-Dihydroxyflavone	Cayman Chemical – 16946

3.3. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmamızda kullandığımız çözeltilerin nasıl hazırlandığı ve bunlar hakkında saklanması/kullanılması gereken öneriler aşağıda belirtildiği gibidir. Aksi belirtilmedikçe çözeltiler kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklandı. Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kullanılan bütün çözeltiler deneylerden hemen önce oda sıcaklığına getirildi.

50 mL, 1 N NaOH Çözeltisi: 2 g NaOH yaklaşık 40-45 mL saf suda çözüldü daha sonrasında balon joje ile 50 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larını ayarlamak ve asetazolamid çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

50 mL, 1 M H₂SO₄ Çözeltisi: Yoğunluğu 1.84 g/mL olan %98'lik stok H₂SO₄'den 2.7 mL alınıp yaklaşık 40-45 mL saf suya eklendi. Sonrasında balon joje ile üstü 50 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerinin pH'larını ayarlamak için kullanıldı.

500 mL, pH = 7.4 olan 0.05 M Tris-SO₄ Tampon Çözeltisi: 3.03 g Tris yaklaşık 400-450 mL saf suda çözüldü. 1 M H₂SO₄ çözeltisi ile pH'sı 7.4 olarak ayarlandı. Sonrasında hacmi 500 mL'ye tamamlandı. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ölçümlerinde tampon çözelti olarak kullanıldı. Stok karbonik anhidraz çözeltilerini seyreltmek ve asetazolamid çözeltisi hazırlamak için de kullanıldı.

50 mL, 3 mM p-Nitrofenil Asetat (p-NPA) Çözeltisi: 27.2 mg p-nitrofenil asetat tartılıp 1 mL asetonda çözüldü. 49 mL saf su opak bir erlenmeyerde manyetik karıştırıcının üzerine karıştırılırken hazırlanan aseton ve p-nitrofenil asetat çözeltisi yavaşça suya damlatılıp çözülmesi beklendi. Bu çözelti günlük olarak deneyden hemen önce hazırlandı. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi için substrat olarak kullanıldı.

167 µg/mL hCAI Çözeltisi: 1 000 µg/mL (100–500 Wilbur-Anderson Ünite/mg protein) (161) stok hCAI çözeltisinden 1:5 oranında Tris-SO₄ tamponu ile seyreltildi.

100 µg/mL hCAII Çözeltisi: 1 000 µg/mL (3 713 Wilbur-Anderson Ünite/mg protein) (162) bulunan stok hCAII çözeltisi 1:9 oranında Tris-SO₄ tamponu ile seyreltildi.

0,01M pH = 7.4 PBS: Bir tablet PBS 100 mL saf suda çözüldü. NaOH ile pH'ı 7.4'e ayarladı.

%17'lik DMSO (V/V) Çözeltisi: 1.7 mL saf DMSO 8.3 mL PBS ile karıştırıldı. 7,8-DHF'nin CA aktivitesine etkisini ölçerken kör olarak kullanıldı. Ayrıca stok 7,8-DHF'nin daha seyreltik konsantrasyonlarını hazırlamak için de kullanıldı.

47.2 mM Stok 7,8-DHF Çözeltisi: 24 mg 7,8-DHF 2 mL saf DMSO'da çözüldü. Daha seyreltik 7,8-DHF çözeltileri hazırlamak için stok çözelti hazırlandı.

5 mM 7,8-DHF Çözeltisi (%17'lik DMSO'da Çözülmüş, 3 mL): 317 µL stok (12 mg/mL) 7,8-DHF çözeltisi, 193 µL saf DMSO ve 2 490 µL PBS çözeltisi karıştırıldı. 7,8-DHF'nin karbonik anhidraz aktivitesine etkisini araştırmak için kullanıldı. Ayrıca daha

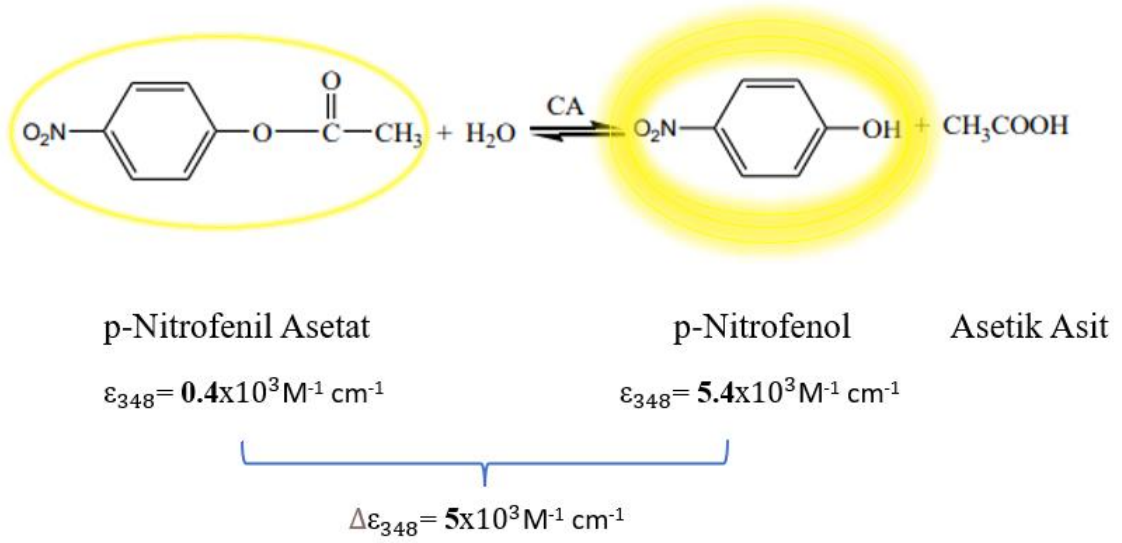
düşük konsantrasyonda 7,8-DHF çözeltisi hazırlanılması için kullanıldı. 5 mM 7,8-DHF çözeltisinden %17'lik DMSO çözeltisi kullanılarak 3, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mM ve daha düşük konsantrasyonlarda 7,8-DHF çözeltileri hazırlandı.

Asetazolamid Körü Çözeltisi: 0.1 mL 1 N NaOH çözeltisi ve 4.9 mL Tris-SO₄ çözeltisi karıştırıldı. Asetazolamid körü olarak kullanıldı.

Asetazolamid Çözeltileri: 111 mg asetazolamid 1 mL 1 N NaOH 'da çözüldü. Tris-SO₄ tamponu ile son hacmi 50 mL'ye tamamlandı (0.01 M). Asetazolamid körü çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonlarla daha seyreltik çözeltiler hazırlandı.

3.4. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidrazın aktivitesini belirlemek için en sık kullanılan iki aktivite tayin yöntemi vardır bunlardan biri hidrataz aktivitesi tayini iken diğeri esteraz aktivitesi tayinidir (163). Bu çalışmada kinetik ölçümlerde daha çok tercih edilen Verpoorte ve arkadaşlarının (164) geliştirdiği esteraz aktivitesi tayini yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi; karbonik anhidrazın bir substratı ve neredeyse renksiz olan p-nitrofenil asetatı (p-NPA) renkli olan p-nitrofenol (p-NP) ve asetata hidrolizi (Şekil 7) sonucunda oluşan renk farkının spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Oluşan p-nitrofenolden kaynaklı renk farkı 348 nm dalga boyunda 3 dakika süre ile absorbans değişimi olarak takip edilir. Reaksiyon sonucunda p-nitrofenol ve p-nitrofenolat oluşabilir. Her iki molekülde 348 nm'de aynı absorbansı verirler. Fenol grupları ise asidik olduklarından deney ortamının pH'ına göre fenolat ve H⁺ iyonlarına ayrışabilse de yine ölçümün yapıldığı dalga boyunda absorbansı etkilemez. Böylece bu değişiklikler karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ölçümünde herhangi interferans oluşturmaz. p-Nitrofenil asetatın hidroliz reaksiyonu şu şekildedir;



Şekil 7. p-Nitrofenil asetatın karbonik anhidraz tarafından hidrolizi

Lambert-Beer Kanuna göre spektrofotometrede okunan absorpsiyon şu şekilde tanımlanır (165):

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Eşitlik 2})$$

A: Absorbans

ϵ : Molar absorpsiyon (sönümlenme veya ekstinksiyon) katsayısı ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

c: Konsantrasyon (M)

b: Işık yolu (cm)

p-nitrofenil asetat ile p-nitrofenol arasındaki molar absorpsiyon katsayısı farkı ($\epsilon = 5.4 \times 10^3 - 0.4 \times 10^3 = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (164) ve kullanılan küvetin ışık yolu (1cm) sabit olduğundan dolayı 3 dakika boyunca gözlemlenen absorbans değişim (ΔA) hızı çözeltide bulunan substrat konsantrasyonu (c) ile doğru orantılıdır. Gözlemlenen absorbans değişimi (ΔA) karbonik anhidrazın aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Karbonik anhidraz aktivite ölçümü için 1mL'lik kuvartz küvete öncelikle 467 μL Tris- SO_4 tamponu ve 33 μL enzim (hCAI veya hCAII) eklendi. Bu karışım 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında 500 μL 3 mM p-NPA çözeltisi eklenerek hemen spektrofotometre ile 348'nm de okundu (Tablo 6). Absorbans değişim farkı 3 dakika boyunca takip edildi. Her bir örnek için üç kere ölçüm yapıldı elde edilen verilerin ortalamaları alındı. Enzimin aktivitesi şu formül kullanılarak hesaplandı:

$$EA \text{ (U/L)} = \frac{\Delta A \times V \times 10^6}{\epsilon \times b \times t \times v} = \frac{\Delta A \cdot 1000 \mu\text{L} \times 10^6}{5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 3 \text{ dk} \times 33 \mu\text{L}}$$

$$= \Delta A \times 2020 \mu\text{mol/dk/L} = \Delta A \times 2020 \text{U/L} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

EA: Enzim Aktivitesi (U/L)

ΔA : 3 dakika sonundaki absorbands değişimi

V: Toplam hacim (μL)

ϵ : Molar absorpsiyon (sönümlenme veya ekstinksiyon) katsayısı ($5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b: Işık yolu (1 cm)

t: Süre (3 dk)

v: Örnek hacmi

U: Ünite

3.5. 7,8-DHF ve AZM'nin Karbonik Anhidraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz aktivitesinin ölçüldüğü aynı 1 mL'lik küvetlere 433 μL Tris- SO_4 tamponu, 33 μL enzim (hCAI veya hCAII) ve 33 μL numune (7,8-DHF çözeltisi, AZM çözeltisi veya bu çözeltilerin körleri) eklenip 5 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında bütün ölçümler için eşit olarak 500 μL 3 mM p-NPA çözeltisi eklenerek (Tablo 6) hemen spektrofotometre ile absorbands değişimi okundu. 7,8-DHF ve AZM'nin farklı konsantrasyonları kullanıldı. Her bir konsantrasyon için ölçülen değer kendi köründen çıkartılarak elde edilen fark enzim aktivitesini belirlemek için kullanıldı. Hem 7,8-DHF hem de AZM çözeltilerin körlerinin aktiviteleri %100 kabul edilerek diğer konsantrasyonlardaki çözeltiler bunlarla karşılaştırılarak aktiviteleri yüzde olarak belirlenmiş oldu.

7,8-DHF'nin hem hCAI hem de hCAII izoenzimlerin aktivitesini belirlemek için yüksek 7,8-DHF konsantrasyonlarında okuma yaparken yüksek absorbandlarda değerler çıkabilmektedir. Eşit koşullarda deneyin sürdürülmesi amacıyla bütün 7,8-DHF konsantrasyonları için okuma yaparken her bir numune için kör okunurken reaksiyon başlatıldıktan hemen sonra spektrofotometre sıfırlandı ve 3 dakika sonra farkı alındı.

Tablo 6. Esteraz aktivitesi için kullanılan çözelti miktarları (1 mL)

Kullanılan Çözelti	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL) (hCAI/hCAII)	AZM (µL)	7,8-DHF (µL)	p-NPA (µL)	Toplam (µL)
Enzim Körü	500	-	-	-	500	1 000
Enzim	467	33	-	-	500	1 000
AZM Körü	467	-	33	-	500	1 000
AZM	434	33	33	-	500	1 000
7,8-DHF Körü	467	-	-	33	500	1 000
7,8-DHF	434	33	-	33	500	1 000

3.6. 7,8-DHF ve AZM'nin hCAI ve hCAII İzoenzimleri İçin IC₅₀/AC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

IC₅₀/AC₅₀ (yarı inhibisyon/aktivasyon konsantrasyonu), herhangi bir molekülün bir enzimin aktivitesini %50 oranında azaltan/arttıran inhibitör/aktivatör konsantrasyonunu tanımlamak için kullanıla bir ifadedir. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0.2 Windows uygulaması kullanılarak “Analyze/Nonlinear Regression/[inhibitör] vs response” yoluyla hem grafikler (aktivite/konsantrasyon) oluşturuldu hem de IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu grafik ve IC₅₀ değerleri her bir bileşik için ayrı ayrı oluşturuldu ve hesaplandı.

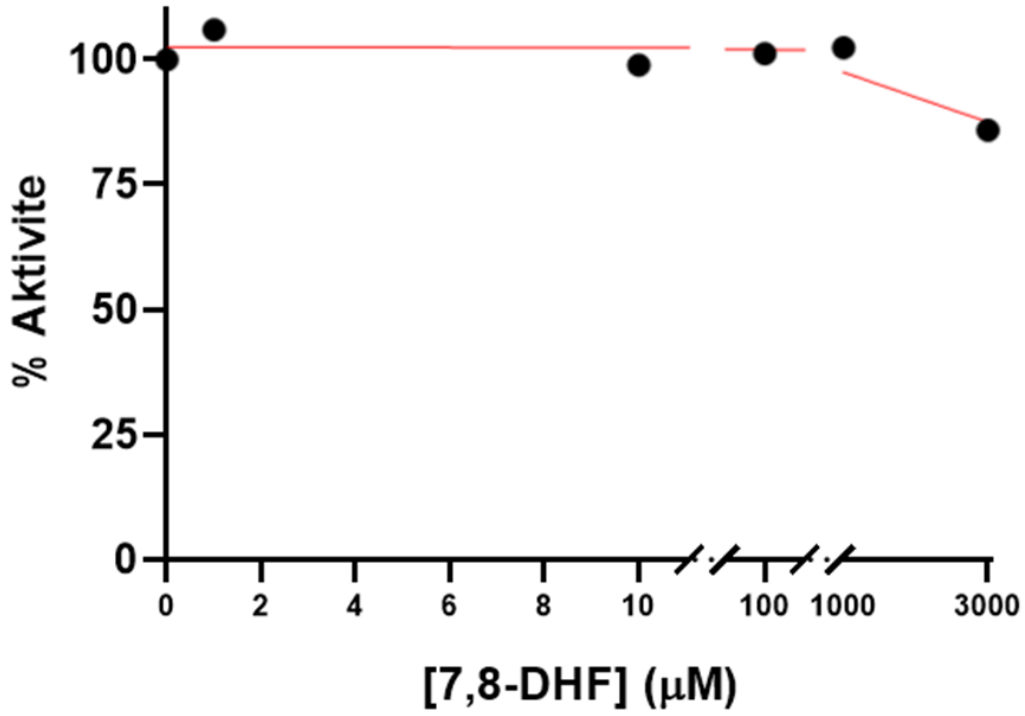
4. BULGULAR

4.1. 7,8-DHF'nin hCAI İzoenzimi Üzerine Etkisi

7,8-DHF'nin hCAI izoenzimi üzerine *in vitro* etkisini gösteren bulgular Tablo 7 ve Şekil 8'de gösterilmiştir. 0-3 mM arasında 6 farklı 7,8-DHF konsantrasyonuyla yapılan ölçümlerde 0-1 mM arasındaki 7,8-DHF konsantrasyonlarında anlamlı bir değişiklik görülmezken 3 mM 7,8-DHF konsantrasyonunda %14.1 oranında bir inhibisyon gözlemlenmiştir. %50 ve daha fazla oranda bir inhibisyon ölçülmediği için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Tablo 7. 7,8-DHF'nin farklı konsantrasyonları için hCAI izoenziminin yüzde aktivite tablosu

[7,8-DHF] (mM)	Enzim Aktivitesi (U/L)	% Aktivite
0	85.85	100
0.001	90.90	105.9
0.01	84.84	98.8
0.1	86.86	101.2
1	87.87	102.4
3	73.73	85.9



Şekil 8. 7,8-DHF-hCAI izoenzimi için yüzde aktivite grafiği

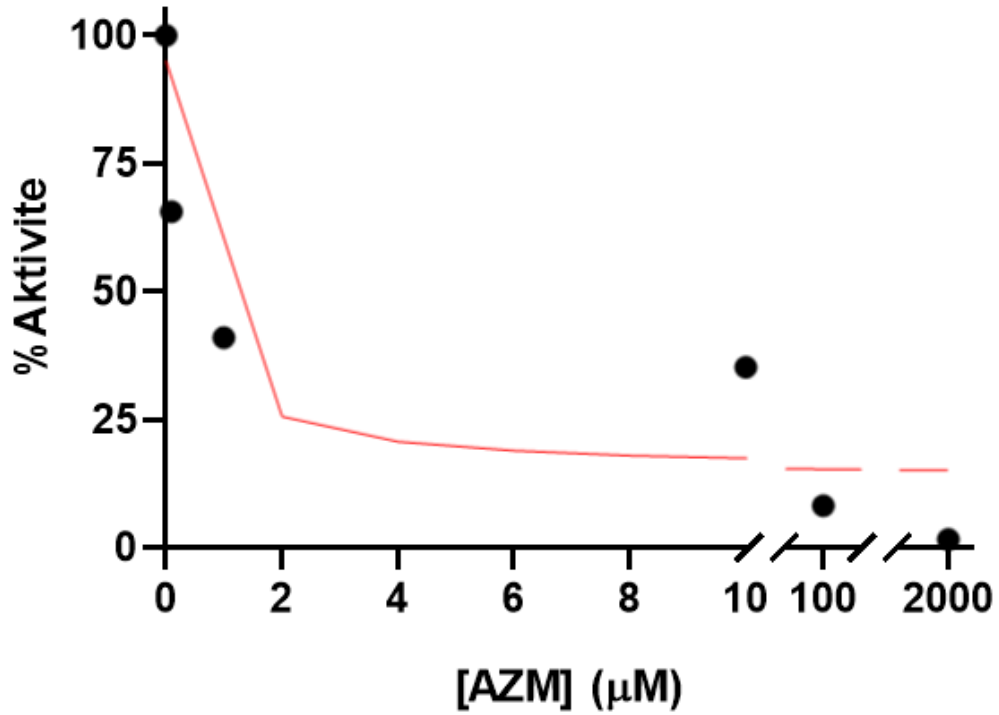
4.2. AZM'nin hCAI İzoenzimi Üzerine Etkisi

7,8-DHF'nin hCAI izoenzimi üzerine *in vitro* etkisini belirlemek için pozitif kontrol olarak en çok kullanılan inhibitörlerden biri olan asetazolamid tercih edilmiştir. 0-10 mM aralığında 8 farklı asetazolamid konsantrasyonuyla hCAI 'in aktivitesine etkisi ölçüldü (Tablo 8 ve Şekil 9). Bu ölçümler doğrultusunda 2 mM ve daha yüksek asetazolamid konsantrasyonlarında hCAI neredeyse aktivite gösterememiştir (%98.4 inhibisyon). Elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar sonucunda IC₅₀ değeri 0.304 μM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 8. AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCAI İzoenziminin yüzde aktivite tablosu

[AZM] (mM)	Enzim Aktivitesi (U/L)	% Aktivite
0	123.22	100
0.0001	80.80	65.6
0.001	50.50	41
0.01	43.43	35.2
0.1	10.1	8.2
2	2.02	1.6
5*	2.02	1.6
10*	2.02	1.6

* IC₅₀ hesaplanırken hesaba katılmadı



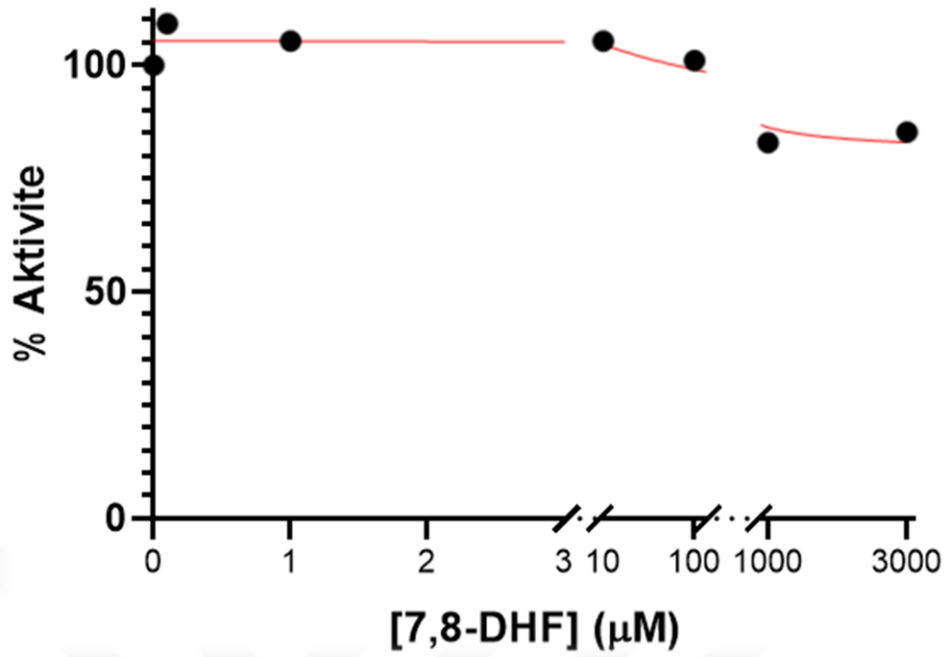
Şekil 9. AZM-hCAI izoenzimi için yüzde aktivite grafiği (IC₅₀:0.304 μM)

4.3. 7,8-DHF'nin hCAII İzoenzimi Üzerine Etkisi

7,8-DHF'nin hCAII izoenzimi üzerine *in vitro* etkisini gösteren bulgular Tablo 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. 0-3 mM arasında 7 farklı 7,8-DHF konsantrasyonuyla yapılan ölçümlerde 0-0.1 mM arasındaki 7,8-DHF konsantrasyonlarında anlamlı bir değişiklik görülmezken 1-3 mM 7,8-DHF konsantrasyonlarında %17.1-14.8 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir. %50 ve daha yüksek oranda inhibisyon ölçülmediği için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Tablo 9. 7,8-DHF'nin farklı konsantrasyonları için hCAII izoenziminin yüzde aktivite tablosu

[7,8-DHF] (mM)	Enzim Aktivitesi (U/L)	% Aktivite
0	285.83	100
0.0001	312.09	109.2
0.001	300.98	105.3
0.01	300.98	105.3
0.1	288.86	101.1
1	236.95	82.9
3	243.81	85.3



Şekil 10. 7,8-DHF-hCAII izoenzimi için yüzde aktivite grafiği

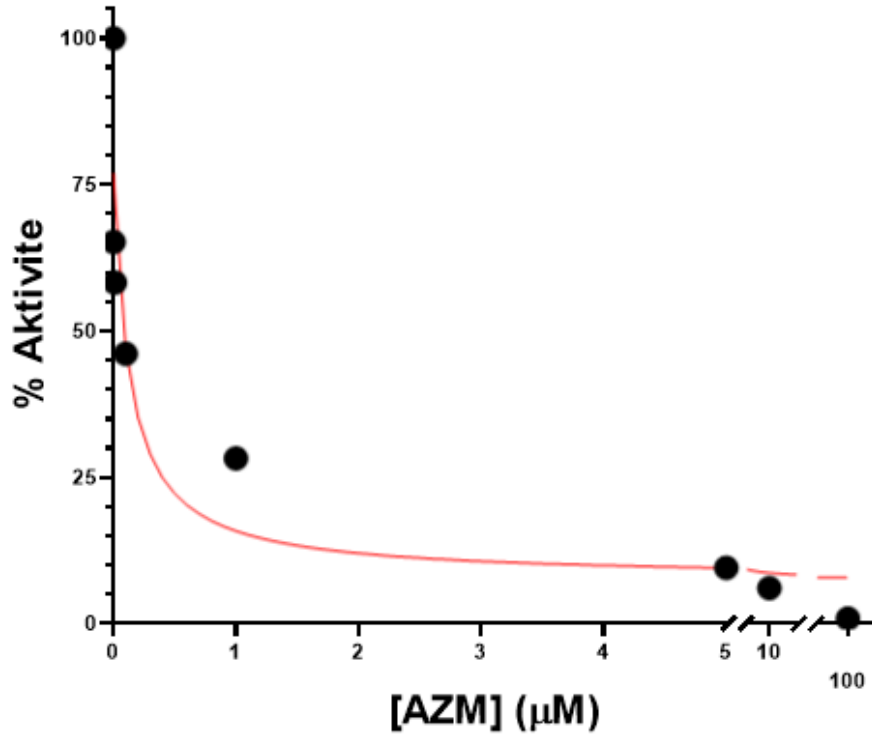
4.4. AZM'nin hCAII İzoenzimi Üzerine Etkisi

7,8-DHF'nin hCAI izoenzimi üzerine *in vitro* etkisini belirlemek için pozitif kontrol olarak en çok kullanılan inhibitörlerden biri olan asetazolamid tercih edilmiştir. 0-10 mM aralığında 10 farklı asetazolamid konsantrasyonu ile hCAII'nin aktivitesine etkisi ölçüldü (Tablo 10 ve Şekil 11). Bu ölçümler doğrultusunda 0.1 mM ve daha yüksek asetazolamid konsantrasyonlarında hCAII neredeyse aktivite gösterememiştir (%99.1 inhibisyon). Elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar sonucunda IC_{50} değeri 0.132 μ M olarak hesaplanmıştır.

Tablo 10. AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCAII izoenziminin yüzde aktivite tablosu

[AZM] (mM)	Enzim Aktivitesi (U/L)	%Aktivite
0	232.3	100
0.000001	151.5	65.2
0.00001	135.34	58.3
0.0001	107.06	46.1
0.001	65.65	28.3
0.005	22.22	9.6
0.01	14.14	6.1
0.1	2.02	0.9
1*	2.02	0.9
10*	2.02	0.9

* IC₅₀ hesaplanırken hesaba katılmadı



Şekil 11. AZM-hCAII izoenzimi için yüzde aktivite grafiği (IC₅₀: 0.132μM)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler canlılarda hayatı idame etmesi için biyokimyasal reaksiyonların hızlandırılmasında kritik rol oynayan, elzem olarak bulunan moleküllerdir. Enzimlerin doğru şekilde düzenlenmesi, metabolik süreçlerin kontrolünde ve hücresel homeostazın sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir. Memelilerde de bulunan bu moleküllerin neredeyse hepsi protein yapısında olup substratlara özgü spesifik aktivitelere sahiptirler. Bu bağlamda, enzim inhibisyonu/aktivasyonu, hücresel işlevleri düzenlemede ve terapötik müdahalelerde önemli bir strateji haline gelmiştir (11).

Bu enzimlerden biri olan karbonik anhidraz uzun yıllar önce keşfedilmiştir ve her bir hücrenin işlev-sağ kalımı ile yakında ilişkili olan karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonunu sağlar. Neredeyse bütün canlı gruplarında bulunur ve şimdiye kadar sekiz farklı alt sınıfı (α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι) eski Yunan harfleri kullanılarak sınıflandırılmıştır(55, 56). İnsanlarda dahil olmak üzere memelilerde sadece α -CA sınıfı keşfedilmiş ve on beşi insanda da olmak üzere on altı izoenzimi bulunur (46).

Enzim inhibisyonunun tedavi amaçlı uzun yıllardan beri kullanım örneklerinden biri de karbonik anhidraz inhibisyonudur. Başta glokom olmak üzere idiyopatik intrakranial hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, irtifa hastalığı, felç ve epilepsi hastalıklarının tedavisinde, Asetazolamid, methazolamid ve dorzolamid gibi sülfonamidler karbonik anhidrazın inhibisyonunu sağlayan moleküller kullanılmaktadır. İnhibitörler içerisinde en yaygın kullanımı olan bileşik asetazolamidir. Ayrıca karbonik anhidrazın deneysel çalışmalarında da pozitif kontrol olarak en çok tercih edilen molekül asetazolamidir (124–126).

Karbonik anhidrazın sadece inhibisyonu değil aktivasyonunun da sağlık üzerine önemli etkilerinin olduğu ifade edilmektedir. Özellikle biliş, hafıza ve öğrenmede karbonik anhidraz aktivasyonunu önemli olabileceği ifade edilmiştir. Henüz karbonik anhidrazın aktivasyonunun klinik olarak bir kullanım alanı olmasa da araştırmalar devam etmektedir. İlk keşfedilen aktivatör Histamindir. Bazı aminoasitler (L-His, D-His, L-Phe, D-Phe, D-Trp, L-Trp ve L-Tyr), L-Adrenaline ve DOPA (3,4-Dihidroksi-L-Fenilalanin) gibi bileşiklerde karbonik anhidraz aktivatörlerdir (60, 166).

Biliş, hafıza ve öğrenme üzerine bir diğer çalışma alanı ise TrkB sinyal yolağının aktivasyonudur. Bu aktivasyon ile transkripsiyon düzeyinde nöronal sağkalım, yenilenme, olgunlaşma ve dentrit ağ oluşumunu sağlayıp biliş, hafıza ve öğrenme düzeylerinin

ile çok yüksek bir inhibisyon gösterdiğini bulmuşlardır. Bu bulgu doğrultusunda taksifolin neredeyse Karbonik anhidraz için asetazolamid kadar güçlü bir inhibitördür.

Dilek ve ark. (172) tarafından yapılan bir çalışmada ise birer fenolik bileşik olan osajin (PubChem CID: 95168) ve pomiferinin (PubChem CID: 4871) IC₅₀ değerleri sırasıyla 87.2 µM ve 471 µM olarak bulunmuştur. Fenolik bileşiklerden 7,8-DHF'ye daha yakın kimyasal yapıya sahip olan bileşikler incelendiğinde Aggul ve ark. (22) luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone, PubChem CID: 5280445) ve diosmetin (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavone, PubChem CID: 5281612) hCAI'e etkisine bakıldığında sırasıyla 2.62 µM ve 3.69 µM IC₅₀ değeri göstermişlerdir. Fenolik bileşikler ve daha da sınırlandırılacak olursak flavonoidler farklı düzeyde de olsa hCAI izoenzimi için farklı derecelerde inhibisyon profilleri sergilemektedirler.

7,8-DHF'nin hCAII izoenzimi üzerine etkisini araştırıldığında, %17'lik DMSO'da çözölmüş 0-3 mM arasında 7 farklı konsantrasyonda 7,8-DHF çözeltisi kullanılarak yapılan deneylerde hCAI'e benzer şekilde hCAII için de yeterli inhibisyon sağlanamadığı için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır (IC₅₀ > 3mM). Fakat düşük 7,8-DHF konsantrasyonunda hCAII aktivitesinde artış gözlemlenirken (%9.2) 7,8-DHF konsantrasyonu arttıkça hCAII'ye karşı inhibisyon gözlemlenmiştir. 3 mM 7,8-DHF konsantrasyonunda %14.7 inhibisyon gözlemlenmiş olmasına rağmen hem inhibisyon oranı düşük olduğundan dolayı hem de yüksek konsantrasyonundan dolayı *in vivo* araştırmalar için uygulanabilir seviyelere ulaşamamıştır.

Birer fenolik bileşik olan resveratrol, silimarin, dobutamin ve kurkumin esteraz yöntemi kullanılarak hCAII'ye etkisini araştırmak için yapılan bir araştırmada (142) sırasıyla 1.68 µM, 4.26 µM, 4.72 µM ve 4.81 µM IC₅₀ ile inhibisyon sergilemişlerdir. Yine fenolik bileşikler olan osajin ve pomiferin ise sırasıyla 83.1 µM ve 235.7 µM IC₅₀ değerleri ile güçlü bir inhibitör olan asetazolamite kıyasla çok düşük bir inhibisyon sergilemişlerdir (172). 7,8-DHF'nin da üyesi olduğu fenolik bileşiklerin en büyük alt gruplarından biri flavonoidlerdir. Birer flavonoid olan luteolin, diosmetin ve taksifolin sırasıyla 3.43 µM, 2.82 µM ve 43.3 nM IC₅₀ değerleri ile hCAII'nin inhibisyonunu sağlamışlardır (22, 171).

Balboni ve ark. (173) flavonlar ve yapısal olarak benzer olan kromononların hCAI ve hCAII üzerine etkisini araştırmak için hidrataz yöntemini kullanarak yaptıkları bir çalışmada aynı iskelet yapısını bulunduran fakat yapısal olarak çok küçük farklılıklara sahip moleküller çok farklı inhibisyon oranları gösterebildiklerini ifade etmişlerdir. Ayrıca

15 dk ve 12 saatlik enzim-bileşik (inhibitör) inkübasyonlarının da sonuçlar üzerinde önemli sayılabilecek bir fark yaratmadığını göstermişlerdir.

Fenolik bileşiklerin bazıları insan/memeli karbonik anhidraz izoenzimlerine çok düşük oranda (350 μ M ve daha fazla) afinite gösterirken bunlara kıyasla β -CA ailesi izoenzimlerine yüksek (0.9-10 μ M) bir ilgi gösterebilmektedirler (174). Yine fenolik bileşikler (175) ve kumarinlerin (176) bazıları bütün insan/memeli CA izoenzimlerine benzer oranda inhibisyon gösterebileceği gibi aynı gruptaki diğer bazı bileşikler ise izoenzimler arasında çok farklı inhibisyon sergileyebilir. Örneğin esteraz yöntemi ile yapılan bir ölçümde katekol (benzen-1,2-diol, PubChem CID: 289) hCAI, hCAIX ve hCAXII izoenzimlerine 247.5- 516 μ M K_i ile inhibisyon sergilerken, hCAII'ye karşı 5.51 μ M'lık K_i inhibisyon gösterebilmektedir (23).

Sonuç olarak, 7,8-DHF'nin hCAI ve hCAII izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine *in vitro* etkisini araştırmayı amaçladığımız bu çalışmamızda yapılan ölçümler sonucunda 7,8-DHF karbonik anhidrazın bu iki izoenzimi üzerine anlamlı bir inhibisyon veya aktivasyon gösterememiştir. Genel olarak fenolik bileşiklerin bir kısmının karbonik anhidraz inhibitörü olarak bilinse de (23), bu grupta hem çok farklı kimyasal yapıya sahip bileşiklerin olması, hem de çeşitlilik açısından çok zengin bileşiklerin bulunması enzim inhibisyonları için genel bir ifade kullanmayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca aynı bileşik hem karbonik anhidrazın alt sınıflarında hem de izoenzimleri arasında farklı etkileşimler gösterebilmektedir. Bu zengin grubun üyelerinin kendileri veya farklı yollarla sentezlenen türevleri ile izoenzim seçici inhibitörler keşfedilebilir. Bu amaçla organizmanın neredeyse her dokusuna dağılmış olan karbonik anhidrazın farklı izoenzimlerinin inhibisyonu veya aktivasyonu ile hedefe yönelik tedavi için daha geniş araştırmaların yapılabilmesi için fenolik bileşikler hala etkileyici bir gruptur.

6. KAYNAKLAR

1. Lee D, Hong JH (2020). The fundamental role of bicarbonate transporters and associated carbonic anhydrase enzymes in maintaining ion and pH homeostasis in non-secretory organs. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1–18.
2. Guyenet PG, Bayliss DA (2015). Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. *Neuron* 87: 946–961.
3. Supuran C (2008). Carbonic anhydrases an overview. *Current Pharmaceutical Design* 14: 603–614.
4. Supuran CT (2018). Carbonic anhydrases and metabolism. *Metabolites* 8: 25. doi: 10.3390/metabo8020025.
5. Pala N, Cadoni R, Sechi M (2015). Carbonic anhydrase I. In: Supuran CT, De Simone G, (Eds.), *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts* Amsterdam: Elsevier BV, Amsterdam, Pages: 31–49.
6. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21: 1570–1582.
7. Pınar S (2018). Yüksek yağlı diyetin karaciğer karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Rize
8. Lakota J, Dubrovčáková M (2020). Overexpression of CA1 mRNA and the CA I protein in tumor cells does not change the gene expression of the ECM proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 639. doi: 10.3390/ijms21020639.
9. Ciccone L, Cerri C, Nencetti S, Orlandini E (2021). Carbonic anhydrase inhibitors and epilepsy: state of the art and future perspectives. *Molecules*, 26: 6380. doi: 10.3390/molecules26216380.
10. Waheed A, Sly WS (2017). Carbonic anhydrase XII functions in health and disease. *Gene* 623: 33–40.
11. Gürdol F (2015). Tıbbi biyokimya İstanbul. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; Sayfa: 1-647.
12. Harvey RA, Champe PC (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews Biochemistry*. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. 3rd ed. Çeviren: Ulukaya E (Ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1- 576.

13. Geronikaki A, Eleutheriou PT (2023). Enzymes and enzyme inhibitors-applications in medicine and diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 5245. doi: 10.3390/ijms24065245.
14. Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF (2018). Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension: to use or not to use? *Journal of the American College of Cardiology* 71: 1474–1482.
15. Hurst M, Jarvis B (2001). Perindopril: an updated review of its use in hypertension. *Drugs* 61: 867–896.
16. Anderson RJ, Duchin KL, Gore RD, Herman TS, Michaels RS, Nichola PS, Nolen TM, Wolfson P, Wombolt DG, Zusman R (1991). Once-daily fosinopril in the treatment of hypertension. *Hypertension* 17: 636–642.
17. Nandakishore R, Yalavarthi P, Kiran Y, Rajapranathi M (2014). Selective cyclooxygenase inhibitors: current status. *Current Drug Discovery Technologies* 11: 127–132.
18. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11693–11697.
19. Grosser T, Theken KN, FitzGerald GA (2017). Cyclooxygenase inhibition: pain, inflammation, and the cardiovascular system. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 102: 611–622.
20. Mann T, Keilin D (1940). Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature* 146: 164–165.
21. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V (2021). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 209: 112923.
22. Aggul AG, Uzun N, Kuzu M, Taslimi P, Gulcin I (2022). Some phenolic natural compounds as carbonic anhydrase inhibitors: an in vitro and in silico study. *Archiv der Pharmazie* 2022: e2100476. doi: 10.1002/ardp.202100476.
23. Karioti A, Carta F, Supuran CT (2016). Phenols and polyphenols as carbonic anhydrase inhibitors. *Molecules* 21: 1649. doi: 10.3390/molecules21121649.
24. Supuran CT (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 20: 3467–3474.

25. Sun MK, Zhao WQ, Nelson TJ, Alkon DL (2001). Theta rhythm of hippocampal CA1 neuron activity: gating by GABAergic synaptic depolarization. *Journal of neurophysiology* 85: 269–279.
26. Wang J, Ke T, Zhang X, Chen Y, Liu M, Chen J, Luo W (2013). Effects of acetazolamide on cognitive performance during high-altitude exposure. *Neurotoxicology and Teratology* 35: 28–33.
27. Provensi G, Carta F, Nocentini A, Supuran CT, Casamenti F, Passani MB, Fossati S (2019). A new kid on the block? Carbonic anhydrases as possible new targets in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 4724. doi: 10.3390/ijms20194724.
28. Sun MK, Alkon DL (2002). Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. *Trends in Pharmacological Sciences* 23(2): 83–89.
29. Blandina P, Supuran CT (2019). Carbonic anhydrase activators and their potential in the pharmaceutical field. In: Supuran CT, Nocentini A (Eds.) *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target*. Academic Press, Pages: 477–492.
30. Blandina P, Provensi G, Passani MB, Capasso C, Supuran CT (2020). Carbonic anhydrase modulation of emotional memory. implications for the treatment of cognitive disorders. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35(1): 1206-1214.
31. Poggetti V, Salerno S, Baglini E, Barresi E, Da Settimo F, Taliani S (2022). Carbonic anhydrase activators for neurodegeneration: An overview. *Molecules* 27: 2544. doi: 10.3390/molecules27082544.
32. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry* 299: 125124. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124.
33. Chaiyana W, Charoensup W, Sriyab S, Punyoyai C, Neimkhum W (2021). Herbal extracts as potential antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory, and whitening cosmeceutical ingredients. *Chemistry and Biodiversity* 18: e2100245. doi: 10.1002/cbdv.202100245.
34. Zia A, Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, Samarghandian S (2021). The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 134: 111119. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111119.

35. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, vd. (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2687–2692.
36. Palmer T, Bonner PL (2007). *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. 2nd edition. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
37. Palmer T (1994). *Understanding Enzymes*. Tıp ve Fen Bilimleri Öğrencileri İçin Enzim Bilgisi. 1. Bas. Çevirenler: Alpseymen T ve Tezcan F, Türkiye: Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul, 1- 528.
38. Keha E, Küfrevioğlu İ (2012). *Biyokimya*. 9. Baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum.
39. McDonald AG, Boyce S, Tipton KF (2009). ExplorEnz: The primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Research* 37. doi: 10.1093/nar/gkn582.
40. ExplorEnz-The Enzyme Database (y.y.). Carbonic anhydrase, EC 4.2.1.1 [online]. Available from: <https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=4.2.1.1>. [Accessed: 29 Mart 2022].
41. Cabaleiro-Lago C, Lundqvist M (2020). The effect of nanoparticles on the structure and enzymatic activity of human carbonic anhydrase I and II. *Molecules*, 25: 4405. doi: 10.3390/molecules25194405.
42. Domsic JF, Avvaru BS, Chae UK, Gruner SM, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, McKenna R (2008). Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *Journal of Biological Chemistry* 283: 30766–30771.
43. Çoban TA, Beydemir Ş, Gülçin İ, Ekin D (2007). Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull* 30: 2257–2261.
44. Liljas A (2018). Carbonic anhydrase under pressure. *IUCrJ* 5: 4-5. doi: 10.1107/S2052252517018012.
45. Aggarwal M, Boone CD, Kondeti B, McKenna R (2012). Structural annotation of human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28(2):267-277.
46. DiMario RJ, Machingura MC, Waldrop GL, Moroney J V. (2018). The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. *Plant Science* 268: 11–17.
47. Banerjee S, Deshpande PA (2016). On origin and evolution of carbonic anhydrase isozymes: A phylogenetic analysis from whole-enzyme to active site. *Computational Biology and Chemistry* 61: 121–129.

48. Srivastava DK, Jude KM, Banerjee AL, Haldar M, Manokaran S, Kooren J, Mallik S, Christianson DW (2007). Structural analysis of charge discrimination in the binding of inhibitors to human carbonic anhydrases I and II. *Journal of the American Chemical Society* 129(17): 5528-5537.
49. Eriksson AE, Jones TA, Liljas A (1988). Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 4: 274–282.
50. RCSB PDB (y.y.). 1CA2 [online]. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/1CA2>. [Accessed: 19 Temmuz 2023].
51. Temperini C, Innocenti A, Guerri A, Scozzafava A, Rusconi S, Supuran CT (2007). hosph(on)ate as a zinc-binding group in metalloenzyme inhibitors: X-ray crystal structure of the antiviral drug foscarnet complexed to human carbonic anhydrase I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 17: 2210–2215.
52. Ozensoy Guler O, Capasso C, Supuran CT (2015). A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization 31: 689–694.
53. Meldrum NU, Roughton FJW (1933). Carbonic anhydrase. its preparation and properties. *The Journal of Physiology* 80: 113–142.
54. Tripp BC, Smith K, Ferry JG (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 276: 48615–48618.
55. Akocak S, Supuran CT (2019). Activation of α -, β -, γ - δ -, ζ - and η - class of carbonic anhydrases with amines and amino acids: a review. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34(1): 1652-1659.
56. Hirakawa Y, Hanawa Y, Yoneda K, Suzuki I (2022). Evolution of a chimeric mitochondrial carbonic anhydrase through gene fusion in a haptophyte alga. *FEBS letters* 596(23): 3051–3059.
57. Alkan Türkuçar S (2018). Yeni Bir ON-LİNE HPLC-CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesi ve biyoaktif bitki ekstraktlarına uygulanması. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon
58. Sonmez F, Gunesli Z, Demir T, Cıkrıkcı K, Ergun A, Gencer N, Arslan O (2022). The effect of total anthocyanins extracted from sweet cherry cultivars on carbonic anhydrases and antioxidant activity. *Erwerbs-Obstbau* 64: 145–153.

59. Pastorekova S, Gillies RJ (2019). The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews* 38: 65–77.
60. Chiaramonte N, Gabellini A, Angeli A, Bartolucci G, Braconi L, Dei S, Teodori E, Supuran CT, Romanelli MN (2022). New histamine-related five-membered N-heterocycle derivatives as carbonic anhydrase I activators. *Molecules* 27: 545. doi: 10.3390/molecules27020545.
61. Khalifah RG (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry* 246: 2561–2573.
62. Henderson LE, Henriksson D, Nyman PO (1976). Primary structure of human carbonic anhydrase C. *Journal of Biological Chemistry* 251: 5457–5463.
63. Lindskog S (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics* 74(1): 1–20.
64. Nyman PO (1961). Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 52: 1–12.
65. Supuran CT, Capasso C, De Simone G (2015). Carbonic Anhydrase II as Target for Drug Design. In: Supuran CT, De Simone G (Eds.), *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*. Elsevier BV, Amsterdam, Pages: 51–90.
66. Liljas A, Kannan KK, Bergsen P-C, Waara I, Fridborg K, Strandberg B, Carlbom U, Jarup L, Lövgren S, Petef M (1972). Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase C. *Nature New biology* 235: 131–137.
67. Alexander RS, Nair SK, Christianson DW (1991). Engineering the hydrophobic pocket of carbonic anhydrase II. *Biochemistry* 30: 11064–11072.
68. Armstrong JM, Myers D V., Verpoorte Jacob A., Edsall JT (1996). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry* 241: 5137–5149.
69. Siffert W, Gros G (1984). Carbonic anhydrase in human platelets. *Biochemical Journal* 217: 727–730.
70. Lindskog S (1960). Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochimica et Biophysica Acta* 39: 218–226.
71. Dodgson SJ, Forster RE (1983). Carbonic anhydrase activity of intact erythrocytes from seven mammals. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 55: 1292–1298.

72. Çomaklı V, Yerlikaya E, Demirdağ R, Küfrevioğlu İ (2012). Purification and characterization of α -carbonic anhydrase II from sheep liver and examining the inhibition effect of kanamycin on enzyme activity. *J Biol and Chem* 40: 133–138.
73. Carter N, Auton J (1975). Characterisation of carbonic anhydrases from tissues of the cat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 410: 220–228.
74. Bayram T, Arslan O, Ugras HI, Cakir U, Ozensoy O (2007). Purification of carbonic anhydrase from dog erythrocytes and investigation of in vitro inhibition by various compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22: 739–744.
75. Furth AJ (1968). Purification and properties of horse erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 4832–4841.
76. Ferrell RE, Stroup SK, Tanis RJ, Tashian RE (1978). Amino acid sequence of rabbit carbonic anhydrase II. *BBA-Protein Structure* 533: 1–11.
77. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaniemi H (1994). Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut* 35: 646–650.
78. Christie KN, Thomson C, Xue L, Lucocq JM, Hopwood D (1997). Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45: 35–40.
79. Lonnerholm G, Selking O, Wistrand PJ (1985). Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 88: 1151–61.
80. Kida E, Palminiello S, Golabek AA, Walus M, Wierzb-Bobrowicz T, Rabe A, Albertini G, Wisniewski KE (2006). Carbonic anhydrase II in the developing and adult human brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65: 664–674.
81. Supuran CT (2018). Applications of carbonic anhydrases inhibitors in renal and central nervous system diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 28: 713–721.
82. Nishimori I, Onishi S (2001). Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Digestive and Liver Disease* 33: 68–74.
83. Inada A, Nienaber C, Fonseca S, Bonner-Weir S (2006). Timing and expression pattern of carbonic anhydrase II in pancreas. *Developmental Dynamics* 235: 1571–1577.

84. Alkaya ZA, İlkimen H, Yenikaya C, Kaygısız Y, Bülbül M, Tunç T, Sarı M (2017). A novel proton transfer salt of 2-amino-6-sulfamoylbenzothiazole and its metal complexes: the evaluation of their inhibition effects on human cytosolic carbonic anhydrases. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 32: 231–239.
85. Purkerson JM, Schwartz GJ (2007). The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney International* 71: 103–115.
86. McMahon C, Will A, Hu P, Shah GN, Sly WS, Smith OP (2001). Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood* 97: 1947–1950.
87. Kuo WH, Chiang WL, Yang SF, Yeh KT, Yeh CM, Hsieh YS, Chu SC (2003). The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sciences* 73: 2211–2223.
88. Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H (1991). A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. *Histochemistry* 95: 477–482.
89. Karhumaa P, Parkkila S, Türeci Ö, Waheed A, Grubb JH, Shah G, Parkkila AK, Kaunisto K, Tapanainen J, Sly WS, vd. (2000). Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Molecular Human Reproduction* 6: 68–74.
90. Aliakbar S, Brown PR, Nicolaides KH (1990). Localization of CAI and CAII isoenzymes in normal term human placenta by immunofluorescence techniques. *Placenta* 11: 35–39.
91. Sterling D, Reithmeier RAF, Casey JR (2001). A transport metabolon: functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47886–47894.
92. Geers C, Gros G (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological Reviews* 80: 681–715.
93. Swain DK, Sharma P, Shah N, Sethi M, Mahajan A, Gupta S, Mishra AK, Yadav S (2022). Introduction to the pathways involved in the activation and regulation of sperm motility: a review of the relevance of ion channels. *Animal Reproduction Science* 246: 107052. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107052.

94. Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 1149–1158.
95. Wandernoth PM, Mannowetz N, Szczyrba J, Grannemann L, Wolf A, Becker HM, Sly WS, Wennemuth G (2015). Normal fertility requires the expression of carbonic anhydrases II and IV in sperm. *Journal of Biological Chemistry* 290: 29202–29216.
96. Hu J, Spencer TE (2005). Carbonic anhydrase regulate endometrial gland development in the neonatal uterus. *Biology of Reproduction* 73: 131–138.
97. José O, Torres-Rodríguez P, Forero-Quintero LS, Chávez JC, De La Vega-Beltrán JL, Carta F, Supuran CT, Deitmer JW, Treviño CL (2015). Carbonic anhydrases and their functional differences in human and mouse sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468: 713–718.
98. David Weiner I, Verlander JW (2013). Renal ammonia metabolism and transport. *Comprehensive Physiology* 3(1): 201-220. doi: 10.1002/cphy.c120010.
99. Wagner CA, Imenez Silva PH, Bourgeois S (2019). Molecular pathophysiology of acid-base disorders. *Seminars in Nephrology* 39: 340–352.
100. Breton S (2001). The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP Journal of the Pancreas* 2: 159–164.
101. Kivelä AJ, Kivelä J, Saarnio J, Parkkila S (2005). Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World Journal of Gastroenterology* 11: 155–163.
102. Enzim Veritabanı (y.y.). ExplorEnz: Resmi IUBMB enzim listesi [online]. Available from: <https://www.enzyme-database.org/>. [Accessed: 13 Ocak 2023].
103. Doğan A, Akocak S (2020). Obezite tedavi çalışmalarında karbonik anhidraz enziminin rolü. Temel V (Ed.), *Recent Advances in Health Sciences*. Duvar Yayınları, Ankara, Sayfa: 369–380.
104. Lynch CJ, Fox H, Hazen SA, Stanley BA, Dodgson S, Lanoue KF (1995). Role of hepatic carbonic anhydrase in de novo lipogenesis. *Biochemical Journal* 310: 197–202.
105. Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE (1983). Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 2752–2756.

106. Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, Tashian RE, Hewett-Emmett D, Guibaud P, Vainsel M, Baluarte HJ, Gruskin A, Al-Mosawi M, vd. (1985). Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N Engl J Med* 313: 139–145.
107. Pang Q, Qi X, Jiang Y, Wang O, Li M, Xing X, Dong J, Xia W (2015). Two novel CAII mutations causing carbonic anhydrase II deficiency syndrome in two unrelated Chinese families. *Metabolic Brain Disease* 30: 989–997.
108. Yang Y, Tang N, Zhu Y, Zhang L, Cao X, Liu L, Xia W, Li P, Yang Y (2021). A novel homozygous nonsense mutation in the CA2 gene (c.368G>A, p.W123X) linked to carbonic anhydrase II deficiency syndrome in a Chinese family. *Metabolic Brain Disease* 36: :589–599.
109. Nampoothiri S, Anikster Y (2009). Carbonic anhydrase II deficiency: a novel mutation. *Indian Pediatrics* 46: 532–534.
110. Soda H, Yukizane S, Yoshida I, Koga Y, Aramaki S, Kato H (1996). A point mutation in exon 3 (His 107→Tyr) in two unrelated Japanese patients with carbonic anhydrase II deficiency with central nervous system involvement. *Human Genetics* 97: 435–437.
111. Alsharidi A, Al-Hamed M, Alsuwaida A (2015). Carbonic anhydrase II deficiency: report of a novel mutation. *CEN Case Reports* 5(1): 108–112. doi: 10.1007/s13730-015-0205-y.
112. Satapathy AK, Pandey S, Chaudhary MR, Bagga A, Kabra M, Uwe K, Gupta N (2019). Report of another mutation proven case of carbonic anhydrase II deficiency. *Journal of Pediatric Genetics* 8(2): 91-94.
113. Jakubowski M, Szahidewicz-Krupska E, Doroszko A (2018). The human carbonic anhydrase II in platelets: an underestimated field of its activity. *BioMed Research International* 2018: 4548353. doi: 10.1155/2018/4548353.
114. Alhuzaim ON, Almohareb OM, Sherbeeni SM (2015). Carbonic anhydrase II deficiency in a Saudi woman. *Clinical Medicine Insights: Case Reports* 8: 7–9. doi: 10.4137/CCRep.S16897.

115. Awad M, Al-Ashwal AA, Sakati N, Al-Abbad AA, Bin-Abbas BS (2002). Long-term follow up of carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Saudi Medical Journal* 23: 25–29.
116. Whyte MP (1993). Carbonic anhydrase II deficiency. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 294: 52–63.
117. Fathallah DM, Bejaoui M, Sly WS, Lakhous R, Dellagi K (1994). A unique mutation underlying carbonic anhydrase II deficiency syndrome in patients of Arab descent. *Hum Genet* 94: 581–582.
118. Stenson PD, Mort M, Ball E V., Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics* 136: 665–677.
119. Venta PJ, Welty RJ, Johnson TM, Sly WS, Tashian RE (1991). Carbonic anhydrase II deficiency syndrome in a Belgian family is caused by a point mutation at an invariant histidine residue (107 His----Tyr): complete structure of the normal human CA II gene. *American Journal of Human Genetics* 49(5): 1082-1090.
120. Laway BA, Mubarik I (2017). Renal tubular acidosis, osteopetrosis, and cerebral calcification: a rare syndrome caused by carbonic anhydrase II deficiency. *Indian Journal of Nephrology* 27(4): 330–331.
121. Jonsson BH, Liljas A (2020). Perspectives on the classical enzyme carbonic anhydrase and the search for inhibitors. *Biophysical Journal* 119(7): 1275–1280.
122. Supuran CT (2013). Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(6): 677–679.
123. Lolak N, Akocak S, Bua S, Sanku RKK, Supuran CT (2019). Discovery of new ureido benzenesulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as carbonic anhydrase I, II, IX and XII inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 27(8): 1588–1594.
124. Rankin GO (2007). Acetazolamide. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–5. doi: 10.1016/B978-008055232-3.61158-4.
125. Wongboonsin J, Thongprayoon C, Bathini T, Ungprasert P, Aeddula NR, Mao MA, Cheungpasitporn W (2019). Acetazolamide therapy in patients with heart failure: a meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine* 8: 349. doi: 10.3390/jcm8030349.

126. Supuran CT (2015). Acetazolamide for the treatment of idiopathic intracranial hypertension. *Expert Review of Neurotherapeutics* 15: 851–856.
127. Briganti F, Mangani S, Orioli P, Scozzafava A, Vernaglione G, Supuran CT (1997). Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations for the Interaction of Isozymes I and II with Histamine. *Biochemistry* 36(34): 10384–10392.
128. Nocentini A, Cuffaro D, Ciccone L, Orlandini E, Nencetti S, Nuti E, Rossello A, Supuran CT (2021). Activation of carbonic anhydrases from human brain by amino alcohol oxime ethers: towards human carbonic anhydrase VII selective activators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36: 48–57.
129. Scozzafava A, Supuran CT (2002). Carbonic anhydrase activators: high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating a β -alanyl-histidine scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry* 45: 284–291.
130. Provensi G, Nocentini A, Passani MB, Blandina P, Supuran CT (2021). Activation of carbonic anhydrase isoforms involved in modulation of emotional memory and cognitive disorders with histamine agonists, antagonists and derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36: 719–726.
131. Supuran CT (2018). Carbonic anhydrase activators. *Future Medicinal Chemistry* 10: 561–573.
132. Kumar A, Nirmal P, Kumar M, Jose A, Tomer V, Oz E, Proestos C, Zeng M, Elobeid T, Sneha V, vd. (2023). Major phytochemicals: recent advances in health benefits and extraction method. *Molecules* 28: 887. doi: 10.3390/molecules28020887.
133. Ebrahimi P, Lante A (2021). Polyphenols: a comprehensive review of their nutritional properties. *The Open Biotechnology Journal* 15: 164–172.
134. Vermerris W, Nicholson R (2009). *Phenolic Compound Biochemistry*. 1st Edition. Springer, West Lafayette; Pages: 1-276.
135. Nollat LML, Alejandra G-UJ (2018). *Phenolic Compounds in Food Characterization and Analysis*. 1st Edition. CRC Press, Boca Raton.
136. Karabulut G, Yemiş O (2019). Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyoyararlılığı. *Akademik Gıda* 17(4): 526–537. doi: 10.24323/akademik-gida.667270.

137. Radonjić S, Maraš V, Raičević J, Košmerl T (2020). Wine or beer? Comparison, changes and improvement of polyphenolic compounds during technological phases. *Molecules* 25: 4960. doi: 10.3390/molecules25214960.
138. Hossain MK, Dayem AA, Han J, Yin Y, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 569. doi: 10.3390/ijms17040569.
139. Coşkun T (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48: 69–84.
140. Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010). Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Medica* 76: 1044–1063.
141. Ekinci D, Karagoz L, Ekinci D, Senturk M, Supuran CT (2014). Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 28: 283–288.
142. Senturk M, Gulcin I, Beydemir S, Kufrevioglu OI, Supuran CT (2011). In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology and Drug Design* 77: 494–499.
143. Du X, Hill RA (2015). 7,8-Dihydroxyflavone as a pro-neurotrophic treatment for neurodevelopmental disorders. *Neurochemistry International* 89: 170–180.
144. Koirala N, Pandey RP, Parajuli P, Jung HJ, Sohng JK (2014). Methylation and subsequent glycosylation of 7,8-dihydroxyflavone. *Journal of Biotechnology* 184: 128–137.
145. Cayman Chemical (y.y.). 7,8 Dihydroxyflavone [online]. Available from: <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/16946.pdf>. [Accessed: 23 Ocak 2022].
146. Chen J, Chua KW, Chua CC, Yu H, Pei A, Chua BHL, Hamdy RC, Xu X, Liu CF (2011). Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience Letters* 499: 181–185.
147. Liu X, Obiany O, Chan CB, Huang J, Xue S, Yang JJ, Zeng F, Goodman M, Ye K (2014). Biochemical and biophysical investigation of the brain-derived neurotrophic factor mimetic 7,8-dihydroxyflavone in the binding and activation of the TrkB receptor. *Journal of Biological Chemistry* 289: 27571–27584.

148. Diniz BS, Teixeira AL (2011). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *NeuroMolecular Medicine* 13: 217–222.
149. Wurzelmann M, Romeika J, Sun D (2017). Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research* 12(1): 7-12.
150. Ohira K, Hayashi M (2009). A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. *Current Neuropharmacology* 7(4): 276-285. doi: 10.2174/157015909790031210.
151. Minichiello L (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature Reviews Neuroscience* 10(12): 850–860.
152. Bollen E, Vanmierlo T, Akkerman S, Wouters C, Steinbusch HMW, Prickaerts J (2013). 7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice. *Behavioural Brain Research* 257: 8–12.
153. Aytan N, Choi JK, Carreras I, Crabtree L, Nguyen B, Lehar M, Blusztajn JK, Jenkins BG, Dedeoglu A (2018). Protective effects of 7,8-dihydroxyflavone on neuropathological and neurochemical changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 828: 9–17.
154. Chen C, Wang Z, Zhang Z, Liu X, Kang SS, Zhang Y, Ye K (2018). The prodrug of 7,8-dihydroxyflavone development and therapeutic efficacy for treating Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 578–583.
155. Agrawal R, Noble E, Tyagi E, Zhuang Y, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2015). Flavonoid derivative 7,8-DHF attenuates TBI pathology via TrkB activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852: 862–872.
156. Zhang MW, Zhang S feng, Li ZH, Han F (2016). 7,8-Dihydroxyflavone reverses the depressive symptoms in mouse chronic mild stress. *Neuroscience Letters* 635: 33–38.
157. Zhou Q, Tang H, Bai D, Kong Y (2022). 7,8-Dihydroxyflavone protects neurons against oxygen-glucose deprivation induced apoptosis and activates the TrkB/Akt pathway. *PeerJ* 10: e12886. doi: 10.7717/peerj.12886.
158. Sahin E, Saglam N, Erdem S, Alvuroglu E, Abidin I, Yulug E, Alver A (2022). 7,8-Dihydroxyflavone alleviates endoplasmic reticulum stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome. *Life Sciences* 306: 120781. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120781.

159. Gulceri E, Peker G, Cirrik S, Hacıoglu G, Sahin E, Alver A (2022). Renal effects of 7,8-dihydroxyflavone in cafeteria diet-induced obesity. doi:10.21203/RS.3.RS-2053626/V1.
160. Şahin E, Sağlam N, Erdem S, Alver A (2020). Bir BDNF agonisti olan 7,8-dihidroksiflavon yaşlı farelerin karaciğerindeki oksidatif stresi azaltır. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, 27-31 Ekim 2021, 1–2.
161. Sigmaaldrich (2011). Carbonic Anhydrase I From Human Erythrocytes-C4396 [online]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/125/781/C4396-5MG____SIGMA____.pdf. [Accessed 20 July 2023].
162. Sigmaaldrich (2011). Carbonic Anhydrase Isozyme II From Human-C6165 [online]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/475/482/C6165-5MG____SIGMA____.pdf. [Accessed 20 July 2023].
163. Innocenti A, Scozzafava A, Parkkila S, Puccetti L, De Simone G, Supuran CT (2008). Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18: 2267–2271.
164. Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. *Journal of Biological Chemistry* 242: 4221–4229.
165. Douglas A. Skoog, F. James Holler SRC (2018). *Instrumental Analysis Principles*, Seventh Boston.
166. Temperini C, Innocenti A, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT (2007). Carbonic anhydrase activators: L-Adrenaline plugs the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 17: 628–635.
167. Emili M, Guidi S, Uguagliati B, Giacomini A, Bartesaghi R, Stagni F (2022). Treatment with the flavonoid 7,8-dihydroxyflavone: a promising strategy for a constellation of body and brain disorders. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62: 13-50.
168. Cho SJ, Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Fernando PDSM, Zhen AX, Hyun YJ, Ahn MJ, Kang HK, Hyun JW (2019). 7,8-Dihydroxyflavone protects high glucose-damaged neuronal cells against oxidative stress. *Biomolecules and Therapeutics* 27(1): 85-91.

169. Huai R, Han X, Wang B, Li C, Niu Y, Li R, Qu Z (2014). Vasorelaxing and antihypertensive effects of 7,8-dihydroxyflavone. *American Journal of Hypertension* 27: 750–760.
170. Creative Enzymes (2022). Spectrophotometric enzyme assays [online]. Available from: https://www.creative-enzymes.com/resource/spectrophotometric-enzyme-assays_5.html. [Accessed: 21 Temmuz 2023].
171. Gocer H, Topal F, Topal M, Küçük M, Teke D, Gülçin I, Alwasel SH, Supuran CT (2016). Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31: 441–447.
172. Dilek E, Erol HS, Cakir A, Koc M, Halici MB (2017). Natural product inhibitors of carbonic anhydrase I and II isoenzymes: osajin and pomiferin. *Archives of Physiology and Biochemistry* 123: 219–224.
173. Balboni G, Congiu C, Onnis V, Maresca A, Scozzafava A, Winum JY, Maietti A, Supuran CT (2012). Flavones and structurally related 4-chromenones inhibit carbonic anhydrases by a different mechanism of action compared to coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22: 3063–3066.
174. Poulsen SA, Davis RA (2014). Natural products that inhibit carbonic anhydrase. *Sub-Cellular Biochemistry* 75: 325–347.
175. Supuran CT (2011). Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Mol Divers* 15: 305–316.
176. Supuran CT (2020). Coumarin carbonic anhydrase inhibitors from natural sources. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35: 1462–1470.