

## İNCE BAĞIRSAK KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ORNİDAZOL VE METRONİDAZOL İLAÇLARININ *İN VİTRO* ETKİSİ\*

Fatma ERGÜN<sup>1</sup>, Dilek DÜLGER<sup>2</sup>, Nazan DEMİR<sup>3</sup>

### ÖZ

Bu araştırmada sığır ince bağırsağından total olarak saflaştırılan karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1.) enzimi aktivitesi üzerine bazı ilaçların *in vitro* olarak etkileri araştırıldı. Bağırsak dokusundan karbonik anhidraz enzimi afinitekromatografisi ile saflaştırıldı. Saf olarak elde edilmiş olan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine ornidazol ve metronidazol etken maddesine sahip ilaçların etkileri araştırıldı. Aktivite ölçümlerinde karbonik anhidrazın CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinden yararlanıldı. 3 farklı konsantrasyonda ve 6 farklı hacimde yapılan ölçümlerin sonuçları Aktivite-[ilaç hacmi] şeklinde grafik halinde verildi. Elde edilen bulgulardan, ornidazol ve metronidazol ilaçlarının bağırsak CA enzim aktivitesini aktive ettiği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** İnce bağırsak, Karbonik anhidraz, Ornidazol, Metronidazol

### ABSTRACT

In this study, the effects of certain drugs on the activity of carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1.), Which is totally purified

from bovine small intestine, were investigated in vitro. The intestinal tissue was purified by affinity chromatography of the carbonic anhydrase enzyme. On the activity of the purely obtained carbonic anhydrase enzyme, the effects of drugs with ornidazole and metronidazole were investigated. Carbonic anhydrase CO<sub>2</sub>-hydratase activity was utilized in the activity measurements. The results of the measurements made at 3 different concentrations and 6 different volumes were graphically displayed in the form of activity- [drug volume]. From the results obtained, it was determined that ornidazole and metronidazole drugs activated the intestinal enzyme activity.

**Key words:** Small intestine, Carbonic anhydrase, Ornidazole, Metronidazole

## GİRİŞ

Enzimler, hücre içerisindeki kimyasal reaksiyonları hücrenin gereksinimlerine uygun bir şekilde katalizlemektedir. Yapılarındaki amino asitlerin sıralanışı ve buna bağlı olarak enzimlerin kazandığı üç boyutlu yapı, enzimlerin kataliz görevi yapmalarını sağlayan en önemli etkidir (Onat ve Emerk, 1997).

Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların tümünde reaksiyona katılan bileşikler ile ürünleri birbirinden ayıran bir enerji engeli bulunmaktadır. Bu şekilde, reaksiyonların kendiliğinden ve kontrolsüz gerçekleşmesi önlenmektedir. Enzimler, enerji açısından gerçekleşmelerine engel olmayan reaksiyonları, metabolik yollar oluşturacak şekilde yönlendirmektedirler. Hücresel reaksiyonların hızını hücrenin gereksinimlerine göre ayarlanmaktadır. Belirli reaksiyonların organeller içerisinde diğerlerinden etkilenmeden aynı anda gerçekleşebilmesi için pek çok enzimin hücre içindeki yerleşimi, metabolik olayların özelliğine göre düzenlenmiştir (Onat ve Emerk, 1997).

Karbonik anhidraz (CA) (E.C:4.2.1.1. karbonat hidrolizaz)  $Zn^{2+}$  iyonu ihtiva eden metalo enzimlerden ilk bulunanlardan olup, hücrelerde  $CO_2$ hidrasyonu veya  $HCO_3^-$ indehidrasyonu reaksiyonunu katalizlemektedir. Enzim bu şekilde  $CO_2$ 'nin taşınmasını sağlamanın yanısıra birçok dokuda,  $H^+$  ve  $HCO_3^-$ 'nin birikiminde rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasalmetodlarla, tükrük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus, endometrium, beyin, kanser ve tümör dokularında CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Böylece çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması,  $CO_2$  ve pH dengesinin sağlanması gibi önemli fizyolojik roller olduğu, kemik erimesi, kireçleme ve tümör oluşumu gibi bazı patolojik olaylarda rol oynadıkları açıklanmıştır (Hewett-Emmett, 2000). Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ispatlanmıştır.

Karbonik anhidraz (CA) enzimi sözü geçen canlı hücrelerde çoğunlukla sitoplazmada çözülmüş, bazen de hücre membranına bağlanmış olarak bulunmaktadır (Maren, 1967, Pocker&Sarkanen, 1978).Sindirim sisteminde görev alan mide, ince bağırsak ve kalın bağırsakta CA'nın varlığı ve dağılımı Hansson'unhistokimyasal metodu ile belirlenmiştir (Hansson, 1967). Aktif karbonik anhidraz'ın, sindirim sisteminde iyon transferine ve luminalpH'in bölgesel kontrolüne katıldığı belirlenmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemlerle, CA'nındistal ince ve kalın bağırsağın epitel plazma membranlarınınapikal yüzeylerinde yerleştiği bulunmuştur. Bağırsak epitelinde CA-IV'ün bölgesel ve hücresele yerleşimi, sindirim sistemi CA'sı için önerilen fizyolojik roller ile uyum göstermektedir. Aktif CA, kalın bağırsak ve *ileum*'da su ve iyon transferine katılmaktadır (Fleming vd., 1995).

Antibiyotikler birçok farklı hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından bazı antibiyotiklerin aktivatör veya inhibitör etkileri araştırılmıştır (Britta, 1997; Demir,Nadaroglu ve Demir, 2006)

Antibiyotik grubu içerisinde yer alan nitroimidazoller; özellikleanaerop bakterilere yönelik etkinlikleriyle dikkati çekerler. Duyarlı patojen mikroorganizmalara geçen nitroimidazoller, nitro grupları aracılığıyla

hücre içi yapılarla etkileşerek, aralarında antibakteriyel etkili çeşitleri de bulunan çok sayıda ara ürünlerin şekillenmesine neden olurlar. Nitroimidazoller aşırı ölçülerde DNA kırılmalarına yol açabilmektedir ve özellikle DNAase 1 gibi DNA onarımını sağlayan enzimleri inhibe etmektedirler.

Bu çalışmada, *in vitro* olarak nitroimidazol türevi olan ornidazol ve metronidazol etken maddesine sahip ilaçların sığır ince bağırsağındanafinitekromatografi tekniği kullanılarak elde edilen karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerineinhibisyon/aktivasyon olan etkileri araştırılmıştır.

## YÖNTEM

### **Sığır İnce Bağırsağından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin HomojenatEldesi**

Sığır ince bağırsak numuneleri kesim esnasında fizyolojik serum (%0,9'luk NaCl çözeltisi) içerisine alındı. Daha sonra bağırsak dokusu bıçakla küçük parçalara bölünerek yaklaşık 2 L fizyolojik serum ile yıkandı. Yıkama çözeltisi tamamen berrak oluncaya kadar yıkama işlemine devam edildi (Zhu&Sly,1990).

Kılcal damar ve eritrositlerden tamamen uzaklaştırılmış olan ince bağırsak dokusunun her gramına 2 mL olacak şekilde %1'lik Triton X-100 içeren 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7.4) tamponu içine alındı ve 4 saat süreyle ultrasonikdismembratör'deultrasonik ses dalgalarına maruz bırakıldı. Ardından soğutmalı santrifüjde 12.000xg'de 30 dk süreylesantrifüj edildi. Süzgeç kağıdından süzülüp süpernatant ayrıldı.Süpernatant2 gün saf suya, 1 gün 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7.4) tamponuna karşı diyaliz edildi. Daha sonra CCl<sub>4</sub> ile yıkanarak ortamdaki yağlar ekstrakte edildi. HomojenatınpH'sı katı Tris ile 8.7'ye getirildi. Böylece homojenatafinitekolonuna tatbik için hazırlanmış oldu (Whitney&Briggle, 1982).

### **Karbonik AnhidrazHomojenatınınAfinite Kolonuna Tatbiki ve EnziminElüsyonu**

Afinite jeli Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'ninCNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, L-tirozinkovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamidiazolanaraktirozine kenetlendi. Burada tirozinafinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazinspesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz

konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır (Kohn&Wilchek,1978).

pH'sı 8,7'ye ayarlanmış karbonik anhidraz enzim homojenatı, 25 mMTris-HCl/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH=8.7 ) çözeltisi ile dengelenmiş olan kolona tatbik edildi. Kolon 25 mMTris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH=8.7) çözeltisi ile yıkandı. Ardından 0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip, karbonik anhidraz enzimi elüe edildi. (Arslan, Nalbantoglu, Demir, Özdemir ve Küfrevioğlu, 1996).

Elüatlarda, 280 nm'dekalitatif protein tayini ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar, birleştirilerek Coomassie-blue yöntemi ile toplam protein miktarı ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi belirlendi. Daha sonra homojenat ve saf enzim çözeltileri için spesifik aktiviteler, ayrı ayrı belirlenerek saflaştırma oranı hesaplandı.

#### **Protein tayini:**

Kromatografi işlemleri sonunda fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda 280 nm'deabsorbans ölçümleri yapılarak kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüpler birleştirilerek CoomassieBrillant Blue G-250 yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı (Bradford,1976).

#### **CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi Tayini**

Burada Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson Yöntemi kullanıldı (Rickli, Ghazanfar, Gibbons &Edsall1964;Sly&Peigi,1995).Bu yöntem, CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi. 2 mLveronal tamponu (pH=8,2), % 0,004'lük brom timol mavisi çözeltisinden 0,2 ml alınarak karıştırıldı. Bu karışıma enzim çözeltisinden 0,8 ml, 0°C'de doyurulmuş CO<sub>2</sub> çözeltisinden 2 ml ilave edildi. Bir kronometre ile, CO<sub>2</sub> çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi için geçen süre belirlendi (t<sub>c</sub>). Aynı süre enzimsiz olarak da tespit edildi (t<sub>0</sub>).

Wilbur-Anderson birimi =  $\frac{t_0}{t_c}$  formülünden bulundu.

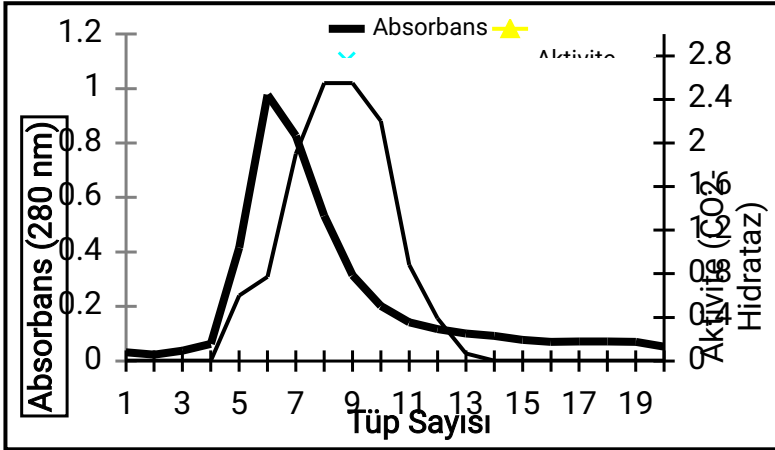
#### **Sığır İnce Bağırsağından Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerine**

### Bazı İlaçların Etkisinin İncelenmesi

Saf olarak elde edilmiş olan ince bağırsak karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine ornidazol, metronidazol, etken maddelerine sahip iki farklı ilacın etkileri araştırıldı. Bu çalışmada karbonik anhidraz enziminin sahip olduğu CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi yönteminden yararlanıldı. Ölçümler 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-6</sup> M olmak üzere üç farklı konsantrasyonda yapıldı. Ölçüm esnasında ilaç hacimleri en az 100µL, en fazla 600µL olacak şekilde alındı. Sonuçlar Aktivite-[ilaç] grafikleri halinde verildi.

### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada sığır ince bağırsağından karbonik anhidraz enzimi saflaştırılmış ve elde edilen saf enzimin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkileri araştırılmıştır. İnce bağırsak dokusundan karbonik anhidraz enziminin afinitekromatografisi ile saflaştırılması sırasında eluatlardaki protein muhtevaları 280 nm'de absorbanları ölçülerek belirlendi (McIntoshi, 1969). Saflaştırılan enzimin aktivite-absorbans grafikleri Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Afiinite kolonundan sığır ince bağırsak total karbonik anhidraz enziminin 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5,6) tamponuyla elüsyonu; (—) 280 nm'de absorbanı, (—) Wilbur-Anderson birimi ile aktivite, kolon 1,3 cm<sup>2</sup> x 60 cm, jel yüksekliği 50 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.

Saf enzim ve homojenatın spesifik aktiviteleri hesaplanarak saflaştırma

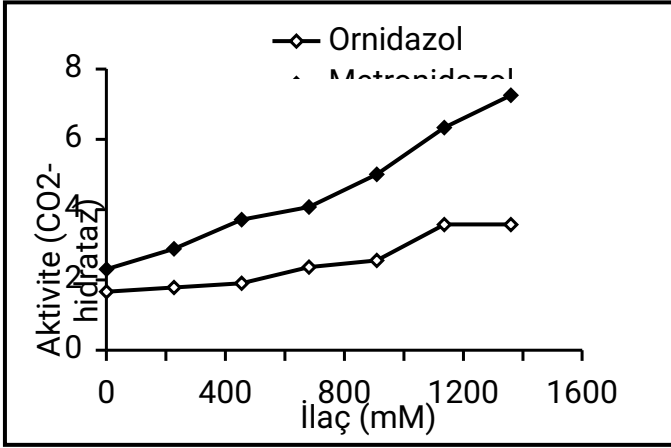
çizelgeleri çıkarıldığında ince bağırsak karbonik anhidrazının 1150 kat saflaştırdığı görülmektedir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Sığır ince bağırsağından elde edilen total karbonik anhidraz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan total karbonik anhidraz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma oranı sonuçları

Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Total Aktivite EÜ	%	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	300	1.69	507	100	87.5	0.0193	-
Afinite kolonundan sonra	40	3.275	135	26.62	0.152	22.2	1150.4

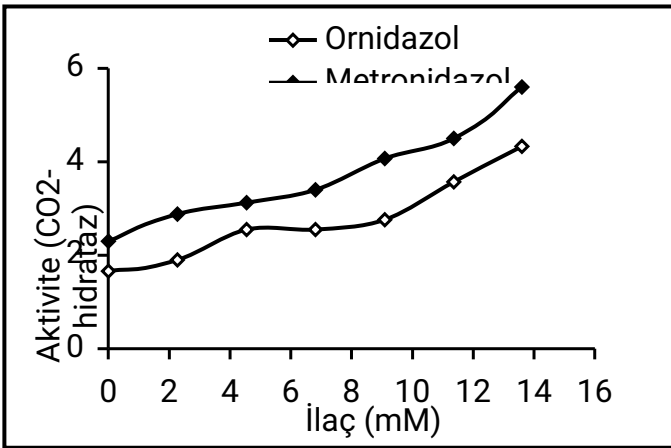
Saf olarak elde edilmiş olan total ince bağırsak karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesi üzerine ornidazol ve metronidazol, etken maddelerine sahip iki farklı ilacın etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada ilaçların  $10^{-2}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-6}$  M olmak üzere üç farklı konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümü esnasında deney ortamındaki ilaç konsantrasyonları hesaplanarak elde edilen sonuçlara göre Aktivite-[ilaç] grafikleri çizilmiştir.

Sığır ince bağırsak karbonik anhidraz enziminin aktivitesi, ornidazol ve metronidazol içerikli ilaçların  $10^{-2}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-6}$  M'lık stok çözeltilerinde konsantrasyon artışına paralel olarak artmıştır (Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4).



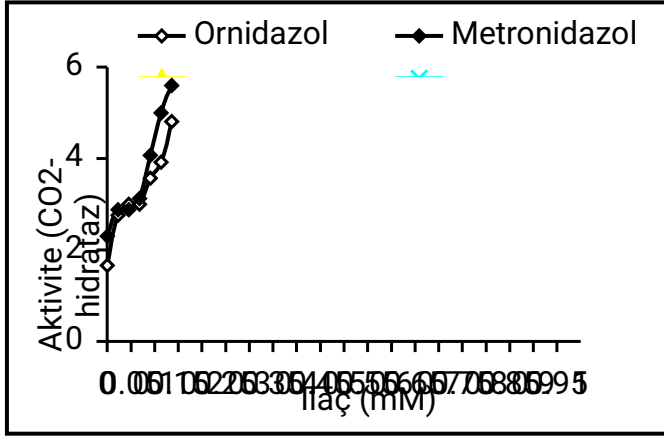
**Şekil 2.** İnce bağırsaktan saflaştırılan total karbonik anhidraz enziminin CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerine Ornidazol ve Metronidazol ilaçlarının etkisi (10<sup>-2</sup> M stok çözelti)

Grafikler incelendiğinde metronidazol içerikli ilacın özellikle 10<sup>-2</sup> M konsantrasyondaki stok çözeltide yapılan denemelerde aktiviteyi artırıcı etkisinin ornidazolden daha fazla olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 3.** İnce bağırsaktan saflaştırılan total karbonik anhidraz enziminin CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerine Ornidazol ve Metronidazol ilaçlarının etkisi (10<sup>-4</sup> M stok çözelti)





**Şekil 4.** İnce bağırsaktan saflaştırılan total karbonik anhidraz enziminin CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerine Ornidazol ve metronidazol ilaçlarının etkisi (10<sup>-6</sup> M stok çözelti)

Farklı organizmalardan saflaştırılan CA enzimlerin aktiviteleri üzerine çeşitli kimyasalların, pestisitlerin ve ilaçların etkileri birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır (Demir, 2004; Ekinci, 2007; Altıntop vd., 2015; Altıntop vd., 2017a.; Altıntop vd., 2017b).

Metronidazole ve ornidazol bağırsak enfeksiyonlarında, protozoal, anaerobik enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan bir antibiyotiklerdir. (Löfmark vd., 2010). Anaeroprotozoon veya bakteri hücresine difüze olan metronidazol, bu hücrelerin redoks potansiyeline sahip proteinleri tarafından ara metabolitlere dönüştürülmektedir. Bu ara metabolitler hücre DNA'sına bağlanarak DNA sentezini inhibe etmekte ve hücrenin ölümüne yol açmaktadır. Ornidazol isenitroimidazol türevidir. Anaerob bakterilere bağlı enfeksiyonlarda, kolon ve jinekolojik vakalar başta olmak üzere tüm cerrahi müdahalelerde, amipli dizanteri dahil tüm intestinal enfeksiyonlarda kullanılmaktadır.

Bu çalışma sonucunda ilgili enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin bakterisit etkisinin yanında sekonder olarak da CA enziminin aktivitesi üzerine aktivatör etki sağladığı belirlenmiştir.

## **Kaynaklar**

- Altıntop, M.D., Ozdemir, A., Kucukoglu, K., Turan-Zitouni, G., Nadaroglu, H., Kaplancıklı, Z.A.(2015). Synthesis and Evaluation of New Thiadiazole Derivatives as Potential Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase Isozymes (hCA-I and hCA-II), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(1), 32-37. <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2013.873038>
- Altıntop, M.D., Sever, B., Çiftçi, G.A., Kucukoglu, K., Ozdemir, A., Soleimani, S.S., Nadaroglu, H., Kaplancıklı, Z.A.(2017a). Synthesis and Evaluation of New Benzodioxole-Based Dithiocarbamate Derivatives as Potential Anticancer Agents and hCA-I and hCA-II Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.035>
- Altıntop, M.D., Sever, B., Özdemir, A., Kucukoglu, K., Onem, H., Nadaroglu, H., Kaplancıklı, Z.A.(2017b). Potential inhibitors of human carbonic anhydrase isozymes I and II: Design, synthesis and docking studies of new 1,3,4-thiadiazole derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(13), 3547-3554. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.005>.

- Anderson, A.K. (2005). Affective Influences on the Attentional Dynamics Supporting Awareness. *Journal of Experimental Psychology: General*, 154, 258–281. doi:10.1037/0096-3445.134.2.258
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. (1996) A New Method for the Purification at Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turk J MedSci* 26: 163-166
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Britta, K., Ralf, R. (1997).  $\beta$ -lactam antibiotics inhibit chloroplast division in a moss (*Physcomitrella patens*) but not in tomato (*Lycopersicon esculentum*): *Journal of Plant Physiology*, 150, 137-140. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80193-9
- Demir, Y., Nadaroğlu, H., Demir, N. 2004. Effects of omeprazole, famotidine, and ranitidine on the enzyme activities of carbonic anhydrase from bovine stomach in vitro and rat erythrocytes in vivo, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1730-1734. http://doi.org/10.1248/bpb.27.1730
- Demir, Y., Nadaroğlu, H., Demir, N. (2006) Effect of Glimepiride on Paraoxonase Activity: *Pharmaceutical Biology*, 44 (5), 396–399. http://dx.doi.org/10.1080/13880200600751717
- Ekinci, D., Beydemir, S., Alim, Z. 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II, *Pharmacological Reports*, 59, 580-587.
- Fleming, R.E., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Waheed, A., Sly, W.S. (1995) Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular and subcellular localization. *J. Chin. Invest.* 96, 2907-2913. doi: 10.1172/JCI118362
- Hansson, H.P.J. (1967) Histokimyasal Demonstration of Carbonic Anhydrase Activity. *Histochemie*. 11, 112-128.
- Hewett-Emmett, D. (2000) *In the carbonic anhydrase- new horizons*. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Kohn, J., Wilchek, M. (1978) Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 7-14. https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)90255-3

- Löfmark, S.,Edlund, C. andNord, C.E. Metronidazole Is StilltheDrug of ChoiceforTreatment of AnaerobicInfectionsClinicalInfectiousDiseases 2010; 50:S16–23 doi:<https://doi.org/10.1086/647939>
- Maren TH (1967) Carbonic Anhydrase, Chemistry, Physiology and Inhibition. Physiological
- McIntosh, J.E.A. (1969) Carbonikanhydraseisoenzymes in theerythrocytesanddorsdaterralprostate of rat. Biochem. J. 114, 463-467.
- Onat, T.,Emerk, K. (1997) Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, (2. Baskı) İzmir.
- Pocker, Y.,Sarkanen, S. (1978) Carbonicanhydrase: Structure, catalyticversalityandinhibition. Adv. Enzym. 49, 149-274.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H. and Edsall, J.T (1964) Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes. Journal of Biological Chemistry 239: 1065-1078
- Sly, S.W., Peigi, Y.H. (1995) Human carbonic anhydrase and carbonic andrase deficiencies. Annu. Rev. Biochem., 64, 375-401. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.002111>
- Whitney, P.L.,Briggle, T.V (1982) Membrane-associatedcarbonicanhydrasepurifiedfrombovinelun g. J. Biol. Chem. 257, 12056-12059.
- Zhu, X.L.,Sly, W.S. (1990) Carbonicanhydrase IV fromhumanlung. Purification, characterizationandcomr rarisonwithmembranecarbonicandydra sefromhumankidney. J. Biol. Chem. 265, 8795-8801.

