

Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Rivastigmin ve Galantamin İlaç Etken Maddelerinin CA I ve II İzoenzimleri Üzerine *in vitro* Etkilerinin İncelenmesi

Esra DİLEK¹, Murat ÇANKAYA^{2*}, Talat EZMECİ, Mukadder SUNAR⁴,
T. Abdulkadir ÇOBAN⁵

¹Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

²Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye

³Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlık, Erzincan, Türkiye

⁴Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

⁵Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

(Geliş Tarihi/Received: 24.10.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 22.12.2016)

ÖZ

Karbonik anhidraz (CA, EC.4.2.1.1), CO₂'in, HCO₃⁻ ve H⁺ iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen, çinko (Zn²⁺) iyonlu metallo enzimlerden biridir. Fizyolojik ve patolojik birçok proste önemli rol oynar. Bu çalışmanın amacı, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bazı ilaç etken maddelerinin insan eritrosit CA I ve II izoenzimleri üzerine *in vitro* etkilerini araştırmaktır. İnsan kanından CA-I ve II izoenzimleri Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfamid afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. CA I izoenzimi: yaklaşık % 61.7 verimle 122.2 kat; CA II izoenzimi: % 60 verimle 807.5 kat saflaştırılmıştır. CA I için rivastigmin yarışmalı inhibisyon, galantamin ise yarışmasız inhibisyon gösterdi. CA II için ise her iki etken madde de yarışmasız inhibisyon gösterdi. K_i değerleri ise rivastigmin için CA I: 0.79 µM; CA II: 1.08 µM, galantamin için CA I: 0.41µM; CA II: 0.40 µM olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında en kuvvetli inhibitör galantamin olarak tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Rivastigmin, Galantamin, İnhibisyon, Karbonik anhidraz.

Investigation *in vitro* Effects of Rivastigmine and Galantamine Used to Treatment of Alzheimer's Disease on CA Isozymes I and II

ABSTRACT

The carbonic anhydrases (CA, EC. 4.2.1.1) are an expanding family of zinc-containing enzymes catalyzing the reversible hydration of CO₂ in a two-step reaction to yield HCO₃⁻ and H⁺. These enzymes play important roles in several physiological/pathological processes. The aim of this study is to evaluate *in vitro* the effects of these drug active substances which use which use for treatment of Alzheimer disease on CA I and II isoenzyme. CA I and II isoenzymes from human blood have been purified using Sepharose-4B-l-tyrosine-sulfanilamide affinity chromatography method. The CA I isoenzyme was purified ~122.2-fold with a yield of 61.7%. The CA II isoenzyme was purified ~807.5-fold with a yield of 60%. rivastigmine was showed competitive inhibition and galantamine was showed uncompetitive inhibition for CAI. Both of these drug active substances were showed uncompetitive inhibition for CAII. K_i values were determined for rivastigmine CA I: 0.79 µM; CA II: 1.08 µM and for galantamine CA I:

0.41µM; CA II: 0.40 µM. The results obtained in this study galantamine was identified as the most potent inhibitor.

Keywords: Rivastigmine, Galantamine, Inhibition, Carbonic anhydrases

1. Giriş

Canlı organizmalar biyolojik fonksiyonlarını birçok biyokimyasal reaksiyonlar sayesinde gerçekleştirirler. Bu reaksiyonların hızlı bir şekilde gerçekleşebilmesi, biyolojik katalizörler olarak bilinen enzimler sayesinde olur. Enzimleri diğçer proteinlerden ayıran özelliğiy ise reaksiyonları katalizleme özelliğiydir. Katalizörlük yaparken her hangi bir yan ürün üretmeyerek büyük bir avantaj sağlar (Telefoncu, 1986). Canlılarda gerçekleşen temel enzimatik olaylardan biri de karbondioksitin (CO₂) hidrasyonudur. Yavaş bir reaksiyon olan karbondioksitin (CO₂) bikarbonat (HCO₃⁻) ve protona (H⁺) dönüşümünü katalizleyen enzim ise karbonik anhidraz enzimidir (CA). CA enzimi sayesinde yavaş gerçekleşen bu reaksiyonun hızı saniyede 10⁴-10⁶ kat arttırılmaktadır. CA (Karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1), aktif bölgesinde çinko (Zn²⁺) iyonu bulduran metalloenzim ailesinin bir üyesi olup kırmızı kan hücrelerinde, hayvanların diğçer kısımlarında ve bitkilerde bulunur. Enzimin memelilerdeki moleköl kütleli 30 kDa civarında olduğı çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir (Bayram vd., 2008; Coban vd., 2009; Feldstein ve Silverman 1984; Krungkrai vd., 2001; Beydemir vd., 2002)

Enzimler vücuda dışardan alınan ya da vücut içerisinde oluşçan herhangi bir maddeyle

etkileşebilmektedirler. Bu etkileşim sonucu bazı bileşikler enzimin aktivitesinde azalmaya neden olurken bazıları da aktivitesinde artışa neden olabilmektedirler. Enzimlerin bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük moleköl ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaç ve zehirli bileşik, etkilerini bu yolla gerçekleştirirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2014). İnhibitörler; hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2014). Tedavi amaçlı vücuda alınan ilaçların etki mekanizmalarını belirlemek ve ileri tetkikler için yarar sağlamak adına bugüne kadar birçok enzimin farklı ilaçlarla olan inhibisyon çalışmaları rapor edilmiştir (Sarıkaya vd., 2014; Cankaya vd., 2012; Dilek ve Çağlar, 2015; Dilek ve Polat, 2016; Çiftçi vd., 2000). Aynı zamanda bir maddenin farklı enzimlerle olan etkileşimleri de rapor edilmiştir. Örneğiy; CA I ve II izoenzimlerini farklı oranlarda inhibe eden moleküller bulunmuştur (Gocer vd., 2015; Goçer vd., 2016; Özgeris vd., 2016; Scozzafava vd., 2015). Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan rivastigmin ve

galantamin ilaç etken maddelerinin CA I ve II izoenzimleri ile etkileşime girebileceğini düşündük ve bu izoenzimler üzerindeki inhibisyon etkilerini araştırdık.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

Sefaroz 4B, protein analizi reaktifleri ve 4-nitrofenilasetat Sigma-AldrichCo.'dan temin edildi. Diğer tüm kimyasallar ise Merck'den temin edilmiştir.

2.2. İnsan Kanından Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması

Deneyde kullanılan insan kanı Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesinden temin edildi. Kullanılacak kan, antikoagulantlı kan torbalarına alındıktan sonra 4°C'de muhafaza edildi. Daha önceki çalışmalarda uygulanan prosedürler uygulandı (Bayram vd., 2008; Coban vd., 2009). Sırasıyla insan kanından eritrositler ayrıldı ve soğuk saf su ile hemoliz edildi. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4°C'de 20.000 rpm'de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH'sı katı Tris ile 8.7'ye getirildi. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B-L-Tirozin ile etkileştirildi. 100 mL 0.2 M NaHCO₃ (pH 8.80) tamponu ile yıkandıktan sonra kolon materyali aynı tamponun 40 mL si içine alındı. Diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7.8) içine

alınarak süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi ve dengeleme tamponu ile yıkandı.

Katı Tris ile pH'sı 8.7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH:8.7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6.3) tamponu tatbik edilerek CA I enzimi daha sonra 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO (pH:5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve her bir tüp için protein miktarı ve aktivite değerlerine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek kinetik çalışmaları yapmak üzere 4°C'de muhafaza edildi (Bayram vd., 2008; Coban vd., 2009; Sarıkaya vd., 2011).

2.3. Esteraz aktivitesi tayini

Prensip olarak CA, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte vd., 1967). Bu yöntem CA enzimlerinin esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Kuvartz küvetlere tamponlanmış enzim çözeltisi (0.05 M Tris-SO₄pH=7.4 içinde) ve 1.5 ml substrat (+inhibitör) konulmasından 3 dakika sonra 25°C'da 348 nm'de absorpsiyon değeri köre karşı okundu.

2.4. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

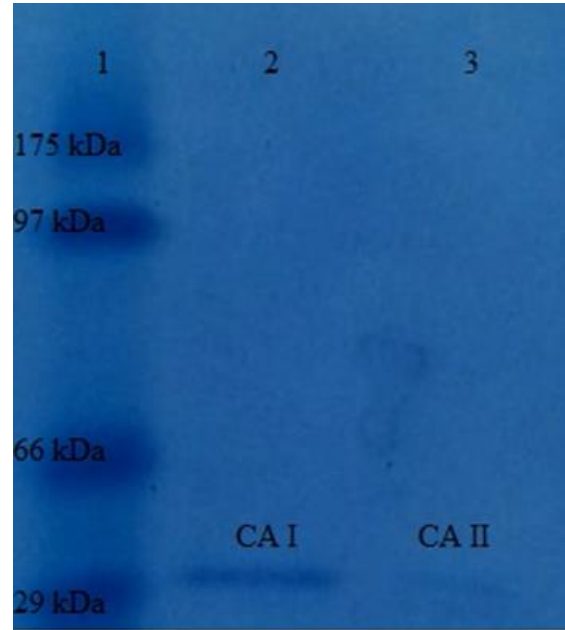
2.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970).

2.6. İlaç Etken Maddelerinin CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi

İnsan eritrositlerinde saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik-çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, IC50 değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 mL olduğundan ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldığından; ortamdaki substrat konsantrasyonu 1 mM'dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. p-Nitrofenil asetatın ise $0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorpsiyon değerinin 5'e bölümü ile ortamdaki p-nitrofenol (p-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir (Lineweaver ve Burk, 1934).



Şekil 1. Saflaştırılmış CA I ve II için SDS-PAGE fotoğrafı 1. Bant: Standart proteinler; Protein B Galaktozidaz (175 kDa), Tavşan fosfofosforilaz B (97 kDa), Sığır Serum Albümin (66 kDa), Sığır Serum Karbonik Anhidraz (29 kDa), 2. Bant: Saflaştırılmış İnsan Karbonik Anhidraz I izoenzimi (30 kDa), 3. Bant: Saflaştırılmış İnsan Karbonik Anhidraz II izoenzimi (30 kDa).

2.7. İlaç Etken Maddelerinin CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin Ki sabitleriyle bulunması

Ki değerlerini bulmak için; insan eritrositlerinden afinite kromotografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Lineweaver Burk

grafiklerini çizmek için bu değerler $1/V$ değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları $[S]$, grafikte kullanmak için $1/[S]$ değerlerine dönüştürüldü. Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün CA I ve CA II enzimleri için ayrı ayrı Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden, KM ve V_{max} değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitörler için kullanılan eşitlikte yerine konularak Ki değerleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

Tablo 1. İnsan kanından CA I ve II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.

Numune türü	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	51	152	19,45	7,81	100,00	1,00
CA I	10,23	468	0,49	955,10	61,76	122,22
CA II	5,45	852	0,135	6311,11	59,90	807,57

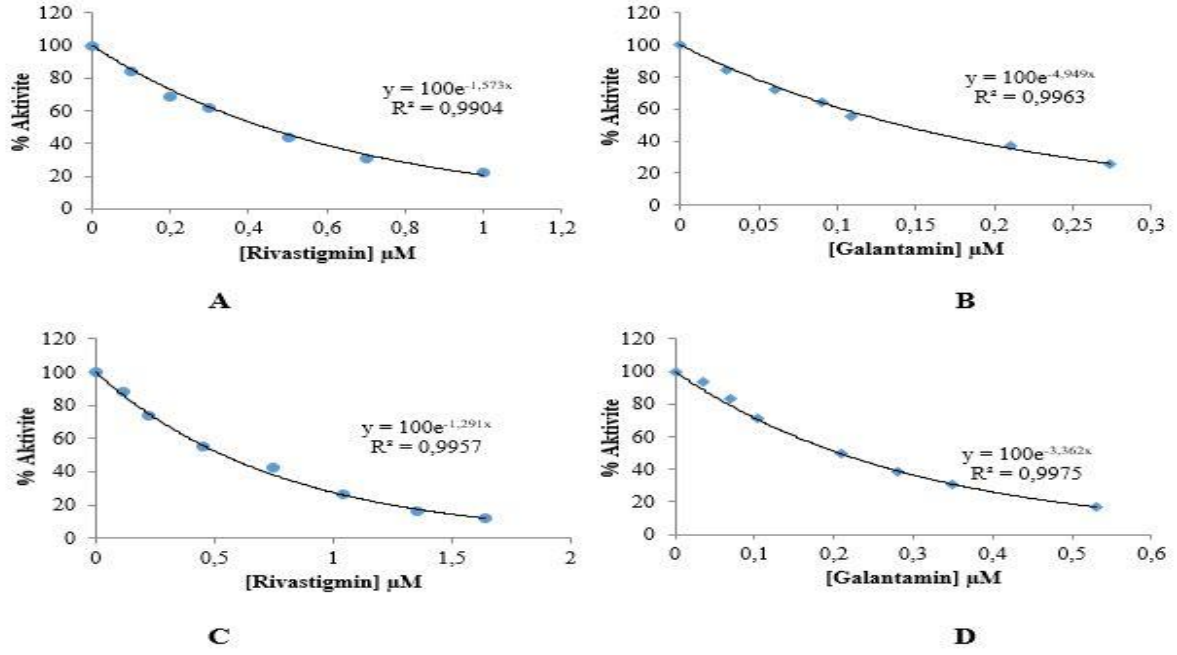
3. Bulgular

İnsan kanından afinite kromotografisi yöntemi ile CA I izoenzimi: yaklaşık % 61.7 verimle 122.2 kat; CA II izoenzimi: % 60 verimle 807.5 kat saflaştırıldı (Tablo 1).

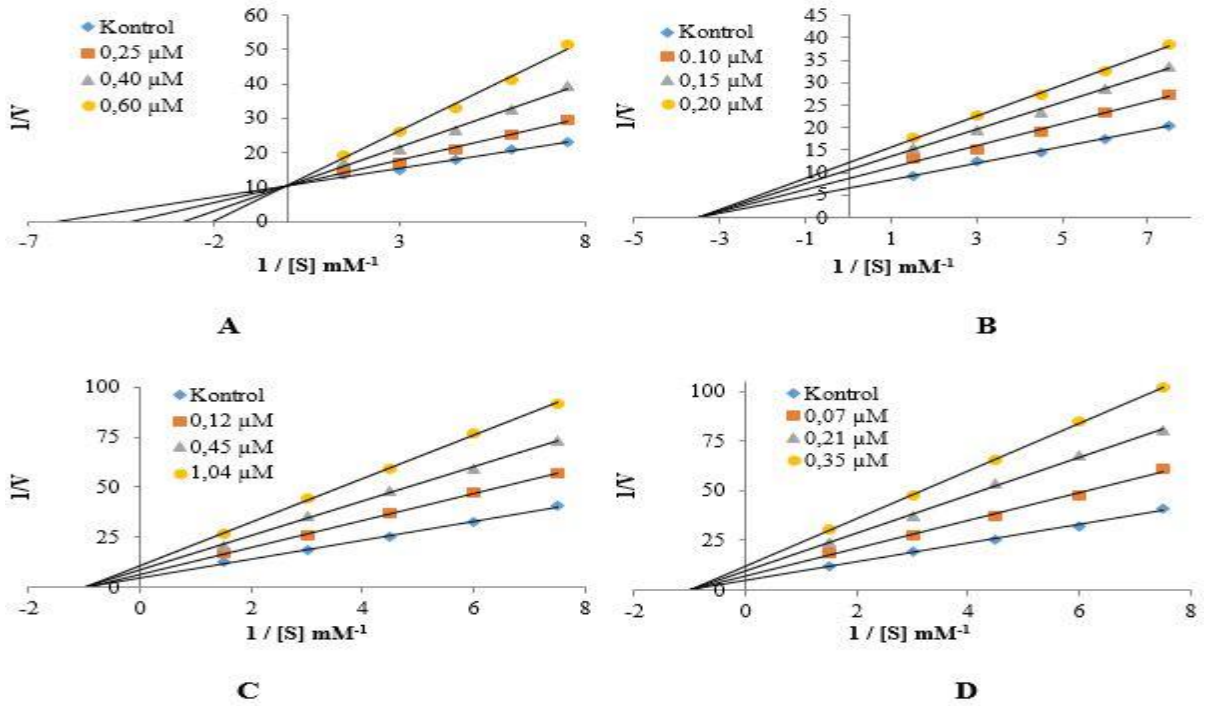
Saflaştırılan izoenzimlerin aktiviteleri üzerine rivastigmin ve galantamin etken maddelerinin inhibisyon etkilerine bakıldı. İnhibitör konsantrasyonuna karşı % aktivite (% aktivite-[I]) grafikleri çizildi (Şekil 2.). Eğrilerin denkleminde CA I ve II izoenzimleri için IC_{50} değerleri hesaplandı.

Bu değerler rivastigmin için CA I: 0.44 μM ; CA II: 0.54 μM ve galantamin için CA I: 0.14 μM ; CA II: 0.21 μM olarak hesaplandı (Tablo 2).

Çalışmada kullanılan etken maddelerin Ki değerlerini belirlemek amacıyla, 5 farklı substrat konsantrasyonuna karşı belirlenen üç sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite değerlerine bakıldı ve her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.) (Lineweaver ve Burk, 1934).



Şekil 2. Rivastigmin ve galantamin etken maddelerinin CA I izoenzimine karşı (A ve B), CA II izoenzimine karşı (C ve D) %Aktivite-[I] grafikleri



Şekil 3. Rivastigmin ve galantamin etken maddelerinin CA I izoenzimine karşı (A ve B), CA II izoenzimine karşı (C ve D) Lineweaver-Burk grafikleri

Tablo 2. Rivastigmin ve galantamin ilaç etken maddelerinin CA I ve II izoenzimlerine karşı IC₅₀ değerleri.

İnhibitör	IC ₅₀ değeri (µM)	
	CA I	CA II
Rivastigmin	0.44	0.54
Galantamin	0.14	0.20

Bu grafikler yardımıyla inhibisyon tipleri ve Ki değerleri belirlendi. CA I için rivastigmin yarışmalı inhibisyon, galantamin ise yarışmasız inhibisyon gösterdi. CA II için ise her iki etken madde de yarışmasız inhibisyon gösterdi. Ki değerleri ise rivastigmin için CA I: 0.79 µM; CA II: 1.08 µM, galantamin için CA I: 0.41µM; CA II: 0.40 µM olarak hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 3. Rivastigmin ve galantamin ilaç etken maddelerinin CA I ve II izoenzimlerine karşı K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.

İnhibitör	K _i değeri (µM)		İnhibisyon tipi	
	CA I	CA II	CA I	CA II
Rivastigmin	0.79	1.08	Yarışmalı inhib.	Yarışmasız inhib.
Galantamin	0.41	0.40	Yarışmasız inhib.	Yarışmasız inhib.

4. Tartışma

Bu çalışmada insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (CA I ve II) afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan rivastigmin ve galantamin ilaçlarının etken maddelerinin bu izoenzimler üzerindeki inhibisyon etkileri in vitro olarak belirlendi. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar genel olarak AChE enziminin spesifik inhibitörleridir. Bu çalışmada kullanılan ilaç etken maddelerinin de bu enzimin inhibitörleri olduğu bilinmektedir (Colovic vd., 2013). Yapılan bazı çalışmalarda AChE enzim inhibitörlerinin CA izoenzimleri üzerinde de inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur (Gocer vd., 2015; Goçer vd., 2016; Özgeris vd., 2016; Scozzafava vd.,

2015). Bu çalışmada da gördük ki; rivastigmin ve galantamin ilaçlarının etken maddeleri önemli ölçüde CA I ve II izoenzimleri inhibe etmektedirler.

Rivastigmin; AChE enzimini zayıf, seçici ve geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Hafif ve orta derecedeki Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır (Desai ve Grossberg, 2005). Galantamin ise; Galanthus woronowii bitkisinden izole edilen bir alkoloiddir. Orta derecedeki Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır. AChE enzimini güçlü, seçici ve geri dönüşümlü olarak inhibe eder. İnhibisyon etkisini yarışmalı olarak gösterir (Bartolucci vd., 2001; Pilger vd., 2001; Kitisripanya vd., 2011). Diğer Alzheimer ilaçları ile karşılaştırıldığında daha az tolere edilebilir olduğu bilinmektedir (Birks ve Cholinesterase, 2006).

Alzheimer hastalığının tedavisi için önerilen bu ilaç etken maddelerinin insanlar üzerinde etkileri de büyük önem kazanmaktadır. AChE enzimi üzerine inhibisyon etkileri çalışılmış olup CA I ve II izoenzimleri üzerinde bir çalışma mevcut değildir (Bartolucci vd., 2001; Pilger vd., 2001; Kitisripanya vd., 2011). Bu amaçla literatüre katkı sağlamak adına bu etken maddelerin in vitro olarak CA I ve II izoenzimleri üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

İnhibisyona neden olan etken maddelerin inhibisyon etkisi K_i ve IC_{50} olmak üzere iki farklı değerle verildi. En pratik parametre IC_{50} değeridir. Çünkü K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Fakat inhibisyon tipinin belirlenebilmesi için K_i değerinin hesaplanması şarttır. İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V$ ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarından değerlendirmeler yapılır (Nelson ve Cox, 2004). Çalışmamızda etken maddelerin ne tür inhibisyon gösterdikleri bu metotla tespit edildi. Rivastigmin yarışmalı inhibisyon, galantamin ise yarışmasız

inhibisyon gösterdi. Bu da rivastigminli ortamda enzimin substrata olan ilgisinin azaldığını ($K_M < K_{MI}$), maksimum hızın ise değişmediğini ($V_{max} = V_{maxI}$) göstermektedir. Galantamin ilave edildiği ortamda ise enzimin substrata olan ilgisi değişmezken ($K_M = K_{MI}$), maksimum hız değeri ($V_{max} > V_{maxI}$) azalmıştır.

5. Sonuç

Elde edilen sonuçlara bakıldığında uygulanan ilaç etken maddelerinin içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile her iki izoenzim üzerinde de en kuvvetli inhibitör galantamin (IC_{50} : CA I: 0.14 μ M; CA II: 0.21 μ M) olarak tespit edildi. CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda hayati fonksiyonlara sahip bir enzimdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ilaçların hastalar üzerinde yapacağı yan etkilerin sebeplerini araştırırken doktorlara katkı sağlayacaktır.

6. Kaynaklar

- Bartolucci, C., Perola, E., Pilger, C., Fels, G., Lamba, D. 2001. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins*, 42, 182–191.
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2008. Supuran C.S. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 9101-9105.

- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Büyükokuroğlu, M.E. 2002, Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Birks, J. 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD005593.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cankaya, M., Aktas, M., Kuzucu, M., Gülçin, I., Coban, T.A. 2012 Effects of some drugs on human cord blood erythrocyte carbonic anhydrases I and II: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(5), 641-645.
- Ciftçi, M., Küfrevioğlu, O.İ., Gündoğdu, M., Özmen, I. 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*, 41,109-113.
- Coban, T.A., Beydemir, S., Gülçin, I., Gücin, I., Ekinci, D., Innocenti, A. 2009. Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 5791-5795.
- Colovic, M.B., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M. 2013. Acetylcholin esterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
- Desai, A.K., Grossberg, G.T. 2005. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 5, 563-580.
- Dilek, E., Caglar, S. 2015. Effects of mono and dinuclear copper (II) complexes derived from non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen on human serum paraoxanase₁ (PON₁) activity. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 189-195.
- Dilek, E. Polat, M.F. 2016. In vitro inhibition of three different drugs used in rheumatoid arthritis treatment on human serum paraoxanase 1 enzyme activity. *Protein and Peptide Letters*, 23, 3-8.
- Feldstein, J.B., Silverman, D.N. 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of therat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Gocer, H., Akincioglu, A., Goksu, S., Gulcin, I., Supuran. C.T. 2016. Carbonic anhydrase and acetyl cholin esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoyl carbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(2), 316-320
- Gocer, H., Topal, F., Topal, M., Kucuk, M., Teke, D., Gulcin, I., Alwase S.H., Supuran C.T. 2016. Acetyl cholin esterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles

- of taxifolin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 441-447.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2014. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi.
- Kitisripanya, N., Saparpakorn, P., Wolschann, P., Hannongbua, S. 2011. Binding of huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method. *Nanomedicine: Nanotechnology*, 7, 60-68.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J. 2001. Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparum. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lineweaver, H., Burk, D.J. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-66.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2004. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, 3. Baskı, Palme Yayıncılık, S. 259-261
- Özgeris, B., Göksu, S., Köse, L.P., Gülçin, I., Salmas, R.E., Durdagi, S., Tümer, F., Supuran. C.T. 2016. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel urea and sulfamide derivatives in incorporating dopaminergic 2-aminotetralin scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(10), 2318-29.
- Pilger, C, Bartolucci, C., Lamba, D., Tropsha, A., Fels, G. 2001. Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of torpedo californica acetylcholinesterase using molecular docking. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 19, 288-296.
- Sarikaya, S.B.O., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, I., Supuran, C.T. 2001. In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 5, 4259-4262.
- Sarikaya, S.B.O., Sisecioglu, M., Cankaya, M., Gulcin, I., Ozdemir, H. 2014. Inhibition profile of a series of phenolic acids on bovine lactoperoxidase enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 1-5.
- Scozzafava, A., Kaln, P., Supuran, C.T., Gülçin İ., Alwasel, S.H. 2015. The impact of hydroquinone on acetyl choline esterase and certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(6), 941-946.
- Telefoncu, A. 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Ege Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak. Yayını; S. 59, İzmir.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4230.