

C Vitamininin Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) Üzerine Etkisi

Yağmur HOŞGÖR¹, Ekrem TUNCA^{1*}, Metin BÜLBÜL¹

¹Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Kütahya, Türkiye

Sorumlu yazar e-posta: ekrem.tunca@dpu.edu.tr

e-posta: yağmur.hosgor@hotmail.com

metin.bulbul@dpu.edu.tr

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7556-8379>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8396-4272>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4722-447X>

Geliş Tarihi: 03.03.2021

Kabul Tarihi: 25.09.2021

Öz

Anahtar kelimeler

C vitamini; Karbonik anhidraz; İnhibisyon; Glokom

Metabolik faaliyetlerin sorunsuz bir şekilde yerine getirilmesinde vitaminlerin önemi son derece büyüktür. Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini, antioksidan özellik gösterir, nörotransmitasyonda ve kolajen sentezi gibi pek çok biyolojik süreçte rol alır. Karbonik anhidraz (CA) izoenzimleri ise elektrolit salınımı, pH dengesi, iyon taşınımı ve bunlarla ilişkili birçok süreçte rol alır. Çalışmamızda, C vitamininin, insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. L-Askorbik asidin hCA I ve hCA II izoenzimlerini yarışmasız inhibisyon mekanizması üzerinden inhibe ettiği, K_i değerinin sırasıyla $96.80 \pm 11.19 \mu\text{M}$ ve $120.46 \pm 22.11 \mu\text{M}$ olduğu belirlenmiştir.

The Effect of Vitamin C on Carbonic Anhydrase Isoenzymes (hCA I and II)

Abstract

Keywords

Vitamin C; Carbonic anhydrase; Inhibition; Glaucoma

Vitamins play an extremely important role in the smooth functioning of metabolic activities. Vitamin C, which is one of the water-soluble vitamins, has antioxidant properties and plays a role in many biological processes such as neurotransmission and collagen synthesis. Carbonic anhydrase (CA) enzymes play a role in electrolyte release, pH balance, ion transport and many related processes. In our study, the inhibition effects of vitamin C, on hCA I and hCA II purified from human erythrocytes were investigated as *in vitro*. It was determined that L-Ascorbic acid inhibits hCA I and hCA II isoenzymes through its non-competitive inhibition mechanism, and its K_i value was $96.80 \pm 11.19 \mu\text{M}$ and $120.46 \pm 22.11 \mu\text{M}$, respectively.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

C vitamini (L-Askorbik asit), birçok hayvanın böbrek veya karaciğerinde glukozdan sentezlenen altı karbonlu bir ketolaktondur (Marik 2020). Bununla birlikte, insanlar, diğer primatlar, kobaylar ve meyve yarasaları, C vitamini sentezinin son aşamasını katalize etmekten sorumlu enzim olan L-gulonolakton oksidaz (GULO) enzimini kodlayan gende inaktive edici bir mutasyon barındırdıklarından, C vitamini sentezleyemezler (Marik 2020). Bu nedenle insanlar diyetle C vitamini almalıdırlar. Plazmada C vitamini konsantrasyonu olan $30-80 \mu\text{M}$, meyve ve sebzelerden oluşan dengeli bir diyet ile günlük ihtiyaç olan $75-80 \text{ mg}$ C vitamini

alımından rahatlıkla sağlanabilir (Padayatty and Levine 2016).

C vitamini genellikle, kollajen sentezi ve skorbüt hastalığının önlenmesi için gerekli bir mikrobesein olarak kabul edilir. Bununla birlikte C vitamini, bir antioksidan olarak önemli bir rol oynar, çok sayıda biyolojik reaksiyonda, nörotransmisyon ve nöromodülasyonda kritik bir rol üstlenir. C vitamininin, bakteri ölümünü artırarak, konağı oksidan yaralanmadan koruyarak, mitokondriyal ve metabolik fonksiyonu koruyarak, inflamatuvar yanıtı modüle ederek ve organ hasarını sınırlandırarak konak savunmasında önemli rolleri olduğu rapor edilmiştir (Marik 2020, 2018, Moskowitz *et al.* 2018). Son zamanlarda, damar yolu ile askorbik asit

uygulanmasının, kanserli hastalarda olumlu sonuçlar verdiğini gösteren Faz I ve Faz II testlerinin sonuçları yayınlanmıştır. Bu durum C vitamininin önemini bir kat daha artırmaktadır (Ngo *et al.* 2019). Bünyesinde Zn²⁺ iyonu bulunduran bir enzim olan karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1), karbon dioksitin (CO₂) hidrasyonu ve bikarbonatın (HCO₃⁻) dehidrasyonu reaksiyonlarını katalizler (Mert vd. 2019, Tunca vd. 2020). CA'lar elektrolit salınımı, pH regülasyonu, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, CO₂ ve çeşitli iyonların transportu, solunum, glukoneogenez, lipogenez, tümör oluşumu çeşitli patojenlerin gelişimi ve virülansı gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda görev alırlar (Supuran 2008, Supuran 2016, Alterio *et al.* 2012). Bu süreçlerde yer alan CA izoenzimlerinin birçoğu, ödem (Carta and Supuran 2013), glokom (Masini *et al.* 2013), obezite (Scozzafava *et al.* 2013), kanser (Nocentini and Supuran 2018), epilepsi (Aggarwal *et al.* 2013), vertigo (Sluch vd. 2017) ve osteoporoz (Carradori *et al.* 2015) gibi bir dizi rahatsızlığı tedavi etmek için inhibe olma potansiyeli olan önemli terapötik hedeflerdir. CA inhibitörlerinin, protozoa, mantar ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede potansiyel kullanımı da araştırılmaktadır (Supuran 2008).

CA inhibitörleri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. CA I ve CA II inhibitörleri olan asetazolamit (AAZ) ve brinzolamit (BRZ) glokom tedavisinde, topiramet epilepsi tedavisinde, AAZ ve metazolamit (MTZ) diüretik ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar (Alım *et al.* 2015). Sistemik olarak kullanılan bu ilaçların (AAZ ve MTZ) uyuşukluk, el ve ayak parmaklarında karıncalanma, tat almada bozukluk, bulanık görme ve böbrek taşı oluşumu gibi yan etkileri vardır (Kasımoğulları *et al.* 2010). Yan etkisi daha az olabilecek yeni sentetik bileşiklerin ve doğal kaynaklı bileşiklerin CA üzerine etkileri çeşitli araştırma grupları tarafından incelenmiştir (Balaydın *et al.* 2012, Göçer *et al.* 2016, Arabacı *et al.* 2014).

Bu çalışmada günlük ihtiyacımız olan C vitamininin, kimyasal formu olan L-Askorbik asidin insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan L-askorbik asit ve tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Hemolizatin hücre membranlarından ayrımı soğutmalı santirfüj (SIGMA 3K30) ile sağlanmıştır. Afinite saflaştırması peristaltik pompa (ISMATEC REGLO Digital MS-2/6) ile gerçekleştirilmiştir. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamdaki enzim aktivite çalışmaları UV-Visible spektrofotometre (SHIMADZU UV1700 PharmaSpec) kullanılarak yapılmıştır.

2.2 CA izoenzimlerinin saflaştırılması

Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 1500 rpm devirde 20 dk. santrifüjlenerek plazma ayrıldı. Eritrositler izotonik çözelti (%0.9 NaCl) ile birkaç kez yıkandı ve buzlu su ile (1:1.5) hemoliz edildi. Hemolizat, karışımın 4 °C sıcaklıkta, 20000 rpm devirde 30 dk. süreyle santrifüj edilmesi suretiyle ayrıldı. Hemolizatin pH'ı katı TRIS (tris(hidroksimetil)aminometan) kullanılarak 8.7 değerine ayarlandı ve 25.0 mM TRIS-HCl/100 mM Na₂SO₄ (pH 8.7) çözeltisi ile dengelenmiş afinite kolonuna (Sepharose® 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzensülfonamit) yüklendi. 25.0 mM TRIS-HCl/22.0 mM Na₂SO₄ (pH 8.7) çözeltisi ile yapılan yıkama işlemi takiben, hCA I izoenzimi 1000 mM NaCl/25.0 mM Na₂HPO₄ (pH 6.3) çözeltisi ile, hCA II izoenzimi ise 100 mM NaCH₃COO/500 mM NaClO₄ (pH 5.6) çözeltisi ile afinite kolonundan elüe edildi (Rickli *et al.* 1964). Saflaştırılan izoenzimlerde protein miktarı belirlendi (Bradford 1976) ve SDS-PAGE analizi yapıldı (Laemmli 1970).

2.3 CA enzim aktivitesi ölçümü

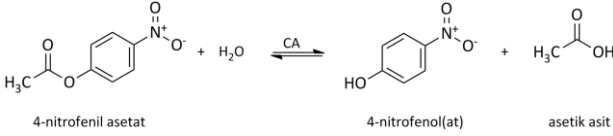
hCA I ve hCA II' nin CO₂ hidrataz aktivitesi pH-stat yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin prensibi, CO₂-H₂O reaksiyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu nedeniyle, pH' ın 8.15 den 6.15 e düşmesi için geçen sürenin pH metre ve kronometre kullanılarak belirlenmesidir (Şekil 1) (Wilbur and Anderson 1948, Maren 1960).



Şekil 1. Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi reaksiyonu.

Enzim ünitesi ise, $((t_0 - t_c) / t_c)$ eşitliği kullanılarak hesaplandı. Burada t_0 enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi, t_c ise enzim varlığındaki CO₂ hidrasyon süresidir.

Esteraz aktivitesi ise, substrat olarak kullanılan 4-nitrofenilasetat bileşiğinin, CA katalizörlüğünde, 4-nitrofenol(at) bileşiğine hidrolizi esnasında absorbans değerinde meydana gelen değişimin 348 nm de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Ölçümlerde 25 °C sıcaklık, 3 dakikalık süre esas alınmıştır (Şekil 2) (Verpoorte *et al.* 1967).



Şekil 2. Esteraz aktivitesi reaksiyonu.

2.4 L-Askorbik asidin IC₅₀ değerinin ve K_i sabitinin belirlenmesi

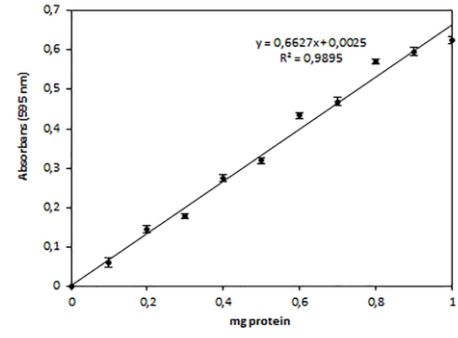
IC₅₀ değerini belirlemek için, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri, farklı L-Askorbik asit konsantrasyonlarında, "Bölüm 2.3" de tarif edildiği şekilde ölçüldü. İnhibitörsüz ortamdaki ölçümlerde enzim aktivitesi %100 kabul edildi, %Aktivite-[L-Askorbik asit] eğrisi çizildi ve eğri denklemleri yardımıyla bileşiklerin IC₅₀ değerleri belirlendi (İlkimen *et al.* 2015).

İnhibisyon sabiti (K_i), izoenzimlerin esteraz aktivitesi esas alınarak belirlendi. K_i değerlerinin belirlenmesi için, enzimli reaksiyon hızını %30, %50 ve %70 oranında azaltan üç farklı L-Askorbik asit konsantrasyonu seçildi ve her bir L-Askorbik asit konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ve 0.7 mM) CA enzim aktiviteleri ölçüldü. Aynı ölçümler inhibitörsüz ortamda da tekrarlandı ve Lineweaver-Burk eğrileri çizilerek K_i sabiti belirlendi (Lineweaver and Burk 1934, Alkaya *et al.* 2018).

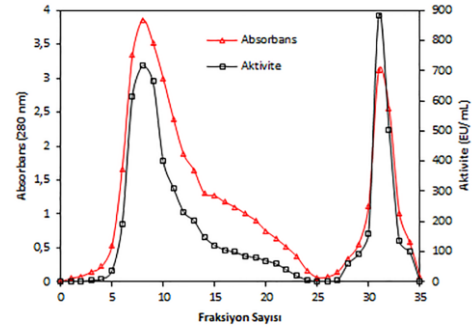
3. Bulgular

3.1 CA izoenzimlerinin saflaştırılması

hCA I ve hCA II, Sepharose®4B-L-tirozin-p-aminobenzensülfonamid kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Elüatlarda kalitatif-kantitatif protein analizi, ve hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı (Şekil 3, Şekil 4).

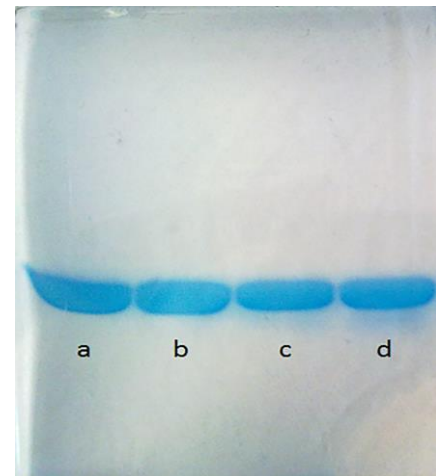


Şekil 3. Protein miktarı standart eğrisi.



Şekil 4. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin fraksiyonlara göre absorbanslarındaki ve aktivitelerindeki değişim (1.-25. fraksiyonlar hCA I, 26.-35. fraksiyonlar hCA II)

hCA I izoenzimi, 2076.47 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 1596.71 EU.mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır. hCA II izoenzimi ise 4422.88 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 3401.00 EU.mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 1). Ayrıca elüatlarda SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. SDS-PAGE analizi (a: Standart hCA I (30 kDa), b: Saflaştırılan hCA I, c: Standart hCA II (30 kDa)d: Saflaştırılan hCA II).

3.2 L-Askorbik asidin IC₅₀ değerinin ve K_i sabitinin belirlenmesi

L-Askorbik asidin hidrataz ve esteraz IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için, öncelikle %1.0'lik stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra CA izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri, farklı konsantrasyonlardaki L-Askorbik asit varlığında

“Bölüm 2.3” de tarif edildiği şekilde ölçüldü. Her ölçüm üç kez tekrarlandı ve %Aktivite-[L-Askorbik asit] eğrileri çizilerek L-Askorbik için IC₅₀ değeri hesaplandı (Çizelge 2, Şekil 6 ve 7). L-Askorbik asidin esteraz K_i sabitinin belirlenmesi için gerekli ölçümler “Bölüm 2.4” de açıklandığı şekilde yapıldı (Çizelge 2, Şekil 8 ve 9).

Çizelge 1. CA izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin veriler.

Saflaştırma Basamağı	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	118.25	50.00	153.78	7689.00	5912.50	0.77	100.00	1.00
Afinite (hCAI)	718.52	5.00	0.45	2.25	3592.60	1596.71	60.76	2076.47
Afinite (hCAII)	884.26	5.00	0.26	1.30	4421.30	3401.00	74.78	4422.88

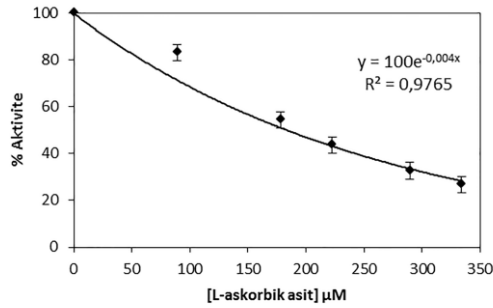
Çizelge 2. L-Askorbik asidin IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri.

Bileşik	Hidrataz IC ₅₀ (μM) ±SD ^{a,b}		Esteraz IC ₅₀ (μM) ±SD ^{a,b}		K _i (μM) ±SD ^{a,b}			
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	hCA I	İnhibisyon Türü	hCA II	İnhibisyon Türü
AAZ ^c	0.39±0.008	0.20±0.005	0.42±0.004	0.31±0.008	0.26±0.003	Yarışmasız	0.14±0.005	Yarışmasız
L-Askorbik asit	-	-	192.50±33.34	211.75±33.34	96.80 ±11.19		120.46±22.11	

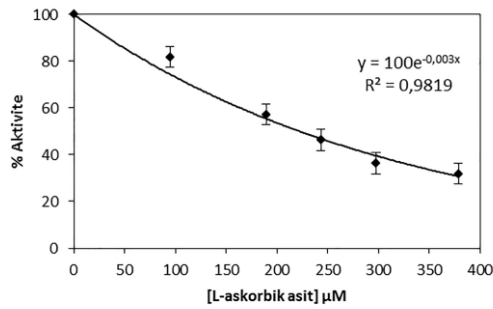
^aOrtalama±standart sapma değeri (n=3).

^bp<0.0001

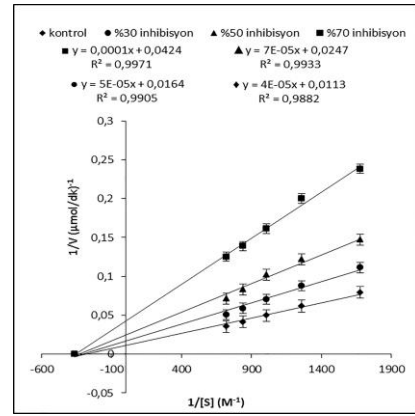
^cKontrol bileşiği olarak kullanılmıştır (Yenikaya et al. 2016)



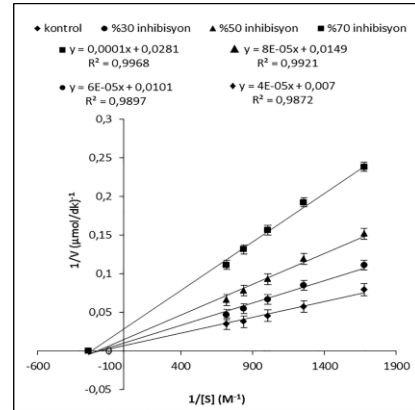
Şekil 6. L-Askorbik asidin hCA I esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 7. L-Askorbik asidin hCA II esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 8. hCA I K_i sabiti için Lineweaver-Burk grafiği.



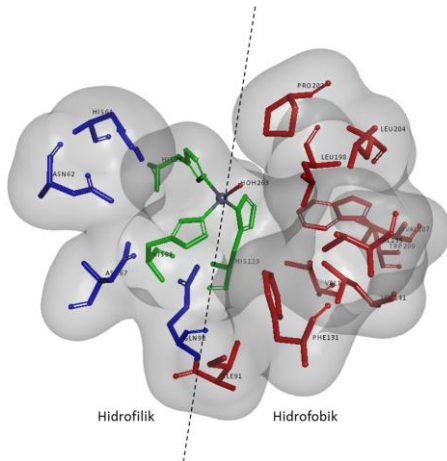
Şekil 9. hCA II K_i sabiti için Lineweaver-Burk grafiği.

4. Tartışma ve Sonuç

CA'lar karbon dioksitin bikarbonat ve protona tersinir hidrasyonunu katalize ederek hücre içi ve hücre dışı CO_2 , H^+ ve HCO_3^- konsantrasyonlarını düzenler. İnsan CA'ları hava-su arayüzünde gaz değişimi (Henry 2000), CO_2 ve HCO_3^- 'in membranlar arasında taşınması (Henry 1996), biyosentetik reaksiyonlar, asit-baz dengesi (Frasseto *et al.* 2012), kalsifikasyon (Supuran 2008), onkogenез ve metastatizasyon (Neri and Supuran 2011) gibi çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkilendirilmektedir.

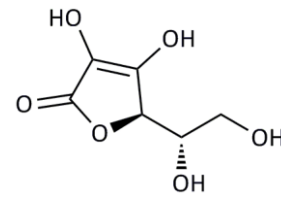
Bu araştırma kapsamında hCA I ve hCA II izoenzimleri, insan eritrosit hücrelerinden Sepharose®4B-L-tirozin-*p*-aminobenzen sülfonamid afinite jeli kullanılarak saflaştırılmıştır. hCA I %60,76 verim ile 2076.47 kat, hCA II ise %74,78 verim ile 4422.88 kat saflaştırılmıştır. Elüe edilen hCA I izoenziminin spesifik aktivitesi $1596.71 \text{ EU.mg protein}^{-1}$, hCA II izoenziminin spesifik aktivitesi ise $3401.00 \text{ EU.mg protein}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE analizleri standart, hCA I (30 kDa, Sigma-Aldrich) ve hCA II (30 kDa, Sigma-Aldrich) varlığında gerçekleştirildi. Şekil 5 de verilen analiz sonucu, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin insan eritrositlerinden yüksek saflıkta izole edildiğini göstermektedir.

Memeli CA'larının koni şeklindeki aktif bölge yapısının bir kısmının hidrofobik, bir kısmının ise hidrofilik amino asitlerden oluşmuş olması, bu enzimlerin geniş bir bileşik sınıfı (sentetik ve doğal) ile etkileşime girebilmesini sağlamaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. α -CA izoenzimlerinin aktif bölge yapısı (PDB: 1CA2).

Sentetik CA inhibitörleri arasında sülfonamidler, sülfamatlar, sülfamitler, ditiyokarbamatlar, karboksilik asitler, fenoller, poliaminler ve sülfokumarinler sayılabilir (Alterio *et al.* 2012). Literatürde örnekleri bulunan doğal CA inhibitörlerine ise polifenoller (kafeik asit, ferulik asit, kuersetin, kurkumin, silmarin vb.), bromofenoller, spirobisnaftalin türevleri, kapsaisin ve izoflavon türevi bileşikler örnek verilebilir. Çalışmamızda ise suda çözünen, esansiyel bir vitamin olan ve çok sayıda biyolojik etkinliği ispatlanmış olan C vitamininin (L-Askorbik asit) insan eritrosit CA izoenzimleri olan hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.



Şekil 11. L-Askorbik asidin kimyasal formülü.

Şekil 11 de görüldüğü üzere, L-Askorbik asit bileşiminde, halka üzerinde bulunan $-\text{OH}$ grupları asidik karakterde olup iyonlaşabilmektedirler. Bu durum çözelti pH'nı değiştirdiğinden, ölçüm prensibi pH değişimi olan hidrataz aktivitesi inhibisyon ölçümü sağlıklı bir şekilde yapılamamış olup hidrataz IC_{50} değerleri elde edilememiştir.

Esteraz IC_{50} değerleri incelendiğinde hCA I için $192.50 \pm 33.34 \mu\text{M}$, hCA II için $211.75 \pm 33.34 \mu\text{M}$ olduğu görülmektedir. L-Askorbik asidin hCA I için K_i değeri $96.80 \pm 11.19 \mu\text{M}$, hCA II için K_i değeri $120.46 \pm 22.11 \mu\text{M}$ dır. Bu değerler kontrol amacıyla kullanılan sentetik AAZ'nin yanında zayıf kalmakla birlikte daha önce çalışmaları yapılan doğal kaynaklı bileşiklerle kıyaslanabilir büyüklüktedir.

Diğer araştırma grupları tarafından çalışmaları yapılan doğal kaynaklı CA inhibitörlerinin hCA I ve hCA II için K_i değerlerini inceleyelim. Balaydın vd. (2012), bromofenol türevlerinin CA izoenzimleri üzerine etkilerini incelemişler ve hCA I için K_i değerlerini $1.08 - 4003 \mu\text{M}$ arasında, hCA II için K_i değerlerini $0.37 - 78.49 \mu\text{M}$ arasında bulmuşlardır. Göçer vd. (2016), spirobisnaftalin türevlerinin CA izoenzimleri üzerine etkilerini incelemişler ve hCA I için K_i değerlerini $1.60 - 460.42 \mu\text{M}$ arasında, hCA II

için K_i değerlerini 0.39 – 419.42 arasında bulmuşlardır. Arabacı vd. (2014), kapsaisin bileşiğinin hCA I ve hCA II üzerine etkisini incelemişler ve hCA I için K_i değerini 696.15 μM , hCA II için K_i değerini 208.37 μM olarak belirlemişlerdir.

L-Askorbik asit bileşiğinin CA izoenzimi ile etkileşim şeklinin ise yapısındaki –OH gruplarından dolayı, fenolik bileşiklerin etkileşim şekli olan, çinko(II) iyonuna bağlı su molekülüne bağlanma (Innocenti *et al.* 2008) veya yakın zamanda keşfedilen, çinko(II) iyonuna bağlı su molekülüne komşu olan ve “derin su” olarak adlandırılan su molekülüne bağlanma (D’Ambrosio *et al.* 2020) şeklinde olduğu düşünülmektedir. Ancak kesin bir ifade için X-ışınları analizi gereklidir.

Sonuç olarak, günlük almamız gereken bir vitamin olan C vitamininin, insan CA izoenzimlerinin aktivitesini inhibe edici bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Düzenli olarak taze meyve ve sebze tüketimi ile kolaylıkla temin edebileceğimiz C vitamini, giriş kısmında bahsedilen diğer faydalarının yanı sıra CA aktivitesini de düzenleyerek ileride bu izoenzimler ile ilişkili olarak ortaya çıkabilecek glokom gibi hastalıkların önlenmesine yardımcı olabilir.

Teşekkür

Çalışmalarımıza olan katkılarından dolayı Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

Bu çalışma Yağmur HOŞGÖR’ ün 2020 yılı öncesi tamamlanan yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

5. Kaynaklar

Aggarwal, M., Kondeti, B. and McKenna, R., 2013. Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**, 717–724.

Alım, Z., Kılınç, N., İşgör, M.M., Şengül, B. and Beydemir, Ş., 2015. Some anti-inflammatory agents inhibit esterase activities of human carbonic anhydrase isoforms I and II: an *in vitro* study. *Chemical Biology and Drug Design*, **86**, 857–863.

Alkan Alkaya, Z., İlkimen, H., Yenikaya, C., Tunca, E., Bülbül, M., Tunç, T. and Sarı, M., 2018. Synthesis and characterization of Cu(II) complexes of 2-amino-6-sulfamoylbenzothiazole and their inhibition studies

on carbonic anhydrase isoenzymes. *Polyhedron*, **151**, 199–205.

Alterio V., Di Fiore, A., D’Ambrosio, K., Supuran, C.T. and De Simone, G., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms. *Chemical Reviews*, **112**, 4421–4468.

Arabacı B., Gülçin, İ. and Alwaseel, S., 2014. Capsaicin: A potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Molecules*, **19**, 10103–10114.

Balaydın, H.T., Şentürk, M., Göksu, S. and Menzek, A., Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols and their derivatives including natural products: Vidalol B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **54**, 423–428.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.

Carradori, S., Mollica, A., De Monte, C., Granese, A. and Supuran, C.T., 2015. Nitric oxide donors and selective carbonic anhydrase inhibitors: A dual pharmacological approach for the treatment of glaucoma, cancer and osteoporosis. *Molecules*, **20**, 5667–5679.

Carta, F. and Supuran, C.T., 2013. Diuretic with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005–2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**, 681–691.

D’Ambrosio, K., Carradori, S., Cesa, S., Angeli, A., Monti, S.M., Supuran, C.T., De Simone, G., 2020. Catechols: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications*, **56**, 13033–13036.

Frassetto, P., Parisotto, T.M., Peres, R.C.R., Marques, M.R., Line, S.R.P., Nobre dos Santos, M., 2012. Relationship among salivary carbonic anhydrase VI activity and flow rate, biofilm pH and caries in primary dentition. *Caries Research*, **46**, 194–200.

Göçer, H., Aslan, A., Gülçin, İ. and Supuran, C.T., 2016. Spirobisnaphthalenes effectively inhibit carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **31**, 503–507.

- Henry, R.P. and Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration Physiology*, **121**, 1–12.
- Henry, R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annual Review of Physiology*, **58**, 523–538.
- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **18**, 1583–1587.
- İlkimen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H. and Baş, M., 2015. Synthesis and characterization of complexes of a novel proton transfer salt and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **30**, 195–203.
- Kasımoğulları, R., Bülbül, M., Arslan, B.S. and Gökçe, B., 2010. Synthesis, characterization and antiglaucoma activity of some novel pyrazole derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 4769–4773.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, **56**, 658–666.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **130**, 26–29.
- Marik, P.E., 2018. Hydrocortisone, Ascorbic Acid and Thiamine (HAT therapy) for the treatment of sepsis. Focus on ascorbic acid. *Nutrients*, **10**, 1762.
- Marik, P.E., 2020. Vitamin C: an essential “stress hormone” during sepsis. *Journal of Thoracic Disease*, **12**, S84–S88.
- Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2013. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**, 705–716.
- Mert, S., Alım, Z., İşgör, M.M., Anıl B., Kasımoğulları, R. and Beydemir, Ş., 2019. Novel pyrazole-3,4-dicarboxamides bearing biologically active sulfonamide moiety as potential carbonic anhydrase inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry*, **12**, 2740–2748.
- Moskowitz, A., Andersen, L.W., Huang, D.T., Berg, K.M., Grossestreuer, A.V., Marik, P.E., Sherwin, R.L., Hou, P.C., Becker, L.B., Cocchi, M.N., Doshi, P., Gong, J., Sen, A. and Donnino, M.W., 2018. Ascorbic acid, corticosteroids, and thiamine in sepsis: a review of the biologic rationale and the present state of clinical evaluation. *Critical Care*, **22**, 283.
- Neri, D. and Supuran, C.T., 2011. Interfering with pH regulation in tumors as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**, 767–777.
- Ngo, B., Van Riper, J.M., Cantley, L.C. and Yun J., 2019. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nature Reviews Cancer*, **19**, 271–282.
- Nocentini, A. and Supuran, C.T., 2018. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008–2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **28**, 729–740.
- Padayatty, S.J. and Levine, M., 2016. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, **22**, 463–493.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H. and Edsall, J.T., 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **239**, 1065–1078.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T. and Carta, F., 2013. Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **23**, 725–735.
- Sluch, I.M., Elliott, M.S., Dvorak, J., Ding, K. and Farris, B.K., 2017. Acetazolamide: A new treatment for visual vertigo. *Neuro-Ophthalmology*, **41**, 315–320.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 168–181.

Supuran, C.T., 2016. Structure and function of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, **473**, 2023–2032.

Tunca, E., Bülbül, M., İlkimen, H., Saygılı Canlıdınç, R. and Yenikaya, C., 2020. Investigation of the effects of the proton transfer salts of 2-aminopyridine derivatives with 5-sulfosalicylic and their Cu(II) complexes on cancer-related carbonic anhydrases: CA IX and CA XII. *Chemical Papers*, **74**, 2365–2374.

Verpoorte, J.A., Mehta, S. and Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 4221–4229.

Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, **176**, 147–154.

Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M.M., Ceyhan, B., Bülbül, M. and Tunca, E., 2016. Preparation of two maleic acid sulfonamide salts and their copper(II) complexes and antiglaucoma activity studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **27**, 1706–1714.