

Doğal Antidiyabetiklerin İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Rahmah Duraid Fakhrudeen Al-Nuaimi¹ , Ekrem Tunca^{1*} 

¹Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya Bölümü, KÜTAHYA

(Alınış / Received: 05.07.2024, Kabul / Accepted: 09.10.2025, Online Yayınlanma / Published Online: 25.12.2025)

Anahtar Kelimeler

Andrografolid,
Vildagliptin,
Buformin,
Karbonik Anhidraz

Öz: Solunum, pH homeostazisi, elektrolit salınımı, kemik resorpsiyonu ve bazı biyosentez reaksiyonlarında önemli roller üstlenen karbonik anhidrazlar (CA'lar), uzun yıllardır farmakolojik açıdan önemli hedefler arasında yer almaktadırlar. Günümüze kadar başta sülfonamidler olmak üzere pek çok CA inhibitörü rapor edilmiştir. Ancak bu alandaki temel sorun, CA izoenzimleri arasında yüksek seçiciliğe sahip olan inhibitörlerin rapor edildiği çalışmaların nispeten az sayıda olmasıdır. Özellikle, retina ve beyin ödemi başta olmak üzere birtakım hastalıklarla ilişkisi ortaya konulmuş olan hCA I izoenzimine karşı seçici olan inhibitörlerin rapor edildiği çalışma sayısı yok denilecek kadar azdır. Çalışmamızda, doğal kaynaklı antidiyabetik ajanlar olan andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esterase aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Bileşiklerin tamamı sadece hCA I izoenzimini inhibe etmiş, hCA II üzerinde hiçbir etki göstermemiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, doğal kaynaklı ve izoenzim seçici CA inhibitörlerinin keşfi açısından kayda değerdir.

Investigation of the Effects of Natural Antidiabetics on Human Carbonic Anhydrase Isoenzymes

Keywords

Andrographolide,
Vildagliptin,
Buformin,
Carbonic Anhydrase

Abstract: Carbonic anhydrases (CAs), which play important roles in respiration, pH homeostasis, electrolyte secretion, bone resorption and some biosynthesis reactions, have been among the pharmacologically important targets for many years. To date, many CA inhibitors, especially sulfonamides, have been reported. However, the main problem in this field is the relatively small number of studies reporting inhibitors with high selectivity between CA isoenzymes. In particular, the number of studies reporting inhibitors that are selective against the hCA I isoenzyme, which has been shown to be associated with some diseases, especially retinal and brain edema, is almost non-existent. In our study, the inhibition effects of andrographolide, vildagliptin and buformin compounds, which are natural antidiabetic agents, on the esterase activities of hCA I and hCA II isoenzymes were examined *in vitro*. All of the compounds inhibited only the hCA I isoenzyme and had no effect on hCA II. Our results are noteworthy for the discovery of natural origin and isoenzyme selective CA inhibitors.

1. Giriş

Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygın olarak bulunan bir metaloprotein olan karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) enzimleri, bikarbonat anyonu ve proton üretimi ile sonuçlanan temel bir biyokimyasal reaksiyon olan karbon dioksitin dönüşümlü hidrasyon

reaksiyonunu katalize ederler. Dolayısıyla, hücresel pH homeostazisinin temel düzenleyicileri arasında yer alırlar [1]. Bu enzimler ayrıca, solunum, bikarbonat iyonlarının ve karbon dioksitin taşınması, elektrolit salınımı, üre oluşumu, kemik rezorpsiyonun, lipogenez, glukoneogenez ve daha pek çok önemli biyolojik süreçte rol alırlar [2–5]. Şimdiye kadar memelilerde

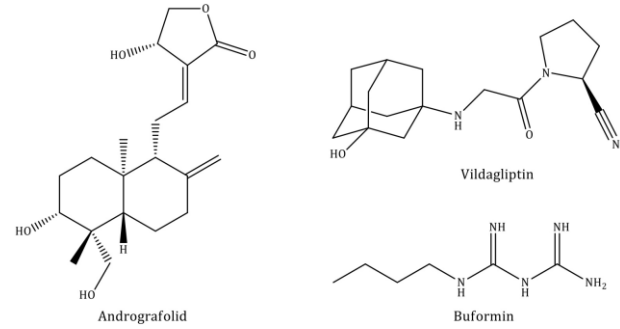
*Sorumlu yazar ("Corresponding author"): ekrem.tunca@dpu.edu.tr

her biri farklı doku dağılımına, hücre içi lokalizasyona ve katalitik aktiviteye sahip 16 CA izoenzimi keşfedilmiştir. Katalitik aktiviteye sahip olan memeli CA'ları aktif bölgesinde Zn(II) iyonu bulundurulur [6, 7]. CA'lar glokom (hCA I, II, IV ve XII), kanser (hCA IX ve XII), epilepsi, nöropatik ağrı, idiyopatik intrakraniyal hipertansiyon (hCA I, II, ve VII), ödem (hCA II, IV, XII ve XIV), obezite (hCA VA ve VB) ve osteoporoz (hCA IV ve XIV), gibi hastalıklarda anormal veya düzensiz bir ekspresyon seviyesi ile ilişkilendirilmiştir [8–10]. Son zamanlarda hCA I izoenzimi ile ilişkisi keşfedilen bazı hastalıklar mevcuttur. Bir klinik çalışmada, ankilozan spondilit hastalarının sinovyumunda hCA I'in aşırı ifadelendiği bulunmuştur. Bu bulgu, hCA I'in kemik oluşumunda iki önemli süreç olan kalsiyum üretimini ve kemik emilimini hızlandırabileceğini düşündürmektedir [11, 12]. Öte yandan, meme kanseri hastalarından alınan dokularda ve kan örneklerinde hCA I protein seviyelerinin arttığı bulunmuştur [13]. hCA I protein seviyelerinin ve hCA I aracılı kalsifikasyonun, aterosklerozlu bir fare modelinde ateroskleroz gelişimi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir [14]. Ayrıca hCA I izoenziminin diyabetik retinopatili hastalarda retinal damar sızıntısını artırarak intraretinal ödeme neden olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir mekanizma ile hCA I'in serebral vasküler geçirgenliği indükleyerek nörovasküler ödem ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir [15].

Uzun yıllardır birçok CA inhibitörü, CA ilişkili hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Sülfonamidler, fenoller, sülfamatlar, sülfamidler, kumarinler, poliaminler, ditiyokarbamatlar, ksantatlar, benzoksaboroller, fosfonamidatlar ve ninhidrinler günümüze kadar CA inhibitörü olarak rapor edilen bileşik sınıflarıdır [16]. Ancak klinik kullanımdaki inhibitörlerin çoğunun izoform seçicilikleri zayıf olduklarından yan etkileri azımsanmayacak derecede fazladır. Bu nedenle yeni ve izoform seçici CA inhibitörlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. *In vitro* olarak bazı izoform seçici inhibitörler geliştirilmiş olsa da henüz klinik kullanım başarısının elde edilememiş olması yeni inhibitörlere olan ihtiyacı artırmaktadır.

Andrografolid, antik Çin'de ve doğu Asya'nın diğer bölgelerinde kanser, romatoid artrit, ishal, üst solunum yolu enfeksiyonu ve larenjit gibi bir dizi rahatsızlığı tedavi etmek için kullanılan, geleneksel bir bitki olan *Andrographis paniculata*'dan ekstrakte edilen bir bileşiktir ve çok uzun bir geçmişe sahiptir [17–20]. Vildagliptin, tip 4 dipeptidilpeptidaz (DPP-4) enzimini seçici olarak inhibe eden ve pankreatik α ve β hücrelerinin glukoz duyarlılığını artıran, pankreas adacık uyarıcıları sınıfının bir üyesidir. Vildagliptin, insülin:glukagon oranını arttırarak hepatik glukoz üretimini azaltır ve bu da plazma glukoz seviyesinde bir azalmaya yol açar [21]. Tip 2 diyabetli hastalarda vildagliptin, glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) seviyesini de azaltmaktadır [22]. Diyabetik sıçanlarda, iki haftalık vildagliptin tedavisinin oksidatif stres oluşumunu azalttığı ve torasik aortta inflamatuvar, fibrotik ve trombojenik gen

ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir [23]. Buformin (bütilbiguanid), bileşiği de insüline bağımlı olmayan (tip 2) diyabet tedavisinde kullanılan bir antidiyabetik ajandır. Biguanidler sınıfına dahil olan buformin, oral anti-hiperglisemik bir ajandır [24]. 2015 yılında tip 2 diyabetli hastalarda kanser insidansını azaltmak için biguanidlerin kullanılabileceği önerilmiştir. Biguanidler, AMPK'yi aktive ederek, mTOR yolunu inhibe ederek ve endometrial kanser, yumurtalık kanseri ve meme kanseri gibi tümörlerde hücre döngüsü durmasını indükleyerek tümörjenik aktiviteyi inhibe edebilir [25]. Şekil 1 de andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin molekül yapıları verilmiştir.



Şekil 1. Andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin molekül yapıları.

Bu çalışma kapsamında, hCA I izoenziminin seçimli olarak inhibe edilmesinin, retina ve beyin ödemi başta olmak üzere birçok fizyolojik bozukluğun tedavisinde önemli olabileceğinden hareketle, andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak incelendi ve izoenzim seçicilikleri kıyaslandı.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan inhibitörler olan andrografolid ve buformin Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) firmasından, vildagliptin ise abcr GmbH (Karlsruhe, Germany) firmasından temin edildi. Enzim aktivite ölçümlerinde kullanılan 4-nitrofenil asetat substratı Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA) firmasından temin edildi. Aktivite tamponu hazırlamak için kullanılan TRIS ve H₂SO₄ sırasıyla Merck KGaA (Darmstadt, Germany) ve Fluka (Seelze, Germany) firmalarından, inhibitör çözeltilerini hazırlamak için kullanılan DMSO ise Carlo Erba Reagents GmbH (Emmendingen, Germany) firmasından temin edildi. Esteraz aktivitesi ölçümleri SHIMADZU UV-1700 PharmaSpec (SHIMADZU Corp. Kyoto, Japan) spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. pH ölçümleri ise Mettler Toledo SevenDirect SD-20 Kit (Mettler-Toledo GmbH Greifensee, Switzerland) pH metre ile yapıldı.

2.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin esteraz aktivitelerinin ölçülmesi

Çalışmada kullanılan hCA I ve hCA II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinden Sepharose®4B-L-tirozin-p-aminobenzen sülfonamit afinite kromatografisi kullanılarak, tek basamakta yüksek saflıkta elde edildi. hCA I ve hCA II nin saflıkları SDS-PAGE ile kontrol edildi. Saflaştırma basamaklarının detayları önceki çalışmalarımızda açıklandığı şekildedir [26–30].

Esteraz aktivitesi, 4-nitrofenil asetat bileşiğinin hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenol miktarının 348 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlendi. Reaksiyon ortamı, toplam hacim 3 mL olacak şekilde pH 7,4 TRIS-SO₄ tamponu, 4-nitrofenil asetat substratı, saf su ve hCA I / hCA II izoenziminin karıştırılması ile hazırlandı ve 3 dk. süre ile absorbans-taki değişim incelendi. Aynı ölçüm enzimsiz ortamda da tekrarlanıp substratın otohrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenol miktarı belirlenerek CA aktivitesi için düzeltme yapıldı [26–28, 31].

2.2. Doğal antidiyabetiklerin karbonik anhidraz inhibitör özelliklerinin incelenmesi

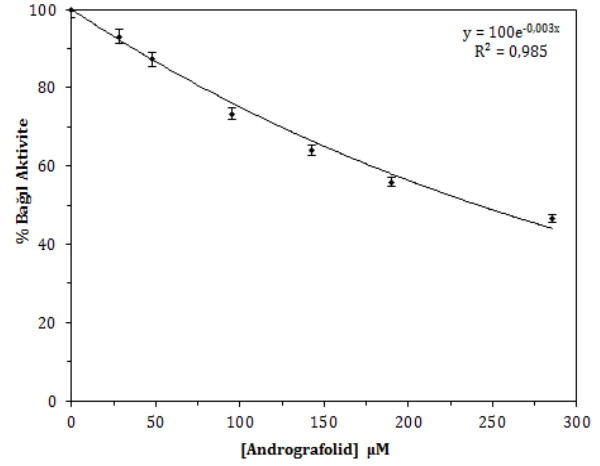
Andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin inhibitör özelliklerinin incelenmesi için ilk olarak DMSO içerisinde %0,1 lik stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki inhibitör varlığında, hCA I ve hCA II nin esteraz aktiviteleri yukarıda açıklandığı şekilde ölçüldü. İnhibitörsüz ortamdaki enzim aktivitesi %100 kabul edilerek inhibitörlü ortamdaki bağıl enzim aktiviteleri hesaplandı. Microsoft Excel 2016 paket programı yardımıyla %Bağıl aktivite - [İnhibitör] eğrileri çizilerek, yeterli oranda inhibisyon etkisi gösteren bileşikler için IC₅₀ değerleri hesaplandı [26–28].

2.3. İstatistik analiz

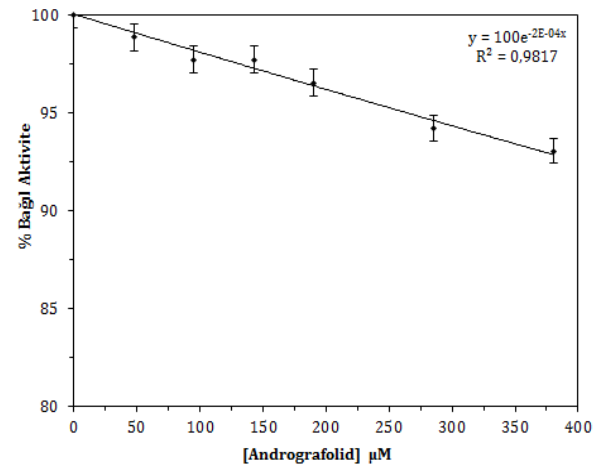
Sunulan tüm veriler üç bağımsız deney ile doğrulandı ve ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Veriler, SPSS paket programı yardımıyla (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL) çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edildi. $p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

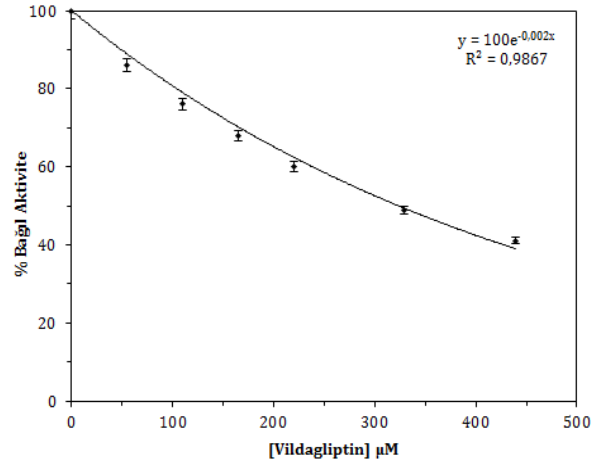
Çalışmamızda ticari olarak temin edilen andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin majör CA enzimleri olan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak incelendi (Şekil 2 – 7).



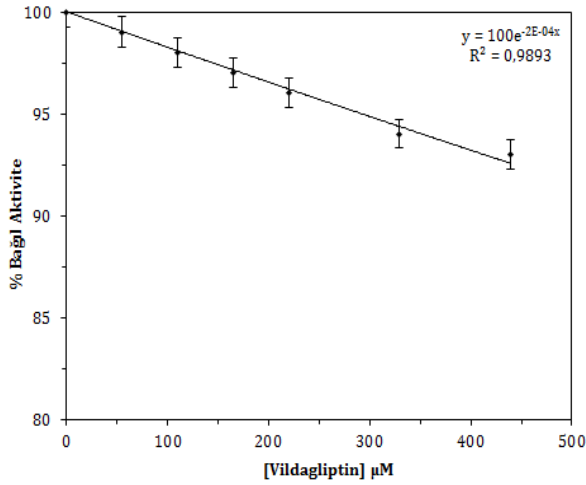
Şekil 2. Andrografolid bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi.



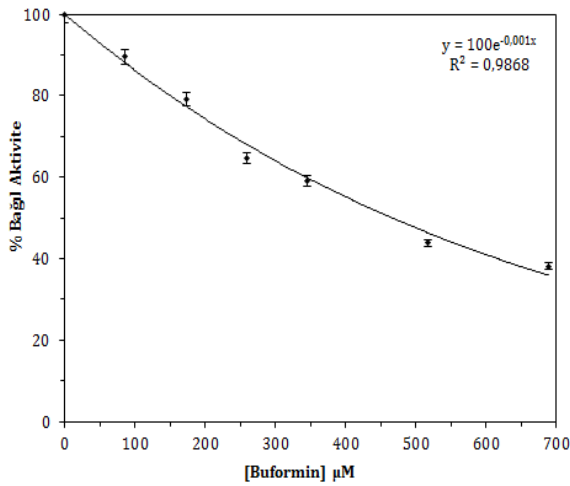
Şekil 3. Andrografolid bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi.



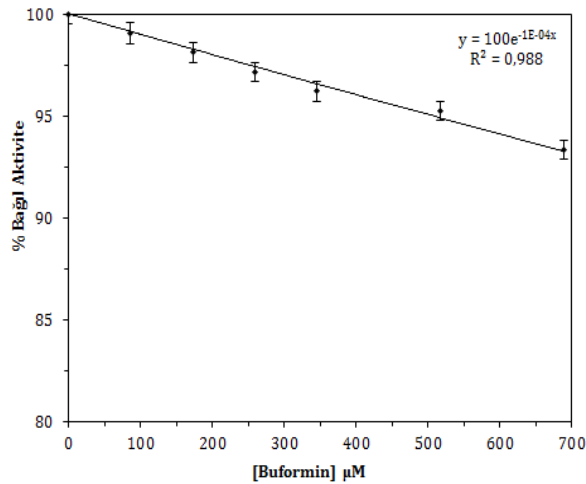
Şekil 4. Vildagliptin bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 5. Vildagliptin bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 6. Buformin bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi.



Şekil 7. Buformin bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi.

Çizilen eğrilerin denklemleri yardımıyla hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin IC₅₀ değerleri.

Bileşik	Esteraz IC ₅₀ (µM) ^{a,b}	
	hCA I	hCA II
AAZ ^c	0.42±0.004	0.31±0.008
<i>Andrografolid</i>	231.0±7.0	–
<i>Vildagliptin</i>	346.5±10.4	–
<i>Buformin</i>	693.0±12.6	–

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

^bp<0,0001

^cAAZ (Asetazolamid) kontrol bileşiği olup, IC₅₀ değerleri referans 27 den alınmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Elde edilen sonuçlar bizlere iki CA izoformundan sadece hCA I'in inhibe edildiğini, hCA II'nin ise andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşikleri tarafından inhibe veya aktive edilmediğini göstermektedir. Bu iki izoformun amino asit sekansları birbirine çok yakın olmakla birlikte, aktif bölgelerindeki bazı amino asit kalıntıları arasında farklılıklar vardır (Tablo 2).

Tablo 2. hCA I ve hCA II izoformlarının aktif bölge amino asit kalıntıları [32].

Kalıntı Numarası	hCA I	hCA II
62	Val	Asn
65	Ser	Ala
67	His	Asn
69	Asn	Glu
91	Phe	Ile
121	Ala	Val
131	Leu	Phe
135	Ala	Val
200	His	Thr
204	Tyr	Leu

hCA I ve hCA II nin amino asit kalıntıları arasındaki farklılıklar (Tablo 2), bu iki izoformun yapı olarak birbirine çok benzer olmalarına rağmen, farmakolojik ajanlardan farklı şekilde etkilenmesinin potansiyel olduğunu göstermektedir [32].

Çalışmamızda kullanılan antidiyabetiklerden andrografolid bileşiği, yapısında hem polar hidroksil grupları hem de kondanse halkalı bir karbon iskeleti bulundurulur. Suda çözünürlüğü zayıf olan bu bileşiğin aktif bölgenin hidrofobik kalıntıları ile etkileşmesi potansiyeldir. Özellikle hCA I de apolar olan 62 nolu kalıntı ve yine hCA I de daha hacimli olan 91 nolu kalıntı bu hidrofobik etkileşimde rol oynamış olabilir. Ayrıca aktif bölgede birbirine komşu diğer hidrofobik kalıntılar olan Ala121, Leu131 ve Ala135 de mevcut hidrofobik etkileşimlerin daha güçlü olmasına katkı sağlamış olabilir. Bu kalıntıların hCA II deki karşılıklarına göre daha küçük hacimli olması, sterik engeli azaltmada fayda sağlayabilir. IC₅₀ değerlerinden de anlaşılacağı üzere, en güçlü inhibitör etkinin andrografolid bileşiğinin gözlemlenmiş olması önermiş olduğumuz çoklu hidrofobik etkileşimi destekler niteliktedir. Vildagliptin bileşiği ise andrografolid bileşiğine göre daha az

hacimli ve nispeten daha polar bir bileşiktir [33,34]. Bu bileşikteki apolar karbon halkası daha küçüktür. Dolayısıyla vildagliptin bileşiğinin aktif bölge girişinde birbirine komşu konumunda olan Ser65, His67, Asn69 ve Phe91 kalıntıları ile etkileşmiş olması muhtemeldir. İnhibitör etki bakımından andrografolid bileşiğinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Bu durum daha az sayıda amino asit kalıntısı ile etkileşimden ya da daha zayıf bağlanmadan kaynaklı olabilir. Biguanid sınıfına dahil olan buformin bileşiği ise çalışmamız kapsamında CA inhibisyon potansiyelini değerlendirdiğimiz en polar ve en az hacimli bileşiktir [35]. Hidrofobik karbon zinciri çok kısa olduğundan aktif bölge girişindeki hidrofobik amino asit kalıntıları ile etkileşme ihtimali çok zayıftır. CA izoformlarında proton transferinin sağlandığı hidrojen bağı ağının son basamağı aktif bölge girişindeki Tyr7, mekik görevi gören His64 ve 200 nolu amino asit kalıntısıdır. hCA II izoformunda 200 nolu kalıntı Thr iken, hCA I izoformunda bu kalıntı His'dir. Buformin bileşiğinin sadece hCA I izoformunu inhibe etmesi, Thr200 kalıntısına göre daha hacimli olan His200 kalıntısı ile etkileşime girmesinin sonucu olabilir. Ayrıca buformin, yapısındaki ardışık –NH grupları nedeniyle proton transfer ağına dahil olup dolaylı yoldan inhibitör etki göstermiş olabilir. Buformin bileşiğinin hCA I inhibitör etkisinin çok zayıf olması, hCA I – buformin etkileşiminin zayıf olabileceğini göstermektedir. Bu kısımda ifade edilen yapı – aktivite ilişkilerinin, bileşiklerin moleküler yapıları ve enzimlerin aktif bölge amino asit kalıntıları dikkate alınarak yorumlandığının, kesin ifadeler için moleküler kenetlenme çalışmalarının yapılması ve enzim – inhibitör kristal yapılarının sentezlenip, yapının aydınlatılması gerektiğinin belirtilmesinde fayda vardır.

Literatürde günümüze kadar sentetik, doğal ya da hibrit olmak üzere birçok CA inhibitörü rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları tümör ilişkili CA IX ve CA XII için seçici iken, bazıları da başta glokom, epilepsi ve yüksek irtifa hastalığı ile ilişkili CA II olmak üzere başka hastalıklarla ilişkili diğer CA izoformları için seçicidir. Günümüze kadar sadece hCA I için seçici olan inhibitörlerin rapor edildiği çok az sayıda çalışma mevcuttur. Tetraaminomono(4-florobenzil)spiro(N/N)siklotrifosfazen ve tetraaminobis(4-florobenzil) spiro(N/N)siklotrifosfazen türevlerinin sentezlendiği ve CA izoformlarına etkilerinin incelendiği bir çalışmada, bileşiklerin hCA I izoenzimini inhibe ettikleri, hCA II izoenzimi üzerinde herhangi bir etki göstermedikleri belirlenmiştir. Bileşiklerin hCA I için esteraz IC₅₀ değerleri 10,97 µM ve 14,62 µM olarak hesaplanmıştır [27]. N-aminosakarin türevlerinin sentezlenip hCA I, hCA II, hCA IV ve hCA VII üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelendiği bir çalışmada, bileşiklerin tamamının AAZ bileşiğinden zayıf inhibitör oldukları, ancak özellikle N-aminosakarin bileşiğinin hCA I için yüksek seçicilik gösterdiği ve CO₂ hidrataz aktivitesi için IC₅₀ değerinin 8,8 µM olduğu rapor edilmiştir [36]. Yeni sülfamid bileşiklerinin sentezlenip hCA I, hCA II, hCA IV ve hCA IX izoformları üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise bileşiklerin çoğunluğunun hCA I

için seçici olduğu, en güçlü hCA I inhibitörü olan *meta*-sülfamid flor süstitü türevinin ise CO₂ hidrataz aktivitesi için K_i değerinin 45.8 nM olduğu belirtilmiştir [37].

hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenen doğal kaynaklı antidiyabetikler olan andrografolid, vildagliptin ve buformin bileşiklerinin inhibisyon etkilerinin, kontrol bileşiği olan AAZ den çok daha zayıf olduğu görülmektedir. Ancak bileşiklerin doğal kaynaklı ve sadece hCA I için seçici inhibitör olmaları, antidiyabetik özelliklerinin dışında başka farmakolojik potansiyellerinin olabileceğini ortaya koymuştur. Bu bileşiklerin molekül yapılarında yapılabilecek küçük modifikasyonlarla hem izoform seçici hem de güçlü inhibitör özellik gösteren ajanların literatüre kazandırılması olasıdır.

Teşekkür

Çalışmamızı, 2022 yılı ikinci dönem 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız. (Proje No: 1919B012222800)

Etik Beyanı/Declaration of Ethical Code

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Supuran, C. T. 2016. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal*, 473(14), 2023-2032.
- [2] Khalifah, R. G. 1973. Carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: paradoxical consequences of the unusually rapid catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(7), 1986-1989.
- [3] Aggul, A. G., 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*, 355(6), e2100476.
- [4] Emameh, R. Z., Kuuslahti, M., Nosrati, H., Lohi, H., Parkkila, S. 2020. Assessment of databases to determine the validity of β- and γ-carbonic anhydrase sequences from vertebrates. *BMC Genomics*, 21, 352.
- [5] Hirkawa, Y., Senda, M., Fukuda, K., Yu, H. Y., Ishida, M., Taira, M., Kinbara, K., Senda T. 2021. Characterization of a novel type carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biology*, 19, 105.

- [6] Al-Matarneh, C. M., Pinteala, M. Nicolescu, A., Silion, M., Mocci, F., Puf, R., Angeli, A., Ferraroni, M., Supuran, C. T., Zara, S., Carradori, S., Paoletti, N., Bonardi, A., Gratter, P. 2024. Synthetic approaches to novel human carbonic anhydrase isoform inhibitors based on pyrrol-2-one moiety. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(4), 3018-3038.
- [7] Aggarwal, M., Kondeti, B., McKenna, R. 2013. Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1526-1533.
- [8] Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., De Simone, G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chemical Reviews*, 112(8), 4421-4468.
- [9] De Simone, G., Alterio, V., Supuran, C. T. 2013. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(7), 793-810.
- [10] García-Llorca, A., Carta, F., Supuran, C. T., Eysteinson, T. 2024. Carbonic anhydrase, its inhibitors and vascular function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11, 1338528.
- [11] Adeva-Andany, M. M., Fernández- Fernández, C., Sánchez-Bello, R., Donapetry-García, C., Martínez-Rodríguez, J. 2015. The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. *Atherosclerosis*, 241(1), 183-191.
- [12] Chang, X., Han, J., Zhao, Y., Yan, X., Sun, S., Cui, Y. 2010. Increased expression of carbonic anhydrase I in the synovium of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11(1), 279.
- [13] Zheng, Y., Xu, B., Zhao, Y., Gu, H., Li, C., Wang, Y., Chang, X. 2015. CA1 contributes to microcalcification and tumorigenesis in breast cancer. *BMC Cancer*, 15, 679.
- [14] Yuan, L., Wang, M., Liu, T., Lei, Y., Miao, Q., Li, Q., Wang, H., Zhang, G., Hou, Y., Chang, X. 2019. Carbonic anhydrase 1-mediated calcification is associated with atherosclerosis, and methazolamide alleviates its pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 766.
- [15] Gao, B. B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S. J., Srinivasan, V. J., Wojtkowski, M., Fujimoto, J. G., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Bursell, S. E., Aiello, L. P., Feener, E. P. 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Medicine*, 13(2), 181-188.
- [16] Supuran, C. T. 2023. A simple yet multifaceted 90 years old, evergreen enzyme: carbonic anhydrase, its inhibition and activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 93, 129411.
- [17] Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., Wang, Y. 2019. Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(S1), S17-S29.
- [18] Lu, J., Ma, Y., Wu, J., Huang, H., Wang, X., Chen, Z., Chen, J. He, H., Huang, C. 2019. A review for the neuroprotective effects of andrographolide in the central nervous system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109078.
- [19] Zhang, Z., Lai, D., Wang, L., Yu, P., Zhu, L., Guo, B., Xu, L., Zhou, L., Sun, Y., Lee, S. M. Y., Wang, Y. 2014. Neuroprotective effects of the andrographolide analogue AL-1 in the MPP⁺/MPTP-induced Parkinson's disease model *in vitro* and in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 122, 191-202.
- [20] Serrano, F. G., Tapia-Rojas, C., Carvajal, F. J., Hancke, J., Cerpa, W., Inestrosa, N. C. 2014. Andrographolide reduces cognitive impairment in young and mature A β PPswe/PS-1 mice. *Molecular Neurodegeneration*, 9, 61.
- [21] Polyakova, E. B., Sabirzyanov, D. R., Prozorova, N. A., Foteeva, A. V. 2022. Physicochemical properties and methods of analysis of vildagliptin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 56(1), 110-117.
- [22] Banerjee, M., Younis, N., Soran, H. 2009. Vildagliptin in clinical practice: a review of literature. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(16), 2745-2757.
- [23] Khan, S., Khan, S., Imran, M., Pillai, K. K., Akhtar, M., Najmi, A. K. 2013. Effects of pioglitazone and vildagliptin on coagulation cascade in diabetes mellitus – targeting thrombogenesis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(6), 627-639.
- [24] Chou, C. H., Cheng, C. L., Huang, C. C. 2004. A validated HPLC method with ultraviolet detection for the determination of buformin in plasma. *Bio-medical Chromatography*, 18(4), 254-258.
- [25] Chen, L., Zhang, T., Liu, Q., Tang, M., Yang, Y., Wang, Y., Qiu, H., Yu, J. 2018. Buformin increases radiosensitivity in cervical cancer cells via cell-cycle arrest and delayed DNA-damage repair. *Experimental Biology and Medicine*, 243(4), 1133-1140.
- [26] Alkan Alkaya, Z., İlkimen H., Yenikaya C., Tunca, E., Bülbül, M., Tunç, T., 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.

- [27] Okumuş, A., Elmas, G., Binici, A., Tunca, E., Hökelek, T., Kılıç, Z. 2023. Phosphorus–nitrogen compounds: part 70. Syntheses of tetraamino-mono/bis(4-fluorobenzyl)spiro(*N/N*)cyclotri-phosphazenes: structural characterization, Hirshfeld surface analysis and comparative evaluation of esterase activities of hCA I and hCA II isoenzymes. *New Journal of Chemistry*, 47(18), 8578-8588.
- [28] Tunca, E., Bülbül, M., İlkimen, H., Saygılı Canlıdınç, R., Yenikaya, C. 2020. Investigation of the effects of proton transfer salts of 2-aminopyridine derivatives with 5-sulfosalicylic acid and their Cu(II) complexes on cancer-related carbonic anhydrases: CA IX and CA XII. *Chemical Papers*, 74, 2365-2374.
- [29] Al-Dhrub, A. H. A., Sahin, S., Ozmen, I., Tunca, E., Bulbul, M. 2017. Immobilization and characterization of human carbonic anhydrase I on amine functionalized magnetic nanoparticles. *Process Biochemistry*, 57, 95-104.
- [30] İlkimen H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H. 2014. Synthesis and characterization of a proton transfer salt between 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-aminobenzothiazole, and its complexes and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(3), 353-361.
- [31] Verpoorte, J. A., Mehta, S., Edsall, J. T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229.
- [32] Bhatt, A., Mahon, B. P., Cruzeiro, V. W. D., Cornelio, B., Laronze-Cochard, M., Ceruso, M., Sapi, J., Rance, G. A., Khlobystov, A. N., Fontana, A., Roitberg, A., Supuran, C. T., McKenna, R. 2017. Structure-activity relationships of benzenesulfonamide-based inhibitors towards carbonic anhydrase isoform specificity. *ChemBioChem*, 18(2), 213-222.
- [33] National Center for Biotechnology Information, 2024. PubChem Compound Summary for CID 5318517, Andrographolide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Andrographolide> (Erişim Tarihi: 08.10.2024).
- [34] National Center for Biotechnology Information, 2024. PubChem Compound Summary for CID 6918537, Vildagliptin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vildagliptin> (Erişim Tarihi: 08.10.2024).
- [35] National Center for Biotechnology Information, 2024. PubChem Compound Summary for CID 2468, Buformin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Buformin> (Erişim Tarihi: 08.10.2024).
- [36] Kuznetsov, M. A., Shestakov, A. N., Zibinsky, M., Krasavin, M., Supuran, C. T., Kalinin, S., Tanç, M. 2017. Synthesis, structure and properties of *N*-aminosaccharin – A selective inhibitor of human carbonic anhydrase I. *Tetrahedron Letters*, 58(2), 172-174.
- [37] Berrino, E., Bua, S., Mori, M., Botta, M., Murthy, V. S., Vijayakumar, V., Tamboli, Y., Bartolucci, G., Mugelli, A., Cerbai, E., Supuran, C. T., Carta, F. 2017. Novel sulfamide-containing compounds as selective carbonic anhydrase I inhibitors. *Molecules*, 22(7), 1049.