

Sıvı kardiyak ilaçların karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri

Onur ARGAN^{1*}, Kübra ÇIKRIKÇI², Nahit GENCER²

¹Balikesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Çağış Kampüsü, Balikesir
²Balikesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çağış Kampüsü, Balikesir

Geliş Tarihi (Received Date): 15.11.2021
Kabul Tarihi (Accepted Date): 21.03.2022

Öz

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında ölümlerin önde gelen nedenidir. Son yıllarda karbonik anhidraz inhibitörleri ile ateroskleroz arasındaki ilişki dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, sık kullanılan sıvı kardiyak ilaçların insan karbonik anhidraz (hCA) I ve II üzerine *in vitro* etkilerini belirlemeyi amaçladık. İlaçların hCA I ve hCA II üzerindeki inhibitör etkileri hidrataz aktivitesi ile belirlendi. Test edilen kardiyak ilaçlarının tamamı hCA I ve II izozimlerini inhibine etmiştir. En güçlü inhibitörün Atropin Sülfat (hCA I: 5,86 mM ve hCA II: 6,59 mM) olduğunu saptadık. Heparin Sodyum ve Dopamin HCl de güçlü inhibitörlerdir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak ilaçlar, karbonik anhidraz, enzim inhibisyonu

Effects of liquid cardiac drugs on carbonic anhydrase I and II isozymes

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. In recent years, the relationship between atherosclerosis and carbonic anhydrase inhibitors has attracted attention. In this study, we aimed to determine the *in vitro* effects of commonly used liquid cardiac drugs on human carbonic anhydrase (hCA) I and II. The inhibitory effects of drugs on hCA I and hCA II were determined by hydratase activity. All tested cardiac drugs inhibited hCA I and II isozymes. We found that the strongest inhibitor

*Onur ARGAN, onur_argan@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0001-7745-7736>
Kübra ÇIKRIKÇI, kubracikrikci91@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2276-1516>
Nahit GENCER, ngencer@balikesir.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0001-7092-8857>

was Atropine sulfate (hCA I: 5.86 mM and hCA II: 6.59 mM). Heparin Sodium and Dopamine HCl are also potent inhibitors.

Keywords: Cardiac drugs, carbonic anhydrase, enzyme inhibition

1. Giriş

Karbonik anhidrazlar (CA), karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü katalize eden bir grup enzimdir. CA enzimi liyazlar sınıfına girmektedir (EC 4.2.1.1, CA). 15 adet insan karbonik anhidraz (hCA) izoformu vardır ve bunlar hücresel/doku lokalizasyonu ve kinetik özellikleri bakımından farklılık gösterir [1]. Farklı ilaçların CA ailesindeki enzimler üzerine inhibitör etkilerinin analizleri insan sağlığı için önem arz etmektedir. Bu enzimlerin sitozolik formları CA-I, CA-II ve CA-III'tür. hCA I ve hCA II izozimleri solunum ve asit-baz homeostazında rol oynar [2]. pH ve bikarbonat homeostazi, solunum, kemik metabolizmasını ve tümör oluşumunu içeren birçok fizyolojik süreç CA'ların karbondioksit hidrasyon katalizi ile ilgilidir.

Son yıllarda, CA ve ateroskleroz arasındaki ilişki dikkati çekmektedir. Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir [3]. Aterosklerotik lezyonlar koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter hastalığına neden olur. Koroner aterosklerotik plakla ilişkili trombotik tıkanma akut miyokard enfarktüsü ile sonuçlanmaktadır. Kalsiyum birikimi, aterosklerozda çok önemli bir basamaktır ve koroner arter hastalığına bağlı yüksek ölüm riski ile ilişkilidir [4-7]. Ancak, kalp hastalığı ile ilişkili CA inhibisyonunun potansiyel rolü kardiyak ilaçlarda yeterince araştırılmamıştır. Ayrıca, ilaç-enzim etkileşim çalışmaları son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. İlaç yan etkileri, CA izoenzimlerinin inhibisyonundan kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle CA dünya çapında bilim insanları tarafından giderek daha fazla çalışılmaktadır [8-11]. Çalışmamızda sıvı kardiyak ilaçlarının neden olduğu hCA I ve II aktivitesindeki olası değişiklikleri belirlemeyi ve karşılaştırmayı amaçladık.

2. Deneysel bölüm

2.1 Materyaller

Sepharose 4B, L-tirozin, protein analiz reaktifleri, fenol kırmızısı ve elektroforez için kimyasallar Sigma-Aldrich Şti'den temin edildi. Analitik sınıfta olan diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich ya da Merck'den elde edildi. Çalışma yerel etik kurul tarafından (Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Etik Kurulu, Balıkesir, Türkiye, Karar No. 2021 /190 ve Tarih: 08.09.2021) onaylandı.

2.2 Hemolizatin hazırlanması ve izoenzimlerin saflaştırılması

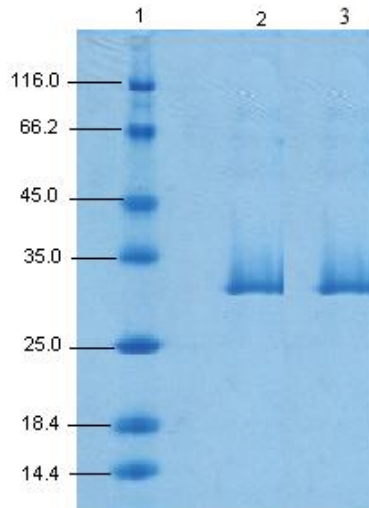
Kan örnekleri, 4°C' de 15000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ayrıldı. Paketlenmiş eritrositler, üç kez % 0,9 NaCl ile yıkandı ve ardından soğuk suda hemoliz edildi. Hemolizatin pH'ı katı Tris bazı ile 8,5'e ayarlandı. 25 ml hemolizati Sefaroz 4B-etilen diamin-4-izotiyosiyanat benzensülfonamid içeren bir afinite kolonuna tatbik edildi [12]. CA izoenzimleri daha sonra 0,1 M NaCl /25 mM Na₂HP0₄ (pH 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) ile sırasıyla hCA I ve II elue edildi.

2.3 Hidrataz Aktivite Analizi

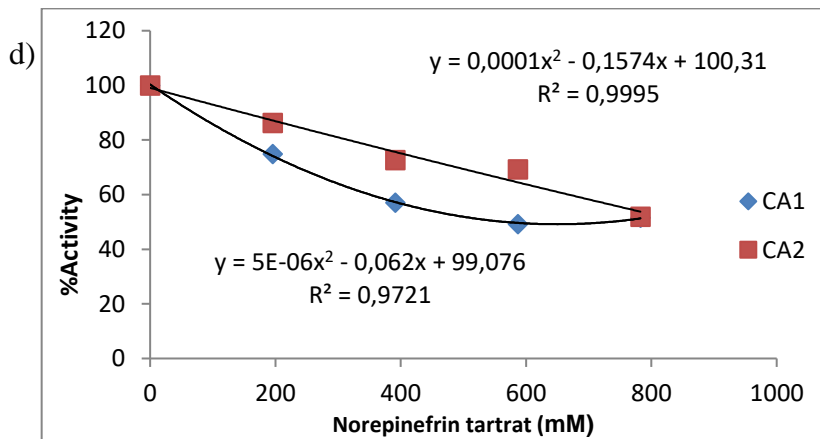
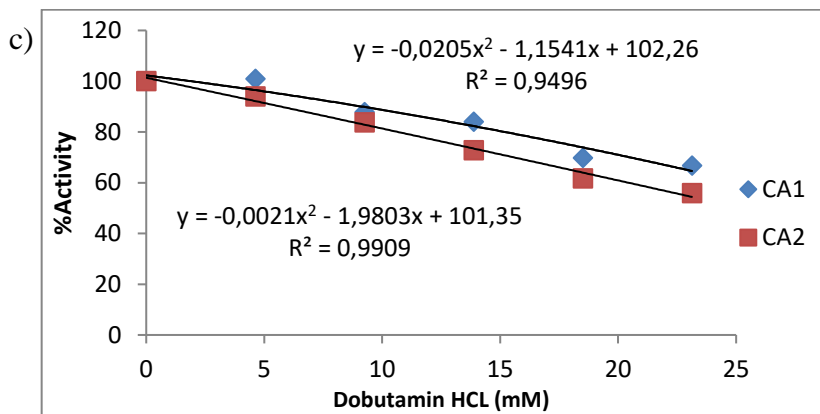
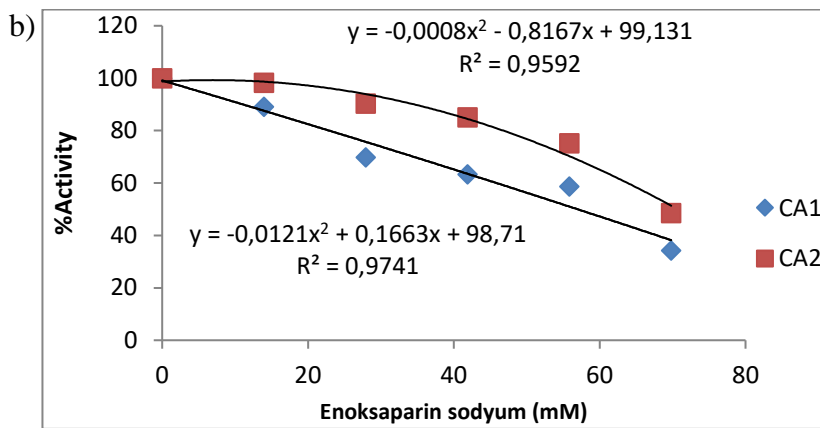
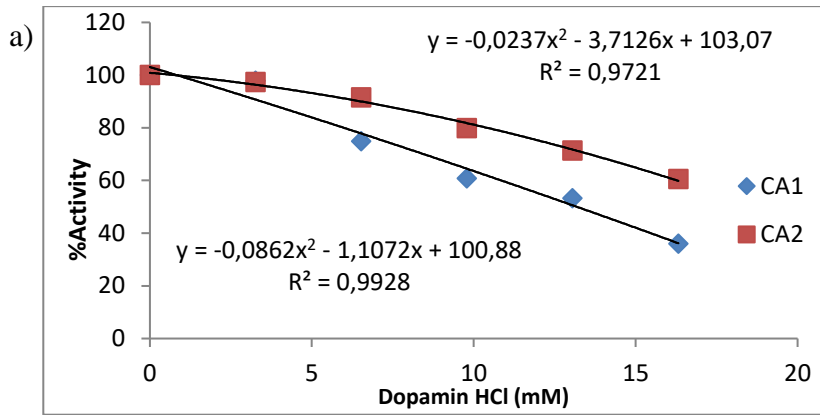
CA aktivitesi, CO₂ hidrasyonundan dolayı pH'ın 10 dan 7,4'e düşmesi için gereken sürenin belirlenmesini temel alan Maren methoduyla ölçüldü [13]. Deney çözeltisi, 0,5 M Na₂CO₃ / 0,1 M NaHCO₃ (pH 10,0) ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ilave edildi. Karbon dioksit-hidrataz aktivitesi aşağıdaki denklemle enzim ünitesi (EU) hesaplandı: $t_0 - t_c / t_c$, burada t₀ ve t_c, sırasıyla enzimatik olmayan ve enzimatik reaksiyonların pH değişimi zamanlarıdır. Enzim aktivitesi belirleme ortamına, toplam hacmi 4,2 ml olan farklı ilaç konsantrasyonları eklendi. Çözelti içinde kırmızıdan sarıya renk değişiminin süresi (saniye cinsinden) 1 cm çapında 10 ml'lik bir cam tüp içinde ölçüldü. İnhibitör yokluğunda kontrol küvet aktivitesi % 100'e ayarlandı. Tüm bileşimler, kullanılan her konsantrasyonda üç kez test edildi. Her inhibitör için bir % aktivite-[inhibitör] grafiği çizildi. Grafiklerden %50'ye kadar inhibisyona (IC₅₀) neden olan inhibitör konsantrasyonu belirlendi. DMSO'nun test edilen konsantrasyonların hiçbirinde enzim aktiviteleri üzerinde etkisi olmadığı belirlendi.

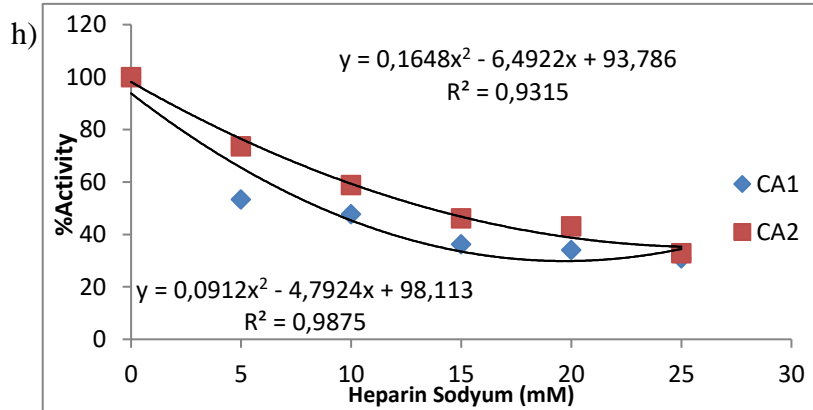
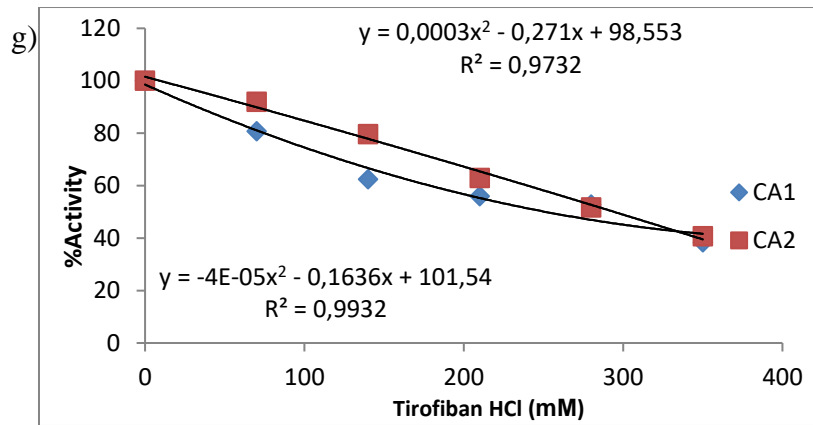
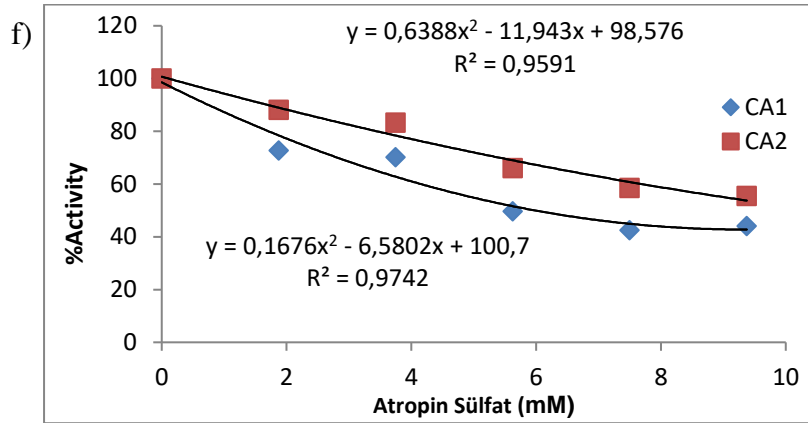
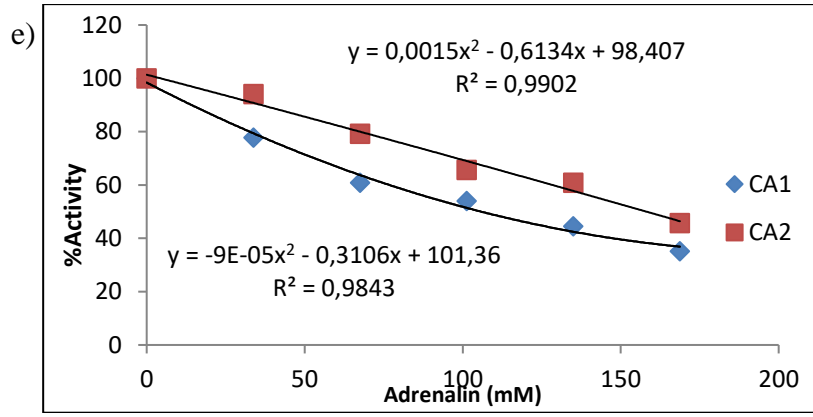
3. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada, sıklıkla kullanılan sıvı kardiyak ilaçların insan eritrosit CA-I ve CA-II üzerindeki in vitro etkileri araştırıldı. Afinite kromatografisi hCA I ve hCA II saflaştırmak için kullanıldı. Enzimlerin saflığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı (Şekil 1). İlaçların hCA I ve hCA II üzerindeki inhibitör etkileri hidrataz yöntemiyle belirlendi (Şekil 2). IC₅₀ değerleri, % aktivite - [I] grafiklerinden hesaplandı ve Tablo 1'de gösterildi. Ortamda ilaç yok iken, CA aktivitesi % 100 aktivite olarak kabul edildi. En güçlü inhibitörün Atropin Sülfat (hCA I: 5,86 mM ve hCA II: 6,59 mM) olduğu saptandı. Dopamin HCl (hCA I: 13,17 mM ve hCA II: 18,66 mM) ve Heparin Sodyum (hCA I: 5,98 mM ve hCA II: 24,01 mM) da güçlü inhibitörlerdir. Norepinefrin Tartrat (hCA I: 460 mM ve hCA II: 844,45 mM) ise bu ilaçlar içinde en düşük inhibisyon etkisine sahip olduğu saptandı.



Şekil 1. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi. (1: Standart protein marker, 2: hCA-I, 3: hCA-II).





Şekil 2. İlaçların hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon grafikleri (a: Dopamin HCl, b: Enoksaparin Sodyum, c: Dobutamin HCl, d: Norepinefrin Tartrat, e: Adrenalin, f: Atropin Sülfat, g: Tirofiban HCl, h: Heparin Sodyum)

Tablo 1. Kardiyolojik sıvı ilaçların hCA I ve CA II üzerine inhibisyon etkisi

No	Bileşikler	IC ₅₀ (mM) (Hidrataz) hCA I	IC ₅₀ (mM) (Hidrataz) hCA II
1	Dopamin HCl	13,17	18,66
2	Enoksaparin Sodyum	56,88	70,47
3	Dobutamin HCL	29,65	25,25
4	Norepinefrin Tartrat	460	844,45
5	Adrenalin	106,75	122
6	Atropin Sülfat	5,86	6,59
7	Tirofiban HCl	246	289,75
8	Heparin Sodyum	5,98	24,01

CA'lar ilaç hedefli enzimlerdir. Bu enzimlerin inhibitörleri, yeni terapötik ajanları keşfetmek ve enzim-ilaç etkileşimlerini moleküler düzeyde ayrıntılı olarak anlamak için önemli arz etmektedir. Ayrıca CA ile ateroskleroz arasındaki ilişki son yıllarda dikkat çekmektedir.

Ateroskleroz, aort ve özellikle koroner arterler gibi aortun dallarını etkileyen dinamik bir süreçtir. Aterosklerotik plaklar; kolesterol, hidroksiapatit, lifli bağ dokusu birikimi ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu sonucu intima tabakasının lokal kalınlaşmasının bir sonucudur. Ateroskleroz damarlarda tıkanmaya ve plak yırtılmasına bağlı olarak embolilere ve kalp krizlerine neden olmaktadır.

Aterosklerozun belirleyici aşaması; kolesterol, kalsiyum karbonat, trigliserit, lipoprotein, hidroksiapatit ve kalmodülini plak içinde hapseden kalsiyum çökmesidir [4]. Kalsifiye aterosklerotik plak histomorfolojik olarak kemik dokusundan ayırt edilemez [14-16]. Kemiklerde oluşum ve yıkım arasındaki denge, osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sağlanır [17]. Osteoklastlar kemiği rezorbe eder ve rezorpsiyon sırasında asidik bir mikro çevre oluşturma yeteneğine sahiptir. Aterosklerozun olduğu arterlerde, kemik oluşumunda rol oynayan ana hücre tiplerinin, osteoblastlar ve osteoklastlar ile benzer fenotip sergileyen hücreler olduğu anlaşılmıştır; ancak arterlerde benzer mekanizmaların işleyip işlemediği net bilinmemektedir. CA'lar osteoklastlar tarafından üretilir [18]. CA enzimi CO²'nin hidrasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize ederek HCO³ oluşturur, bu da kalsiyum iyonlarına hızla bağlanarak kalsiyum karbonat oluşumuna neden olmaktadır. Bu oluşum osteoklast fonksiyonu ve kemik rezorpsiyonu için bir ön koşuldur. Bu mekanizma hem CA-I hem de CA-II'nin, aterosklerozun bir bileşeni olan vasküler kalsifikasyon etiyolojisinde önemli bir rol oynamasıyla ilişkilidir [19].

Oksala ve arkadaşlarının çalışmasında, CA-II, ileri aterosklerozlu hastalarda aterosklerotik plaklarında yüksek oranda eksprese edilmiştir [20]. Ayari ve arkadaşları, karşılaştırmalı bir genom mikrodizi ekspresyon analizinde, aynı hastadan alınan sağlıklı

arter dokusu ile karşılaştırıldığında aterom plaklarında CA-II'nin 1,7 kat daha fazla eksprese edildiği bulunmuştur [21]. Yuan ve arkadaşları, aterosklerotik bir sıçan modelinde CA'nın ateroskleroz üzerindeki etkilerini ve ayrıca ateroskleroz ilişkili insan aort diseksiyonu ve anevrizması vakalarını incelemiştir. Hem insan hem de hayvan aterosklerotik dokularında önemli ölçüde daha yüksek CA-I seviyeleri ile karşılaşmışlardır. Bu sonuçlar, daha yüksek CA-I seviyelerinin vasküler kalsifikasyon ile ilişkili olduğunu ve CA-I' in aterosklerozun ilerlemesinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir [19].

Çalışmamızda CA inhibisyonu gösteren en kuvvetli sıvı kardiyak ilaç olarak Atropin Sülfat saptandı. Atropin, muskarinik reseptör antagonistlerinin prototipidir [22]. Akut semptomatik bradikardi tedavisinde ilk seçenek ilaç olmaya devam etmektedir. İntrovasküler uygulanan atropin, kalp hızını arttırmakta ve bradikardi ile ilişkili belirti ve semptomları iyileştirmektedir [23].

Yine Dopamin HCl (hCA I: 13,17 mM ve hCA II: 18,66 mM) ve Heparin Sodyum (hCA I: 5,86 mM ve hCA II: 24,01 mM) da güçlü CA'yı inhibe eden ilaçlardır.

Dopamin, dopaminerjik reseptörlerin yanı sıra alfa ve beta reseptörlere de bağlanarak doza bağımlı olarak etki eden norepinefrin ve epinefrinin bir öncülüdür. Düşük dozlarda dopaminerjik reseptörlere etki ederek renal arter vazodilatasyonunu aktive eder. 5-15 mikrogram/kg/dk dozlarında, alfa ve beta-adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ile kalp hızını, kardiyak kontraktileti ve outputu artırır. 15 mikrogram/kg/dk'dan daha yüksek dozlarda, ana etkiler alfa reseptörler üzerindedir [24], bu durum vasokonstrüksiyon ve tansiyon değerlerinde yükselme ile sonuçlanır. Şentürk M ve arkadaşlarının çalışmasında Dopamin bileşiğinin, CA izoenzimleri üzerine etkisi 348 nm' de Esteraz aktivitesi (p-nitrofenil asetat substratı ile) ile çalışılmış ve Ki değerleri CA-I 13,5 µM, CA-II 9,2 µM, CA-VI 21 µM bulunmuştur [25]. Bizim çalışmamızda ise Dopamin HCl bileşiğinin IC₅₀ değerleri hidrataz aktivitesi ile çalışılmıştır. (CO₂ hidrasyonundan dolayı pH'ın 10 dan 7,4'e düşmesi için gereken sürenin belirlenmesini temel alan Maren methodu kullanılarak). IC₅₀ değerleri CA-I 13,17 mM, CA-II 18,66 mM bulunmuştur. Bu çalışmada çalışmamızdan farklı aktivite yöntemleri kullanılmıştır.

Dobutamin organik kalp hastalığı veya kalp yetersizliğine bağlı gelişen azalmış kardiyak kontraktileteye bağlı hipotansiyonu düzeltmek için kullanılan parenteral inotropik bir ajandır [26]. Şentürk M ve arkadaşlarının çalışmasında Dobutamin bileşiğinin CA izoenzimleri üzerine etkisi 348 nm'de Esteraz aktivitesi (p-nitrofenil asetat substratı ile) ile çalışılmış olup IC₅₀ değerleri CA-I 5,34 µM, CA-II 4,72 µM saptanmıştır [27]. Bizim çalışmamızda ise Dobutamin HCl bileşiğinin IC₅₀ değerleri hidrataz aktivitesi ile çalışılmıştır (Maren methodu kullanılarak). Bu çalışmadan farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeni farklı aktivite yöntemlerinin kullanılmasıdır.

Bir glikozaminoglikan olan heparin, antitrombin III'e bağlanarak trombin, faktör X ve diğer pıhtılaşma faktörlerinin inhibisyonunu hızlandırarak kan pıhtılaşmasını güçlü bir şekilde inhibe eder [28]. Koroner arter hastalarında periferik embolizmin ve kalp krizine bağlı ölümlerin önlenmesinde etkilidir ve uzun yıllardır kullanılmaktadır [29]. Akut iskemik inme hastalarında sağ kalımı iyileştirdiği gösterilmiştir [30].

Diğer taraftan Norepinefrin Tartrat değerlendirdiğimiz ilaçlar içinde en zayıf inhibisyon etkisine sahip ilaç olarak saptadık. Norepinefrin Tartrat sempatomimetik etkili bir ajandır. Etkisini arterlerde vasokonstrüksiyonun neden olduğu kan basıncını arttırarak göstermektedir [31].

Birçok ilaç molekülü, moleküller arası etkileşimler yoluyla hedeflerine geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak bağlanan enzim inhibitörleridir. Bu nedenle enzim inhibisyon çalışmaları, ilaç tasarımı ve biyokimyasal uygulamalar için önemli bir konudur [32-34]. Mevcut çalışmanın bulguları, inhibitörler veya karbonik anhidraz enzimleri hakkında büyüyen literatüre katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada, sıvı kardiyak ilaçların CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki in vitro inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, ilaçlar in vitro olarak hCA I ve II üzerinde farklı derecelerde inhibitör etkisi göstermiştir.

Kaynaklar

- [1] Supuran CT, Altamimi ASA, Carta F. Carbonic anhydrase inhibition and the management of glaucoma: a literature and patent review 2013–2019. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 29:781–92, (2019).
- [2] Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20:3467–74, (2010).
- [3] Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, et al. Mortality from ischemic heart disease. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, 12: e005375, (2019).
- [4] Gamble W. Atherosclerosis: the carbonic anhydrase, carbon dioxide, calcium concerted theory. **Journal of Theoretical Biology**, 239: 16–21, (2006).
- [5] Goodman WG, London G, Amann K, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. **Am J. Kidney Diseases**, 43: 572e579, (2000).
- [6] Ramanan R, Kannan K, Sivanesan S, et al. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25: 981e987, (2009).
- [7] Adeva-Andany MM, Fernandez-Fernandez C, Sanchez-Bello R, et al. The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. **Atherosclerosis**, 241: 183–91, (2015).
- [8] Taskin MI, Bilen C, Ergun A, et al. In vitro effects of estrogen and progesterone containing drugs on human erythrocyte carbonic anhydrase I and II isozymes in women smokers and nonsmokers. **Journal of the Chinese Medical Association**, 78:513–9, (2015).
- [9] Sarioglu N, Bilen C, Sackes Z, et al. The effects of bronchodilator drugs and antibiotics used for respiratory infection on human erythrocyte carbonic anhydrase I and II isozymes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 121:56–61, (2015).
- [10] Koc ER, Erken G, Bilen C, et al. The effects of anti-epileptic drugs on human erythrocyte carbonic anhydrase I and II isozymes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 120:131–5, (2014).
- [11] Erzen M, Bilen C, Ergun A, et al. Antipsychotic agents screened as human carbonic anhydrase I and II inhibitors. **Archives of Physiology and Biochemistry**, 120:29–33, (2014).

- [12] Bozdog M, Isik S, Beyaztas S, et al. Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 30:240–4, (2015).
- [13] Maren TH. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 130:2629–34, (1960).
- [14] Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. **Virchows Archiv.**, 433:559–65, (1998).
- [15] Detrano RC, Doherty TM, Davies MJ, Sary HC. Predicting coronary events with coronary calcium: pathophysiologic and clinical problems. **Current Problems in Cardiology.**, 25: 374–40, (2000).
- [16] Sary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. **Zeitschrift für Kardiologie.**, 89 Suppl 2:28–35, (2000).
- [17] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.**, 423:337–42, (2003).
- [18] Riihonen R, Supuran CT, Parkkila S, Pastorekova S, Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts. **Bone.**, 40:1021–31, (2007).
- [19] Yuan L, Wang M, Liu T, et al. Carbonic anhydrase 1-mediated calcification is associated with atherosclerosis, and methazolamide alleviates its pathogenesis. **Frontiers in Pharmacology.**, 10:766, (2019).
- [20] Oksala N, Levula M, Pelto-Huikko M, et al. Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques – Tampere Vascular Study. **Annals of Medicine**, 42:360–70, (2010).
- [21] Ayari H, Bricca G. Microarray analysis reveals overexpression of IBSP in human carotid plaques. **Advances in Medical Sciences**, 57: 334H, (2012).
- [22] Ercüment ÖLMEZ. Antimuscarinic Drugs. **Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences**, 1(18):58-68, (2005).
- [23] 2005 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. Part 7.3: Management of symptomatic bradycardia and tachycardia. **Circulation**, 112:IV-67–77. 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.480988, (2005).
- [24] Cooper BE. Review and update on inotropes and vasopressors. **American Association of Critical-Care Nurses Advanced Critical Care**, Jan-Mar;19(1):5-13; quiz 14-5, (2008).
- [25] Şentürk, M., Ekinci, D., Göksu, S., & Supuran, C. T. , Effects of dopaminergic compounds on carbonic anhydrase isozymes I, II, and VI. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, 27(3), 365-369, (2012).
- [26] Ruffolo RR Jr. The pharmacology of dobutamine. **The American Journal of the Medical Sciences.**, 294(4):244-8, (1987).
- [27] Şentürk, Murat, et al. "In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds." **Chemical biology & drug design** 77.6, 494-499, (2011).
- [28] Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94:14683–14688, (1997).
- [29] Klein W, Buchwald A, Hillis SE, Monrad S, Sanz G, Graham A, Turpie G, van der Meer J, Olaisson E, Undeland S, Ludwig K, for the FRIC Investigators. Comparison of low-weight heparin with unfractionated heparin acutely and with

- placebo for 6 weeks in the management of unstable coronary artery disease: Fragmin in Unstable Coronary Artery Disease Study (FRIC). **Circulation**, 96:61–68, (1997).
- [30] Kay R, Wong KS, Yu YL, Chan YW, Tsoi TH, Ahuja AT, Chan FL, Fong KY, Law CB, Wong A, Woo J. Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. **The New England Journal of Medicine**, 333:1588–1593, (1995).
- [31] Chistiakov DA, Ashwell KW, Orekhov AN, Bobryshev YV. "Innervation of the arterial wall and its modification in atherosclerosis". **Autonomic Neuroscience**. 193: 7–11, (2015).
- [32] Gokce B, Gençer N, Arslan O, Turkoğlu SA, Alper M, Köçkar F. Evaluation of in vitro effects of some analgesic drugs on erythrocyte and recombinant carbonic anhydrase I and II. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 27(1): 37–42, (2012).
- [33] Gencer N, Demir D, Sonmez F, Kucukislamoglu M. New coumarin derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 20:2811–2821, (2012).
- [34] Karatas MO, Alici B, Cakir U, Cetinkaya E, Demir D, Ergün A, Gencer N, Arslan O. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel coumarin derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 28(2): 322–327, (2013).