

Mehtap ÖZÇELİK

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**KOYUN MEME DOKU ARGİNAZİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİ**

DOKTORA TEZİ

118808

Mehtap ÖZÇELİK

118808

F.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

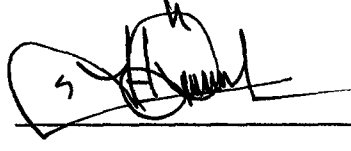
**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DANIŞMAN
Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR

ELAZIĞ-2002

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halis ÖCAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR
Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR
Danışman

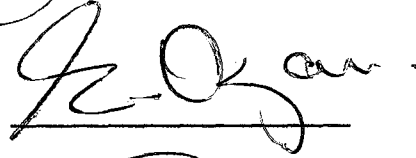


DOKTORA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ



Prof. Dr. Sema ÖZAN



Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ	IV
ÖN SÖZ	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	
1. 1. Üre Sentezi.....	1
1. 2. Arginaz Enzimi.....	6
1. 3. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri.....	7
1. 4. Koyun Meme Dokusunda Arginaz Aktivitesi	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2. 1. Kimyasal Maddeler.....	15
2. 2. Kullanılan Cihazlar.....	15
2. 3. Metodlar.....	15
2. 3. 1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	15
2. 3. 1. 1. Kullanılan Ayıraçlar.....	16
2. 3. 1. 2. Arginaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesi.....	18
2. 3. 2. Protein Ölçümü.....	19
2. 3. 2. 1. Kullanılan Ayıraçları.....	19
2. 3. 2. 2. Deneyin Yapılışı.....	20
3. BULGULAR	
3. 1. Preinkübasyon Isısının Tespiti.....	21
3. 2. Preinkübasyon Zamanının Tespiti.....	22
3. 3. İnkübasyon Zamanının Tespiti.....	23
3. 4. Mangan İyonlarının Etkisi.....	24
3. 5. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	25
3. 6. Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	25
3. 7. Optimal pH'nın Tespiti.....	26
3. 8. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı olarak Değişimi.....	28

	Sayfa
3. 9. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesine Etki Eden Bazı İnhibitörler..	29
3. 9. 1. Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'in İnhibitör Etkisi.....	29
3. 9. 2. L-Ornitinin İnhibitör Etkisi.....	31
3. 9. 3. L-Lizinin İnhibitör Etkisi.....	34
3. 9. 4. p- Kloromerküri Benzoik Asidin (p-CMBA) İnhibitör Etkisi.....	36
3. 9. 5. N- Etil Maleimitin (NEM) İnhibitör Etkisi.....	38
3. 9. 6. Metilen Mavisinin Fotoinaktivasyon Etkisi.....	40
3. 10. Koyun Meme Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi.....	43
4. TARTIŞMA.....	46
5. KAYNAKLAR.....	56
ÖZ GEÇMİŞ	67
TEŞEKKÜR.....	68



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Amino asitlerin amino gruplarını keto asite transfer eden transaminasyon mekanizması.....	1
Şekil 2: Karaciğerdeki Amonyak Metabolizması.....	2
Şekil 3: Toksik olan amonyağın toksik olmayan hale dönüşüm mekanizması.....	3
Şekil 4: Krebs Henseleit Üre Döngüsü ve Poliamin Biyosentezi	5
Şekil 5: Arginin, prolin, ornitin metabolizması.....	10
Şekil 6: Meme dokusunda arginin metabolizması ve prolin sentezi.....	14
Şekil 7: TDMU Metodu için kalibrasyon eğrisi.....	19
Şekil 8: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.....	21
Şekil 9: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Değişimi.....	22
Şekil 10: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.....	23
Şekil 11: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin MnCl ₂ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.....	24
Şekil 12: Manganyonlarının ve Preinkübasyon Isınının Koyun Meme Doku Arginazı Üzerine Etkisi.....	26
Şekil 13: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi İçin Optimal pH'nın Saptanması.....	27
Şekil 14: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.....	28
Şekil 15: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.....	29
Şekil 16: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginazı Üzerine Etkisi.....	30
Şekil 17: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	30
Şekil 18: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.....	31
Şekil 19: L-Ornitinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	32

Şekil 20: L-Ornitinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	33
Şekil 21: L-Ornitinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Grafiği İle Değerlendirilmesi	33
Şekil 22: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.....	34
Şekil 23: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	35
Şekil 24: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Grafiği İle Değerlendirilmesi	35
Şekil 25: p-CMBA'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	36
Şekil 26: p-CMBA'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	37
Şekil 27: p-CMBA'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Grafiği İle Değerlendirilmesi	37
Şekil 28: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	38
Şekil 29: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	39
Şekil 30: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Gösterilmesi	39
Şekil 31: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	40
Şekil 32: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	41
Şekil 33: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	41
Şekil 34: Diferansiyel Santrifügasyon Yöntemi.....	44

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Bazı Metal Tuzlarının Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	25
Tablo 2: Metilen Mavisinin Farklı Ortamlarda Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.....	42
Tablo 3: Mangan, Metilen Mavisi ve Işığın Koyun Meme Doku Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkisi.....	43
Tablo 4: Santrifügasyon Yöntemiyle Koyun Meme Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi.....	45



ÖN SÖZ

Koyunların süt ve et üretiminin ülke ekonomisine katkısı vardır. Bu nedenle, koyunların meme dokusu ile süt üretimi arasındaki ilişki bizim açımızdan önem taşımaktadır. Ayrıca sütün içerdiği protein, karbonhidrat, yağ, mineral maddeler beslenme açısından önemlidir. Meme dokusu ile süt içeriğinin teşekkülünde arginaz enzimin önemli rolü vardır.

Arginaz (E.C. 3.5.3.1, L- arginin amidinohidrolaz)) Krebs- Henseleit üre döngüsünün son basamağını teşkil eden argininin üre ve ornitine dönüşüm reaksiyonunu katalizleyen enzimdir. Enzimin esas yeri karaciğer olup organizma için zararlı olan amonyağın detoksifikasyona uğratarak üreyi meydana getirmektedir. Karaciğer dışındaki dokularda da enzim aktivitesine rastlanmış olup enzimin esas fonksiyonları dışında görevleri olduğu da tespit edilmiştir.

Arginaz, üre döngüsüne katılmanın yanında ayrıca birçok fonksiyonu da vardır. Bunlardan en önemlisi poliamin sentezine katılmaktır.

Meme dokusunda üre döngüsü bulunmamasına rağmen arginaz aktivitesine rastlanmıştır. Yaptığımız literatür taramalarında koyun meme doku arginaz aktivitesi hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle koyun meme doku arginazının bazı kinetik özelliklerinin optimize edilmesi, bilinen bazı inhibitör ve aktivatörlere karşı ilgisinin olup olmadığı, ayrıca hücre içi yerleşiminin saptanması amaçlanmıştır.

Karaciğer dışındaki birçok dokuda ve üreotelik olmayan bazı canlılarda aktif arginaz enzimin bulunması arginazın amonyağı detoksifikasyona uğratmasının dışında bazı görevleri olabileceğini ortaya koymaktadır. Çalışma sonuçlarının koyun meme doku arginazı ile ilgili yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

ÖZET

Bu çalışma ile koyun meme doku arginazının bazı kinetik özellikleri laboratuvarımızda optimize edilmiştir.

Koyun meme doku arginazı için $MnCl_2$ ve preinkübasyon gereklidir. Preinkübasyon ısısının $52^\circ C$, süresi ise 12 dakika olarak tespit edilmiştir. L- amino asitlerden L-ornitin ve L-lizin, koyun meme doku arginazını inhibe etmektedirler. L-ornitin ve L-lizinin inhibisyonu nonkompetitif tiptedir.

EDTA, p-CMBA, NEM, metilen mavisi koyun meme doku arginaz aktivitesini önemli derecede düşürmektedir. Bunlardan EDTA enzimi kompetatif, diğerleri ise nonkompetitif olarak inhibe etmektedir. Argininin yıkımından sorumlu olan arginaz hücre çekirdeğine bağlı olup en yüksek aktiviteyi pH 9.5'da göstermektedir.

Değişik ışık koşullarında metilen mavisinin arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Metilen mavisinin, ışığın, $MnCl_2$ 'ün koyun meme doku arginazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri de saptanmıştır.

Koyun meme doku arginazının L-arginine karşı olan K_m değeri $1.35mM$ 'dir. Bu da koyun meme doku arginazının üreotelik tipte düşük K_m 'e sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

SUMMARY

In this study, all features of arginase in the sheep mammary tissue was been optimized in our laboratuar.

It was determined that $MnCl_2$ and preincubation were essential for the activation of the enzyme. It was found that preincubation temperature was $52^{\circ}C$ at 12 minutes for arginase. The enzyme activity non-competitively was inhibited L- amino acids such as L- ornithine and L-lysine.

EDTA, p- CMBA, NEM, methylene blue were significantly reduced arginase activity of the sheep mammary tissue which is in lactating periods. The enzyme activity was inhibited competitively by EDTA and non-competitively by the others. Arginase which has role in the destruction of arginin metabolism was localized in nucleus and has more activation at pH 9.5.

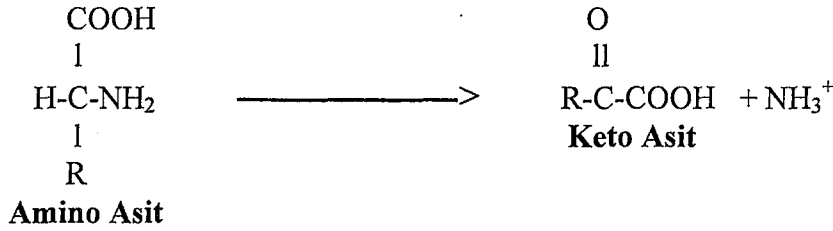
It was found that methylene blue was effected on the arginase activation in different light. In addition, present study were demonstrated that, methylene blue, 150 watt light and $MnCl_2$ effects photoinactivation of arginase in the sheep mammary tissue.

Km of arginase in the sheep mammary tissue were found 1.35mM. Because of arginase of the sheep mamary tissue has low Km such as ureothelic type.

1. GİRİŞ

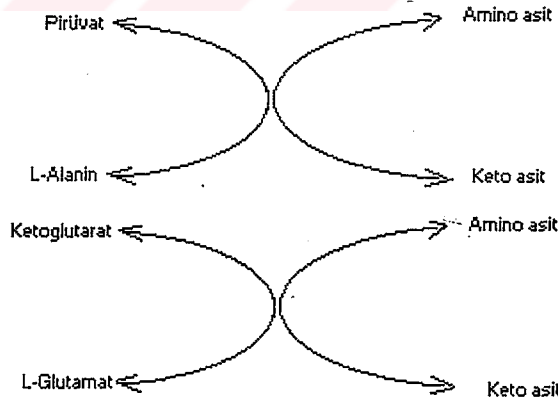
1. 1. Üre Sentezi

Canlılar tarafından besinlerle alınan proteinler, gastrointestinal sistemde proteaz enzimlerinin etkisiyle polipeptidlere, polipeptidler de aminopeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin etkisi ile önce peptidlere ve sonra amino asitlere kadar parçalanmaktadır. Canlı organizmanın sindirim kanalından emilen bu amino asitlerin bir kısmı plazma ve doku proteinlerinin sentezinde, bazı enzimlerin, protein yapılı hormonların, pürin ve pirimidinlerin sentezinde, enerji üretiminde kullanılırken, bir kısmı da fazla parçalanarak organik asitleri, amonyak ve karbondioksiti oluşturur.

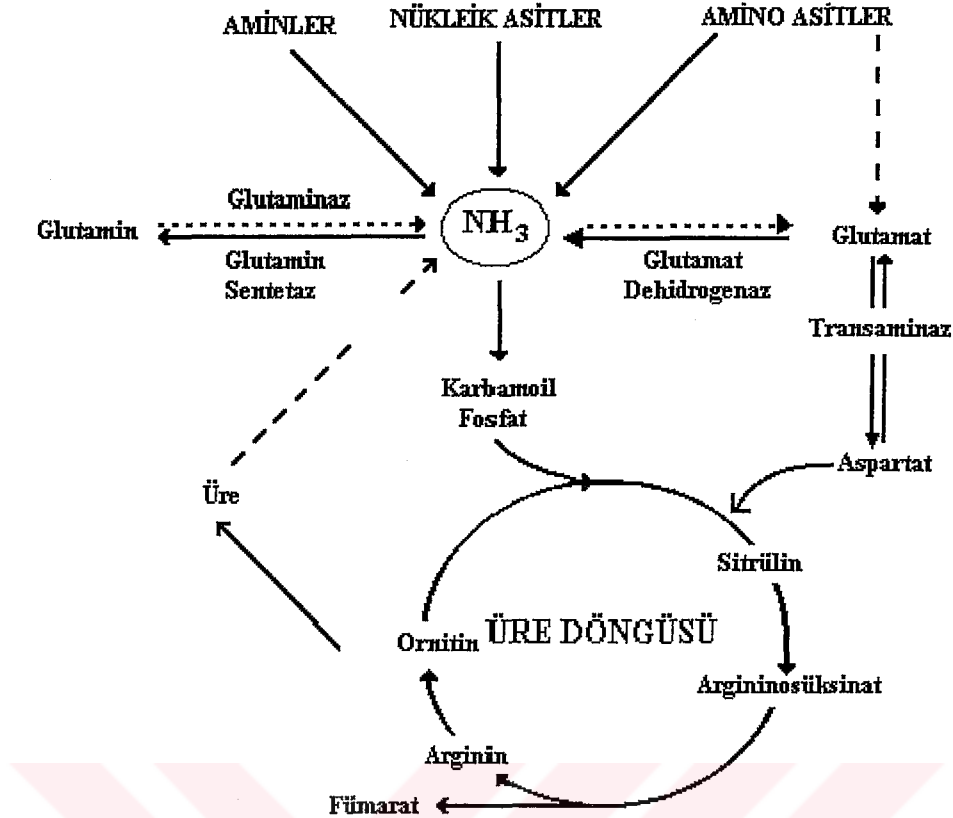


Amino asitlerin katabolizması, amino gruplarının transferi ile başlar ve bu olay daha çok karaciğer hücrelerinde meydana gelir.

Amino asitlerin amino grupları, transaminasyon reaksiyonları ile keto asit olan α -ketoglutarik asite transfer edilerek L-glutamik asitin meydana gelmesine neden olurlar. L-glutamik asit de hücrelerin sitoplazmalarından mitokondrialarına girer ve NAD^+ gerektiren glutamat dehidrogenazla tekrar α -ketoglutarik asite ve amonyağa dönüşür (124).



Şekil 1: Amino asitlerin amino gruplarını keto asite transfer eden transaminasyon mekanizması (117).



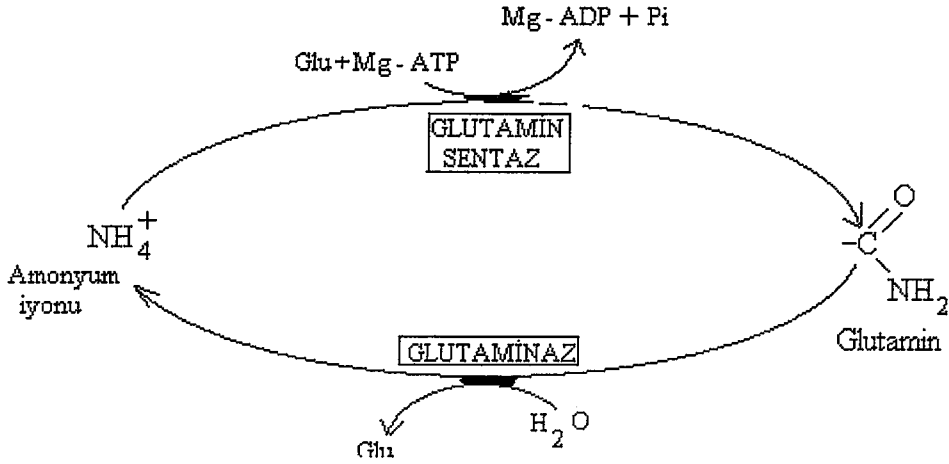
Şekil 2: Karaciğerdeki Amonyak Metabolizması (112)

Amonyanın karaciğerdeki metabolik rolü Şekil 2’de gösterilmiştir. Organizmada önemli miktarda amonyak bu yolla meydana gelir. Azotlu maddelerin yıkımı ile açığa çıkan amonyak çok toksik bir madde olduğundan tekrar azot içeren bileşiklerin sentezinde kullanılmayacaksa en kısa zamanda organizmadan uzaklaşması gerekir.

Karaciğer amonyağı kan dışında, bağırsak bakterileri tarafından oluşturulan amonyaktan da kaynaklanır. Barsaklardan vena porta kanı içine absorbe olur. Bu nedenle vena porta, sistemik kandan daha yüksek düzeylerde amonyak içerir. Normal şartlar altında karaciğer portal kandan amonyağı derhal alarak ortadan kaldırır. Karaciğeri terk eden kan, amonyak bakımından temizdir. Amonyanın çok küçük miktarı dahi santral sinir sisteminde toksik etki yapar. Metabolizma için zararlı olan bu maddenin ya derhal uzaklaştırılması veya toksik olmayan bileşiklere çevrilmesi gerekir (Şekil 3).

Böbrekler tarafından amonyak üretimi ve salınımı asit baz dengesini korur. Perifer dokularda meydana gelen amonyak toksik olmayan şekli Glutamine çevrilir. Glutamin

oluşumu, böbrek dokusunda büyük miktarlarda bulunan mitokondrial enzim glutamin sentaz tarafından katalizlenir (117).



Şekil 3: Toksik olan amonyağın toksik olmayan hale dönüşüm mekanizması (117).

Azotun organizmadan atılımı canlının bulunduğu ortamdaki su miktarına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Azot metabolizmasının son ürünlerine göre canlılar üç grupta toplanmaktadır.

1- Amonyotelik Grup :

Akuatik canlılar amonyağı hiçbir değişikliğe uğratmadan solungaçları vasıtasıyla suyu dışarı atarken vücutlarında bulunan amonyağı da dışarı atarlar. Deniz memelileri bunların dışında kalır.

2-Üreotelik Grup :

Yaşamı için ortamda yeterli miktarda su bulunan canlılar ile karada yaşayan canlılar amonyağı Krebs- Henseleit üre döngüsü ile üreye çevirirler ve üre olarak atarlar. Suda yaşayan memeliler ve omurgasızlar da bu grupta yer alırlar.

3- Ürikotelik Grup :

Suyun az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler ve tüm kanatlılar azotu suda daha az çözünen ürik asite çevirerek vücutlarından uzaklaştırırlar (73, 112).

Grazi (52), tavuk karaciğerinde yaptığı bir çalışmada iki tip arginaz tespit etmiştir. Ürikotelik karaciğer arginazı (Arginaz B) ve üreotelik karaciğer arginazı (Arginaz A). Bu arginazların bazı özelliklerinin birbirinden farklı olduğunu açıklamıştır.

Üreotelik canlılarda üre, üre döngüsünün en son basamağında argininin arginaz tarafından hidroliz edilmesiyle meydana gelir (5, 73, 90, 112, 124). Arginin protein sentezi için gerekli bir amino asit olup varlığına bütün hücrelerde rastlanmaktadır. Üre döngüsü her hücrede bulunmamakla beraber genellikle arginaz üre döngüsü olmayan organizma ve organlarda da bulunmaktadır. Karaciğer hem arginazı hem de üre döngüsünün diğer enzimlerini kapsadığından üre sentezi bu organda oluşmaktadır.

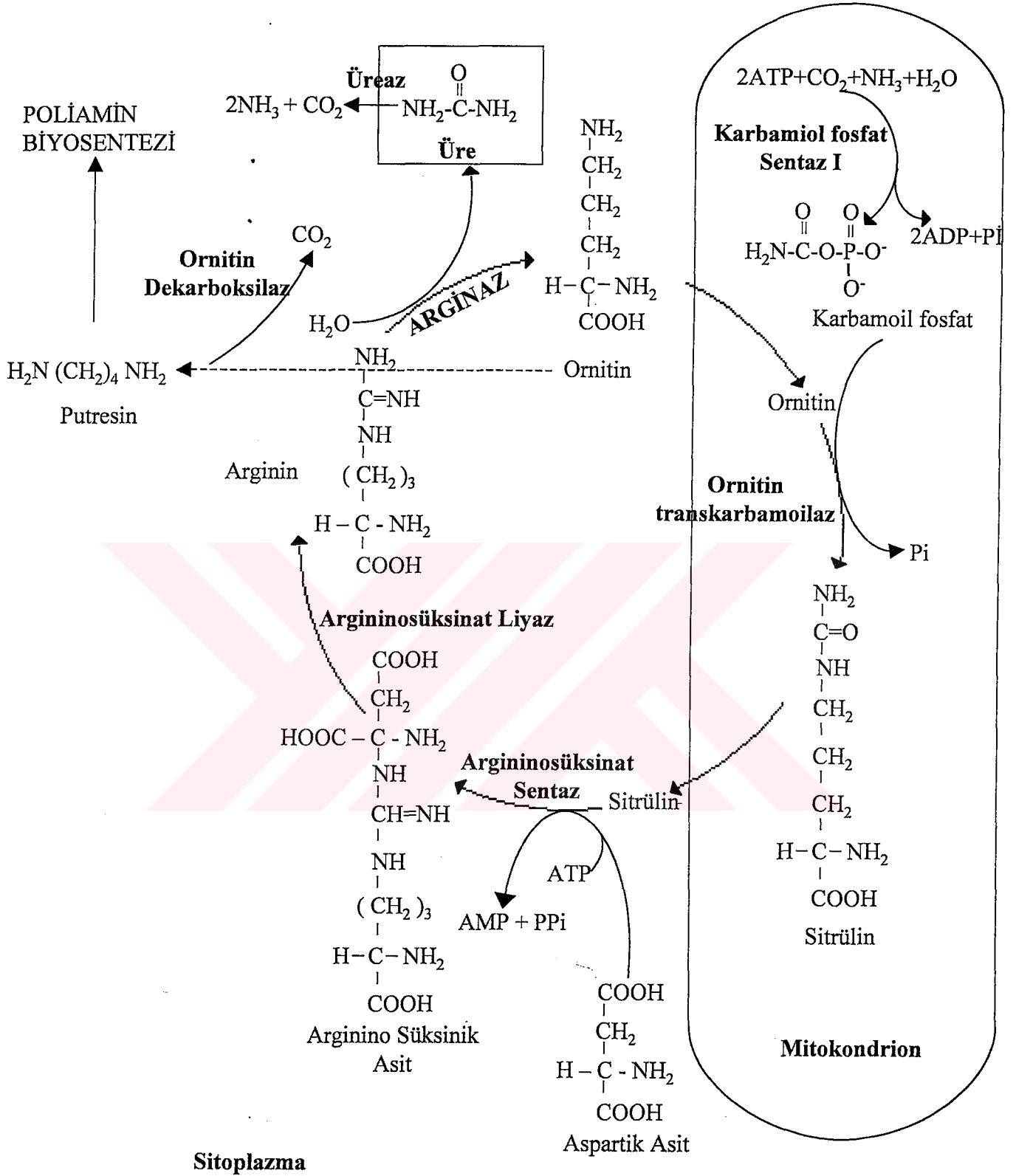
Aedes aegypti denilen bir insektisitte, canlının metamorfoz dönemi süresince ve sonrasında aldıkları proteinlerin katabolizması incelenmiş ve ürikotelik döngü için ksantin dehidrogenaz, üreotelik döngü için arginaz aktivitesine bakılmıştır. İnsektisit yaşam süresince geçirdiği tüm evrelerde her iki enzim aktivitesinin de yüksek olduğu görülmüştür (37).

Üre sentezi, amino asitlerin yıkımı esnasında açığa çıkan serbest amonyak ile dekarboksilasyonlardan meydana gelen ve büyük bölümü solunumla atılan CO₂ ve 2 mol ATP'nin karaciğer hücrelerinin mitokondriasında **karbamoil fosfat sentetaz I** enzimi vasıtasıyla **karbamoil fosfata** dönüşmesiyle başlar (Şekil 4). Enzimin aktivasyonu N-Asetil Glutamat (NAG) ve Mg⁺² iyonları ile sağlanmaktadır (124, 80). **Ornitin trans karbamoilaz**, karbamoil fosfatın karbamoil grubunu ornitine vermekte ve **sitrülin** meydana gelmektedir. Mitokondride bulunan sitrülin sitoplazmaya geçerek burada bulunan aspartatın amino grubu ile sitrülinin karbonil grubu arasında 1 mol ATP harcanarak **argininosüksinat sentaz** enzimiyle **argininosüksinik asit** meydana gelmektedir. İkinci amino grubu vericisi L-aspartattır.

Argininosüksinik asit **argininosüksinat liyaz** enzimiyle **arginin** ve **fümarik asit**'e dönüşür. Meydana gelen arginin ise **arginaz** enzimiyle **üre** ve **ornitini** oluşturur (8, 16, 27, 32, 35, 61, 80, 93, 124). Ornitin tekrar reaksiyona girerek döngüyü yeniden başlatır. Ornitin döngüde temel madde olduğundan dolayı Krebs-Henseleit Üre Döngüsüne Ornitin-Üre Döngüsü de denilmektedir.

Şekil 4'de de görüldüğü gibi üre sentezinde karbamoil fosfat ve sitrülin teşekkülü mitokondriada, siklusun diğer reaksiyonları ise sitoplazmada meydana gelir.

Reaksiyonların devamlı oluşabilmesi için ornitinin mitokondriye girmesi, sitrülinin ise mitokondriyi terketmesi gerekir.



Şekil 4: Krebs Henseleit Üre Döngüsü ve Poliamin Biyosentezi (51).

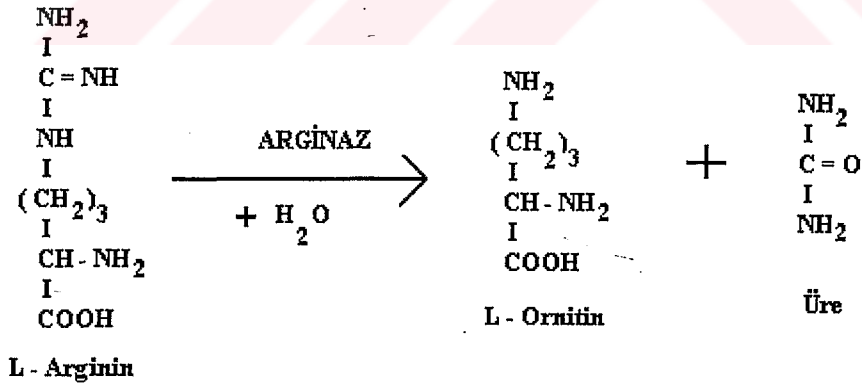
Bir mol ürenin sentezi için 3 mol ATP molekülünün harcanması gerekmektedir. Üre sentezi ekonomik açıdan pahalı metabolik yoldur. Memelilerin ve diğer canlıların amonyak yerine üre atmaları, amino asit katabolizması sonucu elde ettikleri enerjinin %15'ini harcamalarına neden olmaktadır. Develer üreyi rumene göndererek rumende bakterilerin çıkardığı üreaz enzimiyle üre amonyağa dönüşmekte ve amonyak rumen bakterileri tarafından tekrar amino asit sentezine kazandırılmaktadır. Bu amino asitler ise bağırsaktan tekrar absorbe edilerek hayvan tarafından yeniden kullanılmaktadır (51).

Sütten kesilmiş domuz yavrularının ince bağırsağında yapılan bir çalışmada karbamoil fosfat sentetaz I ve ornitin transkarbamoilaz enzimlerinin mitokondride yerleştiği; argininosüksinat sentaz ve liyaz enzimlerinin sitoplazmada; arginaz enziminin izoenzimlerinin ise hem sitoplazmada hem de mitokondride yerleştiği bulunmuştur (34).

Bu döngü ile bir mol ürenin atılması için 3 mol ATP'nin harcanması gerektiğinden bu metabolik yolun son derece masraflı olduğu da bilinmektedir (16).

1. 2. Arginaz Enzimi

Arginaz üre döngüsünün son enzimidir. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından keşfedilen arginaz sitoplazmik enzim olup üre döngüsünün son basamağında L-arginini, üre ve ornitine hidrolize eder ve üre döngüsünün diğer enzimleriyle koordineli çalışır (46, 69).



Üre döngüsü her hücrede görülmemesine rağmen, arginaz enzimi birçok hücrede görülmektedir. Arginaz bakımından en zengin organ, üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (86, 128).

Karaciğer dokusu dışında arginaz enzimi böbrek, beyin, bağırsak, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, plasenta, testis gibi dokularda (14, 45,

71, 72, 92, 93, 101, 102) düşük düzeyde ve bronş lavaj sıvısında (1) da bulunmuştur. Üre döngüsünün görülüp görülmemesi arginazın biyokimyasal rolünü etkilemektedir (35). Arginaz enzimi sadece üreotelik canlılarda bulunmayıp, bazı ürikotelik canlılarda ve bitkilerde de bulunmuştur (19, 59, 65). Krebs-Henseleit üre döngüsü ile üre sentezleyemeyen (non-üreotelik) canlılarda ve dokularda da arginaz bulunmaktadır. Arginaz burada üre döngüsüne katılmayıp başka fonksiyonlarda rol oynar.

Eritrositlerde üre döngüsü görülmemesine rağmen, insan, sığır, koyun eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiştir. Buna karşılık tavuk ve keçi eritrositlerinde bu enzime rastlanmamıştır (62, 97). Ozan ve ark. (97), tavuk eritrositlerinde arginin varlığını göstermelerine rağmen ölçülebilir bir düzeyde arginaz aktivitesi saptayamamışlar ve bunu tavuk eritrositlerinde arginaz aktivitesi olmadığı şeklinde yorumlamışlardır.

Normal insan serumunda arginaz aktivitesi eritrositlerden 200 kat daha düşüktür. Lenfosit ve blast hücrelerinde de eritrositlerden daha az, fakat nötrofilik lökositlerde ise kırmızı hücrelerin aktivitesinden 50 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (60). Karbon tetraklorid verilerek karaciğer nekrozu oluşturulan köpek, koyun ve sığırlarda arginaz ve bazı enzimlerin arttığı görülmüştür (4).

1. 3. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri

Arginaz enziminin kinetik özellikleri çeşitli dokularda birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur.

Birçok canlıda yapılan çalışmalarda; İmmunoelektroforez, CM-(Karboksimetil-), DEAE-(Dietilaminoetil-) selüloz kromatografisi, çift-immunodiffüzyon yöntemleriyle arginaz enziminin beş izoenzimi saptanmış ve farklı özelliklere sahip bu izoenzimler birbirlerinden tamamen ayrılmıştır (72, 111).

Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşiminde de farklılık gösterdiği ortaya koyulmuştur. Karaciğer için ana form olan A₁ sitoplazmaya yerleşmişken, böbrek için ana form olan A₄ mitokondriye yerleşmiş olup prolin sentezinde görev almaktadır. Böbrek A₁ arginazının ise sitoplazmaya yerleştiği açıklanmıştır (22).

Dokulara göre izoenzimlerin yerleşimi şöyledir. **Karaciğer** A₁, A₂, A₃, A₅; **böbrek, bağırsak, beyin** A₁, A₄; **submaksillar tükürük bezi** A₃; **fibroblast** A₁, A₂, A₃, **eritrosit** A₂, A₄; **tükürük, parotis bezi** A₁; **meme bezi** A₁, A₂.

Poremska ve Zamecka (111), ratlarda yaptıkları araştırmada arginazının A₁ ve A₄ formunun oligomerik protein yapısında olduğu bulunmuştur. A₁ formu katyonik, A₄ formu ise anyonik protein zincirinden oluştuğu bu nedenle subünitelerin elektrik yüklerinin ise farklı

olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada (125), rat böbreğinin sitozolünde A₁ formunun, matriksinde ise A₄ formunun yerleştiği bulunmuştur.

Fare korneasında arginaz I ve II izoenzimleri tanımlanmıştır. Herpes simplex virus enfeksiyonu boyunca arginaz enziminin her iki tipine de rastlanmıştır (83).

İnsan dokularından izole edilen izoenzimler $120\ 000 \pm 5\ 000$ Dalton molekül ağırlıkta olup (132), molekül ağırlıkları $39\ 200 \pm 400$ Dalton olan üç subünitenin biraraya gelmesiyle trimerik yapı olduğu görülmüştür (18, 62).

Farklı memelilerin karaciğerlerinde yapılan çalışmalarda arginazın molekül ağırlığının $38\ 500 - 39\ 700$ Dalton olduğu bulunmuştur. Subünitelerin yan yana gelerek molekül ağırlığı $110\ 000 - 150\ 000$ Dalton olan tetramerik bir molekül yapı kazandığı açıklanmıştır (18, 62, 112). **Aspergillus nidulans**'ın türünün saflaştırılmış arginazının molekül ağırlığının ise 40 kilodalton olduğu ortaya konulmuştur (38).

Üreotelik ve ürikotelik organizmaların karaciğer arginazı arasında hem yapısında hem de kinetik özellikleri açısından farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların en başında da molekül ağırlığı gelmektedir. Üreotelik ve ürikotelik arginazların molekül ağırlıklarının $138\ 000 - 276\ 000$ Dalton arasında değiştiği bulunmuştur (52).

Arginaz bir metaloenzim olup, tam katalitik aktivite göstermesi ve dördüncül yapı şekillenmesi için her subünitenin bir mol Mn^{+2} içermesi gerekir (58, 91). Arginazın aktivitesi için Mn^{+2} gerekli olup (12, 29, 62, 74, 79, 128) kazanılan aktivitenin %90-95'i Mn^{+2} iyonlarına bağımlıdır (74). Mn^{+2} iyonlarının bağlanması enzimin ısıya dayanıklılığını artırmaktadır (128) ve inhibitörlere karşı daha dayanıklı hale gelmesini de sağlamaktadır (109). Fakat enzimin asitle muamelesi sonucu Mn^{+2} iyonlarının ilavesi enzimin inhibisyonunu etkilemediği ve enzimi denaturasyona karşı koruyamadığı bulunmuştur (59). İki değerlikli iyonlardan Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Va^{+2} , ferros-askorbat ve ferros-sistein bileşiklerinin enzim aktivitesine etkisinin daha az olduğu görülmüştür (32, 90). Metal iyonlardan Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+1} , sitrat, borat arginaz aktivitesine inhibitör etki ettiği bildirilmektedir (32, 94).

Ratlarda yapılan bir çalışmada (15), hayvanların mangandan fakir diyetle beslendiklerinde hepatik arginaz seviyesinin kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Plazma amonyak miktarının ise yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Arginaz aktivitesi ve stabilitesi için kofaktör olarak Mn^{+2} iyonlarına ihtiyaç duyduğu da açıklanmıştır.

Enzimin maksimum aktivitesi için Mn^{+2} iyonlarının yanında, $55^{\circ}C$ 'de preinkübasyon gerekmektedir (6, 32, 100, 121). Shimke'nin bir çalışmasında (121), sıçan karaciğer arginazı $55^{\circ}C$ 'de Mn^{+2} ile preinkübe edildiğinde enzim aktivitesinin %110 arttığı görülmüştür. Colombo ve Konarska (32) yaptıkları bir çalışmada, eritrosit arginaz aktivitesinin Mn^{+2}

iyonlarının varlığında 55°C'de preinkübe edildiğinde enzim aktivitesinin 2-6 kat arttığı, buna karşılık karaciğer arginaz aktivitesinin ise 4-5 kat arttığı saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada (128), argininin hidrolizi için optimal pH'nın 9.4-9.8 olduğu görülmüştür. pH 7.4'de enzim aktivitesi %10-30 arasında düşme gösterirken, daha düşük pH'larda enzimin aktivitesini kolayca kaybettiği saptanmıştır (74, 121).

Rat karaciğer arginazı üzerine yapılan çalışmada (59), enzim aktivitesinin 6'dan düşük pH'larda hızlı bir şekilde inaktive olduğu gözlenmiştir.

Carvajal ve ark. (22) rat karaciğer ve böbrek arginazı üzerine prolinin etkisini araştırmışlar ve prolinin pH 9.5'da böbrek arginazını (A₄) kompetitif olarak inhibe ederken, karaciğer arginazını da (A₁) nonkompetitif inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Her iki doku enzimi pH 7.5'ta nonkompetitif tipte inhibisyona uğratmıştır. Araştırmacılar böbrek arginazının proline, karaciğer arginazının da lösin, izolösin ve valin gibi amino asitlere daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada (113), prolinin meme bezi arginazını da nonkompetitif inhibe ettiği görülmüştür.

Ornitin, sistein, lizin, lösin, izolösin (22, 41, 44, 67, 91), valin (22, 41, 91, 120), prolin (22, 41, 53), hidroksiprolin, homoarginin (62), borat, EDTA (59, 91, 116), kanavanin, NEM, p-CMBA (41), sodyum nükleat, metilen mavisi (88), sakkaropin (2), malathion (85) gibi maddelerin arginazı inhibe ettiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur.

L-amino asitlerden valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sisteinin sığır rumen doku arginazını inhibe ederken, histidin ve hidroksiprolinin etki etmediği görülmüştür (41). Arginaz enziminin katalize ettiği reaksiyon sonucu oluşan ürünlerden ornitin arginazı inhibe ettiği, ürenin ise inhibe etmediği bildirilmiştir (69).

Muszynska ve Wojtczak (91) yaptıkları bir çalışmada ornitin ve lizinin sıçan karaciğer arginazını kompetitif; valin, lösin, izolösin ve sisteinin ise nonkompetitif olarak inhibe ettiğini açıklamışlardır.

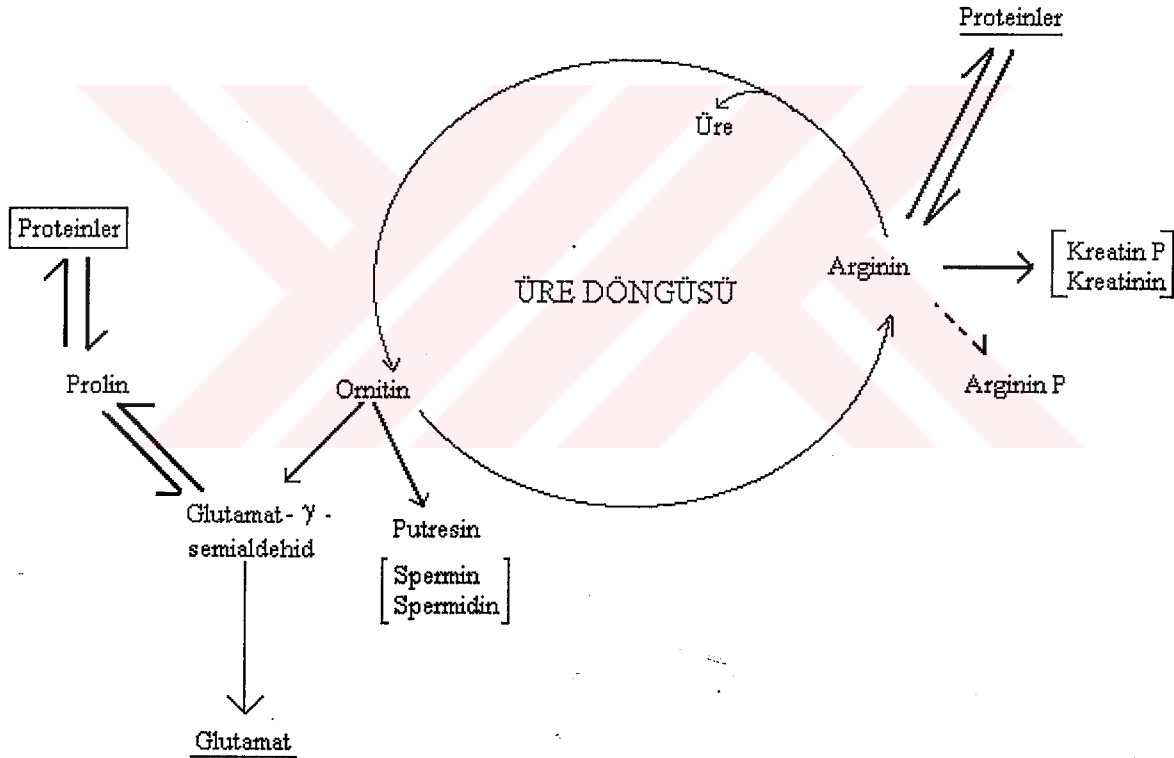
Reczkowski ve ark. (116), EDTA ve sitrat gibi şelatörlerin rat karaciğer arginazını inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Fakat enzim saflaştırıldıktan sonra Mn⁺⁺ ile reaksiyona sokulması sonucu inhibitörlere maruz bırakıldığında enzimi fazla inhibe etmediklerini görmüşlerdir. Ayrıca bu çalışmada boratın, enzimi nonkompetitif tipte inhibe ettiğini de açıklamışlardır.

Ber ve ark (9), arginazın aktivite göstermesi için aktif merkezinde, -SH grubu içeren amino asitlerin olması gerektiğini, saflaştırılmış sıçan karaciğer arginazı üzerine p-kloro merkür benzoik asit (p-CMBA) ve N-etil maleimid (NEM) kullanarak incelemişler ve bu iki maddenin sıçan karaciğer arginazı üzerine inhibisyon etkisi göstermediklerini açıklamışlardır.

Buna karşın sığır rumen doku arginazı (41) ve insan tiroid doku arginazı üzerine (64), p-CMBA ve NEM'in inhibisyona neden olduklarını bildirmişlerdir. İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazı üzerine p-CMBA'nın inhibisyon etkisinin ise olmadığı bulunmuştur (56).

Ber ve Muszynka (8), sıçan karaciğer arginazının metilen mavisi ve 150 w ışık altında enzimin fotoinaktivasyonu sonucu, 32 histidil artığından 21'ini tahrip ederek katalitik aktivitenin çoğunun kaybolduğunu açıklamışlardır.

Arginaz; temel fonksiyonu olan üre sentezi dışında, memeli hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli bir biyomolekül olan poliaminlerin (putresin, spermin ve spermidin) sentezine de katılır (10, 11, 72, 136). Ayrıca Şekil 5'de görüldüğü gibi protein sentezi için ornitin üzerinden prolini sentezlemek de arginazın önemli fonksiyonlarından (117).



Şekil 5: Arginin, prolin, ornitin metabolizması (117).

Arginin metabolizmasının fizyolojik olarak, canlı organizma için çok önemli olduğu açıklanmıştır. Çünkü bu metabolizma gerekli proteinleri oluşturan amino asitlerin birleşimidir. Bu yolların son ürünleri ise protein sentezinin gerçekleşmesinde, yara

iyileşmesinde, immün cevap oluşumunda, tümör biyolojisinde, inflamasyonun regülasyonunda rol oynadığı saptanmıştır (39, 133).

Enzim aktivitesi beslenme ve hormonal etki ile değişikliğe uğramaktadır. Düşük protein diyetinde ve açlık durumlarında farklı dokulardaki arginazların aktivitelerinde genel bir azalma olmaktadır. Fazla karbonhidratlı yiyeceklerle beslenildiğinde üre döngüsü enzimleri azalmaktadır. Karbonhidrat tüketimi azaldığında ise üre döngüsü enzimleri artmaktadır (43, 121).

Düşük ve yüksek protein diyetiyle beslenen keçilerde yapılan bir çalışmada (122), yüksek protein diyetiyle beslenenlerde üre döngüsü enzimleri ve serum üre düzeylerinin daha fazla olurken, düşük protein diyetiyle beslenenlerde karaciğer amonyak seviyesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Konarska ve arkadaşları (72), tiroksin ve hidrokortizonun, ince bağırsak ve böbrek arginazını aktive ettiğini, beyin arginazına ise bir etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Kumar ve Kalyankar (76), kortizolün karaciğer arginazını aktive ettiğini, böbrek arginazına bir etkisinin olmadığını açıklarken testosteronun ise tam aksini yaptığını ortaya koymuşlardır.

Fötal ratların kültüre edilmiş karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışmada insülinin ve deksametazonun üre döngüsü enzimlerini etkilediği bulunmuştur (61).

Üre döngüsü enzimlerindeki yetersizlik veya bozukluk durumunda metabolizmanın dengesi bozular. Özellikle üre döngüsü bozukluklarından primer defektin, enzimlerdeki yetersizlikten kaynaklandığı saptanmıştır (77, 123).

Arginin beslenme için gerekli semi-esansiyel bir amino asittir (133). Arginaz eksikliği sonucu oluşan argininemia, üre döngüsünün kalıtsal bir bozukluğudur. İlerleyen zeka geriliği ve spazmlar, gelişme bozukluğu klinik bulguları arasında sayılabilir (31, 57). Kedi ve diğer karnivorlar argininsiz diyetle beslendikleri zaman hayvanların böbreklerinde bazı metabolik bozukluklara da rastlanmıştır (78).

Hiperammonemia'nın periyodik formlarından olan Argininemia üreogenezisin herediter hastalıklarındandır. Hiperammonemia, ensefalopatiye yol açar. Bazı akut vakalar hafif seyrederken bazılarının ilerlemesi sonucu ölümlere yol açtığı gözlenmiştir (68, 121, 124). Bu olay arginaz enzim yetersizliğinde görülür (57).

Senegal ailelerinde yapılan bir çalışmada (20), arginaz yetersizliği olan iki kardeş tesbit edilmiş ve farklı iki tip diye adlandırılan bu hiperargininemia vakalarının klinik belirtilerinin çocuklarda hastalığın çıkış yaşına bağlı ve mental gerilikle karakterize olduğu açıklanmıştır.

Argininemia'da klinik laboratuvar olarak hiperargininemia, hiperammonemia, argininüri, lizinüri, sistinüri yaygın şekilde bulunmuştur. İdrarda orotik asit ve diğer pirimidinlerden urasil ile üridinin arttığı saptanmıştır. İntramitokondrial argininin fazlalığı N-asetil glutamat sentazı aktive ederek karbamoil-P sentaz aktivitesini stimüle etmektedir (31).

Bazı kanser vakalarında, serum arginaz düzeyi ve doku arginaz düzeyinin arttığı bildirilmiştir (129, 134). Arginazın kanser olayları için belirleyici (marker) enzim olabileceği üzerinde durulmaktadır (129, 134, 135).

Akciğer kanserli hastalarda doku arginaz düzeyleri araştırılmış ve tümör dokularındaki enzim düzeylerinin sağlıklı dokulara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu artışın, poliamin biyosentezinin hızlandırılması nedeniyle kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği şeklinde açıklanmıştır (50).

İnsan kolorektal kanserli dokudaki arginaz aktivitesi normal dokudan daha yüksek bulunmuştur (110). İntestinal kanaldaki kanserli dokularda da arginaz aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (70).

Gebelerin ve hiperprolaktinemili hastaların tükürük arginaz aktivitelerinde 4-5 kat artış saptanması prolaktin hormonunun etkisinden olabileceği açıklanmıştır. Bunun yanında eritrosit arginaz aktivitesinde hafif düşüş bulunmuştur (54).

Serum arginaz aktivitesinin akut hepatitis, safra kanallarının malign tümörü, karaciğer metastazları, siroz gibi hücre harabiyetine sebep olan malin ve benin karaciğer hastalıklarında arttığı görülmüştür (129).

Orak hücre hastalığına bağlı olarak eritrosit arginazında artış olduğu ve bu artışın heterozigot grubun homozigot gruba göre daha az aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (126).

İnsanda arginazı şifreleyen iki farklı yapısal gen lokusunun olduğu bilinmektedir (127, 128). Birinci lokus, eritrosit ve karaciğerdeki enzim aktivitesinin %90'ından; böbrek , mide-bağırsak ve beyindeki aktivitenin ise yaklaşık %50'sinden sorumludur. İkinci lokus ise karaciğer ve eritrositlerdeki aktivitenin %5'inden sorumlu iken böbrek, mide- bağırsak ve beyindeki aktivitenin ise %50'inden sorumludur (127).

Depresyon geçiren hastalarda antidepresan ilaç tedavisinden önce ve sonra arginaz aktivitesine bakılmış ve bu hastalarda arginaz aktivitesindeki artışın arginaz ve Nitrik Oksit arasındaki ilişkiden kaynaklanacağı sonucuna varılmıştır (40).

1. 4. Koyun Meme Dokusunda Arginaz Aktivitesi

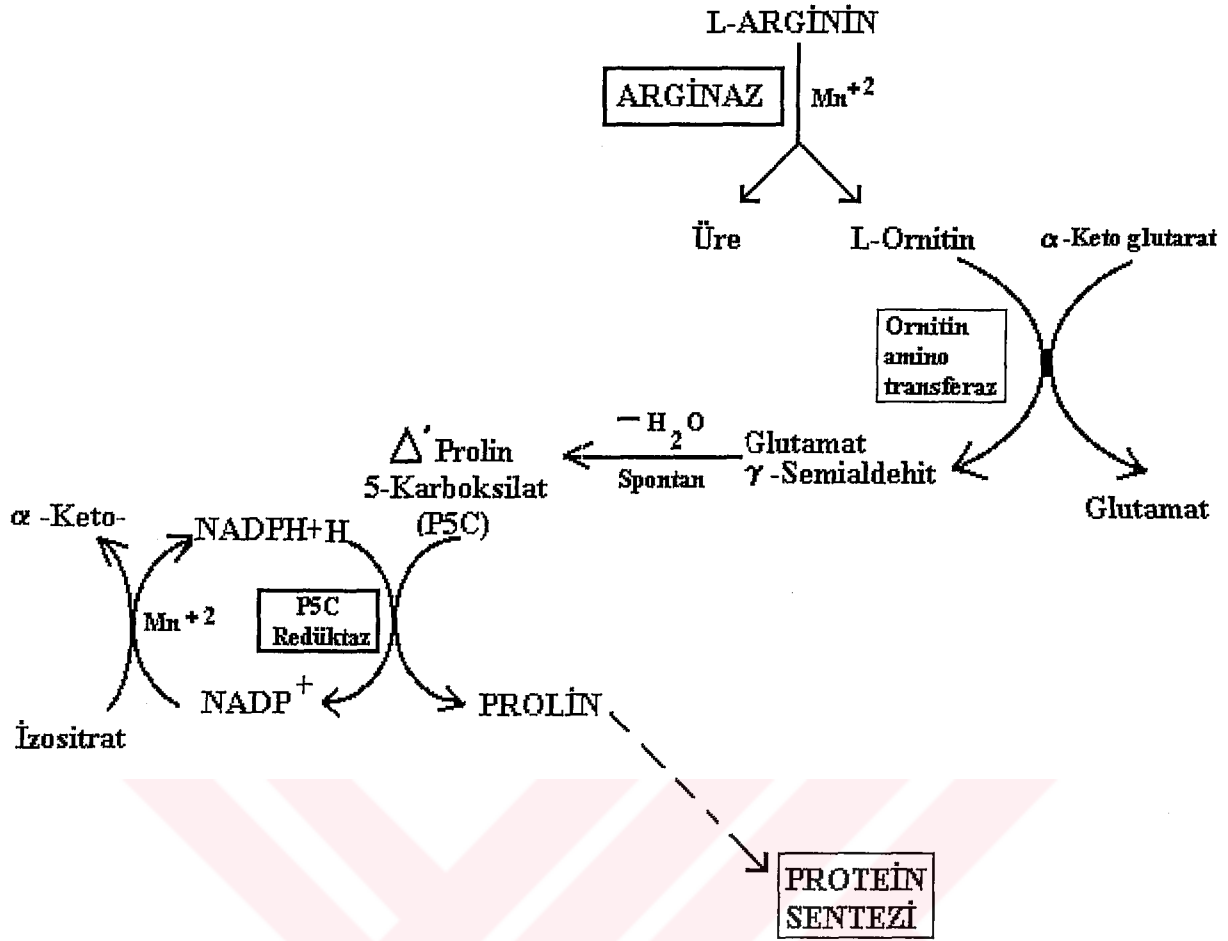
Meme bezi arginazının ana fonksiyonu; argininden prolin ve glutamat üretmektir. Meme bezindeki arginaz aktivitesi bu amino asitleri regüle ederek işlemi gerçekleştirir. Meme bezi arginazı üzerine, prolinin etkileri yapılan çalışmaların temelinı oluşturmaktadır (3, 10, 45, 71, 82, 87, 89, 132).

Ornitin kandan emilir ve prolin (γ -amino grup transaminasyonla) meme bezinde amino asit sentezi için kullanılır. Mephan ve Linzell (82), süt proteini ile direkt birleşen argininin, üre ve ornitine dönüştüğü açıklanmıştır.

Karaciğer dokusu dışındaki dokular aktif üre döngüsü görülmemiştir. Meme bezindeki arginaz enzimi üre döngüsünün bir fonksiyonu olarak görev yapmaz. Bununla ilgili olarak Yip ve Knox (132); laktasyon dönemindeki fare meme dokusunda tam çalışan bir üre döngüsü olmamasına rağmen çok belirgin arginaz aktivitesi bulmuşlardır. Bununla birlikte, prolin ve pirimidin sentezinde görev alan bazı enzimlerde de (ornitin aminotransferaz, aspartat karbamoil transferaz ve karbamoil fosfat sentetaz II) artış gözlemlenmiş ve meme dokusunda üre döngüsünün görülmemesinin nedeninin karbamoil fosfat sentaz I ve ornitin transkarbamoilaz enzimlerinin olmasından kaynaklandığını açıklanmışlardır.

Meme dokusunda arginaz enzimine mutlaka ihtiyaç vardır. Arginaz arginini, ornitine ve üreye çevirir. Arginazın poliamin biyosentezinde ornitin kaynağı olarak rol oynadığı bilinmektedir. Arginin arginaz vasıtasıyla putresine dönüşmekte ve putresin de ara kademelerden geçerek spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır (3, 69, 118). Ornitin, ornitin amino transferaz ile glutamat γ -semialdehite, bu da spontan olarak Δ^1 Prolin 5 karboksilata (P5C) dönüşür. P5C ise P5C-redüktaz enzimiyle proline dönüşür (Şekil 6). Elde edilen bu amino asitin süt proteininin oluşması için mutlaka gerekli olduğu açıklanmıştır (7).

Üre döngüsü olmayan koyun plasentasında ilerleyen gebelik süresine paralel olarak artış gösteren bir arginaz enzim aktivitesi saptamışlardır. Burada amino asit ve metabolik ara ürünler protein sentezinin başlaması için önemli kabul edilmiştir. Laktasyonun başlangıcında ise protein sekresyonunda meme bezindeki kazein miselleriyle dolarak süt salgılamaya yol açar. Bundan sonra arginin ornitine, ornitin de proline dönüşerek kazein oluşumunu sağlar (Şekil 6). Eğer organizmadan bu iki amino asit uzaklaştırılırsa prolin ve kazein yetersizliği meydana gelir(7).



Şekil 6: Meme dokusunda arginin metabolizması ve prolin üzerinden protein sentezi (7).

Argininin laktasyondaki temel amacı üre döngüsüne katılmak değil, protein ve poliamin sentezine katılmasıdır (3, 7, 48, 69, 136).

Sıçan meme doku arginazının gebeliğin son dönemlerinde belirgin olmaya başladığı ve laktasyon dönemlerinde daha yüksek düzeylere ulaştığı Yip ve Knox (132) tarafından açıklanmıştır.

Memelilerin gebeliğinde, meme bezinin fonksiyonel ve morfolojik modifikasyonlara uğradığı ve gebeliğin ilk günlerinde meme bezlerinin büyümesinin yavaş olduğu ilerleyen günlerde ise hızlandığı tespit edilmiştir (28).

Meme tümörlerinde ve prekanseröz nodüllerde yapılan bir çalışmada arginaz aktivitesinin arttığı görülmüştür (113).

Bu çalışmanın amacı koyunların laktasyon safhalarında meme dokusundaki arginaz varlığını ortaya koymak ve enzimin bazı kinetik özelliklerini optimize etmektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma materyalleri, Elazığ Elet Tesisleri'ne kesim için getirilen laktasyondaki koyunlardan temin edilmiştir. Bu çalışma boyunca 1-2 yaşlarında, aynı şartlarda yetiştirilen ve özellikleri aynı olan 20 baş Akkaraman koyunu kullanılmıştır. Kesimden hemen sonra alınan sütlü meme dokusu %0.9'luk soğuk NaCl çözeltisi içerisinde behere aktarılmış ve en kısa zamanda laboratuara buz içerisinde getirilmiştir. Temizlenen dokular ya hemen analize tabi tutulmuş veya daha sonra kullanılmak üzere -18°C 'de derin dondurucuda (Deep-freeze) saklanmıştır.

2. 1. Kimyasal Maddeler:

Diasetil monoksim, Tiyosemikarbazid, L-Ornitin, EDTA, L-Lizin, N-Etil Malemid, p-CMBA gibi kimyasal maddeler Sigma Chemical Company'den temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup piyasadan alınmıştır.

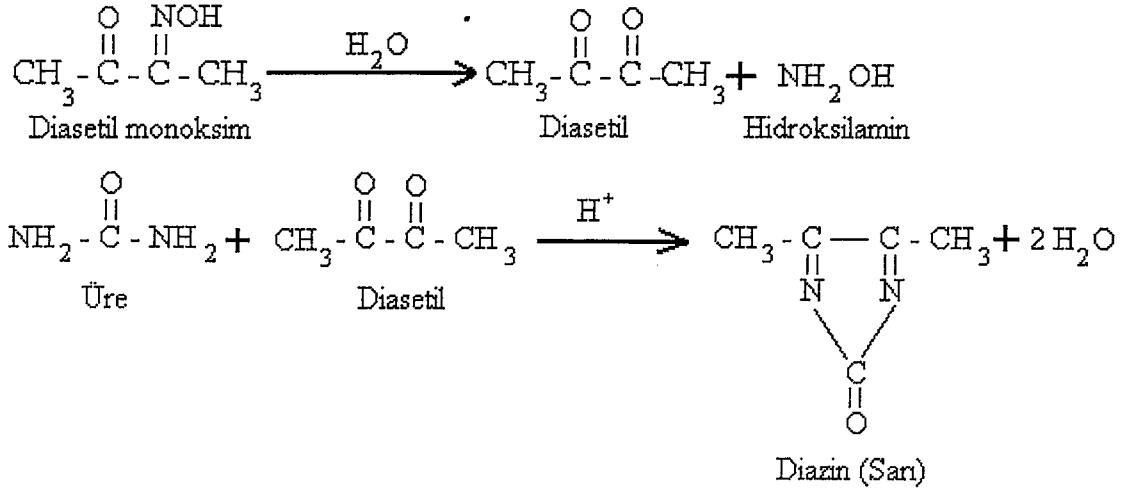
2. 2. Kullanılan Cihazlar:

- 1- Cam- cam ve cam- teflon (Pottern- Elvehjem) Homojenizatör
- 2- Soğutmalı Santrifüj (Sorvall RC- 5B)
- 3- Spektrofotometre (Shidmadzu UV/ 240)
- 4- pH- metre (pH- Meter CG 810)
- 5- Sıcak su banyosu (Benmarry)
- 6- Karıştırıcı

2. 3. Metodlar:

2. 3. 1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi:

Tiyosemikarbazid- Diasetilmonoksim Üre (TDMU)- yöntemi esas alınarak arginaz düzeyi saptanmıştır (47). Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil, asit solüsyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan Diazin'i meydana getirir. Oluşan sarı rengi kararlı kılmak için Thiosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (66).



2. 3. 1. 1. Kullanılan Ayıraçlar:

1- Substrat Çözeltisi (75mM L-Arginin) :

1.58g L-arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66g/mol) 80-85 ml distile suda çözüldükten sonra pH'sı 9.5'a ayarlanıp distile suyla 100ml'ye tamamlanarak, +4°C'de saklanmıştır.

2- Karbonat Tampon Çözeltisi (100mM NaHCO₃ / Na₂CO₃):

a) 1.06g Na₂CO₃ (Mol. Ağ. 105.99g/mol) bir miktar distile suda çözülerek, 100ml'ye tamamlanmıştır.

b) 0.84g NaHCO₃ (Mol. Ağ. 84.01g/mol) bir miktar distile suda çözülerek, 100ml'ye tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisini hazırlamak için 100mM'lık NaHCO₃ çözeltisi behere konarak ve üzerine 100mM'lık Na₂CO₃ çözeltisiyle pH'sı 9.5'a gelinceye kadar ilave edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3- Asit Karışımı:

a) 0.120 M FeCl₃ / %56.7 H₃PO₄

3.24g FeCl₃ (Mol. Ağ. 270.3g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra üzerine 66.7ml %85'lik H₃PO₄ (d= 1.71, Mol. Ağ. 98.0g/mol) ilave edilir. Daha sonra distile suyla 100ml'ye tamamlanarak oda ısısında saklanmıştır.

b) 999ml %20 (v/v)'lik H₂SO₄ (d=1.84, Mol. Ağ. 98.08g/mol) üzerine 1.0ml yukarıda hazırlanan 0.120 M FeCl₃ / %56.7 H₃PO₄ çözeltisinden ilave edilerek oda ısısında saklanmıştır.

4- Renk Ayıracı:

Bu karışım 0.0036M Tiyosemicarbazid (TSC, Mol. Ağ. 91.14g/mol) ve 0.0617M Diasetilmonoxim (DMA, Mol. Ağ. 101.1g/mol) içermektedir. 6.23g DMA ve 0.328g TSC bir miktar distile suda çözüldükten sonra litreye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde ve oda ısısında saklanmıştır.

5- 10mM MnCl₂ Çözeltisi:

0.99g MnCl₂. 4H₂O (Mol. Ağ. 197.9g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile suyla 500ml'ye tamamlanarak buzdolabında saklanmıştır. Koyun meme doku arginaz aktivitesi çalışmalarında bu stok çözeltiden sulandırma yapılarak istenilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.

6- Üre Standartı (0.1 µmol üre/ ml):

3mg üre (Mol. Ağ. 60.06g/mol), 100ml 0.016M Benzoik Asit (d=1.321) içinde çözülür. Stok olarak kullanılan bu çözelti, deney sırasında 1/5 oranında sulandırılarak 0.1µmol üre/ml (0.6mg/dl)'lik üre standartı elde edilmiştir. Üre stok standart çözeltisi +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

7- Glisin- NaOH Tampon Çözeltisi (100mM):

a) 1.88g Glisin (Mol. Ağ. 75.07g/mol) bir miktar distile suda çözülerek, 250ml'ye tamamlanmıştır.

b) 1g NaOH (Mol. Ağ. 40g/mol) bir miktar distile suda çözülerek, 250ml'ye tamamlanmıştır.

Tampon çözeltisini hazırlamak için 100mM'lık Glisin çözeltisi behere konarak ve üzerine 100mM'lık NaOH çözeltisiyle 8.5 ile 11.0 arasında değişen pH'larda çözelti hazırlanmıştır.

8- Tris- HCl Tampon Çözeltisi (100mM):

3.035g Tris (Mol. Ağ. 121.14g/mol) 250 ml'ye distile suyla tamamlanarak HCl'le (d=1.19, Mol. Ağ. 34.46g/mol, %37'lik) kullanılarak 7.5 ile 9.2 arasında değişen pH'larda çözeltiler hazırlanmıştır.

9- EDTA Çözeltisi:

0.058g EDTA (Mol. Ağ. 292.25g/mol) alınıp 25ml'e tamamlanarak 4mM'lık stok çözeltiyi oluşturmuştur.

10- L- Ornitin Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 168.6g olan L-Ornitin'den 50mM'lık stok çözelti hazırlanarak kullanılmıştır.

11- L- Lizin Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 182.7g olan L- Lizin'den depo çözelti olarak 50mM hazırlanmıştır.

12- p-CMBA Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 357.2g olan p- CMBA'den 5mM'lık stok çözelti hazırlanarak kullanılmıştır.

13- N- Etil Malemid Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 125.13g olan N- Etil Malemid'den 200mM'lık stok çözelti hazırlanmıştır.

14- Metilen Mavisi Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 799.81g olan Metilen Mavisi'den 2mM'lık stok çözelti hazırlanmıştır.

15- Sükroz Çözelti (0.25M):

21.39g alınan Sükroz (Mol. Ağ. 342.30g/mol) 250ml'e tamamlanarak kullanılmıştır.

16- KCl Çözeltisi (0.16M):

3.0g KCl (Mol. Ağ. 74.56g/mol) alınarak 250ml'ye distile suyla tamamlanarak kullanılmıştır.

2. 3. 1. 2. Arginaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesi:

Alınan doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulup 1g olarak tartılıp (ağırlık/hacim) saf su ile 5ml'e tamamlanmıştır (dilüsyon oranı 1 x 5). Daha sonra bu örnekler Potter-Elvehjem (cam- cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C'de 16000xg'de 15 dakika Sorvall RC-5B'de santrifügasyon işlemine tabii tutulmuştur. Santrifügasyon işleminden sonra örneklerin süpernatantları ve pelletleri(çöküntü) kısmı birbirinden ayrılmıştır.

Koyun meme doku örneklerinin her ml süpernatantı için 3 ünite Jack-Bean üreaz ilave edilmiştir. Daha sonra 37°C'de 15 dakika inkübe edilerek endojen üreazın parçalanması sağlanmıştır (84, 95). Sonunda örnekler 2mM MnCl₂ çözeltisi ile 1 x 6 oranında sulandırılarak 52°C'de 12 dakika metabolik su banyosunda tutulmasıyla preinkübasyon işlemi sağlanmıştır. Preinkübasyon işleminden sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Enzimatik karışım 1ml olup 75mM'lık L-Arginin'den (pH 9.5) 0.3ml ve 100mM'lık Karbonat Tamponu'ndan (pH 9.5) 0.4ml içerecek şekilde düzenlenmiştir. Tüplere önce L-Arginin, sonra Karbonat Tamponu daha sonra üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3ml eklenerek örnekler 37°C'de sallantılı metabolik su banyosunda 15 dakika tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır. 15 dakikalık inkübasyon süresi 3ml asit karışım

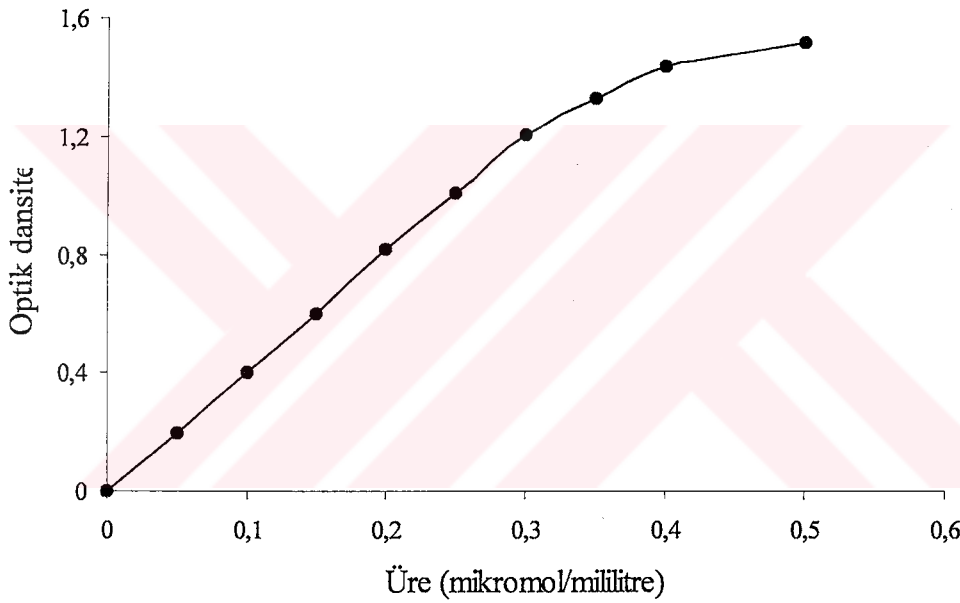
ilavesiyle sona erdirilmiştir. Asit ilavesinden sonra tüplere 2ml renk ayırıcı ilave edilmiş, tüpler vortekste karıştırılarak 10 dakika kaynar su içerisinde tutulmuş ve renk oluşumu sağlanmıştır.

Dalga boyu 520nm'de örneklerin üre miktarları sıfır zaman körlerinin (zero time blank) absorpsiyonlarının çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

Aynı işlemler standart çalışmasında da uygulanmıştır. Yalnız enzim kaynağı yerine 0-0.6µmol arasında değişen üre standart çözeltiler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 7).

ÜNİTE: 1mg proteinin 1 saatte oluşturduğu üre miktarının µmol cinsinden ifadesidir.

Ünite = µmol üre/ mg protein x saat olarak alınmıştır.



Şekil 7: TDMU Metodu için kalibrasyon eğrisi.

2. 3. 2. Protein Ölçümü:

Protein miktarı Biüret Yöntemi ile saptanmıştır (49).

Biüret Yöntemi: İki veya daha fazla peptid bağı içeren proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile erguvani (mor) renk verme esasına dayanır (49, 73).

2. 3. 2. 1. Kullanılan Ayraçlar:

1- **Biüret Ayırıcı:** 1.5g Bakır Sülfat (Mol. Ağ. 159.6g/mol) , 6g Sodyum- Potasyum Tartarat (Mol. Ağ. 282.23g/mol) 500ml distile suda çözülmüştür. Üzerine 300ml %10'luk (Ağırlık/ hacim) Sodyum Hidroksit ilave edilerek toplam hacim 800ml'e tamamlanmıştır.

2- **Protein standartı:** 2.5 mg BSA (Sığır Serum Albumini) / ml

2. 3. 2. 2. Deneyin Yapılışı:

	Örnek	Standart	Kör
Süpernatant (ml)	1	---	---
Protein Standartı (ml)	---	1	---
Distile su (ml)	---	---	1
Büret Ayıracı (ml)	4	4	4

Tüpler iyice karıştırılır ve 30 dakika oda ısısında tutularak absorbanslar köre karşı 540 nm'de okunur.

Hesaplanması:

$$\text{Protein Miktarı} = \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Standart Abs.}} \times 2.5$$

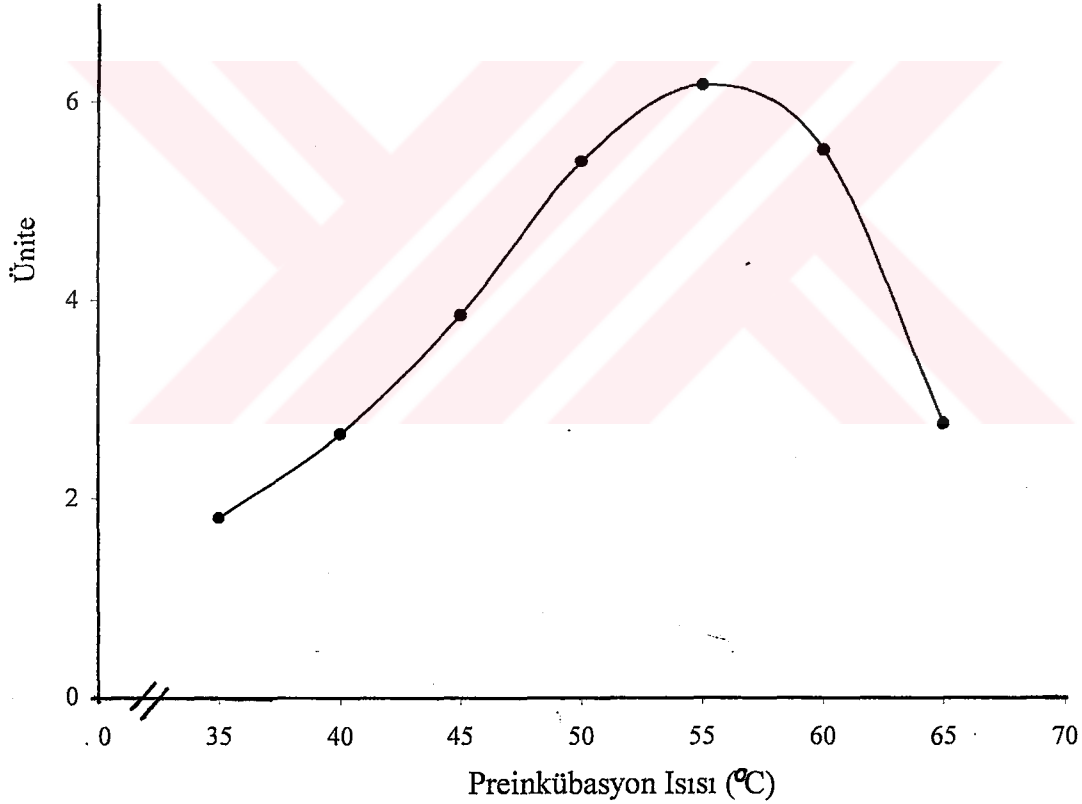


3. BULGULAR

Koyun meme dokusunda arginaz varlığının saptanmasından sonra enzimin kinetik özellikleri tespit edilmiştir. Deneyler en az üç kez tekrarlandıktan sonra bulgular açıklanmıştır:

3. 1. Preinkübasyon Isısının Tespiti:

Koyun meme doku arginaz enziminin aktivasyonu için gerekli şartlardan birisi preinkübasyon ısıdır. Arginaz üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır (Şekil 8). Mangan varlığında 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65°C'lerde preinkübasyon ısısına tabi tutulmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 50-55°C'ler arasında saptanmıştır. Bu nedenle enzimin aktivasyonu için preinkübasyon ısı 52°C olarak kabul edilmiştir.

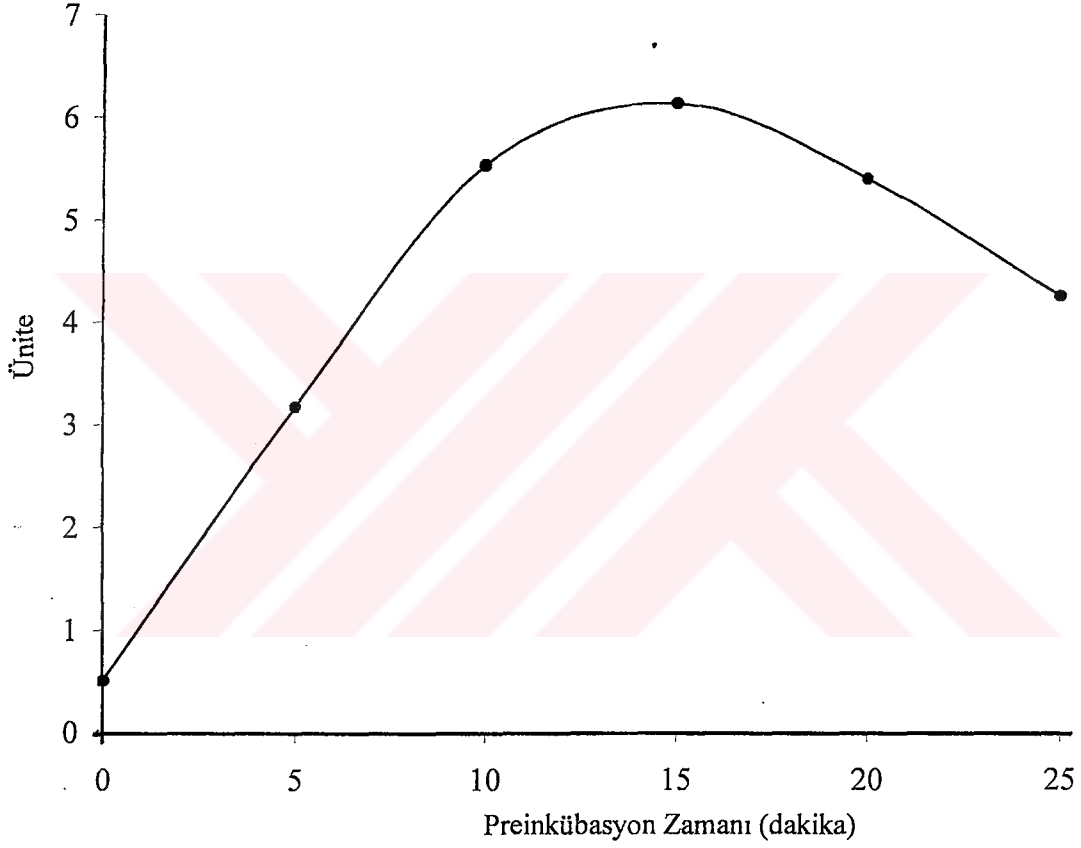


T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİYOLOJİK BİLİMLER MERKEZİ

Şekil 8: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.

3. 2. Preinkübasyon Zamanının Tespiti:

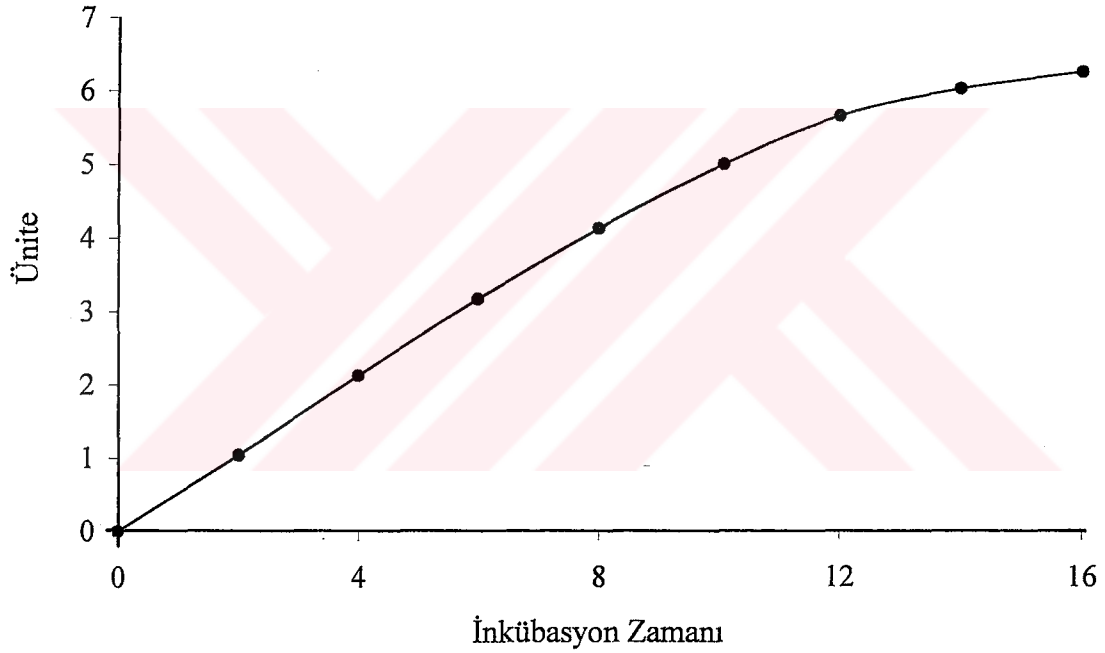
Koyun meme doku arginazının preinkübasyon zamanına bağılı olarak değişimini $MnCl_2$ varlığında ve $52^{\circ}C$ 'lik preinkübasyon ısısında 5- 25 dakikalık zaman aralıklarında incelendiğinde maksimum aktiviteye 12 ile 15. dakikaları arasında ulaşıldığı görülmüş ve preinkübasyon zamanı 12 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağılı Değişimi.

3. 3. İnkübasyon Zamanının Tespiti:

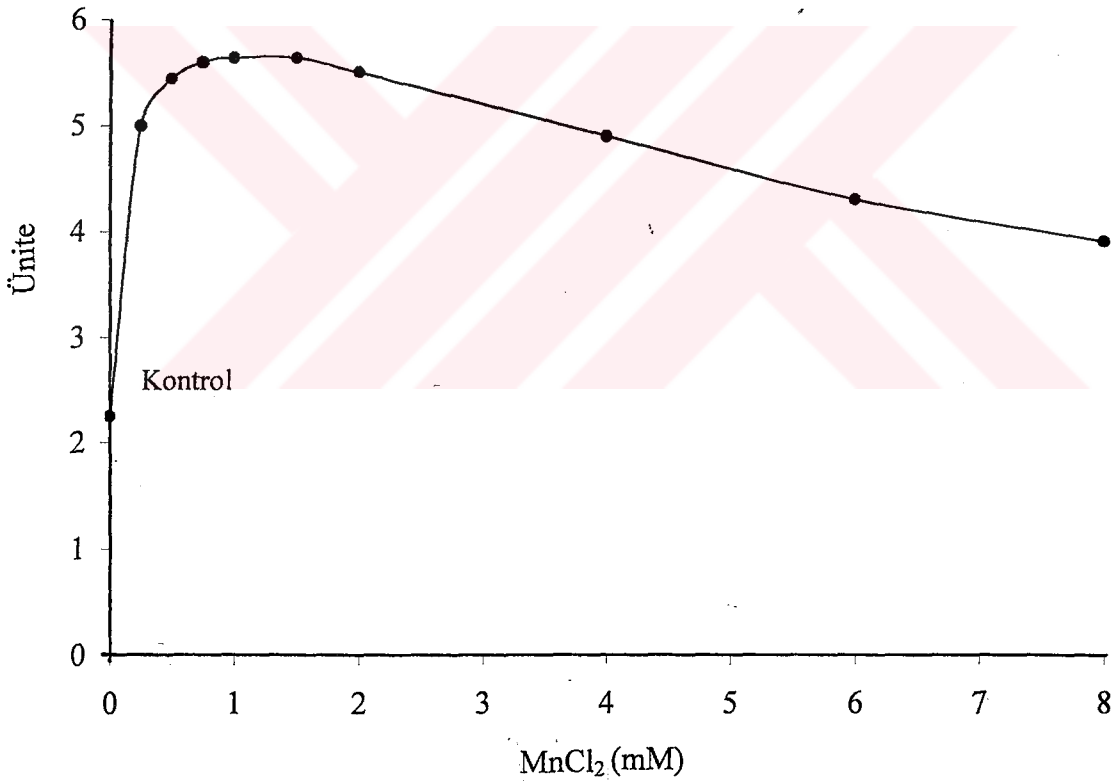
Koyun meme doku arginazı için en uygun inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynakları değişik zaman sürelerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu argininin hidrolizi izlemiştir. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürünün zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 10'da da görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 12. dakikaya kadar doğrusallığını koruyup bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için optimal inkübasyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 10: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

3. 4. Mangan İyonlarının Etkisi:

Mangan iyonlarının arginaz için gerekli olduğu anlaşıldıktan sonra değişik konsantrasyonlarda Mn^{++} iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Arginaz aktivitesi üzerine $MnCl_2$ 'ün 0-8mM arasında değişen konsantrasyonlarda, Mn^{++} iyonları ilave edilmiştir. Preinkübasyon ortamında Mn^{++} içermediği noktada enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonları ilave edildiğinde belirgin şekilde aktivite artışı gözlenmiştir. En yüksek aktivitenin alındığı konsantrasyon 0.5-1mM arasındadır. 1.5mM $MnCl_2$ konsantrasyonundan sonra aktivite düşmüştür (Şekil 11). Enzim 0.75mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi göstermesinden dolayı bu molarite enzim için en uygun $MnCl_2$ konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.



Şekil 11: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

3. 5. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi:

Metal iyonlarının etkisini araştırmak için; Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Ag^{+1} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} varlığında enzim aktivite düzeylerine bakılmıştır. Bu metal iyonları 0.75mM'lık konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir (Tablo 1). Mangan iyonlarının varlığında enzimin katalitik aktivitesinin çok yüksek olduğu fakat diğer metal iyonlarının varlığında ise enzimin katalitik aktivitesinin azaldığı saptanmıştır.

Tablo 1: Bazı Metal Tuzlarının Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

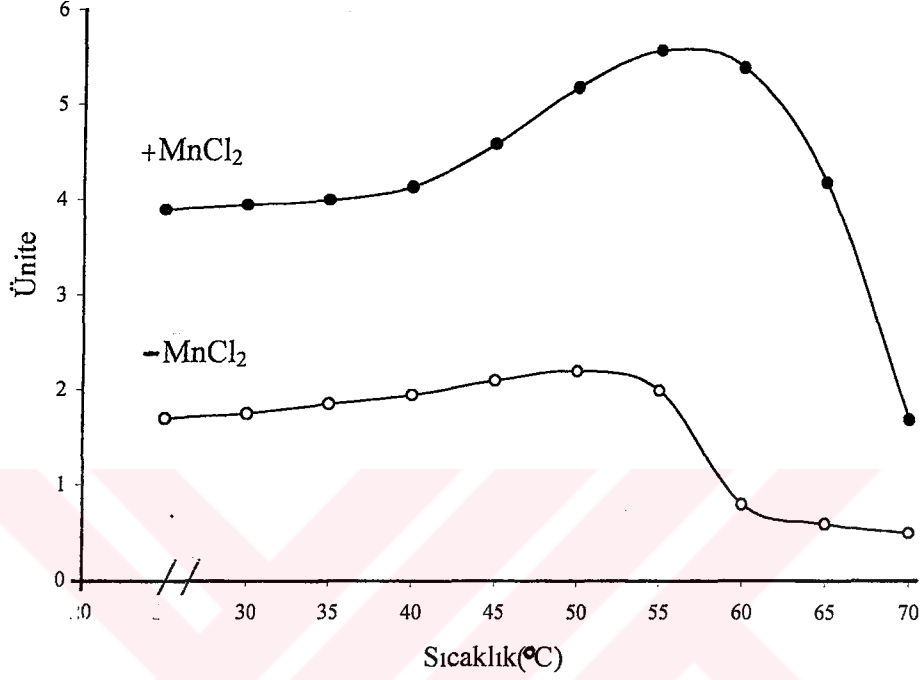
Metal iyonları	% Aktivite
Kontrol	100
$MnCl_2$	2060
$CdCl_2$	700
$NiSO_4$	556
$CaCl_2$	216
$MgCl_2$	164
$BaCl_2$	124
$CuSO_4$	116
$FeCl_3$	110
$HgCl_2$	100
$CoSO_4$	96
$ZnSO_4$	72
$AgNO_3$	44
$SnCl_2$	8
$Pb(NO_3)_2$	0
CrO_3	0

Enzim kaynağı olarak kullanılan kısım $MnCl_2$ 'süz preinkübe edilmiş aynı molariteyi sağlayacak miktardaki $MnCl_2$ enzimatik karışıma eklenmiştir.

3. 6. Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi:

Preinkübasyon ısısının Mn^{++} iyonlarının varlığına bağlı olup olmadığını tespit etmek için $MnCl_2$ 'lü ve $MnCl_2$ 'süz (distile su ile) arginaz aktivitesi preinkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçta; $MnCl_2$ varlığında uygulanan preinkübasyonla enzimin aktivitesinin,

çok daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. $MnCl_2$ 'süz preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından elde edilen aktivite ile $MnCl_2$ 'lü preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından elde edilen aktivitenin sadece 1/3 katı olduğu bulunmuştur (Şekil 12).

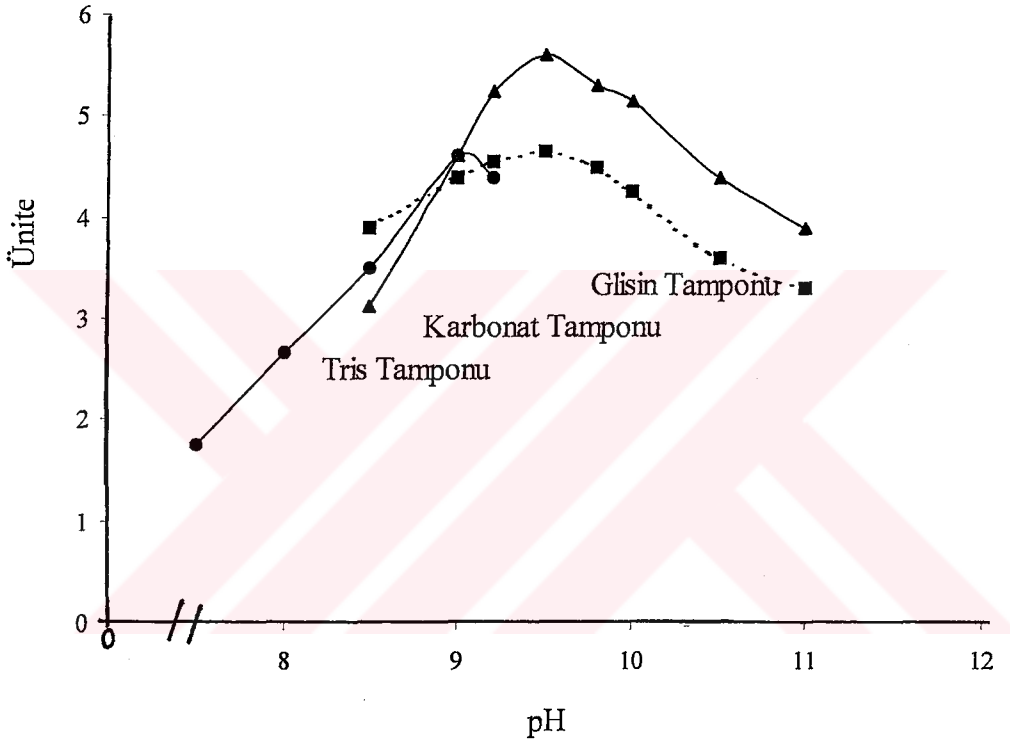


Şekil 12: Mangane İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

3. 7. Optimal pH'nın Tespiti:

Koyun meme doku arginazının optimal pH'sını tespit etmek için pH 7.5'dan pH 11'e kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan; pH 8.6-10.6 arasında aktivite gösteren Glisin-NaOH Tamponu, pH 7.1-8.9 arasında aktivite gösteren Tris-HCl Tamponu, 9.2-10.2 pH'larında aktivite gösteren Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponları kullanılmıştır. Bu tamponlar kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamının tespitine çalışılmıştır. Grafik tipik bir çan eğrisi (Bell shape) şeklindedir (Şekil 13). Karbonat tamponu, glisin tamponu ile pH 9.5'da örtüşme yapmaktadır. Karbonat tamponunun arginaz aktivitesi için spesifik bir tampon olması ve maliyetinin ucuz olması nedeni ile tercih edilmiştir. Enzim en yüksek aktiviteyi pH 9.5'da

vermiştir. Bu nedenle, pH 9.5'daki karbonat tamponu enzim aktivitesi için optimal pH olarak kabul edilmiştir.

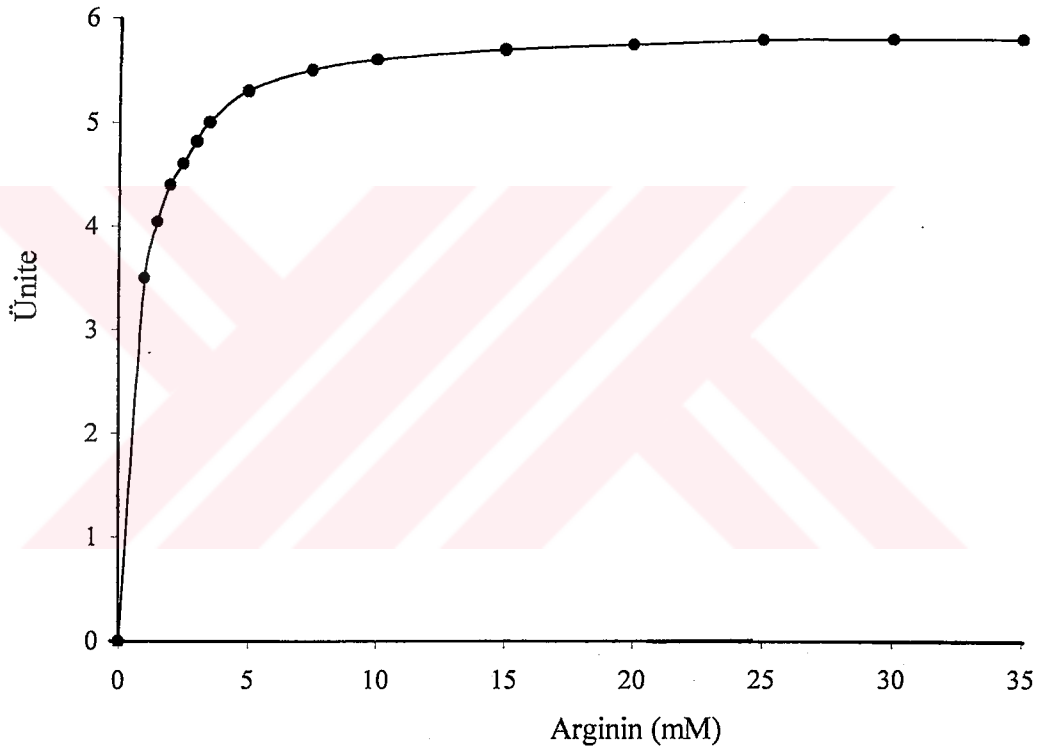


Şekil 13: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi İçin Optimal pH'nın Saptanması.

3. 8. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı

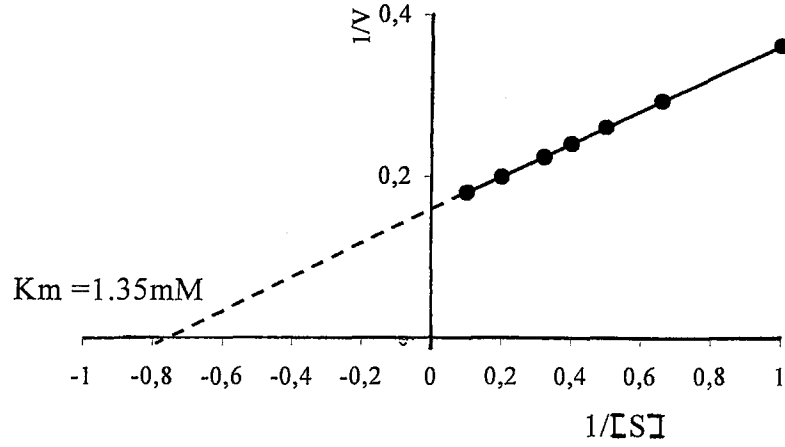
Değişimi:

Koyun meme doku arginazı için optimal şartlar belirlendikten sonra, arginazın substratı olan L-arginin 0-35mM'lık değişik konsantrasyonlarındaki V_o hızları Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir. L-arginin konsantrasyonu Şekil 14'de görüldüğü gibi , 0-35 mM arasında değişik konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Reaksiyon hızı 2 mM'a kadar lineerlik gösterirken (**I. Mertebe Kinetiği**), daha sonra yerini hiperbolik bir görünümüne (**Karışık Mertebe Kinetiği**) bırakmış, enzim 15mM'lık substrat konsantrasyonunda ise enzim sonra doygunluğa (**Sıfır Mertebe Kinetiği**) ulaşarak reaksiyon sabit hızla devam etmiştir.



Şekil 14: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

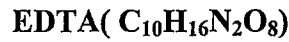
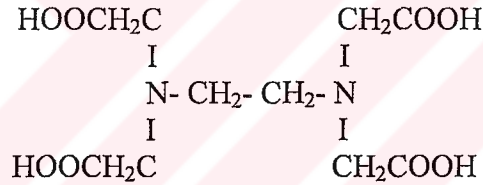
Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi Lineweaver-Burk Eğrisi'ne (Şekil 15) göre de değerlendirilmiştir. Koyun meme doku arginazının, L-arginine karşı K_m 'inin 1.35 mM civarında olduğu bulunmuştur.



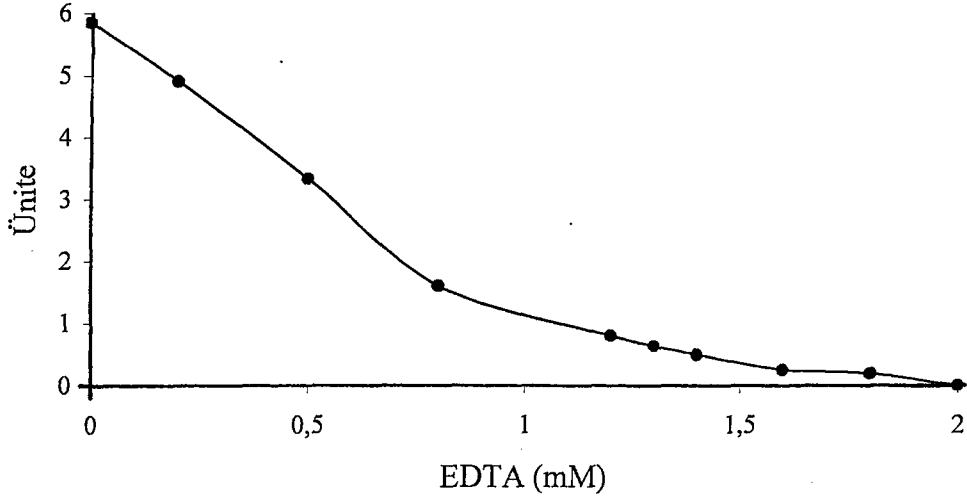
Şekil 15: Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.

3. 9. Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesine Etki Eden Bazı İnhibitörler:

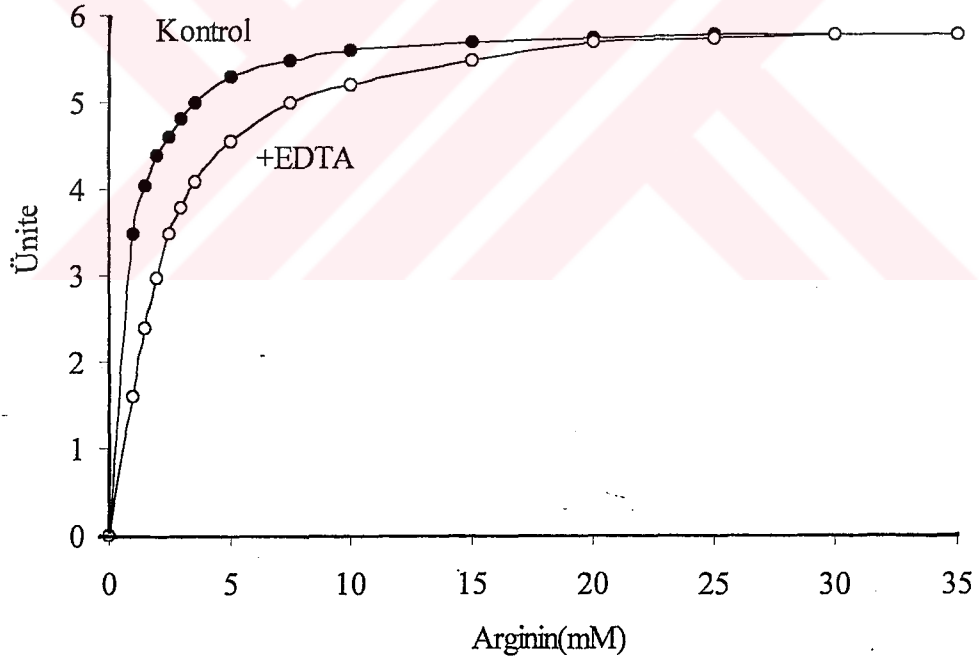
3. 9. 1. Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'in İnhibitör Etkisi:



Koyun meme doku arginaz enzimi üzerine EDTA'nın inhibisyon etkisi araştırılmış ve Şekil 16'de gösterilmiştir. İnkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonu sabit tutulup, preinkübasyon ortamına 0-2 mM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda EDTA ilave edilerek aktivite kaybı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. 0.5mM EDTA enzim aktivitesinin %44'ünü, 1 mM EDTA aktivitenin %80'nini, 2 mM ve üzerindeki EDTA konsantrasyonun ise aktivitenin %100'ünü kaybettiği görülmüştür.



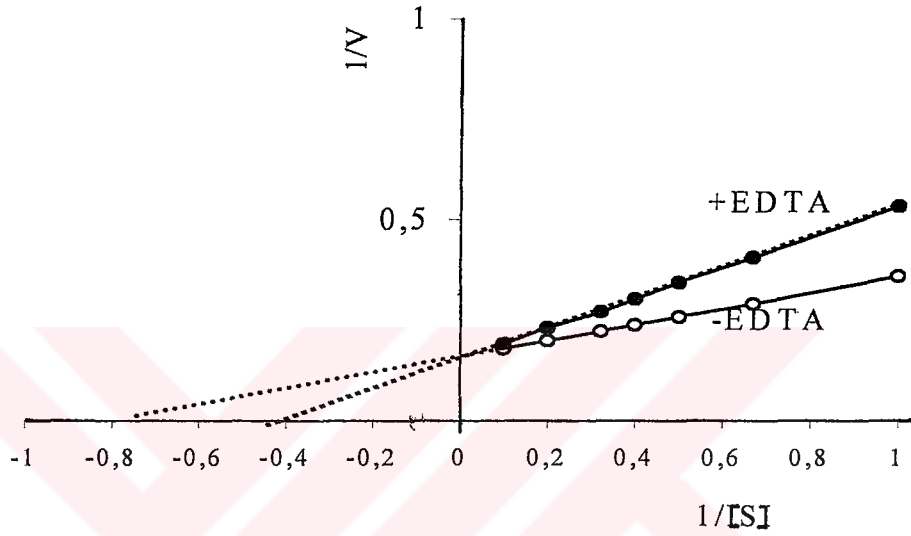
Şekil 16: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginazı Üzerine İnhibisyon Etkisi.



Şekil 17: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

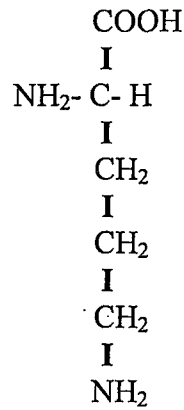
EDTA'in yaptığı inhibisyon tipini tespit etmek amacıyla 1,2 mM EDTA varlığında Michaelis- Menten ile gösterilmiştir. Şekil 17'de görüldüğü gibi koyun meme doku

arginazının V_{max} 'ının değişmediği, K_m 'inin değiştiği tespit edilmiştir. EDTA'nın, koyun meme doku arginazını kompetitif inhibitör etkisinde olduğu görölmüştür (şekil 18).



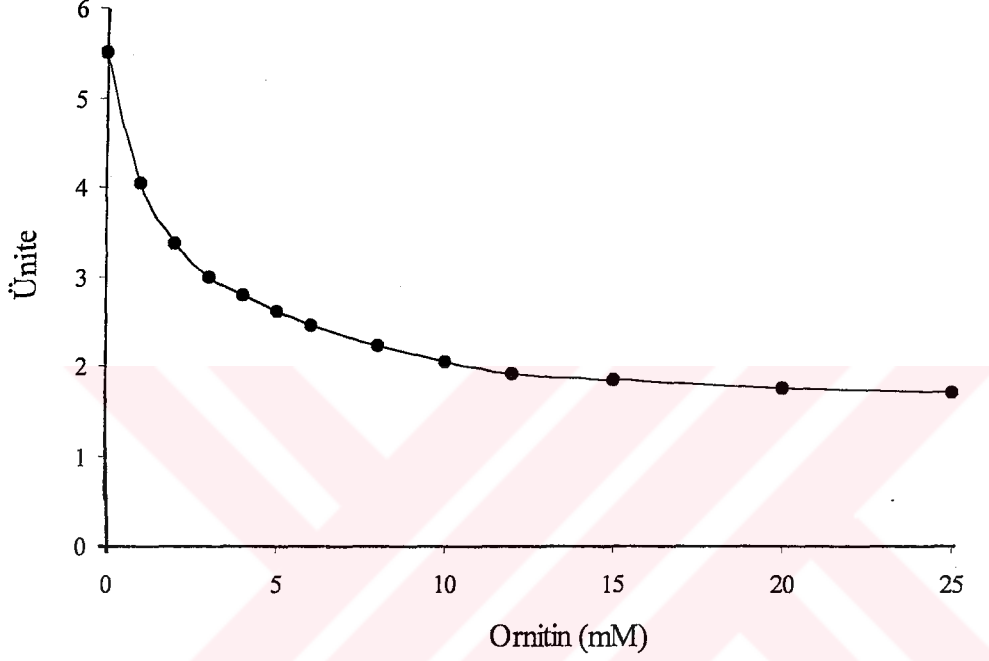
şekil 18: EDTA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver- Burk Grafiği ile Gösterilmesi.

3. 9. 2. L-Ornitinin İnhibitör Etkisi:



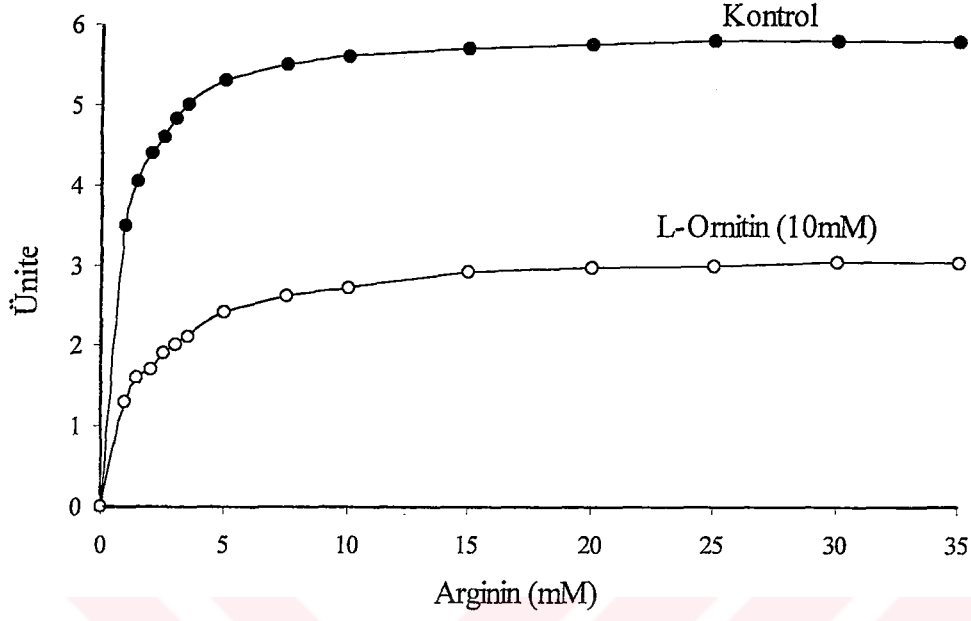
L-Ornitin: $(\text{NH}_2 \text{CH}_2 (\text{CH}_2)_2 \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})$

L-ornitin 0'dan 25mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda, koyun meme doku arginaz aktivitesi incelenmiştir. 2mM L-ornitin konsantrasyonunda enzim aktivitesi %38'i; 5mM'a ulaştığında arginaz aktivitesinin %53'ünü; bu oran 15mM ulaştığında ise aktivitenin %66'sını kaybettiği görülmüştür (Şekil 19).

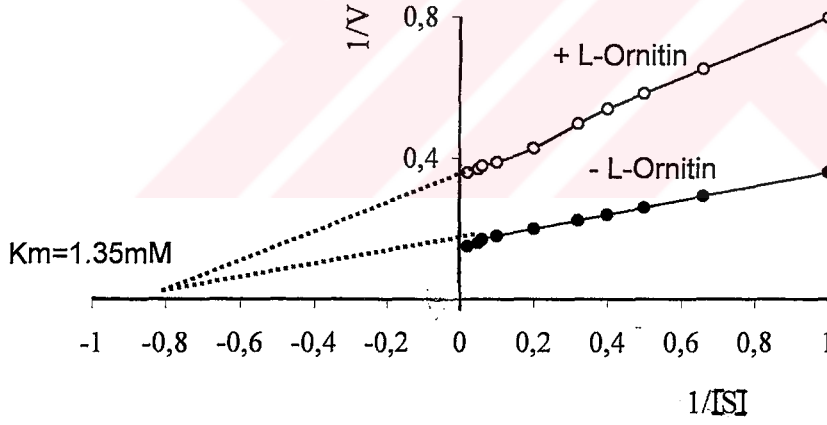


Şekil 19: L-Ornitinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.

L-ornitin koyun meme doku arginaz enzimi üzerine yaptığı inhibisyonun türünü belirlemek için 10 mM L-ornitin kullanılmıştır. Sonuçlar Michaelis- Menten grafiğine göre (Şekil 20) değerlendirilerek L-ornitin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Veriler Lineweaver- Burk (Şekil 21) eğrisi ile değerlendirilerek, Vmax değerinin değiştii, Km değerinin ise değişmediği saptanmıştır.

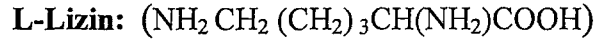
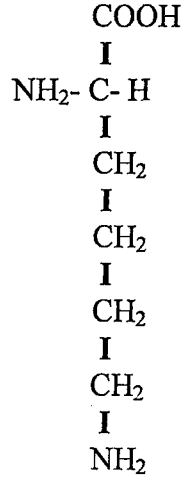


Şekil 20: L-Ornithinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

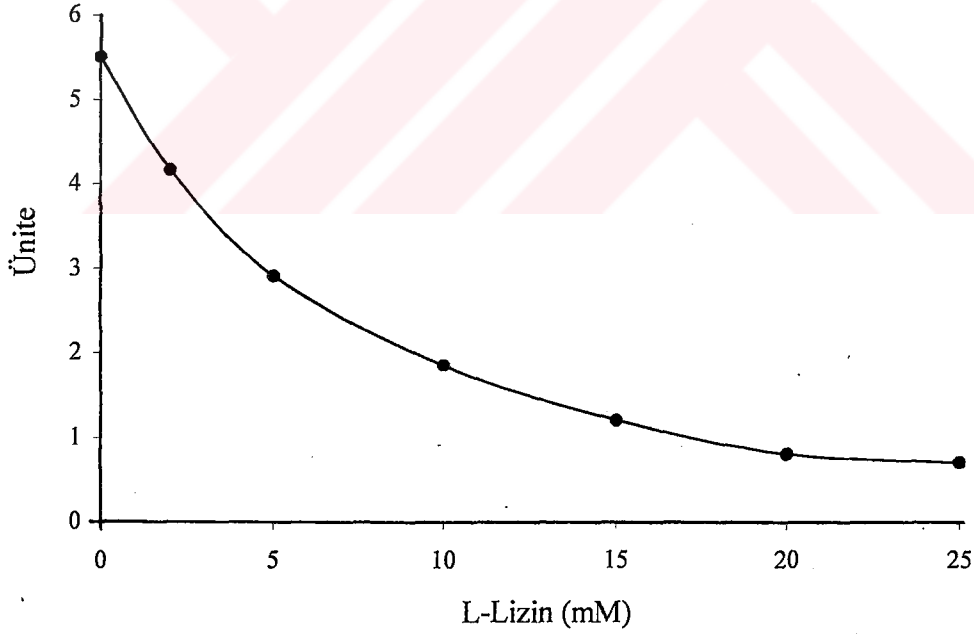


Şekil 21: L-Ornithinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver- Burk Grafiği İle Değerlendirilmesi.

3. 9. 3- L-Lizinin İnhibitör Etkisi:



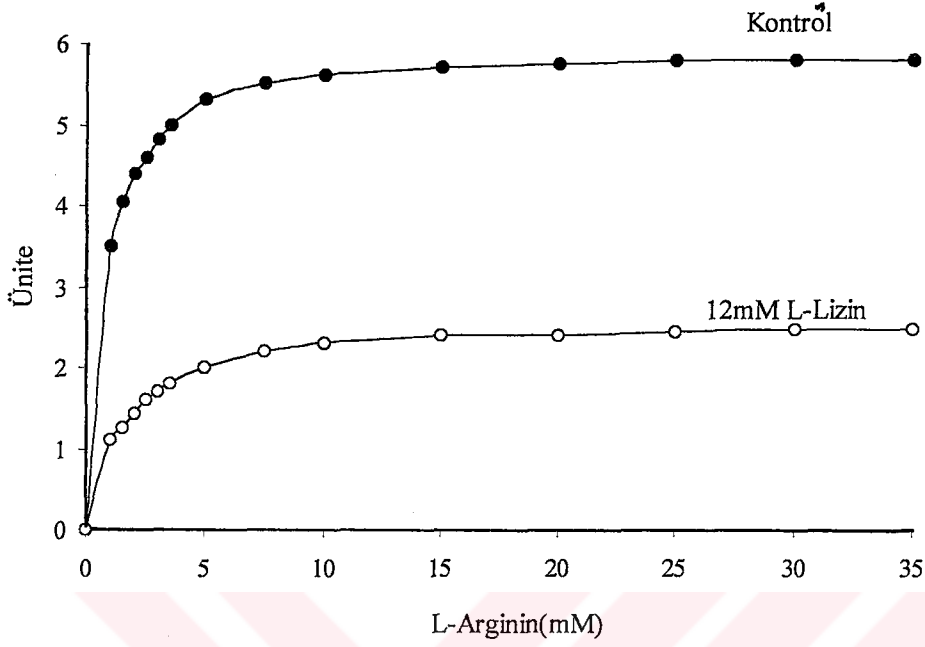
L-lizinin 25mM'a kadar farklı konsantrasyonlarda koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi incelendiğinde L-ornitinin inhibitör etkisine benzediği görülmüştür. Şekil 22'de görüldüğü gibi 5mM L-lizin konsantrasyonunda kullanıldığında enzimin %48 oranında aktivite kaybetmesine neden olmuştur. 15mM'a çıkarıldığında %79; 20 mM L-lizin kullanıldığında ise %86'lık bir aktivite kaybının olduğu görülmüştür.



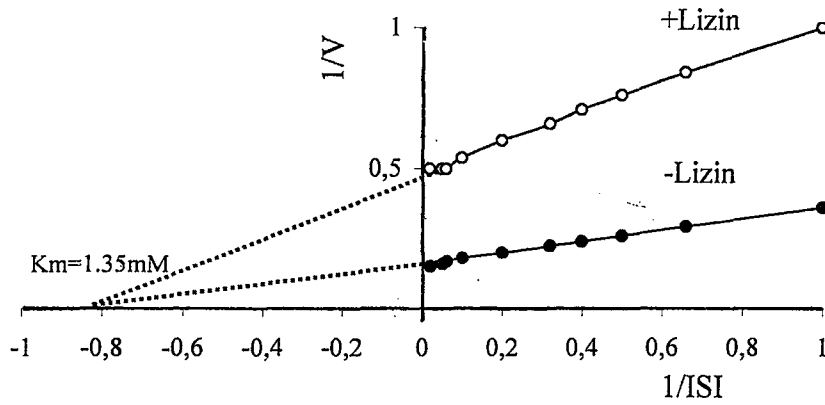
Şekil 22: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.

12 mM L-lizin varlığında ve L-argininin farklı konsantrasyonlarında koyun meme doku arginaz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon tipi belirlenmiştir. Veriler Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir (Şekil 23). Buna göre enzimin V_{max} 'ının değiştiği

Km'in ise değişmediği görülmüştür. Sonuçlar Lineweaver- Burk eğrisiyle (şekil 24) değerlendirildiğinde inhibisyonun nonkompetitif olduğu tespit edilmiştir.



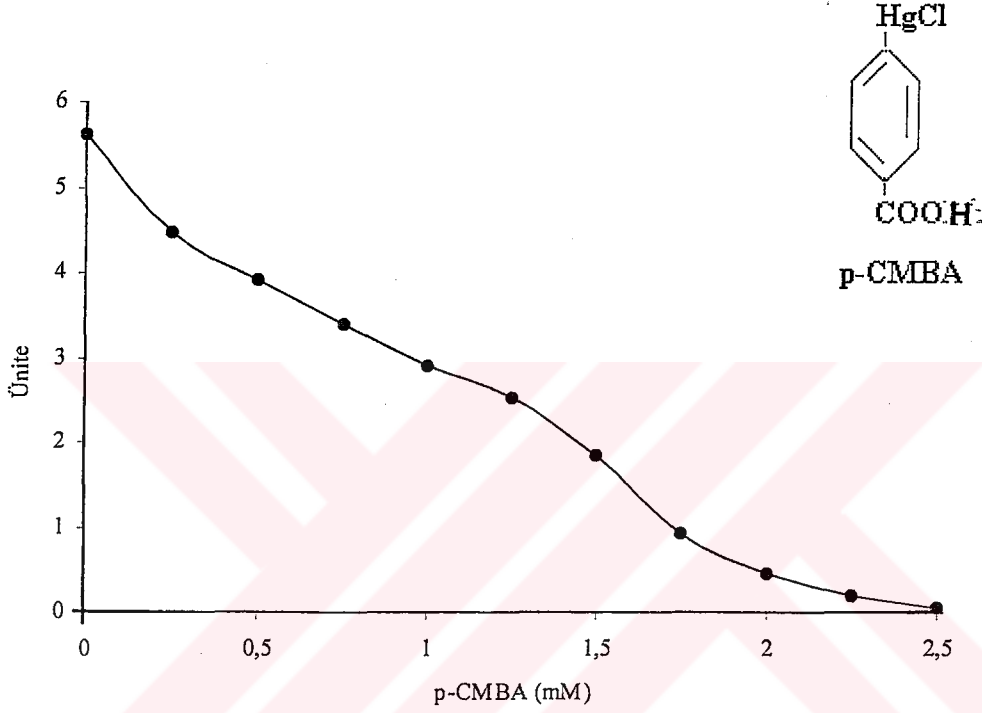
şekil 23: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi zerine Etkisi.



şekil 24: L-Lizinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi zerine Etkisinin Lineweaver- Burk Grafiği ile Değerlendirilmesi .

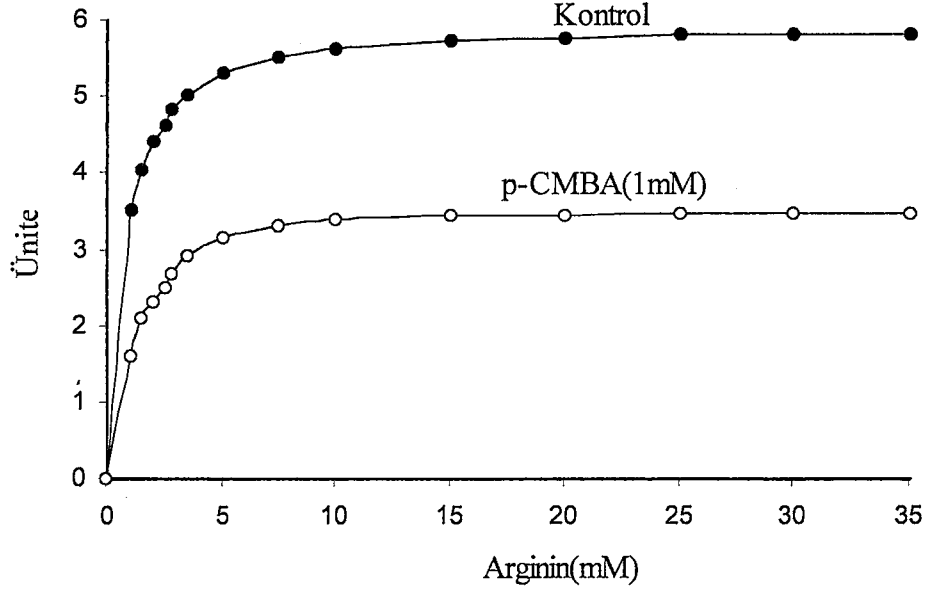
3. 9. 4. p- Kloromerküri Benzoik Asidin (p-CMBA) İnhibitör Etkisi:

p-CMBA, 0.25mM ile 2.5mM arasında değişen konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilerek enzim üzerine inhibitör etkisi incelenerek kontrole göre değerlendirilmiştir. 0.5mM p-CMBA konsantrasyonunda koyun meme doku arginazının %30, 1mM konsantrasyonda enzimin %49, 2mM konsantrasyonda enzim aktivitesinin %92'sini kaybederek bu oran. 2.5mM'a çıkarıldığında enzim aktivitesinin tamamen inhibe olduğu saptanmıştır (Şekil 25).

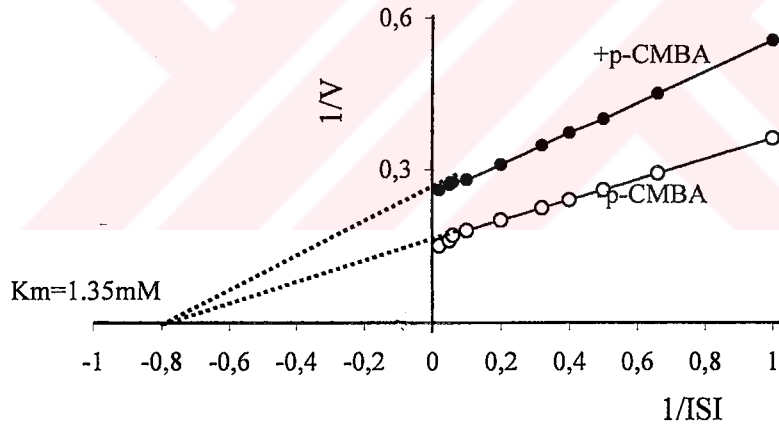


Şekil 25: p-CMBA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.

1mM p-CMBA varlığında ve inkübasyon ortamındaki arginin konsantrasyonlarını değiştirilerek, koyun meme doku arginaz aktivitesi ölçülüp inhibisyon etkisinin varlığı kontrole göre değerlendirilmiştir. Hem Michaelis- Menten (Şekil 26) eşitliği ile hem de Lineweaver- Burk (Şekil 27) eğrisi ile değerlendirilmesi sonucu , p-CMBA'nın Vmax'ı değiştirip Km değiştirmediği görülmüştür.



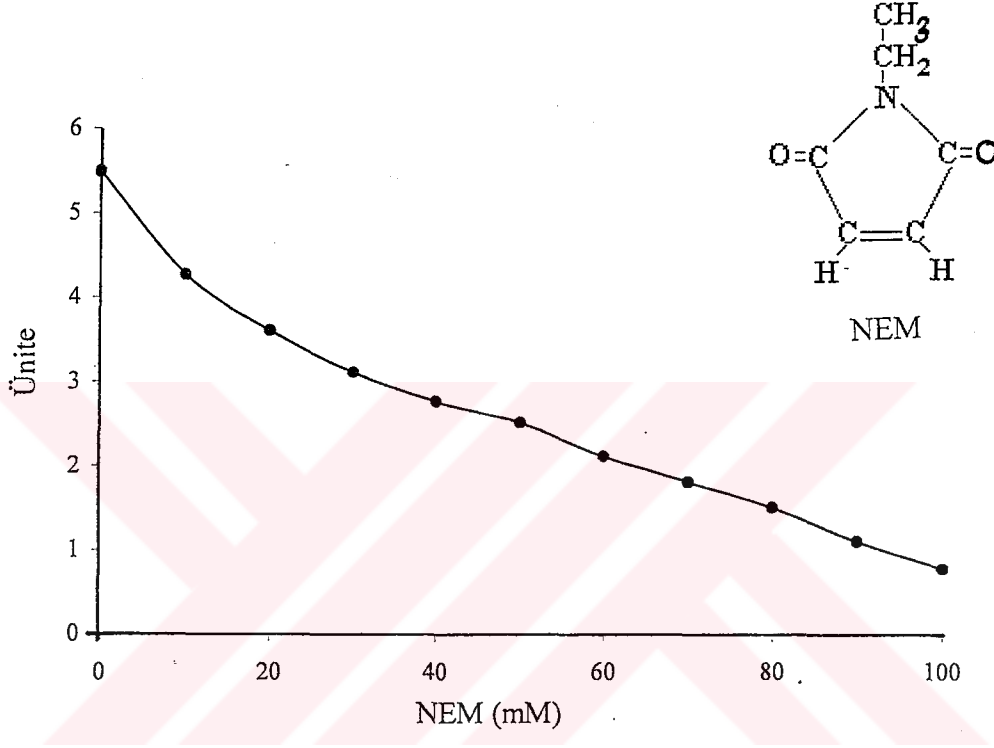
Şekil 26: p-CMBA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 27: p-CMBA'nın Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver- Burk Grafiği İle Değerlendirilmesi

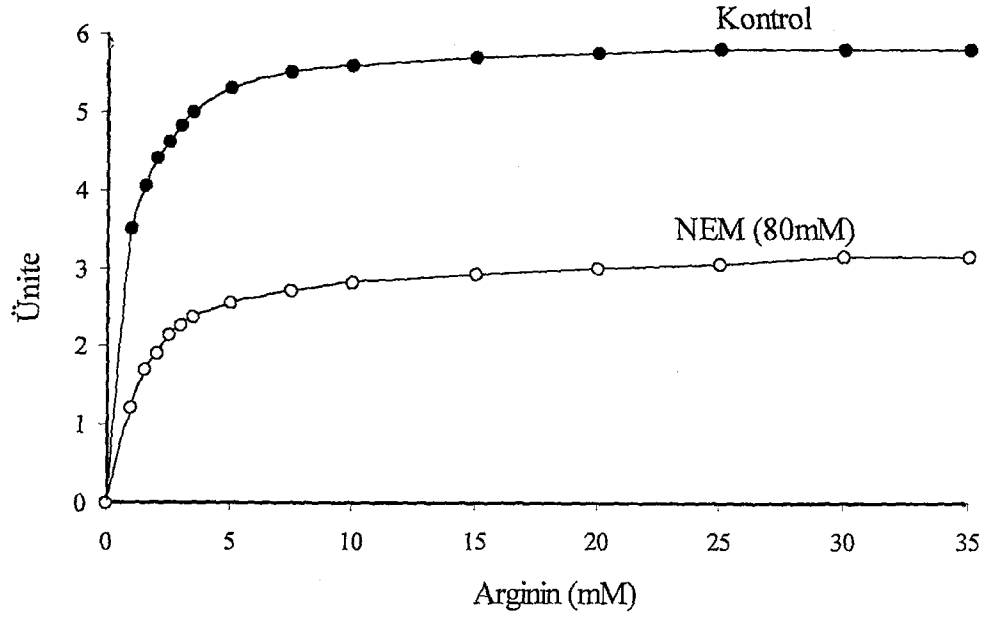
3. 9. 5. N- Etil Maleimitin (NEM) İnhibitör Etkisi:

Değişik NEM konsantrasyonlarının varlığında arginaz enziminin aktivitesi incelenmiştir. 10mM-100mM arasında değişen NEM konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. 10mM'da enzimi % 23 dolaylarında inhibisyona uğrattığı, 50mM'da %55, 100mM NEM konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin %86'sını kayba uğrattığı gözlenmiştir (Şekil 28).

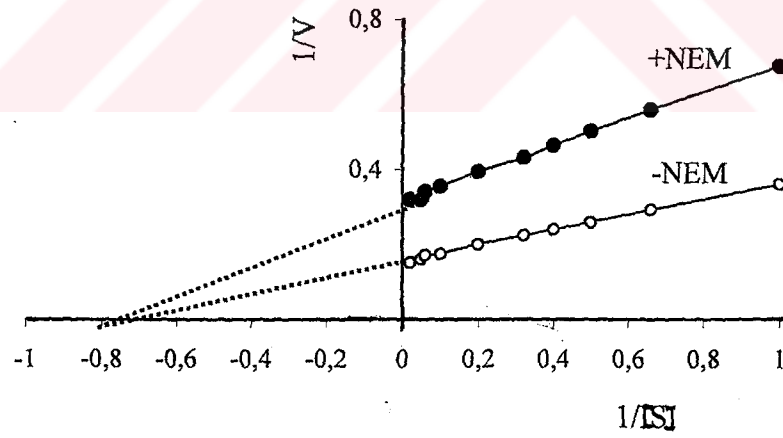


Şekil 28: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.

Farklı arginin konsantrasyonunda ve 80mM NEM varlığında koyun meme doku arginaz aktivitesi bulunarak kontrole göre değerlendirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde Michaelis- Menten (Şekil 29) ve Lineweaver- Burk (Şekil 30) eğrisi kullanılmıştır. Her iki grafiğin değerlendirmesinde, Vmax'larının değiştiği Km'lerinin ise değişmediği görülmüştür. NEM koyun meme doku arginaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe etmektedir.



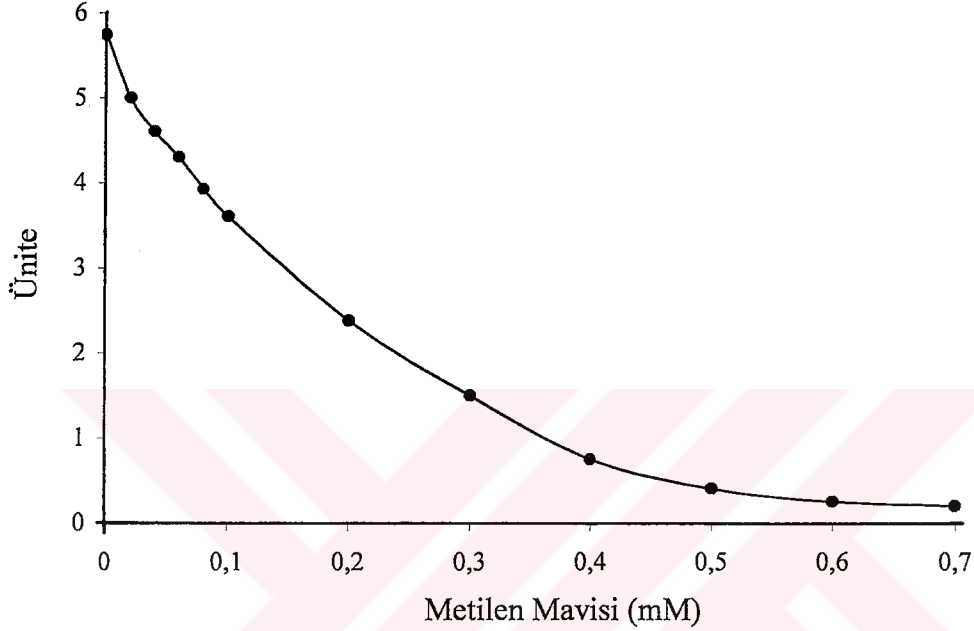
Şekil 29: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 30: NEM'in Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Gösterilmesi

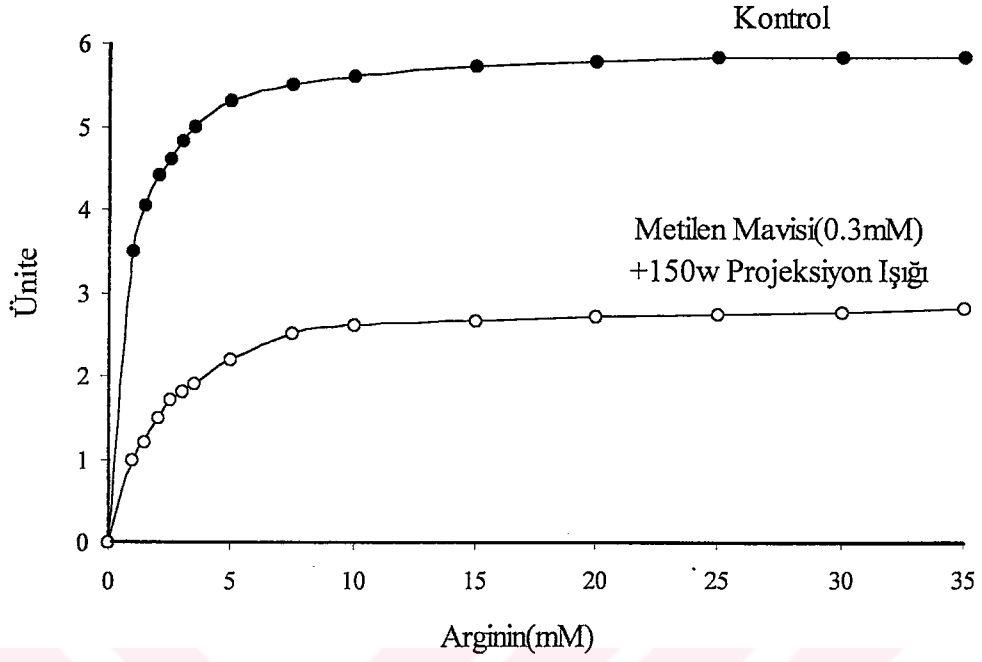
3. 9. 6. Metilen Mavisinin Fotoinaktivasyon Etkisi:

Değişik metilen mavisi konsantrasyonlarında 150 watt'lık projeksiyon ışığı altında koyun meme doku arginazının fotoinaktivasyonu incelenmiştir. 0.3mM konsantrasyonunda %74, 0.7mM konsantrasyonunda ise enzim %96 oranında aktivite kaybettiği gözlenmiştir (Şekil 31).

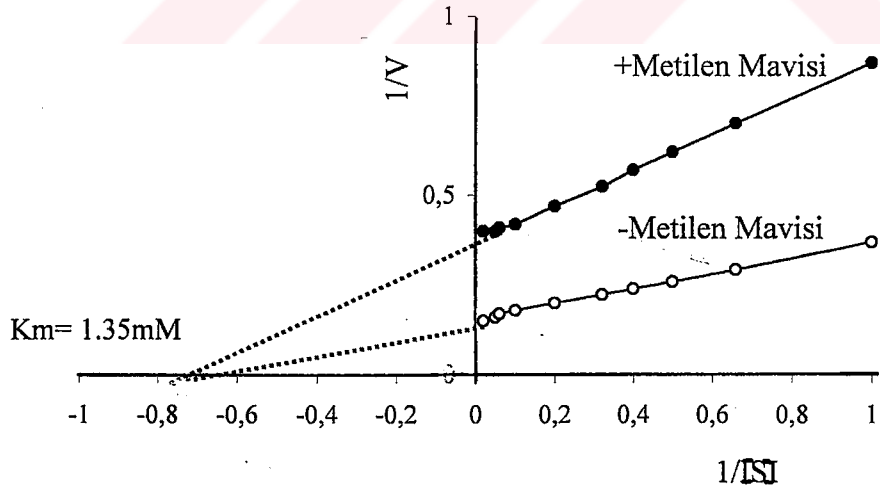


Şekil 31: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi.

Metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon tipini belirlemek için farklı arginin konsantrasyonlarında, 0.3mM metilen mavisi kullanılarak inhibisyon tipi tespit edilmiştir. Veriler kontrolle karşılaştırılarak V_{max} değerinin değiştiği K_m değerinin ise değişmediği bulunmuştur. Metilen mavisinin enzimi nonkompetatif inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 32, 33).



Şekil 32: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 33: Metilen Mavisinin Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Metilen mavisinin, koyun meme doku arginaz aktivitesine etkisi oda ışığı, karanlıkta ve 150w'lık ışık altındaki etkisi araştırılarak kontrole göre değerlendirilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi inhibisyonun oda ışığında %76; karanlıkta %63; 150w ışıkta ise %66 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2: Metilen Mavisinin Farklı Ortamlarda Koyun Meme Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi.

KOŞULLAR	AKTİVİTE %	
	Kontrol	+Metilen Mavisi
Oda Işığı	100	76
Karanlık	100	63
150w Işık	100	66

% 0.1mM metilen mavisi ve $MnCl_2$ 'ün, I. ve II. preinkübasyon şartlarının uygulanmasıyla (Tablo 3) sonuçlar değerlendirilmiştir:

I. preinkübasyona sadece $MnCl_2$ 'ün konulmasıyla yapılan çalışmayı kontrol kabul edip diğer çalışmalar bu kontrole göre kıyaslanmıştır (A).

Hem $MnCl_2$ ve hem de %0.1 metilen mavisinin I. preinkübasyon 150w ışık altında yapılan çalışmayla koyun meme doku arginaz aktivitesini %59 inhibe ettiği bulunmuştur (B).

150w ışık altında I.preinkübasyonda %0.1 metilen mavisi, II. preinkübasyonda ise $MnCl_2$ eklendiğinde koyun meme doku arginaz aktivitesini %66'ını inhibe ettiği saptanmıştır (C).

150w ışık altında I. preinkübasyonda $MnCl_2$, II. preinkübasyonda ise %0.1 metilen mavisi eklendiğinde koyun meme doku arginaz aktivitesini %86'sını inhibe ettiği görülmüştür (D).

Tablo 3: Mangan, Metilen Mavisi ve Işığın Koyun Meme Doku Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkisi.

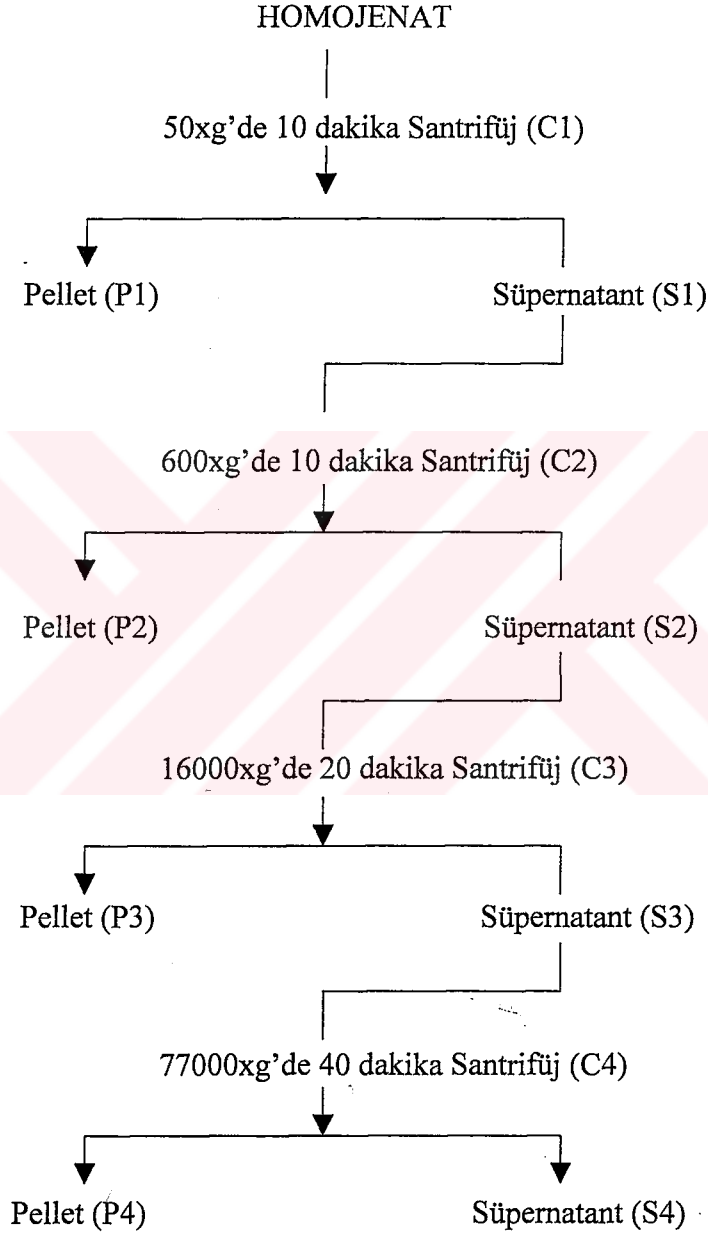
					IŞIKLANDIRMA		Kalan % Aktivite
	MnCl ₂	%0.1 Metilen Mavisi	%0.1 Metilen Mavisi	MnCl ₂	150w Işık	Oda Işığı	
A	+	-	-	-	-	+	100
B	+	+	-	-	+	-	41
C	-	+	-	+	+	-	34
D	+	-	+	-	+	-	14
	I. Preinkübasyon		II. Preinkübasyon				

3. 10. Koyun Meme Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi:

Koyun meme doku arginazının hücre içindeki yerinin saptanması için 4g doku alınıp 0.25M'lık süktroz çözeltisinde Potter-elvenjem cam-teflon homojenizatörü ile parçalanmış ve süktroz çözeltisi ile 20ml'e tamamlanarak 1 x 5 oranında sulandırılarak (Ağırlık / Hacim) homojenat elde edilmiştir. Bu homojenattan 4ml ayırarak arginaz düzeyine bakılmıştır. Daha sonra homojenattan 1ml alınıp 7ml 0.5mM'lık MnCl₂'lü süktroz çözeltisi hazırlanarak 1 x 40 dilüsyon yapılmıştır. Geri kalan 17ml'lik bölüm 600xg'de 10 dakika +4°C'de santrifügasyon işlemine sokulmuştur. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmış ve süktroz çözeltisi ile toplam hacim 17ml'ye tamamlanmıştır. Böylece elde edilen pellette(çöküntü) ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılmıştır. 17ml'ye tamamlanan çözelti 600xg'lik süpernatanttan alınan 10ml'lik bölüm tekrar 16000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve iki bölüme ayrılmıştır. Süpernatant ve pellet süktroz çözeltisi ile ayrı ayrı 11ml'ye tamamlanmıştır. Çeşitli hücresel kısımdan oluşan bu fraksiyonlar 52°C'de 10 dakika preinkübasyona tabi tutulduktan sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Tablo 4'de görüldüğü gibi en yüksek arginaz aktivitesi 16000xg'de elde edilmiş ve bu da enzimin hücrenin çekirdeğinde lokalize olduğunu göstermiştir. 50xg'deki santrifügasyon işlemi sonunda hemen hemen homojenattaki aktivitenin aynısı elde edilmiştir. 600xg süpernatantı 16000xg'de santrifüj edildiğinde pellette toplam aktivitenin yaklaşık %50 bulunduğu gözlenmiştir. 16000xg pelleti mitokondriaları kapsamaktadır. 600xg

süpernatantı da toplam aktivitenin %25'inin bulunmasının nedeni 3 ihtimali kapsamaktadır:

- 1- Çekirdeksel kısımlar tam çökmemiştir.
- 2- Santrifügasyon sırasında çekirdekler parçalanmış ve enzim sitoplazmik fraksiyona geçmiştir.
- 3- Arginazın bir izoenzimi bulunabilir.



Şekil 34: Diferansiyel Santrifügasyon Yöntemi (17).

Tablo 4'deki sonuçlar Şekil 34'e göre uygulanmıştır. Tabloda enzim her ne kadar hücre çekirdeğine bağlı ise de eğer homojenizasyon iyonik bir çözeltide yapıp iyonik güç artırılırsa enzimin çekirdeksel kısmından sitoplazmanın çözünen kısmına kolayca geçtiği görülür. 0.16M'lık KCl çözeltisi ile yapılan homojenizasyon işleminden sonra arginaz aktivitesinin hücre içi dağılımı incelendiği zaman görülmüştür ki Tablo 4'deki sonuçların aksine iyonik gücün artması ile 16000xg'deki pelleti yerine süpernatant fraksiyonu daha çok arginaz aktivitesi içermektedir. Aynı zamanda 0.16M'lık KCl çözeltisiyle yapılan bu deneyler sonunda enzimin hücre çekirdeğinde lokalize olduğu bir kez daha gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Santrifügasyon Yöntemiyle Koyun Meme Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi.

No	Devir	Enzim Kaynağı	ÜNİTE (0.25M Sükroz'lu)	ÜNİTE (0.16M KCl'li)
A	—	Homojenat	5.4	4.6
B	50xg	Süpernatant	4.5	3.8
C	600xg	Pellet	0.4	0.5
D	600xg	Süpernatant	1.6	1.3
E	16000xg	Pellet	0.3	0.4
F	16000xg	Süpernatant	3.6	2.0
H	77000xg	Süpernatant	1.1	1.4

4. TARTIŞMA

Yapılan literatür tarama sonucunda koyun meme doku arginaz enziminin kinetik özelliklerine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, çalışmada laktasyondaki koyun meme doku arginaz enziminin bazı kinetik özellikleri incelenmiş ve tartışılmıştır.

Arginaz enziminin esas yerinin karaciğer olduğu bilinmektedir. Karaciğer dışındaki organların çoğunda arginaz enzim aktivitesine rastlanmıştır. Bu durum enzimin üre döngüsü dışında farklı fonksiyonlar yaptığını açıklamaktadır.

Laktasyondaki koyun meme doku arginazının preinkübasyon ısısını belirlemek için farklı ısılar kullanılarak (35-65°C) uygun ısı araştırılmış ve optimal preinkübasyon ısısı 52°C olarak bulunmuştur (Şekil 8). Enzim aktivitesi 55°C'ye kadar en yüksek düzeye ulaşmış, 55°C'den sonra aktivitenin düştüğü görülmüştür. Arginaz ölçümlerinde kullanılan bütün metodlar preinkübasyonu önermektedir (22, 41, 42, 99). Enzimlerin yapısı protein olduğu için yüksek ısıya dayanıklı değildirler. Aktivite gösterdiği optimal ısının üstüne çıkıldığı zaman enzim aktivitesi düşer.

Preinkübasyon ancak Mn^{+2} iyonlarının varlığında gerçekleştirir. Mangan iyonunun enzim ile substrat arasında bir metal köprü kurduğu ve enzim- Mn^{+2} - arginin kompleksinin meydana gelmesinde aktivasyonun etkili olduğu bildirilmiştir (109). Mohammed ve Greenberg (84) ise preinkübasyon sırasında $MnCl_2$ 'ün arginaza bağlanarak enzimin aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığını açıklamışlardır.

Preinkübasyonun ve $MnCl_2$ 'ün enzim aktivasyonuna olan etkisini değişik şekillerde açıklayanlar vardır. Farklı dokularda ve farklı türlerde optimal preinkübasyon ısılarının değişiklik gösterdiği bulunmuştur. İnsan tiroid dokusu (64), uterus (56), eritrosit (32, 56), sığır karaciğer (121) arginazı ; saflaştırılmadan önceki ve sonraki sığır rumen doku (42) arginazı; koyun vitreus (55) arginazı için optimal preinkübasyon ısılarının farklılık gösterdiği bulunmuştur.

Laktasyondaki koyun meme doku arginaz enziminin uygun preinkübasyon zamanını tespit etmek için 0 ile 25 dakika arasında değişen sürelerde preinkübe edilmiştir. Enzim aktivitesi Şekil 9'da görüldüğü gibi 15 dakikaya kadar arttığı 15 dakikadan sonra enzim aktivitesinin düştüğü bulunmuştur. Koyun meme doku arginaz enziminin 52 °C'de 15. dakikadan sonra inhibe olduğu görülmüştür. Optimal preinkübasyon süresi ise 12 dakika olarak tespit edilmiştir.

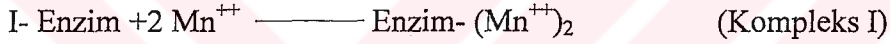
Colombo ve Konarska (32), 55°C'de 20 dakikalık bir preinkübasyonla karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat, eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat arttığını bulmuşlardır.

Schimke (121), sıçan karaciğer arginaz aktivitesi için preinkübasyon ısısını 55 °C zamanın ise 5 dakika olarak tespit etmiştir. Ozan ve Gülen (95), sığır tükürük arginaz enziminin aktivasyonu için preinkübasyon işleminin ve Mn^{+2} iyonlarının gerekliliğini ortaya koymuşlardır.

Arginaz enziminin ihtiyaç duyduğu kofaktörler genellikle iki değerlikli metal iyonlarıdır. Özellikle bu iki değerlikli metal iyonlarından Mn^{+2} iyonu enzimi en iyi aktive eden metaldir. Yaptığımız çalışmada laktasyondaki meme doku arginaz enzimine spesifik metal iyonu olan Mn^{+2} konsantrasyonu tespit edilmiştir.

Koyun meme doku arginaz enzimi en yüksek aktiviteyi 0.75mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda göstermiştir (Şekil 11). 1.5mM'dan sonra enzim aktivitesi düşmektedir. Aktivitenin $MnCl_2$ ve preinkübasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Rather (114), arginazın Mn^{+2} iyonuyla aktivasyonunu değişik bir yaklaşımla açıklamıştır. Sıçan ve sığır arginazları dört alt birimden meydana gelmiş olup her bir alt birime bir Mn^{+2} iyonu bağlanmıştır.



Kompleks I, Kompleks II'ye oranla %50 daha az aktiftir. Kompleks I'in Kompleks II'ye dönüşüm basamağı belkide tepkime hızının kontrol edildiği basamaktır. Preinkübasyon bu basamak için gerekli olan ısı ve zamanı sağlamıştır.

Enzim- Mn^{+2} - Arginin kompleksinin oluşmasında, enzimi aktive eden Mn^{+2} iyonları enzim- substrat arasında bir köprü oluşturmuştur (32, 115).

Bazı dokular için bulunan $MnCl_2$ konsantrasyonu; insan karaciğer dokusu ve eritrosit (56) ile tiroid dokusu için (64) 2.5mM; uterus dokusu için 0.8mM (56); sığır rumen dokusu için saflaştırılmadan önce 1mM, saflaştırıldıktan sonra ise 2mM (42); koyun gözü vitreusu için 5mM (55); M. benedeni arginazı için 0.5mM (103) olarak tespit edilmiştir. Mn^{++} katyonları arginaz aktivitesi için gerekli bir kofaktördür. Mn^{++} katyonları olmadan enzim tam aktivite gösteremez. Her doku için ayrı ayrı konsantrasyonlarda $MnCl_2$ kullanılır.

Rat karaciğer arginazı üzerine yapılan bir çalışmada (15), diyetteki Mn^{++} yetersizliği araştırılmış, karaciğer arginaz aktivitesinin Mn^{++} yetersizliğinde düşük olduğu saptanmış; plazma amonyak düzeyinin de yüksek olduğu görülmüştür. Streptozotosin ile oluşturulan diabetik ratlara Mn^{+2} enjekte edildiğinde arginaz aktivitesinin yükseldiği açıklanmıştır (13).

En iyi şekilde karakterize olan saflaştırılmış rat karaciğer arginazının (30800 Dalton molekül ağırlığında ve 4 subüniteden oluşan) dört Mangan iyonununa ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir (8). Carvajal ve ark. (26), insan karaciğer arginazı üzerinde yaptıkları bir

çalışmada, esas rolü metal iyonlarının oynadığı ve bu metallere de en önemlisinin Mn^{+2} iyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada (25), boratın insan karaciğer arginazını kısmi olarak inhibe ettiği, bunun nedeni de boratın tetrahedral yapısından ve Mn^{+2} iyonlarının enzime gevşek bağlanmasından kaynaklanabileceğini açıklamışlardır.

Çalışmamızda, preinkübasyon ısısının Mn^{+2} iyonu ile ilgili olup olmadığı araştırılmış ve Mn^{+2} iyonlarının preinkübasyon için gerekli olduğu saptanmıştır. Preinkübasyon ortamına Mn^{+2} iyonları ilave edilerek yapılan çalışmanın ilave edilmeden yapılan çalışmadan daha yüksek aktivite verdiği görülmüştür. Mn^{+2} iyonunun aktiviteyi yaklaşık 3 kat arttırdığı da tespit edilmiştir (Şekil 12). Mangan iyonu ilave edilmeden preinkübe edilen enzim kaynağı $55^{\circ}C$ 'ye kadar çok az aktivite gösterdiği, $55^{\circ}C$ 'den sonra düşmeye başladığı, $70^{\circ}C$ de ise enzim aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır. Oysa Mn^{+2} iyonu ilave edilen çalışmada $55^{\circ}C$ 'ye kadar bariz bir artış görülmüş, $55^{\circ}C$ 'den sonra ise düşüş gözlenmiştir.

Mangan iyonu varlığında preinkübasyonla enzim aktivitesinin önemli bir şekilde değiştiği saptanmış ve enzim aktivitesini stabilize ettiği ortaya konulmuştur (119).

İnkübasyon ısısının ne kadar zamanda enzimi aktive ettiğini bulmak için 0- 25 dakikaları arasında değişen süreler alınarak uygun olan zaman tespit edilmiş ve bunun 15 dakika olduğu bulunmuştur. 15. dakikadan sonra ise hiperbolik görünüm aldığı Şekil 10'da gösterilmiştir.

Farklı inkübasyon süreleri tespit edilmiştir. Uterus için 20 dakika (56); vitreus için 9 dakika (55); eritrosit için 8 dakika (56, 126); tiroid için 30 dakika (64); rumen için 13 dakika (41) olarak bulunmuştur. Araştırmacılar inkübasyon süresine göre ünite tanımı yaptıkları için farklı süreleri kullanarak aktiviteyi buna göre tanımlamışlardır.

Farklı organ ve türlerde yapılan birçok çalışmada arginaz için optimal pH'nın 9-11 arasında değiştiği saptanmıştır (32, 41, 74, 121, 128). Bu nedenle, çalışmamızda farklı tamponlar kullanılarak enzim için en yüksek aktiviteyi veren pH tespit edilmiştir. Tris- HCl, Glisin- NaOH ve $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 tamponları kullanılarak, Şekil 13'de de görüldüğü gibi en uygun tamponun $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 tamponu olduğu ve bu tamponun en yüksek aktivite verdiği pH'nın da 9.5 olduğu saptanmıştır. Diğer tamponların karbonat tamponununa göre daha az aktivite gösterdiği ve daha dayanıksız olduğu görülmüştür.

Colombo ve Konarska (32) hem karaciğer hem de eritrosit arginazı için; Erişir ise (41) sığır rumen arginazı için uygun pH'nın 9.7 olduğunu açıklamışlardır.

Enzim üzerine bazı metal iyonlarından Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Ag^{+1} , Cr^{+3} , Sn^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} etkisi araştırıldığında maksimum aktiviteyi Mn^{+2} iyonlarının verdiği saptanmıştır (Tablo 1). Koyun meme doku arginazı çeşitli metal iyonları

ile preinkübe edildiğinde, Mn^{+2} 'nin %2060 aktivite gösterdiği daha düşük olarak da Cd^{+2} 'un %700, Ni^{+2} 'in %556, Ca^{+2} 'un %216, Mg^{+2} 'un %164, Ba^{+2} 'un %124, Cu^{+2} 'in %116, Fe^{+3} 'in %110, Hg^{+2} 'nin %100 aktive gösterdiği saptanmıştır. Co^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+1} ise çok düşük oranda aktivite gösterdiği, Sn^{+2} , Pb^{+2} , Cr^{+3} iyonlarının ise hiç aktivite göstermediği Tablo 1'de verilmiştir. En yüksek aktiviteyi Mn^{+2} iyonlarının, ondan sonra da Cd^{+2} ve Ni^{+2} 'in gösterdiği tespit edilmiştir.

Bir doku için aktivatör olan metal iyonu diğer bir doku için inhibitör olabilmektedir. İlhan (64), tiroid doku arginazını çeşitli iyonların $Mn^{+2} > Ni^{+2} > V^{+5} > Mg^{+2} > Co^{+2} > Cd^{+2} > Ca^{+2}$ şeklinde aktive ettikleri, $Ag^{+1} > Hg^{+2}$ 'nin ise inhibe ettiklerini saptamıştır. Başka bir çalışmada (116), da boratın rat karaciğer arginazını inhibe ettiği bulunmuştur. Spector ve ark. (128), yetişkin ve fetal insan karaciğer, eritrosit, böbrek, beyin ve mide-bağırsak kanalında yaptıkları çalışmada $Mn^{+2} > Co^{+2} > Mg^{+2}$ şeklinde enzimi aktive ettikleri Ca^{+2} 'un ise inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.

Çalışmada koyun meme doku arginazının K_m 'i araştırılmış ve yaklaşık 1.35mM olarak bulunmuştur.

İnsanların karaciğer, böbrek, beyin, mide-bağırsak kanalında yapılan bir çalışmada (128), arginaz enziminin K_m değeri 8-18mM bulunmuştur. Sığır rumen arginazının saflaştırılmadan önce ve sonra K_m değerinin 4mM olduğu (41); insan eritrosit arginazının saflaştırılmadan önce 1.5mM (126); insan tiroid bezi arginazının 2mM (94); sıçan karaciğer arginazının 10-20mM arasında değiştiği (46); *M.benedeni* arginazının ise 12.5 mM olduğu ortaya konulmuştur (100).

Yukarıdaki çalışmalarda aktif üre döngüsünün görülmediği dokularda K_m değerinin düşük olduğu saptanmıştır. Buna göre koyun meme dokusunda üre döngüsü görülmediği için K_m değeri de düşük bulunmuştur (Şekil 15).

Koyun meme doku arginaz enziminin K_m değeri bulunduğundan sonra bazı inhibitörlerin etkisi de araştırılmıştır. Bunlardan ilk olarak EDTA'nın koyun meme doku arginazı üzerine etkisi incelenmiştir. EDTA'nın farklı konsantrasyonları enzim kaynağı ile reaksiyona sokularak inhibisyon etkisi incelenmiş (Şekil 16). Bu şekilde 0.5mM EDTA konsantrasyonunda enzim %44 aktivite kaybeder. 2mM'in üstüne çıktığında aktivite kaybının %100 olduğu görülmüştür. EDTA (1.2mM) kullanılarak farklı substrat yoğunluklarında enzim aktivitesi araştırılıp daha sonra Lineweaver-Burk (Şekil 18) eğrisine dökülerek inhibisyon türü tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda V_o-S grafiği (Şekil 17) kontrol grafiğine göre karşılaştırılmış inhibisyonun kompetitif tipte olduğu görülmüştür. Burada enzimin V_{max} değerinin

değişmediği fakat Km değerinin değiştiği saptanmıştır. Kontrolün Km değeri 1.35 mM iken EDTA varlığında Km değeri 2.4 olarak tespit edilmiştir.

Reczkowski ve Ash (116), rat karaciğer arginazında yaptıkları çalışmada; Mn^{++} iyonlarının enzimi tamamen aktive ettiğini, bunun sonucunda enzim 10mM EDTA ve 10mM sitrat ile oda ısısı ve pH 9'da reaksiyona sokulduğunda inhibe olmadığını görmüşlerdir. Fakat aynı şartlarda enzim 60°C'de 10 dakika preinkübe edildiğinde aktivitenin tamamen kaybolduğunu saptamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada (88), EDTA'nın fare karaciğer arginazına etki etmediği ortaya konmuştur. Hosoyama (59) ise, rat karaciğer arginazını inhibe ettiğini saptamıştır.

Ayrıca genç koyunların yemlerine Ca^{+2} - EDTA- Cu^{+2} kompleksi katılarak yapılan bir çalışmada (63), ilk 24 saatte arginaz aktivitesinin arttığı, daha sonra ise düştüğü ortaya konulmuştur. *Helicobacter pylori* arginazının, 30mM'lık L- arginin ve 0.25 mM'lık EDTA ile reaksiyona sokulmasıyla enzimin tamamen inhibe olduğu saptanmıştır (81).

Rat karaciğer arginazı EDTA ile muamele edildiğinde, enzimin 30000 Dalton molekül ağırlığındaki inaktif formunun subünitelerine ayrılarak aktivitenin kaybolduğu görülmüştür (91).

Kuhn ve ark (75), insan karaciğer arginazının farklı pH'larda EDTA ile reaksiyona sokulduğunda enzim aktivitesinde sürekli azalma olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yukarıda yapılan çalışmalarda EDTA'nın dokular üzerine yaptığı inhibisyonun hangi tip inhibisyon olduğu bulunmamıştır. Yaptığımız çalışmada EDTA'nın, koyun meme doku arginazını kompetitif tipte inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 17, 18).

L-ornitin ve L-lizin gibi amino asitlerin laktasyondaki koyun meme doku arginazı üzerine etkileri araştırılmış ve L-ornitin, 2mM konsantrasyonda %38, 5mM'a çıkarıldığında %53, 15mM'da ise %66'lık bir inhibisyon yaptığı görülmüştür (Şekil 19). Aynı şartlar L-lizine uygulandığında 5 mM'da %48, 15mM'da %79, 20 mM'da ise %86'lık bir inhibisyon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22). Buna göre 10mM L-ornitin (Şekil 20) ve 12mM L-lizin konsantrasyonu (Şekil 23) farklı substratlarda reaksiyona sokularak Vo- S grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler kullanılarak Lineweaver- Burk (Şekil 21, 23) grafiğine göre Km değerleri saptanmıştır. 1.35mM olan kontrolün Km değerinin hem L-ornitin hem de L-lizinde değişmediği, Vmax değerlerinin ise değiştiği görülmüştür. Buna göre her iki amino asitin yaptığı inhibisyon tipinin nonkompetitif olduğu tespit edilmiştir.

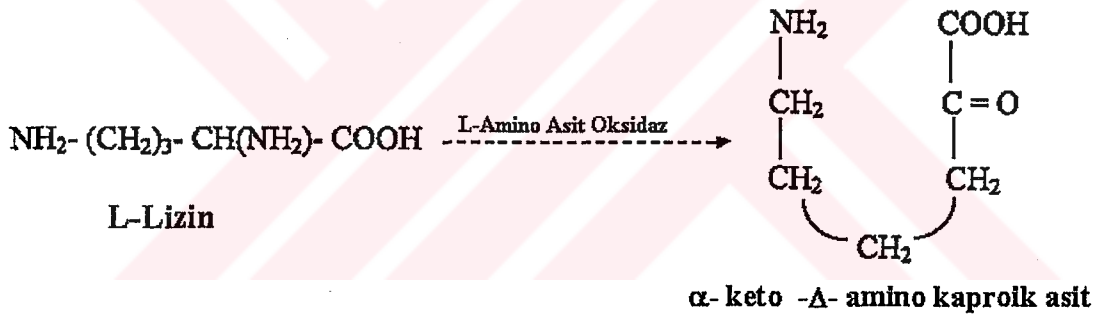
Muszynska ve Wojtczak (91), amino asitlerin ligand olduğunu, bu ligandların arginaza bağlanmasıyla arginazın yapısında değişiklikler oluşturduğunu ve bunun da enzim-substrat kompleksinin turnover'ını bozduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada sıçan karaciğer

arginazını ornitin ve lizin kompetitif, valin, lösin, izolösin ve sisteinin ise nonkompetitif tipte inhibisyona uğrattığı açıklanmıştır.

Dolinska ve Albrecht (36), rat beyin mitokondrisinde yaptıkları çalışmada 25mM L-arginin kullanılarak L-ornitin ve L-lizinin etkisini araştırarak, enzimi 20 kat inhibe ettiğini bulmuşlardır. Carvajal ve ark. (23), insan karaciğer arginazında, ornitin nonkompetitif, lizin ise kompetitif tipte inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Freedland ve ark. (44) ise ornitin ve lizin izole edilen rat karaciğer arginazını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Başka çalışmada (116), çok yönlü inhibitör denilen; ister kompetitif ister nonkompetitif, isterse kompetitif/nonkompetitif inhibitör çiftlerinin aynı anda, eşit miktarda ve sabit arginin konsantrasyonunun kullanılmasıyla karışık inhibisyon oluşturdukları saptanmıştır. Bunun sonucunda ratların karaciğer arginazını ornitin ve üre ile reaksiyona sokularak enzimi kompetitif tipte inhibisyona uğrattığı açıklanmıştır.

Klinik açıdan önemli olan ve en çok incelenen konu arginazın lizin tarafından engellenmesidir. L-lizinin aşağıda gösterilen yolla deamine edilmemesi sonucu kanda lizin miktarı artmakta ve **argininemia** oluşmaktadır.



Argininemia' da görülen klinik tablo devamlı kusma, baş dönmesi, zekada gerilik ve vücut gelişiminde gerilemedir (30, 33, 68). Biyokimyasal bulgular ise kan ve idrarda normalin çok üstünde arginin, lizin, sitrülün ve amonyağın bulunmasıdır. Bu tablo, Colombo ve ark. (33), tarafından "**Lysine Intolerance**" olarak isimlendirilmiştir. Bu hastalığın nedeni lizinin arginazını engellemesine bağlanmaktadır.

Yapılan bir çalışmada (2), üre döngüsü enzimlerinden arginazını, en iyi inhibe eden amino asitin lizin olduğu ve amino asitin enzimi karışık tipte inhibe ettiği saptanmıştır. L-lizinin ve L-ornitin sığır karaciğer arginazını üzerindeki kompetitif inhibisyon etkisinin putresin ve kadaverinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir (130). Rat meme bezi arginazında bazı amino asitlerin inhibisyon etkisi araştırıldığında lizin, ornitin, valinin enzimi kuvvetli bir şekilde kompetitif tipte inhibe ettikleri; prolin, izolösin ve lösinin ise zayıf bir şekilde inhibisyona neden oldukları gösterilmiştir (45).

Sığır rumen doku arginaz aktivitesi üzerine 30mM ornitinin %70, 40 mM lizinin %58 inhibisyona neden olduğu ve bu amino asitlerin enzimi nonkompetitif tipte inhibe ettikleri açıklanmıştır (41).

L-ornitinin farklı derecelerde saflaştırılan renal arginaz ve sığır hepatik arginazının kısmi olarak kompetitif ve nonkompetitif (karışık tipte inhibisyon) etki ettiği ortaya konmuştur (21). Başka bir çalışmada (106), L-ornitinin sığır karaciğer arginazını kompetitif tipte inhibe ettiği görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada p-CMBA ve NEM'in laktasyondaki koyun meme doku arginazı üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Enzim 0.25mM ile 2.5mM değişen konsantrasyonlarda p-CMBA ile preinkübasyona tabii tutulmuştur. 0.5mM p-CMBA konsantrasyonunun koyun meme doku arginazını %30, 1mM'da %49, 2mM'da %92 düzeyinde inhibe etmektedir. Konsantrasyon 2.5mM'a ulaştığında ise enzimin aktivitesinin tamamen kaybolduğu görülmüştür (Şekil 25). 10mM ile 100mM arasında değişen NEM konsantrasyonlarında enzimin preinkübe edilmesi sonucunda 10mM'ın % 23, 50mM'ın %55, 100mM'ın ise %86 düzeyinde inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Şekil 28).

Enzim, 1mM p-CMBA, 80mM NEM kullanılarak Michaelis-Menten grafiği çizilmiştir (Şekil 26, Şekil 29) ve grafik verileri Linewear-Burk (Şekil 27, 30) grafiğine dökülmüş ve Km'leri belirlenmiştir. Her ikisinin de Km'lerinin değişmediği Vmax değerlerinin değiştiği bulunmuştur. Bu sonuca göre, p-CMBA ve NEM'in koyun meme doku arginaz enzimini nonkompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.

Helicobacter pylori'nin lizatlarında p-CMBA'in mikromolar düzeyde enzimi inhibe etmesine rağmen (81); başka bir çalışmada (9) rat karaciğer arginazının p-CMBA ve NEM ile etkilenmediği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla paralel olarak insan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazı üzerine p-CMBA'in herhangi bir inhibisyon etkisi görülmemiştir (56). Acı bakla arginazı ile tavuk karaciğer arginazı (90) ve *M. benedeni* arginazı (104) üzerine p-CMBA ve NEM'in inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. Bizim çalışmalarımızla paralellik gösteren insan tiroid doku (64) ve rumen doku (41) arginazlarını, p-CMBA ve NEM'in nonkompetitif inhibe ettikleri saptanmıştır. NEM'in sığır karaciğer arginazı üzerine yapılan bir çalışmada (131), etkenin enzim aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Yapılan bu çalışmaların hepsi de inhibisyon yapan inhibitörlerin enzimin aktif merkezindeki -SH gruplarını bloke ettiklerini açıklamaktadırlar.

Çalışmamızda metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve 0.02mM metilen mavisinin %13, 0.3mM konsantrasyonun %74, 0.7mM konsantrasyonun ise %96 düzeyinde inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 31). Koyun meme doku

arginaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin yaptığı inhibisyon tipini belirlemek için farklı arginin konsantrasyonlarında, 0.3mM metilen mavisi kullanılarak aktivite tespit edilmiş, Vmax değerinin değiştiği, Km değerinin değişmediği ve nonkompetitif inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (Şekil 32, 33).

Metilen mavisinin, M. benedeni arginazını (103), insan tükürük arginazını (98), manda karaciğer ve böbrek doku arginazını (105) nonkompetitif tipte inhibe ettiği ortaya konmuştur.

Metilen mavisinin koyun meme doku arginaz aktivitesine inhibitör etkisi bulunduğundan sonra hangi ortamda daha iyi inhibisyon yaptığı araştırılmıştır. Metilen mavisi ile oda ışığı, karanlıkta ve 150w'lık ışık altında enzim preinkübe edilerek bulunan sonuçlar kontrollerle kıyaslanmış ve inhibisyon derecesi araştırılmıştır. İnhibisyon sonucu kalan aktivitenin oda ışığında %76; karanlıkta %63; 150w ışıkta %66 olarak bulunmuştur (Tablo 2). Laktasyondaki koyun meme doku arginazının enzimini metilen mavisile karanlıkta ve 150w'lık ışıkta daha kuvvetli inhibe olduğu tespit edilmiştir.

Rat karaciğer arginazı üzerine metilen mavisile birlikte 150w ışık uygulandığında aktivitedeki düşüşün, 21 histidil artıklarının fotoinaktivasyona uğramasının ya subünitelere ayrılması veya subünitelerin toplanması sonucu olabileceği açıklanmıştır (8).

Enzimin, 150w ışık altında reaksiyona sokulması bir fotoinaktivasyon örneğidir. Fotoinaktivasyon, enzimdeki histidil artıklarının imidazol gruplarının parçalanmasıyla oluşur. Ayrıca çeşitli dokularda arginaz enziminin histidil artıklarının imidazol gruplarına Mn^{++} katyonlarının bağlanmasıyla enzimin tetramerik forma geçtiği belirtilmektedir. Metilen mavisi ve 150 w ışık varlığında enzimin histidil artığının imidazol gruplarının parçalanmasıyla Mn^{++} katyonlarının tetramerik yapıya dönüşemediği ve fotoinaktivasyonun meydana geldiğini bildirmişlerdir (96, 98, 103, 105).

Koyun meme doku arginaz enziminine farklı ortamlarda iki farklı preinkübasyon uygulanmıştır (Tablo 3). Buna göre oda ışığında, I. preinkübasyona sadece $MnCl_2$ 'ün konulmasıyla yapılan çalışma kontrol kabul edilmiş ve diğer uygulamalar bununla kıyaslanmıştır (A).

150w ışık altında $MnCl_2$ ve %0.1 metilen mavisinin I. preinkübasyonda ortama ilave edilmesiyle arginaz aktivitesini %59 inhibe ettiği (B); I. preinkübasyonda %0.1 metilen mavisi, II. preinkübasyonda ise $MnCl_2$ eklendiğinde enzim aktivitesinin %66 oranında inhibe olduğu (C); I. preinkübasyonda $MnCl_2$, II. preinkübasyonda ise %0.1 metilen mavisi eklendiğinde koyun meme doku arginaz aktivitesinin %86 inhibe olduğu ortaya konmuştur (D).

İnsan karaciğerinde yapılan bir çalışmada (23), tetramer yapıdaki arginazın p-MHBA (p- hidroksi merkür benzoik asit) ile reaksiyona girmesiyle aktif dimerlerin oluştuğu, ortama 2-merkapt etanol eklenmesiyle bu dimerlerin rejenerasyon yeteneği kazandıkları bulunmuş ve bu altüniteler Mn^{+2} ile reaksiyona sokulmalarıyla enzimin tekrar aktif tetramer yapı kazandığı saptanmıştır.

Bir başka çalışmada (27), insan karaciğer arginazının dördüncül yapısı üzerine Mn^{+2} iyonlarının etkisi incelenmiş ve enzim önce EDTA ile inkübe edilerek, 30 000 Dalton molekül ağırlığında inaktif enzime dönüşmüş daha sonra Mn^{+2} iyonlarının ilave edilmesiyle doğal enzimin molekül ağırlığıyla aynı olan yeni rejenere enzim elde edilebilmiştir. Benzer çalışma rat karaciğeri üzerinde de denenmiş ve aynı sonuç elde edilmiştir (91).

Arginaz enziminin substrat ilave edilmeden önce inhibitör ile karşılaştığı zaman inhibisyonun daha fazla olduğu, substrat ile inhibitör karşılaştıktan sonra enzim ilave edildiğinde ise inhibisyonun daha az olduğu bildirilmiştir (88). Çalışma sonuçlarımız bu literatürle paralellik göstermiştir.

İnsan karaciğer arginazının mutagenезisi sonucu oluşan mutant arginazın histidin-141'ine fotoinaktivasyonun etkili olmadığı bulunmuştur (24).

Histidil artıklarının imidazol gruplarına Mn^{+2} katyonları bağlanınca enzim tetramerik forma geçebilmektedir. Histidilin imidazol grupları yıkıma uğrayınca Mn^{+2} katyonları tetramerik yapının oluşumunu sağlayamamakta, yapının değişimini ancak belli miktarlarda etkilemektedir (105). Koyun meme doku arginazı, önce Mn^{+2} katyonları ile preinkübasyona sokulup daha sonra metilen mavisi ile ışığa maruz bırakılmaları sonucunda inaktivasyon düzeyi düşmektedir. Enzimin oligomerik yapıya kavuştuktan sonra histidil artıklarının yıkımı oligomerik yapının değişimini ancak belli miktarda etkilemektedir.

Değişik santrifügasyon yöntemleri (34, 35, 107, 108), sonucu mitokondriada enzimin yerleşimindeki iyonik gücün ortamı ile sitoplazmanın çözünebilen kısma geçebildiği gözlenmiştir (Tablo 4). Koyun meme doku arginazının %70'e varan bir bölümü çekirdektedir.

Enzimin hücre çekirdeğine bağlı olmasının metabolik denetimi açısından önemi Moss (88), tarafından bildirilmiştir. Buna göre, Mn^{+2} iyonları daha çok hücre çekirdeğinde bulunmakta ve bunların çekirdekten sitoplazmaya geçişleri ile arginaz aktive edilirken arginin düzeyleri değişmeler göstermekte ve bunun sonucu protein sentezi denetim altına alınmaktadır.

Bu fraksiyonda enzimin bulunması çekirdeksel fraksiyonun tam çökmesine veya bir kısmının süpernatanta geçip daha sonra 16000xg'de santrifüj olunca mitokondrial fraksiyon ile çökmesi şeklinde izah edilebilir.

Koyun meme doku arginazının hücre içi yerleşiminde çekirdeğe bağlı olmasının metabolizma yönünden etkinliği tartışılmaya açık kalmaktadır.

Sükrozlu (0.25M) tamponla hazırlanan homojenatın (H) direkt aktivitesi 5.4Ü bulunmuştur. Daha sonra 50xg'de 10 dakika santrifüj (S) edilerek enzim aktivitesi 4.0 Ü; 600xg'de 10 dakika santrifüj edilerek pelletteki (P1) enzim aktivitesi 0.4Ü süpernatanttaki enzim aktivitesi 1.6Ü; 16000g'de 10 dakika santrifüjle elde edilen pelletteki (P2) aktivite 0.3Ü, süpernatantta (S2) aktivite 5.6Ü; 77000xg'de 20 dakika santrifüj ile süpernatanttaki (S3) aktivite 1.1Ü bulunmuştur. 0.16M'lık KCl'li tamponla hazırlanan homojenattaki aktiviteler H'da 4.6Ü, S'de 3.8Ü, P1'de 0.5Ü, S1'de 1.3Ü, P2'de 0.4Ü, S2'de 3.0Ü, S3'de 1.4Ü enzim aktivitesi bulunmuştur (Tablo 4).

Domuz yavrularının ince bağırsağında yapılan bir çalışmada (34), üre döngüsü enzimlerinin yerleşimi araştırılmış arginaz izoenzimlerinin hem mitokondriye hem de sitoplazmaya yerleşik olduğu bulunmuştur.

Rat böbreğinde Percoll yöntemiyle arginin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin selüler ve subselüler yerleşimi incelenmiş ve arginaz ve ornitin aminotransferaz enziminin iç korteks ve dış medullaya yerleştiği bulunmuştur (35). Percoll (Colloidal PVP coated silica) kullanılarak dansite gradient santrifügasyon yapılmasının çok sık kullanılan bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür. İnsan ve hayvan kaynaklı spermlerinin in-vitro fertilizasyonunda saflaştırma işleminde, kemoterapi ve radyasyon tedavisi alan hastaların hücre tedavisinde hücrelerin izolasyonunda kullanıldığı açıklanmıştır (108).

Literatür veriler bizim bulgularımızı desteklemektedir. Yapılan literatür tarama sonucu bugüne kadar bilimsel olarak koyun meme doku arginaz enziminin bazı kinetik özelliklerinin araştırılmadığı ortaya çıkmıştır. Bu konu ilk defa laboratuvarımızda çalışılmıştır. Koyun meme dokusunda aktif bir üre döngüsü bulunmamasına rağmen arginaz enziminin varlığı tespit edilmiş ve bazı kinetik özellikleri optimize edilerek arginazın bu dokudaki görevi açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarının, bu konuda yapılacak bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

5. KAYNAKLAR

- 1- **Altundağ Y. (2001).** Bronj Lavaj Sıvısında Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- 2- **Ameen M. and Palmer T. (1987).** Inhibition of Urea Cycle Enzymes by Lysine and Saccharopine. *Biochemistry International*, Vol 14, No 3, 395- 400.
- 3- **Aminlari M. and Vaseghi T. (1992).** Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol*, Vol. 103B, No 2, 385- 389.
- 4- **Aminlari M., Vaseghi T., Sajedianfard M. J. and Samsami M. (1994).** Changes in Arginase, Aminotransferases and Rhodanese in Sera of Domestic Animals with Experimentally Induced Liver Necrosis. *J. Comp. Path.* Vol 110, 1- 9.
- 5- **Baldwin E. (1967).** Excretory Metabolism of Proteins and Amino acids. pp 263-269. "Dynamic Aspects of Biochemistry", sth Edition. Cambridge of the University Press, London.
- 6- **Barej W. and Hill H. (1970).** Arginine Metabolism in the Blood Cells of Cattle and Goats. *Q. L. Exp. Physiol.* Vol 55, 64- 66
- 7- **Basch J. J., Wickham E. D. and Farrell H. M. (1997).** Arginase in Lactating Bovine Mammary Glands: Implications in Proline Synthesis. *J. Dairy Sci.* 80, 3241- 3248.
- 8- **Ber E. and Muszynska G. (1979).** Chemical Modification of Rat Liver Arginase. *Acta Biochimica Polonica.* Vol 26, No 1/2, 103- 114.
- 9- **Ber E. , Muszynska G. and Cechova D. (1978).** The Lack of Free -SH Groups in Rat Liver Arginase. *Bulletin de L'Academie Polonaise Des Sciences.* Cilt II, Vol XXVI, No 10, 665- 667.
- 10- **Blachier F., Darcy-Vrillon B., Sener A., Duee P. H. and Malaisse W. J. (1991).** Arginine Metabolism in Rat Enterocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1092, 304- 310.
- 11- **Bolkenius F. N. and Seiler N. (1986).** Developmental Aspects of Polyamine Interconversion in Rat Brain. *Int. J. Devl. Neuroscience*, Vol 4, No 3, 217- 224.
- 12- **Bond J. S. (1973).** Effect of Manganese and Amino Acids on Proteolytic Inactivation of Beef Liver Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 327, 157- 165.
- 13- **Bond J. S., Failla M. L. and Unger D. F. (1983).** Elevated Manganese Concentration and Arginase Activity in Livers of Streptozotocin- Induced Diabetic Rats. *J. Biol. Chem.* Vol 258, No 13, 8004- 8009.

14- **Braissant O., Gotoh T., Loup M., Mori M., Bachmann C. (1999).** L-Arginine Uptake, The Citrulline- NO Cycle and Arginase II in the Rat Brain: An in Situ Hybridization Study. *Molecular Brain Research* 70, 231- 241.

15- **Brock A. A., Chapman S. C., Ulman E. A. and Wu G. (1994).** Dietary Manganese Deficiency Decreases Rat Hepatic Arginase Activity. *J. Nutr.* 124, 340- 344.

16- **Brosnan M. E., Colbourne S. A., Brosnan J. T. (1981).** Regulation of Urea Synthesis in vivo; Facts and Speculation Short Term Regulation of Liver Metabolism. ed. By Hue, L.V., Grald Elsevier, North. Holland Biomedical Process. Amsterdam, Newyork..

17- **Brouwer A., Barelds R. J., Knook D. L. (1984):** Centrifugal Separations of Mammalian Cells. *Centrifugation (2nd Edition)* edited by Rickwood D. IRL PRESS Oxford.

18- **Brusdeilins M., Kühner R. and Schumacher K. (1985).** Purification, Affinity to Anti-Human Arginase Immunoglobulin-Sepharose 4B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. *Biochimica et Biophysica Acta* 840, 79- 90.

19- **Campbell J. W. and Lee T. W. (1963).** Ornithine Transcarbamylase and Arginase Activity in Flatworms. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 8, 29- 38.

20- **Candito M., Bebin B., Vianey-Saban C., Rabier D., Bekri S., Sebag F., Chambon M. and Kamoun P. (1993).** Arginase Deficiency in Two Brothers. *J. Inher. Metab. Dis.* 16, 1054- 1056.

21- **Carlisky N. J., Sadnik I. L. and Menendez J. L. (1972).** Properties of Amphibian Renal Arginase- III. The Molecular Weight, Chemical Specificity and Effects of Ornithine and Urea. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol 42B, 81- 90.

22- **Carvajal N. and Cederbaum S.D. (1986).** Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Proline and Branched- Chain Amino Acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 870, 181- 184.

23- **Carvajal N., Martinez J., Oca F. M. , Rodriguez J. and Fernandez M. (1978).** Subunit Interactions and Immobilised Dimers of Human Liver Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 527, 1- 7.

24- **Carvajal N., Olate J., Salas M., Uribe E., Lopez V., Herrera P. and Cerpa J. (1999).** Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis of Human Liver Arginase: Evidence that the Imidazole Group of Histidine-141 is not Involved in Substrate Binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol 371, No 2, 202- 206.

- 25- Carvajal N., Salas M., Lopez V., Uribe E., Herrera P., Cerpa J., Fuentes M. (1999). Manganese- dependent Inhibition of Human Liver Arginase by Borate. *Journal of Inorganic Biochemistry* 77, 163- 167.
- 26- Carvajal N., Torres C., Uribe E. and Salas M. (1995). Interaction of Arginase with Metal Ions: Studies of the Enzyme from Human Liver and Comparison with Other Arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 112B, No 1, 153- 159.
- 27- Carvajal N., Venegas A., Oestreicher G. and Plaza M. (1971). Effect of Manganese on the Quaternary Structure of Human Liver Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 250, 437- 442.
- 28- Chin S. F. and Robbins K. R. (1991). Relation of Arginine Nutrition to Mammary Gland Development in the Rat. *Nutrition Research*, Vol 11, 1317- 1327.
- 29- Christianson D. W. (1997). Structural Chemistry and Biology of Manganese Metalloenzymes. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, Vol 67, No 2/3, 217- 252.
- 30- Christopher R., Rajivnath V. and Taranath Shetty K. (1997). Arginase Deficiency. *The Indian Journal of Pediatrics*, Vol 64, No 2, 266- 269.
- 31- Claesson M. H., Tscherning T., Nissen M. H. and Lind K. (1990). Inhibitory Effect of Mycoplasma- Released Arginase. *Scand. J. Immunol.* 32, 623- 630.
- 32- Colombo J. P. and Konarska L. (1984). Arginase. In: Bergmayer, H.O. Ed: *Methods of Enzymatic Analysis*. 3 rd. Ed. Weinheim: Verlag Chemic. 285-294.
- 33- Colombo J. P., Richterich R., Donath A., Rossi E. (1964): Congenital Lysine Intolerance with Periodic Ammonia Intoxication. *Lancet* 1, 1014- 1023.
- 34- Davis P. K., Wu G. (1998). Compartmentation and Kinetics of Urea Cycle Enzymes in Porcine Enterocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 119, 527- 537.
- 35- Dhanakoti S. N., Brosnan M. E., Herzberg G. R. and Brosnan J. T. (1992). Cellular and Subcellular Localization of Enzymes of Arginine Metabolism in Rat Kidney. *Biochem. J.* 282, 369- 375.
- 36- Dolinska M., Albrecht J. (1998). L- Arginin Uptake in Rat Cerebral Mitochondria. *Neurochem. Int.* 33, 233- 236.
- 37- Dunger P., Briegel H. (2001). Protein Catabolism in Mosquitoes: Ureotely and Uricotely in Larval and Imaginal *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 47, 131- 141.
- 38- Dzikowska A., Caer J. P., Jonczyk P. and Weglenski P. (1994). Purification of Arginase from *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochimica Polonica*, Vol 41, No 4, 467- 471.

- 39- **Efron D. T. and Barbul A. (1999).** Arginine and Nutrition in Renal Disease. Journal of Nutrition, Vol 9, No 3, 142-144.
- 40- **Elgün S. and Kumbasar H. (2000).** Increased Serum Arginase Activitiy in Depressed Patients. Prog. Neuro- Physchopharmacol.& Biol. Phychiat. 2000, Vol 24, 227-232.
- 41- **Erişir M. (1997).** Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Doktora Tezi.
- 42- **Erişir M., Ozan S.T. (1999).** Sığır Doku Rumen Arginazının Saflaştırılmasından Önce ve Saflaştırılmasından Sonra Bazı Özellikler. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 23/3, 597- 608.
- 43- **Flynn N. E., Meininger C. J., Kelly K., Ing N. H., Morris S. M. and Wu G. (1998).** Glucocorticoids Mediate the Enhanced Expression of Intestinal Type II Arginase and Argininosuccinate Lyase in Postweaning Pigs. J. Nutr. 129, 799- 803.
- 44- **Freedland R. A., Crozier G. L. and Meijer A. J. (1984).** Arginine Uptake by Isolated Rat Liver Mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta 802, 407- 412.
- 45- **Fuentes J. M., Campo M. L. and Soler G. (1994).** Kinetics and Inhibition by Some Aminoacids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. Arch. Int. Physiol. Biochimie Biophysique 102, 255- 258.
- 46- **Garganta C. L. and Bond J. S. (1986).** Assay and Kinetics of Arginase. Analitical Biochemistry 154, 388- 394.
- 47- **Geyer J. W. and Dabich D. (1971).** Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. Analytical Biochemistry, Vol 39, No 2, 412-417.
- 48- **Glass R. G. and Knox W. E. (1973).** Arginase Isoenzymes of Rat Mammary Gland, Liver and Other Tissues. The Journal of Biological Chemistry. Vol 248, No 16, 5785- 5789.
- 49- **Gornall A. G., Bardawill C. J. and David M. M. (1975) :** Determination of Serum Proteins by Means of the Biüret Reaction. J. Biol. Chem. 177, pp 751
- 50- **Gökmen S. S, Yörük Y., Çakır E., Yorulmaz F. and Gülen Ş. (1999).** Arginase and Ornithine, As Markers in Human Non- Small Cell Lung Carcinoma. Cancer Biochemistry Biophysics, Vol 17, 125- 131.
- 51- **Gözükara E. (1989):** Amino Asitlerin Oksidasyonu. 1009-1046. "Biyokimya". Birinci Baskı, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.

52- **Grazi E. (1973).** Molecular Properties and Metabolic Control of the "Ureotelic" Arginase from Chicken Liver. *Acta Vitamin. Enzymol.* 27, 37- 50.

53- **Grody W. W., Klein D., Dodson A. E., Kern R. M., Wissmann P. B., Goodman B. K., Bassand P., Marescau B., Kang S. S., Leonard J. V. and Cederbaum S. D. (1992).** Molecular Genetic Study of Human Arginase Deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 1281- 1290.

54- **Güner S. R., Şeker H., Gülen Ş. (1995).** Gebeliğin ve Hiperprolaktineminin Kadınlarda Tükürük ve Eritrosit Arginaz Düzeylerine Etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 12 (1, 2, 3), 99- 104.

55- **Gürsu M. F. (1993).** Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

56- **Halifeoğlu İ. (1993).** İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

57- **Haraguchi Y., Aparicio J. M., Takiguchi M., Akaboshi I., Yoshino M., Mori M. and Matsuda I. (1990).** Molecular Basis of Argininemia. *Clin. Invest.*, Vol 86, 347- 350.

58- **Hirsch-Kolb H., Heine J. P., Kolb H. J. and Greenberg D. M. (1970).** Comparative Physical- Chemical Studies of Mammalian Arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 37, 345- 359.

59- **Hosoyama Y. (1972).** The Reversible Inactivation of Rat- Liver Arginase at Low pH. *Eur. J. Biochem.* 27, 48- 52.

60- **Huang M.-H., Yang C.-C. and Wang S.-R. (1992).** Inhibition of Lymphocyte Proliferation By Liver Arginase. *Life Sciences*, Vol 51, 1725- 1730.

61- **Husson A., Bouazza M., Buquet C. and Vaillant R. (1985).** Role of Dexamethasone and Insulin on The Development of The Five Urea- Cycle Enzymes in Cultured Rat Foetal Hepatocytes. *Biochem. J.* 225, 271- 274.

62- **Ikemeto M., Tabata M., Murachi T., Totani M. (1989).** Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. *Ann Clin Biochem.* 26, 547- 553.

63- **Ishmael J., Gopinath C. and Howell J. (1971).** Studies with Copper Calcium EDTA. *J. Comp. Path.* Vol 81, 279- 290.

64- **İlhan N. (1992).** İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri (Doktora Tezi). Elazığ, F. Ü. Tıp Fak.

65- Kang J. H. and Cho Y. D. (1990). Purification and Properties of Arginase from Soybean, *Glycine max*, Axes. *Plant Physiol.* 93, 1230- 1234.

66- Kaplan L. A. (1987). Urea. 22- 27. Ed. Pesce A. J., Kaplan L. A. In: "Methods in Clinical Chemistry". The C. V. Mosby Company, St. Louis, Washington D. C, Toronto.

67- Kato T., Sano M. and Mizutani N. (1987). Inhibitory Effect of Intravenous Lysine Infusion on Urea Cycle Metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 146, 56- 58.

68- Kimura T., Christoffels V. M., Chowdhury S., Iwase K., Matsuzaki H., Mori M., Lamers W. H., Darlington G. J. and Takiguchi M. (1998). Hypoglycemia-associated Hyperammonemia Caused by Impaired Expression of Ornithine Cycle Enzyme Genes in C/EBP α - Knockout Mice. *J. Biol. Chem.* Vol. 273, No. 42, 27505- 27510.

69- King J. (1965). Arginase. *Practical Clinical Enzymology.* D. Van Nostrand Company, London, 220- 225.

70- Kocna P., Fric P., Zavoral M. and Pelech T. (1996). Arginase Activity Determination a Marker of Large Bowel Mucosa Proliferation. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 619- 623.

71- Konarska L. and Tomaszewski L. (1975). Studies on L-Arginase of Small Intestine. *Biochemical Medicine* 14, 250- 262.

72- Konarska L., Tomaszewski L. and Rolczyk U. (1986). Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 35, 170- 178.

73- Krebs H. A., Hems R., Lund P., Holliday D., Reed W. W. C. (1978). Sources of Ammonia for Mammalian Urea Synthesis. *Biochem. J.* 176, 733- 737.

74- Kuhn N. J., Talbot J. and Ward S. (1991). pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol 286, No 1, 217- 221.

75- Kuhn N. K., Ward S., Piponski M. and Young T. W. (1995). Purification of Human Hepatic Arginase and Its Manganese (II)- Dependent and pH- Dependent Interconversion between Active and Inactive Forms: A Possible pH- Sensing Function of the Enzyme on the Ornithine Cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol 320, No 1, 24- 34.

76- Kumar A. N. and Kalyankar G. D. (1984). Effect of Steroid Hormones on Age Dependent Changes in Rat Arginase Isoenzymes. *Experimental Gerontology*, Vol 19, 191- 198

77- Lemons J. A. and Snodgrass P. J. (1986). Effect of a Maternal Fast on the Urea Cycle Enzymes of the Ovine Fetus. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 5, 138- 142.

78- Levillain O., Parvy P. and Hus-Citharel A. (1996). Arginine Metabolism in Cat Kidney. *Journal of Physiology* 491, 2, 471- 477.

79- Maggini S., Stoecklin-Tschan F. B., Mörikofer-Zwez S. and Walter P. (1992). New Kinetic Parameters for Rat Liver Arginase Measured at Near- Physiological Steady-State Concentrations of Arginine and Mn^{+2} . *Biochem. J.* 283, 653- 660.

80- Meljer A. J., Hanspens H. E. (1986). Ureogenesis. pp. 263-269. "Metabolic Compartmentation" edited by. H. Sies Academic Press.

81- Menz G. L., Holmes E. M., Ferrero R. L. (1998). In situ Characterization of *Helicobacter pylori* Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1388, 465- 477.

82- Mephan T. B. and Linzell J. L. (1967). Urea Formation by The Lactating Goat Mammary Gland. *Nature* Vol 214, 507- 508.

83- Mistry S. K., Zheng M., Rouse B. T., Morris S. M. (2001). Induction of Arginases I and II in Cornea During Herpes Simplex Virus Infection. *Virus Research* 73, 177- 182.

84- Mohamed S. M., Greenberg D. M. (1945) : Liver Arginase I. Preparation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, Inhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 8, 349- 357.

85- Mohanachari V., Neeraja P., Indira K. and Swami K. S. (1980). Inhibition of Sheep Liver Arginase by Malathion. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24, 875- 878.

86- Moreno- Vivian C., Soler G. and Castillo F. (1992). Arginine Catabolism in The Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem.* 204, 531- 537.

87- Morimoto H., Brady J. F. and Atkinson D. E. (1990). Effect of Level of Dietary Protein on Arginine- Stimulated Citrulline Synthesis. *Biochem. J.* 272, 671- 675.

88- Moss S. (1952). Sodium Nucleata Inhibition of Arginase Activity. *Science* Vol 115, 69- 70.

89- Mouille B., Morel E., Robert V., Guihot-Joubrel G., Blachier F. (1999). Metabolic Capacity for L- Citrulline Synthesis from Ammonia in Rat Isolated Colonocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427, 401- 407.

90- Muszynska G., Severina L. O., Lobyreva L. W. (1972). Characteristics of Arginase from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organism. *Acta Biochem. Pol.* Vol 19, No 2, 109- 111.

91- **Muszynska G. and Wojtczak M. (1979).** Influence of Immobilization on Conformation of Rat Liver Arginase. *Int. J. Biochem.* Vol 10, 665- 668

92- **Nadolska-Lutyk J., Grabon W. And Poremska Z. (1990).** Arginase in Bull Testis. *Acta Biochimica Polonica* Vol 37, No 3, 377- 384.

93- **Nakamura H., Saheki T. And Nakagawa S. (1990).** Differential Cellular Localization of Enzymes of L-Arginine Metabolism in The Rat Brain. *Brain Research* 530, 108- 112.

94- **Nikumb S. K., Santhanam K., Rama K. and Rao M. V. (1987).** Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamylase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. *Ann. Nut. Metab.* 31, 387- 394.

95- **Ozan S., Gülen Ş. (1989).** Sığır Tükürüğünde Arginaz Enzimi ve Özelliklerinin Tükürük Bezleri, Eritrosit ve Karaciğer ile Karşılaştırılması. *Doğa Tr. Vet. ve Hay.* 13/ 2, 154- 163.

96- **Ozan S. ve Gülen Ş. (1991).** Farklı Türlerin Organlarında Bulunan Arginazların Metilen Mavisi ile Fotoinaktivasyonu. *Doğa- Tr. J. of Biology* 15, 222- 229.

97- **Ozan S., Gürsu F., Bayraktutan U., Gülen Ş. (1990).** Farklı Türlerin Eritrositlerindeki Arginaz Aktivitesi ile Üre Düzeyleri Arasındaki İlişki. *Cumhuriyet Üniv. Tıp Fak. 1. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi (Sivas)*, 44- 45.

98- **Ozan S., Gürsu M. F. ve Gülen Ş. (1991).** İnsan Tükürük Arginazının Fotoinaktivaasyonu. *Biyokimya Dergisi Cilt 16, 3, 57- 65.*

99- **Ozan S., Gürsu M. F., Gülen Ş. (1993).** Kısmen Artırılmış *Moniezia expansa* Arginazının Bazı Özellikleri. *Doğa-Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 17, 245- 250.

100- **Özdemir N. (1990).** M. benedeni Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.*

101- **Özdemir N., Gürsu F., Gülen Ş. (1987):** Akkaraman, Morkaraman ve İvesi Koyunlarının Eritrositlerinde ve Tükürüklerindeki Arginaz Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *Biyokimya Dergisi Kongre Özel Sayısı. Cilt XII, Sayı 2.*

102- **Özdemir N., Gürsu F., Ozan S., Gülen Ş. (1993):** Kıvırcık ve Düz Saçlı Erkek ve Kız Öğrencilerin Eritrositlerinde ve Tükürüklerindeki Arginaz Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *F. Ü. Sağlık Bil. Dergisi 7 (1), 84- 90.*

103- **Özdemir N., Ozan S. (1993).** M.benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonu ve Kinetik Özellikleri. *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimler Dergisi 2 (2), 152- 157.*

104- Özdemir N., Ozan S. (1994). NEM, EDTA ve p-CMBA'nın M. benedeni Arginazı Üzerindeki İnhibisyon Etkileri ve Kinetik Özellikleri. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 19, 157- 160.

105- Özdemir N., Özçelik M. (2001). Manda Karaciğer ve Böbrek Doku Arginazının Fotoinaktivasyonu ve Kinetik Özellikleri. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 25, 6, 995- 1000.

106- Pace C. N. and Landers R. A. (1981). Arginase Inhibition. Biochimica & Biophysica Acta 658, 410- 412.

107- Palmer T. (1994). Biyolojik Materyallerdeki Enzimlerin Araştırılması. 359- 383. "Enzim Bilgisi", Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul.

108- Pertoft H. (2000). Fractionation of Cells and Subcellular Particles with Percoll. J Biochem Biophys Methods 44, 1- 30.

109- Poremska Z., Grabon W., Zelazowska, Czeczot H. And Zamecka E. (1993). Nonidentity of Ubunits of Human Kidney Arginase A₁ and Human Liver Arginase A₅. Acta Biochemica Polonica Vol 40, No 4, 465- 470.

110- Poremska Z., Zabek J., Grabon W., Rahden-Staron I., Baranczyk-Kuzma A. (2001). Arginase Isoforms in Human Colorectal Cancer. Clinica Chimica Acta 305, 157- 165.

111- Poremska Z., Zamecka E. (1984). Immunological Properties of Rat Arginases. Acta Biochimica Polonica. Vol 31, No 2, 223- 227.

112- Powers S. G., Meister A. (1982). Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. P. 251-252. "The Liver Biology and Pathobiology" edited by I. Arias I. M., Popper H., Schachter D., Shafriz D. A., Raven Press, Newyork.

113- Rao K. V. K., Pai S. R. and Bapat C. V. (1974). The Inhibition of Arginase by Proline in Cell- Free Extracts of Mouse Mammary Tumour. Br. J. Cancer 30, 129- 135.

114- Rather S. (1955). Enzymatic Synthesis of Arginine. 359- 364 (Condensing and Splitting Enzymes). In Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. Vol 2.

115- Rather S. (1976). Farnohian and Clearge of C-N bonds in Arginine and Urea Biosynthesis. pp 227-233. Horecker B. L., Cornedella, Reflections on Biochemistry, Permagon Press, Newyork.

116- Reczkowski R. S. and Ash D. E. (1994). Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism, Alternate Substrates and Inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol 312, No 1, 31- 37.

- 117- **Rodwell V. W. (1993).** Protein ve Amino Asit Azotunun Katabolizması. 340-353. "Harper'ın Biyokimyası"edited by Murray R. K., Mayes P. A., Granner D. K., Rodwell V. W. Çevirenler Menteş G., Ersöz B., Barış Kitapevi İstanbul.
- 118- **Russell D. H. and McVicker T. A. (1972).** Polyamine Biogenesis in the Rat Mammary Gland during Pregnancy and Lactation. *Biochem. J.* 130, 71- 76
- 119- **Rüegg U. T. and Russell A. S. (1980).** A Rapid and Sensitive Assay for Arginase. *Analyt. Biochem.* 102, 206- 212.
- 120- **Selamnia M., Mayeur C., Robert V. And Blachier F. (1998).** A-Difluoromethylornithine (DFMO) as a Potent Arginase Activity Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells. *Biochemical Pharmacology* 55, 1241- 1245.
- 121- **Schimke R. T. (1962).** Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* Vol 237, No 2, 459- 467.
- 122- **Shimbayashi K. and Yonemura T. (1970).** An Aspect of Urea Cycle Enzymes in Goat. *Agr. Biol. Chem.* Vol 34, No 11, 1603- 1609.
- 123- **Siegbahn N. and Mosbach K. (1982).** An Immobilized Cyclic Multi- Step Enzyme System- The Urea Cycle. *Febs Letters* Vol 137, No 1, 6- 10.
- 124- **Silva V. (1993).** The Diagnosis of Urea Cycle Disorders. *Lab. Medica International*, Vol 10, No 3, 13- 15.
- 125- **Skrzypek- Osiecka I., Robin Y. And Poremska Z. (1983).** Purification of Rat Kidney Arginases A₁ and A₄ and Their Subcellular Distribution. *Acta Biochimica Polonica* Vol 30, No 1, 84- 92.
- 126- **Sondaç Ü. (1991).** Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- 127- **Spector E. B, Rice S. C. H. and Cederbaum S. D. (1983).** Immunologic Studies of Arginase in Tissues of Normal Human Adult and Arginase- Deficient Patients. *Pediatric Research.* Vol 17, No 12, 941- 944.
- 128- **Spector E. B., Rice S. C. H., Moedjono S., Bernard B. and Cederbaum S. D. (1982).** Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochemical Medicine* 28, 165- 175.
- 129- **Straus B., Cepelak I. and Festa G. (1992).** Arginase, A New Marker of Mammary Carcinoma. *Clinica Chimica Acta* 210, 5- 12.

130- Subrahmanyam T. S. R, Reddy S. R. R. (1986). L-Ornithine and L-Lysine Need Their α -Carboxyl Groups for Effective Inhibition of Bovine Liver Arginase. Indian Journal of Biochemistry et Biophysics Vol 23, 359- 361.

131- Türkoğlu S. and Özer I. (1992). Possible Involvement of Manganese in the Catalytic Mechanism of Bovine Liver Arginase. Int. J. Vol 24, No 6, 937- 939.

132- Yip M. C. M. and Knox W. E. (1972). Function of Arginase in Lactating Mammary Gland. Biochem. J. 127, 893- 899.

133- Wiesinger H. (2001). Arginin Metabolism and the Synthesis of Nitric Oxide in the Nervous System. Progress in Neurobiology 64, 365- 391.

134- Wu C.-W., Chi C.-W., Lin E.-C., Lui W.-Y., P'eng F.-K., Wang S.-R. (1994). Serum Arginase Level in Patients With Gastric Cancer. J. Clin. Gastroenterol., Vol 18, No 1, 84- 85.

135- Wu C.-W., Wang S.-R., Chang T.-J., Lin E.- C., Chang K.-L., Huang M.-H., Lui W.-Y., P'eng F.-K. and Chi C.-W. (1989). Regulation of Arginase Production by Glucocorticoid in Three Human Gastric Cancer Cell Lines. Life Sciences, Vol 51, 1355- 1361.

136- Wu G., Morris S. M. (1998). Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond. Biochem J. 336, 1- 17.

ÖZ GEÇMİŞ

1972 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1989 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. 1994 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora başladım. Halen Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.



TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde ve araştırmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğiyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Necmi Özdemir'e, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sema Temizer Ozan'a, araştırmamın uygulama dönemindeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mine Erişir'e ayrıca araştırmamın her aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşime, aileme teşekkürü bir borę bilirim.

