

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KOYUN DALAK DOKU ARGİNAZİNİN
BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

DOKTORA TEZİ

Fatih Mehmet KANDEMİR

ELAZIĞ-2009

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

Prof. Dr. Necip İLHAN

Doç. Dr. Sema YARALIOĞLU GÜRGÖZE

Doç. Dr. Mine ERİŞİR

TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim boyunca gerek tez konumun seğiminde, gerekse araştırmalarımın her aşamasında ilgisini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Temel Bilimler Bۆlüm Başkanı Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR' e, yardımlarından dolayı Veteriner Faköltesi Dekanımız ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sema Temizer OZAN' a teőekkür eder, ayrıca doktoramın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Mine ERİŞİR' e ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Seval Yılmaz' a, Tez İzleme Komitesinde yer alan Tıp Faköltesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Necip İLHAN' a, katkılarından dolayı Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünde alışan Dr. Mehtap ÖZÇELİK' e, materyal toplamama yardımcı olan Veteriner Hekim Oya HAN ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında görevli Dr. Abdullah DİKİCİ' ye, doktoram boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, tüm sıkıntılarımda yanımda olan aileme ve eşim Dr. Özge KANDEMİR' e teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Üre Sentezi	3
3.2. Amonyak Metabolizması	5
3.2.1. Amonyak Kaynakları.....	7
3.3. Üre Döngüsü	8
3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları.....	8
3.4. Arginaz Enzimi.....	11
3.4.1. Arginazın Moleküler Yapısı ve Kinetik Özellikleri.....	12
4. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4.1. Kimyasal Maddeler.....	23
4.2. Kullanılan Cihazlar.....	23
4.3. Metodlar.....	24
4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	24
4.3.1.1. Kullanılan Ayıraçlar.....	24
4.3.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü.....	27
4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü.....	29
4.3.2.1. Kullanılan Ayıraçlar.....	29
4.3.2.2. Deney Prosedürü.....	30
5. BULGULAR	31
5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti.....	31
5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti.....	31

5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti.....	32
5.4. Mangan İyonlarının Etkisi.....	33
5.5. Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	34
5.6. Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi	35
5.7. Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi	36
5.8. Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	38
5.9.Koyun Dalak Doku Arginazı Aktivitesi Üzerine Etki Eden Bazı Kimyasal Maddeler.....	39
5.9.1. L- Ornitinin Etkisi.....	39
5.9.2. L- Lizinin Etkisi.....	42
5.9.3. L- Kanavaninin Etkisi.....	44
5.9.4. p-Kloromerküri Benzoik Asidin (P-CMBA) Etkisi.....	46
5.9.5. Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)' in Etkisi.....	49
5.9.6. N-Etil Maleimidin (NEM) Etkisi.....	51
5.9.7. Metilen Mavisinin Fotoinaktivasyon Etkisi.....	54
5.10. Koyun Dalak Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi.....	58
6. TARTIŞMA.....	61
7. KAYNAKLAR.....	74
8. ÖZGEÇMİŞ.....	84

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Metal iyonlarının Etkisi	39
Tablo 2: Metilen Mavisinin Farklı Ortamlarda Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi	56
Tablo 3: : Metilen Mavisi, Mangan ve Işığın Koyun Dalak Doku Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkisi	57
Tablo 4: Santrifügasyon yöntemi ile Koyun Dalak Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi	59

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Azotun amino asitlerden üreye geçişi	4
Şekil 2: Amonyak Metabolizması	6
Şekil 3: İdrardaki azot içeren bileşiklerin dağılımı	8
Şekil 4: Üre döngüsü	10
Şekil 5: TDMU Metodu için Standart Üre Eğrisi	29
Şekil 6: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi	31
Şekil 7: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	32
Şekil 8: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	33
Şekil 9: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi	34
Şekil 10: Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	35
Şekil 11: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi İçin Optimal pH' nın Tesbiti..	36
Şekil 12: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	37
Şekil 13: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	38
Şekil 14: L- Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi	40

Şekil 15: L-Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	41
Şekil 16: L-Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.....	41
Şekil 17: L- Lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi	42
Şekil 18: L-Lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	43
Şekil 19: L-Lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.....	43
Şekil 20: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Kanavanin' in İnhibisyon Etkisi	44
Şekil 21: L-Kanavaninin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	45
Şekil 22: L-Kanavanin' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	46
Şekil 23: p-CMBA' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi	47
Şekil 24: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine P-CMBA' in İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	48
Şekil 25: p-CMBA' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	48

Sayfa

Şekil 26: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi	49
Şekil 27: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	50
Şekil 28: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	51
Şekil 29: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine NEM' in İnhibisyon Etkisi	52
Şekil 30: NEM' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	53
Şekil 31: NEM' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	53
Şekil 32: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi	54
Şekil 33: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Değerlendirilmesi	55
Şekil 34: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi	56
Şekil 35: Diferansiyel Santrifügasyon Yöntemi	60

1.ÖZET

Bu çalışma ile koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri ilk kez laboratuvarımızda optimize edilmiştir.

Koyun dalak doku arginazı için preinkübasyon ısısı 58 °C, preinkübasyon zamanı 13 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 9.5 olarak saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi 2 mM MnCl₂ konsantrasyonunda vermiştir. Sonuç olarak enzimin aktivasyonu için Mn⁺² iyonlarının ve 58 °C' de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edilmiştir. Koyun dalak doku arginazının L-arginine karşı olan Km' i 6 mM olarak saptanmıştır.

L- ornitin ve L- lizin gibi L- amino asitler enzim aktivitesini non-kompetitif inhibe etmiştir. Guanidino bileşiklerinden L- kanavanin enzimi non-kompetitif olarak inhibe etmektedir.

EDTA, NEM, p-CMBA ve metilen mavisinin koyun dalak doku arginaz aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir. EDTA enzimi kompetitif inhibe ederken diğerleri non-kompetitif inhibe etmektedir. Koyun dalak doku arginazının yaklaşık % 50' sinin hücre çekirdeğinde, diğer % 50' sinin de sitoplazmada lokalize olduğu tesbit edilmiştir.

Farklı ışık koşullarında metilen mavisinin arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılarak metilen mavisinin, ışığın ve MnCl₂' ün koyun dalak doku arginazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arginaz , kinetik özellikler, koyun dalak dokusu.

2.ABSTRACT

In this study, some kinetic properties of arginase in the sheep spleen tissue was been optimized at first time in our laboratory.

Its was found to be preincubation temperature 58 °C, preincubation period 13 minutes, incubation period 10 minutes and optimum pH 9.5 for sheep spleen tissues. Enzyme achieved its highest activity at 2 mM MnCl₂ concentration. Consequently, it was determined that Mn⁺² ions and preincubation at 58 °C were essential for the activation of the enzyme. Km of arginase in sheep spleen tissue for arginine were determined tobe 6 mM.

L- amino acids, such as L- ornithine and L- lysine inhibited the enzyme activity non-competitively. Among guanidino compounds L- canavanine inhibited the enzyme non-competitively.

EDTA, NEM, p-CMBA and methylene blue were reduced arginase activity of the sheep spleen tissue. The enzyme activity was inhibited competitively by EDTA and non-competitively by the others. It was determined that approximately 50% percent of arginase in sheep spleen tissue was localized in the cell nucleus and the remaining one in the cell cytoplasm.

It was investigated that methylene blue was effected on the arginase activation in different light and were determined that methylene blue, light and MnCl₂ effect photoinactivation of arginase in the sheep spleen tissue.

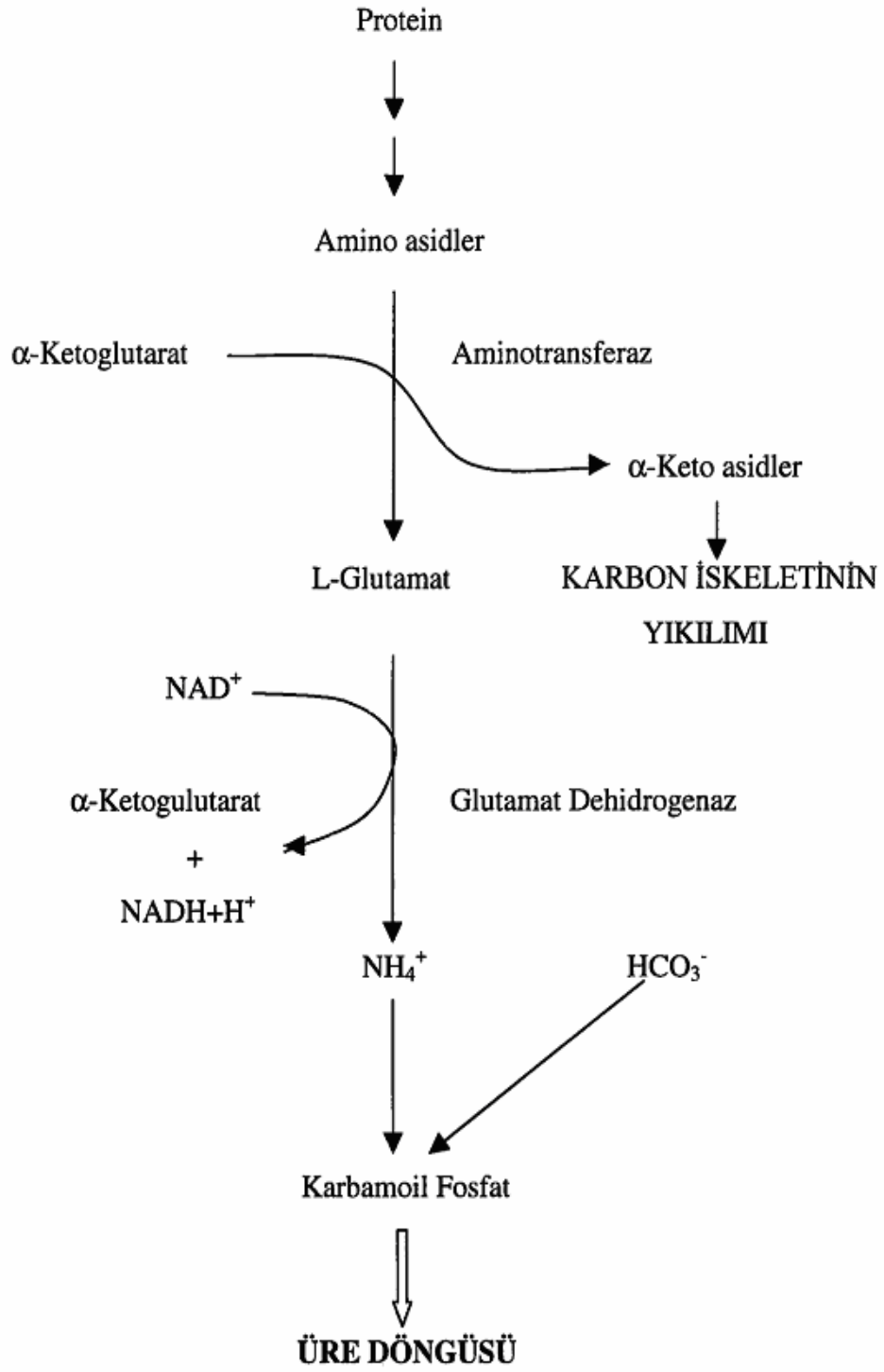
Key Words: Arginase, kinetic properties, sheep spleen tissue.

3.GİRİŞ

3.1.Üre Sentezi

Omurgalılarda besinlerle alınan amino asitlerin büyük bir kısmı protein halinde alınmaktadır. Metabolik yollara ancak peptit ve proteinden ayrılmış serbest amino asitler girmektedir. Bunun içinde besinlerle alınan proteinlerin gastrointestinal kanalda proteolitik enzimler tarafından hidrolize edilmesi ve serbest amino asitlere ayrılması gereklidir (47).

Canlı organizmanın sindirim kanalında emilen bu amino asitlerin bir kısmı plazma ve doku proteinlerinin, bazı enzimlerin, protein yapıları hormonların, pürin ile pirimidinlerin sentezinde ve enerji üretiminde kullanılırken bir kısmı daha fazla parçalanarak organik asitleri, amonyak ve karbondioksiti meydana getirir. Amino asitlerin katabolizması amino gruplarının transferi ile başlar. Amino asitlerin amino grupları transaminasyon reaksiyonları ile α -ketoglutarik asite transfer edilerek L- glutamik asiti meydana getirirler. L- glutamik asit ise hücrelerin sitoplazmalarından mitokondrialarına girerek NAD^+ gerektiren glutamat dehidrogenaz ile tekrar α -ketoglutarik asite ve amonyağa dönüşür (130) (Şekil 1).



Şekil 1: Azotun amino asitlerden üreye geçişi (2)

3.2. Amonyak Metabolizması

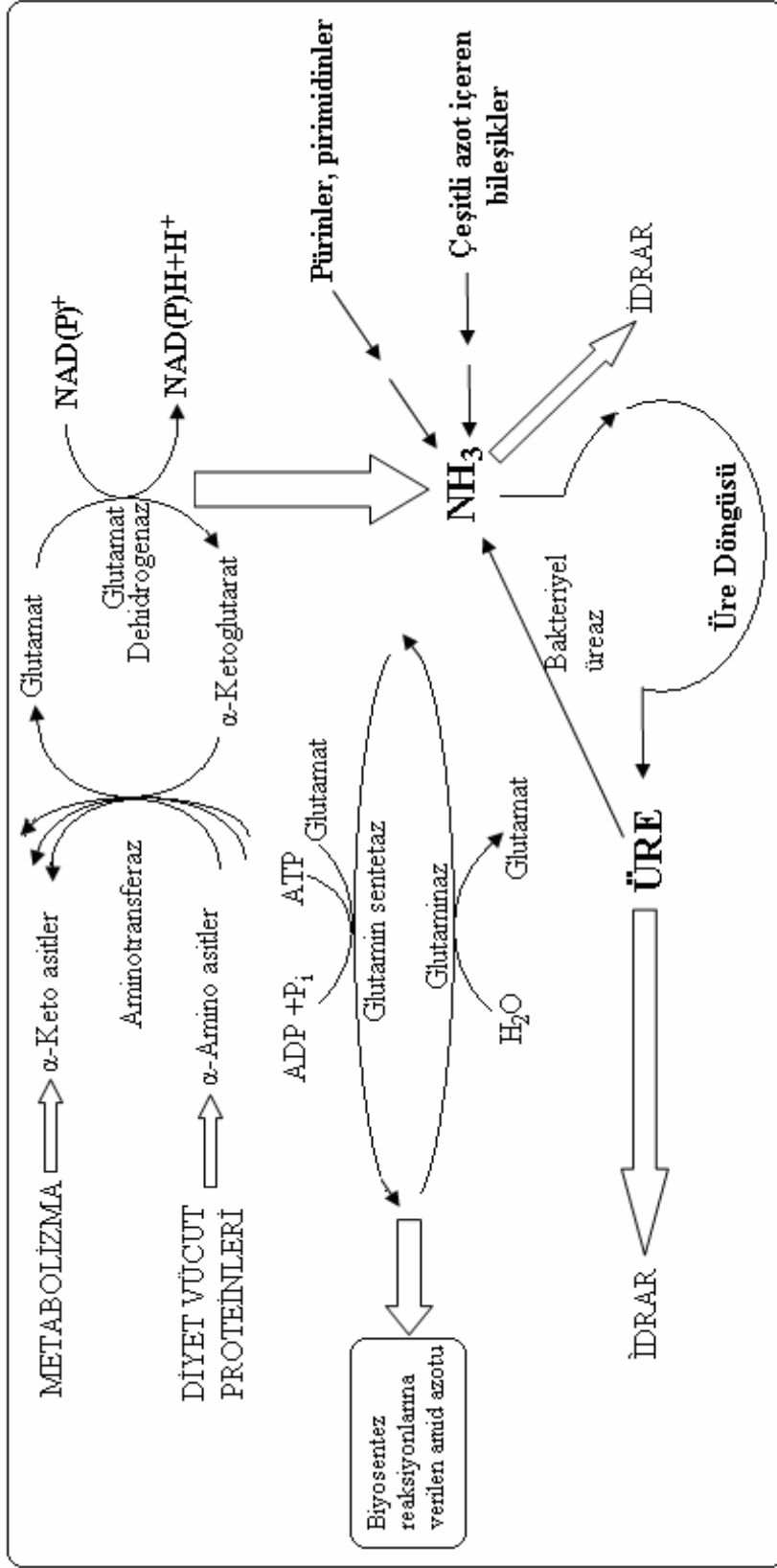
Amino asitlerin yıkımı esnasında açığa çıkan amonyak çok toksik olduğundan en kısa zamanda organizmadan uzaklaştırılır (Şekil 2). Amonyakın atılım şekli canlının yaşadığı ortamdaki su düzeyine bağlı olarak farklılık gösterir. Azot metabolizması son ürününe göre canlılar üç grupta toplanmaktadırlar;

1-Amonotelik Grup: Deniz memelilerinin dışında suda yaşayan bütün canlılar amonyağı bir değişikliğe uğratmadan amonyak şeklinde çıkarırlar.

2-Üreotelik Grup: Suda yaşayan memeliler ve bazı omurgalılar bu sınıfa girerler. Üreotelik canlılarda üre bir döngü sonunda argininin arginaz ile hidrolizinden meydana gelir. Arginin protein sentezi için gerekli bir amino asit olup bütün hücrelerde bulunmaktadır. Üre döngüsü her hücrede bulunmamakla beraber arginaz bir çok hücrede bulunmaktadır. Karaciğer hem arginazı hem de üre döngüsün diğer enzimlerini kapsadığından üre sentezinin önemli bir kısmı bu organda meydana gelir.

3-Ürikotelik Grup: Bütün kanatlılar ve suyun çok az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler amonyağı pürin biyosentezi yoluyla üreye göre suda daha az çözünen ürik aside çevirmektedir (47,89,120).

Amonyak esansiyel bir madde olmasına karşın insan ve hayvanlarda çok düşük serbest amonyak düzeyleri bile ağır serebral bozukluklara yol açar. Amonyak zehirlenmesinin bulguları arasında ellerde titremeler, konuşmanın zayıflaması, görme bozuklukları ve ağır durumlarda koma ve ölüm sayılabilir. Bu nedenle organizmada amonyak bağlanarak süratle zehirsiz hale getirilmelidir (47).



Şekil 2: Amonyak Metabolizması (26).

3.2.1. Amonyak Kaynakları

Amonyak bir takım değişik bileşenlerin metabolizması sonucu elde edilir. Amino asitler amonyağın en önemli kaynağıdır. Çünkü özellikle diyetler protein yönünden zengindir ve fazla miktarda amino asit alınır. Amino asitler deamine edilerek amonyak elde edilir.

1- Amino asitler: Bir çok doku özellikle karaciğer, aminotransferaz ve glutamat dehidrogenaz reaksiyonlarıyla amino asitlerden amonyak üretir.

2- Glutamin: Böbrekler renal glutaminazın etkisiyle glutaminden amonyak oluşturur. Bu amonyağın çoğu idrarla NH_4^+ olarak atılır. Bu mekanizma vücudun asit-baz dengesinin sürdürülmesi için önemlidir. Amonyak aynı zamanda glutaminin intestinal glutaminaz tarafından hidrolizi ile elde edilir. Mukoza hücreleri ile glutamini hem kandan hem de diyet proteinlerinin sindirimi ile elde ederler.

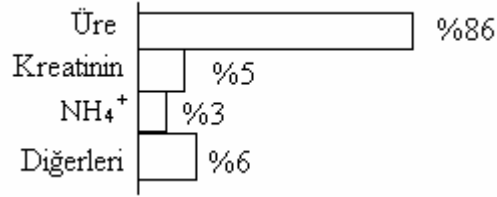
3- Bağırsaklardaki bakterilerin etkisi: Amonyak, bağırsak lumenindeki ürenin bakteriyel yıkımı ile oluşur. Portal vene gečen amonyağın hemen hemen tamamı daha sonra karaciğerde tekrar üreye çevrilir.

4- Aminler: Besinlerle veya hormon ve nörotransmitterler gibi görev yapan monoaminlerden elde edilen aminler amin oksidaz enziminin katalizi ile amonyağa çevrilir.

5- Pürin ve pirimidinler: Pürin ve pirimidin katabolizmasında, halkalardaki amino grupları amonyak olarak salınır (26).

3.3. Üre Döngüsü

Üre amino asitlerden elde edilen amino gruplarının esas atılım şeklidir ve idrarın azot içeren bileşiklerinin % 90' ını oluşturur (Şekil 3). Üre molekülünün içerdiği azotlardan birisi serbest NH_3 ' den, diğeri de aspartatdan elde edilir. Glutamat, amonyak ve aspartat azotunun prekürsörüdür. Amonyak azotunu glutamat dehidrogenazın katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonundan, aspartat azotunu da aspartat aminotransferazın katalizlediği oksaloasetatın transaminasyonu reaksiyonundan elde eder. Ürenin karbon ve oksijeni karbondioksitten elde edilir. Üre karaciğerde oluşur ve daha sonra kanla böbreklere taşınarak idrarla atılır (26).



Şekil 3: İdrardaki azot içeren bileşiklerin dağılımı (26).

3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları:

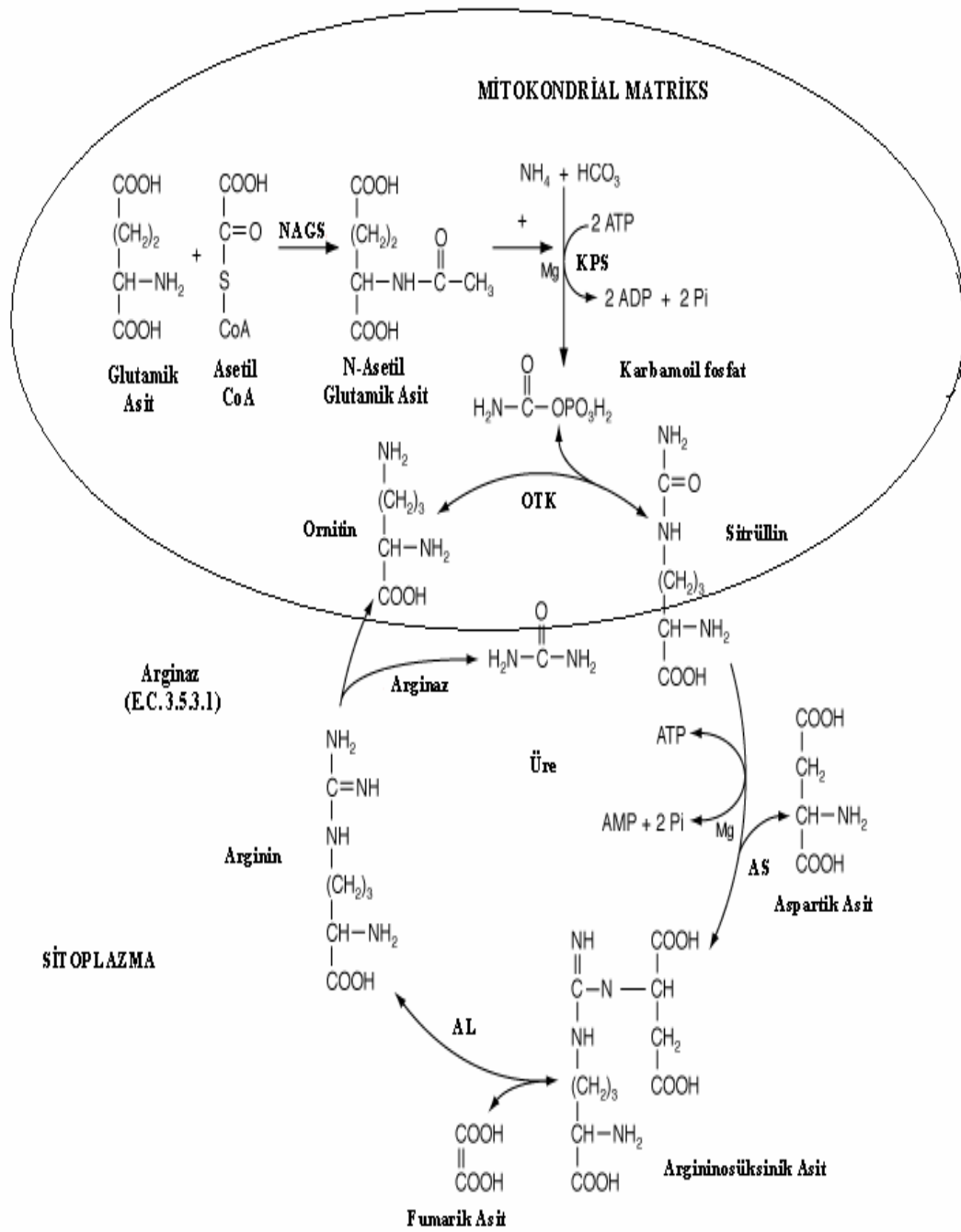
Üre sentezinin ilk iki reaksiyonu mitokondride gerçekleşir. Döngünün diğer enzimleri sitozoldedir (Şekil 4).

Üre sentezi mitokondriyumda başlar. Mitokondriyal bir enzim olan karbamoil fosfat sentetaz enzimi iki mol ATP kullanımı altında bikarbonat ve amonyaktan karbamoil fosfat' ı sentezler. Mitokondriyum zarı bikarbonat için geçirgen değildir. Bu nedenle sitozolden alınan karbondioksit, sadece karaciğer mitokondriyumlarında bulunan karbonik anhidrazın bir izoenzimi aracılığı ile bikarbonata çevrilir ve üre sentezi için hazırlanır. Karbamoil fosfat doğrudan

üreye dönüştürülemez ve bu reaksiyonlar 4 ayrı basamakta gerçekleşir. Öncelikle karbamil fosfatın karbamoil grubu, ornitin karbamoil transferaz enzimi aracılığı ile ornitin üzerine taşınır ve sitrüllin sentezlenir. Oluşan sitrüllin sitozole gönderilir. Üre sentezi reaksiyonları bu aşamaya kadar mitokondriyumlarda gerçekleşirken bundan sonraki aşamalar sitozolde sürdürülür (26,47).

Ornitin yapısındaki karbamoil grubu (sitrüllin) üzerine 1 mol daha amino grubu taşınması gerekir. Fakat bu olay bir transaminasyonla gerçekleştirilemediğinden aspartat döngüsü adı verilen döngüye bağlanır. Bu olayda önce sitrüllinin karbamoil grubu ile aspartik asitin amino grubu arasındaki bağlanmayla arginosüksinik asit oluşur. Reaksiyon arginosüksinik sentetaz tarafından 1 mol ATP kullanımı altında gerçekleşir. Arginosüksinik asit de argino süksinaz tarafından arginin ve fumarik asite parçalanır ve sonuç olarak bu iki reaksiyonla aspartik asitin amino grubunun sitrüllin üzerine taşındığı ve arginin sentezlendiği söylenebilir. Sentezin son basamağında arginin, arginaz enzimi tarafından ornitin ve üreye parçalanır ve döngü tamamlanır. Sitozolde oluşan ornitin sitrüllin' in mitokondriyumdan çıkışıyla dengeli olarak enerji kullanılarak mitokondriyumlara geri döner ve tekrar kullanıma hazır hale gelir (26,47).

Ürenin atılımı: Oluşan üre karaciğerden kana geçerek böbreklere taşınır ve süzülüp idrarla atılır. Karaciğerde sentezlenen ürenin bir kısmı kandan bağırsaklara diffuze olur ve bakteriyel üreazla CO_2 ve NH_3 ' a parçalanır. Bu amonyak kısmen feçesle çıkar, kısmen de kana reabsorbe olur. Böbrek yetmezliği olan hastalıklarda plazma üre seviyeleri artar ve bağırsaklara üre aktarımı da artar. Üreazın etkisi sonucu artan amonyak miktarı bu hastalarda klinik bir sorun oluşturur ve hiperamonyeminin başlıca sebebidir (26).



Şekil 4: Üre döngüsü (5).

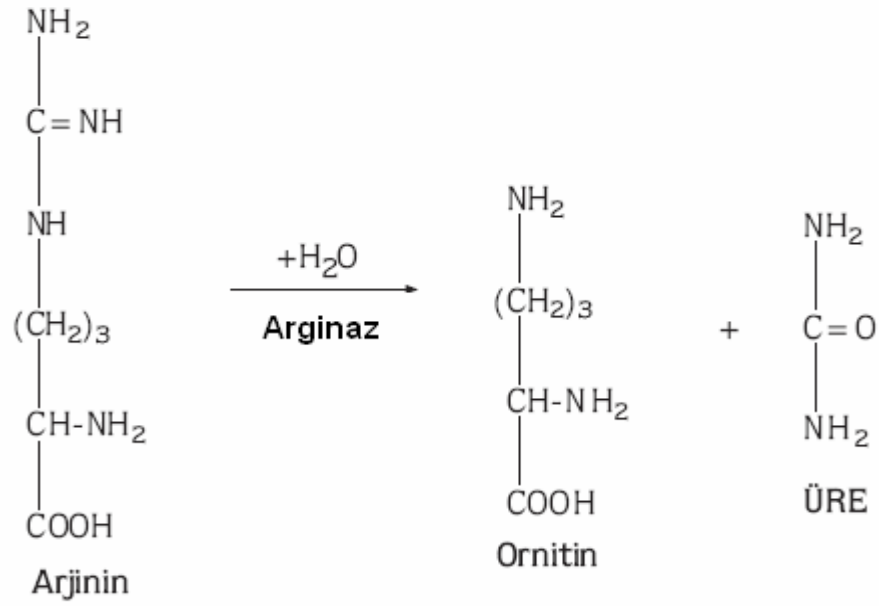
3.4. Arginaz Enzimi

Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından saptanan arginaz (E.C. 3.5.3.1, L- arginin amidinohidrolaz) üre döngüsünün son enzimidir (28). L- argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden arginazın iki izoformu vardır. Arginaz I sitoplazmada lokalize olurken arginaz II mitokondriada bulunmaktadır (64).

Arginaz bakımından en zengin organ üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (84,135). Ancak böbrek, beyin, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi üre döngüsünün görülmediği ekstrahepatik dokularda da arginaz enzimi saptanmıştır (2,4,27,42,49,54,57,68,69,78,93). Arginazın üre döngüsünün olmadığı bu dokulardaki görevinin prolin, glutamat, ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitinin kaynağını sağlamak olduğu bilinmektedir (6).

Poliamin biyosentezinde arginaz enzimi başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Poliaminler (putressin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (109,110).

Arginaz enzimi sadece üretelik canlılarda bulunmayıp, bazı ürikotellik canlılarda ve bitkilerde de varlığı tespit edilmiştir (20,59).



3.4.1. Arginazın Moleküler Yapısı ve Kinetik Özellikleri

İnsan dokularından izole edilen bu izoenzimler 120.000 ± 5000 dalton molekül ağırlığında olup (150), molekül ağırlıkları 39.200 ± 400 dalton olan üç subünitenin bir araya gelmesiyle oluşan trimerik yapı olduğu anlaşılmıştır (19,54).

Değişik memelilerin karaciğerlerinde yapılan araştırmalarda arginazın moleküler ağırlıkları 38500-39700 dalton olan subünitelerin bir araya gelmesi ile moleküler ağırlığı 110.000-150.000 dalton olan tetramerik bir molekül olduğu bildirilmiştir (19,117,124,137). Arginaz enziminin izoenzimlerini saptamak amacı ile çeşitli yöntemler kullanılmış, yapılan çalışmalar sonucunda enzimin 5 izoenzimi tespit edilmiş ve bu izoenzimlerin hücre içi yerleşimlerinin farklı olduğu saptanmıştır (22,68,115,150). Bu enzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir (41,55).

Karaciğer (A₁,A₂,A₃,A₅)

Böbrek, bağırsak, beyin (A₁, A₄)

Eritrosit (A₂,A₄)

Meme bezi	(A ₁ ,A ₂)
Tükürük ve parotis bezi	(A ₁)
Submaksillar tükürük bezi	(A ₃)
Fibroblast	(A ₁ , A ₂ , A ₃)
Plesenta villisi	(A ₁ , A ₂)

5 izoenzimin hepsi bazik protein yapısındadır ve izoelektrik noktaları 7.1-9.3 arasında değişmektedir (150).

Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşiminde de farklılık gösterdiği görülmüştür. Karaciğer için ana form olan A₁ formu sitoplazmada yerleşirken, prolin sentezinde görevli olduğu düşünülen A₄ formu mitokondrilerde yerleşim göstermektedir. Böbrek A₁ formu ise sitoplazmada bulunmaktadır (22,132). Gebelik döneminde insan plesentadaki arginazın izoformlarının yerleşim yerleri incelendiğinde A₁ formunun yalnızca sitotrofoblastlarda, A₂ formunun ise hem sitotrofoblastlarda hem de sinsitotrofoblastlarda yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir (55). *Neurospora crassa*' da arginaz enziminin izoenzimlerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada *N. Crassa*' nın A₁ ve A₂ olmak üzere iki tip izoenzimi olduğu görülmüştür (140). İnsan dokularında da arginazın 5 izoenzimi (A₁, A₂, A₃, A₄, A₅) saptanmıştır (150).

Yapılan bir çok araştırmada farklı doku ve hayvan türlerinde arginaz enziminin kinetik özellikleri ortaya konulmuştur. Arginaz enzim düzeyi beslenmeye ve hormonal değişime bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Arginaz enziminin diyetle alınan proteine bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve bu değişikliğin enzim kinetiği ile ilgili olmayıp enzim molekül miktarının artması şeklinde olduğu belirtilmektedir (126). Yapılan çalışmalarda düşük protein

diyetinde üre döngüsü enzimlerinin azaldığı (129), diyetle fazla protein eklendiğinde üre döngüsü enzim aktivitelerinin düşük proteinli diyetle beslenenlere göre arttığı gözlemlenmiştir (128). Fazla karbonhidratlı yiyeceklerle beslendiğinde üre döngüsü enzimlerinin azaldığı, karbonhidrat tüketimi azaldığında ise bu enzimlerin arttığı tespit edilmiştir (126).

Arginaz enzimi hormonal etkiye bağlı olarakta değişebilmektedir. Kortizolün karaciğer amino asit alımını artırarak amino asit aktive edici enzimlerin düzeylerinde artışa sebep olduğu saptanmıştır (134). Yine kortikosteronun karaciğer arginaz aktivitesini (72), testosteronun böbrek arginaz aktivitesini (66), tiroksin ve hidrokortizonun ince bağırsak ve böbrek arginaz aktivitesini artırdığı (68), insülin ve deksametazonun ise üre döngüsü enzimlerini etkilediği gözlemlenmiştir (53). Gebe koyunların tükürüğünde arginaz aktivitesinin arttığı bunda hormonal değişimlere bağlı olduğu bildirilmiştir (100).

Arginaz enziminin vitaminlerden de etkilendiği literatürlerden anlaşılmaktadır. Yüksek dozda glukokortikoid verilmiş ratlarda artmış arginaz düzeyini E vitamininin düşürdüğü saptanmıştır (40). Yine E vitamini'nin etkisini araştırmak için kerevit rasyonlarına E vitamini ilave edilmiş, yumurtalı kerevitlerde 150 mg/kg, yavru kerevitlerde ise 100 mg/kg dozajının üstünün kaslardaki arginaz aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (39). Testosteron uygulanmış tavşanların böbreklerindeki arginaz aktivitesindeki artışı, E vitamininin azalttığı görülmüştür (37).

Bir metaloenzim olan arginazın tam katalitik aktivite gösterebilmesi ve kuaterner yapısının şekillenmesi için her subünitenin bir mol Mn^{+2} içermesi

gerekir (7,92) . Arginaz aktivitesinin % 90-95' i Mn^{+2} iyonlarına bağımlıdır (70). Mn^{+2} iyonlarının bağlanması enzimin ısıya dayanıklılığını artırmakta (138) ve inhibitörlere karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (116). Ancak enzimin asitle muamelesi sırasında Mn^{+2} iyonlarının enzimi inhibisyona ve denatürasyona karşı koruyamadığı tespit edilmiştir (51).

Brock ve ark. (17), mangandan fakir diyetle beslenen hayvanların karaciğer arginaz seviyesinin düştüğü, plazma amonyak miktarının arttığı bildirilmiştir. Bu durum arginaz aktivitesi ve stabilitesi için kofaktör olarak Mn^{+2} iyonlarına ihtiyaç olduğu ile açıklanmıştır . Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} gibi iki değerlikli iyonların arginaz aktivitesi üzerine etkisinin Mn^{+2} iyonlarına göre daha az olduğu gözlemlenmiştir (28,90). Hg^{+2} , Zn^{+2} ve Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları arginaz aktivitesini düşürmektedirler. Demir askorbat ve demir sistein aktiviteyi artırırken borat ve sitrat gibi arginaz ile kompleks yapan metal iyonlarının aktiviteyi azalttığı tesbit edilmiştir (94).

Arginaz enziminin maksimum aktivitesi için Mn^{+2} iyonları yanında $55\text{ }^{\circ}C$ ' de preinkübasyon gerekmektedir (28,126). Sıçan karaciğer dokusunun $55\text{ }^{\circ}C$ ' de preinkübasyonu enzim aktivitesini Mn^{+2} iyonları varlığında % 110 kat artırmıştır. Enzimin Mn^{+2} iyonları ile preinkübasyonunun maksimum aktivite için gerekli olduğu ilk olarak Schimke (126) tarafından ortaya konmuştur. Basillus anthraksis arginazı için spesifik metal iyonunun Mn^{+2} olduğu, enzimin Mn^{+2} ile aktive edilmediğinde katalitik aktivitesinde düşme olduğu saptanmıştır (142). Kolombo ve Konarska (28) tarafından yapılan bir başka çalışmada Mn^{+2} iyonları varlığında eritrosit arginaz aktivitesi başlangıç enzim aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer enzim

aktivitesini ise 4-5 kat artırdığı bildirilmiştir. İnsan tükürüğünde preinkübasyon sonrası enzim aktivitesinin 3 kat arttığı görülmüştür (67).

Arginazın arginini hidrolize edebilmesi için optimal pH' nın 9.4-9.8 olduğu bildirilmiştir (134). pH 7.4' te enzim aktivitesinde % 10-30 arasında düşme görülürken daha düşük pH' larda enzim aktivitesinin kolayca kaybolduğu saptanmıştır (70,126).

Arginaz enziminin bilinen bir çok inhibitörü mevcuttur. Sıçan karaciğer arginazı üzerine L- amino asitlerden ornitin, lizin, izolösin, sistein, prolin ile adenzin ve inozinin inhibitör etkisi açıklanmıştır (28). Bu amino asitlerden ornitin ve lizin kompetitif, valin, lösin, izolösin ve sistein non-kompetitif inhibisyona neden olmuştur (92). İnsan eritrosit arginazı üzerine yapılan çalışmalarda lizin ve homoargininin kompetitif, kanavanin, oktopin ve argininosüksinik asitin non-kompetitif inhibisyon yaptığı açıklanmıştır (54).

Valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sistein gibi L- amino asitlerin sığır rumen doku arginazını inhibe ettiği, histidin ve hidroksiprolinin enzim aktivitesine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (41). Ornitin ve lizinin koyun meme doku arginazında (102) ve sığır böbrek doku arginazında (58) inhibisyona neden olduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur.

Rat karaciğer ve böbrek arginazı üzerine prolinin etkisi araştırılmış ve prolinin pH 9.5' da böbrek arginazını (A₄) kompetitif, karaciğer arginazını (A₁) ise non-kompetitif inhibe ettiği tespit edilmiştir (22). Bir başka çalışmada ise arginazın bütün L- konfigürasyonundaki alfa amino asitler tarafından inhibe edildiği, monoamino asitlerin non-kompetitif, diamino asitlerin ise kompetitif inhibisyon yaptığı belirtilmiştir (52).

Enzimin –SH gruplarının varlığını göstermek amacı ile yapılan çalışmada saflaştırılmış sıçan karaciğer arginaz enzimi üzerine p-kloro merkür benzoik asit (p-CMBA) ve N- Etil Maleimid (NEM)' in etkisi incelenmiş, p-CMBA ve NEM' in herhangi bir inhibisyona neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum sıçan karaciğer arginaz enziminin fonksiyonel –SH grupları içermediği ile açıklanmıştır (12). Ancak sığır rumen doku arginazı (41), koyun meme doku arginazı (102) ve insan tiroid doku arginazı (57) üzerine p-CMBA ve NEM' in inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. Özdemir ve ark. (104), p-CMBA ve NEM' in M. benedeni arginazı üzerinde inhibisyon etkisi yaptıklarını ortaya koymuşlardır.

Reczkowski ve ark. (121), EDTA ve sitrat gibi şelatörlerin rat karaciğer arginazını inhibe ettiklerini saptamışlardır. Enzime EDTA ile muamele edilmesi enzimin subünitelerine ayrılmasına neden olur. Subüniteler enzimatik olarak inaktiftirler, fakat ortama Mn^{+2} iyonlarının ilavesi, subünitelerin ana formunu oluşturmak üzere tekrar bir araya gelerek enzimin eski aktivitesini kazanmasını sağlar. Mn^{+2} iyonları enzimi subünitelerine ayrılmaktan korur (92).

Ber ve Muszynka (13) sıçan karaciğer arginazını, metilen mavisi ve 150 W ışık altında fotoinaktivasyona uğratmışlar, bu işlemin sonucunda 32 histidil artığından 21' ini tahrip ederek katalitik aktivitenin çoğunun kaybolduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan çalışmalarda bazı kanser vakalarında serum arginaz düzeyi ve doku arginaz düzeyinin arttığı bildirilmiş (80,138,146) ve arginazın kanser olaylarında belirleyici enzim olabileceği düşünülmüştür (138,146,149).

Mide kanserli hastaların mide mukozasında arginaz enzimi ile birlikte glukokortikoid reseptör düzeyinde de artış meydana geldiği gözlenmiş ve arginaz

enziminin de glukokortikoidler gibi immunosupressif ajan olduğu, artan glukokortikoid reseptörleri ile birlikte arginazında kanser etiyojisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (148). Başka bir mide kanserli çalışmada da arginazın kanser hücrelerinin sitoplazmasında normal hücelere göre daha fazla bulunduğu, lenfosit proliferasyonunu güçlüce inhibe ettiği ve hücrel immunitiyi baskıladığı bildirilmiştir (147). Kolorektal kanserli hastaların dokularındaki arginaz aktivitesi normal dokuda bulunan seviyeden 2 kat daha fazladır. Kanserli hastaların sitoplazmasında normal hücrelerden çok daha fazla arginaz bulunur. Kanserli hastalarda hücre immünitesinin zayıflaması, artmış arginaz aktivitesinin immunosupressif etkisine bağlanmaktadır (73). Yine kolorektal kanserli insanların kolorektal dokularında anyonik ve katyonik olmak üzere arginazın iki izoenzimi tespit edilmiş, bu hastalarda serum arginaz seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (114).

Prostatik karsinomalı hastalarda arginaz enzim aktivitesinin yükseldiği açıklanarak spesifik aktivitenin tümörün histolojik yapısı ile ters ilişkide olduğu saptanmıştır (50). Yine prostat kanserli farelerde A II' nin eksikliğinin kanserde ilerlemeye yol açtığı ve bu enzimin prostat kanserinin durumu hakkında belirleyici bir biyomarker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (87,88). Akciğer kanserli hastalarda yapılan araştırmada ise tümör dokusundaki enzim aktivitesinin kontrole göre arttığı, bu artışında poliamin biyosentezindeki hızlanma ile kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir (46). Arginaz aktivitesi ile akciğer hastalıklarının ilgisi araştırılmış ve artan arginaz aktivitesinin akciğerdeki hava yollarının tıkanmasına sebep olduğu, bununda astım, sistik fibrosiz gibi diğer akciğer hastalıklarına yol açabileceği bildirilmiştir (9,76).

Meme kanserli hastaların serum arginaz düzeyleri araştırılmış ve kanserli hastalardaki serum arginaz düzeylerinin sağlıklı kadınlara göre dört kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (112,113,138). Meme kanseri yönünden yüksek riske sahip olan apokrin kist sıvılarında arginaz enzim aktivitesi, düşük risk grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve arginaz enziminin kanser oluşumunda etkili bir ajan olarak gösterilen poliaminlerin sentezini artırarak, özellikle apokrin kiste sahip kistlerde dengenin meme kanseri yönünde kaymasına neden olabileceği kanısına varılmıştır (36).

Eritrosit arginaz düzeyinin persinyöz anemi ve talasemia gibi hastalıklarda, kurşunlu ortamda çalışanlarda ve kurşun zehirlenmelerinde arttığı tespit edilmiştir (43). Miyokard enfarktüsü geçiren hastalarda ilk gün arginaz seviyesinin yüksek olduğu, ikinci gün ilk günden biraz daha düşük olduğu ancak kontrolden yine yüksek olduğu, 10. günde normal seviyesine geldiği görülmüştür (45). Ceylan ve ark. (25), astımlı hastalardan kan alarak plazma arginazına bakmışlar ve hastaların arginaz aktivitesinin kontrole göre daha düşük olduğunu görmüşlerdir. Astımla ilgili başka bir çalışmada ise serum arginaz aktivitesinin arttığı, bununla L-arginin biyoyararlanımını düşürdüğünü, bu yollarda NO yetersizliğinin oluştuğunu, bu arginin metabolizmasında astım tedavisinde yeni bir strateji oluşturabileceğini belirtmişlerdir (85).

Serum arginaz aktivitesi; akut hepatit, safra kanallarının malign tümörleri, karaciğer metastazları ve siroz gibi hücre harabiyetine yol açan karaciğer hastalıklarında artmaktadır (138). Akut ve kronik pankreatitli hastaların serum arginaz aktiviteleri kontrole göre yüksek bulunmuş ve tedaviden sonra arginaz aktivitesi düşürülmüştür (127).

Alkolik hepatitisi hastaların karaciğer biyopsilerinde karbamil fosfat sentetaz ve arginaz aktivite düzeylerinin azaldığı açıklanmıştır (77). Mekanik sarılık oluşturulmuş ratlarda arginaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır (8). Yine safra kanalı ligatüre edilerek deneysel siroz oluşturulmuş ratların karaciğer arginazının kontrole göre azalmış olduğu tespit edilmiştir (144).

Mendez ve ark. (79), karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturdukları ratların karaciğer arginaz aktivitesinin kontrole göre % 33 azaldığını görmüşlerdir. Başka bir çalışmada da tiyosemid ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda arginaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (61). Travmanın ekstrahepatik dokulardaki etkisini incelemek amacıyla ratlarda deneysel travma oluşturulmuş, araştırmanın sonunda dalak ve böbrek doku arginaz aktivitesinin kontrole göre arttığı gözlemlenmiştir (95).

Major depresif hastalarda da serum arginaz aktivitesinin arttığı görülmüş, antidepresan ilaç tedavisinin bu tedaviyi gören hastalarda arginaz aktivitesini artırdığı saptanmıştır (35). Senil kataraktlı insan lenslerinde arginaz aktivitesinin arttığı, karbamil fosfat sentetaz I ve argininosüksinat sentetaz enzim aktivitelerinin azaldığı tespit edilmiştir (119).

Witle ve ark. (145), ratlarda deneysel kolon anastomozu oluşturarak arginaz aktivitesine bakmışlar, kolonun inen ve çıkan kısımlarının anastomozları arasında arginaz aktivitesi yönünden fark bulamamışlar ancak operasyondan sonra arginazın hızla arttığını, 10. günden sonra ise eski seviyesine gelmeye başladığını saptamışlardır.

Atheroskleroz hastalığında endotelial arginaz II aktivitesinde artma olduğu, bununda endotelial fonksiyon yetersizliğinin patofizyolojisinde ve

atheroskleroz hastalığının tedavisinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (125). Kalp yetersizliği olan tavşanlarda yapılan çalışmada ise miyokardial arginaz II' nin kontrole göre arttığı bildirilmiştir (1).

Bachetti ve ark. (7) bildirdiğine göre insan göbek kordonu epitelyal hücrelerinin L- argininden yararlanabilmesi için arginazın önemli bir metabolik yol olduğu ve normal proliferasyonu için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca yangı' nında arginaz aktivitesini artırdığı belirtilmiştir. Yine aynı bilim adamları endotelial arginaz aktivitesindeki çeşitliliğin kardiyovasküler fonksiyon, angiogenez ve yara iyileşme sürecinde bir gösterge olabileceğini tahmin etmektedirler. Glomerulonefritis vakalarında da arginaz enzim düzeyinde artmalar olduğu bildirilmiştir (143).

Gebelikle arginaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacı ile ratlarda yapılan bir çalışmada gebeliğin 12. ve 21. günlerinde düşük aktivite, 19. gününde ise en yüksek arginaz aktivitesi saptanmıştır (123). Gebe koyunların plasentasında yapılan başka bir çalışmada da plasental kotiladonlardaki arginaz aktivitesinin gebeliğin son üç ayında arttığı bildirilmiştir (34). Diabetin doku arginaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için ratlarda streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ve diyabetik ratların karaciğer, böbrek ve dalak dokusundaki arginaz aktivitesi kontrole göre yüksek bulunmuştur (81). Tip II diyabetik hastalarda plazma arginaz seviyesinin kontrole göre % 50 arttığı tespit edilmiştir (62).

Paraziter enfeksiyonlarda da arginaz aktivitesi değişebilmektedir. Fascioliosisli koyunların karaciğer arginaz aktivitesi kontrole göre düşük bulunmuştur (11). Yine yapılmış bir başka çalışmada da T.annulata ile enfekte sığırların eritrositindeki arginaz enziminin kontrol grubuna göre daha düşük

olduğu bildirilmiştir (101). Chagas hastalığına neden olan *Trypanosoma cruzi* ile enfekte farelerin kalplerindeki Th2 sitokinlerinin arginaz üretimini artırdığı tespit edilmiştir (30). *Fasciola gigantika* ile enfekte koyun karaciğerinde de arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur (82).

İnsanda arginazı şifreleyen iki farklı gen lokusunun olduğu bilinmektedir (135,136). Birinci lokus eritrosit ve karaciğerdeki enzim aktivitesinin % 90' indan böbrek, mide, bağırsak ve beyindeki aktivitenin yaklaşık % 50' sinden sorumludur. İkinci lokus ise karaciğer ve eritrositlerdeki aktivitenin % 5' inden sorumlu iken mide, bağırsak ve beyindeki aktivitenin %50' sinden sorumludur (136).

Hiperarginemia, arginaz enzimi eksikliği sonucu oluşan, otozomal resesif genin neden olduğu kalıtsal bir hastalıktır. Zeka geriliği, gelişim bozukluğu, hepatomegali, konvulsiyon, elektroensefologram (EEG) da pikler, aşırı refleksler gibi klinik bulgularla karakterizedir. Hastalıkta biyokimyasal laboratuvar bulguları olarak hiperarginemia, hiperammonemia, lizinüri, sistinüri, hiperglutaminemia görölmekte, idrarda orotik asit, urasil, üridin miktarı normalin üstüne çıkmaktadır (29).

Bu çalışmada daha önce üzerinde herhangi bir araştırma yapılmamış olan koyun dalak doku arginazının kinetik özelliklerinin ilk kez ortaya konulması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma materyali olan koyun dalağı Elazığ Elkas tesislerine kesim için getirilen 2-3 yaşlarındaki, yetiştirme şartları (barınak, bakım ve çevre koşulları) ve beslenme koşulları birbirine benzeyen, aynı sürüdeki 20 adet Akkaraman ırkı koyunlardan temin edilmiştir. Kesimden sonra alınan dalak dokusu üzerindeki kan ve pıhtıdan temizlendikten sonra %0.9' luk soğuk NaCl çözeltisi içerisinde behere aktarılmış ve kırılmış buz içerisinde hızlı bir şekilde laboratuara ulaştırılmıştır. Alınan dokular ya hemen analize tabi tutulmuş yada daha sonra kullanılmak üzere -18 °C' de derin dondurucuda (Deep-freeze) saklanmıştır.

4.1. Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan L-arginin, Diasetil Monoksim, Tiyosemikarbazid, Sülfürik Asit, HCl, Mangan Klorür, L- ornitin, L-lizin, L-kanavanin, EDTA, p-CMBA, N- Etil Maleimid, Metilen Mavisi, Sükroz ve KCl gibi kimyasal maddeler Sigma, Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup piyasadan sağlanmıştır.

4.2. Kullanılan Cihazlar

- 1- Cam-cam ve cam-teflon (Pottern-Elvehjem) homojenizatör
- 2- UV/VİS Spektrofotometre (Shidmadzu UV 240)
- 3- Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 800 R)
- 4- pH metre (pH- Meter CG 810)
- 5- Sıcak su banyosu (Benmari)
- 6- Vorteks
- 7- Mikser
- 8- Deep-freeze (Bosch)

4.3. Metodlar

4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil monoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür (44). Diasetilmonoksim, üre ile direk reaksiyona girmez. Önce asit ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil, asit solusyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan Diazin' i meydana getirir. Oluşan sarı rengi kararlı kılmak için Tiyosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (60).

4.3.1.1. Kullanılan Ayraçlar

1- 120 mM L-Arginin Solusyonu:

2.52 g L- arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66 g/mol) 100 ml distile suya tamamlanarak pH' sı 9.5' a getirilmiştir.

2- Üre Standartı (0.1 µmol üre/ ml):

3 mg üre (Mol. Ağ. 60.06 g/mol), 100 ml 0.016 M Benzoik asit içinde çözülür. Stok olarak kullanılan bu çözelti, deney sırasında 1/5 oranında sulandırılarak 0.1 µmol üre/ ml (0.6 mg/dl)' lik üre standartı elde edilir. Bu çözelti +4 °C' de saklanmıştır.

3- Asit Karışımı:

a) 0.120 M $FeCl_3$ / % 56.7 H_3PO_4

3.24 g $FeCl_3$ (Mol. Ağ. 270.3 g/mol) bir miktar distile su ile çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml % 85' lik H_3PO_4 ' den (d = 1.71, Mol. Ağ. 98.0 g /mol) ilave edilir. Distile suyla 100 ml' ye tamamlanarak oda ısısında saklanır.

b) 999 ml % 20 (v/v) ' lik H_2SO_4 (d = 1.84, Mol. Ağ. 98.08 g/mol) üzerine 1.0 ml yukarıda hazırlanan 0.120 M $FeCl_3$ / % 56.7 H_3PO_4 çözeltisinden ilave edilerek oda ısısında saklanır.

4- Renk Ayracı:

0.0036 M Tiyosemikarbazid (TSC, Mol. Ağ. 91.14 g/mol) ve 0.0617 M Diasetilmonoksim (DAM, Mol. Ağ. 101.1 g/mol) içermektedir. 0.328 g TSC ve 6.23 g DAM bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile litreye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklanmıştır.

5- 10 mM $MnCl_2$ Çözeltisi:

0.99 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Mol. Ağ. 197.9 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 500 ml' ye tamamlanarak +4 °C' de saklanmıştır. Çalışmada bu stok çözeltiden sulandırma yapılarak istenilen konsantrasyonda kullanılmıştır.

6- Karbonat Tampon Çözeltisi (200 mM $NaHCO_3/Na_2CO_3$):

a) 2.12 g Na_2CO_3 (Mol. Ağ. 105.99 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml' ye tamamlanır.

b) 1.68 g $NaHCO_3$ (Mol. Ağ. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml' ye tamamlanır.

Tampon hazırlarken 200 mM' lık $NaHCO_3$ çözeltisi behere konarak Na_2CO_3 ile pH' sı 9.5' a ayarlanır ve solüsyon +4 °C' de saklanır.

7- Tris-HCl Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 7.1-8.9)

6.07 g Tris (Mol.Ağ. 121.14 g/mol) 250 ml' ye tamamlanarak HCl ile (d=1.19, Mol.Ağ.34.46 g/mol, % 37'lik) 7.1 ile 8.9 arasında değişen pH' larda çözeltiler hazırlanır.

8- Glisin-NaOH Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 8.78-10.6)

a) 3.76 g Glisin (Mol.Ağ. 75.07 g/mol) bir miktar distile suda çözünür ve 250 ml' ye tamamlanır.

b) 2 g NaOH (Mol.Ağ.40 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra 250 ml' ye tamamlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanırken 200 mM' lık Glisin çözeltisi behere konmuş ve 200 mM' lık NaOH çözeltisi ile pH'sı 8.78-10.6 arasında değişen çözeltiler hazırlanmıştır.

9- 40 mM' lık L- Ornitin çözeltisi:

Molekül ağırlığı 168.6 g olan L- ornitinden 0.674 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 40 mM' lık stok çözelti hazırlanmıştır.

10- 40 mM' lık L-Lizin Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 182.7 g olan L- lizinden 0.731 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 40 mM' lık stok çözelti hazırlanarak kullanılmıştır.

11- 6 mM' lık p-CMBA çözeltisi:

357.2 g molekül ağırlığındaki p-CMBA'den 0.214 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 6 mM' lık stok çözelti hazırlanmıştır.

12- 2 mM' lık Metilen Mavisini Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 319.86 g olan Metilen mavisinden 0.064 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 2 mM' lık stok çözelti hazırlanmıştır.

13- 280 mM' lık N-Etil Maleimid Çözeltisi:

125.13 g molekül ağırlığındaki N-Etil Maleimid' den 3.5 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 280 mM' lık stok çözelti hazırlanarak kullanılmıştır.

14- 2 mM' lık EDTA Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 292.25 g. olan EDTA' dan 0.058 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 2 mM' lık stok çözelti hazırlanmıştır.

15- 1.2 mM' lık L- Kanavanin Çözeltisi:

Molekül ağırlığı 274.2 g olan L- kanavanin' den 0.033 g alınıp 100 ml' ye tamamlanarak 1.2 mM' lık stok çözelti hazırlanmıştır.

16- Sükroz Çözeltisi (0.25 mM):

Molekül ağırlığı 342.30 g olan sükrozdan 21.39 g alınarak 250 ml' ye tamamlanmıştır.

17- KCl Çözeltisi (0.16 M):

74.56 g molekül ağırlığındaki KCl' den 3 g alınarak 250 ml' ye tamamlanmıştır.

4.3.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü

Alınan doku örnekleri üzerindeki kan ve pıhtılar uzaklaştırıldıktan sonra iki süzgeç kağıdı arasında kurutularak 1 g tartılmış (ağırlık/hacim) ve distile su ile 6 ml' ye tamamlanmıştır (sulandırma oranı 1/6). Örnekler omni-mikserde parçalandıktan sonra Potter-Elvehjem (cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenat + 4 °C' de 14000 x g' de 14 dakika Nüve marka santrifüjde santrifügasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlemden sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöküntü kısmı) birbirinden ayrılmış, süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Her bir arginaz aktivite düzeyi 3 örnek, 2 zero time blank tüpü kullanılarak saptanmıştır.

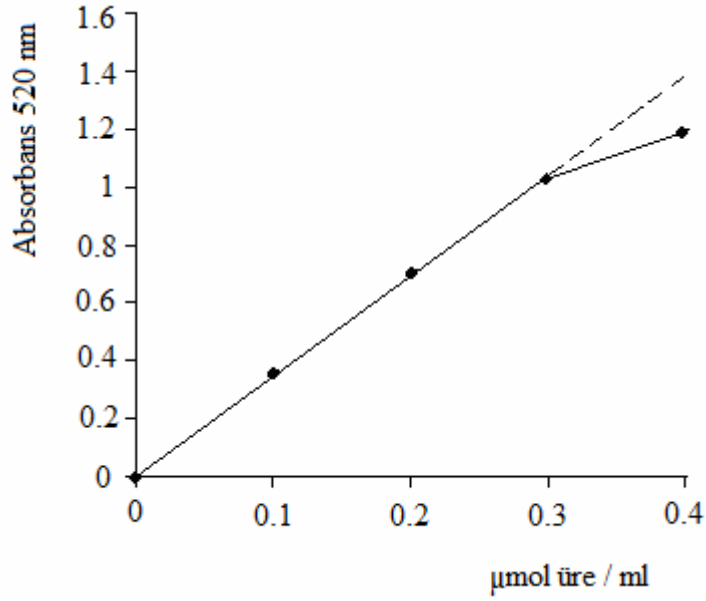
Süpernatantın her ml' si için 3 ünite Jack-Bean üreaz ilave edilerek 37 °C' de 15 dakika inkübasyona sokularak endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır

(83). Örnekler daha sonra 2 mM $MnCl_2$ çözeltisi ile 1 x 40 (v/v) oranında sulandırılarak 58 °C' de 13 dakika metabolik su banyosunda tutulmuş ve böylece preinkübasyon işlemi sağlanmıştır. Preinkübasyondan sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Tüp içindeki enzimatik karışım 1 ml olup 120 mM' lık L- arginin' den (pH 9.5) 0.3 ml ve 200 mM' lık karbonat tamponundan (pH 9.5) 0.4 ml içerecek şekilde düzenlenmiştir. Tüplere önce L- arginin, sonra karbonat tamponu daha sonra da üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3 ml eklenerek 37 °C' de 10 dakika sallantılı metabolik su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır. 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda tüplere 3 ml asit karışımı ilave edilerek enzimatik tepkime durdurulmuştur. Asit ilavesinden sonra tüplere 2'şer ml renk ayırıcı eklenmiş ve tüpler vorteksle karıştırılarak 10 dakika kaynar su banyosunda tutulmuş ve renk oluşumu sağlanmıştır.

Kaynar su banyosundan çıkan tüpler soğutularak UV/VİS Spektrofotometrede (Shimadzu UV-240), 520 nm' dalga boyunda örnekler okunmuş, üre miktarları sıfır zaman körlerinin (zero time blank) absorbanlarının çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir. Bu işlemler standart çalışma tüplerine de uygulanmış, enzim kaynağı yerine 0 ile 0.6 μ mol arasında değişen üre standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 5).

Çalışmada, 1 ünite enzim: 1 saatte, 37 °C' de L-argininden 1 μ mol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite μ mol üre / saat / mg protein olarak ifade edilmiştir.



Şekil 5: TDMU Metodu için Standart Üre Eğrisi

4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız homojenatta protein miktarı modifiye Lowry (75) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayıracı peptit bağları ile kompleks yapar ve prensip olarak Bakır + protein \longleftrightarrow Bakır – protein basit ilişkisini içerir. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm’ de okunur. Bu metod biüret reaksiyonundan 100 kat daha hassastır.

4.3.2.1. Kullanılan Ayıraçlar

1-Alkali Bakır Ayıracı: 10 g Na_2CO_3 , 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml’ ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2- Fenol Ayıracı : 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracından 3.75 ml alınarak distile su ile 67.5 ml' ye tamamlanır. Bu çalışma örnek sayısına göre günlük olarak hazırlanmalıdır.

3- Protein Standartı: 50 µg BSA (Sığır serum albumin)/ ml

4- Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılarak) örnek

4.3.2.2. Deney Prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Alkali Bakır Ayıracı (ml)	1.0	1.0	1.0
Protein Standartı (ml)	-	1.0	-
Örnek (ml)	-	-	1.0
Distile su (ml)	1.0	-	-

Tüpler karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında beklenir.

Fenol Ayıracı (ml)	4.0	4.0	4.0
---------------------------	-----	-----	-----

Tüpler iyice karıştırılır ve 5 dakika 55 °C' de bekletilir. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutularak örnek ve standart tüpleri 650 nm' de kör tüpüne karşı okunur.

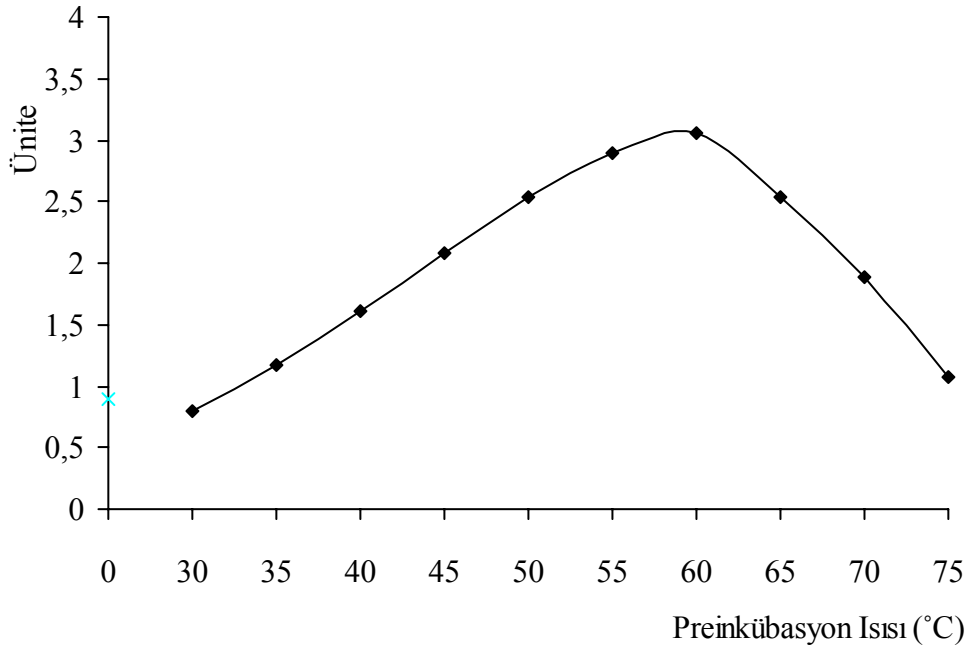
Hesaplama

$\mu\text{g protein/ ml} = (\text{Örnek Abs./ Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$

5. BULGULAR

5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti

Koyun dalak doku arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır. 1 mM $MnCl_2$ varlığında 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C'lerde enzim preinkübasyon ısısına tabii tutulmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 55-58 °C arasında saptanmış ve bundan dolayı enzimin aktivasyonu için preinkübasyon ısısı 58 °C olarak kabul edilmiştir (Şekil 6).

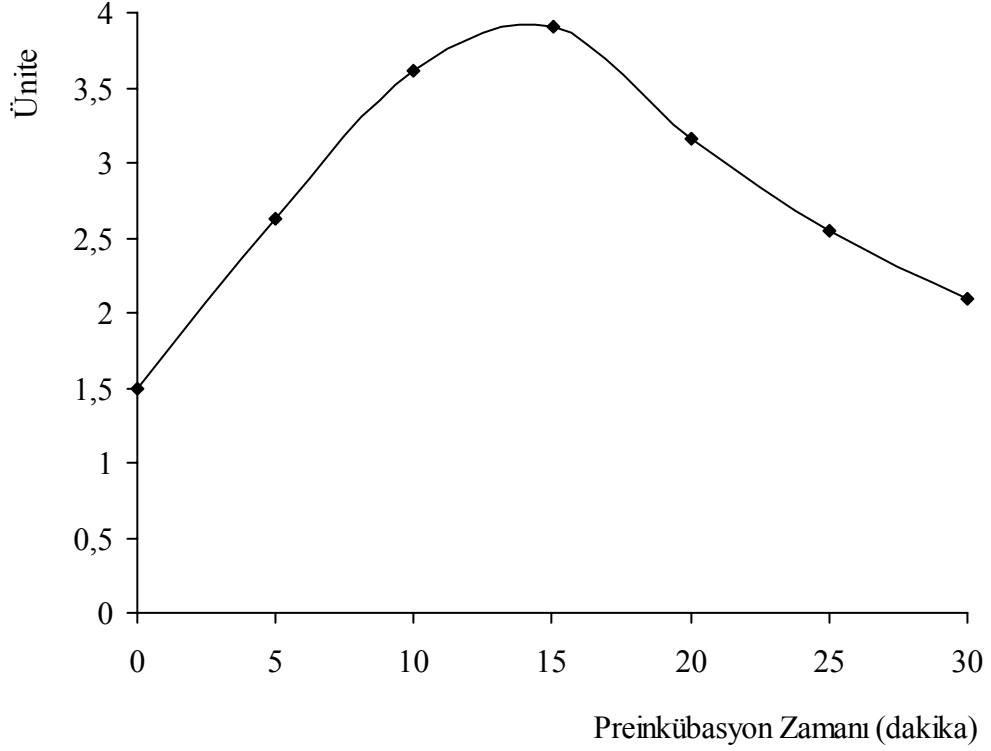


Şekil 6: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti

Koyun dalak doku arginazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak aktivitesi araştırılmış, 1 mM $MnCl_2$ varlığında ve 58 °C preinkübasyon ısısında, 0-30 dakikalık zaman aralıklarında enzimin aktivitesi incelenmiştir. Enzimin

maksimum aktiviteye 13 dakika'da ulaştığı görülmüş ve preinkübasyon süresi 13 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 7).

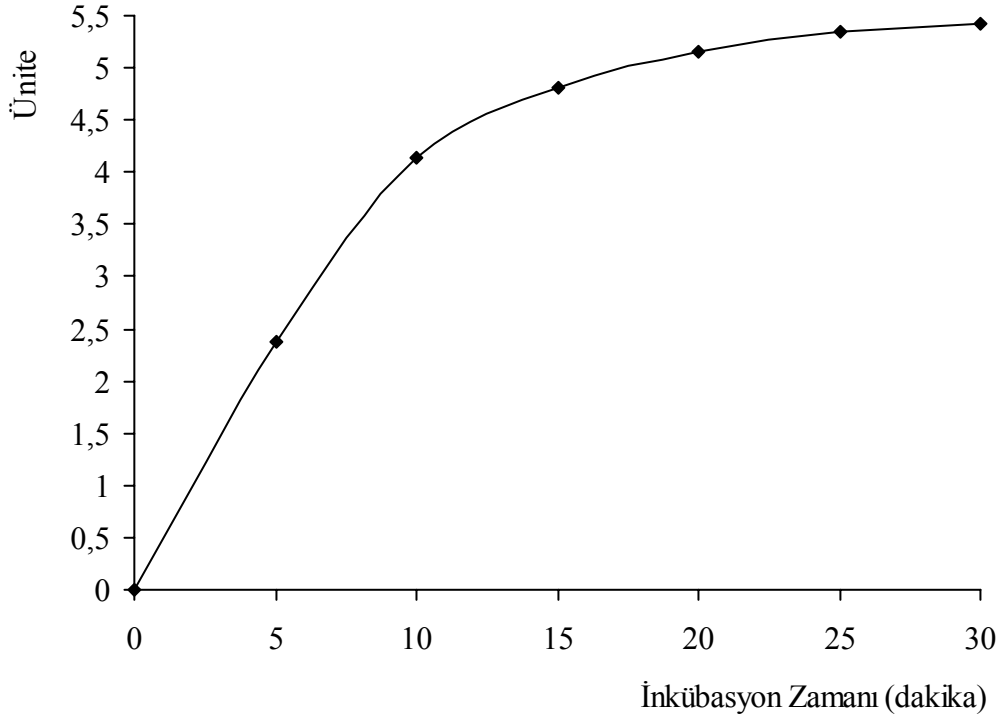


Şekil 7: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti

Koyun dalak doku arginazı için optimum inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynağı 0-30 dakikalık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu argininin hidrolizi izlemiştir. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 8' de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 10. dakikaya kadar doğrusallığını korumuş, bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir

görünümüne bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.

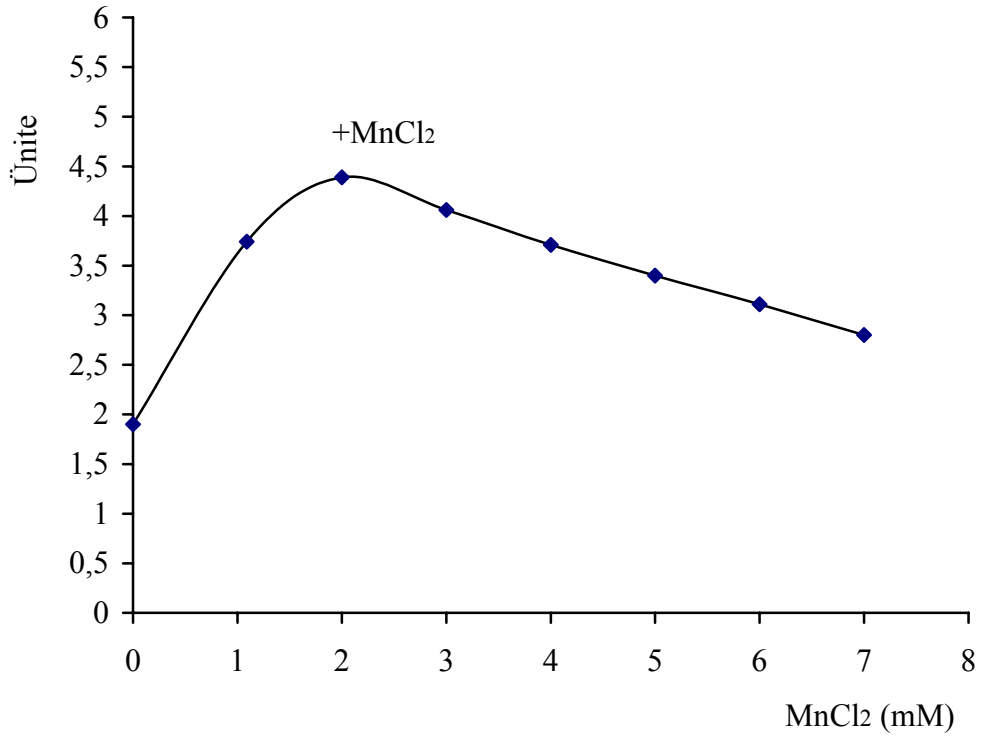


Şekil 8: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.4. Mangane İyonlarının Etkisi

Mangane iyonları arginaz enzimi için gereklidir. Bu yüzden arginaz aktivitesi üzerine mangane iyonlarının etkisini araştırmak için 0-8 mM konsantrasyonları arasında değişen $MnCl_2$, preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Preinkübasyon ortamına Mn^{++} katılmadığı kontrol grubunda enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonları ilave edildiğinde aktivitenin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesi özellikle 1.5-2 mM konsantrasyonları arasında yükselmiş, 2 mM'lık $MnCl_2$

konsantrasyonundan sonra aktivite düşmüştür. Enzimin en yüksek aktiviteyi 2 mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonunda göstermesinden dolayı koyun dalak doku arginazı için en uygun $MnCl_2$ konsantrasyonu 2 mM olarak kabul edilmiştir (Şekil 9).

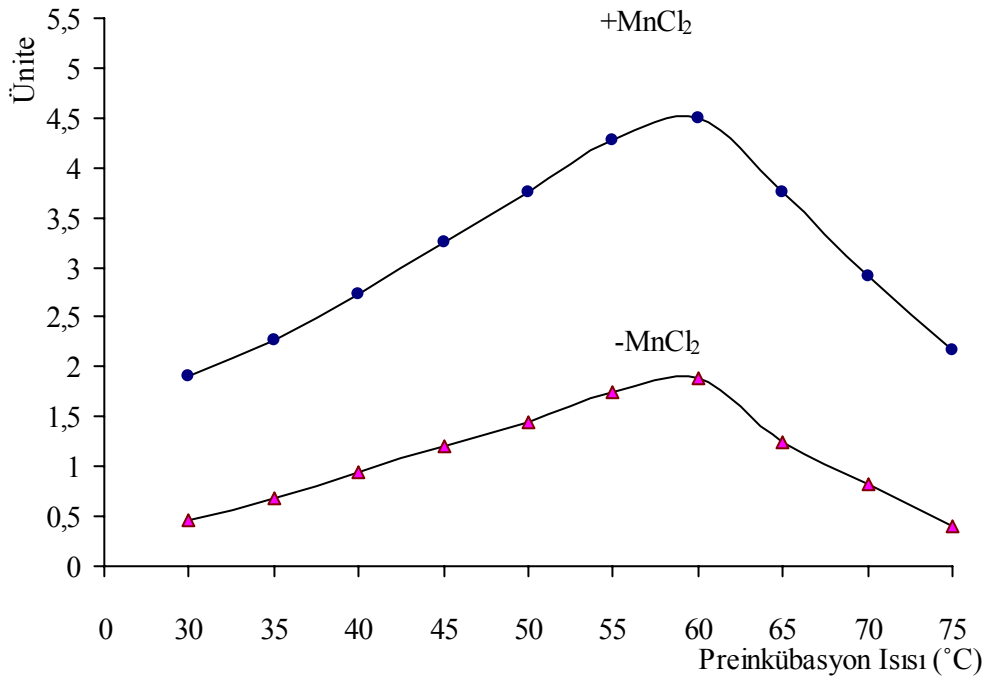


Şekil 9: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

5.5. Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Dalak 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) enzim kaynağı preinkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuçta $MnCl_2$ varlığında uygulanan

preinkübasyonla enzim aktivitesinin çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. $MnCl_2$ ' süz preinkübasyona tabi tutulan enzim kaynağından elde edilen aktivite , $MnCl_2$ ' lü preinkübasyona tabi tutulan enzim kaynağından elde edilen aktivitenin sadece 1/3' ü kadar olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 10).

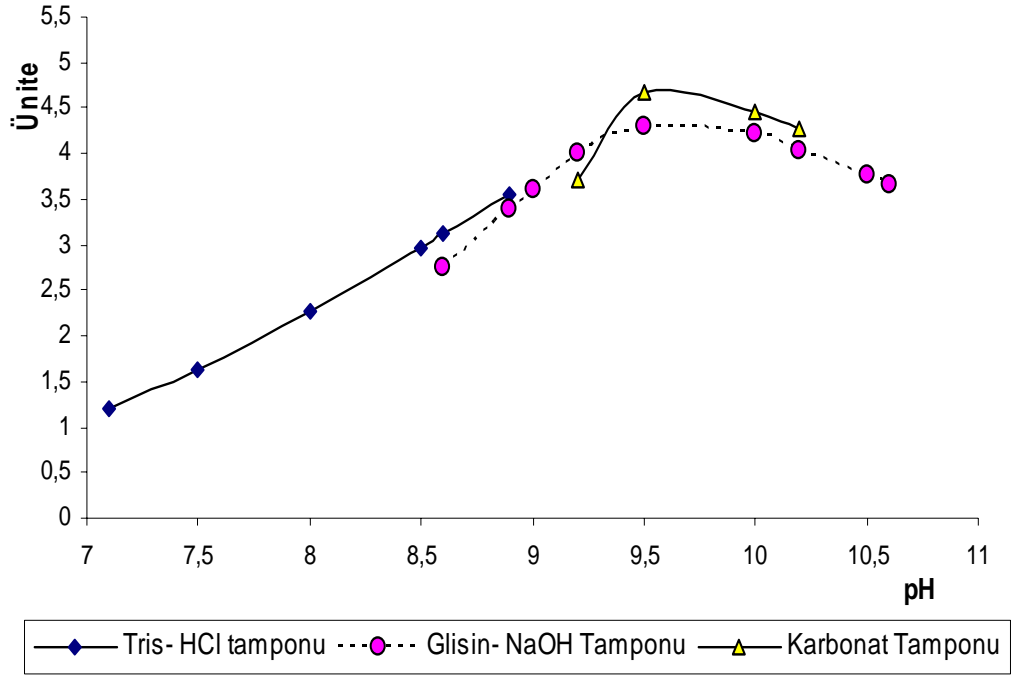


Şekil 10: Mangan İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

5.6. Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi

Koyun dalak 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 7.1-8.9 arasında aktivite gösteren Tris-HCl tamponu, pH 9.2-10.2 arasında aktivite gösteren Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu ve 8.78-10.6 pH' larında aktivite gösteren Glisin-NaOH tamponu kullanılarak

belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 9.5’ da karbonat tamponu varlığında elde edildiği için koyun dalak doku arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun karbonat tamponu, optimal pH’ nın da 9.5 olduğu kabul edilmiştir (Şekil 11).

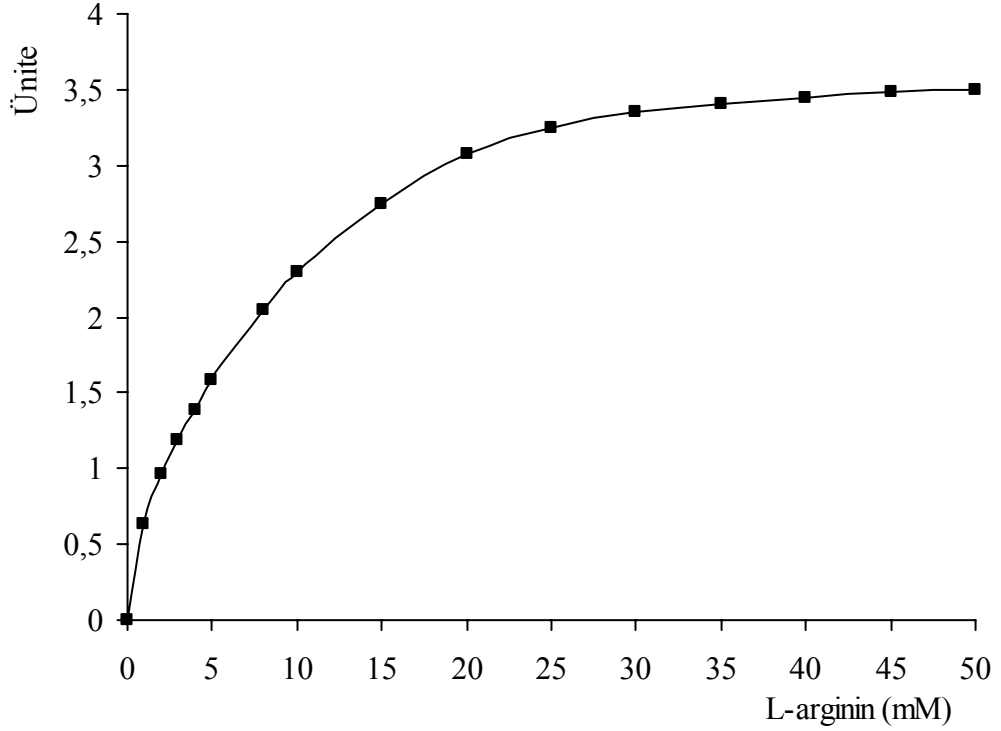


Şekil 11: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi için Optimal pH' nın Tesbiti (Argininin pH' sı tamponların pH' ları ile aynı tutulmuştur)

5.7. Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

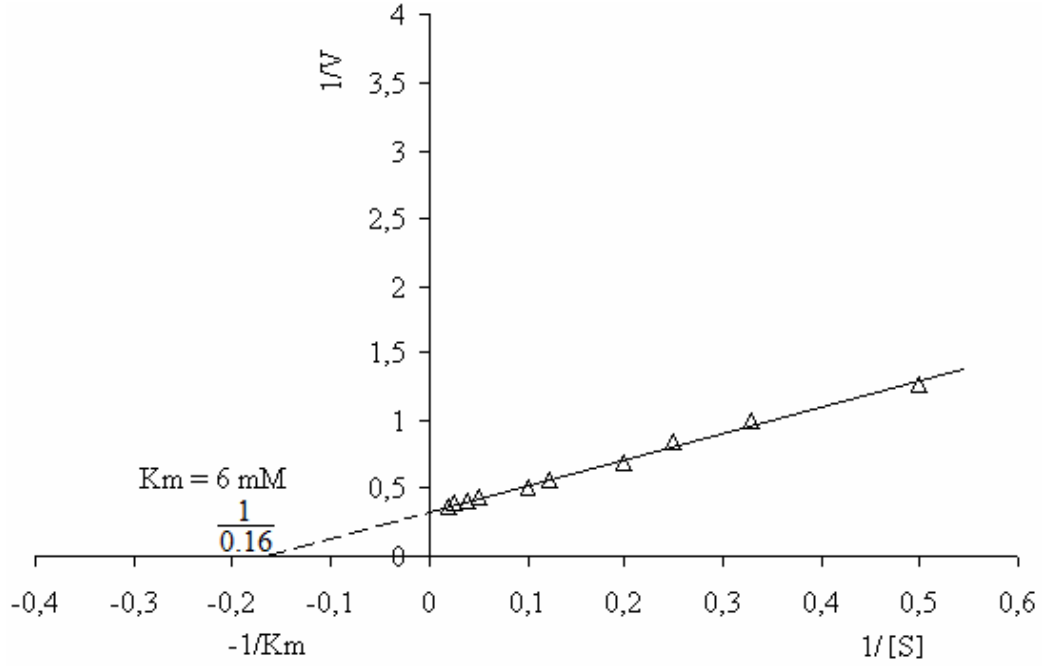
Koyun dalak doku arginazı için optimal şartlar tesbit edildikten sonra, arginazın substratı olan argininin değişik konsantrasyonlarındaki (0-50 mM) V_0 hızları Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir. Reaksiyon hızı 2 mM' a kadar lineerlik gösterirken (**I. Mertebe Kinetiği**), daha sonra yerini hiperbolik bir görünüme (**Karışık Mertebe Kinetiği**) bırakmış, enzim 35 mM' lık substrat

konsantrasyonunda ise enzim doygunluğa (**Sıfır Mertebe Kinetiği**) ulaşarak reaksiyon sabit hızla devam etmiştir (şekil 12).



şekil 12: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi

Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı değişimi Lineweaver-Burk Eğrisi'ne göre değerlendirildiğinde koyun dalak doku arginazının L-arginine karşı K_m 'inin 6 mM sınırları içerisinde olduğu belirlenmiştir (şekil 13).



Şekil 13: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

5.8. Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine Bazı Metallerin Etkisi

Koyun dalak doku arginaz aktivitesine farklı metal iyonlarının etkisini araştırmak için Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Li^{+1} , Al^{+3} , Mg^{+2} , Mo^{+6} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sn^{+2} , Pb^{+2} ve Ag^{+2} metal iyonları 2 mM'lık konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar kontrole (hiçbir metal iyonu içermeyen) göre değerlendirilmiştir.

Arginaz en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} metal iyonu varlığında göstermiştir. % arginaz aktivitesi Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Li^{+1} , Al^{+3} , Mg^{+2} metal iyonlarında artmıştır. Buna karşın Mo^{+6} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sn^{+2} metal iyonları varlığında arginazın % aktivite olarak azaldığı tespit edilmiştir. Arginaz, Pb^{+2} ve Ag^{+2} metal iyonları varlığında ise aktivite göstermemiştir (Tablo 1).

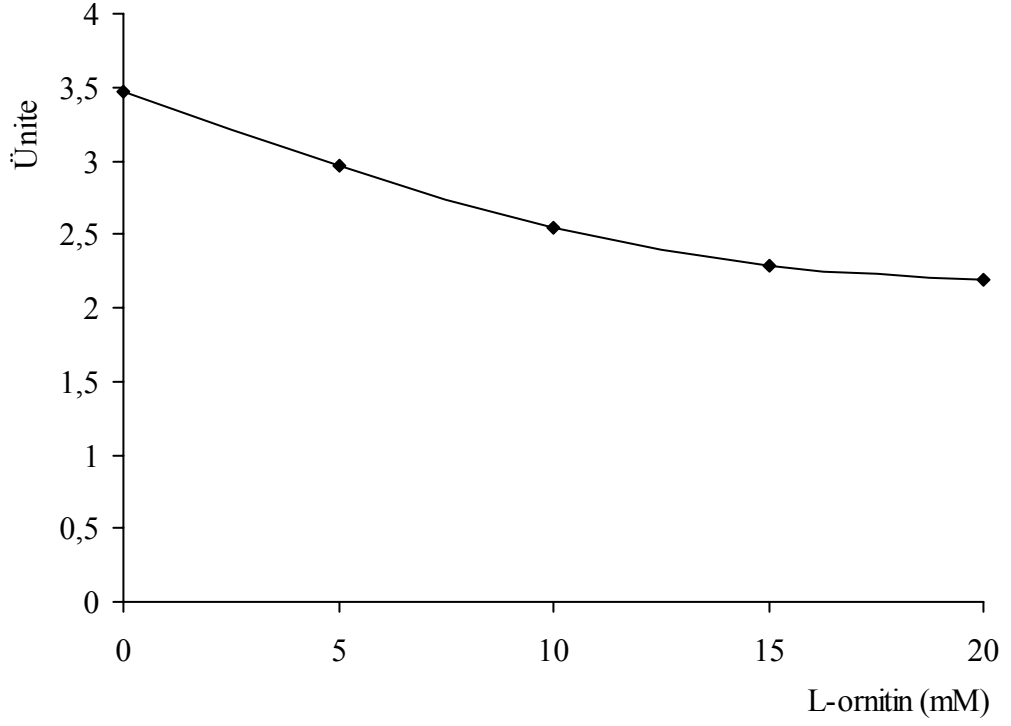
Tablo 1: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Metal İyonlarının Etkisi

Metal İyonları	% Aktivite
Kontrol	100
MnCl ₂	1645
NiSO ₄	1193
LiSO ₄	1080
CdCl ₂	603
CoSO ₄	383
KCl	213
Al ₂ O ₃	193
NaCl	151
MgCl ₂	112
MoO ₃	93
Hg ₂ Cl ₂	80
CuSO ₄	74
CaCl ₂	67
FeCl ₃	64
BaCl ₂	58
ZnSO ₄	48
SnCl ₂	45
CrO ₃	6
AgNO ₃	0
Pb(NO ₃) ₂	0

5.9. Koyun Dalak Doku Arginazı Aktivitesi Üzerine Etki Eden Bazı Kimyasal Maddeler

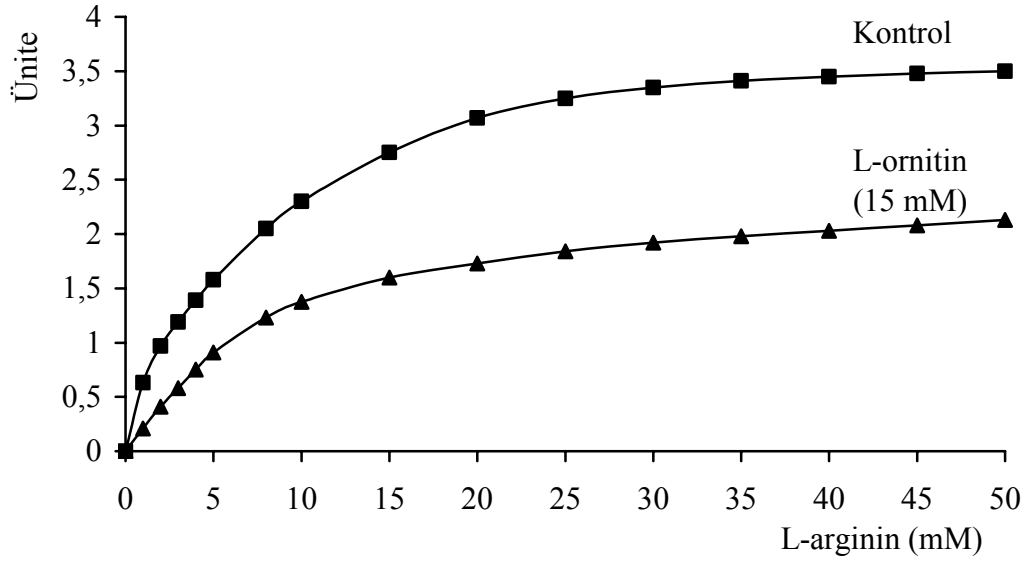
5.9.1. L- Ornitinin Etkisi:

L- ornitinin 0 ile 20 mM' kadar değişen konsantrasyonlardaki varlığında koyun dalak doku arginaz aktivitesi incelenmiştir. 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi % 15, 10 mM konsantrasyonda % 27, konsantrasyon 15 mM' ulaştığında ise enzim aktivitesinin %34' ünü kaybetmiştir (Şekil 14).



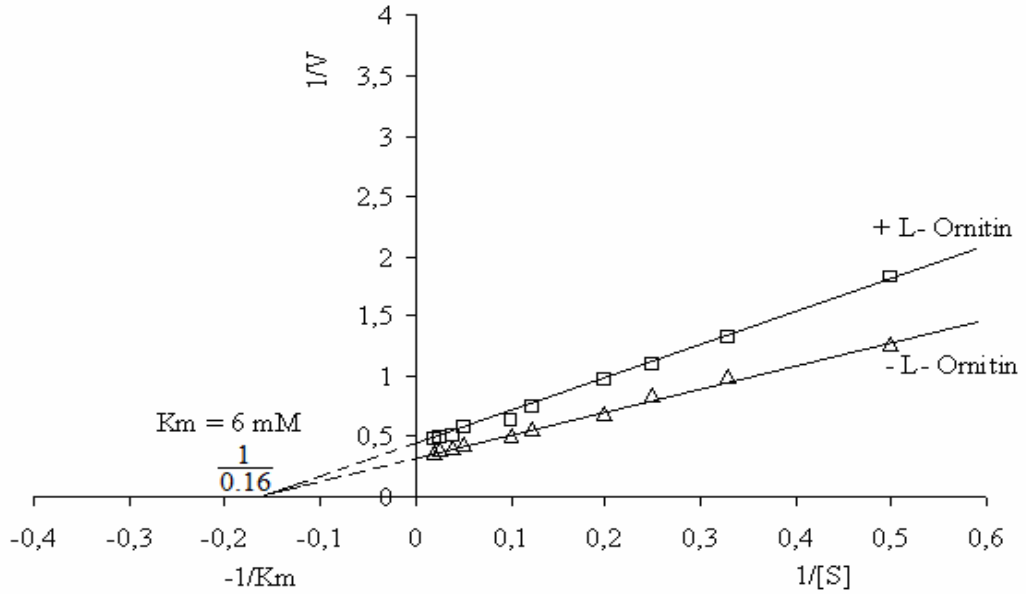
Şekil 14: L- Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

L- ornitinin koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon türünü belirlemek için 15 mM L- ornitin kullanılmıştır. Sonuçlar Michaelis-Menten grafiğine göre değerlendirilmiş ve L-ornitinin enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15: L-Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafığı ile Gösterilmesi

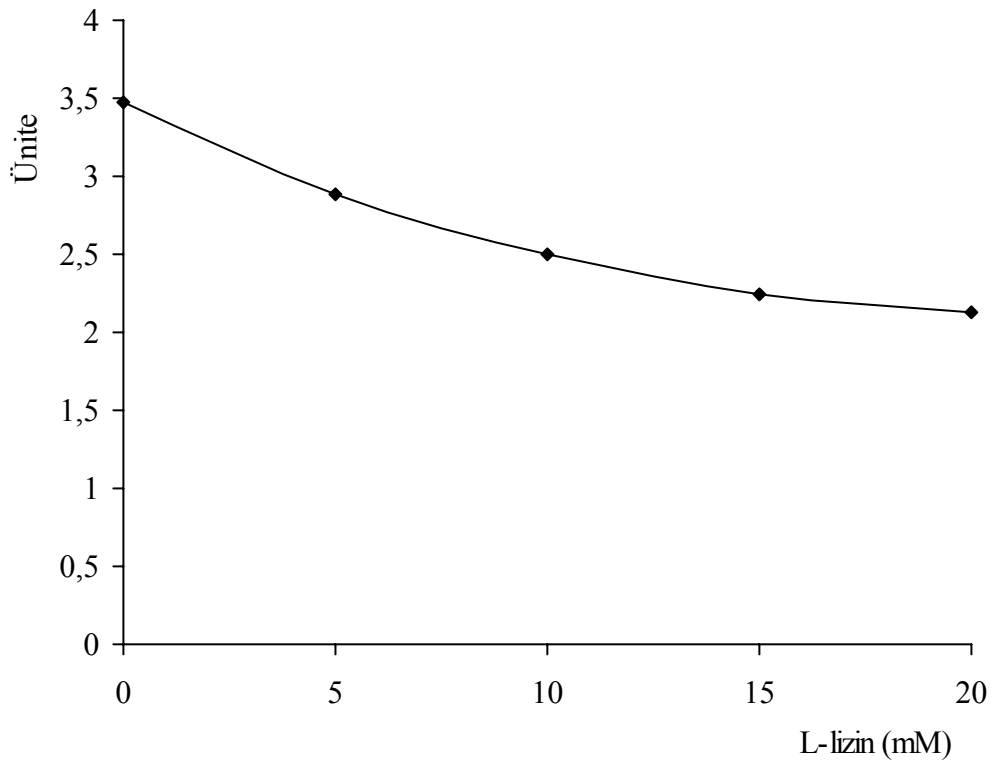
Veriler Lineweaver- Burk eğrisi (Şekil 16) ile değerlendirilerek V_{max} değerinin değiştiği, K_m değerinin ise değişmediği saptanmıştır.



Şekil 16: L-Ornitinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.

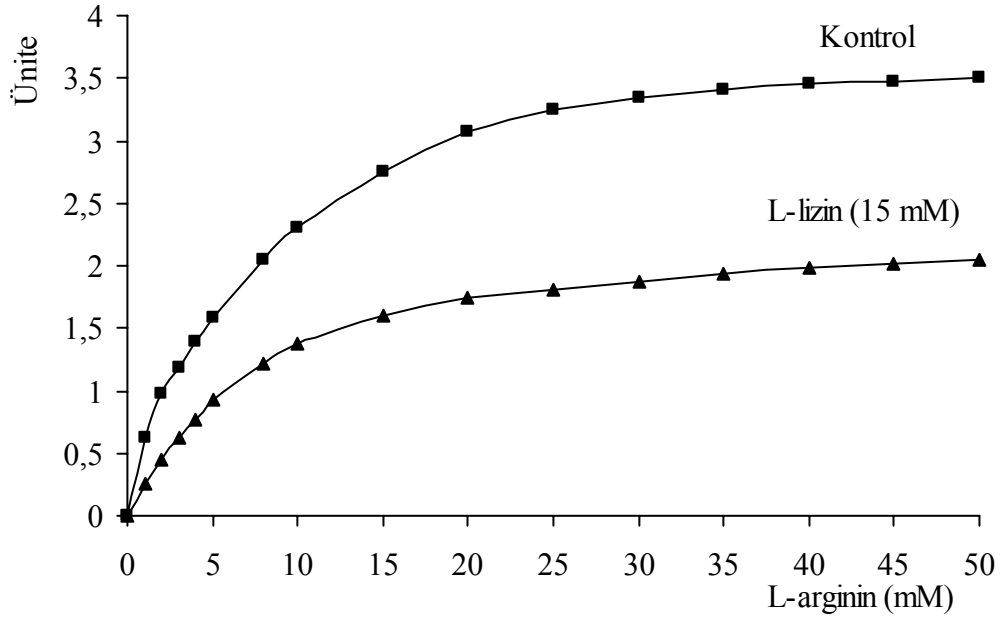
5.9.2. L- Lizinin Etkisi:

L-lizinin 20 mM' a kadar farklı konsantrasyonlarda koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi incelendiğinde 5 mM L- lizin konsantrasyonunun enzim aktivitesinin % 17, 10 mM konsantrasyonunda % 28' i, konsantrasyon 15 mM' a ulaştığında ise aktivitenin % 36' sının kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 17).

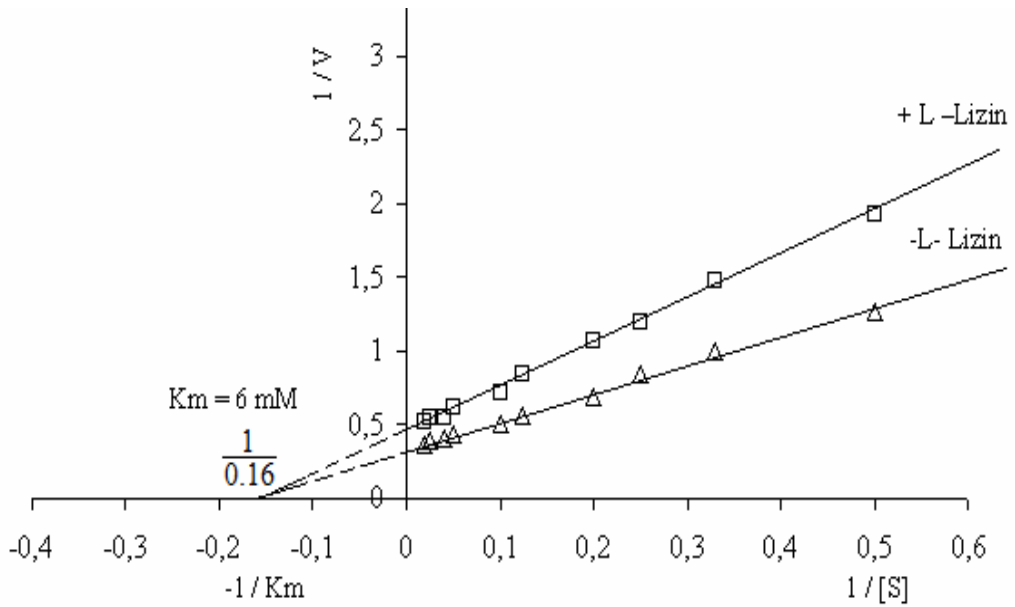


Şekil 17: L- Lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

15 mM L- lizin varlığında ve farklı L- arginin konsantrasyonlarında koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon tipi belirlenmiştir. Veriler Michaelis-Menten (Şekil 18) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 19) ile değerlendirildiğinde inhibisyon tipinin non-kompetitif olduğu tespit edilmiştir.



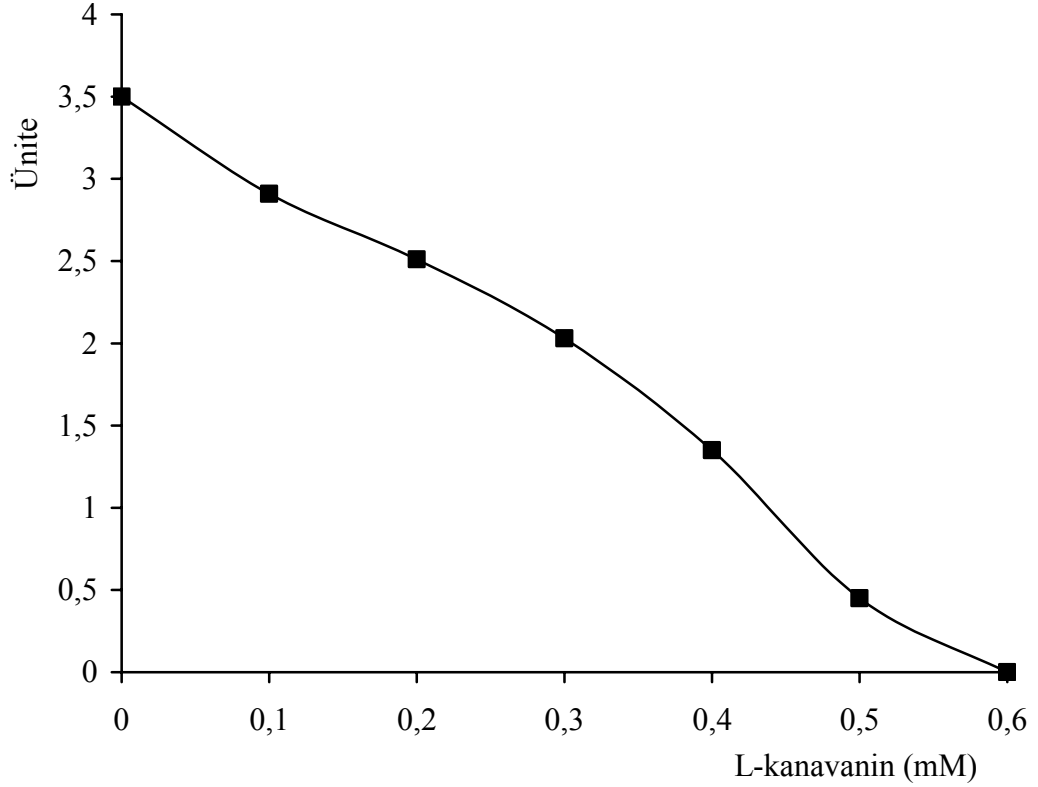
Şekil 18: L-lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafığı ile Gösterilmesi



Şekil 19: L-lizinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi

5.9.3. L- Kanavaninin Etkisi:

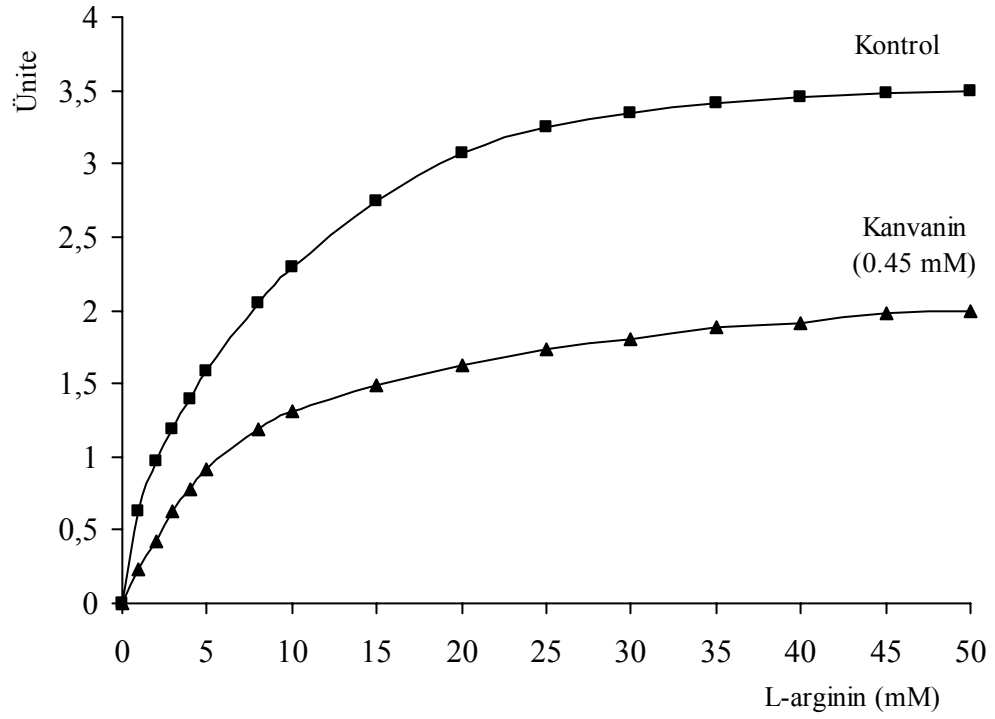
Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine L-kanavaninin etkisini incelemek için 0 ile 0.6 mM L-kanavanin preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve bulgular kontrole göre değerlendirilmiştir. 0,1 mM kanavanin konsantrasyonunda enzim aktivitesinin % 18' i, 0.3 mM konsantrasyonda % 38' i, 0.5 mM konsantrasyonda % 89' u ve 0.6 mM konsantrasyonda % 100' ü kaybolmaktadır (Şekil 20).



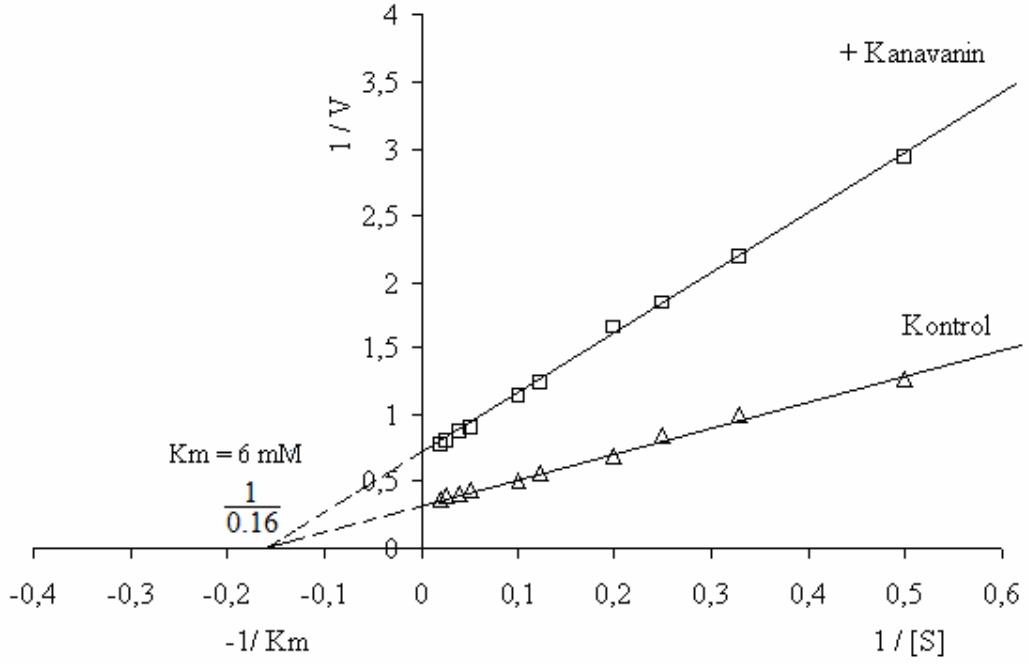
Şekil 20: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine L-Kanavanin' in İnhibisyon Etkisi

L-kanavaninin koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon tipini belirlemek için değişik arginin konsantrasyonlarında ve 0.45 mM

L-kanavanin varlığında enzim aktiviteleri incelenerek veriler Michaelis-Menten (Şekil 21) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 22) ile değerlendirilmiş, L-kanavaninin koyun dalak doku arginaz aktivitesini non-kompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.



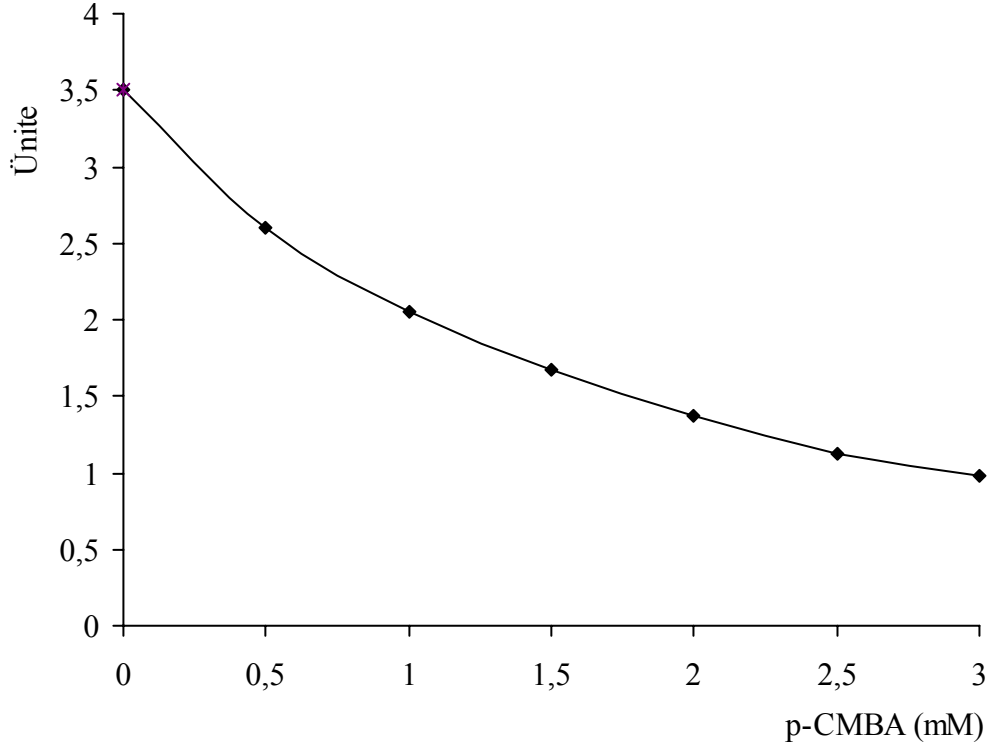
Şekil 21: L-Kanavaninin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi



Şekil 22: L-Kanavanin' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

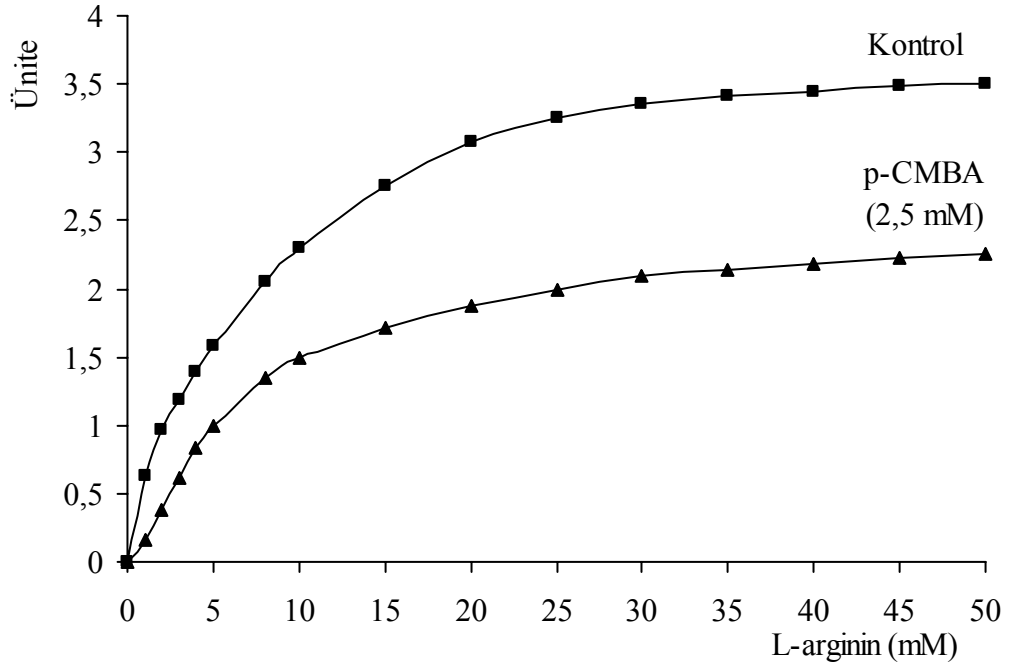
5.9.4. p-Kloromerküri Benzoik Asidin (P-CMBA) Etkisi:

P-CMBA 0 ile 3 mM arasında değişen konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilerek inhibitör etkisi kontrole göre değerlendirilmiştir. 0.5 mM p-CMBA konsantrasyonunda enzim aktivitesinin % 17' si, 1 mM' da % 42' si, 1.5 mM' da % 53' ü, 2 mM' da % 61' i, 2.5 mM' da % 69' u ve 3 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinin % 72' sinin kaybolduğu görülmüştür (Şekil 23).



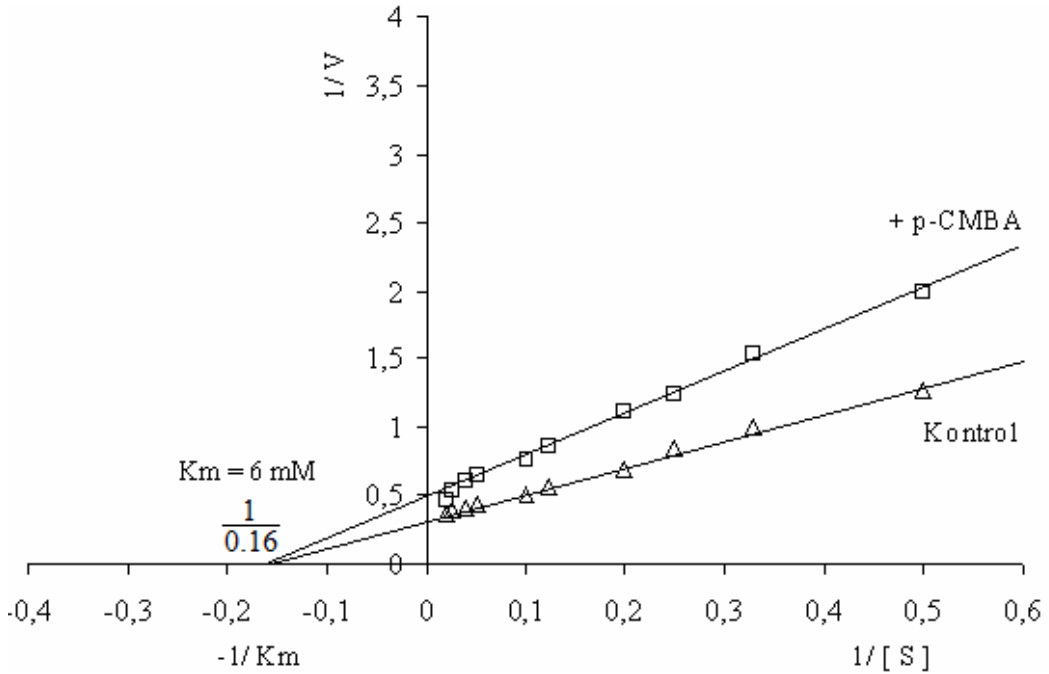
Şekil 23: p-CMBA' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

2.5 mM p-CMBA varlığında, inkübasyon ortamındaki arginin konsantrasyonları değiştirilmiş ve koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine p-CMBA' in inhibisyon etkisi kontrole göre hem Michaelis-Menten (Şekil 24) hem de Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 25) ile incelenmiş, p-CMBA' in non-kompetitif inhibisyona neden olduğu görülmüştür.



Şekil 24: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine P-CMBA' in

İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi

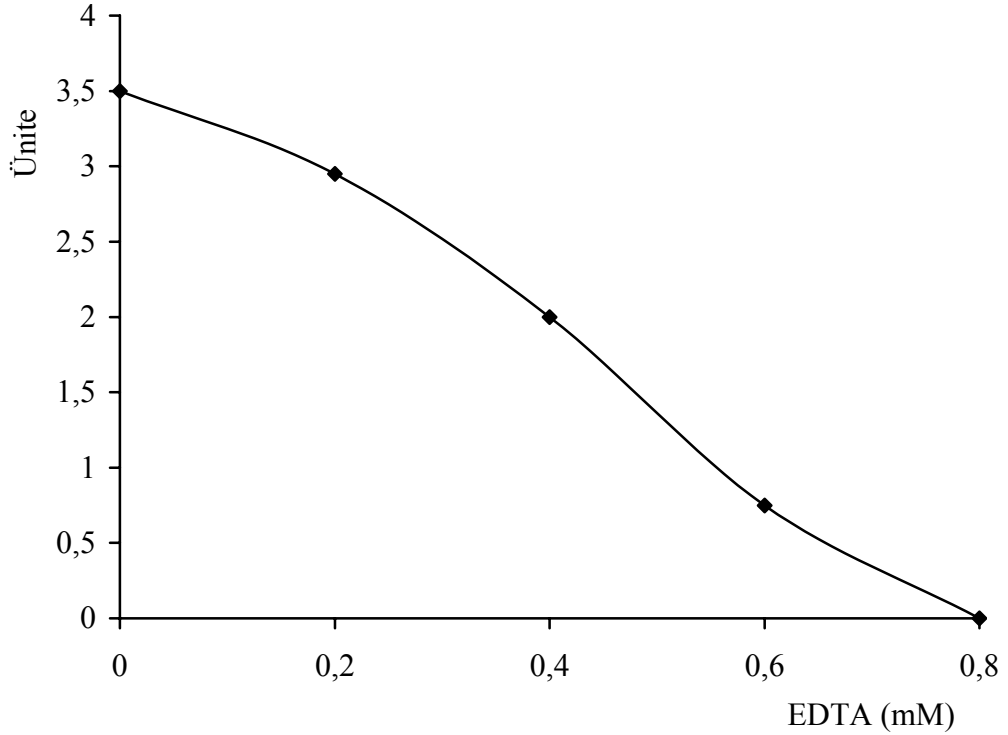


Şekil 25: p-CMBA' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi

Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

5.9.5. Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)' in Etkisi:

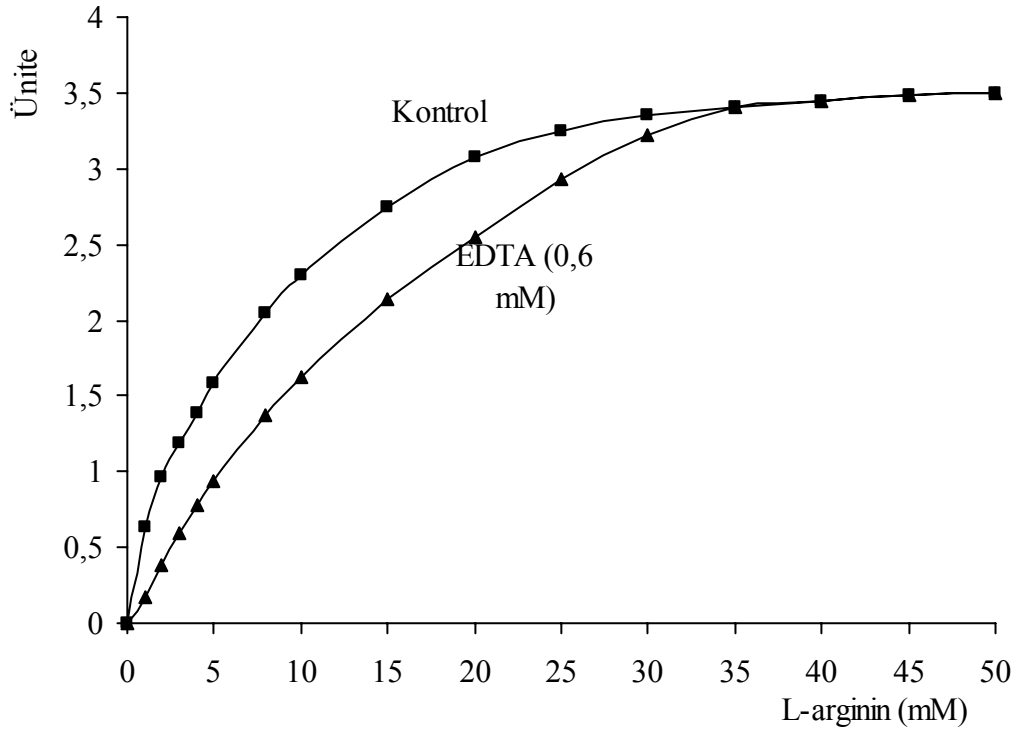
Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine EDTA' nın inhibisyon etkisini araştırmak için, 0 ile 1 mM arasında değişen konsantrasyonlarda EDTA preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve inhibitör etkisi kontrole göre değerlendirilmiştir. 0.2 mM EDTA konsantrasyonunda enzim aktivitesinin % 16' sı, 0.4 mM' da % 43' ü, 0.6 mM' da % 79' u, 0.8 mM' da % 100' ünün kaybolduğu görülmüştür (Şekil 26).



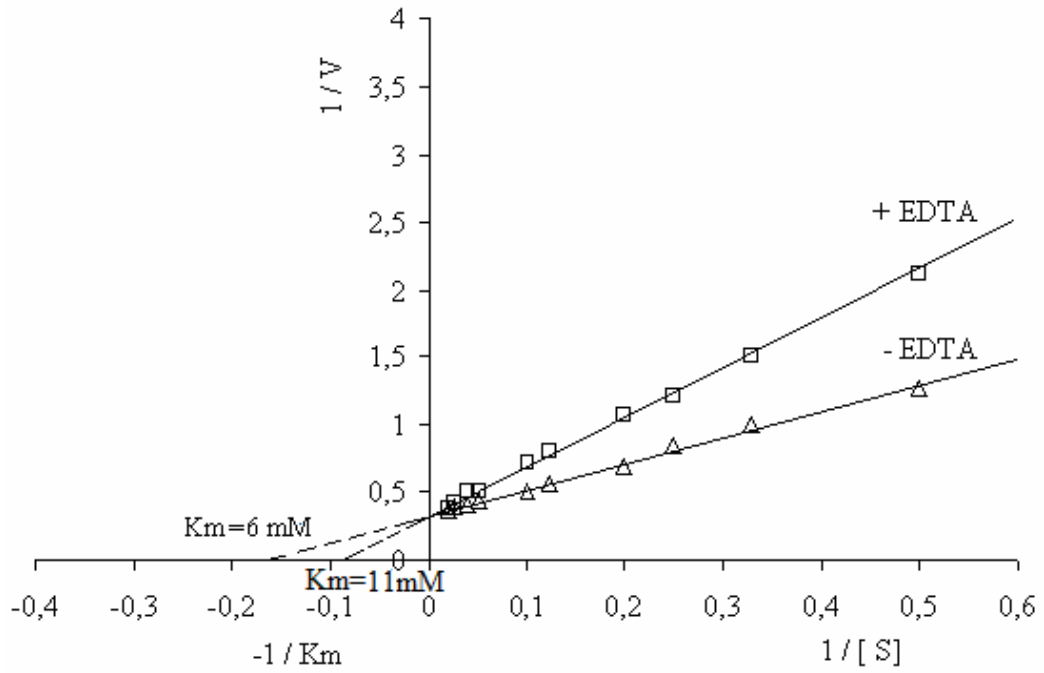
Şekil 26: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

EDTA' nın yaptığı inhibisyon tipini belirlemek amacı ile 0.6 mM EDTA varlığında ve değişik arginin konsantrasyonunda enzim aktivitesi kontrole göre

değerlendirilmiş ve sonuçlar Michaelis-Menten (Şekil 27) ve Lineweaver-Burk (Şekil 28) eğrisi ile incelenmiş, EDTA' nın kompetitif inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.



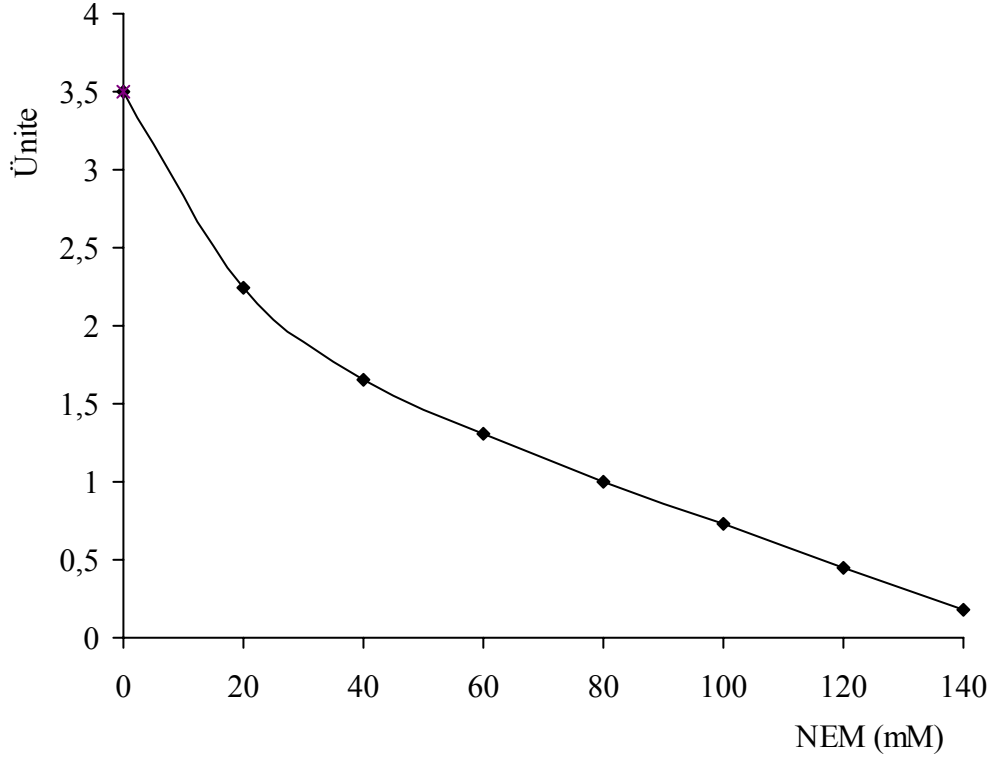
Şekil 27: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi.



Şekil 28: EDTA' nın Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

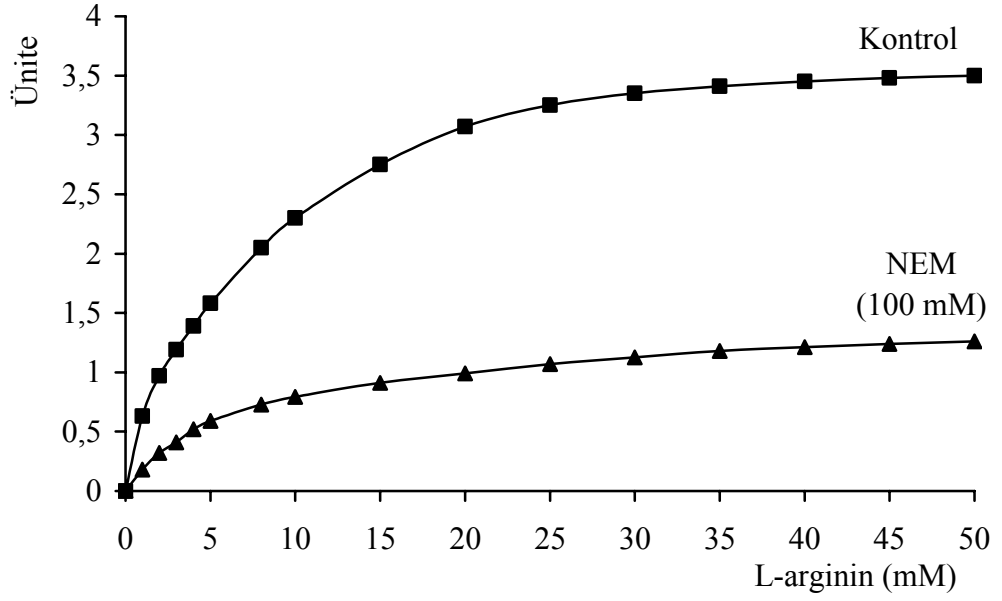
5.9.6. N-Etil Maleimidin (NEM) Etkisi:

NEM' in koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisini araştırmak için 0-140 mM konsantrasyonlarda NEM preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir. 20 mM' da enzim aktivitesinin % 36 sı, 60 mM' da % 62' si, 100 mM' da % 80' i ve 140 mM' da ise % 94' ü kaybolmuştur (Şekil 29).



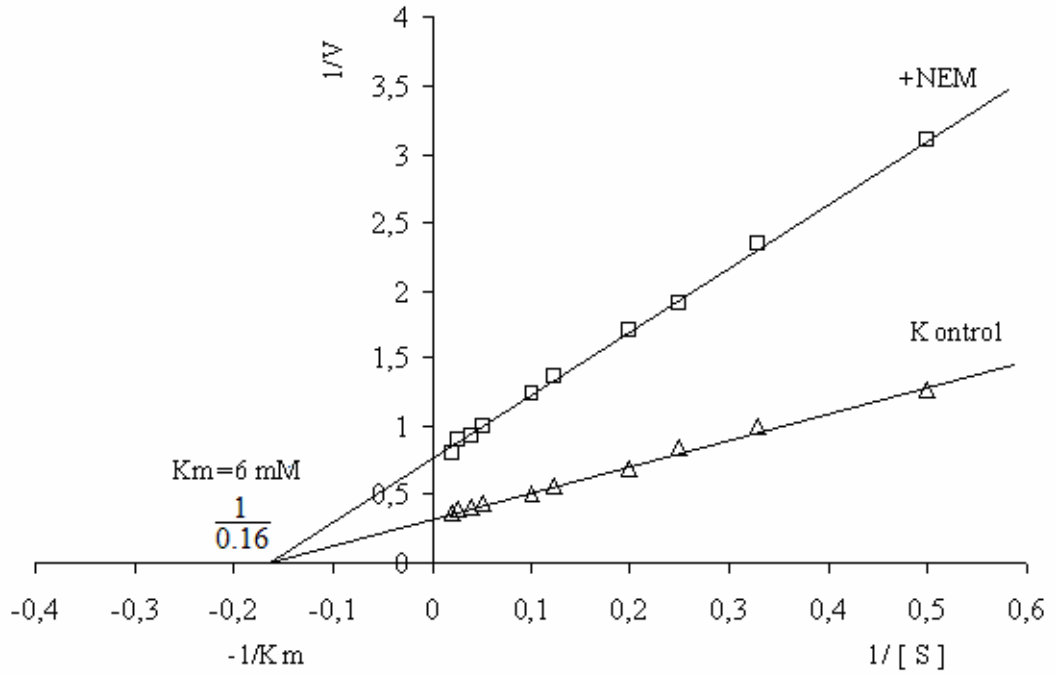
Şekil 29: Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine NEM' in İnhibisyon Etkisi

Farklı arginin konsantrasyonlarında ve 100 mM NEM varlığında koyun dalak doku arginaz aktivitesi bulunarak kontrole göre değerlendirilmiştir. Bulgular Michaelis-Menten (Şekil 30) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 31) ile incelenmiş ve NEM' in koyun dalak doku arginaz aktivitesini non-kompetitif inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 30: N-Etil Maleimidin' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi

Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi.

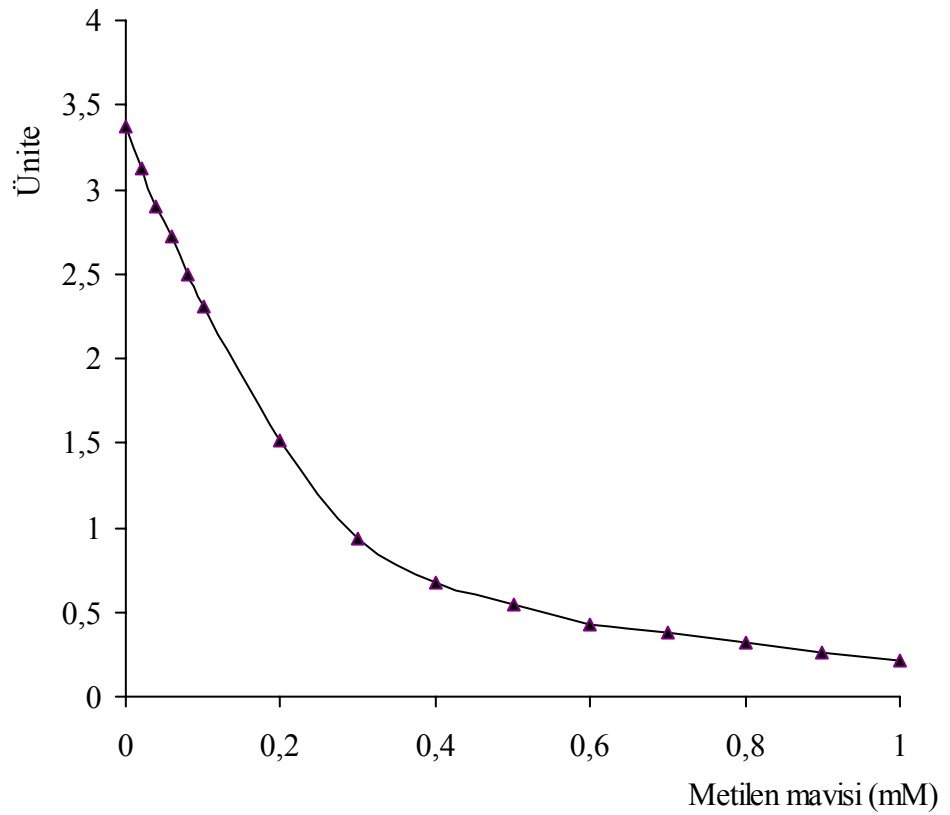


Şekil 31: N-Etil Maleimidin' in Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi

Üzerine İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

5.9.7. Metilen Mavisinin Fotoinaktivasyon Etkisi:

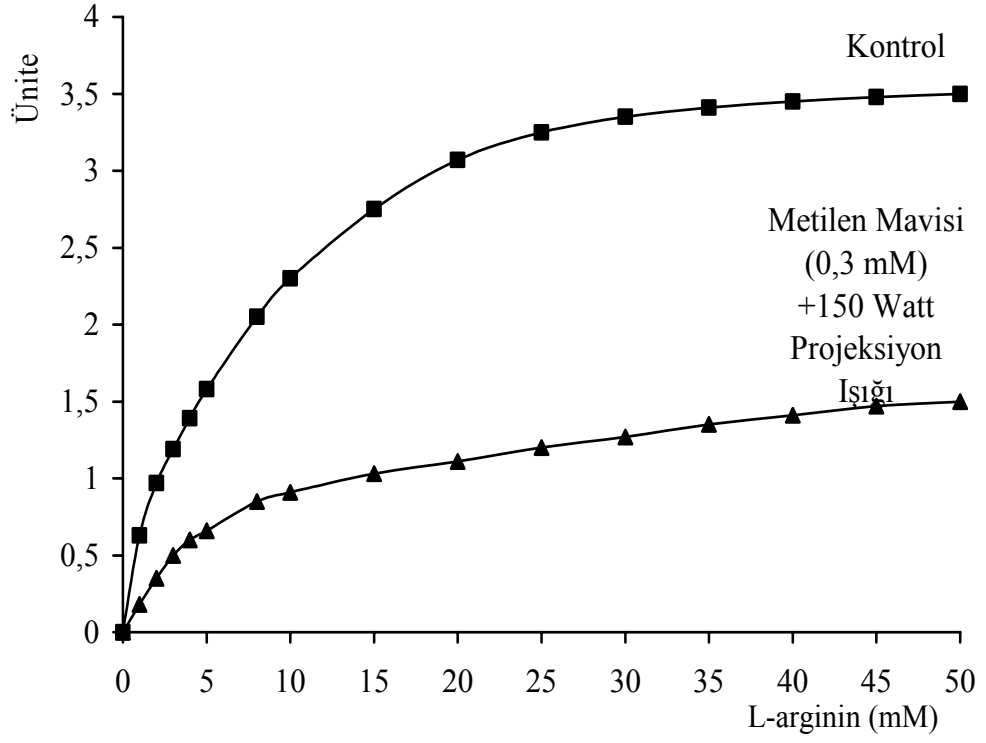
Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin fotoinaktivasyon etkisini incelemek amacıyla enzim değişik metilen mavisi konsantrasyonlarına ve 150 watt'lık ışığa maruz bırakılmıştır. Enzim, 0,3 mM Metilen mavisi konsantrasyonunda %72, 0,6 mM' da % 85, 0,9 mM' da % 92 aktivite kaybına uğramıştır (Şekil 32).



Şekil 32: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi

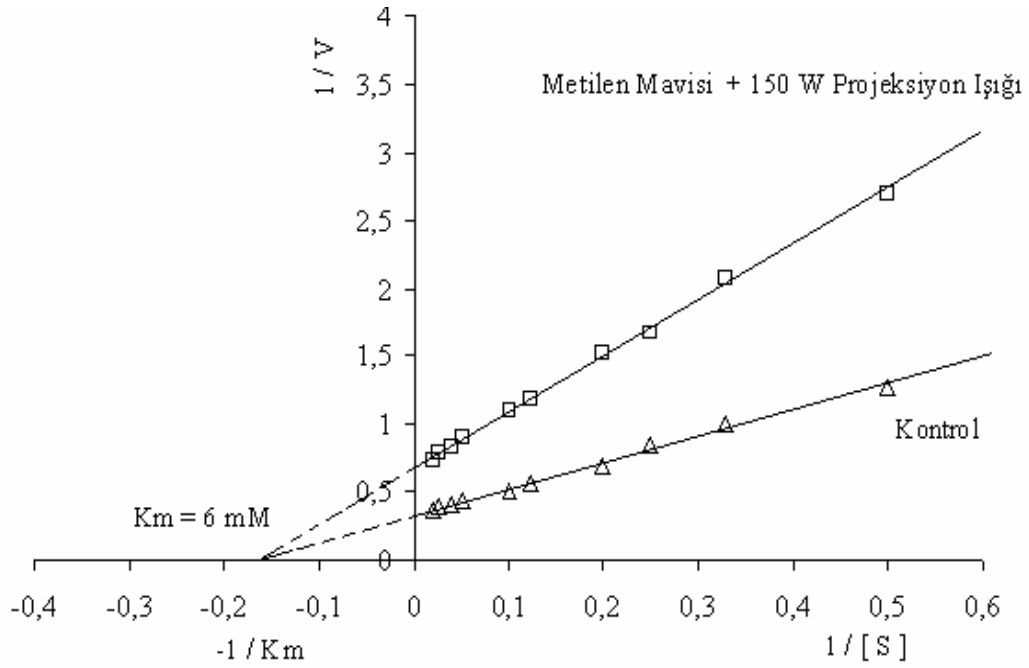
Metilen mavisinin koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine yaptığı inhibisyon tipini belirlemek için farklı L-arginin konsantrasyonlarında ve 0,3 mM metilen mavisi varlığında enzim aktiviteleri incelenerek veriler Michaelis-Menten

(Şekil 33) ve Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 34) ile değerlendirilmiş, sonuç olarak metilen mavisinin enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.



Şekil 33: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi

Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği ile Değerlendirilmesi



Şekil 34: Metilen Mavisinin Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin etkisi farklı ortamlar (oda ışığı, karanlık, 150 watt ışık) altında incelenmiştir. Buna göre enzim oda ışığında % 66, karanlıkta % 60, 150 watt ışık altında ise % 72 aktivite kaybına uğramıştır (Tablo 2).

Tablo 2: Değişik Işık Koşullarında Metilen Mavisinin Arginaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.

KOŞULLAR	AKTİVİTE % (Kaybedilen)	
	Kontrol	+ Metilen Mavisi
Oda Işığı	100	66
Karanlık	100	60
150 Watt Işık	100	72

Metilen mavisi ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kabul edilmiş ve aktivite %100 olarak tanımlanmıştır. Metilen mavisi ilave edilmiş örneklerdeki aktivite kaybedilen aktiviteyi göstermektedir. Değişik ışıklandırmalar, $MnCl_2$ ve % 0,3' lük metilen mavisinin I. ve II. preinkübasyon ortamına eklenmesiyle elde edilen veriler değerlendirilmiştir (Tablo 3).

I. preinkübasyona sadece $MnCl_2$ eklenmiş ve bu kontrol olarak kabul edilmiştir (A). $MnCl_2$ ve % 0,3' lük metilen mavisi 150 watt ışık altında I. preinkübasyonda uygulanmış ve enzimin % 63 aktivite kaybına uğradığı görülmüştür (B). I. preinkübasyonda $MnCl_2$, II preinkübasyonda ise % 0,3' lük metilen mavisi eklenmiş ve enzim 150 watt ışığa maruz bırakıldığında % 51 aktivite kaybının olduğu saptanmıştır (C). % 0,3' lük metilen mavisi I. preinkübasyonda, $MnCl_2$ ise II. preinkübasyonda ortama eklenmiş ve enzimin 150 watt ışık altında aktivitesi incelendiğinde % 81' lik aktivite kaybına uğradığı tespit edilmiştir.

Tablo 3: Metilen Mavisi, $MnCl_2$ ve Işığın Koyun Dalak Doku Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkileri.

					IŞIKLANDIRMA		Kalan Aktivite %
	$MnCl_2$	%0,3'lük Metilen Mavisi	%0,3'lük Metilen Mavisi	$MnCl_2$	150 W Işık	Oda ışığı	
A	+	-	-	-	-	+	100
B	+	+	-	-	+	-	37
C	+	-	+	-	+	-	49
D	-	+	-	+	+	-	19
	I.Preinkübasyon		II.Preinkübasyon				

5.10. Koyun Dalak Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi

Koyun dalak doku arginazının hücre içi yerleşimini saptamak amacıyla 4'er g iki adet doku alınmış, bunların biri 0,25 M süzkroz çözeltisi ile, diğeri ise 0,16 M KCl ile 1/5 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılmış, daha sonrada 1/8 oranında (hacim/hacim) $MnCl_2$ ' lü süzkroz ve KCl çözeltileri ile sulandırılarak homojenatlar hazırlanmıştır (1/40). Bu homojenatlardan 3' er ml alınarak enzim aktivitesine bakılmıştır. Daha sonra homojenatlar normal hacimlerine tamamlanarak 50 x g' de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant (S1)' tan 3 ml alınarak arginaz aktivitesine bakılmıştır. Geriye kalan kısım tekrar normal hacime tamamlanmış 600 x g' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet (P2) kısımlarının hacimleri tamamlanarak, süpernatantlardan ise 3' er ml alarak arginaz aktivitesine bakılmıştır. Geriye kalan süpernatant tekrar normal hacime tamamlanarak 16000 x g' de 20 dakika santrifüj edilmiş pelet ve süpernatantta aynı şekilde arginaz aktivitesi incelenmiştir. Süpernatantlar tekrar alınarak 100.000 x g' de 40 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantında enzim aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 35). 50 x g' deki aktivite homojenatın aktivitesine yakındır. 600 x g' nin süpernatantında toplam aktivitenin % 30' ının bulunmasının nedeni şu sebeplerden kaynaklanabilir:

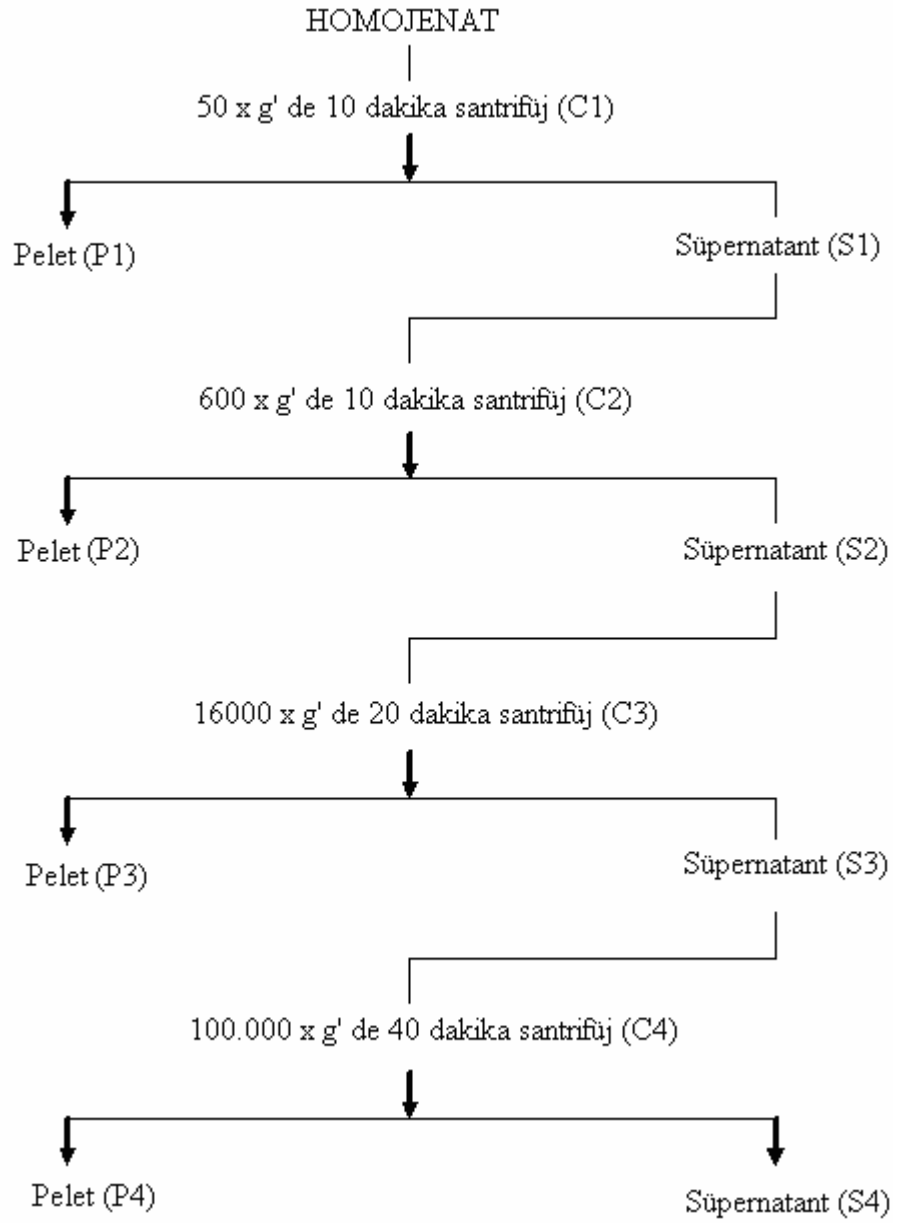
- a- Çekirdeksel kısmın tam çökmemiş olabilir.
- b- Santrifügasyon sırasında çekirdekler parçalanmış ve enzim sitoplazmik kısma geçmiştir.
- c- Arginazın bir izoenzimi olabilir.

600 x g' nin peletinde toplam arginaz aktivitesinin yaklaşık % 50' si bulunmaktadır ve bu pelet çekirdekleri içermektedir. İyonik güç artırıldığında

(aynı deney KCl ile yapıldığında) çekirdekdeki arginazın süpernatanta geçmeye başladığı görülmüştür (Tablo 4). 100000 x g'nin süpernatantında toplam enzim aktivitesinin % 50' ye yakın bir kısmı bulunmaktadır ve bu süpernatant sitoplazmayı kapsamaktadır. Sonuç olarak koyun dalak doku arginazının % 50' lik kısmının çekirdekte, diğer % 50' lik kısmının ise sitoplazmada lokalize olduğu kanısına varılmıştır.

Tablo 4: Santrifügasyon Yöntemi ile Koyun Dalak Doku Arginazının Hücre İçi Yerleşimi

NO	DEVİR	ENZİM KAYNAĞI	ÜNİTE (0,25 M sükrözlü)	ÜNİTE (0,16 M KCl' lü)
A	-	Homojenat	4,4	4,8
B	50 x g	Süpernatant	4,2	4,5
C	600 x g	Pelet	2,1	1,5
D	600 x g	Süpernatant	1,7	2,4
E	16000 x g	Pelet	0,9	0,6
F	16000 x g	Süpernatant	3,1	3,6
G	100.000 x g	Süpernatant	1,8	2,2



Şekil 35: Differansiyel Santrifügasyon Yöntemi (18).

6. TARTIŞMA

Koyun dalak doku arginaz enzimi ile daha önce çalışıldığına dair hiçbir literatür bilgiye rastlanılmamış ve bu çalışmada enzimin bazı özellikleri ortaya konulmuştur.

Enzimlerin genel yapısının protein kaynaklı olması nedeniyle ısıya dayanıklı değildirler. Maksimum aktivite gösterdiği ısının üzerine çıktığı zaman enzim aktivitesi düşmektedir. Koyun dalak doku arginazının preinkübasyon ısısını saptamak için farklı ısılarda (30-70 °C) enzim aktivitesine bakılmış ve en uygun preinkübasyon ısısının 58 °C olduğu, bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği tespit edilmiştir. Preinkübasyon ısısı farklı tür ve dokularda araştırılmış ve tüm metodlarda kullanıldığı görülmüştür. Preinkübasyon ısısı koyun gözü vitreusu için 40 °C (48), koyun meme doku arginazı için 52 °C (102), insan tükürük arginazı (67), tiroid doku arginazı (57), eritrosit ve uterus arginazı (49), bronş lavaj sıvısı arginazı (2) için 55 °C, diabetik rat karaciğeri için 68 °C (38), sığır rumen doku arginazı için 60 °C (41), domuz karaciğer arginazı için 45 °C (133), teleskop balığı karaciğeri için 37 °C (131), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 65 °C (11), M. benedeni arginazı için 53 °C (107) olarak bildirilmiştir.

Preinkübasyon ısısının Mn^{+2} iyonlarına gereksinimini tespit etmek için enzim kaynağı $MnCl_2$ ' lü ve $MnCl_2$ ' süz (distile su ile) preinkübasyona tabii tutulmuştur. $MnCl_2$ ' lü preinkübasyon uygulanan enzim kaynağının, $MnCl_2$ ' süz preinkübasyon uygulanan enzim kaynağından yaklaşık 3 kat daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır. Mn^{+2} iyonları preinkübasyon için gereklidir. Mn^{+2} iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğu ve enzim- Mn^{+2} -

arginin kompleksinin meydana gelmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (116). Yapılan çalışmalarda preinkübasyon ortamına Mn^{+2} , nın ilavesinin enzim aktivitesini artırdığı görülmüştür (41,102). Mn^{+2} , nın preinkübasyon sırasında arginaza bağlanarak enzim aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığı açıklanmıştır (83). Sığır tükürük arginazı (96), koyun meme doku arginazı (102) ve sığır rumen doku arginazı (41) için preinkübasyon ısısının ve Mn^{+2} iyonlarının gerekli olduğu ve aktiviteyi artırdığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Sıçan karaciğer doku arginazının Mn^{+2} iyonları varlığında 55 °C’ de preinkübasyonunun enzim aktivitesini yaklaşık % 110 artırdığı, 5 mM $MnCl_2$ ’ varlığında ve 55 °C’ de 20 dakika preinkübasyonla eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığı saptanmıştır (28,126).

Koyun dalak doku arginaz enziminin en uygun preinkübasyon süresini tespit edebilmek için enzim 58 °C’ de 0-30 dakikalar arasında preinkübasyona tabii tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 13 dakika olduğu tespit edilmiştir. Preinkübasyon süresi koyun meme doku arginazı (102) ve insan tiroid doku arginazı (57) için 12 dakika, koyun gözü vitreusu için 9-10 dakika (48), insan tükürük arginazı (67), bronş lavaj sıvısı arginazı (2) ve diabetik rat karaciğeri (38) için 20 dakika, sığır rumen doku arginazı (41), eritrosit arginazı (49) ve domuz karaciğer arginazı (133) için 5 dakika, uterus arginazı için 35 dakika (49), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 15 dakika (11) , M. benedeni arginazı için 10 dakika olarak belirlenmiştir (107).

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında olduğu için enzim kaynağı 37 °C’ de 0-30 dakikalar arasında inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışılmış, 10. dakikaya kadar lineerliğin devam ettiği, 10.

dakikadan sonra lineerliğin yerini hiperbolik bir görünümün aldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle koyun dalak doku arginazı için optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri tesbit edilmiştir. İnkübasyon süresi insan tiroid arginazı için 30 dakika (57), rat karaciğeri (38), insan karaciğer ve uterusu (49) için 20 dakika, koyun gözü vitreusu (48) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (11) için 10 dakika, sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (41), M. benedeni arginazı (107) ve koyun meme doku arginazı için 15 dakika (102) olarak bulunmuştur. Üniteyi tanımlama inkübasyon süresine göre yapıldığından araştırmacılar buldukları farklı sürelerle göre üniteyi tanımlamışlardır.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn^{+2} katyonlarının gerekli olduğu Muszynska (91) tarafından belirtilmiştir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimi inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (74). Bu nedenle koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine $MnCl_2$ konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin 2 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için gerekli olan $MnCl_2$ konsantrasyonu farklı olup rat karaciğeri (38) ve sığır rumen doku arginazı (41) için 2 mM, M. benedeni arginazı için 0.5 mM (107), Xenopus leavis karaciğer arginazı için 50 mM (111), insan tiroid arginazı (57) ile karaciğer ve eritrosit arginazı (49) için 2.5 mM, insan tükürük arginazı (67) ve vitreus arginazı (48) için 5 mM, koyun meme doku arginazı için 0.75 mM (102), insan uterusu için 0.8 mM (49), domuz karaciğer arginazı için 10 mM (133),

fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 1 mM (11), diabetik rat karaciğer arginazı için 1-2 mM, böbrek arginazı için 2 mM olarak bulunmuştur (38).

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır (11,28,38,41,48,49,57,99,102,107). Bu nedenle araştırmamızda uygun tampon seçimi ve optimal pH araştırılmış, bu amaçla Tris-HCl (pH 7.1 ile 10.6), Glisin-NaOH (pH 8.6-10.6) ve Sodyum bikarbonat- sodyum karbonat (pH 9.2-10.0) tampon sistemleri kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda koyun dalak doku arginazı için en uygun tampon çözeltisinin karbonat tamponu, optimum pH'ında 9.5 olduğu saptanmıştır. Çalışmamızla paralel olarak karaciğer ve eritrosit arginazı (28), *M. expensa* arginazı (99), koyun meme doku arginazı (102), *M. benedeni* arginazı (107) için pH 9.5' deki karbonat tamponu, sığır rumen doku arginazı (41) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (11) için pH 10' daki karbonat tamponu, diabetik rat karaciğeri (38) için pH 10.1' deki karbonat tamponu, insan karaciğer ve eritrositi için pH 9,7' deki, insan uterusu için ise pH 9.6' daki karbonat tamponunun kullanıldığı bildirilmiştir (49). Koyun gözü vitreusu için pH 8.8' deki Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı (48), insan tiroid arginazının optimum pH' sının 9,6 (57), domuz karaciğer arginazının pH' sının 10.5 (133) olduğu, *Genypterus maculatus* türünden balıkların karaciğer arginazının (23) ve *Sea molluse (Concholepas Concholepas)* arginazının (21) pH 9.5' de yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesinin L-arginine karşı olan K_m ' i araştırılmış, bu nedenle enzim miktarı sabit tutularak L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüş ve K_m değeri 6 mM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda farklı türden enzim kaynaklarındaki arginazın

L-arginine karşı olan Km' inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değerleri sığır rumen doku arginazı (41) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (11) için 4 mM, M. benedeni arginazı için 12.5 mM (107), insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM (49), tiroid arginazı için 2 mM (57), vitreus arginazı için 6 mM (48), koyun meme doku arginazı için 1.35 mM (102), Sea molluse (Concholepas Concholepas) arginazı için 25 mM (21), diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM (38), Mus booduga karaciğer arginazı için 8.3 mM (118), Xenopus leavis karaciğer arginazı için 29 mM (111), domuz karaciğer arginazı için 19.6 mM (133) olarak bulunmuştur. Koyun dalak doku arginazı için bulduğumuz Km değeri yapılan çalışmalarda elde edilen Km değerleri sınırları içerisindedir.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Li^{+1} , Al^{+3} , Mg^{+2} , Mo^{+6} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sn^{+2} , Pb^{+2} ve Ag^{+2} metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve enzim en yüksek aktiviteyi $MnCl_2$ varlığında vermiştir. Enzimi aktive eden metal iyonları sıralamaya göre Mn^{+2} (%1645) > Ni^{+2} (%1193) > Li^{+1} (%1080) > Cd^{+2} (% 603) > Co^{+2} (% 383) > K^{+1} (% 213) > Al^{+3} (% 193) > Na^{+1} (% 151) > Mg^{+2} (% 112) olarak bulunmuştur. Mo^{+6} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sn^{+2} iyonları varlığında enzim aktivitesinde düşme görülürken Pb^{+2} ve Ag^{+2} iyonları varlığında enzim hiç aktivite göstermemiştir.

Metal iyonları bir dokudaki enzimi aktive ederken diğer dokudakini inhibe edebilmektedir. Spektor ve ark. (135) , yetişkin ve fetal insan karaciğer, eritrosit, böbrek, beyin ve gastrointestinal sistem dokularında metal iyonlarının etkisini araştırmışlar, Mn^{+2} > Co^{+2} > Mg^{+2} iyonlarının enzimi aktive ettiğini, Ca^{+2}

iyonunun ise enzimi inhibe ettiğini bulmuşlardır. Koyun meme doku arginazi üzerine farklı metal iyonlarının etkisi araştırılmış, enzim en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} metal iyonları varlığında göstermiştir. Cd^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesini Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarına göre daha fazla artırdığı, Hg^{+2} iyonlarının aktiviteyi değiştirmedığı, Co^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+2} , Sn^{+2} iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği, Pb^{+2} ve Cr^{+3} iyonları varlığında ise enzimin hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir (102). Sığır rumen doku arginazi üzerine farklı metal iyonlarının etkisi araştırılmış Mn^{+2} metal iyonu varlığında enzimin en yüksek aktiviteyi verdiği, Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Li^{+1} iyonlarının ise enzim aktivitesini Mn^{+2} a göre daha az artırdığı, K^{+1} , Al^{+3} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , Sn^{+2} iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin azaldığı, Hg^{+2} ve Ag^{+2} varlığında ise enzimin hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir (41). İnsan tiroid arginaz aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi araştırılmış, enzimin en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} metal iyonu varlığında verdiği Cd^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesini Mn^{+2} iyonlarına göre daha az aktive ettiği ve Hg^{+2} , Ag^{+2} iyonları varlığında enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür (57). Koyun gözü vitreus arginaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmada enzimin en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} metal iyonu varlığında verdiği, Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Sn^{+2} , ve Ag^{+2} metal iyonlarının enzim aktivitesi düşürdüğü, Pb^{+2} metal iyonları varlığında ise enzimin hiç aktivite göstermediği tesbit edilmiştir (48). Fare makrofaj arginazi üzerine metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve enzim aktivasyonunun metal iyonları tarafından sırasıyla $Mn^{+2} > Co^{+2} > Ni^{+2} > Zn^{+2} > Fe^{+2} > Na^{+1} > K^{+1}$ şeklinde artırıldığı saptanmıştır (27). Sea molluse (*Concholepas Concholepas*) arginazi için Mn^{+2} ,

Co⁺², Ni⁺² iyonlarının gerekli olduğu bildirilmiştir (21). Yukarıda yapılmış olan çalışmalar bizim sonuçlarımızı teyit etmektedir.

L-aminoasitlerden L-ornitin ve L-lizinin koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış, L-ornitin 5 mM konsantrasyonda enzimi % 15, 10 mM konsantrasyonda % 27, 15 mM konsantrasyonda ise % 34 inhibisyona uğrattığı saptanmıştır. L-lizininde 5 mM konsantrasyonda enzimi %17, 10 mM konsantrasyonda % 28, 15 mM konsantrasyonda %36 oranında L-ornitine benzer bir şekilde inhibisyona uğrattığı tesbit edilmiştir. İnhibisyon tipini belirlemek için 15 mM L-ornitin ve L-lizin kullanılmış, veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri ile değerlendirilerek her iki amino asit için Km değeri 6 mM olarak bulunmuş ve bu amino asitlerin enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı gözlemlenmiştir. Farklı tür ve dokularda L-ornitin ve L-lizinin enzime yaptığı inhibisyon tipleri belirlenmeye çalışılmış ve değişik inhibisyon tipleri elde edilmiştir.

Rat beyin mitokondrisinde yapılan çalışmada 25 mM L-arginin kullanılarak L-ornitin ve L-lizinin enzimi 20 kat inhibe ettiği bildirilmiştir (33). *M. expensa* arginazı (106), laktasyondaki rat meme bezi arginazı (42), sıçan karaciğer arginazı (92), *M. benedeni* arginazı (107), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı (111), sığır karaciğer arginazı (108,139), insan tiroid arginazı (57), *Mus booduga* arginazı (118), domuz karaciğer arginazı (133), *Genypterus maculatus* karaciğer arginazı (23), *Sea molluse (Concholepas Concholepas)* arginazı (21) üzerine L-ornitin ve L-lizin amino asitlerinin etkisi incelenmiş ve bu amino asitlerin enzimi kompetitif inhibisyona uğrattığı ortaya konmuştur.

Kaysen ve Strecker (63) böbrek dokusunda yüksek arginin konsantrasyonlarıyla enzim aktivasyonunun prolin ve lizin amino asitlerinin belirli konsantrasyonları ile engellenebildiğini belirtmişlerdir. Koyun beyin doku arginazı üzerine bazı L-amino asitlerden L-lizin, L-ornitin, L-valin ve L-lösinin kompetitif tipte inhibisyona neden olduğu bulunmuştur (122). Ornitin, lizin ve prolinin koyun karaciğer arginazı üzerinde kompetitif inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (65). L-ornitin buzağı karaciğer arginazını (15) ve vitreus arginazını (48) kompetitif inhibisyona uğrattığı gözlemlenmiştir. İnsan karaciğer arginazı üzerinde ornitin non-kompetitif, lizinin ise kompetitif inhibisyon etkisinin olduğu ortaya konmuştur (24).

Koyun karaciğer dokusunda 55 mM'lık lizinin arginaz aktivitesini % 74 oranında inhibe ettiği ve inhibisyon tipinin karışık inhibisyon olduğu tesbit edilmiştir (10). Yine sığır böbrek doku arginazı üzerinde de L-ornitin ve L-lizin amino asitlerinin karışık tipte inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (58). Ameen ve Palmer (3) lizinin karaciğer arginazını karışık tipte inhibisyona uğrattığını bildirmişlerdir.

Sığır rumen doku arginazı (41), koyun meme doku arginazı (102) ve insan tiroid doku arginazı üzerinde L-ornitin ve L-lizin amino asitlerinin non-kompetitif inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir. Bulgularımız literatürler ile (41, 57,102) uyuşmaktadır.

Bond (16), non-kompetitif inhibisyona neden olan inhibitörlerin substrattan farklı bir noktada enzimle reversible olarak birleştiği ve ligantların muhtemelen enzim substrat kompleksinin turnover'ını bozan konformasyonel

değişime sebep olduğu ve enzimin proteolitik inaktivasyona duyarlılığının arttığını bildirmiştir.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine guanidino bileşiklerinden olan L- kanavaninin etkisi araştırılmış ve L- kanavaninin enzim üzerinde non-kompetitif inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Kanavanin ile arginaz arasında yapısal benzerlik bulunduğundan bu bileşiğin enzimin aktif merkezi dışında bir yere bağlanıp enzimin üç boyutlu yapısını bozarak inhibisyona neden olduğu ileri sürülmüştür (41). Konu ile ilgili yapılmış çalışmalarda çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Saflaştırılmış insan karaciğer arginazı için substrat olarak L- arginin yerine L- kanavanin kullanılmış ve K_m ' in 10.5 mM' dan 50 mM' a çıktığı tespit edilmiştir (14). Sığır rumen doku arginazını guanidino bileşiklerinin (41), saflaştırılmış eritrosit arginazını ise kanavaninin non-kompetitif inhibe ettiği saptanmıştır (54). Başka bir çalışmada da kanavaninin karaciğer arginaz enzimini kompetitif inhibe ettiği, buna karşın eritrosit ve uterus arginazlarını etkilemediği tespit edilmiş, kanavaninin arginin yerine substrat olarak kullanılamayacağı bildirilmiştir (49). Muszynska ve ark. (90) ise kanavanin kullanıldığında acı bakla ve sığır karaciğer arginaz aktivitelerini saptayamadıklarını, buna karşın tavuk karaciğerinde düşük düzeyde arginaz aktivitesi elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Koyun dalak doku arginazı üzerine p-CMBA ve NEM' in inhibisyon etkisi araştırılmış ve inhibisyon tipi belirlenmeye çalışılmıştır. p-CMBA ve NEM, enzimlerin aktif merkezinde -SH grubu içeren amino asitler olup olmadığını belirlemek için kullanılan kimyasal maddeler olup bu maddeler -SH gruplarını bloke ederek enzimin inhibisyonuna neden olmaktadır (41). 0.5 mM p-CMBA konsantrasyonunda enzim aktivitesinin % 17' si, 1 mM' da % 42' si ve 2.5 mM'

da % 69' u kaybolmaktadır. 20 mM NEM konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin % 36' sı, 60 mM' da % 62' si, 100 mM' da ise % 80' inin azaldığı görülmüştür. Farklı L- arginin konsantrasyonlarında 2.5 mM p-CMBA ve 100 mM NEM varlığında bu maddelerin enzime olan inhibisyon etkileri araştırılmış, her iki kimyasal maddenin de enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı görülmüştür. Bu sonuca göre koyun dalak doku arginaz enziminin aktif merkezinde fonksiyonel –SH gruplarının var olduğu ve katalitik faaliyetin başlaması için –SH gruplarının gerekli olduğu kanıtlanmış olmaktadır. Konuyla ilgili farklı çalışmalar yapılmıştır. p-CMBA ve NEM' in rat karaciğer arginazını etkilemediği (12), insan karaciğer, uterus ve eritrositi üzerinde p-CMBA' in herhangi bir inhibisyon etki göstermediği (49), NEM' in ise sığır karaciğer arginazı üzerinde inhibisyona neden olmadığı saptanmıştır (141).

M. Benedeni arginazı (104), acı bakla arginazı ile tavuk karaciğer arginazı (90) ve koyun gözü vitreusu arginazı (48) üzerine p-CMBA ve NEM' in inhibisyon etkisi tesbit edilmiştir. İnsan tiroid arginazı (57), koyun meme doku arginazı (102) ve sığır rumen doku arginazı (41) üzerinde p-CMBA ve NEM' in non-kompetitif inhibisyona yol açtığı bildirilmiş ve bu sonuçlar bizim bulgularımızla paralellik göstermiştir.

EDTA' nın koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış, 0.2 mM EDTA varlığında enzim aktivitesinin % 16' sı, 0.4 mM' da % 43' ü, 0.6 mM' da ise % 79' u kaybolmuştur. 0.8 mM EDTA varlığında ise enzim aktivitesinin hepsini kaybetmiştir. 0.6 mM EDTA kullanarak inhibisyon tipi belirlenmeye çalışılmış, veriler Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrisi ile değerlendirilmiş ve EDTA' nın koyun dalak doku arginazını kompetitif

inhibisyona uğrattığı tespit edilmiştir. Kontrolün Km' i 6 mM iken EDTA varlığında Km değeri 11 mM olarak saptanmıştır. Koyun meme doku arginaz aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada enzim aktivitesi üzerinde 0.5 mM EDTA' nın % 44, 1 mM EDTA' nın ise % 80 civarında inhibisyona neden olduğu ve bizim bulgularımızla paralel olarak EDTA' nın koyun meme doku arginazını kompetitif inhibisyona uğrattığı açıklanmıştır (102). Yapılan bir çalışmada EDTA' nın rat karaciğer arginazını inhibe ettiği bildirilmiştir (51). Genç koyun yemlerine Ca^{+2} -EDTA- Cu^{+2} kompleksi katıldığında ilk 24 saatte arginaz aktivitesinin arttığı, sonra ise düştüğü görülmüştür (56). İnsan karaciğer arginazı farklı pH' larda EDTA ile reaksiyona sokulduğunda enzim aktivitesinde sürekli azalma olduğu ortaya konulmuştur (71).

Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine metilen mavisinin fotoinaktivasyon etkisini incelemek için enzim kaynağı 150 watt ışık altında, değişik metilen mavis konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. 0.3 mM metilen mavis varlığında enzim aktivitesinde %72, 0.6mM konsantrasyonda ise % 85' lik bir azalma tesbit edilmiştir. İnhibisyon tipini belirlemek için 0.3 mM metilen mavis varlığında enzim aktivitesi incelenmiş ve metilen mavisinin enzimi non-kompetitif inhibisyona uğrattığı saptanmıştır. Çalışmamızla paralel olarak koyun meme doku arginazı (102), M Benedeni arginazı (103), manda karaciğer ve böbrek doku arginazı (105) ve insan tükürük arginazının da (98) metilen mavis tarafından non-kompetitif inhibisyona uğratıldığı belirtilmiştir. Metilen mavisinin inhibisyon etkisi farklı ortamlarda incelenmiş, oda ışığında aktivitenin % 66' sının, karanlıkta % 60' mın ve 150 watt ışık altında ise % 72' sinin kaybolduğu

görülmüştür. Koyun dalak doku arginaz enzimini 150 watt ışık altında ve metilen mavisi ile birlikte daha güçlü inhibisyona uğrattığı saptanmıştır.

Fotoinaktivasyon, enzimdeki histidil artıklarının imidazol gruplarının parçalanmasıyla oluşmaktadır. Çeşitli dokularda arginaz enziminin histidil artıklarının imidazol gruplarına Mn^{+2} kationlarının bağlanması ile enzimin tetramerik yapıya geçtiği belirtilmektedir. 150 watt ışık ve metilen mavisi varlığında enzim histidil artığının imidazol gruplarının parçalanması ile Mn^{+2} kationlarının tetramerik yapıyı oluşturamadığı ve bu nedenle fotoinaktivasyonun meydana geldiği bildirilmiştir (97, 98, 102,103,105).

Koyun dalak doku arginaz enzimine farklı ortamlarda iki preinkübasyon uygulanmış, oda ışığında I. preinkübasyona sadece $MnCl_2$ konularak yapılan çalışma kontrol kabul edilmiş ve diğer çalışmalar bununla kıyaslanmıştır. Bu çalışma sonucunda en az aktivite kaybının Mn^{+2} ile preinkübasyona sokulduktan sonra metilen mavisi uygulanan grupta olduğu gözlemlenmiştir. Mn^{+2} kationları enzimi oligomerik yapıya kavuşturduktan sonra histidil artıklarının yıkımı ve oligomerik yapının değişimi ancak belli miktarda etkilenmektedir. Bu yüzden en az aktivite kaybı bu grupta olmuştur.

Koyun dalak doku arginaz enziminin hücre içi yerleşimini saptamak için enzim kaynağı değişik santrifügasyon işlemine tabii tutulmuştur. Değişik santrifügasyon işlemleri sonucunda koyun dalak doku arginazının % 50' ye varan bir bölümünün hücre çekirdeğinde, diğer % 50' lik kısmında sitoplazmada lokalize olduğu saptanmıştır (Tablo 4). 600x g' de santrifüj edilen enzim kaynağının peleti hücre çekirdeğini içermektedir ve toplam aktivitesin yaklaşık yarısı bu pelette elde edilmiştir. 100000x g' nin süpernatantında da toplam

aktivitenin yarısına yakın bir kısmı bulunmuştur ve bu süpernatant sitoplazmayı içermektedir.

Enzimin hücre çekirdeğine bağlı olmasının metabolik denetim açısından önemi Moss (86) tarafından belirtilmektedir. Buna göre enzimin hücre çekirdeğinde bulunması Mn^{+2} iyonlarının daha çok hücre çekirdeğinde bulunması ve bunların çekirdekten sitoplazmaya geçişleri ile arginaz aktive edilirken arginin düzeylerinin değişim göstermesine, bunun sonucunda da protein sentezinin denetim altına alınmasına bağlanmıştır .

Domuz yavrularının ince bağırsağında yapılan çalışmada arginaz izoenzimlerinin hem mitokondriye hem de sitoplazmaya yerleşik olduğu bulunmuştur (31). Yine rat böbreğinde arginin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin böbreğin iç korteks ve dış medulla kısmında (32), *Geypterus maculatus* karaciğer arginazının ise mitokondrial matrixte lokalize olduğu bildirilmiştir (23).

Koyun meme doku arginazı (102) ve *M. benedeni* arginazının da (107) hücrenin çekirdeğine lokalize olduğu belirtilmiş ve bu sonuçlar bulgularımızı desteklemiştir.

Bugüne kadar koyun dalak doku arginaz enziminin kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığı literatür taramalarından anlaşılmaktadır. Bu nedenle aktif üre döngüsü bulunmayan koyun dalak dokusunda arginaz enzimi saptanmış ve bu enzimin bazı kinetik özellikleri ilk kez laboratuvarımızda optimize edilmiştir. Elde edilen verilerin bu konu ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Aker S, Klein K, Totzeck A, Sewell AC, Boengler K, Kleinbongard P, Konietzka I, Van de Sand A, Heusch G, Schulz R. (2008). Increased Myocardial Arginase Expression in Failing Hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 44, 4: 754.
2. Altundağ Y. (2001). Bronj Lavaj Sıvısında Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
3. Ameen M, Palmer T. (1987). Inhibition of Urea Cycle Enzymes by Lysine and Saccharopine. *Biochem. Int.* 14, 3: 395-400 .
4. Aminlari M, Vaseghi T. (1992). Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 103, 2: 385-389 .
5. Anonim (2008). Urea Cycle. Erişim: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov /Olim/ Images/ ureacycle.html>). Erişim tarihi: 30.10.2008.
6. Ash DE. (2004). Structure and Function of Arginase. *American Society for Nutritional Sciences*. 22: 2760-2764.
7. Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato PG, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R. (2004). Arginase Pathway in Human Endothelial Cells in Pathophysiological Conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 37: 515-523.
8. Beck B, Ciszek M, Polaniak R, Beyga Z, Krol W, Drozd M, Shani J. (2005). The Activity of Ornithine Transcarbamoylase and Arginase during Mechanical Jaundice in the Rat Model. *Journal of Surgical Research*. 126: 19-26.
9. Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasemann H. (2008). Developmental Changes in Arginase Expression and Activity in the Lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 294, 3: 498-504.
10. Benzer F, Ozan ST, Yılmaz S. (2003). Koyun Karaciğer Doku Arginazının Guanidin ve Bazı Amino Asitler Tarafından İnhibisyonu ve İnhibisyonunun Kinetiği. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 17, 3: 173-178.
11. Benzer F, Ozan ST. (2002). Fascioliosisli Koyunların Arginaz Enzim Aktivite Düzeyleri ile Karaciğer Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 16, 2: 217-222.
12. Ber E, Muszynska G, Cechova D. (1978). The Lack of Free SH Groups in Rat Liver Arginase. *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*. C.II. XXVI, 10: 665-667.
13. Ber E, Muszynska G. (1979). Chemical Modification of Rat Liver Arginase. *Acta Biochimica Polonica*. 26, 1/2: 103-114.
14. Berüter J, Colombo JP, Bachmann C. (1978). Purification and Properties of Arginase from Human Liver and Erythrocytes. *Biochem. J.* 175: 449-454.

15. Bommarius AS, Drauz K.(1994). An Enzymatic Route to Lornithine from Arginine Activation, Selectivity and Stabilization of l-Arginase. *Bioorg Med Chem.* 2, 7: 617-26.
16. Bond JS. (1973). Effect of Manganese and Amino Acids on Proteolytic Inactivation of Beef Liver Arginase. *Biochim. Biophys. Acta.* 327: 157-165.
17. Brock AA, Chapman SC, Ulman EA, Wu G. (1994). Dietary Manganese Deficiency Decreases Rat Hepatic Arginase Activity. *J. Nutr.* 124: 340-344.
18. Brouwer A, Barelds RJ, Knook DL. (1984). *Centrifugal Separations of Mammalian Cells. Centrifugation (2nd Edition)* edited by Rickwood d. irl press Oxford. 166-181.
19. Brusdeilins M, Kühner R, Schumacter K. (1985). Purification, Affinity to Anti-Human Arginase Immunoglobulin- Sepharose 4 B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 840: 79-90.
20. Campbell JW, Lee TW. (1963). Ornithine Transcarbamylase and Arginase Activity in Flatworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 8: 29-38.
21. Carnaval N, Bustamante M, Hinrichsen P, Torres A. (1984). Properties of Arginase from the Sea Mollusc *Concholepas Concholepas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 78, 3: 591-594.
22. Carnaval N, Cederbaum SD. (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, Kessi E, Ainol L. (1987). Subcellular Localization and Kinetic Properties of Arginase from the Liver of *Genypterus Maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 88, 1: 229-31.
24. Carvajal N, Martinez J, Oca FM, Rodriguez J, Fernandez M. (1978). Subunit Interactions and Immobilised Dimers of Human Liver Arginase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 527: 1-7.
25. Ceylan E, Aksoy N, Gencer M, Vural H, Keleş H, Selek S. (2005). Evaluation of Oxidative-Antioxidative Status and the L-arginine-Nitric Oxide Pathway in Asthmatic Patients. *Respiratory Medicine.* 99: 871-876.
26. Champe PC, Harvey RA. (Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.) (1997). *Lippicott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.* 236-241
27. Chen PC, Broome JD. (1980). Mouse Macrophage Arginase. *Analyt. Biochem.* 163: 354-359.
28. Colombo JP, Konarska L. (1984). Arginase; In : Bergmayer Grabı M. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis.* 3rd Ed. Weinheim Vertag Chemie. 285-294.
29. Crombez EA, Cederbaum SD. (2005). Hyperargininemia due to Liver Arginase Deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism.* 84: 243-251.
30. Cuervo H, Pineda MA, Aoki MP, Gea S, Fresno M, Girones N. (2008). Inducible Nitric Oxide Synthase and Arginase Expression in Heart Tissue during Acute Trypanosoma

- cruzi Infection in Mice: Arginase I Is Expressed in Infiltrating CD68⁺ Macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*. 197: 1772–1782.
31. Davis PK, Wu G. (1998). Compartmentation and Kinetics of Urea Cycle Enzymes in Porcine Enterocytes. *Comperative Biochemistry and Physiology Part B*. 119: 527-537.
 32. Dhanakoti SN, Brosnan ME, Herzberg GR, Brosnan JT. (1992). Celluler and Subcelluler Localization of Enzymes of Arginine Metabolism in Rat Kidney. *Biochem. J*. 282: 369-375.
 33. Dolinska M, Albrecht J. (1998). L- Arginine Uptake in Rat Cerebral Mitokondria. *Neurochem Int*. 33, 3: 233-236.
 34. Edwards EM, Rattenbury JM, Varnam GCE, Dhand UK, Jeacock MK, Shepherd DAL. (1977). Enzyme Activities in the Sheep Placenta During the Last Three Months of Pregnancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / General Subjects*. 497, 1: 133-143.
 35. Elgün S, Kumbasar H. (2000). Increased Serum Arginase Activity in Depressed Patients. *Prog. Neuro-Physchopharmacol and Biol. Psychiat*. 24, 2: 27-232.
 36. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu ME. (2006). Meme Kist Sıvısı Arginaz Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi*. 31, 3: 129–134.
 37. Erisir M, Aydilek N, Aksakal M. (2005). Effect of Vitamin E on Arginase Activity in the Liver and Kidneys of Testosterone-Treated and Castrated Rabbits. *Acta Vet. Brno*. 74: 527-531.
 38. Erisir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. (2005). Evaluation of Optimal Conditions for Arginase Activity in Streptozotosin İnduced Diabetic Rats. *Vet. Med.-Czech*. 50, 2: 69-76.
 39. Erişir M, Barım Ö, Özçelik M, Harlıoğlu M. (2006). The Effect of Dietary Vitamin E on the Arginase Activity in the Females of Freshwater Crayfish. *Turk J. Vet. Anim. Sci*. 30: 195-199.
 40. Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M. (2003). Effects of Dietary Vitamin E and Selenium on Arginase Activity in the Liver, Kidney and Heart of Rats Treated with High Doses of Glucocorticoid. *Cell Biochemistry and Function*. 21: 331-335.
 41. Erişir M. (1997). Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
 42. Fuentes JM, Campo ML, Soler G. (1994). Kinetics and İnhibition by Some Amino acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys*. 102, 5: 255-258.
 43. Fukomato K, Karai I, Nishikawa Y, Horiguchi S. (1983). Erythrocyte Arginase Activity as an İndikator of Lead Exposure. *Brit. J. of Indust. Med*. 40, 106-110.
 44. Geyer JW, Dabich D. (1971) Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem*. 39: 412-417.

45. Gökmen SS, Yıldız R, Özçelik F, Aktaş Z, Gülen Ş. (2006). Akut Myokard İnfarktüsünde Eritrosit Arjinaz Aktivitesinin Önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*. 31, 3: 115-123.
46. Gökmen SS, Yörük Y, Çakır E, Yorulmaz F, Gülen Ş. (1999). Arginase and Ornithine, As Markers in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Biochemistry Biophysics*. 17: 125-131.
47. Gözükara EM. (1997). Enzimler. "Biyokimya II". Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 572-678.
48. Gürsu FM. (1993). Çeşitli Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
49. Halifeoğlu İ. (1993). İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
50. Harris B, Pretlow TP, Bradley EL, Whitehurst GB, Pretlow TG. (1983). Arginase Activity in Prostatic Tissue of Patients with Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma. *Cancer. Res.* 43, 6: 3008-3012.
51. Hosoyama Y. (1972). The Reversible Inactivation of Rat Liver Arginase at Low pH. *Eur. J. Biochem.* 27: 48-52.
52. Hunter A, Downs CE. (1942). The Inhibition of Arginase by Amino Acids. *Canad. Chem. and Process Inds.* 427-445.
53. Husson A, Bouazza M, Buquet C, 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.
54. Ikemato M, Tabata M, Murachi T, Totani M. (1989). Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. *Ann. Clin. Biochem.* 26: 547-553.
55. Ishikawa T, Harada T, Koi H, Kubota T, Azuma H, Aso T. (2006). Identification of Arginase in Human Placental Villi. *Placenta*. xx: 1-6.
56. Ishmael J, Gopinath C, Howell J. (1971). Studies with Copper Calcium EDTA. *J.Comp. Path.* 81: 279-290.
57. İlhan N. (1992). İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
58. Kandemir FM, Özdemir N. (2008). L- Lizin ve L- Ornitinin Sığır Böbrek Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi. *Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi*. 22, 1: 01-04.
59. Kang JH, Cho YD. (1990). Purification and Properties of Arginase from Soybean, *Glycine max*, Axes. *Plant Physiol.* 93: 1230-1234.
60. Kaplan LA. (1987). Urea. "Methods in Clinical Chemistry". Pesce AJ, Kaplan LA. (Editörler). The CV Mosby Company, Toronto. Sayfa 22-27.

61. Karabay G, Aldemir D, Akin E, Ögüş E, Gür G, Boyacıoğlu S, Türkoğlu S. (2005). The Effects of Melatonin Treatment on Oxidative and Nitrosative Stress in Rats with Thioacetamide-Induced Hepatic Damage. *Hepatology Research*. 31: 160-167.
62. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. (2008). Insulin Reduces Plasma Arginase Activity in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 31, 1: 134-9.
63. Kaysen GA, Strecker HJ. (1973): Purification and Properties of Arginase of Rat Kidney. *Biochem J*. 133, 4: 779-788.
64. Kepka-Lenhart D, Ash DE, Morris SM. (2008). Determination of Mammalian Arginase Activity. *Methods Enzymol*. 440: 221-30.
65. Kesava Rao KV. (1973). The Inhibition of Sheep Liver Arginase by Some L- amino Acids. *International Journal of Biochemistry*. 4, 19: 62-70.
66. Kochakain CD, Berlett NM. (1948). The Effect of Crystalline Adrenal Cortical Steroids, DL-Thyroxine and Epinefrine on the Alkaline and Acids Phosphatases and Arginase of the Liver and Kidney of the Normal Adult Rat. *J. Biol. Chem*. 176: 243-247.
67. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG. (1985). Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininemia. *J.Clin. Chem. Clin. Biochem*. 23, 6: 337-342.
68. Konarska L, Tomaszewski L, Rolezyk U. (1986). Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 35: 170-178.
69. Konarska L, Tomaszewski L. (1986). Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, *Biochem. Med. and Met. Biol*. 35: 156-169.
70. Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. (1991). pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 286, 1: 217-221.
71. Kuhn NK, Ward SD, Pionski M, Young TW. (1995). Purification of Human Hepatic Arginase and its ve 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*. 320, 1: 24-34.
72. Kumar AN, Kalyankar GD. (1984). Effect of Steroid Hormones on Age Dependent Changes in Rat Arginase Isoenzymes. *Experimental Gerontology*. 19: 191-198.
73. Leu SY, Wang SR. (1992). Clinical Significance of Arginase in Colorectal Cancer. *Canser*. 70, 4: 733-736.
74. Ihan N, Gülen Ş. (1993). Tiroid Arginaz Enzim Aktivitesinin Farklı Metal İyonları Varlığında Isıya Karşı Stabilesi. *Biyokimya Dergisi*. 18: 59-67.
75. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.

76. Maarsingh H, Pera T, Meurs H. (2008). Arginase and Pulmonary Diseases. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.* 378: 171–184.
77. Maier KP, Volk B, Hoppe-Seyler G, Gerok W. (1974). Urea Cycle Enzymes in Normal Liver and in Patients with Alcoholic Hepatitis. *Europ.J. Clin. Invest* 4: 193-195.
78. Martincic T, Krvavica S. (1964). Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Ruminal Mucosa of Cattle. *Vet. Arh. Zagreb, Svezak.* 3-4: 90-93.
79. Mendez JD, Hernandez RDH, Conejo VA. (2006). Spermine Increases Arginase Activity in the Liver After Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury in Long-Evans Rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 60: 82-85.
80. Meram İ, Ahi S, Tarakçıoğlu M. (2000). Kanserde Serum Arginaz Aktivitesi. *Van Tıp Dergisi.* 7, 1: 20-23.
81. Metin S, Gökmen SS, Ayhan MS, Aygıt MS, Gülen Ş. (2002). Streptozotosin (STZ) ile Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Doku Arginaz Aktivitesi ve Ornitin Düzeyindeki Değişiklikler. *Türk Biyokimya Dergisi* 27, 4: 129-134.
82. Mohamed SA, Fahmy AS, Mohamed TM, Hamdy SM. (2005). Urea Cycle of *Fasciola Gigantica*: Purification and Characterization of Arginase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 142: 308 – 316.
83. Mohammed SM, Greenberg DM. (1945). Liver Arginase I. Preparation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, Inhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 8: 349-357.
84. Moreno-Vivian C, Soler G, Castillo F. (1992). Arginine Katabolism in the Phototrophic Bacterium *Rhodobactercapsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem.* 204: 531-537.
85. Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM. (2004). Decreased Arginine Bioavailability and Increased Serum Arginase Activity in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170: 148–153.
86. Moss S. (1952). Sodium Nucleata Inhibition of Arginase Activity. *Science.* 115: 69-70.
87. Mumenthaler SM, Rozengurt N, Livesay JC, Sabaghian A, Cederbaum SD, Grody WW. (2008). Disruption of Arginase II Alters Prostate Tumor Formation in TRAMP Mice. *The Pros.* 68: 1561-1569.
88. Mumenthaler SM, Yu H, Tze S, Cederbaum SD, Pegg AE, Seligson DB, Grody WW. (2008). Expression of Arginase II in Prostate Cancer. *Int. J. Oncol.* 32, 2: 357-65.
89. Murray RK., Granner DK., Mayes PA, Rodwell VW. (1991). Metabolism of Proteins and Amino Acids. In: "Harper's Biochemistry". Twenty-second ed., Typopress, Lebanon. 267-330.
90. Muszynska G, Wojtczak M. (1979). Influence of Immobilization on Conformation of Rat Liver Arginase. *Int. J. Biochem.* 10, 665-668.
91. Muszynska G, Severina LO, Lobyreva LW. (1972). Characteristics of Arginase from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organism. *Acta Biochem. Pol.* 19, 2: 109-111.

92. Muszynska G. (1976). Immobilization of Rat Liver Arginase. C.I Biospecific Chromatography. Protides of the Biological Fluids 23 RD. Colloquim. Oxford and New York. Pergamon Press, 633-637.
93. Nadolska-Lutykk J, Grabon W, Poremska Z. (1990). Arginase in Bull Testis. Acta Biochimica Polonica. 37, 3: 377-384.
94. Nikumb SK, Santhanam K, Rama K, Rao MV. (1987). Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamylyase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. Ann. Nut. Metab. 31: 387-394.
95. Ochoa JB, Bernard AC, Mistry SK, Morris SM, Figert PL, Maley ME, Tsuei BJ, Boulanger BR, Kearney PA. (2000). Trauma Increases Extrahepatic Arginase Activity. Surgery. 127, 4: 419-426.
96. 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.
97. Ozan S, Gülen Ş. (1991). Farklı Türlerin Organlarında Bulunan Arginazların Metilen Mavisi ile Fotoinaktivasyonu. Doğa Tr. J. of Biology. 15: 222-229.
98. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. (1991). İnsan Tükürük Arginazının Fotoinaktivasyonu. Biyokimya Dergisi 16, 3: 57-65.
99. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. (1993). Kısmen Arıtılmış Moniezia Expensa Arginazının Bazı Özellikleri. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 17: 245-250.
100. Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. (1999). Akkaraman ve İvesi Koyunlarında, Gebelikte ve Doğumdan Sonra Eritrosit, Tükürük ve Serum Arginaz Aktiviteleri İle Serum Üre ve Östrojen Düzeyleri. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 23: 345-350.
101. Ozan ST, Yaralıoğlu S, Yılmaz S, Özer E, Şaki CE, Sevgili M. (1999). Theileria Annulata ile Enfekte Sığırlarda GSH-Px, G6PD, Arginaz Aktiviteleri ile Bazı Biyokimyasal Parametreler. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 23, 3: 553-557.
102. Özçelik M. (2002). Koyun Meme Dokusu Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
103. Özdemir N, Ozan S. (1993). Moniezia Benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonu ve Kinetik Özellikleri. Eciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2, 2: 152-157.
104. Özdemir N, Ozan S. (1994). NEM, EDTA ve p-CMBA' nın Moniezia 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. Turk J. Vet. Anim. Sci. 25: 995-1000.
106. Özdemir N, Yaralıoğlu S, Ozan S. (1995). İnhibition Effect of L-Lysine and L-Ornithine on Arginase of M. Expensa. International Congress on Free Radikals in Healty and Diseases. İstanbul.
107. Özdemir N. (1990). Moniezia Benedeni Arginazının Bazı Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- 108.** Pace CN, Landers RA. (1981). Arginase Inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 658: 410-412.
- 109.** Pegg AE, Mccann P. (1988). Polyamine Metabolism and Function in Mammalian Cells and Protozoans. *Isi Atlas of Sci. Biochem.* 11-18.
- 110.** Pegg AE, Mccann P. (1982). Polyamine Metabolism and Function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 243, 12: 212-221.
- 111.** Peiser L, Balinsky JB. (1982). Kinetic Properties of Arginase from *Xenopus Laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 73, 2 : 215-220.
- 112.** Polat M F, Taysi S, Polat S, Büyük A, Bakan E. (2003). Elevated Serum Arginase Activity Levels in Patients with Breast Cancer. *Surg Today*. 33: 655–661 .
- 113.** Porembaska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Joanna Magnuska, Baranczyk-Kuzma A. (2003). Arginase in Patients With Breast Cancer. *Clinica Chimica Acta*. 328 :105– 111.
- 114.** Porembaska Z, Zabek J, Grabon W, Rahden-Staron I, Baranczyk-Kuzm A. (2001). Arginase Isoforms in Human Colorectal Cancer. *Clinica Chimica Acta*. 305 :157– 165.
- 115.** Porembaska Z, Zamecka E. (1984). Immunological Properties of Rat Arginases. *Acta Biochimica Polonica*. 31, 2: 223-227.
- 116.** Porembaska Z., Grabon W., Zelazowska, Czeczot H, Zamecka E. (1993). Nonidentity of Subunits of Human Kidney Arginase A1 and Human Liver Arginase A5. *Acta Biochemica Polonica*. 40, 4: 465-470.
- 117.** Powers GS, Meister T. (1982). Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. “The Liver: Biology and Pathobiology”. I. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz. (Eds). Raven Pres, New York. 251-263.
- 118.** Prasad GV, Lokanatha V, Sreekanth K, Rajendra W. (1997). Purification and Kinetic Properties of Mus *Booduga* (Gray) Hepatic Arginase. *Journal of Enzyme Inhibition*. 12, 4: 255-272.
- 119.** Rao NC, Cotlier E. (1984). Urea Cycle Enzymes in Retina, Ciliary Body-Iris, Lens and Senile Cataracts. *Exp. Eye Res.* 39: 483-495.
- 120.** Rawn JD. (1989). Catabolism of Amino Acids and the Urea Cycle. In: “Biochemistry”. First ed., Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina. 457-487.
- 121.** Reczkowski RS, Ash DE. (1994). Rat Liver Arginase: Kinetic Mechanism. Alternate Substrates and Inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 312, 1: 31-37.
- 122.** Reddy PNM, Romano Rao JV. (1981). Inhibition of Arginase in Sheep Brain Homogenates by Some L- Amino Acids. *Experientia*. 37: 814.
- 123.** Remesar X, Arola L, Palou A, Alemany M. (1980). Activities of Enzymes Involved in Amino Acid Metabolism in Developing Rat Placenta. *European Journal of Biochemistry*. 110, 1: 289-293.

- 124.**Reyero C, Dorner F. (1975). Purification of Arginases from Human-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of Their Physicochemical and Kinetic Properties. *Eur. J. Biochem.* 56: 137-147.
- 125.**Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A, Sikka G, Lim HK, Sohi J, Santhanam L, Soucy K, Taday E, Baraban E, Ilies M, Gerstenblith G, Nyhan D, Shoukas A, Christianson DW, Alp NJ, Champion HC, Huso D, Berkowitz DE. (2008). Endothelial Arginase II: a Novel Target for The Treatment of Atherosclerosis. *Circ Res.* 102, 8:866-8.
- 126.**Schimke RT. (1962). Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* 237, 2: 59-467.
- 127.**Scibior D, Ashamiss F, Wierzbicki Z, Baranczyk-Kuzma A. (2006). Arginase Activity in Blood Serum of Patients with Acute and Chronic Pancreatitis. *Pol Merkur Lekarski.* 21, 126: 522-4.
- 128.**Shimbayashi K, Yonemura T. (1970). An Aspect of Urea Cycle enzymes in Goat. *Agr. Biol. Chem.* 34, 11: 1603-1609.
- 129.**Shombough G.E.(1978). Urea Biosynthesis II.Normal Abnormal Regulation. *The American Journal and Nutrition.* 31: 126-133.
- 130.**Silva V. (1993): The Diagnosis of Urea Cycle Disorders. *Lab. Medica International.* 10, 3:13-15.
- 131.**Singh RA, Singh SN. (1990). Purification and Properties of Liver Arginase from Teleostean Fish *Clarias Batrachus* (L.). *Arch Int Physiol Biochim.* 98, 6: 411-9.
- 132.**Skrzypek-Osiecka I, Robin Y, Porembaska Z. (1983). Purification of Rat Kidney Arginases A1 and A4 and Their Subcellular Distribution. *Acta Biochim Pol.* 30, 1:83-92.
- 133.**Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. (1981). Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginase (author's transl)]. *Rev Esp Fisiol.* 37, 1: 37-44.
- 134.**Sondaç Ü. (1991). Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Uzmanlık Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
- 135.**Spector EB, Rice SCH, Cederbaum S.D. (1983). Immunologic Studies of Arginase in Tissues of Normal Human Adult and Arginase-Deficients Patients. *Pediatric Research.* 17, 12: 941-944.
- 136.**Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B,Cederbaum SD. (1982). Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochemical Medicine.* 28: 165-175.
- 137.**Spolarics Z, Bond JS. (1988). Multiple Moleculer Forms of Mouse Liver Arginase. *Archs. Biochem. And Biophys.* 260, 1: 469-479.
- 138.**Straus B, Cepelak I, Festa G. (1992). Arginase, A New Marker of Mammary Carcinoma . *Clinica Chimica Acta.* 210: 5-12.

139. Subrahmanyam TS, Reddy SR. (1986). L-ornithine and L-lysine Need Their Alpha-Carboxyl Groups for Effective Inhibition of Bovine Liver Arginase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 23, 6: 359-361.
140. Tumer GE, Weiss RL. (2006). Developmental Expression of two Forms of Arginase in *Neurospora Crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1760: 848-857.
141. Türkoğlu S, Özer I. (1992). Possible Involvement of Manganese in the Catalytic Mechanism of Bovine Liver Arginase. *Int. J.* 24, 6: 937-939.
142. Viator RJ, Rest RF, Hildebrandt E, McGee DJ. (2008). Characterization of *Bacillus Anthracis* Arginase: Effects of pH, Temperature, and Cell Viability on Metal Preference. *BMC Biochemistry.* 9, 15: 1-14.
143. Waddington SN. (2002). Arginase in Glomerulonephritis. *Kidney International.* 61: 876-881.
144. Wei CL, Hon WM, Lee KH, Mori M, Gotoh T, Khoo HE. (2002). Induction of Arginase II in Liver of Bile Duct-Ligated Rats. *Biochemical Pharmacology* 63: 1043-1050.
145. Witte MB, Vogt N, Stuelten C, Gotop T, Mori M, Becker HD. (2003). Arginase Acts as Alternative Pathways of L-Arginine Metabolism in Experimental Colon Anastomosis. *The Society for Surgery of the Alimentary Tract, Inc.* 7, 3: 378-385.
146. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, Peng FK, Wang SR. (1994). Serum Arginase Level in Patients With Gastric Cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* 18, 1: 84-5.
147. Wu CW, Chi CW, Tsay SH, Lui WY, Peng FK, Chang KL, Huang MH, Wang SR. (1987). The Effects of Arginase on Neoplasm. I. The Role of Arginase in the Immunosuppressive Effects of Extract from Gastric Cancer. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 20, 4: 279-89.
148. Wu CW, Wang SR, Chang TJ, Lin EC, Chang KL, Huang MH, Lui WY, Peng FK, Chi CW. (1989). Content of Glucocorticoid Receptor and Arginase in Gastric Cancer and Normal Gastric Mucosal Tissues. *Cancer.* 64, 12: 2552-2556.
149. Wu CW, Wang SR, Chien SL, Yeh TH, Lian SL, Shimizu N, Lui WY, Peng FK, Chi CW. (1992). Regulation of Arginase Production by Glucocorticoid in Three Human Gastric Cancer Cell Lines. *Life Sci.* 51, 17: 1355-61.
150. Zamecka E, Porembaska Z. (1988). Five Forms of Arginase in Human Tissues. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39, 3: 258-66.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 Afyonkarahisar doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Afyonkarahisarda, lise öğrenimimi ise Manisa’ da tamamladım. 1997 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2002 yılında mezun oldum. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora başladım. Halen Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezinde Müdür Yardımcısı olarak görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.