

58871

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**SİĞİR RUMEN DOKU ARGİNAZİNİN BAZI  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

T 58871

DOKTORA TEZİ

**Mine ERİŞİR**

F.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

T.C. YENİKÖYÜKÜLTÜR VE  
DOKÜMANTASYON MÜDÜRLÜĞÜ  
DANIŞMAN

**Prof. Dr. Sema OZAN**

ELAZIĞ-1997

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>1-ÖNSÖZ</b> .....	<b>1</b>
<b>2-GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
2.1. Ruminant Mideleri .....	<b>1</b>
2.2. Ruminantlarda Nitrojenin Muhafazası .....	<b>1</b>
2.3. Karaciğerdeki Amonyakın Kaynakları ve Üre sentezi ...	<b>3</b>
2.4. Arginaz Enzimi ve Özellikleri .....	<b>1 3</b>
<b>3-MATERYAL, METOT ve BULGULAR</b> .....	<b>2 4</b>
<b>3.1. MATERYAL</b> .....	<b>2 4</b>
3.1.1. Doku Örneklerinin Alınması .....	<b>2 4</b>
3.1.2. Doku Örneklerinin Homojenize edilmesi .....	<b>2 4</b>
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	<b>2 4</b>
<b>3.2. METOT 1</b> .....	<b>2 5</b>
3.2.1.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi .....	<b>2 5</b>
3.2.1.2. TDMU Metodunun Prensipleri .....	<b>2 6</b>
3.2.1.3. Metodun Ayıraçları .....	<b>2 6</b>
3.2.1.4. İşlem .....	<b>2 7</b>
3.2.1.5. Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	<b>2 9</b>
3.2.1.6. Biyolojik Sıvılarda Protein Saptanması .....	<b>3 0</b>
<b>3.3. BULGULAR 1</b> .....	<b>3 2</b>
3.3.1.1. İnkübasyon Zamanının Tespiti .....	<b>3 2</b>
3.3.1.2. Preinkübasyon Isısının Belirlenmesi .....	<b>3 3</b>
3.3.1.3. Preinkübasyon Zamanının Etkisi .....	<b>3 4</b>
3.3.1.4. pH'nın Etkisi .....	<b>3 5</b>
3.3.1.5. Metal İyonlarının Etkisi .....	<b>3 5</b>

3.3.1.6. $MnCl_2$ 'ün Etkisi .....	3 7
3.3.1.7. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	3 8
3.3.1.8. Bazı Guanidino Bileşiklerinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisi .....	4 0
3.3.1.9. Enzimde -SH gruplarının Varlığının Gösterilmesi .....	4 9
3.3.1.10. Rumen Doku Arginazının Amino Asit İnhibitörleri ...	5 4
3.3.1.11. Tiyoürenin Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi .....	7 3
<b>3.2. METOT 2 .....</b>	<b>7 6</b>
3.2.2.1. Sığır Rumen Doku Arginazının Saflaştırılması .....	7 6
3.2.2.1.1. Ayırıklar .....	7 6
3.2.2.1.2. İşlem .....	7 6
<b>3.3. BULGULAR 2 .....</b>	<b>7 9</b>
3.3.2.1. İnkübasyon Zamanının Tespiti .....	8 1
3.3.2.2. Preinkübasyon Isısının Saptanması .....	8 1
3.3.2.3. Preinkübasyon Zamanının Tespiti .....	8 2
3.3.2.4. pH'nın Etkisi .....	8 3
3.3.2.5. $MnCl_2$ 'ün Etkisi .....	8 4
3.3.2.6. Kısmen Saflaştırılmış Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan Km'i .....	8 5
<b>4-TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>8 8</b>
<b>5-ÖZET .....</b>	<b>1 0 4</b>
<b>6-SUMMARY .....</b>	<b>1 0 5</b>
<b>7-KAYNAKLAR .....</b>	<b>1 0 6</b>
<b>8-ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>1 1 5</b>
<b>9-TEŞEKKÜR .....</b>	<b>1 1 6</b>

## 1. ÖNSÖZ

Ruminantlarda amonyağın büyük miktarları ruminal mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Gerek proteinlerden gerekse protein yapısında olmayan nitrojenli maddelerden oluşan amonyağın büyük bir kısmı rumenden absorbe edilerek portal kan yolu ile karaciğere taşınmakta burada üreye dönüştürülmektedir. Sentez edilen ürenin %50'si başta tükürük bezleri yolu ile olmak üzere rumene geri gelerek burada tekrar amonyak ve karbondioksite parçalanmaktadır. Rumen ve karaciğer arasındaki bu azot dolaşımına "Rumino-hepatik azot dolaşımı" denilmektedir.

Arginaz (E.C. 3.5.3.1) Krebs-Henseleit üre döngüsünün son basamağını katalize eden bir enzim olup, arginini üre ve ornitine parçalamaktadır. Enzim en aktif şekilde karaciğerde bulunurken karaciğer dışındaki dokularda daha düşük aktivite göstermektedir. Üreotelik hayvanların karaciğerindeki arginazın ana fonksiyonu amonyağın detoksifikasyonu amacıyla ürenin üretimidir.

Ruminantların ön midelerinde hiçbir sindirim fermenti salgılanmadığı halde sindirim olaylarının en önemli bölümü ön midelerde cereyan etmektedir. Ruminantlarda sindirim sisteminin hem hacim hem de fizyolojik olarak önemli bir bölümünü rumen oluşturduğundan ve diğer mide kompartmanlarına göre rumen dokusunda daha yüksek düzeyde arginaz aktivitesi tespit ettiğimizden sunulan çalışmada rumen doku arginazının kinetik özellikleri ile bazı biyokimyasal koşullarını optimize etmeyi ayrıca rumen doku arginazının bazı moleküllere (inhibitörler ve aktivatörler) karşı ilgisini araştırmayı amaçladık. Rumen doku arginazının kinetik özellikleri ve bazı biyokimyasal özellikleri konusunda yapılan taramalar sonucu hiçbir literatür bilgiye rastlanamamıştır.

Karaciğer dışındaki birçok dokuda ve üreotelik olmayan bazı canlılarda da aktif arginaz enzimi bulunması arginaz enziminin amonyağın

## II

detoksifikasyonu dışında da bazı görevleri olabileceği düşüncesini gündemde tutmaktadır. Çalışmada ayrıca rumen dokusundaki arginazın muhtemel fonksiyonu da tartışılacaktır.

Bu tezin, rumen doku arginazı ile ilgili yapılacak olan bundan sonraki biyokimyasal çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz.



## 2.GİRİŞ

### 2.1. Ruminant Mideleri

Ruminantların mideleri oldukça hacimli olup, dört kompartmandan meydana gelmiştir. Bu kompartmanlar sırası ile rumen, retikulum, omasum ve abomasumdur.

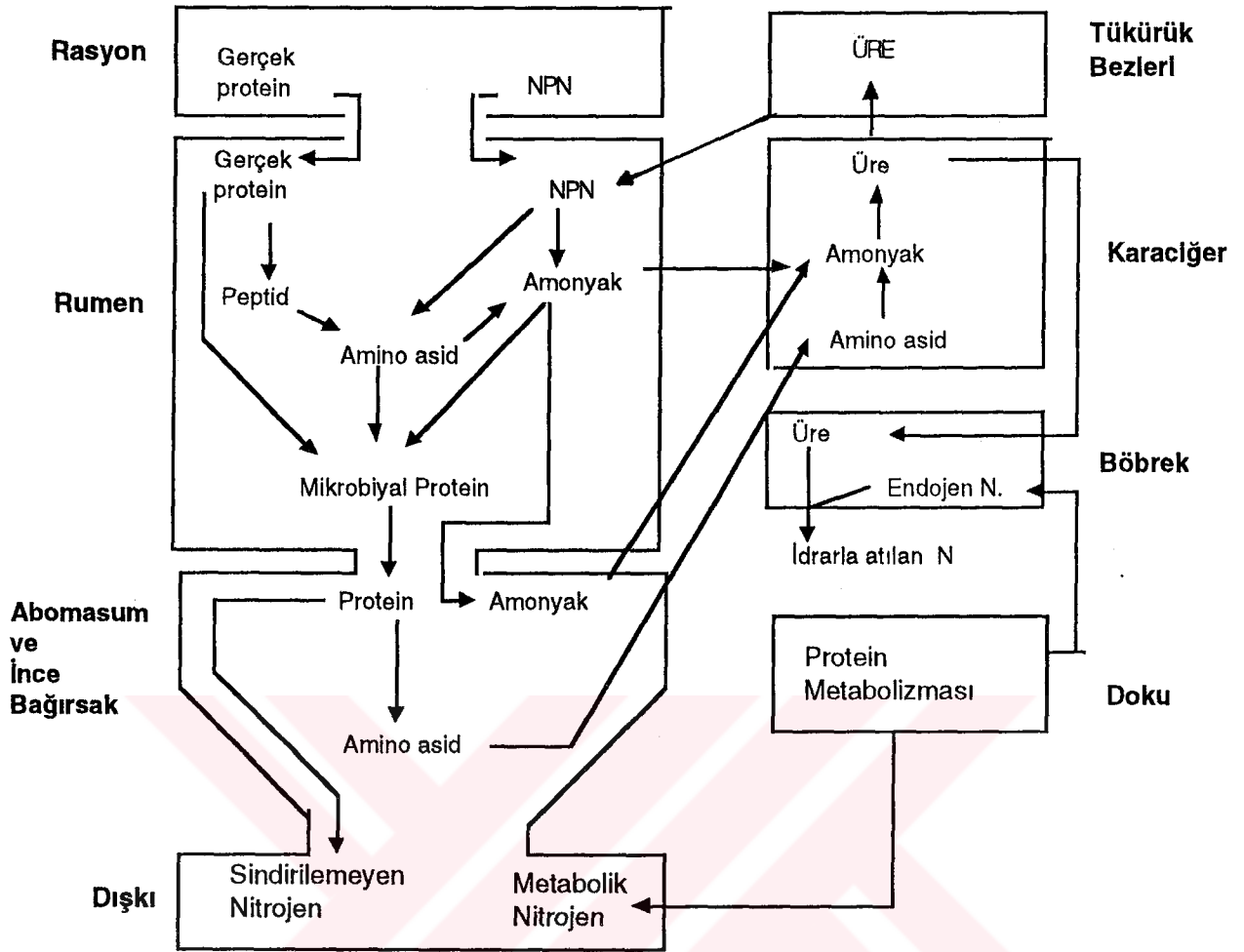
Rumen, retikulum ve omasum nonglandular, abomasum ise glandular tabiattaki mide kısmını oluşturur. Abomasum yapı ve fonksiyon bakımından genellikle ruminant olmayan hayvanların midelerine benzemektedir. Yetişkin bir ineğin tüm midesi, hayvanın ırkına bağlı olarak 100 ile 235 litrelik bir hacim kaplamaktadır. Bu hacimin yaklaşık %85'ini rumen ve retikulum oluşturmaktadır. Rumenin kapasitesi 102 ile 148 litre iken omasum 7-18, abomasum 10-20 litrelik bir hacime sahiptir. Rumen, retikulum, abomasumun normal içeriği sıvı iken, omasumun ki kısmi olarak katıdır (6).

### 2.2. Ruminantlarda Nitrojenin Muhafazası

Ruminantlarda, protein metabolizması tek midelilerinkinden çok daha değişiktir (Şekil 1). Çünkü tek midelilerde ancak gerçek proteinlerin sindirilebilir ve vücutta kullanılabilir olmasına karşılık, ruminantlarda bütün nitrojenli bileşikler değerlendirilmektedir.

Rumen sıvısı, çeşitli bakteri ve protozoonlardan ileri gelen yüksek bir proteinaz aktivitesine sahiptir. Bu bakımdan geniş getiren hayvanlarda proteinlerin %70-80'i rumende yıkılır.

Gerçek proteinler mikrobiyal proteinaz etkisiyle polipeptidlere, polipeptidler aminopeptidaz ve karboksipeptidazlar etkisiyle önce peptidlere sonra da amino asitlere ayrılırlar. Bu amino asitlerin bir bölümü yine mikroorganizmalarca yeniden protein sentezinde kullanılırken, diğer bir kısmı daha fazla parçalanarak organik asitleri, amonyak ve karbondioksiti meydana getirmektedirler.



**Şekil 1: Ruminantlarda Nitrojenin Kullanılması (Rumino-hepatik azot dolaşımı, Protein rejenerasyon döngüsü) (75).**

Protein yapısında olmayan nitrojenli maddeler [ NPN (nonprotein nitrogen)=nükleik asitler, purin ve pirimidin bazları, alkaloitler, kolin, betainler, nitrat, amonyak ve üre] rumende mikroorganizmaların etkisi ile kısa zincirli yağ asitlerine, amonyağa ve karbondioksite parçalanırlar.

Her iki kaynaktan gelen amonyağın bir kısmını, rumen mikroorganizmaları üreyebilmeleri için kendi vücut proteinlerinin sentezinde kullanırlar. Amonyagın büyük bir kısmı ise rumenden absorbe edilerek kan yolu ile karaciğere taşınır ve burada üreye dönüşür. Sentezlenen ürenin yaklaşık % 50'si böbrekler yolu ile dışarı atılır, % 50'si ise başta tükürük bezleri yoluyla olmak üzere, NPN olarak tekrar rumene geri gelir.

Burada tekrar bakteriyal üreaz ile karbondioksit ve amonyağa yıkılır. Parotis bezinin tükürük sekresyonundaki total nitrojenin % 60-70'i üre nitrojenidir. Rumen ve karaciğer arasındaki bu azot dolaşımına "**Rumino-hepatik azot dolaşımı**" denir (Şekil 1) (6,14,52,75).

Gerek sindirilemeyerek rumeni geçen gerçek proteinler ve gerekse rumende sentezlenen mikrobiyal proteinler, abomasum ve ince bağırsakta tek midelilerdeki gibi sindirilmektedir. Açığa çıkan amino asitler, absorbe edilerek vücut proteinlerinin yapımı, doku yenilenmesi ve büyüme için kullanılır.

Ürenin, mikrobiyal proteinlerin yapımında kullanılması, daha sonra mikrobiyal proteinlerin gastrointestinal kanaldan absorbe edilebilen amino asitlere yıkımı, dokular tarafından bu amino asitlerin metabolizması ile ürenin meydana gelmesi, mikrobiyal proteinlerin oluşumunda kullanılmak üzere ürenin tekrar rumene dönüşüne "**Protein rejenerasyon döngüsü**" de denir (6).

### **2.3. Karaciğerdeki Amonyakın Kaynakları ve Üre Sentezi**

Hayvanlar, amino asit ve diğer kaynaklardan gelen azotu, şu üç son üründen bir tanesine çevirirler; amonyak, ürik asit veya üre. Başka bir deyişle canlılar azot metabolizması son ürünlerine göre üç grupta toplanmaktadırlar;

**a-Amonotelik organizmalar;** Kemikli balıklar nitrojeni amonyak halinde atarlar. Balıkların bulunduğu sulu ortam nedeniyle balıklar devamlı olarak suyu dışarı atmaya zorlanırlar. Bu sırada oldukça toksik bir bileşik olan amonyağın devamlı olarak ekskresyonu da sağlanmış olur.

**b-Ürikotelik organizmalar;** Kuşlar ve sürüngenler, su almaları gayet kısıtlı olduğu için amonyağı, üreye göre suda daha az çözünen ürik asit halinde atarlar.

**c-Üreotelik organizmalar;** Kara hayatına uyum sağlamış pek çok omurgalı da amonyağı, suda kolay çözünen ve nontoksik bir bileşik olan üre halinde atar (20,43,56).

Amonyak, fizyolojik pH'da hemen tamamen (%98) amonyum iyonu ( $\text{NH}_4^+$ ) halinde bulunur ve iyonize haldeyken mitokondria ve hücre zarlarını geçemez (43,56).

Karaciğerdeki amonyağın kaynaklarını gösteren enzimatik reaksiyonlar Tablo 1'de listelenmiştir.

İlk üç reaksiyon deamidasyon reaksiyonu olup, amonyak; glutaminin (No:1), asparajinin (No:2) veya bu iki amino asidin  $\alpha$ -keto analoglarının (No:3) amid grubundan ayrılabilir.

Piridoksal fosfat bağımlı deaminasyon reaksiyonları amonyak üreten reaksiyonların diğer bir sınıfını oluşturur. Böylece amonyak; serin, treonin, sistein, sistationin ve homoslerinden ayrılır (No:4-6).

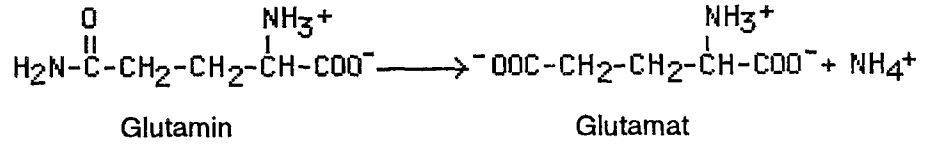
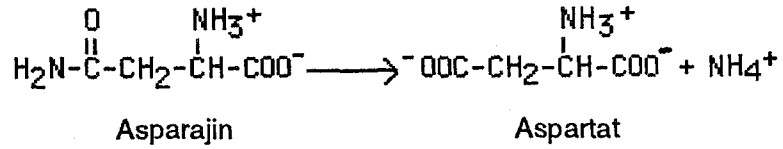
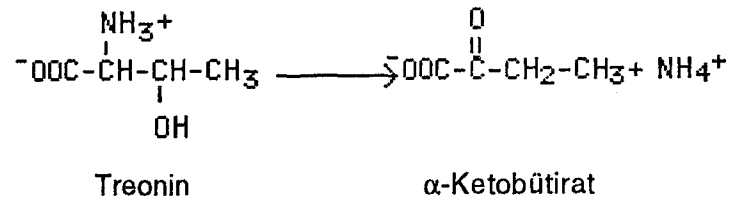
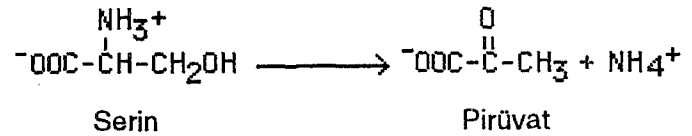
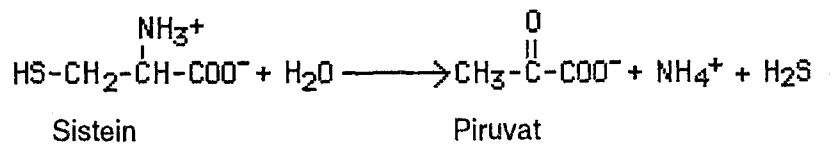
Amonyak nonoksidatif deaminasyonla histidinden salınır (No:7).

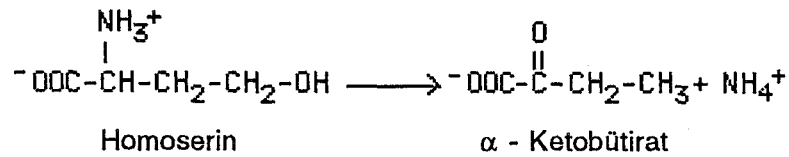
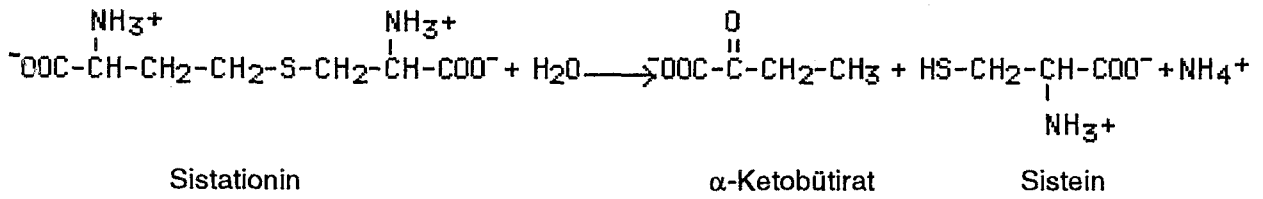
Oksidatif deaminasyon reaksiyonlarını katalize eden flavin bağımlı D-aminoasit oksidaz, glisin ve diyetsetel D-aminoasitleri yıkarak amonyak oluşturur (No:8).

Amin oksidazlar, epinefrin, norepinefrin, serotonin kapsayan mono ve diaminlerin bir kısmını deamine ederler (No:9).

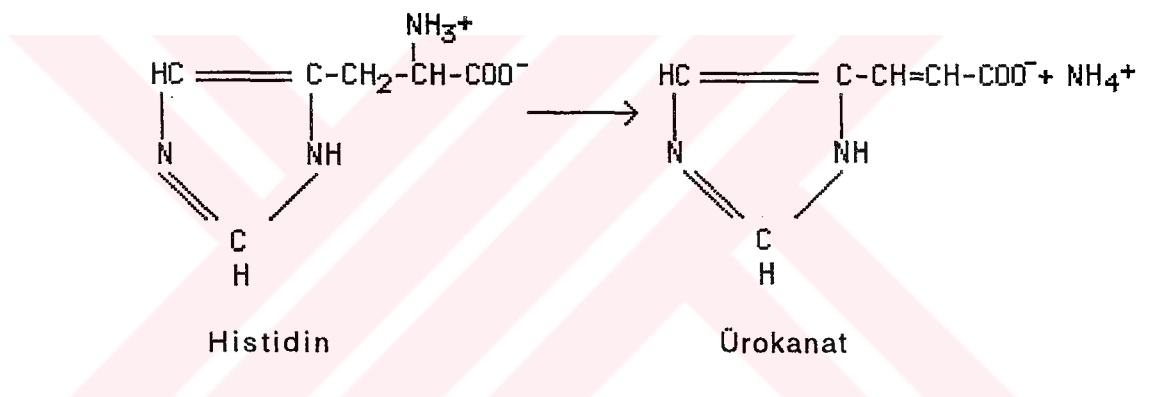
Amonyak veren reaksiyonların diğer kategorisi nükleik asit bazları ve onların türevlerinin hidrolitik deaminasyonudur (No:10-13).

Amonyak gastrointestinal kanalda ürenin bakteriyel yıkımından da meydana gelebilir (43,54).

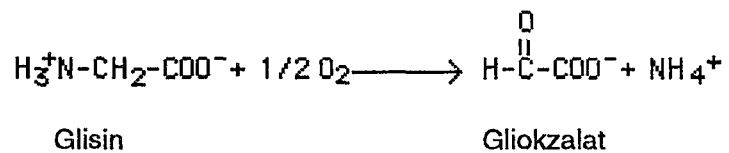
**Tablo 1: Karaciğerde amonyak üreten enzimatik reaksiyonlar (43,54).****No:1. Glutaminaz****No:2. Asparaginaz****No:3. ω- Amidaz****No:4. Serin, treonin dehidrazlar****No:5. Sistein desulfidraz**

No:6. Sistationin  $\gamma$ -Liyaz

## No:7. Histidin amonyak-liyaz



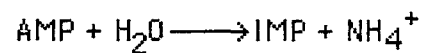
## No:8. D-Amino asit oksidaz



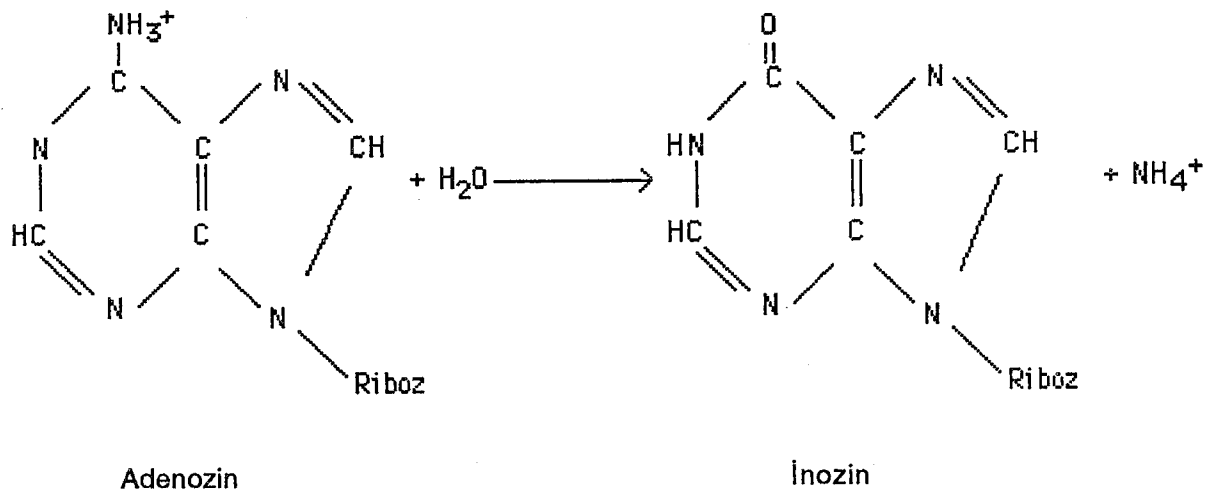
## No:9. Amin oksidaz



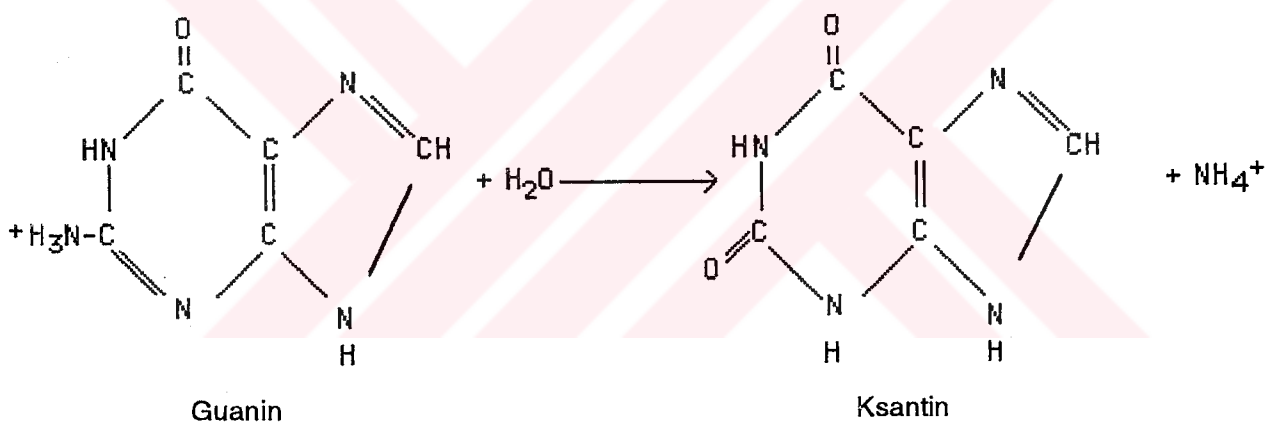
## No:10. AMP deaminaz



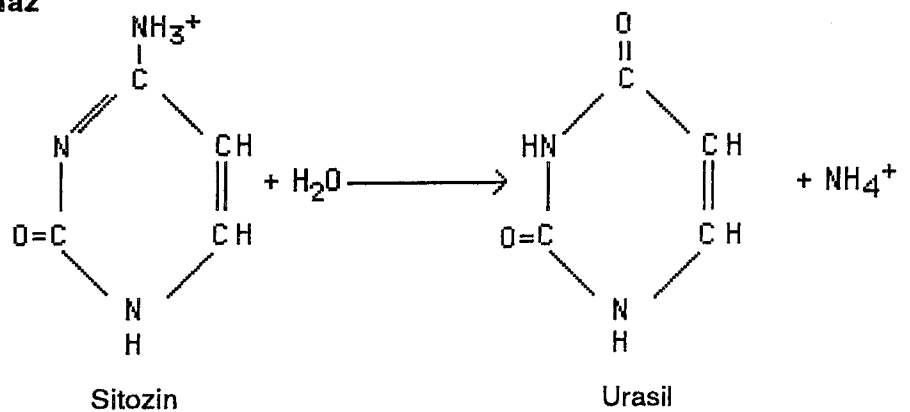
## No:11. Adenozin deaminaz



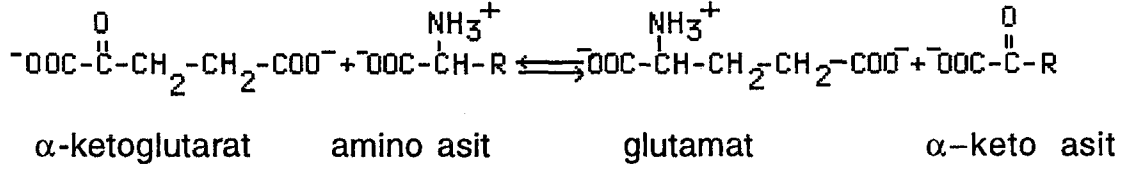
## No:12. Guanin deaminaz



## No:13. Sitozin deaminaz

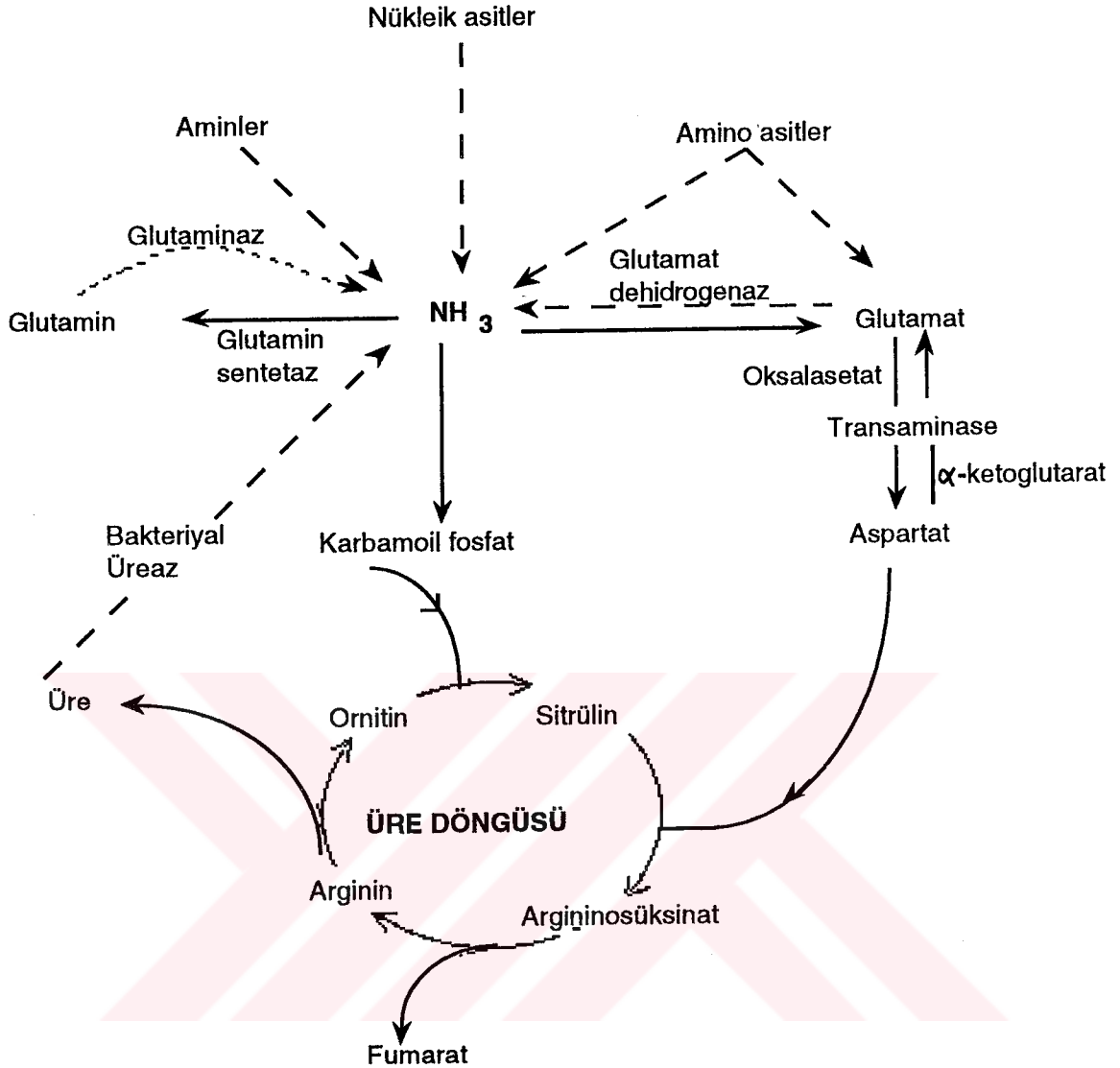


Hepatik amonyağın en önemli miktarı, glutamat dehidrogenazla katalize olan glutamatın, oksidatif deaminasyonundan oluşur. Transaminasyona uğrayabilen amino asitlerden gelen amino azotunun hepsi glutamat içinde toplanabilir.



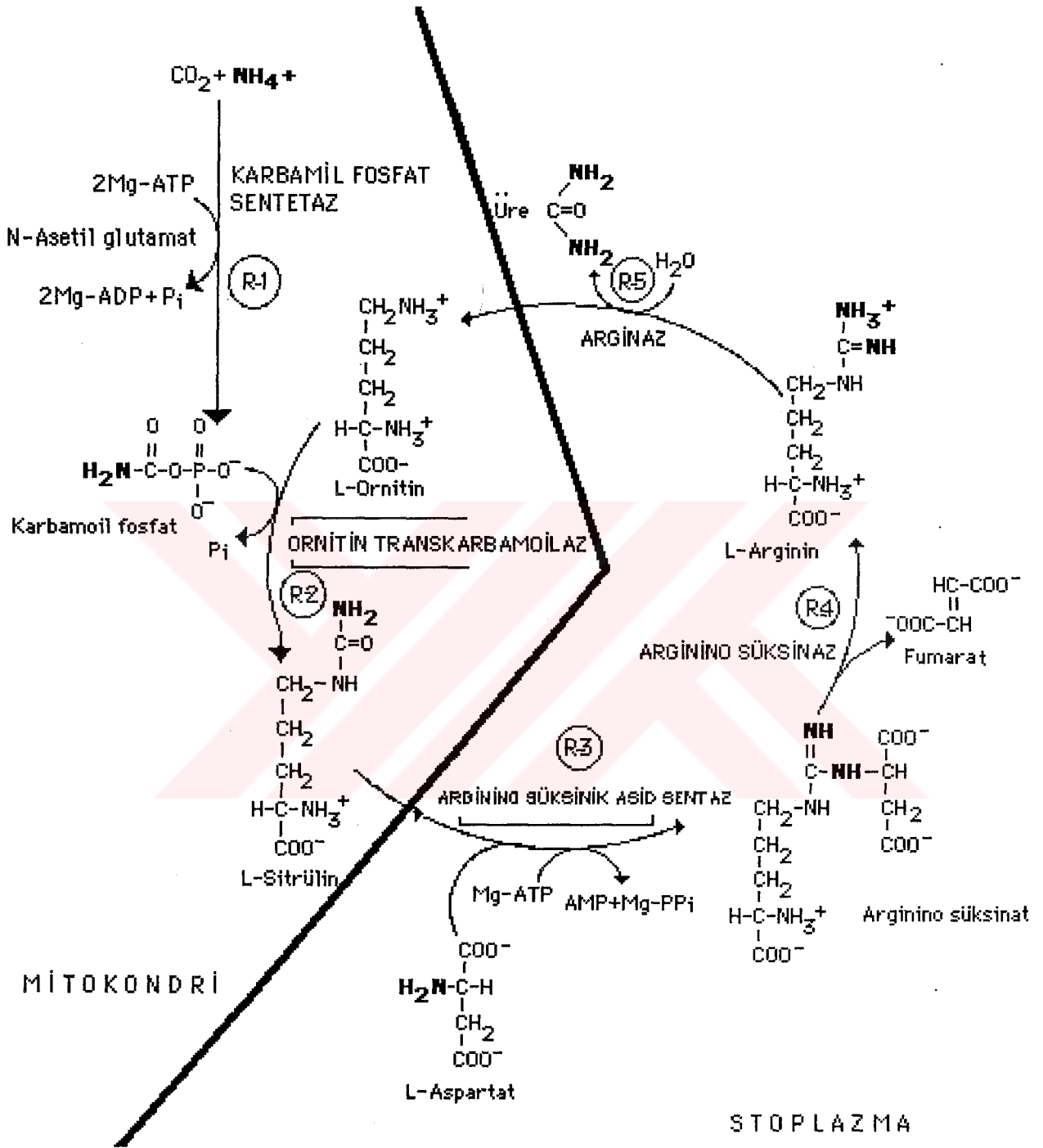
Çünkü; L-Glutamat memeli dokularında bulunup, önemli bir hızda oksidatif deaminasyona uğrayan tek amino asittir. Bu nedenle L-glutamat dehidrogenaz azot metabolizmasında merkezi konumda bulunur (43).

Karaciğerdeki bu amonyak kaynaklarının kısaca özetlenmiş şeması Şekil 2'de gösterilmiştir.



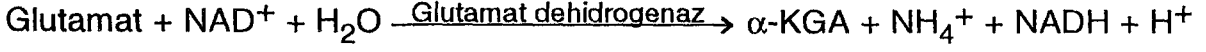
**Şekil 2:** Karaciğerdeki Amonyak Metabolizmasının Genel Şeması (54).  
 (----; Amonyanın meydana geldiği kaynaklar. ———; Amonyanın kullanım yolları.)

Amonyaktan üre oluşumu bir dizi reaksiyon sonucu oluşur ki buna "**Üre Döngüsü**" denir. İlk defa 1932 yılında H.A. Krebs ve K. Henseleit tarafından keşfedilmiş olup, Krebs-Henseleit döngüsü olarak da bilinmektedir (Şekil 3).



Şekil 3: Üre Döngüsü (43).

Üre sentezine ilk giren amino grubunun kaynağı, karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan glutamat dehidrogenaz enziminin faaliyeti sonucu, glutamatın oksidatif deaminasyonu ile ortaya çıkan serbest amonyaktır.



Bu reaksiyon sonucu ortaya çıkan **amonyum iyonu** ( $\text{NH}_4^+$ ) ve mitokondride solunum sonucu meydana gelen  $\text{CO}_2$ 'den, matrikste ATP bağımlı bir enzim olan **karbamoil fosfat sentetaz I** enzimi aracılığı ile **karbamoil fosfat** meydana gelmektedir (Şekil 3, R-1). Karbamoil fosfat sentetaz I enzimi regulasyonu sağlayan bir enzim olup N-Asetil glutamat, enzimin pozitif modülatörüdür.

Karbamoil fosfat yüksek enerjili bir bileşiktir. İki molekül ATP'nin son fosfat grupları bir molekül karbamoil fosfat elde etmek için kullanılmaktadır. Üre döngüsünün bir sonraki basamağında karbamoil fosfat, karbamoil grubunu ornitine vermekte ve **sitrülin** meydana gelirken fosfat grubu serbest hale geçmektedir. Reaksiyon,  $\text{Mg}^{++}$ 'a gereksinim duyan mitokondrial **ornitin transkarbamoilaz** tarafından kataliz edilmektedir (Şekil 3, R-2).

Mitokondri içinde meydana gelen sitrülin buradan stoplazmaya geçmekte, stoplazmada **aspartatın** amino grubu ile sitrülinin karbonil karbonu arasında 1 mol ATP harcanması ile bir kondensasyon meydana gelmekte ve **argininosüksinat** oluşmaktadır. Bu reaksiyon stoplazmada bulunan ve  $\text{Mg}^{++}$ 'a ihtiyaç duyan **argininosüksinat sentaz** enzimi tarafından katalizlenmektedir. L-aspartat ikinci amino grubu vericisidir (Şekil 3, R-3). Enerji dengesi ATP'nin ve ondan oluşan pirofosfatın hidrolizi ile ürünler lehine çevrilir.

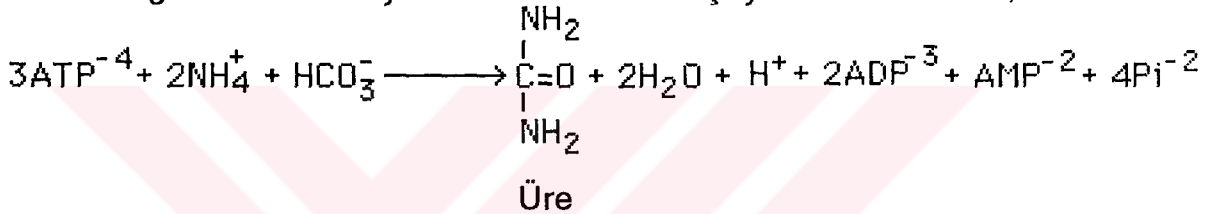
Bir sonraki basamakta **argininosüksinat** geriye dönüşümlü olarak

**argininosüksinat liyaz** (Arginino süksinaz) tarafından koparılmakta **arginin** ve **fumarat** oluşmaktadır (Şekil 3, R-4). Bu noktaya kadar olan reaksiyonlar birçok canlılarda arginin biosentezinde kullanılmaktadır.

Buradan meydana gelen fumarat, sitrik asit döngüsüne girmekte ve bu noktada sitrik asit döngüsü ile üre döngüsü birbirine bağlanmaktadır.

Üre döngüsünün son reaksiyonunda **ARGİNAZ**, arginini hidrolize eder, **üre** ve **ornitin** meydana gelir (Şekil 3, R-5). Meydana gelen ornitinin tekrar mitokondriye girmesi ile üre döngüsünün birinci basamağı tamamlanmış olur.

Üre döngüsünün stokiyometrik denklemi şöyle özetlenebilir;



Üre döngüsü ile iki artık madde olan amonyak ve bikarbonattan oluşan üre vücut dışına atılmaktadır ( 20,43,56).

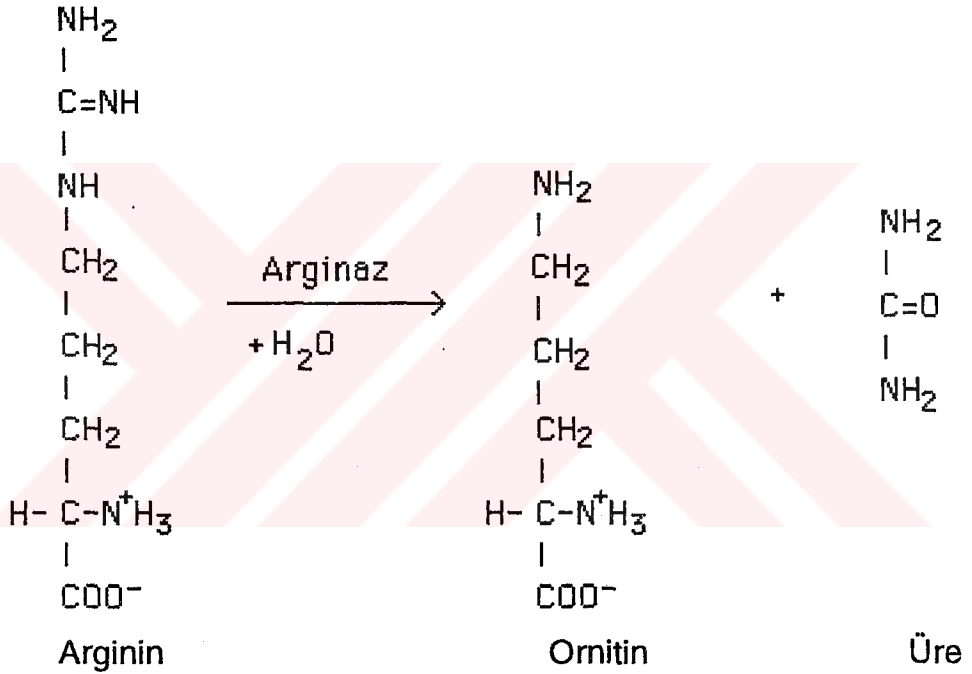
Karaciğer hücrelerinde meydana gelen ürenin %95'i böbreklerle, %5'i feçes ile dışarı atılır (43).

Bir mol ürenin sentezi için 3 ATP molekülünün harcanması gerekmektedir. Üre sentezi ekonomik açıdan pahalı bir metabolik yoldur. Memelilerin ve diğer canlıların amonyak yerine üre atmaları, amino asit katabolizması sonucu elde ettikleri enerjinin %15'ini harcamalarına neden olmaktadır. Geviş getirenlerde bu enerji kaybının kısmen önlendiğine inanılmaktadır. Örneğin sığırlar, sentez ettikleri ürenin %50'sini tükürük ve kan yoluyla tekrar rumene göndermekte, rumende bakterilerin çıkardığı üreaz ile üre amonyağa dönüşmekte ve amonyak rumen bakterileri tarafından tekrar amino asit sentezinde kullanılmaktadır. Bu amino asitler ise bağırsaktan tekrar absorbe edilerek hayvan tarafından yeniden kullanılmaktadır.

Develer de aynı yola başvururlar. Bu sistemin en büyük avantajı, üreyi rumene göndererek su israfının önüne geçmektir. Böylece ürenin böbreklerden atılımı için daha az su gerekir (20).

#### 2.4. Arginaz Enzimi ve Özellikleri

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1), üre döngüsünün son enzimi olup, aşağıdaki reaksiyon ile L-arginini üre ve ornitine hidrolize eder. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından gösterilmiştir (46).



Üre döngüsü her hücrede bulunmamakla beraber, arginaz genellikle birçok hücrede bulunmaktadır. Karaciğer hem arginaz enzimini hemde üre döngüsünün diğer enzimlerini kapsadığından, üre sentezinin önemli bir kısmı bu organda oluşmaktadır (37,70).

Ana kaynağı üre döngüsünün bulunduğu karaciğer olan arginaz enzimine böbrek, bağırsak, beyin, rumen, akciğer, kalp, dalak, iskelet kası, eritrosit, fibroblast, makrofaj, tükürük bezleri v.s. dokularda da düşük düzeylerde

rastlanmaktadır (1,12,28,34,46,60).

Arginaz enziminin varlığı bakteriden insana kadar (*Neurospora crassa*, *Saccharomyces cevisiae*, *Bacillus anthracis*, solucan, *M. expansa*, salyangoz, balık, kertenkele, fare, tavşan, köpek, at, sığır, domuz, maymun, insan....) geniş bir dağılım göstermektedir (7,8,50).

Ancak Krebs-Henseleit üre döngüsü ile üre sentezleyemeyen (non-üreotelik) canlılarda ve dokularda da arginaz bulunmaktadır fakat bunun metabolik fonksiyonu halen tam olarak anlaşılamamıştır. Üreotelik hayvanların karaciğerindeki arginazın ana fonksiyonu, amonyağın detoksifikasyonu için ürenin üretimidir. Reaksiyonun diğer ürünü ornitin; prolin ve poliaminler için önemli bir prekürsördür. Bu nedenle meme bezleri ve beyin gibi üre döngüsünün olmadığı dokularda, arginazın primer fonksiyonunun; gerek prolin gerekse hücre bölünmesi ve farklılaşması için gerekli olan poliaminlerin, sentezi için gerekli öncül molekül ornitini sağlamak olduğu ileri sürülmektedir (1,30,81). Yani extrahepatik dokular arginazı üre döngüsünden başka amaçlar için kullanmaktadır.

Non-üreotelik canlı ve dokularda arginazın yaygın bulunuşu canlıların evrimine bağlanmaktadır. Bazı araştırmacılara göre evrimin ilk dönemlerinde tüm canlılar üre döngüsüne sahip olmalarına rağmen, evrim sonucu biyokimyasal değişimler geçirerek, arginaz hariç diğer üre döngüsü enzimlerinin kaybolduğunu ileri sürmüşlerdir (9,55,76). Brown ve Cohen'de (7), nitrojen düzenlenmesinde, organizmaların üre döngüsünden başka metabolik yolları kullanması ile döngünün diğer enzimlerinin represe (baskı altına alındığını) olduğunu veya silindiğini ileri sürmüşlerdir.

Gerek fare gerekse insan dokularında yapılan çalışmalarda arginaz enziminin beş izoenzimi olduğu saptanmıştır (34,64,79,82). İmmuno-elektroforez, CM-(Karboksimetil-) ve DEAE-(Diethylaminoetil-) sellüloz kromatografisi, çift-immunodiffüzyon testi ile saptanan  $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5$

izoenzimleri; farklı izoelektrik nokta, immunolojik özellik, elektroforetik mobilite ve organlar arasında farklı dağılım göstermektedirler (30,33,34,40,59, 64,82). İzoenzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir:

Karaciğer ( $A_1, A_2, A_3, A_5$ )

Böbrek, bağırsak, beyin ( $A_1, A_4$ )

Submaxillar tükürük bezi ( $A_3$ )

Fibroblast ( $A_1, A_2, A_3$ )

Eritrosit ( $A_2, A_4$ )

Tükürük, Parotis bezi ( $A_1$ )

Meme bezi ( $A_1, A_2$ )

İnsan dokularından izole edilen tüm bu izoenzimler,  $120.000 \pm 5.000$  Da molekül ağırlığına sahip olup (40,82), moleküler ağırlıkları  $39.200 \pm 400$  Da olan üç subünitenin bir araya gelmesiyle trimerik yapı gösterirler (5,8,28).

Ancak farklı memelilerin karaciğerlerinde yapılan çalışmalarda, arginazın, moleküler ağırlıkları 38.500 - 39.700 Da olan subünitelerin bir araya gelmesi ile moleküler ağırlığı 110.000 - 150.000 Da olan tetramerik bir molekül olduğu da tanımlanmıştır (8,54,59,72).

$A_1$  ve  $A_5$  izoenzimleri farklı antijenik determinanta sahip olduklarından,  $A_1$ -anti  $A_5$  ile,  $A_5$ -anti  $A_1$  ile presipite olmaz.  $A_2, A_3, A_4$  enzimleri farklı iki antijenik determinanta sahip olup hem anti  $A_1$  hemde anti  $A_5$  ile reaksiyon verirler. Tüm bu izoenzimler bazik proteinler olup izoelektrik noktaları 7.1-9.3 ( $A_1=7.1, A_2=7.7, A_3=8.4, A_4=8.9, A_5=9.3$ ) arasında değişmektedir (82).

Oysa fare karaciğer arginazı üzerinde yapılan çalışmalarda, 35.000 Da ve 38.000 Da moleküler ağırlığına sahip olan bu subünitler, izoelektrik

noktaları 7.8-9.1 olan bazik proteinler ve izoelektrik noktaları 5.8-6.4 olan asidik proteinlerdir (72).

Böbrekteki  $A_1$ , karaciğerdeki  $A_5$  izoenzimi dayanıklı olup,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de uzun süre saklanabilirken diğer formlar çok daha az dayanıklıdır, özellikle  $A_2$  izoenzimi hemen alt birimlerine ayrılır (82). Dondurulmuş materyal,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de en azından 2 ile 3 hafta,  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de ise birkaç ay depolanabilir (Arginaz enzimi aktivitesini koruyabilir.) (15).

Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşimlerinin de farklılık gösterdiği saptanmıştır. Karaciğer için ana form olan  $A_1$  stoplazmada yerleşirken, böbrek için ana form olan ve üre sentezinden ziyade prolin biyosentezinde görevli olduğu ileri sürülen arginazın  $A_4$  formu mitokondrial yerleşim göstermektedir. Böbrek  $A_1$  arginazı ise stoplazmada sınırlanmıştır (10,64). Taylor ve Stewart (77) ise arginazın bezelye yaprağı mitokondrionlarında yerleştiğini bulmuşlardır.

Beslenme ile arginaz arasındaki ilişki incelendiğinde, protein alımının arginaz aktivitesini artırdığı (62,63,65,66,67), bunun substrat konsantrasyonundaki veya enzim kinetiğindeki değişiklikten değilde, enzim protein sentezinin artışından ileri geldiği bildirilmektedir (62,65,66). Shimbayashi ve Yonemura (63), keçileri yüksek protein ve düşük protein diyetiyle beslediklerinde; yüksek protein diyetiyle beslenenlerde düşük protein diyetiyle beslenenlere oranla üre döngüsü enzim aktivitelerinin ve serum üre nitrojen düzeylerinin daha fazla olduğunu, düşük protein diyetiyle beslenenlerde ise aksine hepatik amonyak nitrojen seviyesinin daha fazla olduğunu bulmuşlardır ve karaciğerdeki amonyak seviyesinin üre döngüsü enzimlerini hızlandırdığını (acceleratör) ileri sürmüşlerdir. Yine aynı araştırmacılar rasyona magnezyum aspartat ilavesinin arginaz enzim aktivitesini %46 artırdığını bildirmişlerdir.

Snodgrass (67),  $CCl_4$  ile mikronodüler siroz oluşturup, sonra ratları kazein diyetiyle besleyerek, üre döngüsünde görevli 5 adet enzimin de 1.5-3 misli indüksiyonuna (protein sentezinin artması) sebep olmuştur. Yine aynı araştırmacı, üre döngüsü enzimlerinin indüksiyonundan sorumlu olan kazein diyetindeki amino asitlerin; alanin, glisin, metionin, sistein olduğunu belirlemiştir (66).

Düşük protein diyetinde ve açlık (perhiz) durumlarında farklı dokulardaki arginazların aktivitelerinde genel bir azalma olmakta (57,62), fazla karbonhidrat alımında üre döngüsü enzimleri azalmakta, karbonhidrat alımı azaldığında da üre döngüsü enzimleri artmaktadır (62).

Enzim aktivitesinin alınan proteine bağlı olarak değişimi, memeli sisteminde spesifik enzim proteininin sentez ve yıkımına sebep olan bir adaptasyon mekanizması sonucu olmaktadır (62).

Bazı araştırmacılar ise farklı protein diyetleri altında, üre döngüsü enzim aktivitelerinde bir değişiklik olmaksızın, karaciğerde artan bazı serbest amino asitlerin üre sentez hızını regüle ettiğini ileri sürmüşlerdir. Enzim düzeyleri ile diyetle alınan protein türü arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır (25).

Fötal dönemde ve erken postnatal dönemde bağırsakta arginaz aktivitesi düşükken, süttten kesilme ile bağırsaktaki arginaz aktivitesi yetişkin seviyesine yükselir (34,58). Araştırmacılar bunu; alınan proteinlerin fötal ve erken postnatal yaşamda, vücutta fazla nitrojen depolanmasında (vücut proteinlerinin yapımında) kullanılmasına bağlamaktadırlar (58).

Arginaz enzimi, hormonal etkiye bağlı olarak da değişim göstermektedir. Snodgrass (65,68) ve Ulbright (78), gerek hücre kültürlerinde, gerekse ratlarda yaptıkları çalışmalarda, glikokortikoidlerin ve glukagonun arginaz ve diğer üre döngüsü enzimlerini indüklediklerini bildirmişlerdir. Dexametazon ve glukagon, rat hepatosit kültürlerinde

arginaz m-RNA'sı için transkripsiyon hızını 7 saat içinde 9 kat, m-RNA seviyesini 28 saat içinde 90 kat arttırmışlardır. Böylece arginaz aktivitesi 48 saat içinde 1.5 kat artmıştır. Arginazın indüksiyonunda, primer olarak m-RNA'nın stabilizasyonunun söz konusu olduğu ileri sürülmektedir (78). Hidrokortizon ve tiroksin ( $T_4$ ) verilen ratlarda; bağırsak ve böbrek için ana form kabul edilen  $A_4$  formunun erken şekillendiği (34), beyin arginazının ise bu hormonlardan etkilenmediği bulunmuştur (32). Bu hormonlar bağırsak ve böbrekteki arginaz  $A_4$  formunun şekillenmesi için gereklidir.

Fare peritoneal makrofaj kültürlerinde; dalak hücrelerinin çeşitli immun reaksiyonlarını ve lenfoma hücrelerinin (malign hücreler) proliferasyonunu inhibe eden makromolekülün, arginaz olduğu in vitro deneylerle ispatlanmıştır (12,16). Lenfosit proliferasyonunun inhibisyonu üzerine, arginazın tesirinin birincil şekli, kültür ortamındaki argininin tüketilmesidir (12,16,27). Karaciğer ekstraktlarındaki arginaz; lenfosit kültürlerinde timidin inkorporasyonunu, uridin kinaz ve timidin kinazı inhibe ederek lenfositlerde DNA, RNA ve protein sentezini engelleyip, lenfosit proliferasyonunu inhibe etmektedir (27). Yani arginaz enzimi immunosupressif etkisini lenfositler üzerinde göstermekte, bu inhibisyon ise doza bağımlı, geriye dönüşümlüdür, sitotoksik değildir (27,80).

Bir metaloenzim olan arginazın, tam aktivite gösterebilmesi ve quaterner yapısının şekillenmesi için her subünitinin bir mol  $Mn^{++}$  içermesi gerekir (26,45,54). Arginazın aktivitesi için  $Mn^{++}$  gereklidir (28,35,54,70) ve kazanılan aktivasyonun en azından %90-95'i  $Mn^{++}$ 'a bağımlıdır (35).  $Mn^{++}$  iyonlarının bağlanması enzimin ısıya dayanıklılığını artırmakta (70) ve inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (45).

Enzimin maksimum aktivasyonu için  $Mn^{++}$  iyonları yanında,  $55^{\circ}C$ 'de preinkübasyonu da gerekmektedir (15,33,62). Schimke (62), sıçan karaciğer arginaz aktivitesinin,  $55^{\circ}C$ 'de preinkübasyonla  $Mn^{++}$  varlığında %110

arttığını bulmuştur, Colombo ve Konarska (15), yine  $Mn^{++}$  iyonları varlığında ve  $55^{\circ}C$ 'de preinkübasyonla, eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, insan tükürüğünde preinkübasyon sonrası ortalama aktivitenin, preinkübasyon uygulanmamıştan 3 kez daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (33).

Argininin hidrolizi için optimal pH 9.4-9.8' dir (46,70). pH 7.4'te enzim aktivitesi %10-30 arasında düşme gösterirken (70) daha düşük pH'larda enzim aktivitesini kolaylıkla kaybeder (35,62).

$Mn^{+2}$  iyonları yanında,  $Co^{+2}, Ni^{+2}, Cd^{+2}, V^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2}$  gibi çift değerlikli metal iyonları daha az oranlarda arginaz aktivitesini artırırken (15,29,46,70),  $Ag^{+}, Hg^{+2}$  gibi ağır metal iyonları aktiviteyi düşürürler (46). Demir askorbat ve demir sistein aktiviteyi artırırken, borat ve sitrat gibi arginaz ile kompleks yapan metal iyonları aktiviteyi azaltır (46).

İzolösin, lizin, valin, ornitin, sistein, lösin, prolin, hidroksprolin gibi L-amino asitler, homoarginin, argininosüksinik asit, kanavanin, oktopin gibi arginin analogları arginazın inhibitörleridir (5,10,28,29,45). Ornitin (29,45), lizin (5,28,29,45), homoarginin (28) kompetitif, valin, lösin, izolösin, sistein (45,70) ve argininosüksinik asit, kanavanin, oktopin (28)'in nonkompetitif inhibisyon yaptığı bazı çalışmalarla açığa çıkarılmıştır.

Prolin pH 9.5'ta rat böbrek arginazı  $A_4$ 'ü kompetitif, karaciğer arginazı  $A_1$ 'i nonkompetitif inhibe etmiştir. pH 7.5'ta inhibisyon her iki enzim içinde nonkompetiftir. Böbrek arginazı prolinle inhibisyona karaciğer enzimine göre çok daha fazla duyarlıdır. Karaciğer arginazı da lösin, izolösin ve valin gibi dallanmış zincirli amino asitlere böbrek arginazından daha duyarlıdır (10).

EDTA, adenzin, inozin ve protein denaturantları olan tiyosiyanat,

salisilat, sodyum dodesil sülfat arginaz inhibitörleri olarak bilinir (15,28,45,46). Arginin türevlerinin insan eritrosit arginazı üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (28).

EDTA muamelesi, enzimin subünitlerine ayrılmasına sebep olur. Subünitler enzimatik olarak inaktiftir, fakat ortama  $Mn^{++}$  iyonlarının ilavesi; subünitlerin ana formu oluşturmak üzere tekrar biraraya gelerek, enzimin eski aktivitesini kazanmasını sağlar. Yani  $Mn^{++}$  iyonları, enzimi subünitlerine ayrılmaktan korur (45).

Ber ve Muszynka birlikte yaptıkları bir araştırmada (4), sıçan karaciğer arginazının metilen mavisi varlığında, 150 watt'lık ışık kaynağı ile fotooksidasyonu sonucu, enzimdeki 32 histidil artığından 21'inin tahrip olduğunu ve böylece enzimin katalitik aktivitesinin önemli kısmının kaybolduğunu açıklamışlardır. Yine aynı araştırmacılar, her bir subünitdeki 1-2 triptofanil artığının direkt katalitik reaksiyonda gerekli olduğunu ve bu amino asitin, daha fazla enzim substrat kompleksinin şekillenmesinde özel apolar (hidrofobik) çevrenin oluşması için gerekli olduğunu bildirirken, tirozil ve lizil artıklarının arginazın katalitik fonksiyonunda görevli olmadığını bildirmektedirler. Ozan ve ark. (49), insan tükürük arginazının histidil artıklarının imidazol grublarına  $Mn^{++}$  katyonlarının bağlanmasıyla enzimin tetramerik forma geçtiğini belirtmekte, metilen mavisi ve 150watt'lık ışık varlığında enzimin histidil artığının imidazol gruplarının parçalanması nedeni ile  $Mn^{++}$  katyonlarının tetramerik yapıyı oluşturamadığını ve fotoinaktivasyonun meydana geldiğini bildirmektedir.

Enzimdeki -SH gruplarının varlığını göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada, saflaştırılmış sıçan karaciğer arginaz enzimi üzerine p-kloro merkürü benzoik asit (p-CMBA) ve N-etil maleimid (NEM)'in etkisi incelenmiştir. p-CMBA ile NEM'in, sıçan karaciğer arginazı üzerinde *herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği belirtilmiş ve sıçan karaciğer*

arginaz enziminin fonksiyonel -SH grupları içermediği açıklanmıştır (3). Başka bir çalışmada ise p-CMBA ve NEM'in acı bakla arginazı ve tavuk karaciğer arginazı üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (44). İnsan tiroid dokusunda bu iki kimyasal madde, arginaz enzimini nonkompetitif inhibe ederken (29), insan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazı üzerine p-CMBA'in herhangi bir inhibisyon etkisi bulunamamıştır (22).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser vakalarında (meme karsinomu, safra kanallarının malign tümörü, kolorektal karsinom, malign hepatik hastalıklar) serum arginaz düzeyi ve doku arginaz düzeyinin arttığı bildirilmekte (38,74,80) ve arginazın kanser olayları için belirleyici (marker) enzim olabileceği üzerinde durulmaktadır (38,74). Meme karsinomlu hastalarda serum arginaz aktivitesi, sağlıklı kadınlarınkinden 4 kat yüksek iken, benign göğüs hastalıklarında arginaz aktivitesi normal sınırlar içerisinde bulunmuştur (74). Kolorektal adenokarsinomlu hastaların dokularındaki arginaz aktivitesi, normal dokuda bulunan seviyeden 2 kez daha büyüktür. Kanserli hücrelerin stoplazmasında normal hücrelerden çok daha fazla arginaz bulunur. Kanserli hastalarda, hücresel immunitenin zayıflamasını, kısmi olarak, artan arginazın immunosupressif etkisine bağlarlar (38). Mide kanserli hastalarda, mide mukozasında artan glikokortikoid reseptör ve arginaz düzeylerinin, kanser etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (80).

Sağlıklı kişilerin serum arginaz düzeyleri oldukça düşüktür (2,46). Serum arginaz aktivitesi akut hepatitis, safra kanallarının malign tümörü, karaciğer metastazları, siroz gibi hücre harabiyetine sebep olan malign ve benign karaciğer hastalıklarında artar (74).

Eritrositler üre döngüsü ile üre sentez edememelerine rağmen insan, sığır, koyun eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiştir

(2,28,48,59), fakat tavuk ve keçi eritrositlerinde bu enzime rastlanılamamıştır (2,48). Eritrositlerde, arginin ve arginazın bulunuşu açısından ters orantı vardır. Keçi ve tavuk eritrositleri arginin içerip, arginaz içermezken, sığır, insan, koyun eritrositleri arginin içermeyip arginaz içermektedir (2,48).

Orak hücre hastalığında eritrosit arginaz aktivitesi incelenmiş ve bu hastalığa bağlı olarak eritrosit arginazında artış olduğu ve bu artışın heterozigot gruba göre homozigot grubda daha fazla olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada bir üre analogu olan tiyoürenin, eritrosit arginazını nonkompetitif inhibe ettiği bulunmuştur (69).

Yine yapılan bir araştırmada (73), diabetik farelerin karaciğerinde arginaz aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Artan aktivitenin moleküler temelini araştırmak için kontrol ve diabetik farelerin, hepatik arginazlarının fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini araştırmış, sonuçta diabetlilerde, arginazın fizikokimyasal karakterlerinde belirgin bir değişiklik bulamazken, arginazın kofaktörü  $Mn^{++}$  için  $K_m$  değerinin arttığını bulmuşlardır.

Arginaz enzim eksikliği sonucu oluşan **argininemi**, üre döngüsünün kalıtsal bir bozukluğudur ve nadiren otozomal resesiftir (23). Klinik bulgular arasında ilerleyen zeka geriliği, gelişme bozukluğu, ilerleyen spazmlar, elektroensefalogramda (EEG) anormal pik sayılabilir (11,23). Argininemili hastalarda; plazma ve serebrospinal sıvıdaki arginin, plazmadaki homoarginin,  $\alpha$ -keto- $\delta$ -guanidino valerik asit, argininik asit, N- $\alpha$ -asetil arginin seviyeleriyle idrar orotik asit, uridin, urasil, dibazik amino asit seviyeleri normalin üzerindedir. Bütün bunlara rağmen plazma amonyak konsantrasyonu normaldir (11,41).

İnsanda arginazı şifreleyen iki farklı yapısal gen lokusu vardır (70,71). 1. lokus, eritrosit ve karaciğerdeki enzim aktivitesinin %90'ından

fazlası için, böbrek, gastrointestinal sistem ve beyindeki aktivitenin yaklaşık %50'si için sorumludur. 2. lokus ise karaciğer ve eritrositlerdeki aktivitenin %5'inden daha azı, böbrek, gastrointestinal sistem, beyindeki aktivitenin ise yaklaşık %50'inden sorumludur. Hiperargininemik hastalarda 1.lokus tarafından tanımlanan enzim aktivitesi yoktur. Hiperargininemik bireylerin böbrek biopsilerinde enzim aktivitesinin normal bireylerden 4-5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (71).



### 3.MATERYAL, METOT ve BULGULAR

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Doku Örneklerinin Alınması

Araştırma materyalleri, Elazığ Elet Tesisleri'ne kesim için gelen sığırlardan temin edildi.

Kesimden hemen sonra alınan rumen parçaları, musluk suyu ile iyice yıkanarak rumen muhteviyatı uzaklaştırıldı ve doku en kısa zamanda, kırılmış buz içerisinde laboratuvara getirilip, tekrar %0.9'luk NaCl (Serum fizyolojik) ile dokunun temizlenmesi sağlandı. Numuneler ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$  'de derin dondurucuda saklandı.

##### 3.1.2. Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Rumen doku örnekleri derin dondurucudan alınıp, buzdolabında bekletilerek çözünmeleri sağlandı. İki süzgeç kağıdı arasında, suyu alınan rumen dokusu, tam 1 g olarak tartılıp bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve pH'sı 7.4 olan 0.01M Tris-HCl tamponu içinde 1/10 oranında (w/v) sulandırıldı.

Daha sonra 1/10 oranında sulandırılmış materyal, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edildi (15,70). Elde edilen homojenatlar 50ml'lik polipropilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15 000 rpm' de (20 000 g)  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda analiz yapılana kadar bekletildi.

##### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

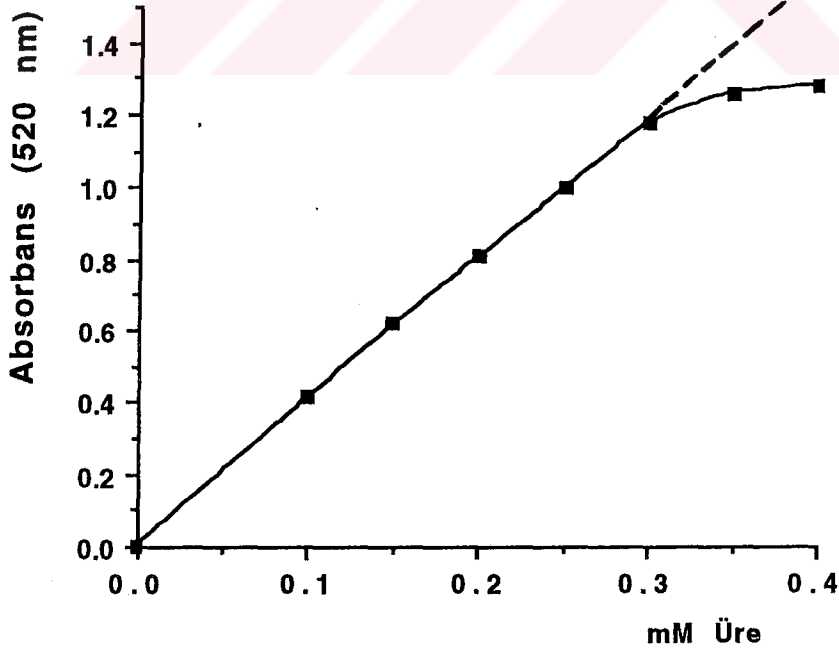
Araştırmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck (Almanya) ve Sigma (A.B.D) firmalarından temin edildi.

## 3.2. METOT 1

### 3.2.1.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

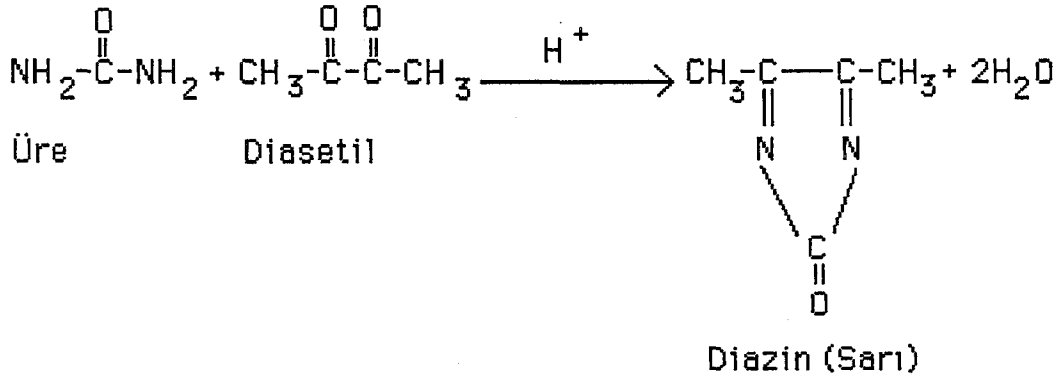
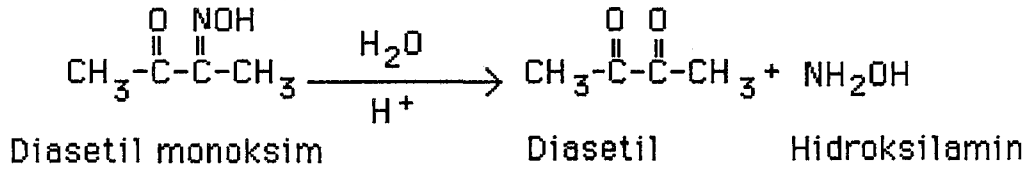
Enzim aktivite tayinlerinde ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülerek, enzimlerin aktiviteleri saptanmaktadır. Arginaz enzim aktivitesini ölçmek için de birçok metot geliştirilmiştir. Bu metodlar, arginin-arginaz reaksiyonu sonucu; ya azalan arginin konsantrasyonunun (1) ya da artan ornitin (13), veya üre konsantrasyonlarının (18,61) ölçümüne dayanmaktadır.

Rumen doku arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu kullanıldı (18). TDMU metodu; arginin-arginaz reaksiyonu sonucu oluşan ürenin, kolorimetrik olarak ölçümünü sağlayan bir metot olup, Schimke metodundan (61) daha basit ve daha hassastır. Bu metodun tek dezavantajı, üre miktarı  $0.3 \mu\text{mol} / \text{ml}$  'yi aştığı zaman Beer-Lambert kanununa uymamasıdır (Şekil 4) (51).



Şekil 4: Üre Kalibrasyon Eğrisi.

### 3.2.1.2. TDMU Metodunun Prensipleri



Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısının etkisi ile diasetil ve hidroksilamine hidrolize olur. Diasetil, asit solüsyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan diazini meydana getirir. Oluşan sarı rengi stabilize etmek için tiosemikarbazid ve Fe iyonları kullanılır (31).

### 3.2.1.3. Metodun Ayırıcıları

**a- Renk ayırıcı (DAM-TSC):** Bu karışım 0.0036 M Tiyosemikarbazid ve 0.0617 M Diasetilmonoksim içermektedir. 6.23 g Diasetilmonoksim (DAM) ve 0.328 g Tiyosemikarbazid (TSC) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile litreye tamamlanır. Renk ayırıcı, koyu renkli reaktif şişelerinde ve oda ısısında uzun süre dayanıklıdır.

### b-Asit karışımı:

1-0.12 M FeCl<sub>3</sub> / %56.7 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

3.24 g FeCl<sub>3</sub> bir miktar distile suda çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml %85' lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ilave edildi ve daha sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu ayıraç oda ısısında saklandı.

2-Yukarıdaki çözülden 1.0 ml alındı ve 999 ml %20 (v/v) 'lik  $H_2SO_4$  ilave edildi. Deney aşamasında asit karışımı olarak bu çözelti kullanıldı. Oda ısısında saklandı.

**c-10 mM  $MnCl_2$  çözeltisi:** 0.99 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve buzdolabında  $+4^{\circ}C$  de saklandı. Rumen doku arginaz aktivitesi çalışmalarında, bu çözülden sulandırma yoluyla gereken konsantrasyonlarda  $MnCl_2$  çözeltileri hazırlandı.

**d-Substrat çözeltisi (70 mM L-arginin):** 1.47 g L-arginin monohidroklorit 80-90 ml distile suda çözüldü ve pH'sı 9.7'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 100ml'e tamamlandı. Buzdolabında  $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

**e-Tampon çözelti (125 mM  $NaHCO_3 / Na_2CO_3$ ):**

1-1.32g  $Na_2CO_3$  bir miktar distile suda çözüldü ve 100ml'ye tamamlandı.

2-1.05g  $NaHCO_3$  bir miktar distile suda çözüldü 100 ml'ye tamamlandı.

Tampon çözeltisi: 125 mM  $NaHCO_3$  çözeltisi bir behere kondu ve 125 mM  $Na_2CO_3$  çözeltisi ilave edilerek, pH 9.7'ye getirildi. Bu tampon  $+4^{\circ}C$  de saklandı.

**f-Üre standartı (0.1  $\mu$ mol üre / ml):** 3 mg üre, 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözüldü. Stok olarak kullanılan bu çözelti, deney sırasında 1/5 oranında sulandırılarak 0.1  $\mu$ mol üre/ml (0.6 mg/dl) 'lik üre standartı elde edildi. Üre stok standart çözeltisi  $+4^{\circ}C$  de buzdolabında saklandı.

#### 3.2.1.4. İşlem

**a-Enzim aktivitesi tayininde ağzı vida kapaklı tüpler kullanıldı.** Bu amaçla iki deney seti oluşturuldu. Birinci sete numaralanmış deney tüpleri,

ikinci sete ise kör (blank), standart ve sıfır zaman tüpleri (zero time blank) konuldu. Birinci düzenekteki tüpler üçlü, ikinci düzenekteki tüpler çift olarak kullanıldı.

**b-**Deney ve sıfır zaman tüplerine oda ısısına gelmiş 70 mM L-arginin monohidrokloritden 0.3 ml ve 125 mM karbonat tamponundan 0.4 ml konuldu. Standart tüpüne, Üre stok standart çözeltisi 1/5 oranında (0.2 ml üre stok standartı + 0.8 ml distile su) sulandırılarak 1.0 ml (0.1  $\mu$ mol üre/ml), kör tüpüne ise 1.0 ml distile su konuldu.

**c-**Homojenizasyon ile elde edilen rumen doku homojenatı, deney aşamasında  $MnCl_2$  ile 1/20 oranında sulandırıldı (20 ml içindeki  $MnCl_2$  konsantrasyonu 1mM'a ayarlandı.) ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

**d-**Enzim kaynağı, 60°C'deki sıcak su banyosunda 9 dakika preinkübasyona bırakıldı.

**e-**Bu süre sonunda preinkübasyondan alınan enzim kaynağı ve daha önceden hazırlanmış deney düzeneğini oluşturan tüpler, 37°C'deki sallayıcı metabolik su banyosunda (metabolik çalkalayıcı) 3 dakika bekletilip, aynı ısıya gelmeleri sağlandı.

**f-** 37°C' ye getirilen vida kapaklı tüpler üzerine, enzim kaynağından 0.3' er ml ilave edilerek hemen tüpler inkübasyon için 37°C'deki sallayıcı metabolik su banyosunda 13 dakika inkübasyona bırakıldı.

**g-**Oda ısısında bekleyen sıfır zaman tüplerine 0.3 ml enzim kaynağı ilave edildikten sonra, tüplere reaksiyonu durdurmak için hemen 3 ml asit karışımı ilave edildi. Ayrıca standart ve kör tüplerine de 3 ml asit karışımı ilave edildi.

**h-**13 dakikalık inkübasyon süresi sonunda, metabolik su banyosundan alınan deney setindeki vida kapaklı tüpler (enzimatik reaksiyonun geliştiği) üzerine de reaksiyonu durdurmak amacı ile hemen 3 ml asit karışımı konuldu.

i-Her iki deney setindeki tüplere, 2 ml renk ayırıcı ilave edilip, tüplerin kapakları kapatılarak vorteks mikserde iyice karıştırıldı.

i-Örnek, sıfır zaman, standart ve kör tüplerinin hepsi kaynar su banyosunda 10 dakika tutularak reaksiyonun tamamlanması sağlandı.

j-10 dakika sonunda kaynar su banyosundan alınan tüpler buzlu su banyosunda 3 dakika kadar bekletilerek soğutuldu.

k-Bu süre sonunda standart, örnek ve sıfır zaman tüplerinin absorbansları 520 nm'de Shimadzu UV. Vis. spektrofotometrede köre karşı okundu.

### 3.2.1.5. Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Hesaplanması

1-Her örnek deney tüpünün absorbansından, kendisine ait sıfır zaman tüpünün absorbansının farkı alınarak net absorbans elde edildi.

2-Örneğe ait protein değerleri, Lowry yöntemi ile ölçüldü, mg / ml olarak hesaplandı.

3-Enzim kaynağının preinkübasyon ve inkübasyon aşamasında sulandırılma oranları, standart absorbansı ve standart konsantrasyon değerlerinden faydalanılarak bir faktör bulundu.

Faktör hesaplanması şu şekilde yapıldı;

$$\text{Faktör} = \frac{(0.1 \mu\text{mol üre/ml}) \times (20 \times 3.33 \times 4.61)}{0.4} = 76.75$$

20: Homojenatın preinkübasyon ortamında  $\text{MnCl}_2$  ile sulandırılma oranıdır.

3.33: İnkübasyon ortamında enzim kaynağının sulandırılma oranıdır.

4.61: İnkübasyon ortamında reaksiyon 13 dakika devam ettirildiğinden, bulunan değerlerin saatteki miktarını ifade etmek için sonuç 4.61 ( $60/13=4.61$ ) ile çarpıldı.

0.1  $\mu\text{mol}$  üre / ml içeren, standart tüpünün absorbansı ise 0.4' dür.

4-Örneğe ait net absorbans değeri, faktör (76.75) ile çarpılarak,  $\mu\text{mol}$

üre / ml homojenat / saat cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

5-Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için; enzim aktivitesi, homojenatın protein (mg/ml) değerine bölündü.

Bu çalışmada bir ünite enzim aktivitesi şu şekilde tarif edildi.

1 saatte, 37°C' de, L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir.

**Ünite:** µmol üre / mg protein / saat

### 3.2.1.6. Biyolojik Sıvılarda Protein Saptanması

Çalışmamızda kullanılan homojenatlardaki protein miktarları Lowry (39) yöntemine göre ölçüldü. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar. Prensib olarak, Bakır + protein  $\rightleftharpoons$  Bakır-protein basit ilişkisini içerir. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm'de okunur.

Bu metot, 280 nm'de absorpsiyon ölçümünden 10-20 kez daha hassas, çok daha spesifiktir ve bulanıklık daha az sorun yaratır. Biüret reaksiyonundan ise 100 kez daha hassastır.

Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapıldı.

#### Ayıraçlar

**1-Alkali Bakır Ayırıcı:** 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> , 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

**2-Fenol Ayırıcı:** 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3.75 ml alındı distile su ile 67.5 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

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

**4-Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek**

### İşlem

	KÖR	STANDART	ÖRNEK
Alkali Bakır Ayıracı (ml)	1.0	1.0	1.0
Protein Standart (ml)	-	1.0	-
Örnek (ml)	-	-	1.0
Distile su (ml)	1.0	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.

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

Tüpler hemen vorteks mikserde iyice karıştırıldı ve 5 dakika 55°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutuldu. Daha sonra 650nm'de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okundu.

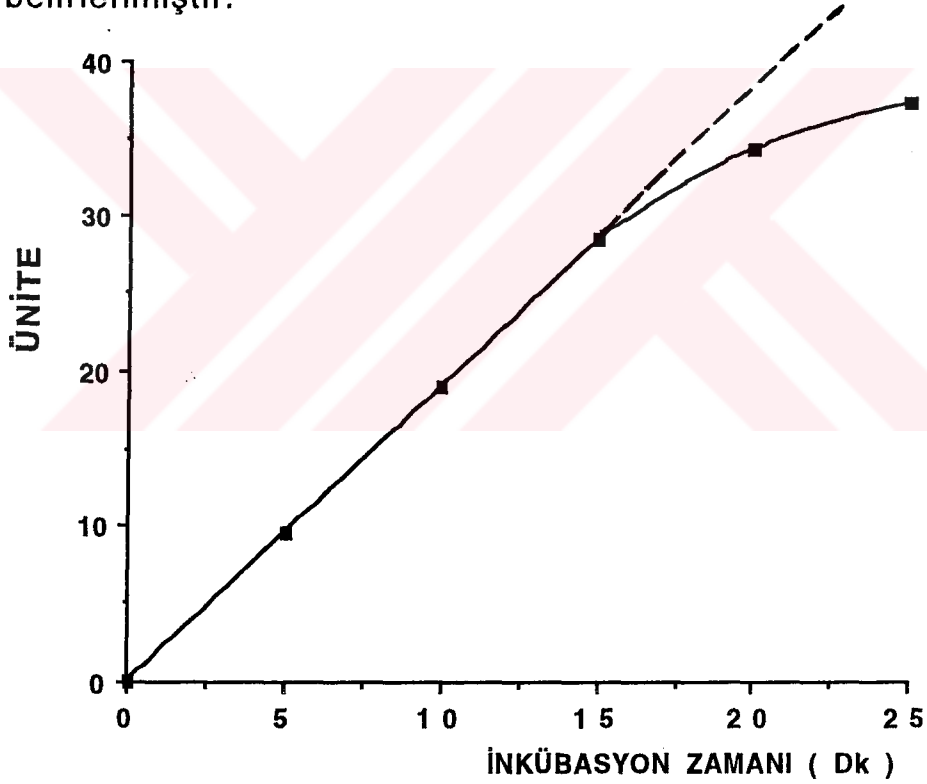
### Hesaplama

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

### 3.3. BULGULAR 1

#### 3.3.1.1. İnkübasyon Zamanının Tespiti

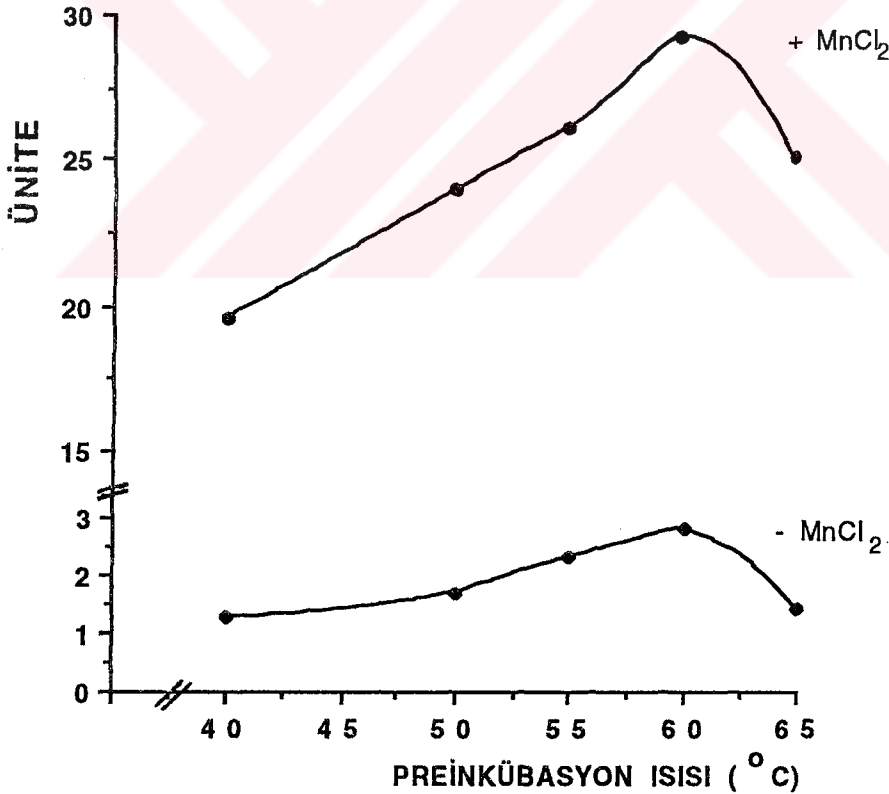
Rumen arginazı için en uygun inkübasyon süresini saptamak amacı ile  $MnCl_2$  varlığında, inkübasyon süresi değiştirilerek arginin-arginaz reaksiyonunun oluşması sağlanmıştır. Rumen arginaz aktivitesi 15. dakikaya kadar lineer bir artış gösterip 15. dakikadan sonra Şekil 5'de görüldüğü gibi bu lineer artış yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bu nedenle rumen doku arginazı için optimal inkübasyon zamanı 13 dakika olarak belirlenmiştir.



**Şekil 5:** Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

### 3.3.1.2. Preinkübasyon Isısının Belirlenmesi

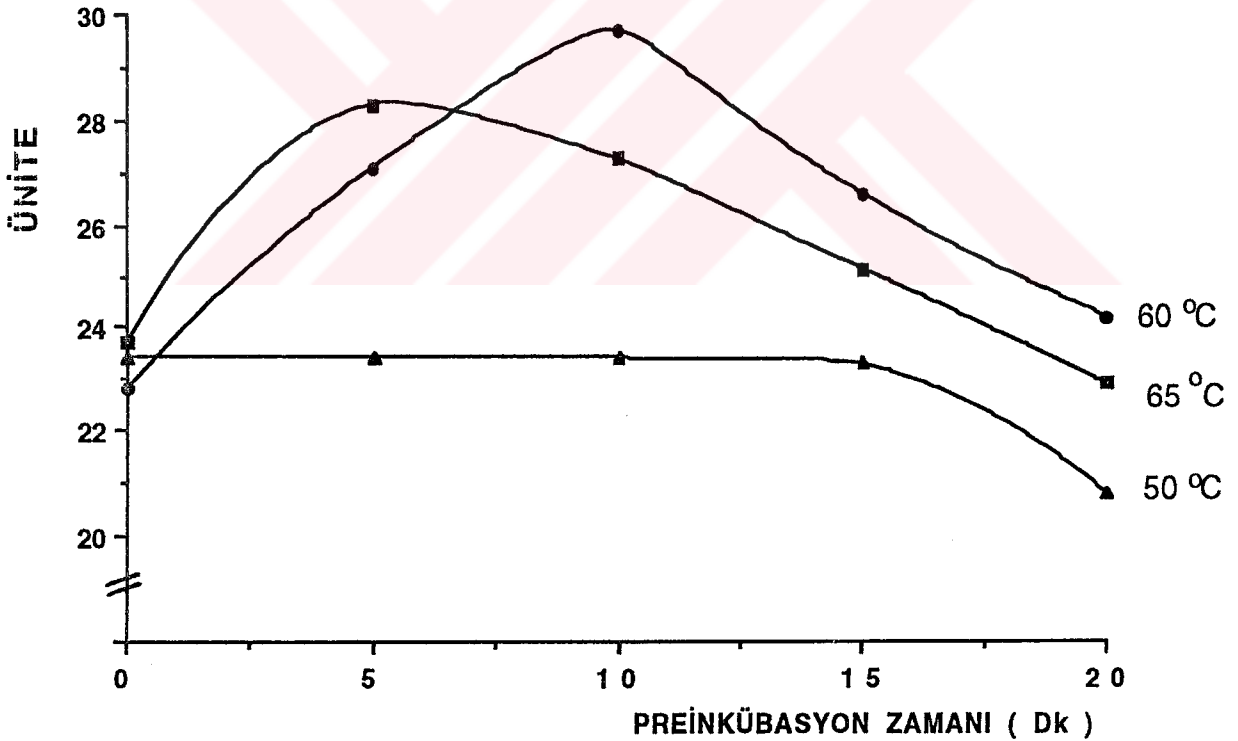
Preinkübasyon ısısının tespiti ve preinkübasyon etkisinin  $Mn^{++}$  kationlarının varlığına bağlı olup olmadığını, saptamak için Mn iyonlarının varlığında ve yokluğunda, preinkübasyon ısıları değiştirilerek enzim preinkübe edilmiştir. Sonuçta;  $MnCl_2$  varlığında preinkübasyon uygulanmasının enzim aktivitesini,  $MnCl_2$ 'süz preinkübasyona oranla 10 misli artırdığı saptanmıştır. 40 ile  $65^{\circ}C$ 'ler arasındaki preinkübasyon ısılarında ve  $MnCl_2$  varlığında enzim aktivasyonu gözlemlendiğinde;  $60^{\circ}C$ 'ye kadar aktivitenin arttığı,  $60^{\circ}C$ 'de maksimuma ulaştığı,  $60^{\circ}C$ 'den sonra ise düştüğü saptanmıştır (Şekil 6). Bu nedenle rumen doku arginazı için en uygun preinkübasyon ısısı  $60^{\circ}C$  olarak kabul edilmiştir.



Şekil 6: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.

### 3.3.1.3. Preinkübasyon Zamanının Tespiti

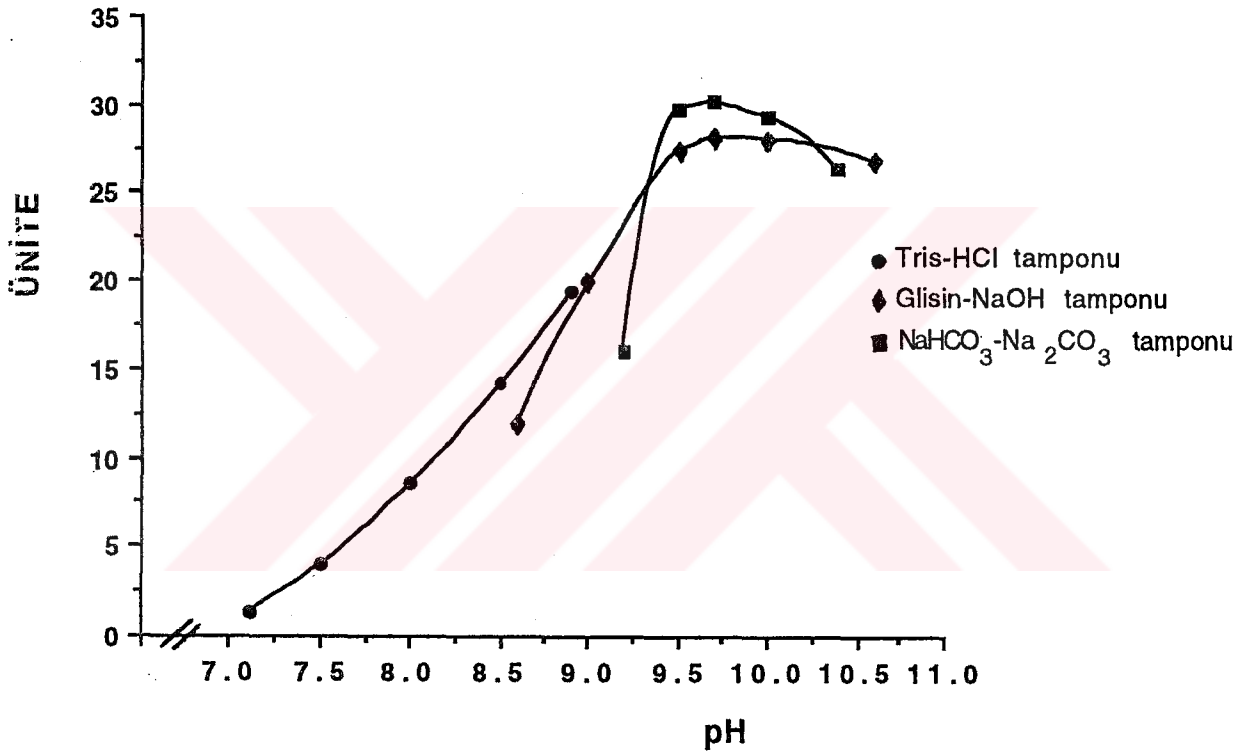
Rumen doku arginazı için optimal preinkübasyon zamanını tespit etmek amacı ile enzim  $MnCl_2$  varlığında ve 50, 60, 65 °C'lik preinkübasyon ısılarında değişik sürelerde bekletilmiştir. Enzim aktivitesi, 50°C'de 15. dakikaya kadar değişmeyip, 15. dakikadan sonra düşüş göstermektedir. 65°C'de 5. dakikaya kadar aktivite artıp 5. dakikadan sonra düşmektedir. 60°C'de 10. dakikaya kadar aktivite artmakta 10. dakikadan sonra aktivite düşmektedir. Rumen doku arginazı en yüksek aktiviteye 60°C'de ve 10 dakikada ulaşmaktadır. 60°C'de 10 dakikalık bir preinkübasyon uygulaması, enzim aktivitesini, preinkübasyon uygulanmamışa oranla %30 arttırmaktadır. Optimal preinkübasyon süresi 9 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7: Farklı Isılarda Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Rumen Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler.

### 3.3.1.4. pH'nın Etkisi

Rumen doku arginazının optimal pH'sını saptamak amacıyla pH'ları 7.0 ile 10.5 arasında değişen çeşitli tampon sistemleri kullanılmıştır. Bu tampon sistemleri pH 7.1-8.9 Tris-HCl, pH 8.6-10.6 Glisin-NaOH, pH 9.2-10.2 Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponlarıdır. Şekil 8'de görüldüğü gibi rumen doku arginaz aktivitesinin ölçümü için en uygun tampon, Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tampon sistemi olup, uygun pH ise 9.7'dir.



Şekil 8: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler.

### 3.3.1.5. Metal İyonlarının Etkisi

Rumen doku arginazı üzerine, metal iyonlarının etkilerini araştırmak amacıyla Tablo 2'de belirtilen metal iyonları, preinkübasyon ortamına ilave edilerek (preinkübasyon ortamındaki konsantrasyonları 1mM), enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Mn<sup>++</sup> katyonları preinkübasyon

basamağında ortama ilave edildiğinde, enzim aktivitesini 10.6 misli, inkübasyon basamağında ortama ilave edildiğinde enzim aktivitesini 4.5 misli artırmaktadır. Preinkübasyon ortamına ilave edilen diğer metal iyonlarından  $Ni^{++}$  5.7 misli,  $Co^{++}$  2 misli,  $Cd^{++}$  ise 4 misli enzim aktivitesini artırmaktadır. Bunların dışındaki metal iyonları ise enzim aktivitesini belirli oranlarda inhibe etmektedir. Çinko, Civa, Kurşun, Gümüş, Bakır, Kalay, Demir'in enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri Magnezyum, Baryum, Potasyum, Aluminyum'unkinden daha fazladır.

**Tablo 2: Metal İyonlarının Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.**

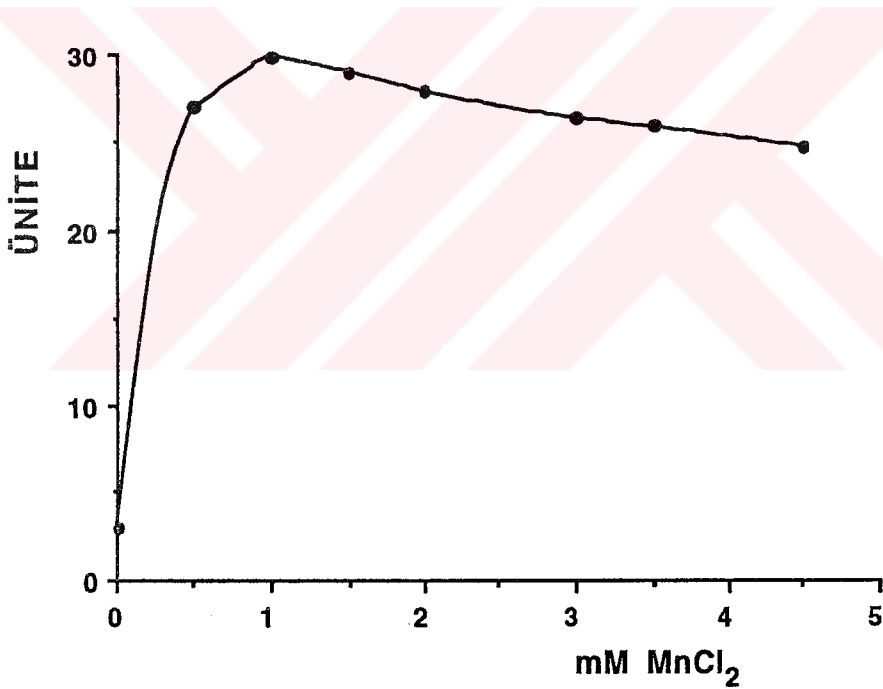
METAL İYONLARI	% AKTİVİTE
<b>Kontrol*</b>	<b>100</b>
<b><math>MnCl_2^{**}</math></b>	<b>451</b>
$MnCl_2$	1063
$NiSO_4$	566
$CdCl_2$	370
$CoSO_4$	199
$LiOH$	109
$Al(OH)_3$	77
$MgCl_2$	71
$BaCl_2$	51
$KCl$	49
$V_2O_5$	46
$CrO_3$	37
$CaCl_2$	36
$ZnSO_4$	10
$Pb(NO_2)_2$	8
$FeCl_3$	3
$CuSO_4$	2
$SnCl_2$	1
$HgO$	-
$AgNO_3$	-

\* Kontrol grubunda preinkübasyon ortamına hiçbir metal iyonu ilave edilmemiştir.

\*\* Enzim kaynağı metal iyonu içermeksizin preinkübe edildikten sonra aynı molariteyi sağlayacak  $MnCl_2$  inkübasyon ortamına ilave edilmiştir.

### 3.3.1.6. $MnCl_2$ 'ün Etkisi

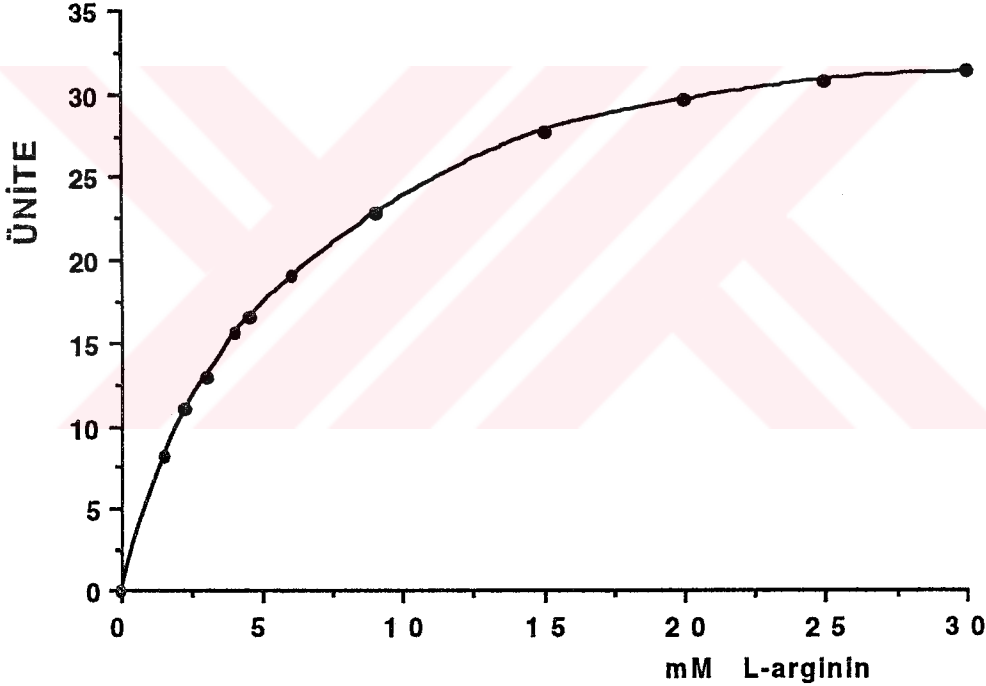
Arginaz aktivitesinin  $MnCl_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini araştırmak amacı ile preinkübasyon ortamına 0-5 mM arasında değişen konsantrasyonlarda,  $Mn^{++}$  iyonları ilave edilmiştir. Şekil 9'da görüldüğü gibi preinkübasyon ortamının  $Mn^{++}$  içermediği durumlarda enzim aktivitesi düşüktür. Ortama  $Mn^{++}$  iyonlarının ilavesiyle enzim aktivitesi belirgin olarak artmaktadır. En yüksek aktivitenin elde edildiği  $MnCl_2$  konsantrasyonu 1 mM civarında olup, 1 mM' dan itibaren enzim aktivitesi düşmektedir. Rumen doku arginazı için optimal  $Mn^{++}$  konsantrasyonu 1mM olarak saptanmış ve kabul edilmiştir.



Şekil 9: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin  $MnCl_2$  Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

### 3.3.1.7. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Rumen doku arginazı için optimal koşullar belirlendikten sonra arginazın substratı L-arginine karşı olan  $K_m$ 'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 10). Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesine bakılmıştır. Reaksiyon hızının artışı, L-arginin konsantrasyonunun artışına paralellik göstermektedir. Başlangıçta, reaksiyon hızında görülen lineer artış daha sonra yerini hiperbolik bir görünüme bırakmakta ve en sonunda reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymun hale gelmektedir.

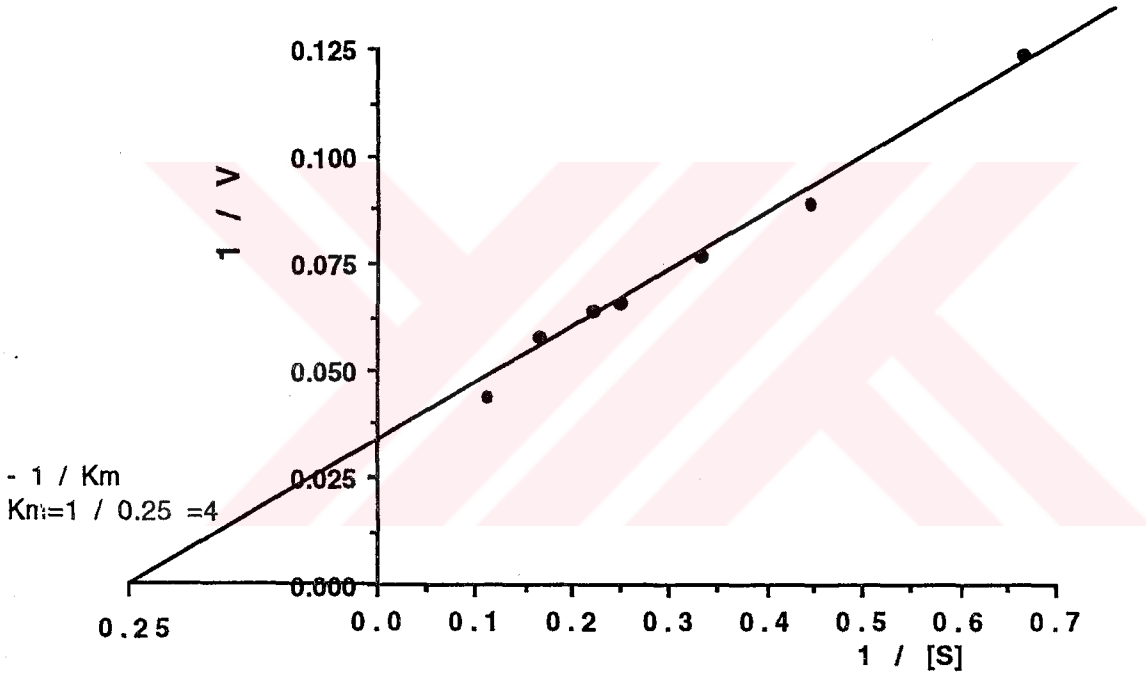


Şekil 10: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Derişimine Bağlı Olarak Değişimi.

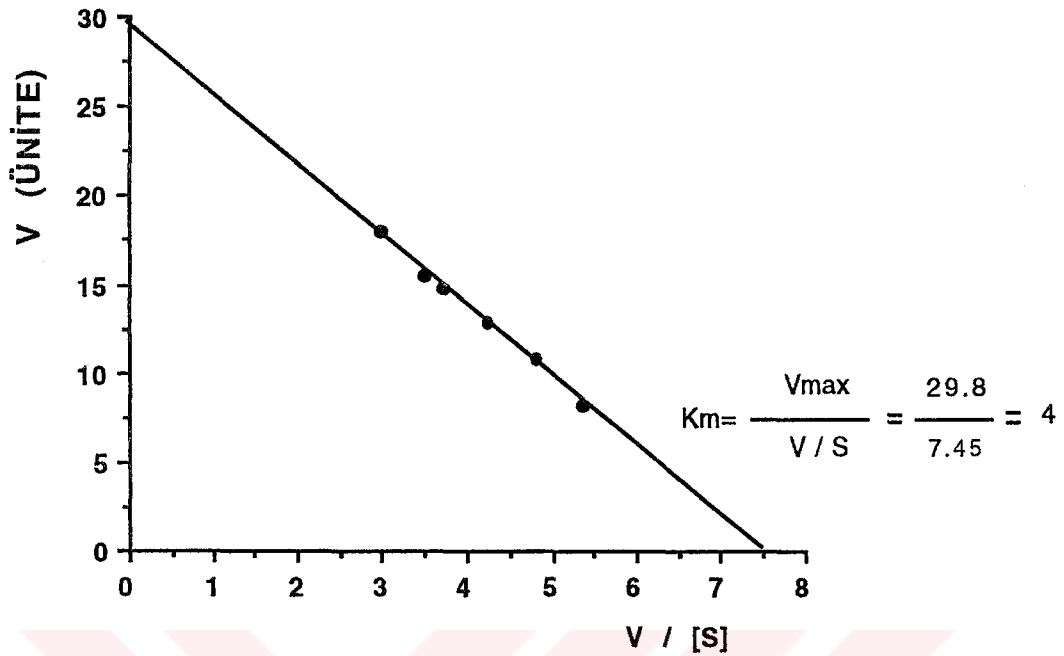
Şekil 10' da görüldüğü üzere, 2.5 mM' a kadar olan L-arginin konsantrasyonundaki artış, enzim aktivitesinde lineer bir artışa (birinci mertebeli kinetiği) neden olmuş, bu noktadan itibaren doğrusallık yavaş yavaş

kaybolarak, yerini hiperbolik bir görünüme (karışık mertebe kinetiği) bırakmıştır. 20 mM'lık L-arginin konsantrasyonundan itibaren, arginaz L-arginin ile doygunluğa ulaşarak (sıfır mertebe kinetiği) reaksiyon sabit hızla devam etmektedir.

Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında, Lineweaver-Burk (Şekil 11) ve Eadie Hofstee (Şekil 12) eğrileriyle de incelenmiş ve rumen doku arginazının, L-arginine karşı olan  $K_m$ 'inin 4 mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 11: Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan  $K_m$ 'inin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.



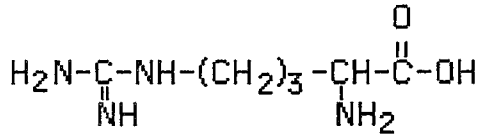
Şekil 12: Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan Km' inin Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

### 3.3.1.8. Bazı Guanidino Bileşiklerinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisi

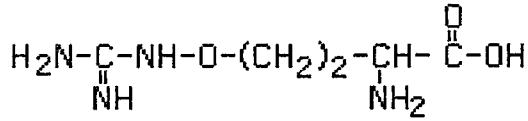
Çalışmanın bu bölümünde arginin analogu olan guanidin, agmatin, kanavaninin arginaz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi olup olmadığı araştırıldı.

İnkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonu sabit tutulup, preinkübasyon ortamına guanidin, agmatin ve kanavanin farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek rumen doku arginaz enzimi üzerine etkileri araştırıldı.

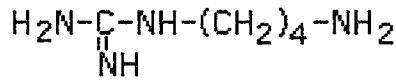
Bu amaçla; 0.5 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda kanavanin (Şekil 13), 35 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda agmatin (Şekil 14), 13 mM'a kadar değişen konsantrasyonlarda guanidin (Şekil 15) kullanıldı.

**Tablo 3:** Arginin ve Yapısal Benzerlik Gösteren Guanidino Bileşikleri.

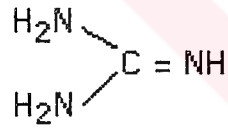
L-arginin (2-Amino-5-guanidino-pentanoik asit)



Kanavanin (2-Amino-4-guanidino-oxy -bütirik asit)



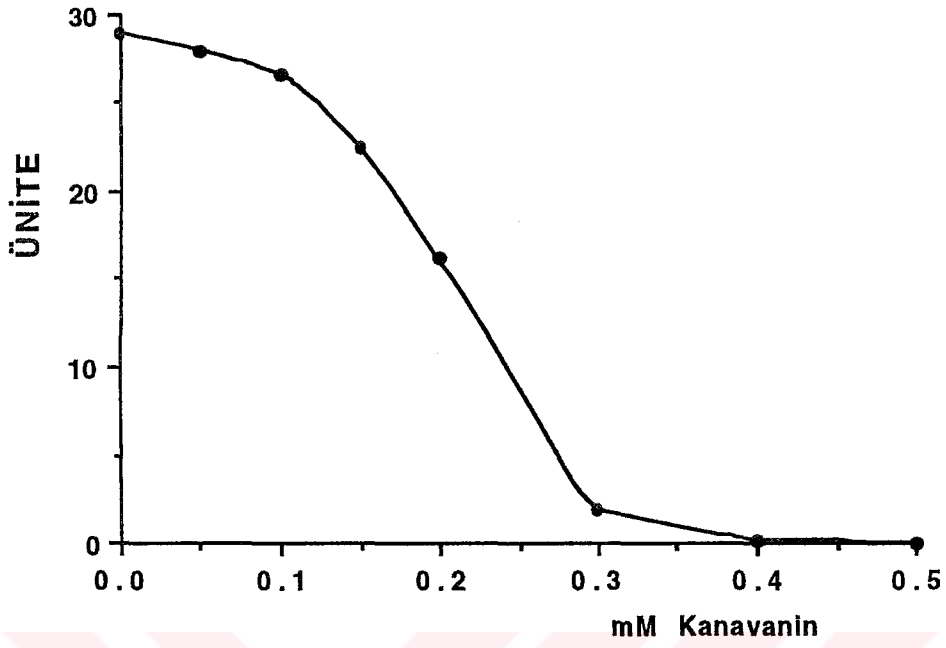
Agmatin (1-Amino-4-guanidinobütan)



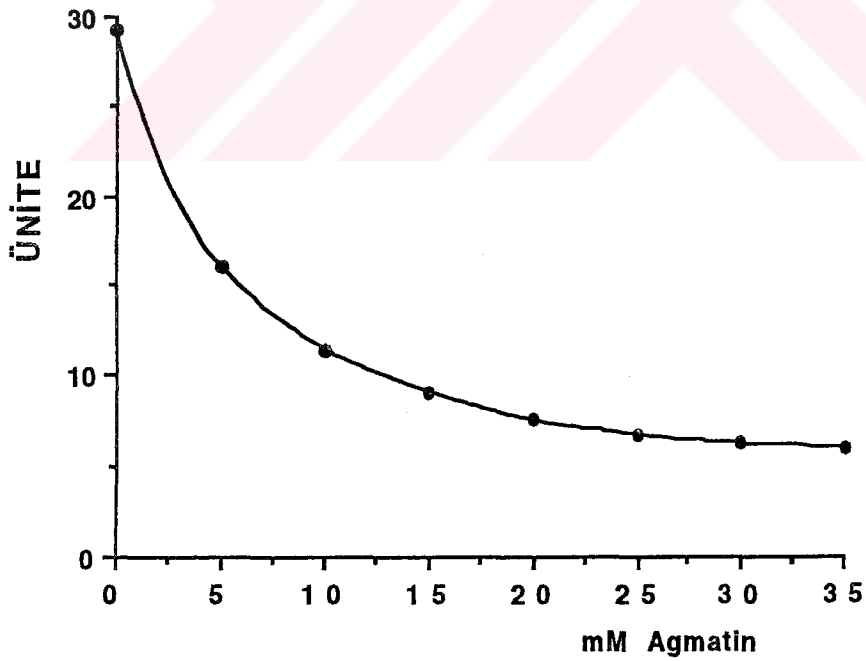
Guanidin

0.15mM kanavanin varlığı %25, 0.2mM kanavanin varlığı rumen arginaz aktivitesini %47 oranında düşürürken, 0.35 mM ve daha yüksek kanavanin konsantrasyonları arginaz aktivitesini %100 inhibe etmektedir (Şekil 13).

5 mM agmatinin %45, 10 mM agmatinin %61, 30 mM agmatinin ise aktiviteyi %79 oranında düşürdüğü bulunmuştur (Şekil 14).

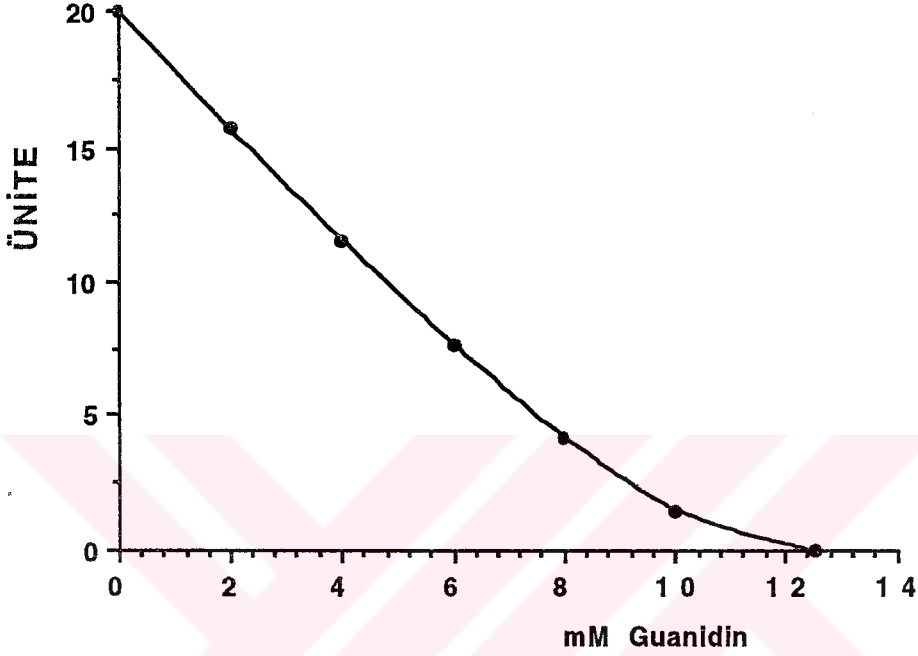


Şekil 13: Kanavaninin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.



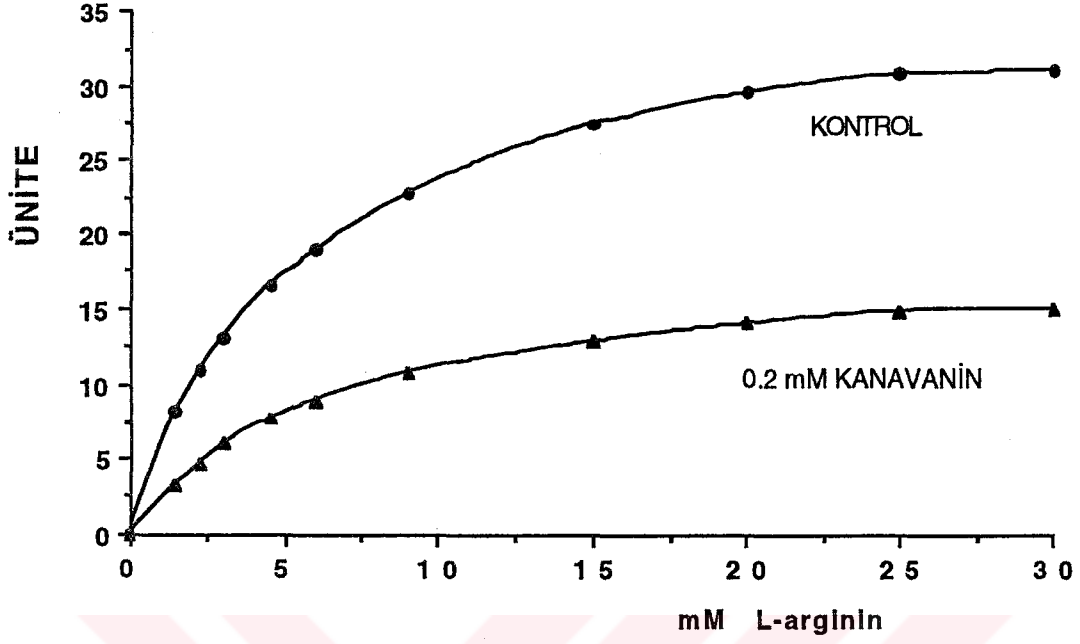
Şekil 14: Agmatinin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

4mM guanidin enzim aktivitesini %42, 6mM guanidin aktiviteyi %62 oranında inhibe ederken, 12mM guanidin konsantrasyonundan itibaren aktivite %100 oranında kaybolmaktadır (Şekil 15).

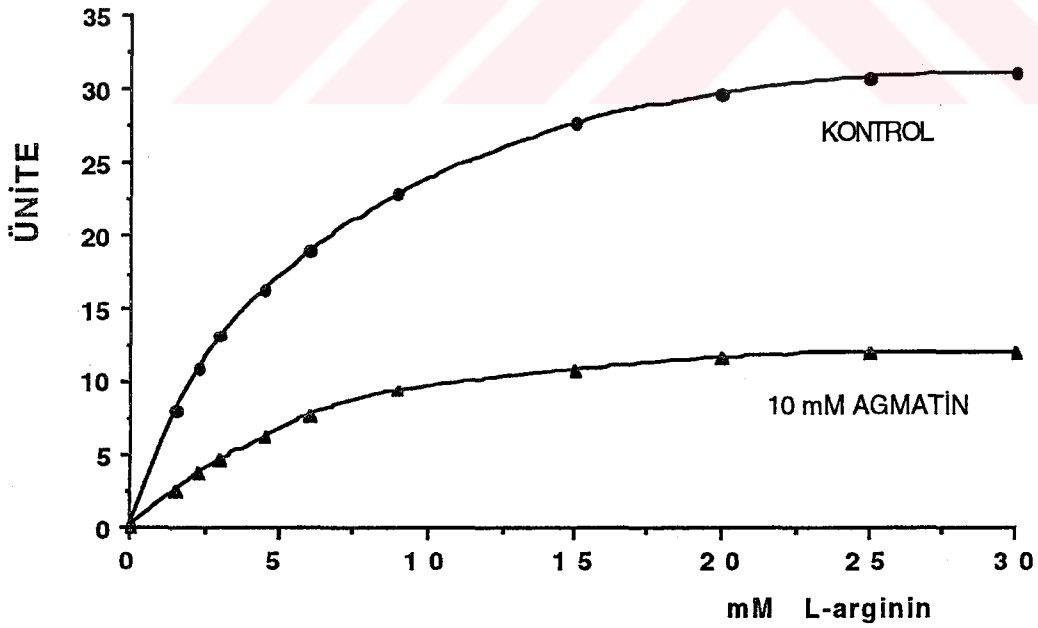


Şekil 15: Guanidinin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

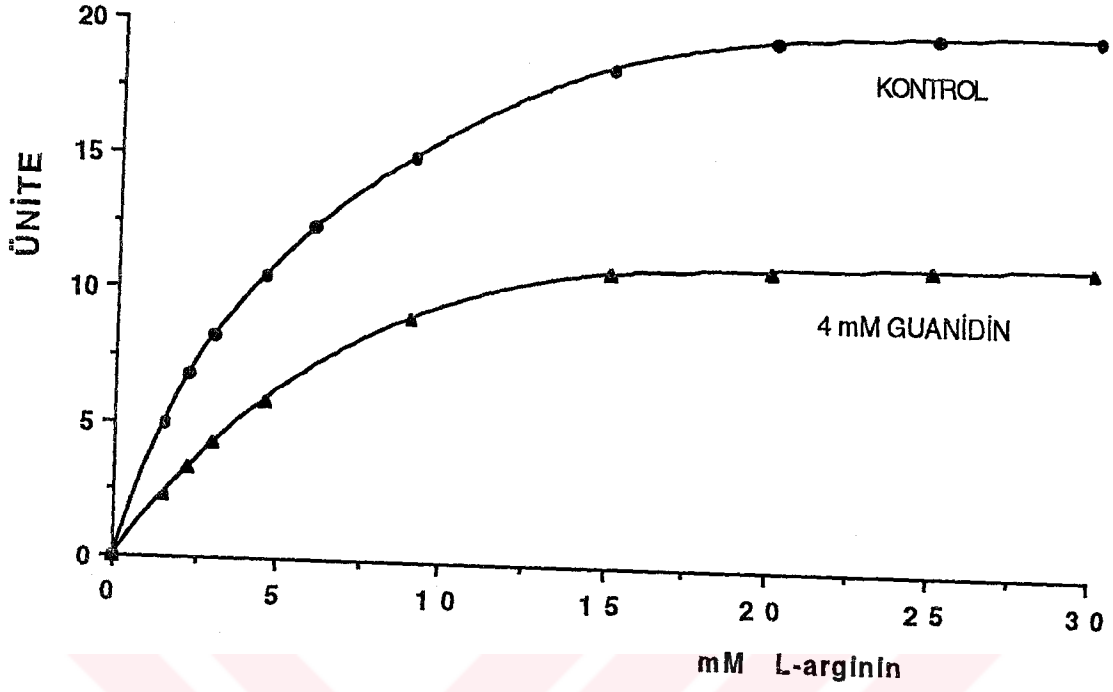
Agmatin, kanavanin ve guanidinin neden olduğu arginaz inhibisyonunun çeşidini belirlemek amacı ile 0.2 mM kanavanin (Şekil 16), 10 mM agmatin (Şekil 17), 4 mM guanidin (Şekil 18) varlığında Michaelis-Menten kinetiği incelenmiştir. Şekil 16,17,18'de görüldüğü gibi agmatin, kanavanin ve guanidinin varlığı, rumen doku arginazının Km'ini değiştirmezken Vmax'ın azalmasına neden olmaktadır. Yani guanidin, agmatin ve kanavanin rumen doku arginazını nonkompetitif tipte inhibe etmektedir.



Şekil 16: Kanavaninin Sebebi Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.

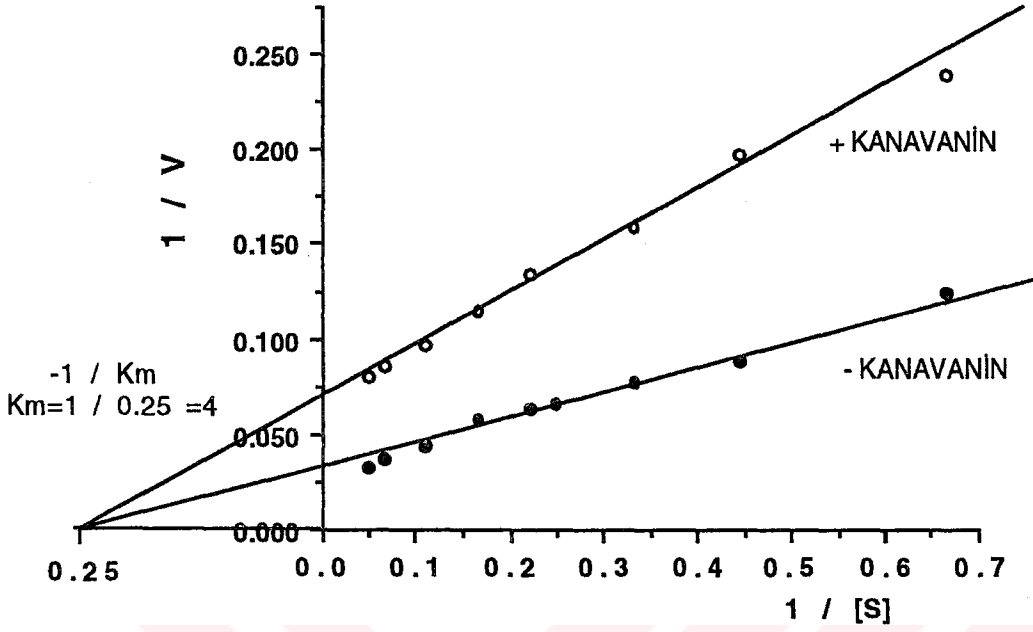


Şekil 17: Agmatinin Sebebi Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.

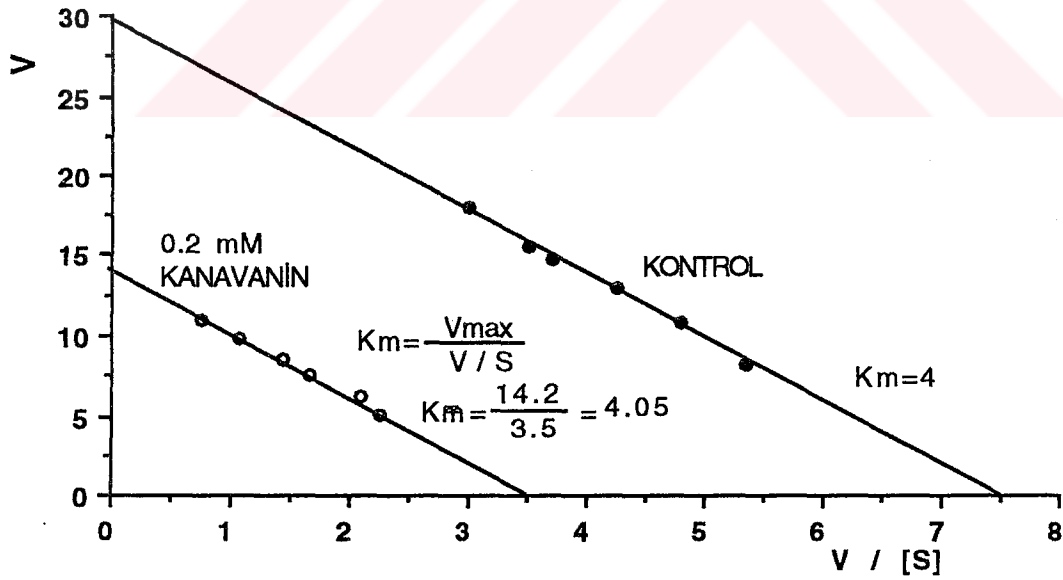


Şekil 18: Guanidinin Sebep Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.

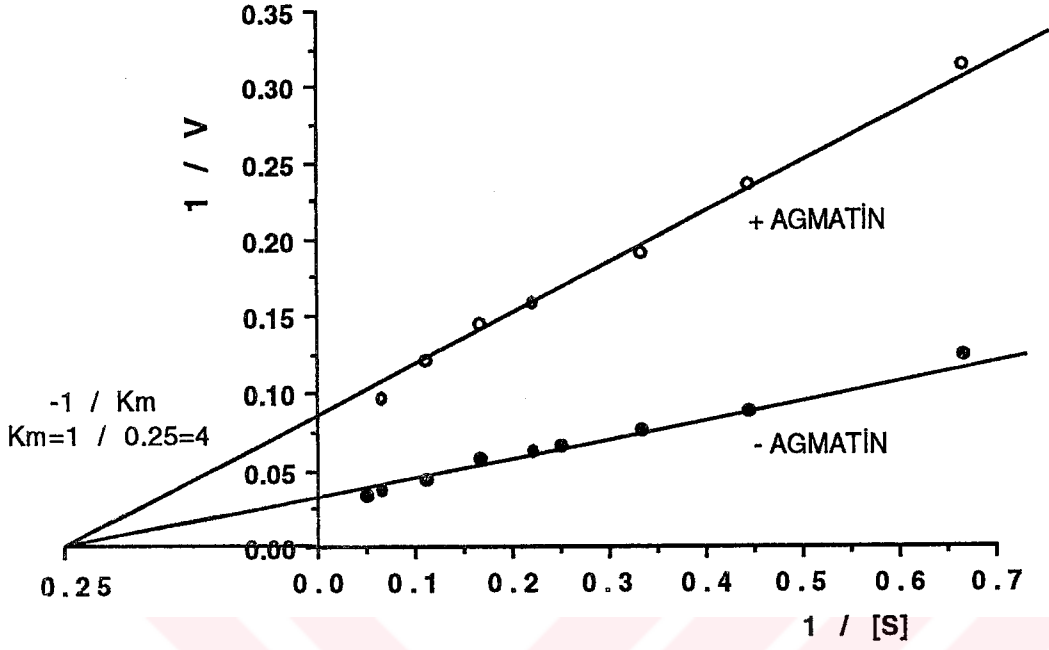
Aynı veriler Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri ile değerlendirilmiş;  $K_m$ 'in değişmediği 4 mM civarında olduğu,  $V_{max}$ 'ın ise azaldığı saptanmıştır (Şekil 19,20 Kanavanin ; Şekil 21,22 Agmatin; Şekil 23,24 Guanidin).



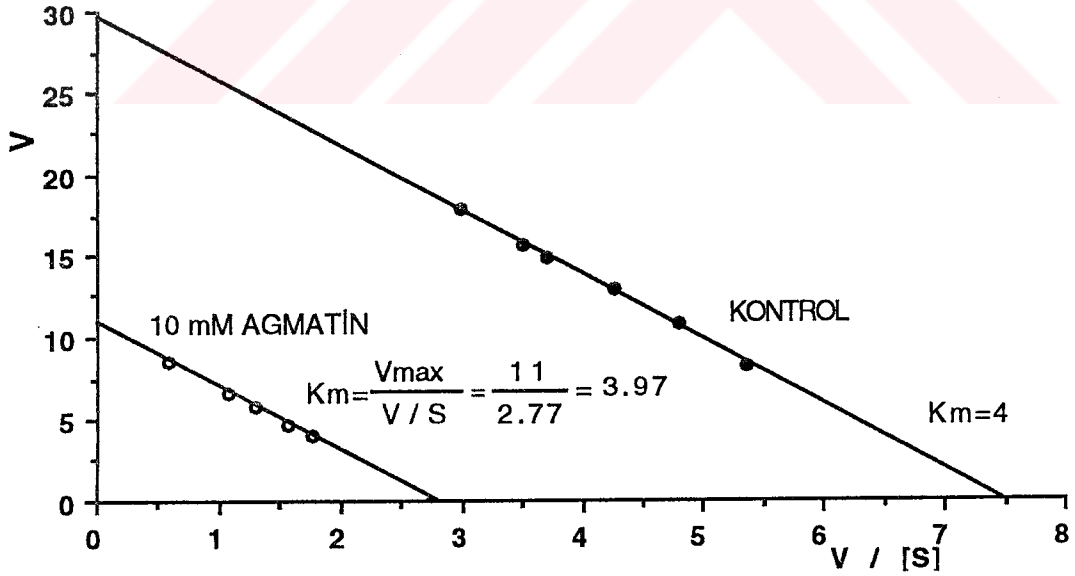
Şekil 19: Kanavaninin, Rumen Doku Arginazinin Kinetik Parametrelerine Etkisinin Lineweaver Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.



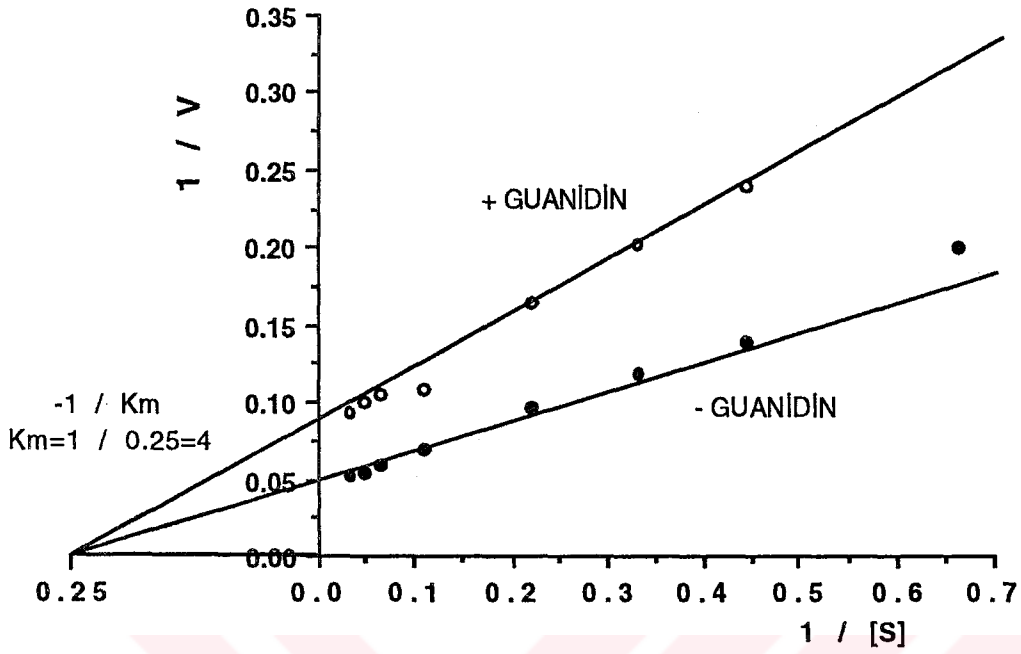
Şekil 20: Kanavaninin, Rumen Doku Arginazinin Kinetik Parametrelerine Etkisinin Eadie-Hofstee Eğrisi ile Değerlendirilmesi.



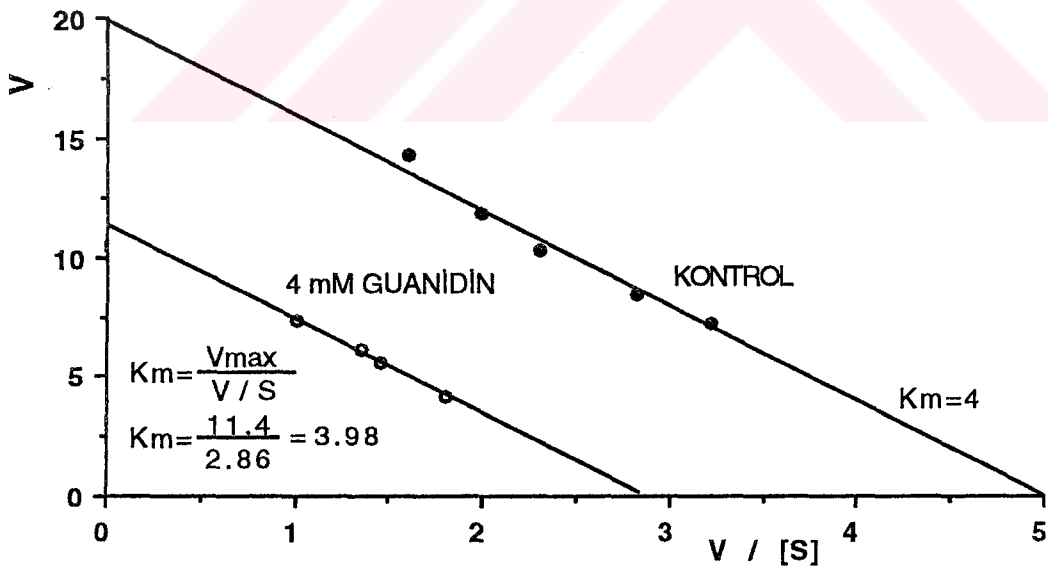
Şekil 21: Agmatinin, Rumen Doku Arginazının Kinetik Parametrelerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.



Şekil 22: Agmatinin, Rumen Doku Arginazının Kinetik Parametrelerine Etkisinin Eadie-Hofstee Eğrisi ile Değerlendirilmesi.

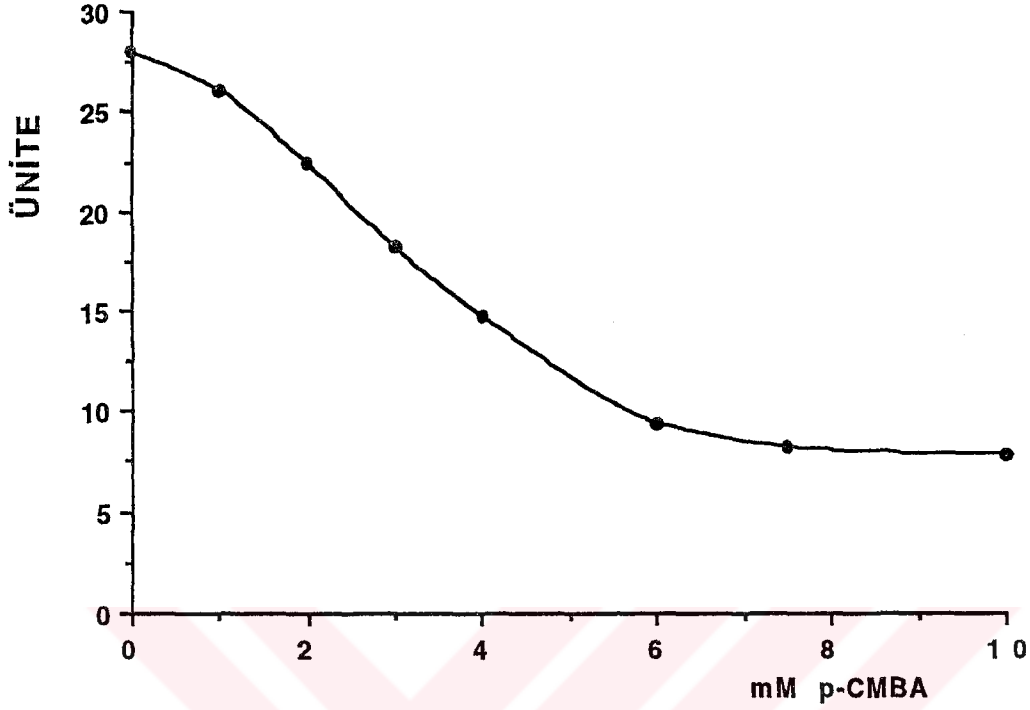


Şekil 23: Guanidinin, Rumen Doku Arginazının Kinetik Parametrelerine Etkisinin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Değerlendirilmesi.



Şekil 24: Guanidinin, Rumen Doku Arginazının Kinetik Parametrelerine Etkisinin Eadie-Hofstee Eğrisi ile Değerlendirilmesi.

### 3.3.1.9. Enzimde -SH Gruplarının Varlığının Gösterilmesi

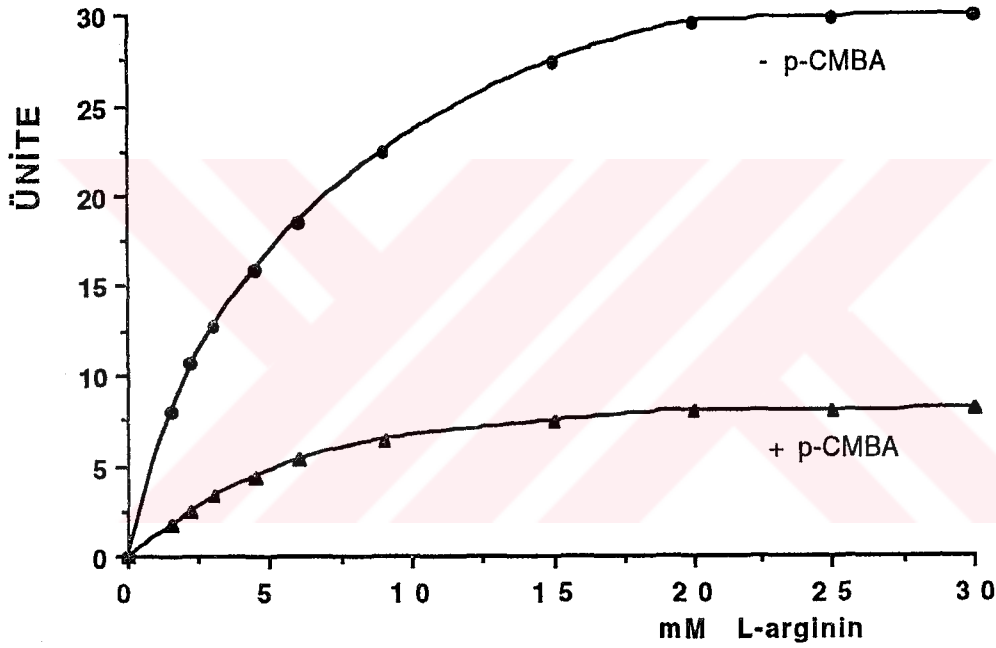


Şekil 25: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinde, p-CMBA Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişim.

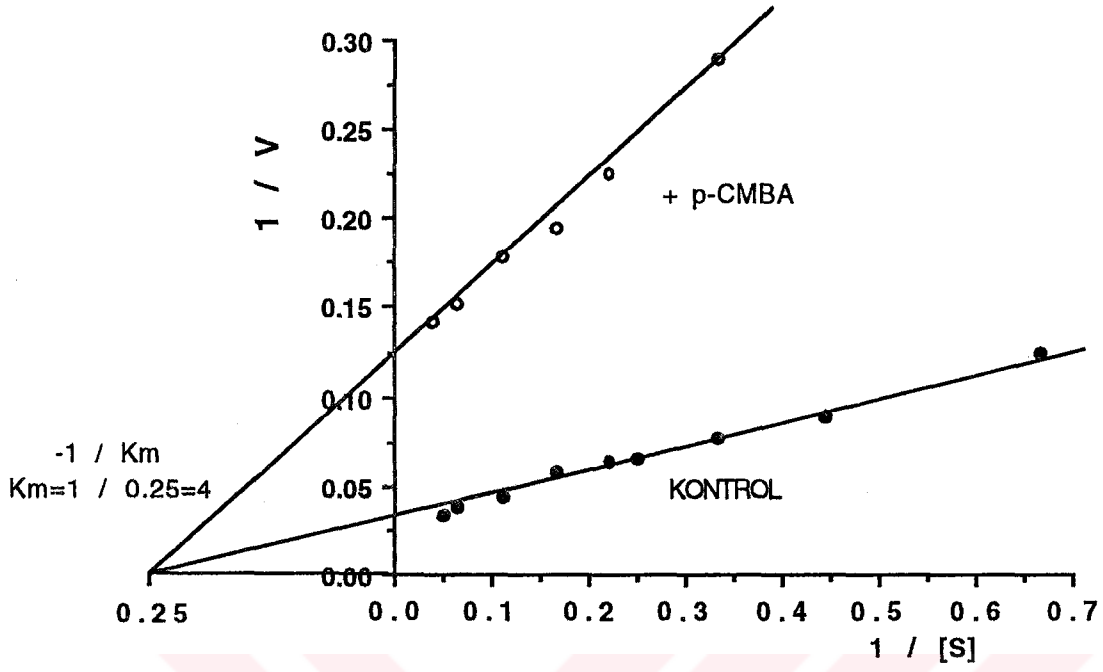
#### 3.3.1.9.a. p-kloromerküri Benzoik Asidin (p-CMBA) Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Rumen doku arginazının aktivite gösterebilmesi için, sülfidril (-SH) gruplarının gerekli olup olmadığını saptamak amacı ile p-CMBA'in varlığında aktivitesi ölçülmüştür. p-CMBA, 1mM ile 10mM arasında değişen konsantrasyonlarda preinkübasyon ortamına ilave edilerek rumen doku arginazı üzerine etkisi incelenmiştir. 2mM p-CMBA konsantrasyonunda enzim %20, 4mM p-CMBA konsantrasyonunda ise enzimin %48 oranında inhibisyona uğradığı bulunmuştur. Şekil 25'de görüldüğü gibi 7.5 mM p-CMBA rumen doku arginaz aktivitesinin %71 inhibisyonuna neden olmuştur. Bu sonuçlar enzimin yapısında serbest -SH gruplarının varlığını göstermektedir.

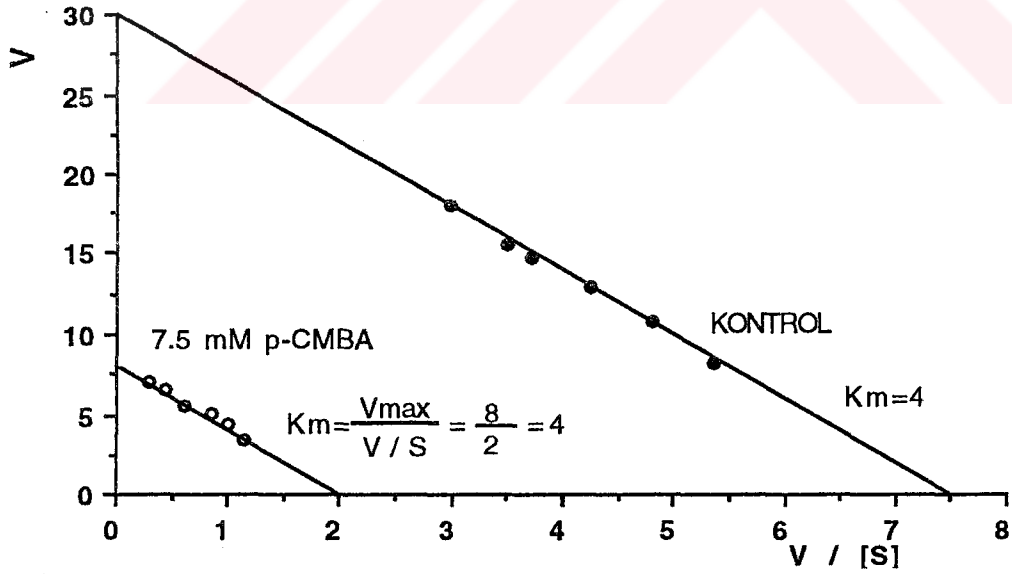
7.5mM p-CMBA varlığında ve inkübasyon ortamındaki L-arginin konsantrasyonları değiştirilerek, rumen doku arginaz aktivitesi ölçülüp, inhibisyon etkisinin varlığı kontrol arginazına göre değerlendirilmiştir. Hem Michaelis-Menten eşitliği (Şekil 26) hemde Lineweaver-Burk eğrisi (Şekil 27) ile değerlendirme sonucunda; p-CMBA'in mevcudiyetinin enzimin Vmax'sını değiştirdiği, Km'ini değiştirmedeği bulunmuştur. Her iki yöntem ile de enzimin arginine karşı Km'inin 4mM civarında olduğu ve p-CMBA 'in enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 26: Argininin Değişik Konsantrasyonlarında Rumen Doku Arginazı Üzerine p-CMBA'in etkisi.



Şekil 27: p-CMBA'in, Rumen Doku Arginazi Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.

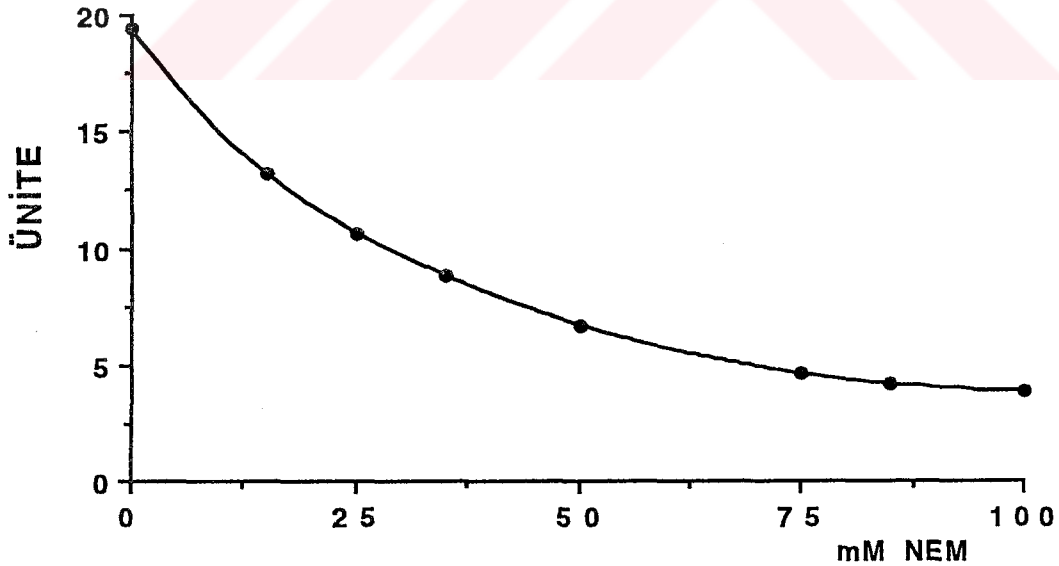


Şekil 28: p-CMBA'in, Rumen Doku Arginazi Üzerine İnhibisyonunun Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

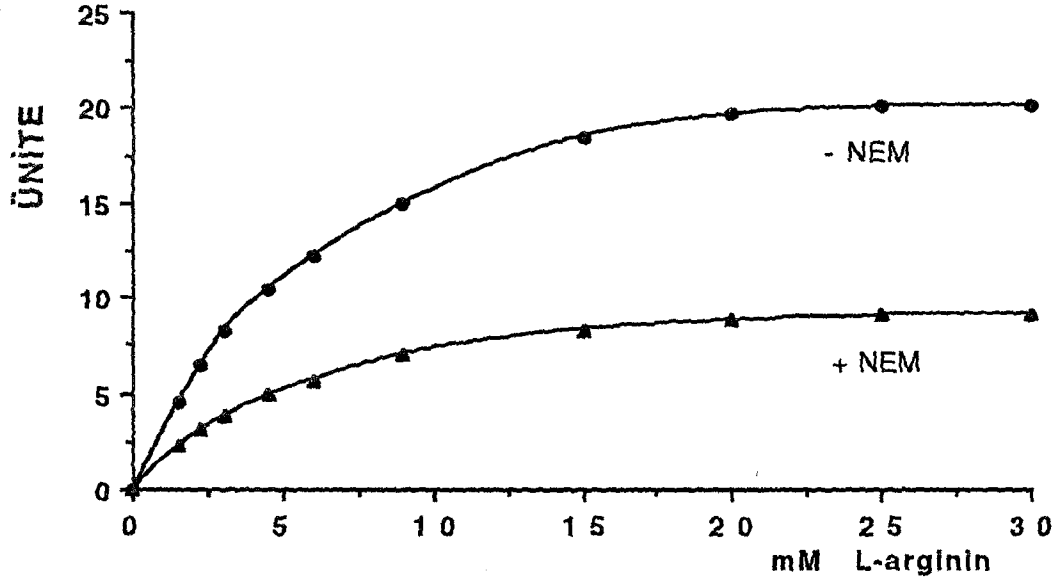
### 3.3.1.9.b. N-etil Maleimitin (NEM) Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tiol (-SH) gruplarının, enzimin aktivitesi için gerekli olduğu, p-CMBA ile tespit edildikten sonra, aynı etkinin N-etil maleimit (NEM) ile de teyit edilmesi amaçlandı. NEM konsantrasyonunun artışına bağlı olarak rumen doku arginaz aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Şekil 29'da görüldüğü gibi enzim aktivitesi, 35mM NEM konsantrasyonunda %54, 75mM NEM konsantrasyonunda ise %76 civarında inhibisyona uğramıştır.

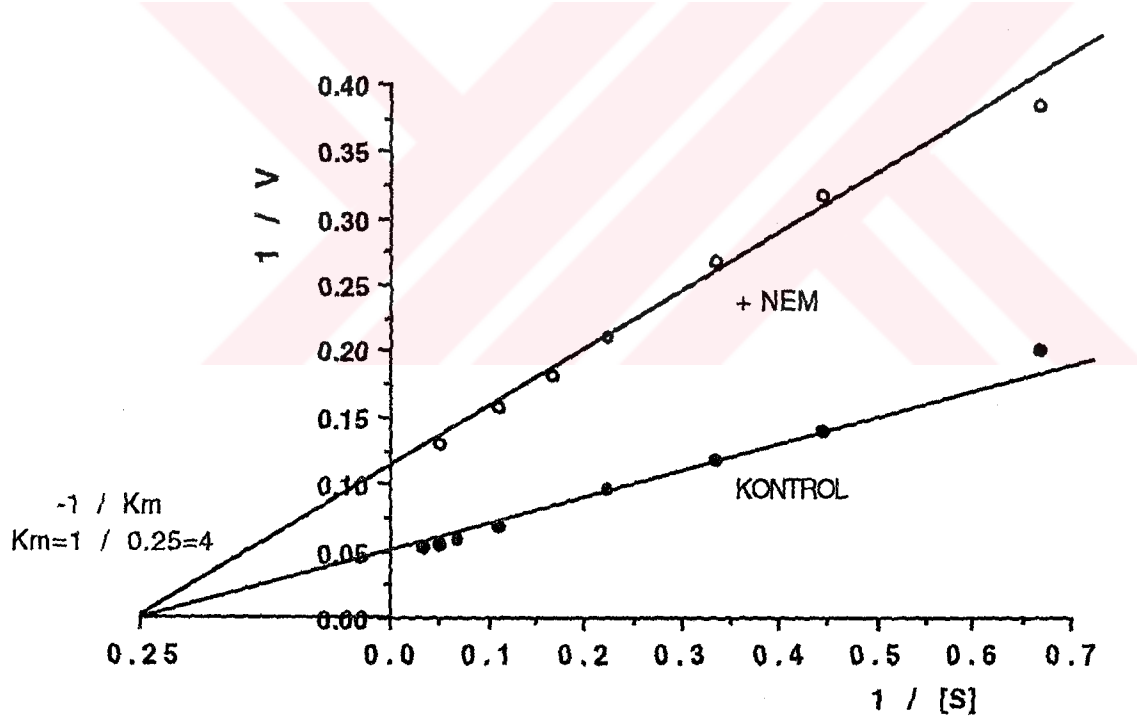
35mM N-etil maleimit varlığında ve çeşitli L-arginin konsantrasyonlarında rumen doku arginaz aktivitesi saptanarak sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde Michaelis-Menten eşitliği ve Lineweaver-Burk eğrisi kullanılmıştır (Şekil 30,31). Her iki yöntem ile değerlendirme sonucunda enzimin Vmax'ının değiştiği ve Km'inin değişmediği saptanmıştır. Bu deney sonucunda enzimin arginine karşı olan Km'inin 4 mM civarında olduğu ve N-etil maleimitin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği bulunmuştur.



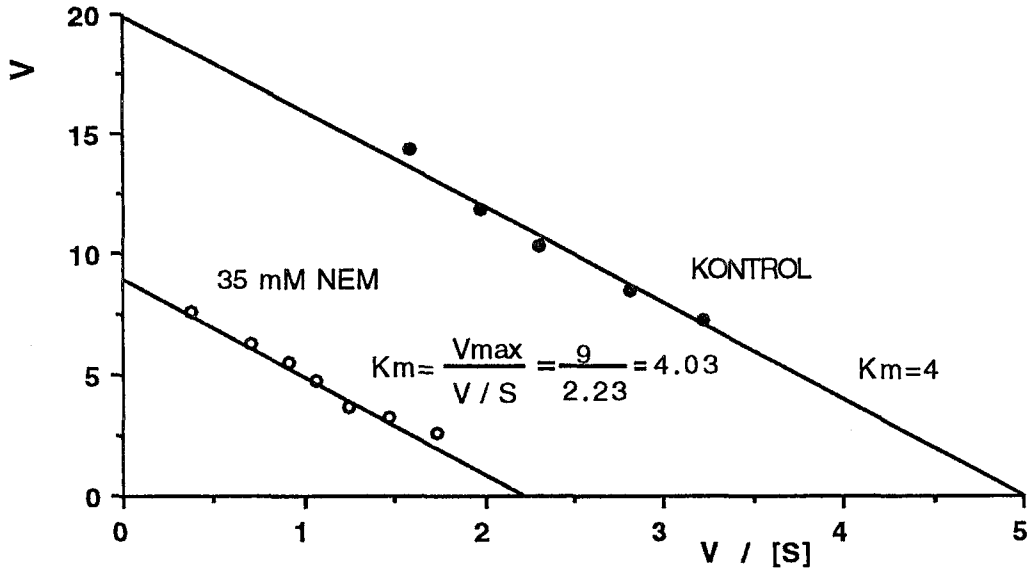
Şekil 29: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinde, NEM Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişim.



Şekil 30: NEM'in, Rumen Doku Arginaz Aktivitesine, Argininin Değişik Konsantrasyonlarında etkisi.



Şekil 31: NEM'in, Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.



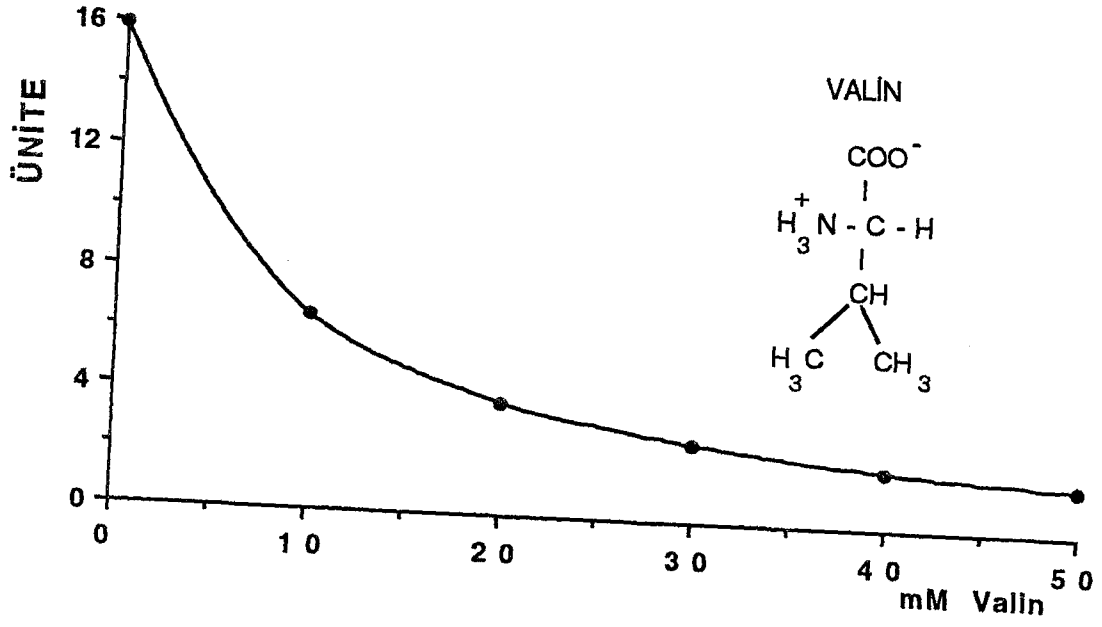
**Şekil 32:** NEM'in, Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

### 3.3.1.10. Rumen Doku Arginazının Amino Asit İnhibitörleri.

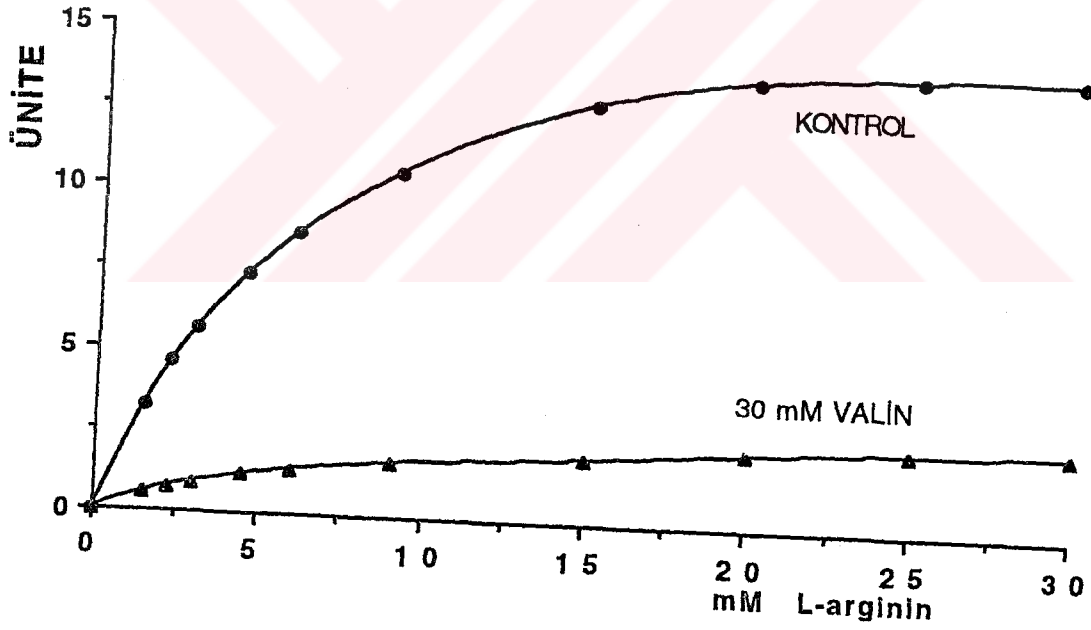
#### 3.3.1.10.a. L-valinin Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

10mM ile 50mM arasında değişen konsantrasyonlarda L-valinin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 33'de görüldüğü gibi L-valin 10mM konsantrasyonda %59, 30mM'da ise %84 oranında rumen doku arginaz aktivitesini inhibe etmiştir.

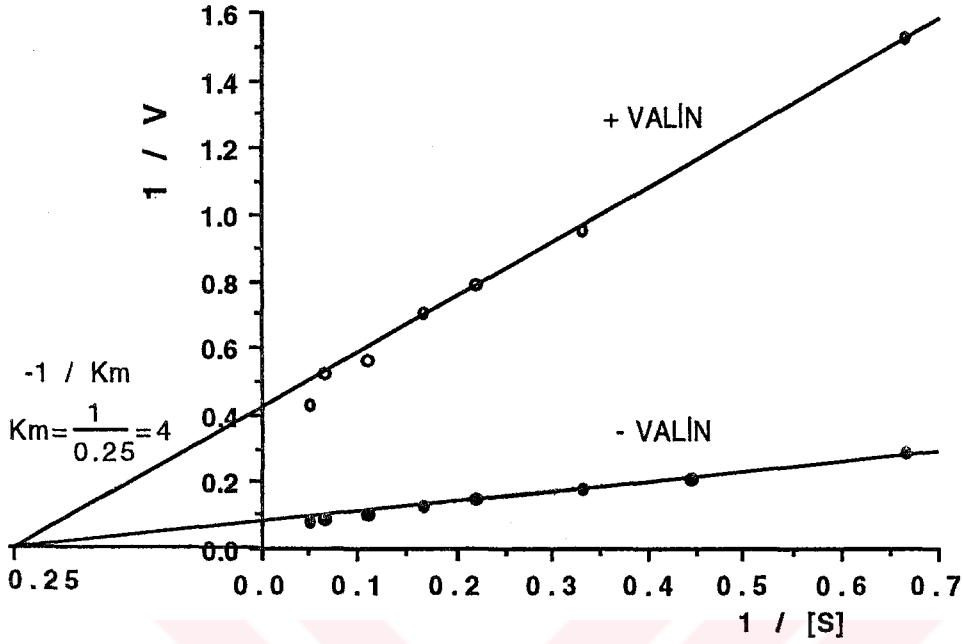
Düz zincirli ve non-polar (yüksüz) bir amino asit olan L-valinin, yaptığı inhibisyon tipini belirleyebilmek için arginaz aktivitesi, farklı arginin konsantrasyonlarında 30mM L-valin varlığında ölçülmüştür (Şekil 34). Sonuçlar Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 35,36). Her iki yöntem ile değerlendirme sonucunda, enzimin Vmax'ının kontrole göre belirgin olarak azaldığı, Km'inin ise değişmediği görülmüştür. Enzimin arginine karşı olan Km'inin 4 mM civarında olduğu ve L-valinin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.



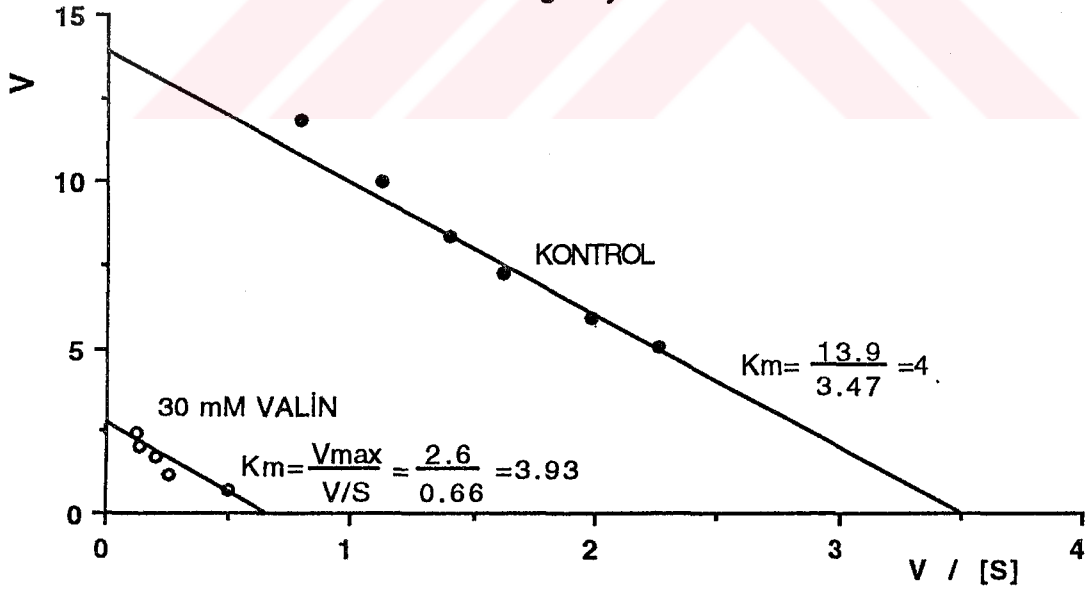
Şekil 33: Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine L-valinin Etkisi.



Şekil 34: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin, L-valin Varlığında Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



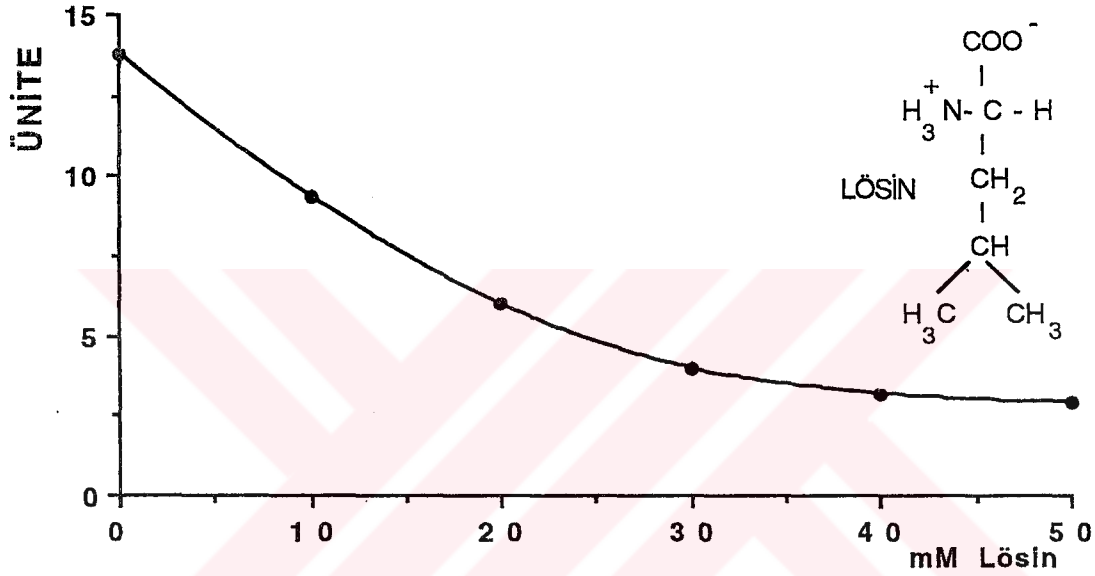
Şekil 35: L-valin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver- Burk Eğrisiyle İncelenmesi.



Şekil 36: L-valin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Eadie-Hofstee Eğrisiyle İncelenmesi.

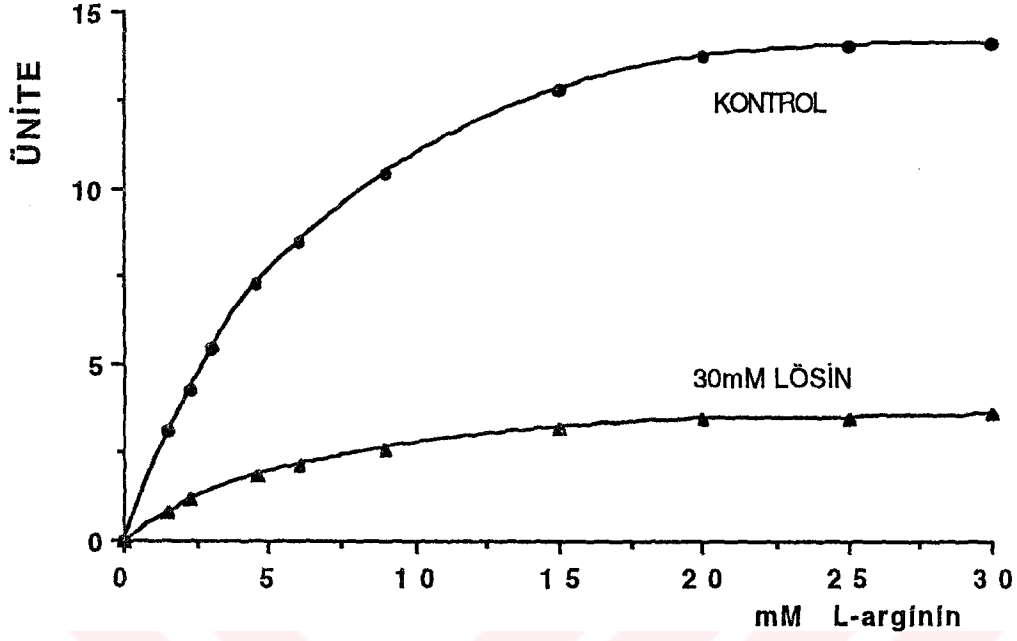
### 3.3.1.10.b. L-lösinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisi

Çeşitli konsantrasyonlardaki L-lösinin, rumen doku arginaz aktivitesini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Şekil 37'de görüldüğü gibi L-lösinin enzim aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur. 10mM konsantrasyonda L-lösinin, aktiviteyi %32, 20mM'da %57, 40mM'da ise %77 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

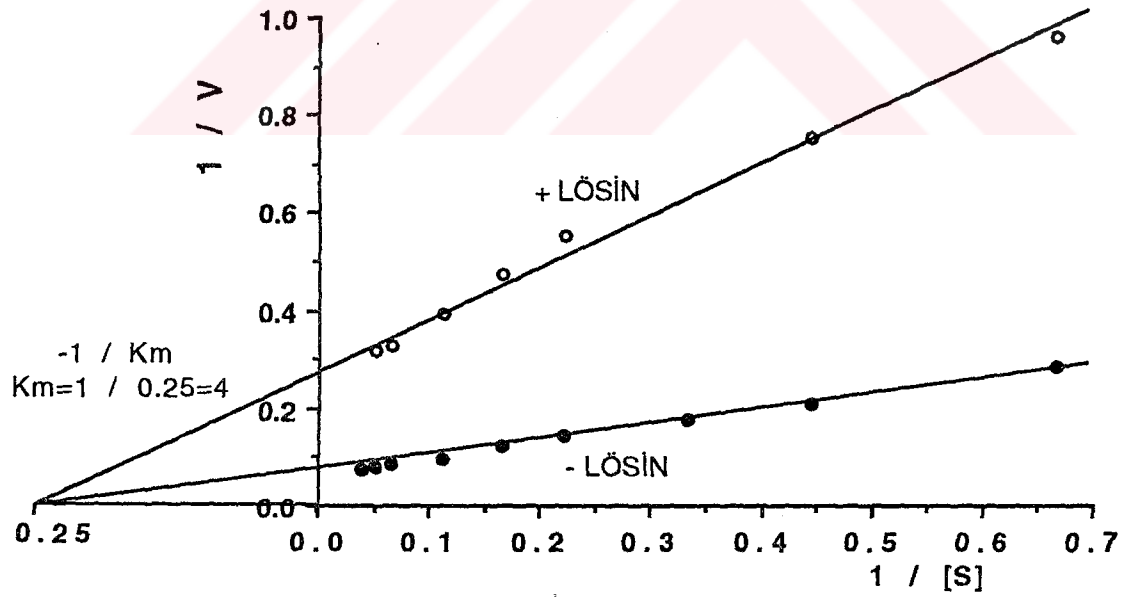


Şekil 37: Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine L-lösinin Etkisi.

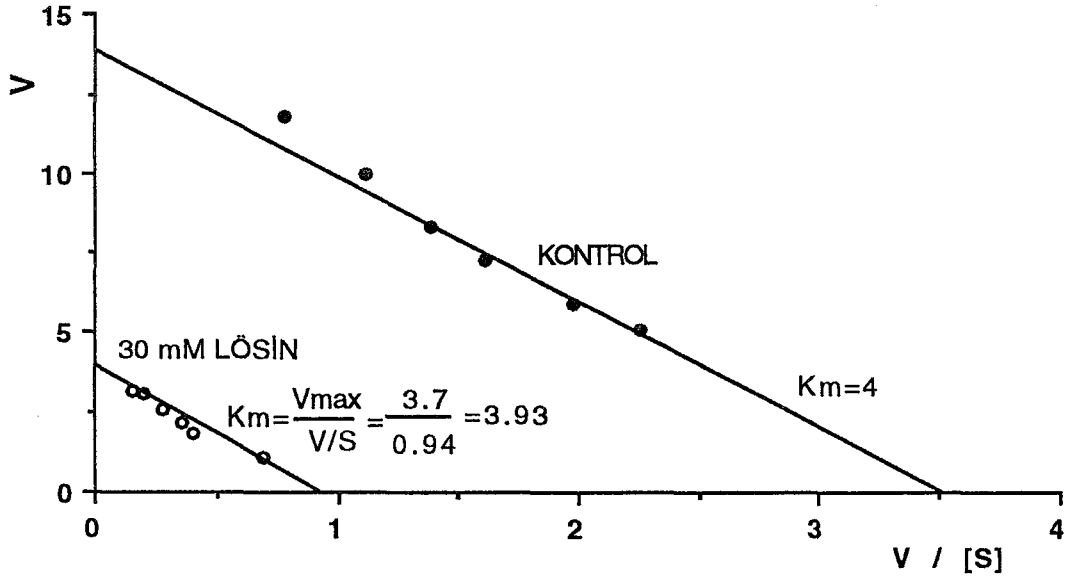
L-lösinin neden olduğu inhibisyon tipini belirleyebilmek için 30mM L-lösin varlığında ve giderek artan arginin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi ölçülmüştür (Şekil 38). Aynı veriler Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri ile de değerlendirilmiştir (Şekil 39,40). Belirtilen konsantrasyondaki L-lösin varlığında enzimin Vmax'ının azaldığı, buna karşılık L-arginine karşı olan Km'inin değişmediği bulunmuştur. Enzimin arginine karşı olan Km'inin 4 mM civarında olduğu ve L-lösinin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 38: Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin, L-lösin Varlığında Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

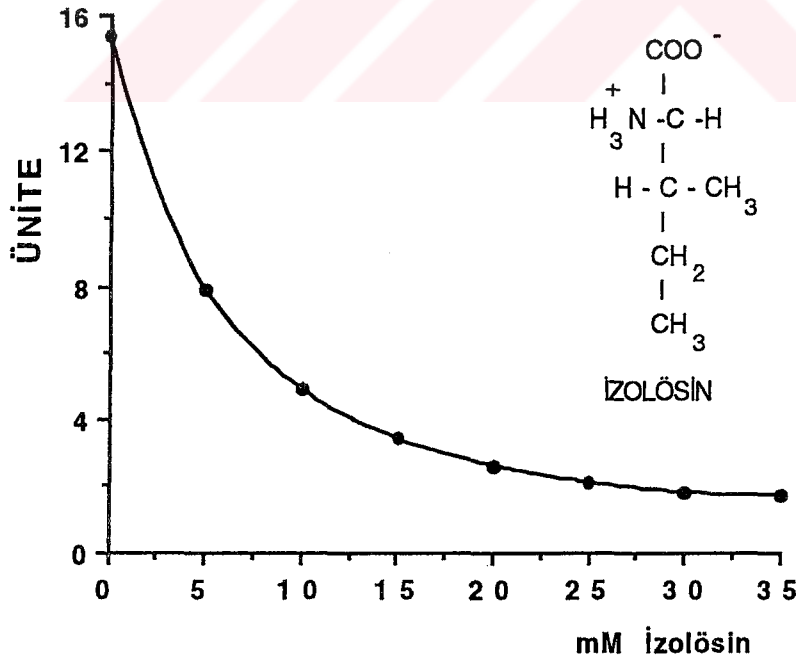


Şekil 39: L-Lösin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisiyle İncelenmesi.



Şekil 40: L-Lösin Varlığında, Rumen Doku Arginaz Aktivitesinin Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Eadie-Hofstee Eğrisiyle İncelenmesi.

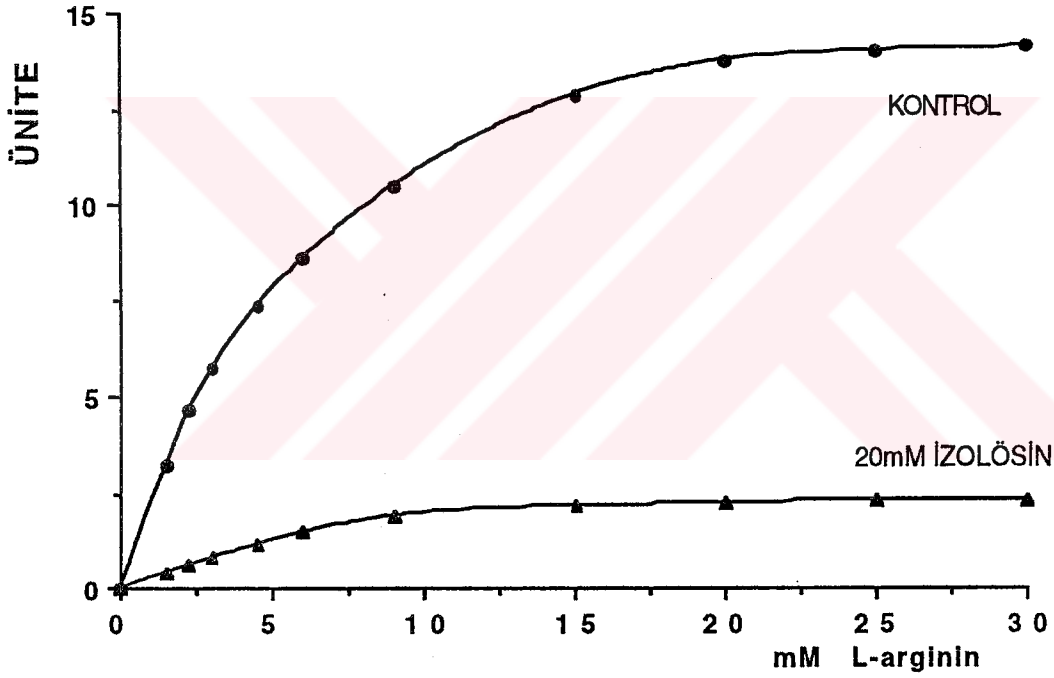
### 3.3.1.10.c. L-izolösinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisi



Şekil 41: L-izolösinin Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

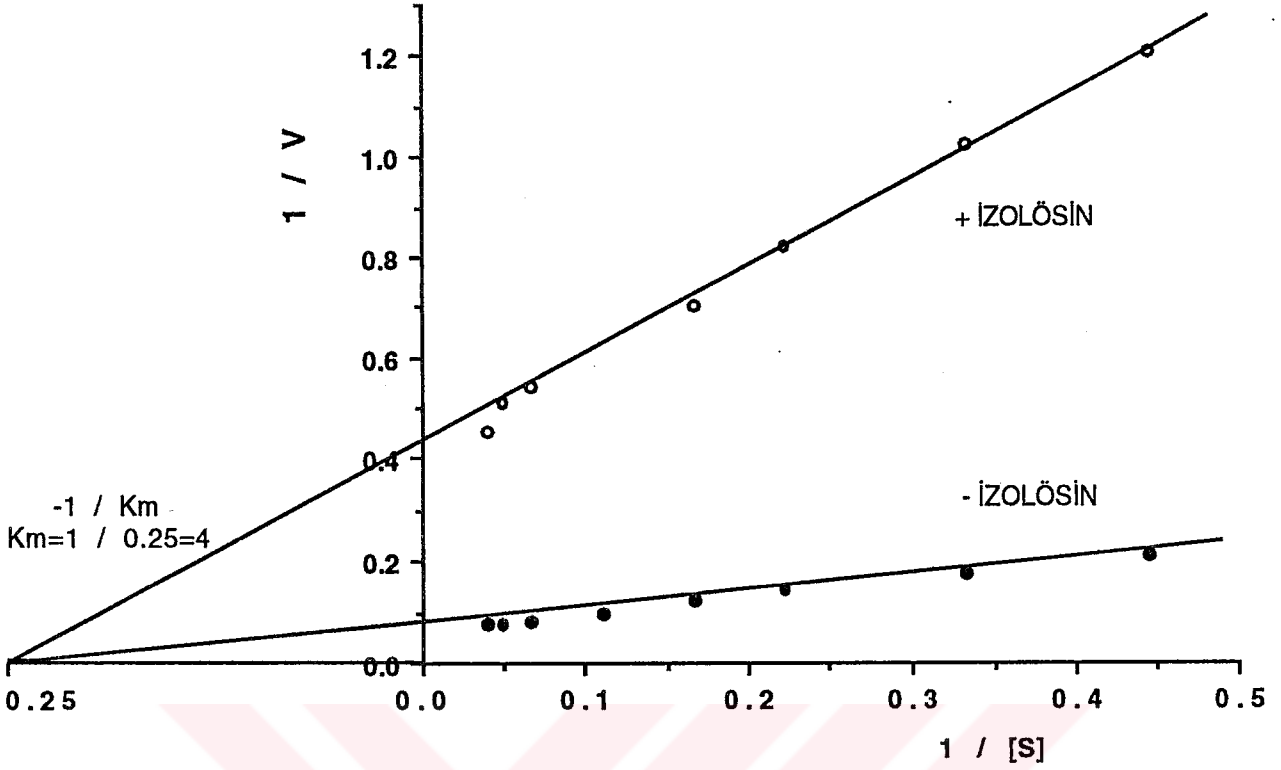
Nonpolar ve düz zincirli bir amino asit olan L-izolösinin arginaz aktivitesine olan etkisini araştırmak için, 5mM ile 35mM'lık L-izolösin konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 41'de görüldüğü gibi 5mM izolösin %49, 15mM izolösin %78, 25mM izolösin ise %86 inhibisyona sebep olmaktadır.

20mM izolösin varlığında, değişik L-arginin konsantrasyonlarında, rumen doku arginaz aktivitesi saptanıp, bu veriler Michaelis-Menten yöntemi ile değerlendirildiğinde  $V_{max}$ 'ın belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 42).

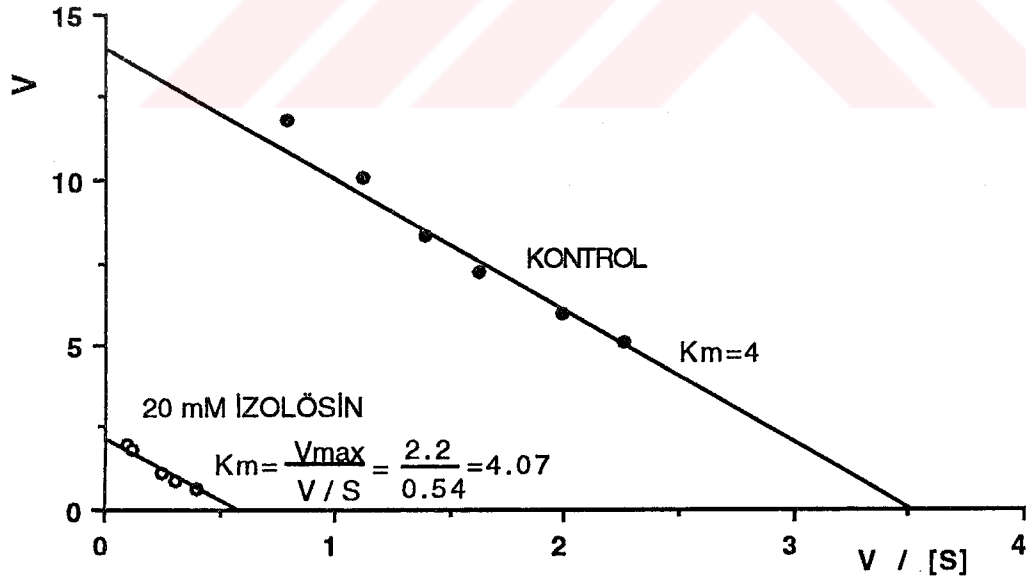


Şekil 42: L-izolösinin Sebep Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Yöntemi ile Saptanması.

Aynı veriler Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee yöntemi ile değerlendirildiğinde  $V_{max}$ 'ın azalmasına karşılık,  $K_m$ 'in değişmediği saptanmıştır. Kontrolde ve izolösin varlığında arginaz enziminin substratı olan L-arginine karşı olan  $K_m$ 'inin 4mM civarında olduğu bulunmuştur (Şekil 43,44).



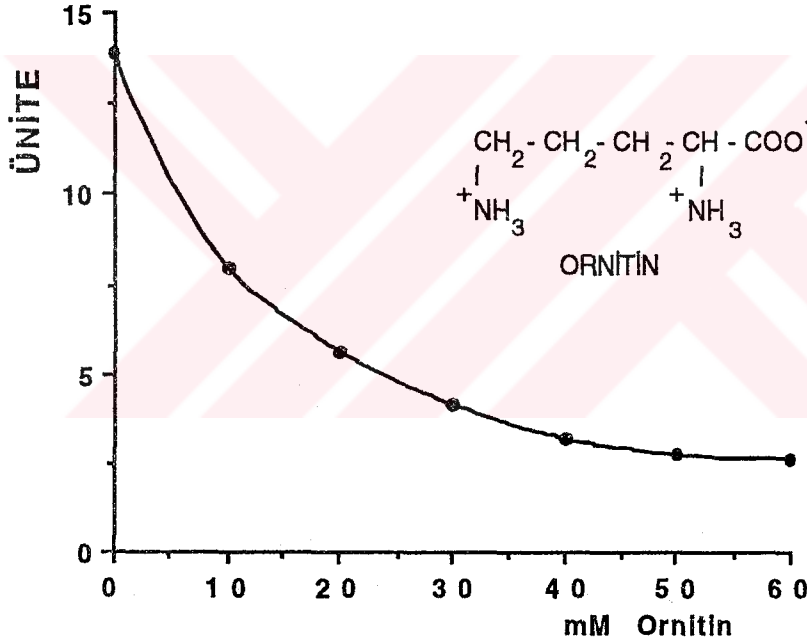
Şekil 43: L-izolösünin Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.



Şekil 44: L-izolösünin Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

### 3.3.1.10.d. L-ornitin'in Rumen Doku Arginaz Enzimi Üzerine Etkisi

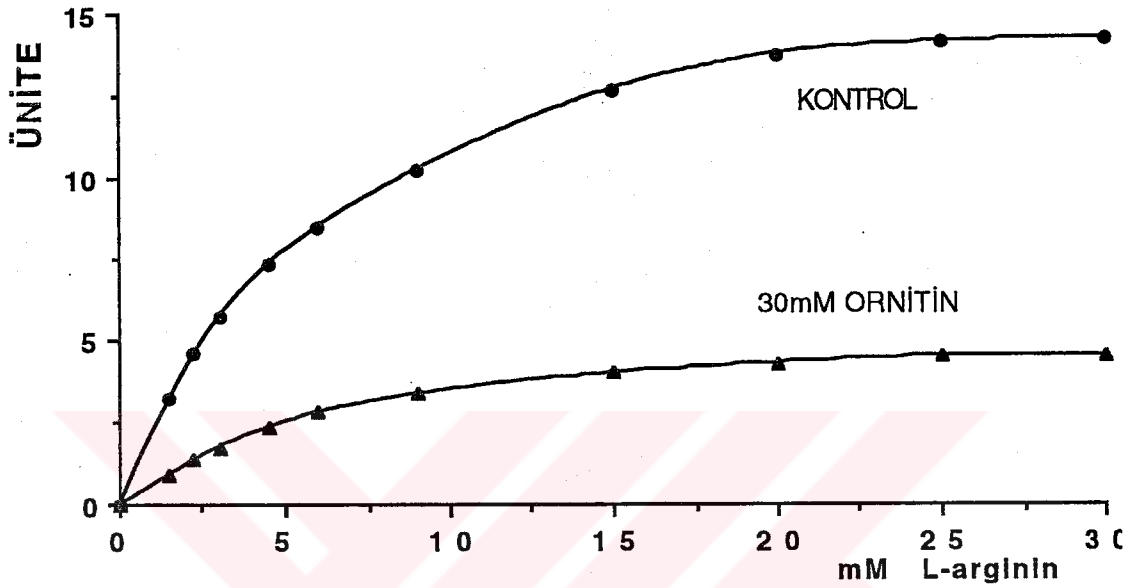
L-ornitin de arginaz inhibitörü olarak bilinmektedir. Bu amaçla, proteinlerin yapısında yer almayan bir amino asit olan L-ornitin'in, çeşitli konsantrasyonlarının rumen doku arginazına olan etkileri araştırılmıştır. 10mM ile 60mM arasında değişen konsantrasyonlarda L-ornitin'in rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi Şekil 45'de gösterilmiştir. Enzimin aktivitesini, 10mM L-ornitin'in %43, 30mM L-ornitin'in ise %70 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.



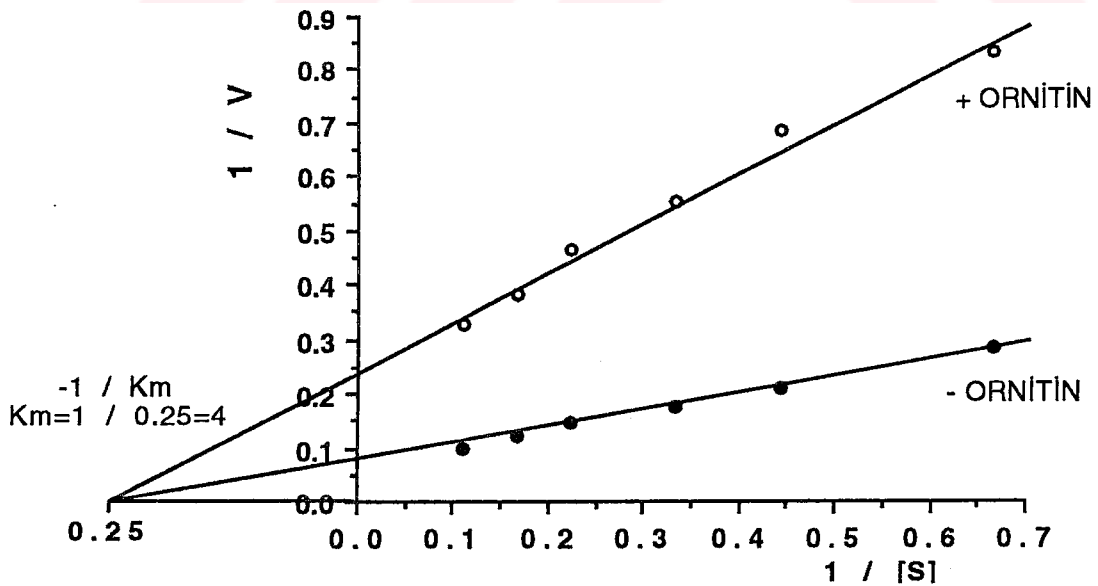
Şekil 45: L-ornitin'in Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

L-ornitin varlığında rumen doku arginaz aktivitesinin kinetik özellikleri araştırılmıştır. 30 mM L-ornitin varlığında ve çeşitli L-arginin konsantrasyonlarında rumen doku arginaz aktivitesi saptanmıştır. Bu veriler Michaelis-Menten yöntemi ile değerlendirildiğinde enzimin Vmax'ının azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 46). Aynı veriler

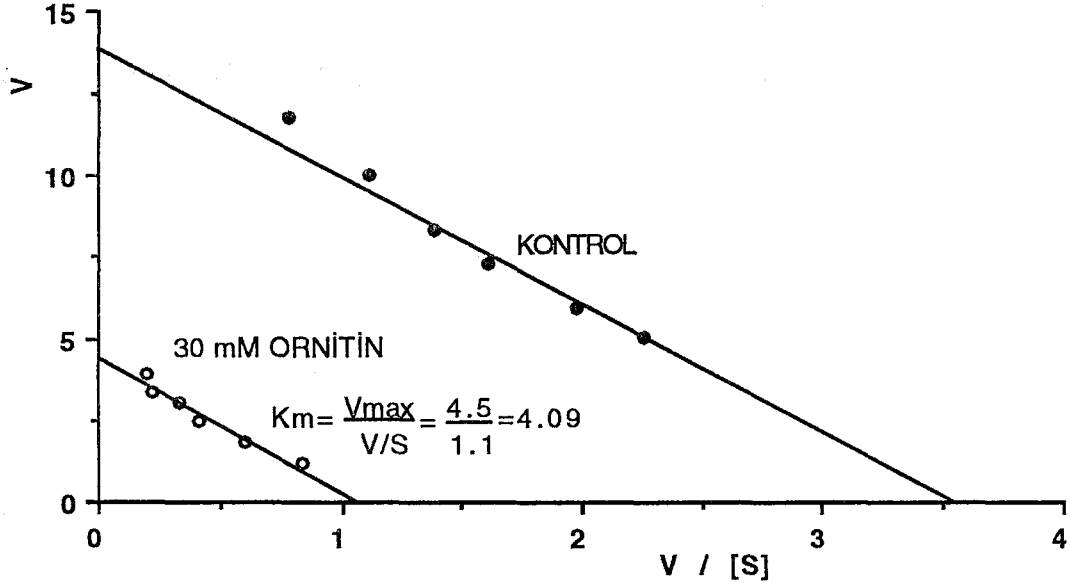
Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee yöntemi ile değerlendirildiğinde, L-ornitin varlığında  $V_{max}$ 'ın azaldığı fakat  $K_m$ 'in değişmediği saptanmıştır (Şekil 47,48). L-ornitin rumen doku arginaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe ettiği bulunmuştur.



Şekil 46: L-ornitin sebep olduğu inhibisyon tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.



Şekil 47: L-ornitin Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.

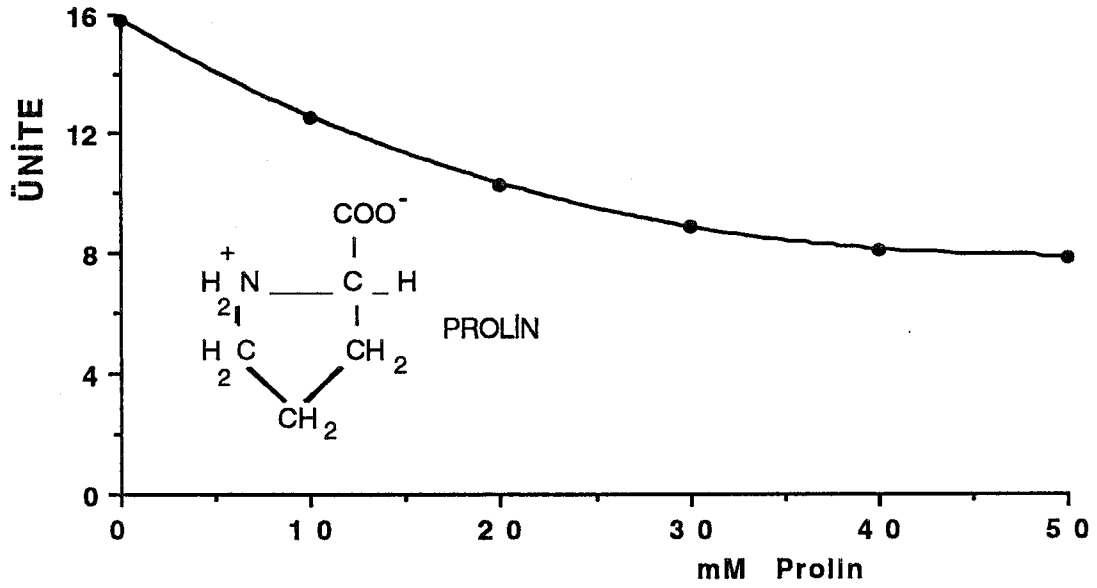


**Şekil 48:**L-ornitin'in Sığır Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibisyonunun Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

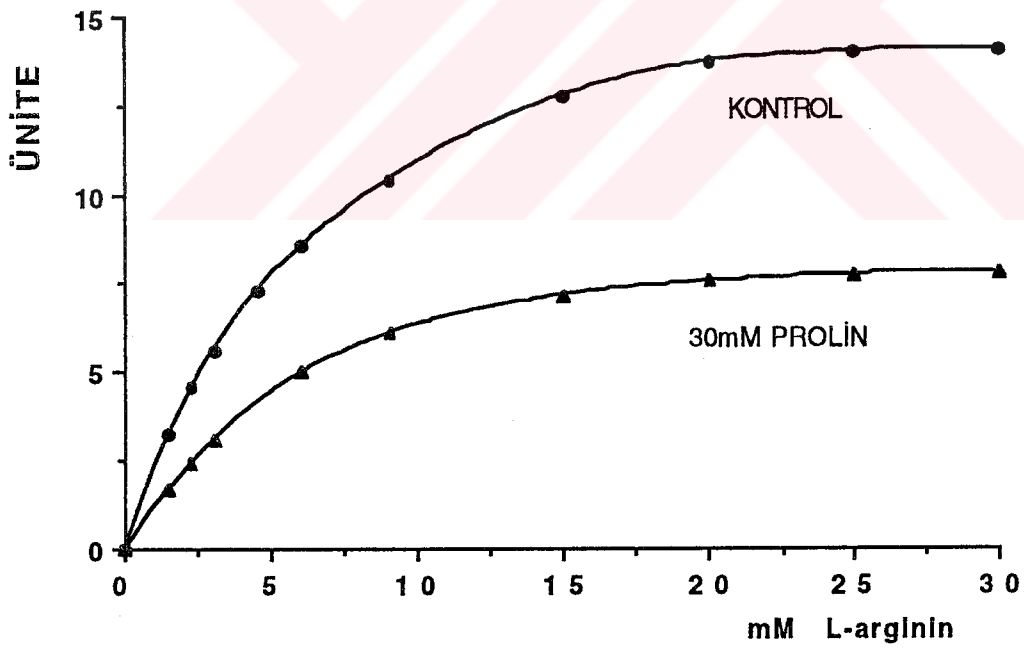
### 3.3.1.10.e. Rumen Doku Arginaz Aktivitesine L-prolinin Etkisi

Değişik konsantrasyonlardaki L-prolinin, rumen doku arginaz aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 10 mM ile 50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda L-prolin kullanılmıştır. L-prolin, rumen doku arginaz aktivitesini; 20mM konsantrasyonda %35, 40mM konsantrasyonda ise %49 inhibisyona uğratmıştır (Şekil 49).

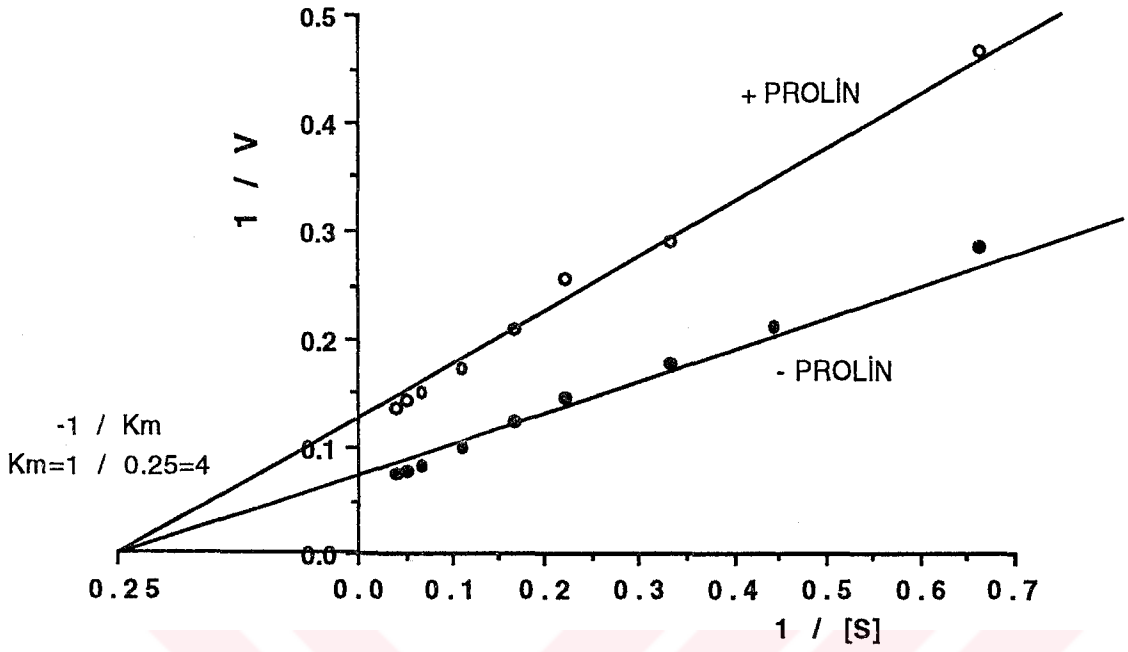
L-prolinin, arginaz aktivitesi üzerindeki inhibisyonun, tipini belirlemek amacı ile; arginaz aktivitesi 30mM L-prolin varlığında, argininin değişen konsantrasyonlarında tayin edilmiştir (Şekil 50). Sonuçlar Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee grafikleri ile değerlendirilmiştir. Şekil 51 ve 52'de görüldüğü gibi L-prolin varlığında enzimin  $V_{max}$ 'ının azaldığı  $K_m$ 'inin değişmediği bulunmuştur. Prolinin varlığında ve yokluğunda  $K_m$ 'inin 4 mM civarında olduğu ve L-prolinin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.



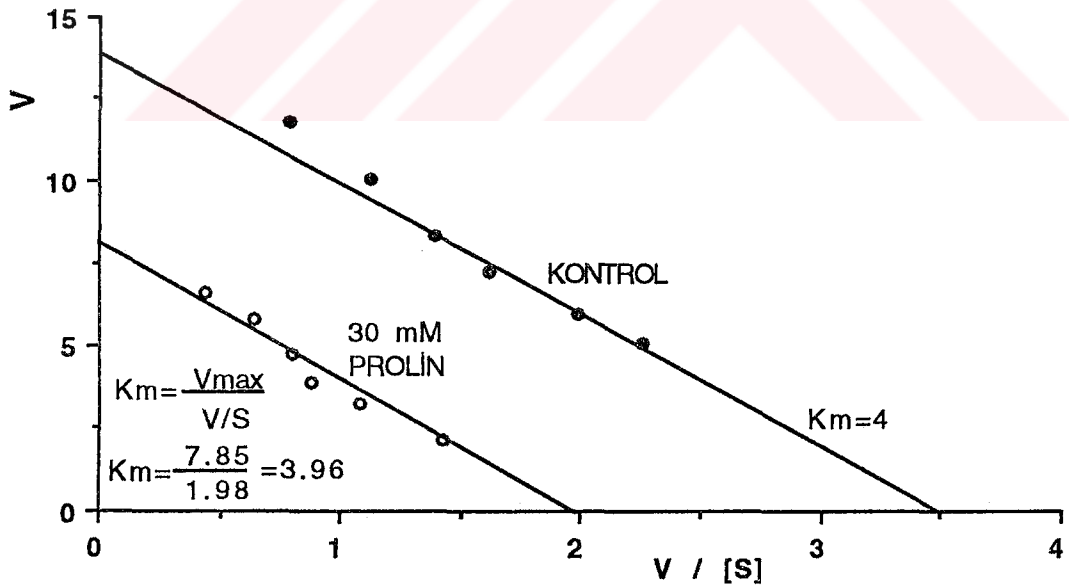
Şekil 49: L-prolinin Farklı Konsantrasyonlarının, Siğir Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.



Şekil 50: L-prolinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği.



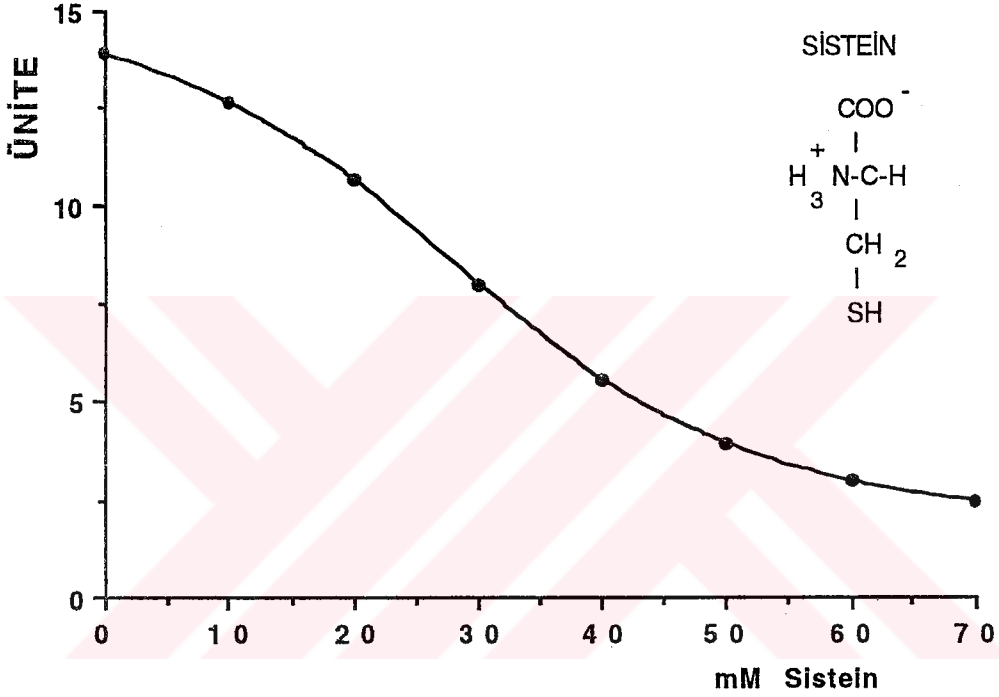
Şekil 51: L-prolinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Lineweaver-Burk Grafiği.



Şekil 52: L-prolinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Eadie-Hofstee Grafiği.

### 3.3.1.10.f. Rumen Doku Arginaz Aktivitesine L-sisteinin Etkisi

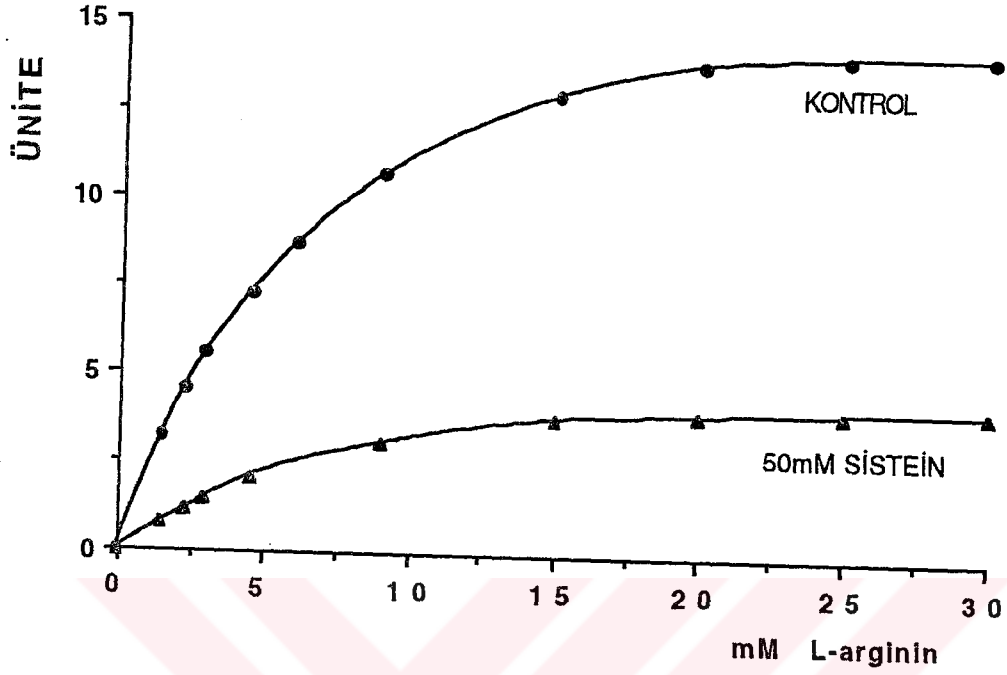
10mM ile 70mM arasında değişen konsantrasyonlarda L-sisteinin, rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkisi Şekil 53'de gösterilmiştir. Enzimin aktivitesini 30mM L-sisteinin %43, 50mM L-sisteinin ise %72 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.



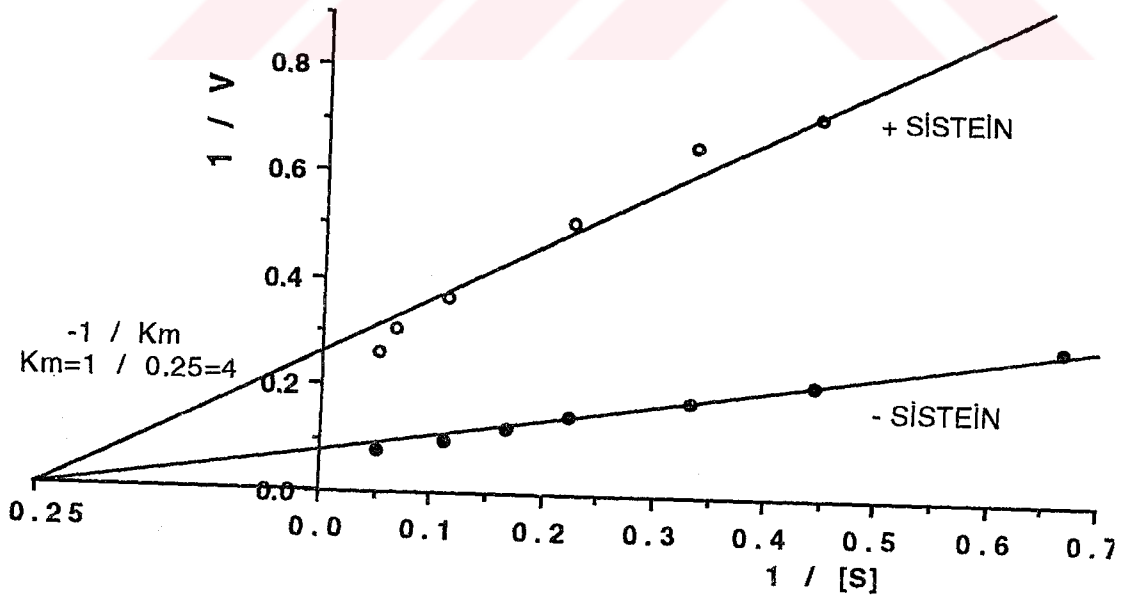
Şekil 53: L-sisteinin Farklı Konsantrasyonlarının, Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.

L-sistein varlığında rumen doku arginaz enziminin kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaç ile 50mM L-sisteinin varlığında, çeşitli arginin konsantrasyonlarında, enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuçlar Michaelis-Menten yöntemi ile değerlendirildiğinde enzimin Vmax'ının azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 54). Aynı sonuçlar Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri ile değerlendirildiğinde, L-sistein mevcudiyetinin enzimin Vmax'ını azalttığı, Km'ini değiştirmedeği bulunmuştur (Şekil 55,56). L-sistein rumen doku arginaz enzimini

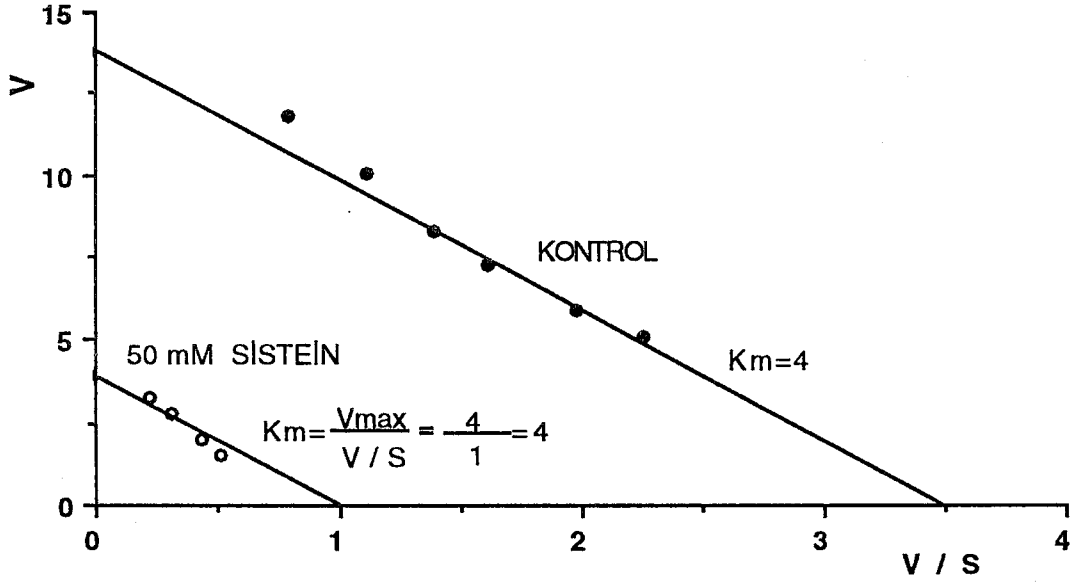
nonkompetitif olarak inhibe etmektedir.



Şekil 54: L-sisteinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisinin Michaelis-Menten Grafiği.



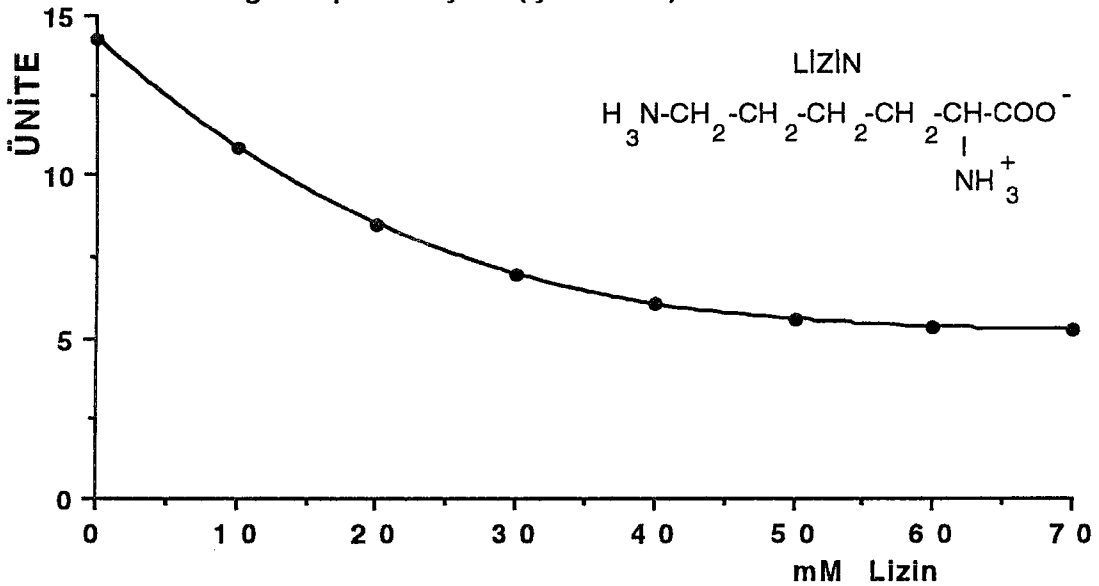
Şekil 55: L-sisteinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Lineweaver-Burk Grafiği.



Şekil 56: L-sisteinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Eadie-Hofstee Grafiği.

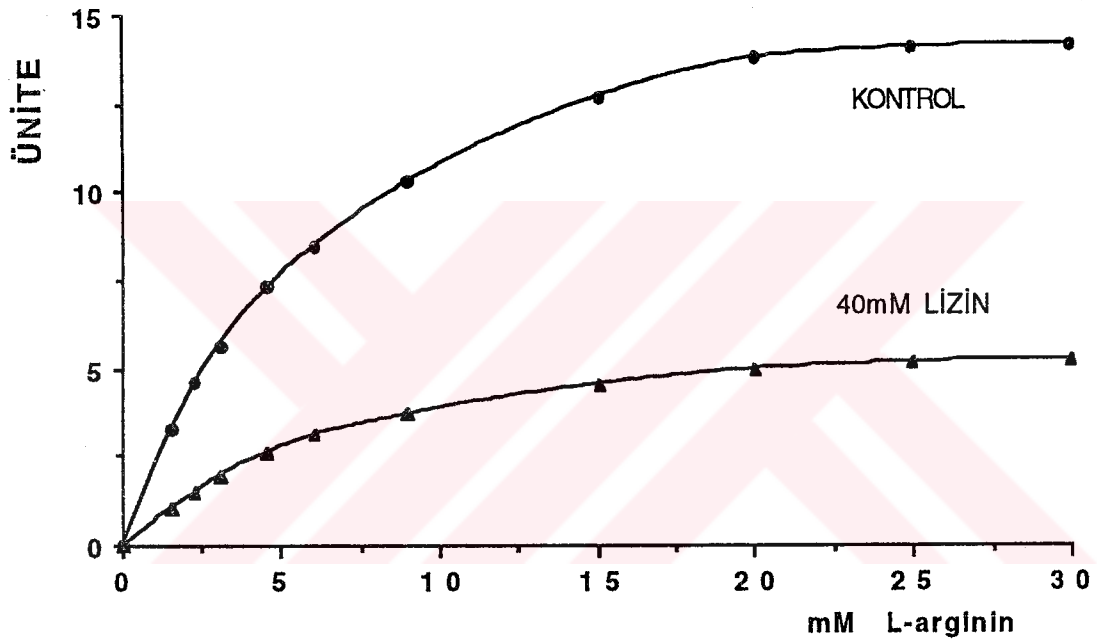
### 3.3.1.10.g. Rumen Doku Arginaz Aktivitesine L-lizinin Etkisi

10mM ile 70mM arasında değişen konsantrasyonlarda L- lizinin, rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. 20mM'lık L-lizinin rumen doku arginaz aktivitesini %41, 40mM konsantrasyonda ise %58 oranında inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 57).

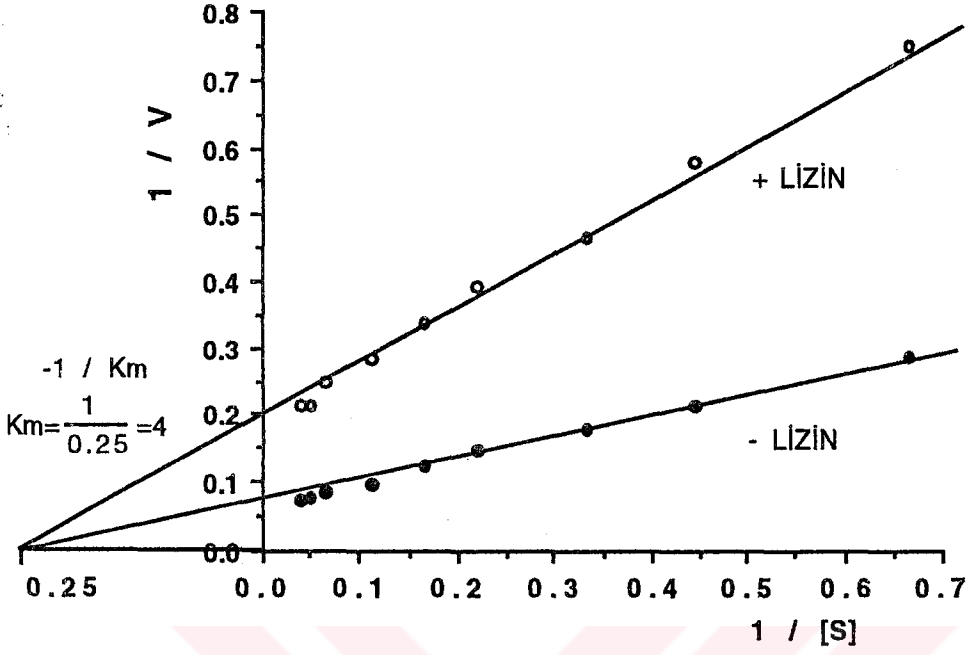


Şekil 57: L-lizinin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

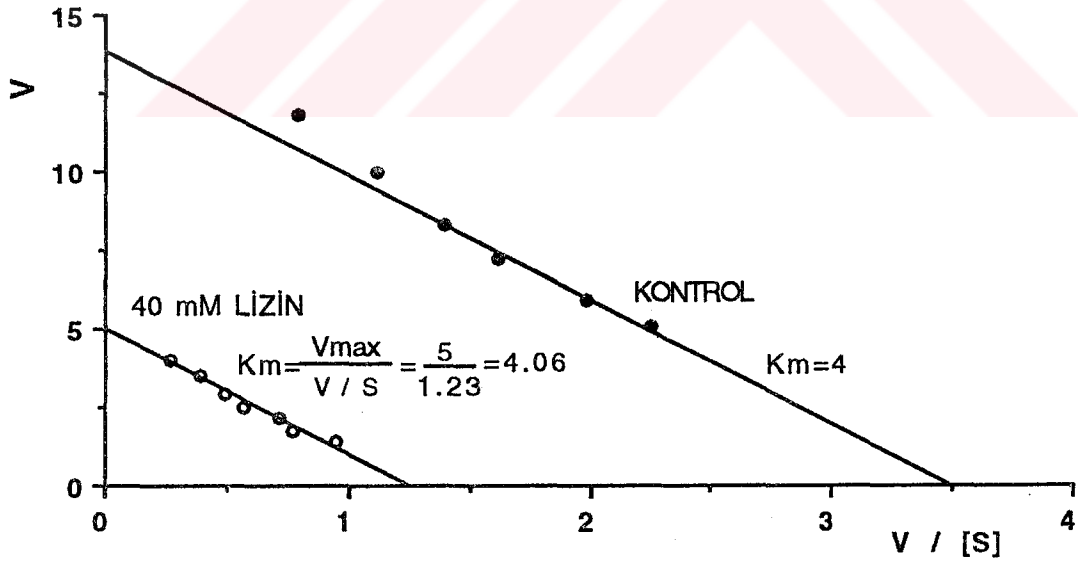
40mM L-lizin varlığında ve L-argininin çeşitli konsantrasyonlarında rumen doku arginaz enziminin aktivitesi tayin edilerek, inhibisyonun tipi belirlenmek istenmiştir. Veriler Michaelis-Menten yöntemi ile değerlendirildiğinde enzimin  $V_{max}$ 'ının azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 58). Sonuçlar Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee eğrileri (Şekil 59,60) ile değerlendirildiğinde; L-lizin varlığının, enzimin L-arginine karşı  $K_m$ 'ini değiştirmedeği ve  $K_m$ 'inin 4mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 58: Lizinin Sebep Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.



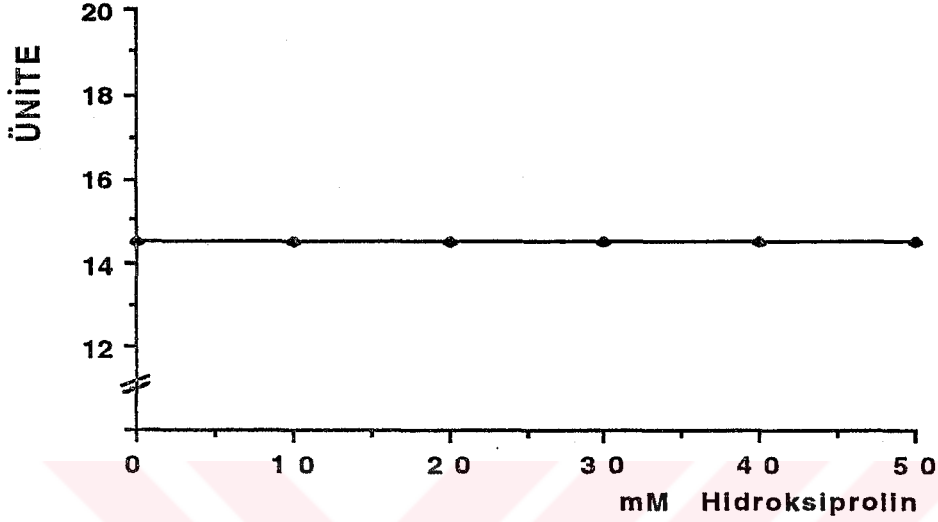
Şekil 59: L-lizinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Lineweaver-Burk Grafiği.



Şekil 60: L-Lizinin Rumen Doku Arginazı Üzerine Yaptığı Nonkompetitif İnhibisyonun Eadie-Hofstee Grafiği.

### 3.3.1.10.h. Arginaz Aktivitesine L-hidroksiprolinin Etkisi.

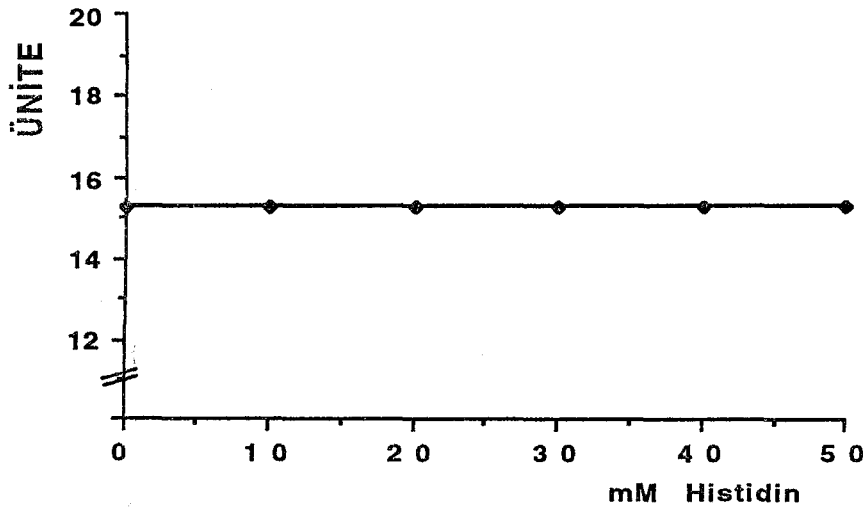
L-argininin optimal konsantrasyonu üzerine, artan konsantrasyonlarda hidroksiprolin ilave edildiğinde, rumen doku arginaz aktivitesinde herhangi bir değişimin olmadığı görülmektedir (Şekil 61).



Şekil 61: Hidroksiprolinin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

### 3.3.1.10.i. L-histidin Rumen Doku Arginazı Üzerine Etkisi.

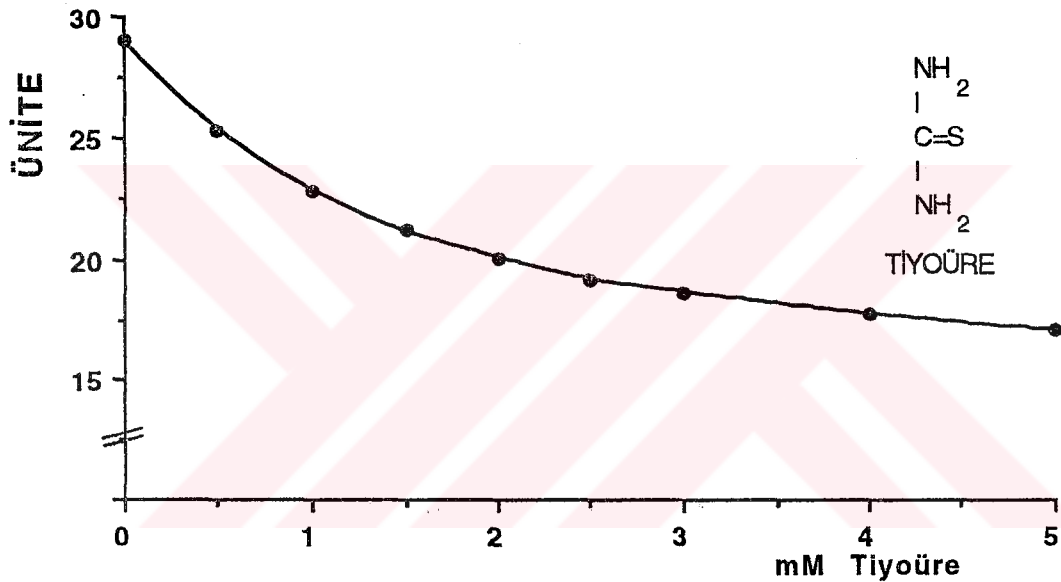
Bu amaçla artan konsantrasyonlarda L-histidin kullanılarak, arginaz aktivitesi ölçülmüştür. L-histidin rumen doku arginaz aktivitesinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır (Şekil 62).



Şekil 62: L-histidin Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

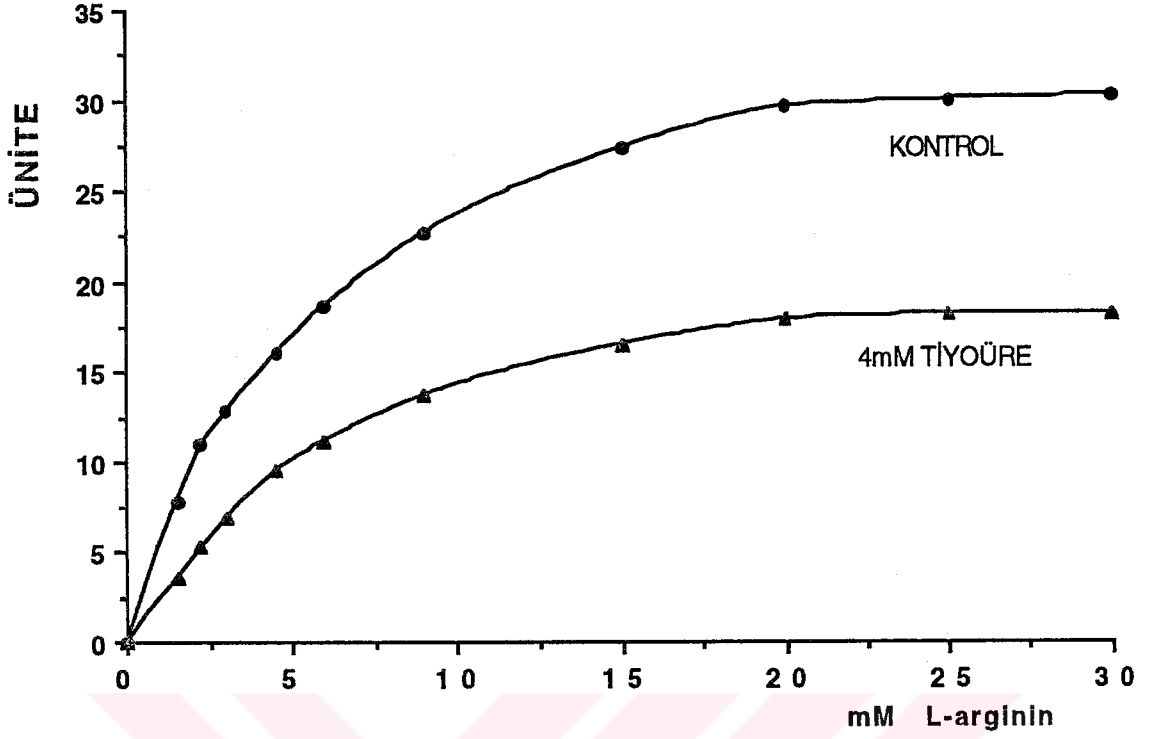
### 3.3.1.11. Tiyöürenin Rumen Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bir üre analogu olarak bilinen tiyöürenin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine olan etkisini incelemek amacı ile 0.5mM ile 5mM arasında değişen konsantrasyonlarda tiyöüre çözeltisi preinkübasyon ortamına ilave edilerek arginaz aktivitesi tayin edilmiştir. Şekil 63'de görüldüğü gibi 1.5mM'lık tiyöürenin %27, 4mM tiyöürenin %38 oranında enzim aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur.

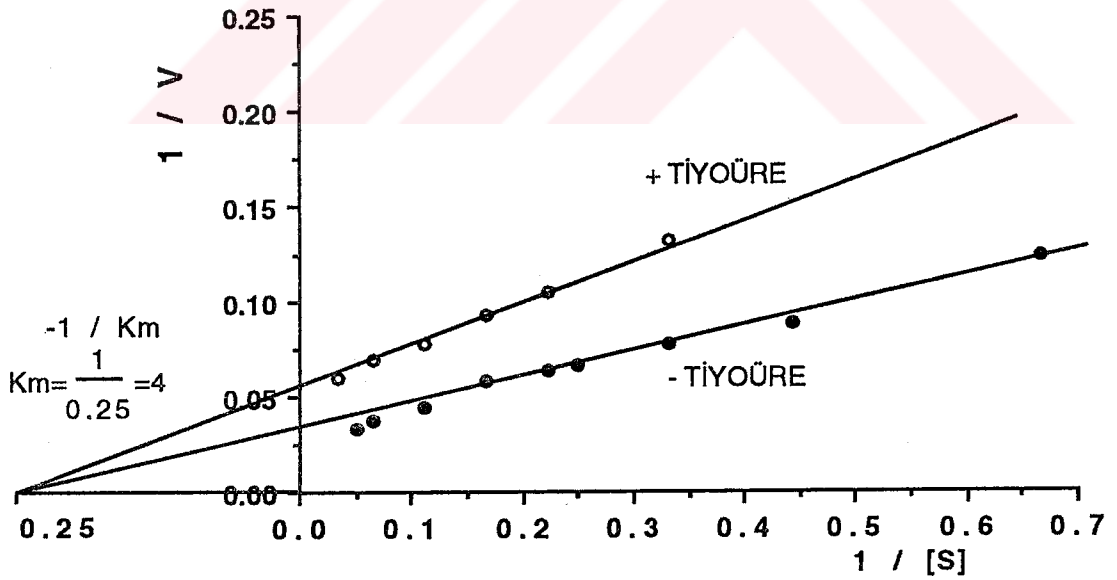


Şekil 63: Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Tiyöürenin Etkisi.

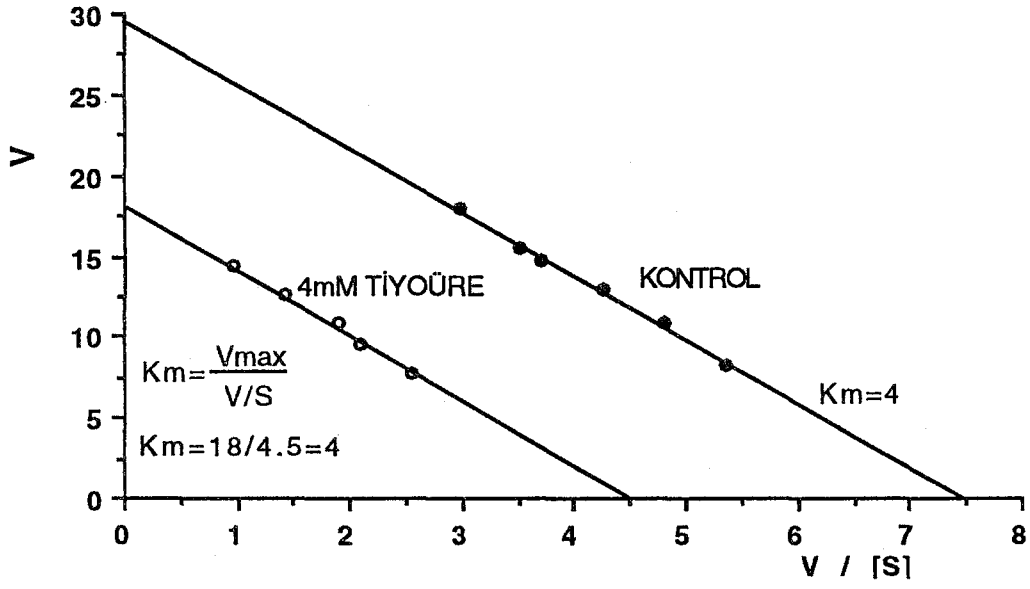
L-argininin değişik konsantrasyonlarında ve 4mM tiyöürenin varlığında arginaz aktivitesi ölçülerek sonuçlar Michaelis-Menten eşitliği ile değerlendirilmiştir. 4mM tiyöüre varlığında enzimin Km'inin değişmediği buna karşılık Vmax'ının azaldığı saptanmıştır (Şekil 64). Aynı veriler Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee grafikleri ile değerlendirildiğinde enzimin arginine karşı Km'inin 4mM civarında olduğu ve tiyöürenin enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 65,66)



Şekil 64: Tiyüenin Sebep Olduğu İnhibisyon Tipinin Michaelis-Menten Eşitliği ile Saptanması.



Şekil 65: Tiyüenin Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Grafiği.



Şekil 66: Tiyüenin Rumen Doku Arginazı Üzerine İnhibitör Etkisinin Eadie-Hofstee Grafiği.

## 3.2. METOT 2

Çalışmanın bu bölümünde sığır rumen doku arginazı kısmen saflaştırıldı ve bazı biyokimyasal özellikleri optimize edildi.

### 3.2.2.1. Sığır Rumen Doku Arginazının Saflaştırılması

#### 3.2.2.1.1. Ayıraçlar

##### 1-Tampon Çözelti (0.01 M Tris-HCl tamponu);

a-1.21 gr Tris bir miktar distile suda çözüldü ve litreye distile su ile tamamlandı.

b-0.82 ml HCl bir miktar distile su üzerine ilave edildi sonra litreye distile su ile tamamlandı.

Tampon çözelti; 0.01M Tris çözeltisi bir behere konuldu ve 0.01 M HCl ile pH 7.5'e getirildi.

##### 2-Homojenizasyon çözeltisi;

0.05 M  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0.16 M KCl, 10 mM 2-Merkaptoetanol 0.01 M'lık Tris-HCl tamponu (pH:7.5) içinde hazırlandı.

#### 3.2.2.1.2. İşlem

**a-Tamponda homojenizasyon:** Sığırlardan alınan rumen doku parçaları, %0.9'luk NaCl ile yıkanarak dokunun artıklardan temizlenmesi sağlandı. Doku örnekleri homojenize edilmeden önce iki süzgeç kağıdı arasında kurutularak 50g olarak tartıldı. Bu rumen doku parçaları, bir makas ile küçük parçalar haline getirildikten sonra, ağırlığının 4 katı hacime (200 ml) homojenizasyon çözeltisi ile tamamlanıp, kırılmış buz içerisinde homojenizatörde (Sorvall Omni Mixer) iyice homojenize edildi. Homojenat iki defa tülbentten süzüldü.

**b-Homojenat santrifügasyonu:** Homojenat 50ml'lik polipropilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) +2°C'de 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek homojenat süpernatantı elde edildi.

**c-Isı muamelesi:** Süpernatantın pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra 60 °C' deki su banyosunda 20 dakika bekletildi ve bu zaman sürecinde birkaç defa bagetle karıştırılarak ısının eşit dağılımı sağlandı. Isı işleminden sonra homojenat, kırılmış buz içerisinde 5 dakika soğutuldu. Isıtma sonucu denatüre olan proteinleri uzaklaştırmak amacı ile, homojenat 14 000 rpm'de 20 dakika (16 000g) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, süzgeç kağıdı ile süzülerek ısı fraksiyonu elde edildi.

**d-Aseton ile muamele:** Bir önceki basamaktan elde edilen süpernatanta hacmi 2.5 misli (%60) oluncaya kadar, -25°C'de bekletilmiş asetondan damla damla ilave edilerek, bu durumda kırılmış buz içerisinde 30 dakika karıştırıldı. Karışım 14 000 rpm'de -10°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı, elde edilen peletler 35 ml homojenizasyon çözeltisi içinde cam-teflon homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra, 0.01 M Tris-HCl tamponuna karşı 1 gece dializ edilerek, 17 000 rpm'de (25 000g) 20 dakika santrifüj edildi.

**e-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile doyurma:** Elde edilen süpernatanta, amonyum sülfat; kırılmış buz içerisinde %55 doygunluğa erişinceye kadar, yavaş yavaş ilave edilip 30 dakika sürekli karıştırıldı. 10 000 rpm'de 30 dakika (8500g) santrifüj edilerek pelet kısmı ayrıldı, süpernatanttaki doygunluğun %85'e ulaşması için gerekli amonyum sülfat tekrar ilave edilerek, aynı işlemler tekrarlandı. %55 ve %85 amonyum sülfat doygunluğu sonrası elde edilen peletler birleştirildi ve 20 ml 0.01 M Tris-HCl tamponunda (pH:7.5, 10mM 2-Merkaptoetanol içerir) çözdürüldü. Bu fraksiyon dializ torbalarına aktarılarak, 0.01 M Tris-HCl tamponuna karşı bir gece diyaliz işlemine tabii tutuldu. Tampon bu süre içerisinde 3 kez değiştirildi. Dializat 11 000 rpm'de 20 dakika (10 000g) santrifüj edildi.

**f-Jel Filtrasyon:** Bu yöntem ile protein molekülleri molekül ağırlıklarına veya büyüklüklerine göre birbirlerinden ayırt edilmektedir. Kolon gözenek ihtiva eden küçük inert taneciklerle (sefadeks,

poliakrilamid, agaroz gibi) doldurulduktan sonra uygun bir tampon ile yıkanır ve dengeli hale getirilir. Daha sonra uygun bir tampon içinde protein çözeltisi kolonun üst kısmından yavaş yavaş ilave edilir. Yer çekimine göre aşağı doğru hareket eden protein çözeltisi, inert tanecikler arasından geçerken küçük protein molekülleri kolon dolgu maddesinin gözenekleri içine girip kolonda tutulur, büyük protein molekülleri ise bu gözeneklere giremediklerinden kolonu ilk olarak terkederler. Daha sonra orta büyüklükteki proteinler en sonunda küçük protein molekülleri kolonu terkeder. Böylece protein molekülleri büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılmış olur.

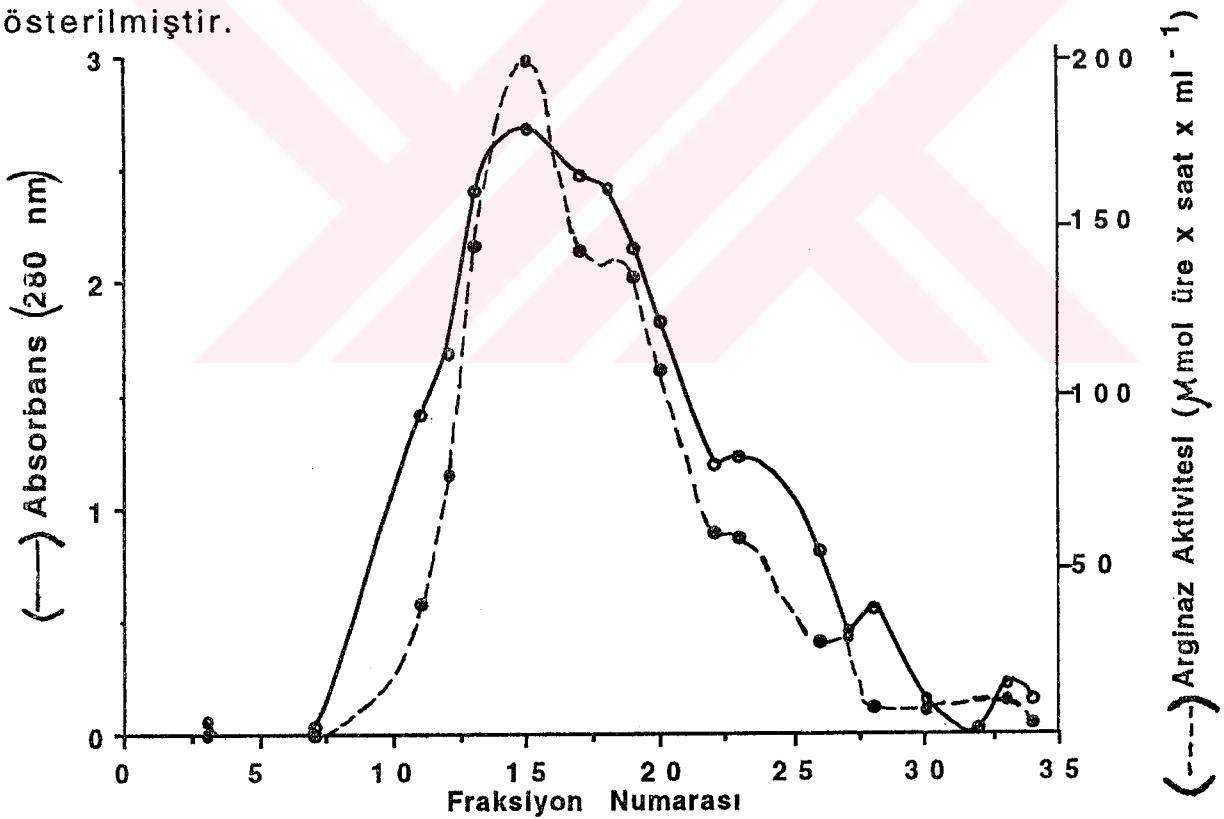
**a-Jellerin hazırlanması;** 0.01M Tris-HCl tamponundan bir behere 200 ml konuldu. 4g Sefadex G-200 yavaş yavaş tampona ilave edildi ve bagetle karıştırıldı. Bu süspansiyon 4-6 saat kaynatılarak jellerin şişmesi ve tampon ile dengelenmesi temin edildi.

**b-Jelin Kolona Doldurulması ve Numunenin Uygulanması;** Hazırlanan jel kolona (2 cm X 60 cm) yavaş yavaş dolduruldu. Bir bagetle yavaşça karıştırılarak hava kabarcıklarının oluşmaması sağlandı. Jel kolona doldurulup, normal akış hızına kavuştuktan sonra %0.9 NaCl içeren 0.01M Tris-HCl tamponu kolondan geçirilerek kolon dengelendi. 13ml dializat %60 oranında asetonla çöktürülüp, çökelti aynı tamponun 4ml'si içinde çözdürülerek kolona uygulandı ve tekrar aynı tampon kolondan geçirilerek 3 ml'lik fraksiyonlar halinde eluatlar alındı. Eluatların 280nm'deki absorbansı 0.005'den küçük oluncaya ( $A_{280} < 0.005$ ) kadar eluat alınımına devam edildi. Absorbansları yüksek olan tüplerde enzim aktivitesine bakılarak, yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve enzimin bazı biyokimyasal özellikleri araştırıldı (8,28,50,59,64).

### 3.3. BULGULAR 2

Tablo 4' de görüldüğü üzere siğir rumen doku arginazı, homojenat süpernatantında 1.16, 60°C'de ısıtmada 2.54, Aseton ekstraksiyonunda 10.13, amonyum sülfat ile çöktürme basamağında 11.16, Sefadeks G-200 jel filtrasyonda ise 18.46 misli saflaştırıldı. Siğir rumen doku arginazı bu saflaştırma basamakları sonunda %4.87 verimle 18.46 misli saflaştırılmıştır. Başlangıçta spesifik aktivitesi 6.47 ünite olan arginazdan, kısmi saflaştırma sonunda, spesifik aktivitesi 18.46 misli artırılarak 119.49 ünite olan kısmen saf arginaz elde edilmiştir.

Amonyum sülfat fraksiyonundan sonra siğir rumen doku arginazının Sefadeks G-200 kolonuna uygulanması ve elüsyon profili Şekil 67'de gösterilmiştir.



Şekil 67: Siğir Rumen Doku Arginazının Sefadex G-200 Jel Filtrasyon Elüsyon Profili. Kolonun Elüsyon Hızı 12 ml/saat Olarak Düzenlenmiş ve Elüsyonlar 3 ml'lik Fraksiyonlar Halinde Toplanmışır.

Tablo 4: Sığır Rumen Doku Arginazının Kısmen Saflaştırılması.

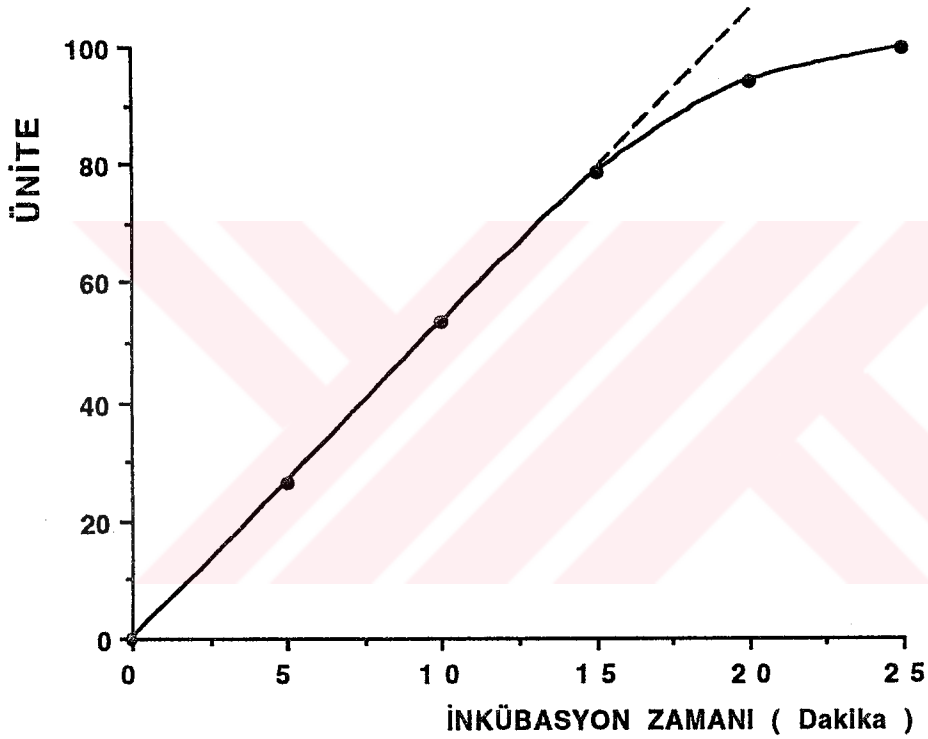
Saflaştırma Basamağı	Total enzim Aktivitesi*	Total Protein (mg)	Verim %	Spesifik Aktivite**	Saflaştırma (Misli)
Homojenat	12276.8	1896	100	6.47	-
Homojenat süpernatantı	11829	1566	96.35	7.55	1.16
60°C' de ısıtma	11774.49	714.95	95.9	16.46	2.54
Aseton ekstraksiyonu	9855.3	150.3	80.27	65.57	10.13
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile çöktürme	7902.72	109.44	64.37	72.21	11.16
Sefadex G-200 jel filtrasyon	598.68	5.01	4.87	119.49	18.46

\* Total enzim aktivitesi:  $\mu\text{mol üre x saat x total hacim}$

\*\* Ünite:  $\frac{\text{Total enzim aktivitesi}}{\text{Total protein}}$ ; Spesifik aktivite

### 3.3.2.1. İnkübasyon Zamanının Tespiti

Enzimatik reaksiyon için gerekli olan inkübasyon zamanını tespit etmek amacı ile kısmen saflaştırılan enzim, 37°C'de ve değişik zaman aralıklarında inkübasyona tabii tutulmuştur. Şekil 68'de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış 15. dakikaya kadar doğrusal olup, 15. dakikadan sonra doğrusallıktan sapmaktadır. Bu nedenle oluşan rengin spektrofotometrede okunabilmesi için optimal bir inkübasyon süresi gereklidir ki bu süre saflaştırdığımız enzim için 13 dakika olarak tespit edilmiştir.

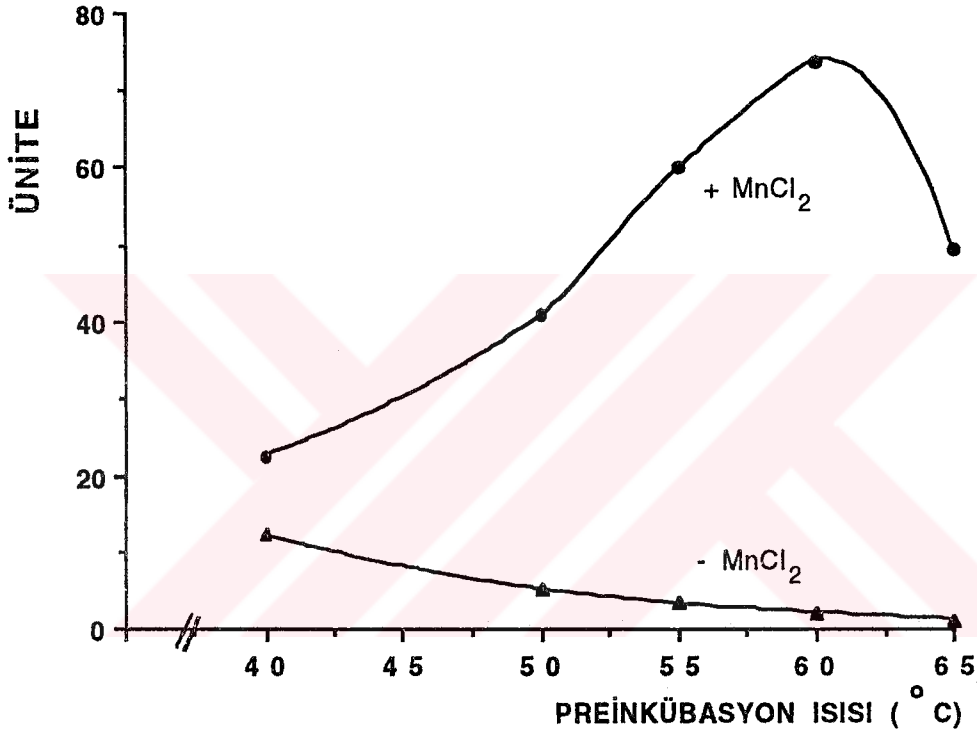


Şekil 68: Sığır Rumen Dokusundan Kısmen Saflaştırılan Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

### 3.3.2.2. Preinkübasyon Isısının Saptanması

Kısmen saflaştırılan rumen doku arginazı için en uygun preinkübasyon ısısını tespit etmek ve preinkübasyon ısısının enzim aktivitesine etkisinin,  $Mn^{++}$  katyonlarına bağlı olup olmadığını araştırmak için; 40-65°C'lik preinkübasyon ısılarıyla beraber  $Mn^{++}$  iyonlarının varlığında ve yokluğunda

enzim aktivitesi ölçülmüştür. Şekil 69'da görüldüğü üzere maksimum enzim aktivasyonu  $MnCl_2$  varlığında ve  $60^{\circ}C$ 'de meydana gelmektedir. Preinkübasyon  $MnCl_2$ 'süz yapıldığında; ısı arttıkça enzim aktivitesi düşerken,  $MnCl_2$  varlığında; enzim aktivitesi,  $60^{\circ}C$ 'ye kadar artmakta,  $60^{\circ}C$ 'den itibaren düşüş göstermektedir.  $60^{\circ}C$ 'lik preinkübasyon ısı ve  $Mn^{++}$  iyonları enzim aktivitesini yaklaşık 37 misli arttırmıştır.

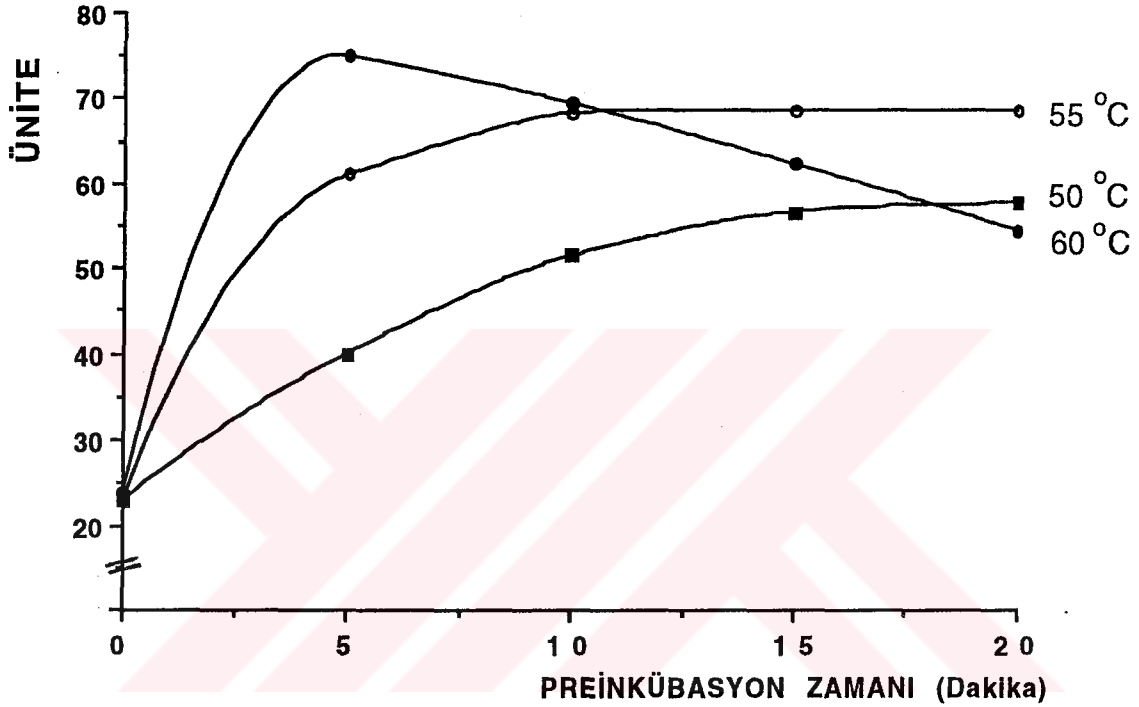


Şekil 69: Preinkübasyon Isısının Kısmen Safılaştırılmış Rumen Doku Arginaz Aktivitesine Etkisi.

### 3.3.2.3. Preinkübasyon Zamanının Tespiti

Kısmen safılaştırılan enzim  $50,55,60^{\circ}C$ 'lik preinkübasyon ısılarında ve değişik sürelerde preinkübasyona tabi tutulduğunda görülmüştür ki;  $50^{\circ}C$ 'de 15. dakikaya kadar enzim aktivitesi artmakta 15. dakikadan itibaren aktivite değişmemektedir.  $55^{\circ}C$ 'de 10. dakikaya kadar enzim aktivitesi artmakta, 10. dakikadan itibaren aktivite sabit kalmaktadır. Enzim aktivitesi,  $60^{\circ}C$ 'de 5. dakikaya kadar artmakta, 5. dakikadan itibaren

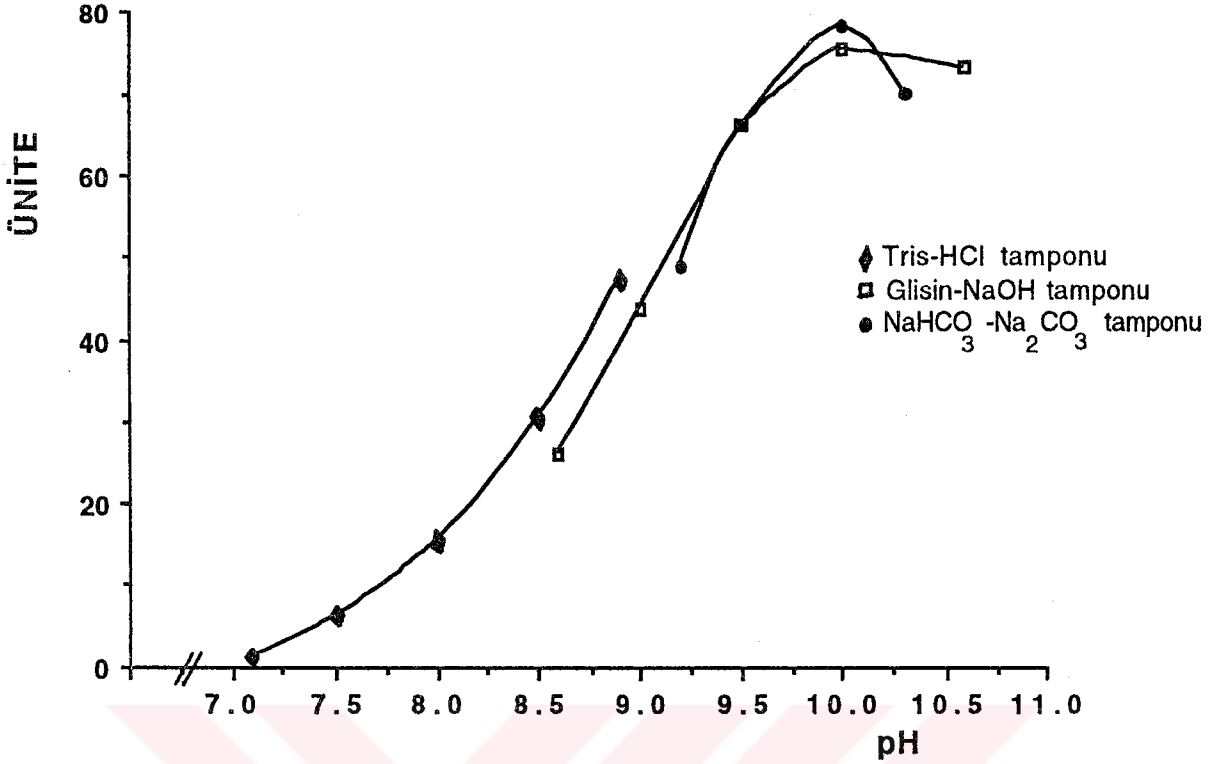
belirgin olarak düşmektedir. 60°C'de 5 dakika preinkübasyon enzim aktivitesini preinkübasyon uygulanmamışa oranla %200-225 arttırmaktadır (Şekil 70). Elde edilen veriler neticesinde, saflaştırdığımız rumen doku arginazı için en uygun preinkübasyon süresinin 5 dakika olduğu tespit edildi.



**Şekil 70:** Preinkübasyon Süresine Bağlı Olarak, Kısmen Saflaştırılmış Sığır Rumen Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişiklikler.

#### 3.3.2.4. pH'nın Etkisi

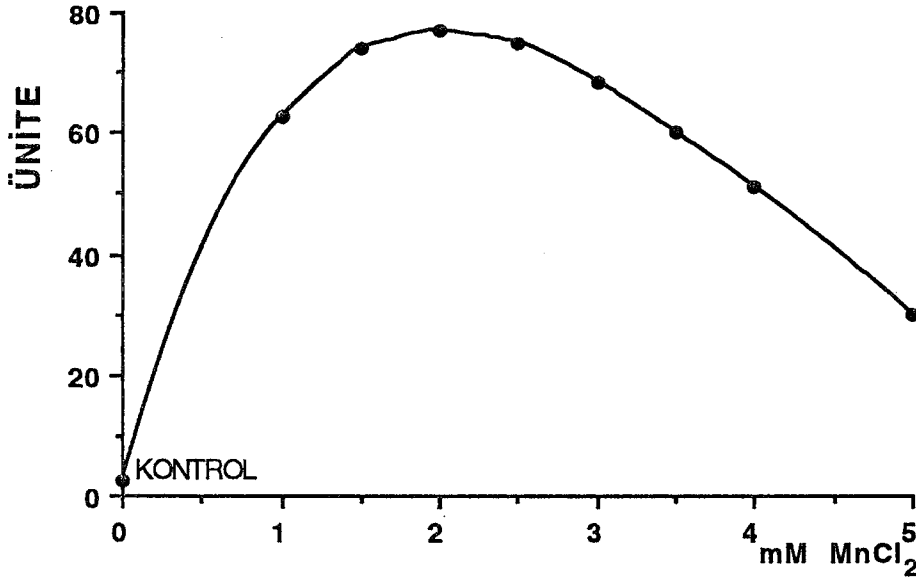
Kısmen saflaştırılan sığır rumen doku arginazının, değişik pH'larda ve çeşitli tamponlar kullanılarak aktiviteleri saptanmış ve pH profili çıkarılmıştır. Bu tampon sistemleri; Tris-HCl (pH: 7.1-8.9), Glisin-NaOH (pH: 8.6-10.6),  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$  (pH: 9.2-10.4) tamponlarıdır. Şekil 71'de görüldüğü üzere enzim en yüksek aktiviteyi pH: 10'da vermiştir. Bu nedenle maksimal aktivite alabilmek için pH:10  $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$  tampon sistemi kullanılmıştır.



Şekil 71: Kısmen Saflaştırılan Sığır Rumen Doku Arginazının Optimal pH'sinin Saptanması.

### 3.3.2.5. MnCl<sub>2</sub>'ün etkisi

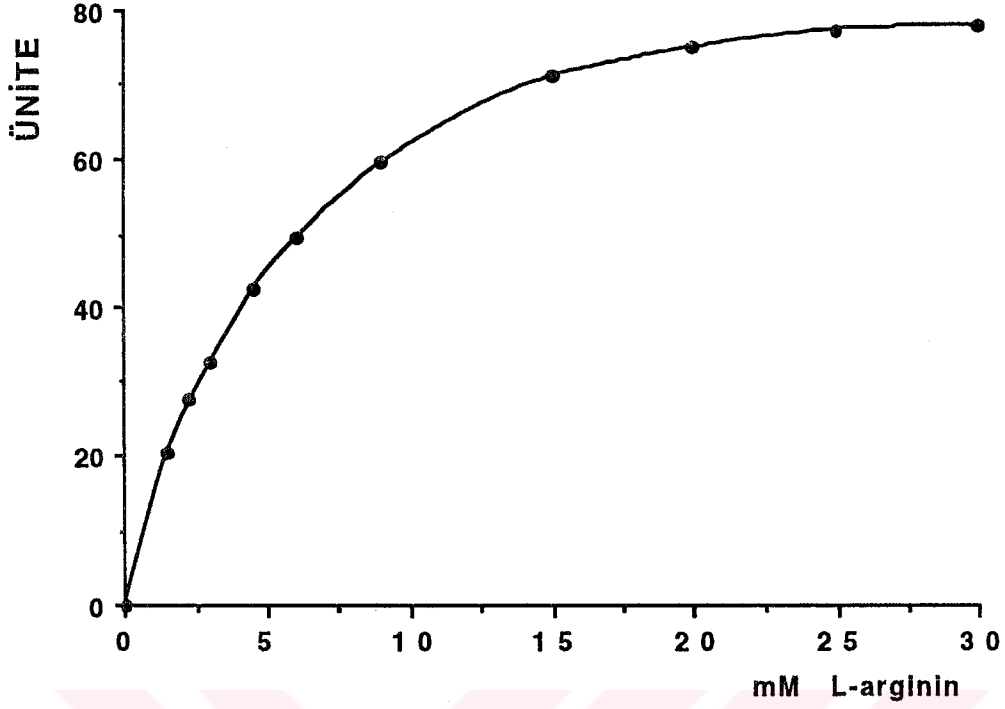
Preinkübasyon ortamına 0-5 mM konsantrasyonlarda MnCl<sub>2</sub> ilave edilmiş ve uygun MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonu tespit edilmiştir. Enzim en yüksek aktiviteyi 2mM'lık MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda göstermiştir (Şekil 72). Mn<sup>++</sup> kationlarının konsantrasyonu 2 mM'ı aştığı zaman enzim aktivitesi belirgin olarak düşmeye başlamaktadır. Şekil 72'de görüldüğü gibi MnCl<sub>2</sub> ile yapılan preinkübasyon MnCl<sub>2</sub>'süz preinkübasyon uygulananana (KONTROL) oranla arginaz aktivitesini 38 misli artırmaktadır.



**Şekil 72:** Kısmen Saflaştırılan Sığır Rumen Dokusu Arginazı Üzerine MnCl<sub>2</sub>'ün Değişik Konsantrasyonlarının Etkisi.

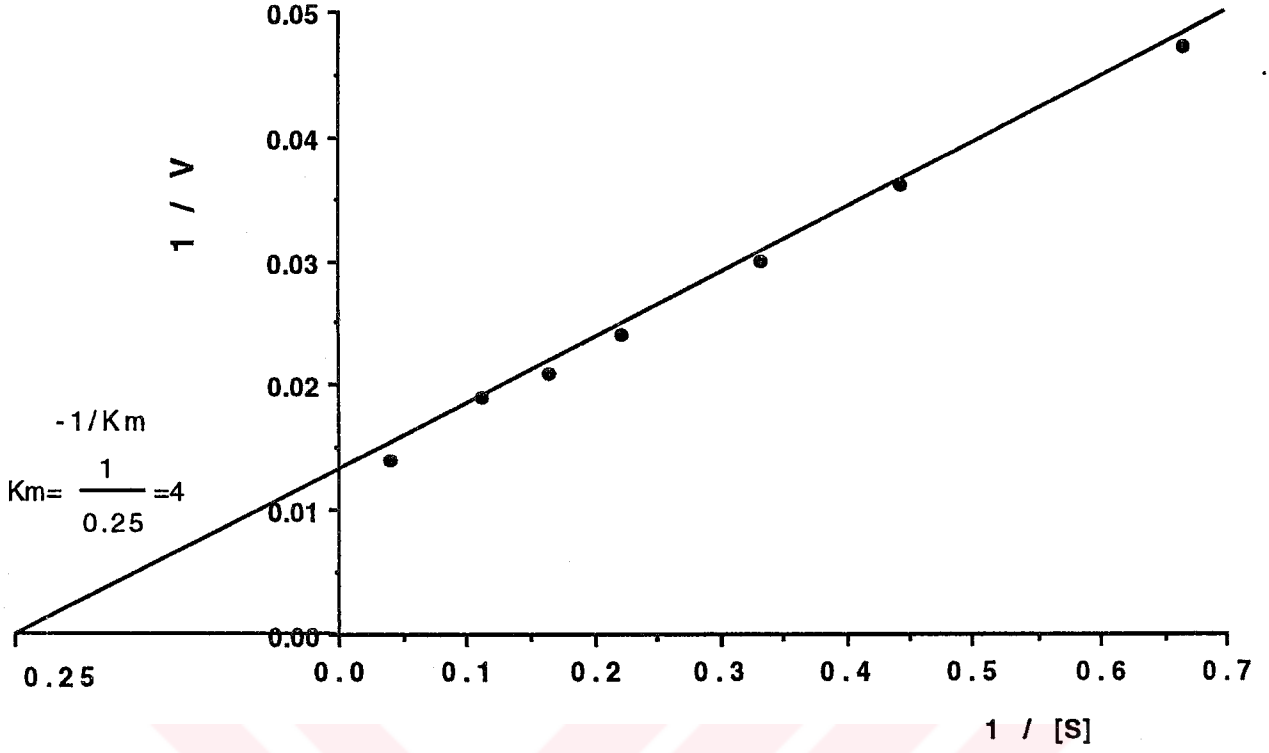
### 3.3.2.6. Kısmen Saflaştırılmış Rumen Doku Arginazının L-arginine Karşı Olan Km'i

Kısmen saflaştırılan enzimin aktivitesinin, enzimin doğal substratı olan L-argininin değişik konsantrasyonlarına bağlı olarak değişimi, Michaelis-Menten yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 73'den de anlaşıldığı gibi enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu artırıldığında enzimatik reaksiyonun hızı artmaktadır. Aktivitede, 2.5mM L-arginin konsantrasyonuna kadar olan doğrusal artış (First Order Kinetic), bu konsantrasyondan itibaren doğrusallığını kaybedip, hiperbolik bir hale dönüşmektedir. Substrat konsantrasyonu 20 mM'a ulaştığı zaman, enzimin aktivitesi maksimum düzeye ulaşmış ve bundan sonra enzimatik aktivitedeki değişim sıfır merteye kinetiği (Zero Order Kinetic) görünümünü almıştır. Yani L-arginin konsantrasyonunun artması enzimatik reaksiyonun hızını arttırmamaktadır.

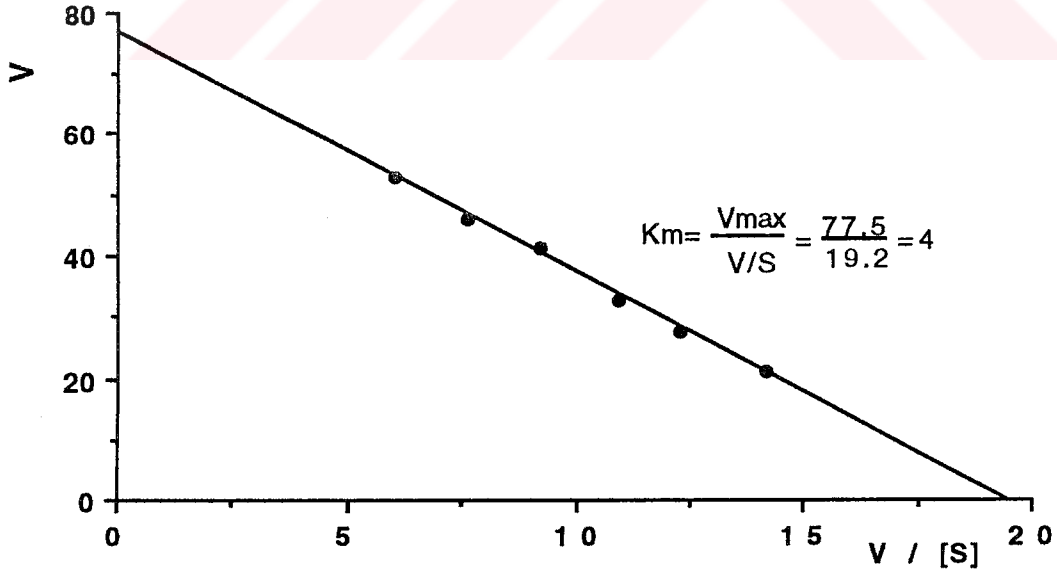


**Şekil 73:** Kısmen Saflaştırılmış Rumen Doku Arginaz Aktivitesinde L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimler.

Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Eadie-Hofstee ve Lineweaver-Burk eğrileriyle de değerlendirilmiştir (Şekil 74, 75) . Bütün değerlendirmeler sonunda görülmüştür ki saflaştırılmış sığır rumen doku arginazının, substratı L- arginine karşı olan  $K_m$ 'i 4mM'dır.



Şekil 74: Kısmen Safılaştırılmış Sığır Rumen Doku Arginazının, L-arginine Karşı Olan  $K_m$ 'nin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.



Şekil 75: Kısmen Safılaştırılmış Sığır Rumen Doku Arginazının, L-arginine Karşı Olan  $K_m$ 'nin Eadie-Hofstee Eğrisi ile Saptanması.

#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Rumen dokusu postmortem olarak alınarak, bu dokudaki arginazın bazı biyokimyasal koşulları ve kinetik özellikleri, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra optimize edilmiş ve sonuçta elde edilen bulgular tartışılmıştır.

Enzimin saflaştırılması; tamponda homojenizasyon, ısıtma, aseton ile muamele, amonyum sülfat ile çöktürme, tampona karşı diyaliz, değişik süre ve devirlerde santrifügasyonlar, Sefadeks G-200 jel filtrasyon işlemlerini içermektedir. Sığır rumen doku arginazı sırası ile; homojenat süpernatantında 1.16, 60°C'de ısıtmada 2.54, Aseton ekstraksiyonunda 10.13, amonyum sülfat ile çöktürme basamağında 11.16, Sefadeks G-200 jel filtrasyonda ise 18.46 misli saflaştırıldı. Bu aşamalar sonucunda sığır rumen doku arginazı %4.87 verimle 18.46 misli saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 119.49 ünite olan kısmen saf arginaz elde edildi (Tablo 4).

Enzimin homojenizasyonu sırasında 2-merkaptoetanol ve  $MnCl_2$  içeren 0.01M'lık Tris-HCl tamponu ile (pH:7.5) hazırlanmış homojenizasyon çözeltisi kullanılmıştır. 2-merkaptoetanol (5,30),  $MnCl_2$  ve nötrale yakın pH (30) enzim aktivitesinin kaybını önler. Homojenat süpernatantının 60°C'de 20 dakika tutulması arginaz dışındaki istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması amacı ile yapılmıştır.

Ozan ve ark. (50), *M.expansa* arginazını; yukarıdaki benzer saflaştırma basamaklarından, sefadeks G-200 jel filtrasyonu kullanmayıp bunun yerine liyofilizasyonu kullanarak %41.2'lik bir verimle 19 kat saflaştırmışlar ve spesifik aktiviteyi 25.16 ünite olarak bulmuşlardır.

Ikemato ve ark. (28), saflaştırılmış enzimin fazla miktarını elde etmek için daha etkili bir metot geliştirmiş, hidrofobik kromatografi ve immunoaffinite kromatografi metodlarını içeren, saflaştırma basamakları ile insan eritrosit arginazını %17 verimle (spesifik aktivitesi 204 ünite

olan) 176000 kat saflaştırıp, 2.1 litre hemolizattan 0.7 mg homojen arginaz proteini elde etmişlerdir.

Yine başka araştırmacılar (64), rat böbrek arginazının izoenzimlerini izole etmek ve bu formların hücre içi yerleşimini, immunolojik özelliklerini ve molekül ağırlığını tespit etmek amacı ile saflaştırma yapmışlardır. Rat böbrek arginazının A<sub>1</sub> ve A<sub>4</sub> formları; ekstrakt, 60°C'de 2 dakika ısıtma, metanol ile presipitasyon, amonyum sülfatla doyurma (%45-65) basamaklarıyla %52.5 verimle 34 kat saflaştırılmıştır. Bu 4 basamaktan sonra, A<sub>1</sub> formunu; DEAE -sellüloz kromatografi, CM-sellüloz kromatografi, sefaroz-lizin kromatografi basamaklarını takiben yaklaşık 300 kat saflaştırırken, A<sub>4</sub> formunu; DEAE-sellüloz kromatografi, amonyum sülfat ile doyurma (%45-75), tekrar DEAE-sellüloz kromatografi, sefadeks G-150 jel filtrasyon, sefaroz-lizin kromatografi işlemleri ile 11744 misli saflaştırmayı başarmışlardır .

Sunulan çalışmada, sığır rumen doku arginazının, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra bazı optimal şartları belirlenmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Arginazın aktivasyonu için iki temel faktör gereklidir. Bu faktörler; preinkübasyon ile enzimin kofaktörü olarak kabul edilen Mn<sup>++</sup> katyonlarıdır.

Rumen doku arginazının optimal preinkübasyon ısısı saflaştırılmadan önce (Şekil 6) ve saflaştırıldıktan sonra (Şekil 69) 60°C olarak bulunmuştur.

Daha önce birçok dokuda çalışılan arginazların optimal preinkübasyon ısıları 50-55°C civarında bulunmuştur. Preinkübasyon ısısı olarak sıçan karaciğeri (62), insan tükürüğü (33), tiroid dokusu (29), uterusu (22), eritrositi (22,15,40), serum (19) arginazı için 55°C, yine lösemili insanların saflaştırılmış lenfosit ve granülositleri (59), saflaştırılmış M.expansa (50) ve rat memesi (30) arginazı için 55°C bulunmuştur. İnsan ve

koyun vitreus arginazı için optimal preinkübasyon ısısı ise 40°C olarak saptanmıştır (21).

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimum ısıya 40-50°C'ler arasında erişir, bu derecelerin üstünde enzimlerin ısıya bağlı olarak denatüre olma hızı, enzimin reaksiyon hızı artışından daha süratli olduğu için enzim aktivitesi azalmaktadır. Gerek Şekil 6, gerekse Şekil 69'da görüldüğü gibi  $Mn^{++}$  varlığında 60°C 'ye kadar enzim aktivitesi artmakta 60°C'den itibaren aktivite düşmektedir. Yukarıdaki araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalara bakarak diyebiliriz ki; sığır rumen doku arginazının preinkübasyon ısısının diğer arginazlardan yüksek olması, rumen doku arginazının diğer arginazlardan ısıya karşı daha stabil olduğunu göstermektedir.

Preinkübasyon ısısının  $Mn^{++}$  katyonları ile ilgisi araştırılmış ve  $Mn^{++}$  katyonlarının preinkübasyon için gerekli olduğu saptanmıştır. Şekil 6 ve Şekil 69'da görüldüğü gibi preinkübasyon ortamına  $MnCl_2$  ilavesi ve 60°C'lik preinkübasyon; saflaştırılmadan önce arginaz aktivitesini 10 misli artırırken, saflaştırıldıktan sonra aktiviteyi yaklaşık 37 misli artırmaktadır.

Saflaştırma safhaları esnasında, örneğin jel filtrasyon ve diyalizle metal iyonlarının bir kısmı kaybolur (28). Bu nedenle saflaştırılmış enzimin aktivitesinin  $MnCl_2$  yokluğunda ve preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişim grafiği (Şekil 69) yukarıda bahsettiğimiz saflaştırma basamakları esnasında ortamdaki  $Mn^{++}$  iyonlarının tamamen uzaklaştırılması nedeniyle saflaştırılmamış enzimin grafiğinden (Şekil 6) tamamen farklıdır.

$MnCl_2$  yokluğunda preinkübasyon ısısına bağlı olarak enzim aktivitesinin değişimine bakacak olursak saflaştırılmış enzimin aktivitesinin 40°C'den itibaren giderek azalmakta 65°C'de tamamen sıfır

olduğunu görmekteyiz (Şekil 69). Saflaştırılmamış enzimin aktivitesinin,  $MnCl_2$  yokluğunda ve preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişim grafiği,  $MnCl_2$  varlığındakine paralellik göstermektedir (Şekil 6). Bu da sığır rumen dokusunun çok düşük derişimlerde  $Mn^{++}$  katyonu ihtiva ettiğinin göstergesidir. Şekil 69 incelendiğinde bir yorum daha ortaya çıkarki bu;  $Mn^{++}$  iyonlarının preinkübasyon ortamına ilavesi arginazı hem ısıya dayanıklı hale getirmekte hemde enzimi aktive etmektedir.

Preinkübasyon ortamına ilave edilen  $Mn^{++}$  iyonlarının enzim-substrat arasında bir metal köprü kurduğu ve Enzim-Mn-Arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiği bildirilmektedir (21,29).  $Mn^{++}$  iyonları varlığında  $60^{\circ}C$ 'de preinkübasyon aktiviteyi 10 misli artırmaktadır (Şekil 6),  $Mn^{++}$  iyonları aynı molariteyi sağlamak üzere, inkübasyon ortamına ilave edildiğinde aktivitedeki artış 4.5 misli dolaylarında olmaktadır (Tablo 2).

Tüm bu verilerimize ve diğer literatürlere (12,22,35,45,70,79) dayanarak diyebilirizki  $Mn^{++}$  iyonları preinkübasyon için gereklidir ve Mn ilavesi tüm dokulardaki arginazlar gibi rumen doku arginazını da daha dayanıklı hale getirir ve aktive eder.

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan ve genellikle metal iyonlarından meydana gelen yan gruplarına kofaktör denir. Bir metaloenzim olan arginazın, vazgeçilmez kofaktörü iki değerlikli Mn'dır. Arginazın tam aktivite gösterebilmesi, subunitlerine dissosiye olmaması ve quaterner yapısının şekillenmesi için her subünitinin bir mol  $Mn^{++}$  içermesi gerekir (26,45,54). Bu amaçla rumen doku arginazı için uygun  $Mn^{++}$  konsantrasyonu tespiti yapılmıştır.

Şekil 9'da görüldüğü üzere, rumen doku arginazı saflaştırılmadan önce en yüksek aktiviteyi 1mM  $MnCl_2$  konsantrasyonunda vermektedir. Saflaştırıldıktan sonra ise en yüksek aktivitenin alındığı  $MnCl_2$

konsantrasyonu 2mM'dır ve 2mM'ı aşan  $MnCl_2$  konsantrasyonlarında enzim aktivitesi belirgin olarak düşmektedir (Şekil 72). Saflaştırma işleminden sonra aktivite için ihtiyaç duyulan  $MnCl_2$  konsantrasyonunun artmasının sebebi; daha önce belirttiğimiz gibi jel filtrasyon ve diyaliz aşamalarında metal iyonlarının ortamdaki uzaklaşmasıdır.

Bazı dokular için tespit edilen  $Mn^{++}$  konsantrasyonlarına baktığımızda; insan karaciğeri, eritrositi (22) ve tiroid dokusu (29) 2.5mM, tükürüğü 5mM (28), uterusu 0.8mM (22), karaciğeri 2mM (54), serumu 50mM (19), koyun gözü vitreusu 5mM (21), fare makrofaj arginazı için ise 1.25mM'dır (12). Saflaştırılmış, lösemili insan lenfosit ve granulositi için 0.01M (59), *M.expansa* için 0.5mM (50) ve insan karaciğer arginazı için 2mM'dır (5). Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta manganın arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal mangan derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir.

Çalışmanın diğer bir bölümünde, farklı preinkübasyon ısılarında değişik sürelerde, preinkübasyon yapılarak; maksimum ürün almak için gereken preinkübasyon zamanı tespit edildi. Şekil 7 ve 70'de görüldüğü gibi enzim 50,55,60,65°C'lik ısılarda preinkübe edildiğinde; gerek saflaştırılmadan önce gerekse saflaştırıldıktan sonra en yüksek aktiviteyi 60°C'de vermekte fakat preinkübasyon süresi değişmektedir. Saflaştırılmadan önce en yüksek aktiviteyi 10 dakikada verirken, saflaştırıldıktan sonra 5 dakikada vermektedir. Bunun nedeni; saflaştırma esnasında protein miktarının giderek azalması ve bu nedenle preinkübasyonda uygulanan ısının, diğer proteinler tarafından maskelenmeyip, direk arginaz proteini tarafından alınması olabilir. 60°C'de 10 dakika preinkübe edilmiş enzim,  $Mn^{++}$  ilave edilmiş fakat preinkübasyon uygulanmamış enzimden, %30 oranında daha fazla aktivite artışı göstermektedir (Şekil 7), fakat saflaştırılmış enzim (Şekil 70)

60°C'de 5 dakika preinkübe edilirse aktivitesi %200-225 artış göstermektedir. Bu verilere dayanarak diyebiliriz ki; enzim saflaştırıldıktan sonra, saflaştırılmamışa oranla daha kısa bir preinkübasyon süresi ile daha fazla aktive olabilmektedir.

Schimke (62), sıçan karaciğer arginaz aktivitesinin, 0.05M  $MnCl_2$  varlığında 55°C'de 5 dakika preinkübasyonla %110 arttığını bulmuştur, Colombo ve Konarska (15), 5mM  $MnCl_2$  varlığında ve 55°C'de 20 dakika preinkübasyonla, eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, aynı şartlarda insan tükürüğünde preinkübasyon sonrası ortalama aktivitenin, preinkübasyon uygulanmamıştan 3 kez daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (33). Ozan ve Gülen (47), sığır tükürük, tükürük bezi, karaciğer ve eritrosit arginazlarının 53°C'de 18 dakika preinkübasyonu ve  $Mn^{++}$  katyonları varlığında aktivasyon düzeylerini karşılaştırarak tükürük arginazının %130, karaciğer ve tükürük bezlerindeki arginazın %150-180 dolaylarında aktivasyona uğradığını, eritrosit arginazının ise preinkübasyondan etkilenmediğini saptamışlardır.

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında cereyan ettiğinden inkübasyon ısı 37°C olarak alınıp reaksiyon için gerekli inkübasyon zamanını tespit etmek amacı ile 0-5-10-15-20-25 dakikalar arasında enzim inkübasyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen veriler grafiğe uygulandığında, Şekil 5 ve Şekil 68 den de anlaşıldığı gibi enzim aktivitesi 15. dakikaya kadar lineer bir artış göstermekte, bu dakikadan sonra lineerlikten sapmaktadır. Enzimin saflaştırmadan önceki ve saflaştırıldıktan sonraki inkübasyon zamanı grafiği Şekil 5 ve 68'de görüldüğü gibi birbirinin aynıdır. 15. dakikadan sonra lineeritenin bozulması dikkate alınarak inkübasyon süresi rumen arginazı için 13 dakika olarak alınıp ünite tarifi saate göre yapılmıştır.

İnkübasyon süresine göre ünite tanımı yapıldığından, araştırmacılar bu konuda farklı süreler kullanmış ve aktiviteyi buna göre tanımlamışlardır. Tiroid doku arginazı için bu süre 30 dakika (29), karaciğer için 20 dakika (22), eritrosit için 8 dakika (22,69), uterus için 20 dakika (22), vitreus için 9 dakika (21) olarak alınmıştır.

Çalışmada enzimin aktivitesi üzerine farklı pH'ların ve tamponların etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Tris-HCl, Glisin-NaOH ve  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tampon sistemleri kullanılmıştır. Gerek saflaştırıldıktan sonra (Şekil 71) gerekse saflaştırılmadan önce (Şekil 8) enzim en yüksek aktiviteyi Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponunda verdiği için bu tampon sistemi rumen doku arginazı için en uygun tampon olarak alınmış ve tüm çalışmalarımızda bu tampon kullanılmıştır. Enzim saflaştırılmadan önce en yüksek aktiviteyi 9.7 pH'da (Şekil 8), saflaştırıldıktan sonra ise 10 pH'da (Şekil 71) vermektedir.

Arginazın optimal pH'sı birçok doku türünde çalışılmış ve argininin arginaz ile hidrolizi için gerekli optimal pH'nın doku türüne göre değiştiği ve bu pH'nın 9.3-11 arasındaki bazı pH sınırları içinde olduğu bildirilmektedir (5,12,15,33,35,46,62,70,79).

Arginaz enzimi ölçümünde araştırmacılar farklı tampon sistemleri kullanmışlardır. Spector ve ark. (70), Tris-HCl tampon sistemini kullanmış, insan yetişkin ve fetal, karaciğer ve böbrek arginazının optimum pH'sını 9.5-11 arasında, gastrointestinal yol ve böbreğinkini ise 9.5 olarak bulmuş, pH:7.4'de aktivitenin %10-30 arasında düşük bulunabileceğini belirtmişlerdir. Colombo ve Konarska (15), hem karaciğer hemde eritrosit için karbonat tamponu (pH:9.5), Gopalakrishna ve Nagarajan (19), insan serum arginazı için bikarbonat-karbonat tampon sistemi (pH:10.5) kullanmışlardır. Van Elsen ve Leroy (79), Glisin-NaOH tamponu kullanarak optimum pH'ı fibroblast, böbrek ve eritrosit için 9.7, karaciğer için ise

10 olarak bulmuşlardır. Berüter ve ark. (5), saflaştırılmış insan karaciğer arginazı için Glisin-NaOH tamponunu kullanmış, optimum pH'ı 9.3 olarak bulmuşlardır. Ozan ve ark. (50), saflaştırılmış *M.expansa* arginazı için en uygun tamponun bikarbonat-karbonat tamponu (pH:9.5) olduğunu tespit etmişlerdir.

Şekil 8 ve 71'de de görüldüğü gibi rumen doku arginazı da bazik pH'da optimum aktivite vermekte ve diğer doku arginazları için belirlenmiş olan pH değerleri ile uyum göstermektedir. Deneyler esnasında tampon ve substratın pH'sı bulduğumuz pH'ya ayarlanarak kullanılmıştır.

Enzim üzerine metal iyonlarının etkisi araştırıldığında enzimin maksimum aktiviteyi  $Mn^{++}$  iyonlarının varlığında verdiği bulunmuştur (Tablo 2). Rumen doku arginazını aktive eden metal iyonlarını ve aktivasyon yüzdelerini sırası ile verecek olursak;  $Mn^{++}$  (%963) >  $Ni^{++}$  (%466) >  $Cd^{++}$  (%270) >  $Co^{++}$  (%99) 'dır.  $Li^{+}$  'un (%9) enzim aktivitesi üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur.  $Hg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Sn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Pb^{++}$  iyonları hemen hemen bütün aktiviteyi engellemektedir.  $Al^{+++}$  (%33),  $Mg^{++}$  (%29),  $Ba^{++}$  (%49),  $K^{+}$  (%51) 'un inhibisyon etkileri,  $V^{+5}$  (%54),  $Cr^{+6}$  (%63),  $Ca^{++}$  (%64) 'a oranla düşüktür (Tablo 2).

Diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalara bakacak olursak, dokuya göre metal iyonlarının aktivatör veya inhibitör etkilerinin değiştiğini görürüz. Spector ve ark. (70), insan yetişkin ve fetal; karaciğer, eritrosit, böbrek, gastrointestinal kanal ve beyin dokularında yaptıkları çalışmada,  $Mn^{++}$  >  $Co^{++}$  >  $Mg^{++}$  iyonlarının enzimi aktive ettiğini göstererek,  $Ca^{++}$  iyonlarının arginaz aktivitesi üzerine etkisini önemsiz bulmuşlardır. Fare makrofaj arginazının metal iyonları tarafından aktivasyonu sıralanacak olursa;  $Mn^{++}$  >  $Co^{++}$  >  $Ni^{++}$  >  $Zn^{++}$  >  $Fe^{++}$  >  $Na^{+}$  veya  $K^{+}$  'dur (12). Tiroid doku arginazını  $Mn^{++}$  >  $Ni^{++}$  >  $V^{+5}$  >  $Mg^{++}$  >  $Co^{++}$  >  $Cd^{++}$  >  $Ca^{++}$  'un aktive ettiği,  $Ag^{+}$  >  $Hg^{++}$  'nın ise inhibe ettiği bulunmuştur (29).

Rumen doku arginazının, L-arginine karşı olan  $K_m$ 'ini araştırmak

amacı ile enzim miktarı sabit tutulup, L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra, enzimin aktivitesi; 2.5mM L-arginin konsantrasyonuna kadar lineer artış göstermekte, bu noktadan sonra hiperbolik bir görünüm almakta ve 20mM L-arginin konsantrasyonundan itibaren reaksiyon sabit hızla devam etmektedir. Bu eğri tipik bir Michaelis-Menten eğrisidir. Burada maksimum aktivitenin yarısına tekabül eden substrat konsantrasyonu, Km'i yani enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. Michaelis-Menten (Şekil 10, 73), Lineweaver-Burk (Şekil 11, 74), Eadie-Hofstee (Şekil 12, 75) eğrileri ile Km araştırıldığında Km'nin 4mM civarında olduğu saptanmıştır. Enzimin, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra substratına olan ilgisi değişmemiştir.

Rumen dokusunun kinetiği ile ilgili literatür bulamadığımızdan karşılaştırma yapamamaktayız. Ancak farklı dokulardaki arginazların, saflaştırıldıktan sonra Km'inin değişmediğini gösteren literatür bilgileri mevcuttur. Mesela; İnsan karaciğer arginazının saflaştırılmadan önceki Km'i 10,14mM (70), saflaştırıldıktan sonraki Km'i yine 10.5mM'dır (5). İnsan eritrosit arginazının saflaştırılmadan önce L-arginine karşı olan Km'i 1.5mM (69), saflaştırıldıktan sonraki Km'i 1.6mM'dır (28).

Çalışmanın diğer bir bölümünde arginine yapısal benzerlik gösteren bazı guanidino bileşiklerinin arginaz üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla guanidino bileşikleri olan agmatin, kanavanin ve guanidin'in konsantrasyonları değiştirilerek arginaz üzerine etkileri incelendi. Şekil 13,14,15'den anlaşıldığı gibi her üç guanidino bileşide rumen doku arginazını inhibe etmektedir. Çünkü bu bileşiklerin konsantrasyonları arttıkça arginaz aktivitesi düşmektedir. Diğer önemli bir nokta ise kanavanin'in 0.35mM'dan itibaren (Şekil 13), guanidin'in ise 12mM'dan itibaren (Şekil 15) enzim aktivitesini %100 engellemesidir. Bu üç bileşinin hangi tip inhibisyona neden olduğu Michaelis-Menten kinetiği ile

incelendiğinde; agmatin, kanavanin ve guanidin varlığının, rumen doku arginazının, L-arginine olan  $K_m$ 'ini değiştirmediği, fakat  $V_{max}$ 'ının azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (şekil 16,17,18). Lineweaver-Burk (şekil 19,21,23) ve Eadie-Hofstee (şekil 20,22,24) eğrilerinden de anlaşıldığı gibi bu üç bileşik enzimin nonkompetitif inhibisyonuna sebep olmaktadır ve arginin konsantrasyonunun artması inhibisyonu engelleyememektedir.

İnhibitör özelliği gösteren bu guanidino bileşikleri ile arginin molekülü arasında yapısal benzerlik bulunduğundan bu bileşiklerin enzimin aktif merkezi dışında bir yere bağlanıp, enzimin üç boyutlu yapısını bozarak inhibisyona neden olduğunu ileri sürebiliriz.

Bu konu ile ilgili diğer dokularda yapılan çalışmalar sınırlı olup, çalışmalar arasında farklılıklar mevcuttur. Berüter ve ark. (5), saflaştırılmış insan karaciğer arginazı için, substrat olarak L-arginin yerine L-kanavanini kullandığında,  $K_m$ 'in 10.5mM'dan 50mM'a çıktığını tespit etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada (28), arginin analogu olan kanavaninin, saflaştırılmış insan eritrosit arginazını, nonkompetitif olarak inhibe ettiği bulunmuştur. İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus dokularında yapılan bir çalışmada (22), kanavaninin arginin yerine substrat olarak kullanılamayacağı ve kanavaninin karaciğer enzimini kompetitif inhibe ederken, eritrosit ve uterus arginazlarını etkilemediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada insan karaciğer, eritrosit ve uterus arginazı üzerine agmatinin herhangi bir etkisine rastlanamamıştır.

p-CMBA ve NEM'in rumen doku arginazına etkisi incelenmiştir. p-CMBA ve NEM, enzimlerin aktif merkezinde, -SH grubu içeren aminoasitlerin olup olmadığını belirlemek için kullanılan kimyasal maddeler olup, bu maddeler -SH gruplarını bloke ederek enzimin inhibisyonuna neden olmaktadır. Enzim p-CMBA ve NEM ile preinkübasyona tabi tutulduğunda; p-CMBA'in 7.5mM civarında %71 oranında (şekil 25), NEM'in ise 75mM civarında %76 oranında

(Şekil 29) inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Bu konu ile ilgili diğer çalışmalara baktığımızda; Ber ve ark. (3), rat karaciğer arginazının p-CMBA ve NEM'den etkilenmediğini belirtirken, Muszynska ve ark. (44) bu maddelerin acı bakla arginazı ve tavuk karaciğer arginazı üzerine inhibisyon etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. İnsan tiroid dokusunda bu iki kimyasal madde, arginaz enzimini nonkompetitif olarak inhibe ederken (29), insan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazı üzerine p-CMBA'in herhangi bir inhibisyon etkisine rastlanılmamıştır (22). Görüldüğü gibi bu iki kimyasal madde, genellikle nonüretelik dokular için inhibitör etki göstermektedir. Bu nedenle rumen arginazının bu iki inhibitör tarafından inhibisyonu nonüretelik dokularinkine benzerlik göstermektedir. Rumen doku arginazı p-CMBA (Şekil 26) ve NEM (Şekil 30) tarafından nonkompetitif olarak inhibe edilmektedir. Bu sonuçlar enzimin aktif merkezinde fonksiyonel -SH gruplarının varlığını ve katalitik faaliyetin başarılması için -SH gruplarının gerekli olduğunu göstermektedir.

L-amino asitlerden valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sistein, lizin, histidin, hidroksprolinin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. 30mM valin %84 (Şekil 33), 40mM lösin %77 (Şekil 37), 25mM izolösin %86 (Şekil 41), 30mM ornitin %70 (Şekil 45), 40mM prolin %49 (Şekil 49), 50mM sistein %72 (Şekil 53), 40mM lizin %58 (Şekil 57) inhibisyona sebep olmaktadır. Görüldüğü gibi rumen doku arginazının; izolösin, valin, lösin, sistein ve ornitin prolin ve lizine göre daha kuvvetli inhibitörleridir. Bu amino asitler nonkompetitif inhibisyona sebep olurken histidin ve hidroksprolinin rumen doku arginaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır.

Muszynska ve Wojtczak (45), amino asitleri ligand olarak kabul etmekte, arginaza bu ligandların bağlanmasının, arginazın konformasyonel değişimine sebep olduğunu ve bununla enzim-substrat kompleksinin turnover'ını bozduğunu belirtmektedir. Aynı çalışmada, sıçan karaciğer

arginazını L-amino asitlerden ornitin ve lizinin kompetitif, valin, lösin, izolösin ve sisteinin ise nonkompetitif tipte inhibisyona uğrattığı belirtilmiştir.

Valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, lizinin laktasyondaki rat meme bezi arginazını kompetitif olarak inhibe ettiği ve bu amino asitlerden ornitin, lizin, valinin meme bezi arginazını prolin, lösin, izolösinden daha kuvvetlice inhibisyona uğrattığı bulunmuştur (17).

Prolin pH 9.5'ta rat böbrek arginazı  $A_4$ 'ü kompetitif, karaciğer arginazı  $A_1$ 'i nonkompetitif inhibe etmiştir. pH 7.5'ta inhibisyon her iki enzim içinde nonkompetiftir. Lösin, izolösin, valin rat karaciğer arginazını kompetitif, böbrek arginazını nonkompetitif olarak inhibe etmektedir. Böbrek arginazı prolinle inhibisyona karaciğer enzimine göre çok daha fazla duyarlıdır. Karaciğer arginazıda lösin, izolösin ve valin gibi dallanmış zincirli amino asitlere böbrek arginazından daha duyarlıdır. Hidroksiprolin böbrek arginazı  $A_4$  'ü inhibe ederken karaciğer arginazı  $A_1$  üzerinde önemsiz bir etkiye sahiptir (10). Bu çalışmada hidroksiprolinin (Şekil 61) inhibitör etkisine rastlanamamıştır.

Rat karaciğer arginazının aktif merkezinde histidin amino asidi bulunmakta ve histidindeki imidazol grubunun, Mn-imidazol etkileşmesi ile enzimi aktif forma dönüştürdüğü bildirilmektedir (4). L-histidinin rumen doku arginazı üzerine herhangi bir etkisinin tespit edilememesi (Şekil 62) enzimin aktif merkezinde aktiviteden sorumlu histidil artığının bulunabileceğini düşündürmektedir.

Amino asitler konusunda yapılan çalışmanın diğerlerinden farkı, kullandığımız amino asitlerin daha yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermesi ve inhibitör etkisi olan bu amino asitlerin hepsinin, rumen doku arginazını nonkompetitif olarak inhibe etmesidir. Nonkompetitif inhibisyona sebep olan bu amino asitlerin, enzimin aktif merkezi dışında

bir bölgeye bağlanıp, enzimin konformasyonel değişimine sebep olarak inhibitör etki gösterdiği düşünülmektedir.

Arginazın arginini hidrolize etmesi sonucu oluşan ornitin, arginazi inhibe ederken, diğer ürün olan üre herhangi bir inhibitör etki göstermemektedir. Bir üre analogu olan tiyoürenin, rumen doku arginazının inhibitörü olduğu ve 4mM tiyoürenin enzim aktivitesini %38 inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 63). Tiyoüre, eritrosit (69) ve tiroid (29) arginazlarında olduğu gibi rumen doku arginazında nonkompetitif inhibe etmektedir (Şekil 64,65).

Fötal dönemde ve erken postnatal dönemde bağırsakta arginaz aktivitesi düşükken, süttten kesilme ile barsaktaki arginaz aktivitesi yetişkin seviyesine yükselir (34,58). Araştırmacılar bunu; alınan proteinlerin fötal ve erken postnatal yaşamda, vücutta fazla nitrojen depolanmasında (vücut proteinlerinin yapımında) kullanılmasına bağlarlar (58).

Laktasyonun başlangıç devresinde üre döngüsü enzim aktivitesi kısmi veya tamamen yoktur. Bu nedenle bağırsak glutamin sentetaz aktivitesi doğumdan 5-10 gün sonra maksimuma ulaşır, daha sonra yetişkin seviyesine düşer. Laktasyon ortasındaki bu artış sindirim sisteminde oluşan fazla amonyağın detoksifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu içindir. Çünkü perinatal hayatta glutaminin sentez ve salınmasında kaslar yetersizdir (58).

Vücut ağırlığına oranla fazla ağırlığa sahip olan mide ve bağırsak, amino asitlerin organlar arasındaki kullanımında ve amino asitlerin yemek sonrası katabolizmasında önemli rol oynar. Bu nedenle; Remesar ve ark. (58), ratların ince bağırsak bölümlerinde bulunan arginazın amino asit metabolizmasıyla ilgili olduğunu ve buradaki arginazın muhtemelen argininin tüketilmesi ve poliamin biyosentezinde rol aldığını ileri sürmüşlerdir. **Rat midesinde ölçülebilir düzeyde arginaz aktivitesi bulamayan Remesar ve ark. bunu bağırsak ile kıyaslayarak, midede**

amonyağın farklı yollarla kullanıldığını ileri sürmüşlerdir.

Ruminantlarda amonyağın büyük miktarları ruminal mikroorganizmalar tarafından üretilir ve bu amonyağın bir kısmı rumen mukozasından portal kana absorbe edilir ve karaciğerde üreye çevrilir. Bu nedenle amonyak detoksifikasyonu, nonruminantlardan ziyade ruminantlar için çok gereklidir (63).

Ruminal içerikte mevcut amonyak, portal kandakinden yaklaşık 60 kez fazladır. Amonyağın fazla diffüze olabilmesi ve portal kanda amonyağın kısmi olarak az miktarda oluşu göz önüne alınarak, ruminal mucozada amonyak kadar toksik bileşiklerin detoksifikasyonunun farklı mekanizmalarla oluştuğu söylenebilir (42).

Aminleri ve ark. (1), arginazın seviyesinin sindirim sisteminin muskuler ve epitelyal tabakaları arasında önemsiz farklılıklar gösterdiğini tespit etmiş ve rumen arginazının karaciğer ile kıyaslandığında amonyak detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamadığını, rumen doku epitelyumunda Glutamat dehidrogenaz, glutamin sentetaz ve transaminazlar gibi amonyak kullanan diğer enzimlerin bu mekanizmada etkili olabileceğini ve diğer ekstrahepatik dokular gibi rumenin de arginazı üre döngüsünden başka amaçlar için kullandığını ileri sürmüşlerdir.

Rumen homojenatında Kusen tarafından tanımlanan üre sentezi Yugoslav araştırmacılar tarafından tasdiklenememiştir (42). Rumen dokusunda Krebs-Henseleit üre döngüsü bulunmayıp, sadece döngünün iki enzimi olan Arginaz ve Ornitin transkarbamilaz bulunduğuna göre rumende bulunan bu enzimlerin; amonyağın detoksifikasyonundan ziyade nitrojenli bileşiklerin, rumen içeriği ile rumen veni arasında resirkülasyonundan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (24,36).

Konarska ve ark. (32), ince bağırsak, böbrek ve beyin dokularında arginaz enziminin varlığını üre sentezinden çok poliamin senteziyle ilişiklendirmişlerdir.

Ancak üre sentezi olmayan rumen gibi karaciğer dışındaki birçok dokuda ve üreotelik olmayan bazı canlılarda aktif arginaz enzimi bulunması, arginaz enziminin amonyağın detoksifikasyonu işlemi dışında da bazı görevleri olabileceği düşüncesini gündemde tutmaktadır (1,30,34,81).

Arginazın üre sentezi dışındaki işlevleri üzerinde yapılan çalışmalar, bu enzimin organizmada üre sentezi dışında iki önemli sentez yoluyla olan ilişkisini ortaya koymuştur. Arginazın etkisi ile oluşan ve nonprotein amino asit olan ornitin organizmada 3 önemli metabolik yolda kullanılabilir. Bunlardan birincisi üre döngüsü tarafından yeniden kullanılmasıdır. Döngünün en son aşamasında meydana gelen ornitin , karbamoil fosfat ile birleşerek döngüyü yeniden başlatmaktadır. Ornitinin ikinci bir kullanım yeri; hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması için gerekli olan poliaminlerin biyosentezidir. Bu sentez yolunun, ilk enzimi ornitin dekarboksilaz enzimi ornitini putresine dönüştürmektedir. Putresin ara kademelerden geçerek spermin ve spermidin gibi poliaminleri meydana getirmektedir. Poliaminler, kültüre edilmiş memeli ve bakteri hücreleri için büyüme faktörü olup, DNA, RNA biyosentezinin uyarılması ve DNA stabilizasyonu yanında hücre bütünlüğünün, subsellüler organellerin ve membranların stabilizasyonundan da sorumludur (1,10,32,58). Ornitinin bir diğer kullanım yeri ise prolin ve glutamat sentezidir. Kollagen ve kazein gibi bazı önemli proteinlerin yapısına katılan prolin ve hidroksprolin, transaminasyon reaksiyonları ile ornitinden sentez edilmektedir (30,81). Ornitinden oluşan glutamat ise amonyum iyonu transportu, enerji metabolizması, amino asitlerin birbirine çevriminde anahtar bir ara metabolittir (30).

Ruminantların ön midelerinde hiçbir sindirim fermenti salgılanmadığı halde sindirim olaylarının en önemli bölümü ön midelerde cereyan etmektedir. Bu nedenle yukarıda belirttiğimiz fonksiyonlar, fizyolojik olarak çok aktif rumen dokusu için gerekli olup diğer extrahepatik dokular gibi rumen doku arginazının önemide glutamat, prolin ve poliaminlerin

biyosentezi için gerekli öncül molekül olan ornitini üretmek olabilir.

Arginazın iki farklı gen lokusu tarafından kodlandığını (8,71) , ayrıca poliaminlerle ve protein sentezi ile ilişkisini göz önünde tutarak, bugün sahip olduğumuz bilgiler ışığında, rumen doku arginazının üre sentezinden sorumlu gen lokusu tarafından değilde, poliamin veya protein sentezinden sorumlu gen lokusu tarafından kodlanabileceğini spekülasyon olarak ileri sürebiliriz.

Ruminantlarda rumende oluşan amonyak giriş kısmında belirttiğimiz gibi "Rumino-hepatik azot dolaşımı" na girmektedir. Rumende üre döngüsü bulunmadığına ve rumende bulunan arginaz amonyağın detoksifikasyonunda görev almadığına göre; Rumen arginazının amonyağın detoksifikasyonu dışındaki fonksiyonu ne olabilir? Rumende bulunan arginaz poliamin ve protein sentezi için gerekli ornitini mi üretmektedir? Bu nedenlerle bu metabolik yolların ilk enzimatik basamağını katalize eden, Ornitin aminotransferaz (Ornitini prolin sentezine yönelten) ve Ornitin dekarboksilaz (Ornitini putresine dönüştüren) enzimleri rumende mevcut mudur? Arginazın hücre içi yerleşimi ile görev aldığı biyosentez yolu arasında bir ilişki var mıdır? soruları üzerinde durularak, rumen arginazının metabolik öneminin ortaya konulması gerekmekte olup, laboratuvarımızda çalışmalarımıza bu yönde devam edilecektir.

## 5. ÖZET

Bu çalışma, sığır rumen doku arginazının bazı özelliklerinin saptanması amacı ile yapıldı. Araştırma materyalleri Elazığ Elet Tesislerine kesim için gelen sığırlardan temin edildi. Çalışma metodu olarak Tiyosemikarbazid Diasetilmonoksim Üre (TDMU) metodu kullanıldı.

Sığır rumen doku arginazının, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra bazı biyokimyasal özellikleri karşılaştırıldı. Arginazın, saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonra, preinkübasyon ısısının ( $60^{\circ}\text{C}$ ) ve substratı L-arginine karşı olan  $K_m$ 'inin ( $4\text{mM}$ ) değişmediği saptandı. Saflaştırılmadan önce preinkübasyon süresi 10 dakika, optimal pH 9.7 iken, saflaştırıldıktan sonra preinkübasyon süresi 5 dakika, optimal pH ise 10 olarak bulundu. Yine saflaştırılmış enzim  $2\text{mM}$   $\text{MnCl}_2$  konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verirken, saflaştırılmamış enzim  $1\text{mM}$   $\text{MnCl}_2$  konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi vermektedir. Neticede, enzimin aktivasyonu için  $\text{Mn}^{++}$  iyonlarının ve  $60^{\circ}\text{C}$ 'de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edildi.

Valin, lösin, izolösin, ornitin, prolin, sistein, lizin gibi L-amino asitler enzimi nonkompetitif olarak inhibe ederken, histidin ve hidroksiprolinin enzim aktivitesi üzerine herhangi bir inhibitör etkisi bulunamamıştır.

Guanidino bileşiklerinden agmatin, kanavanin, guanidin enzimi nonkompetitif olarak inhibe etmektedir.  $0.35\text{mM}$  kanavanin,  $12\text{mM}$  guanidin enzimin %100 inhibisyonuna neden olmuştur.

Rumen doku arginazının p-CMBA ve NEM tarafından nonkompetitif inhibisyonu, bu enzimin aktif merkezinde fonksiyonel -SH gruplarının varlığını göstermektedir.

## 6. SUMMARY

The aim of this study was to establish some properties of rumen tissue arginase in cattle slaughtered at Elet abattoir in Elazığ, using Thiosemicarbazide Diacetylmonoxime Urea method as the criterion.

Some biochemical properties of purified and non-purified rumen tissue arginase were compared. It was found that pre-incubation temperature ( $60^{\circ}\text{C}$ ) of arginase and  $K_m$  (4mM) to its substrate, L-arginine, did not change before and after purification. While pre-incubation period was 10 min and optimal pH 9.7 before purification, pre-incubation period was found to be 5 min and optimal pH 10 after purification. Purified enzyme achieved its highest activity at 2mM  $\text{MnCl}_2$  concentration, whereas non-purified enzyme gave the highest activity at 1mM  $\text{MnCl}_2$  concentration. Consequently, it was determined that  $\text{Mn}^{++}$  cations and pre-incubation at  $60^{\circ}\text{C}$  were essential for the activation of the enzyme.

L-amino acids, such as valine, leucine, isoleucine, ornithine, cysteine, proline, lysine inhibited the enzyme activity noncompetitively. On the other hand, histidine and hydroxyproline were not determined to have any inhibitory effect on the enzyme activity.

Among guanidino compounds, canavanine, agmatine and guanidine inhibited the enzyme noncompetitively; 0.35mM canavanine and 12mM guanidine caused 100% inhibition in the enzyme's activity.

The noncompetitively inhibition of rumen tissue arginase by p-CMBA and NEM indicates that functional -SH groups may be present in the active centre of this enzyme.

## 7. KAYNAKLAR

**1-Aminlari M. and Vaseghi T. (1992).** Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.103 B, No.2, pp. 385-389.

**2-Barej W. and Hill H. (1970).** Arginine Metabolism in the Blood Cells of Cattle and Goats. *Q. Jl exp. Physiol.* 55, 64-65.

**3-Ber E., Muszynska G. and Cechova D. (1978).** The Lack of Free SH Groups in Rat Liver Arginase. *Bulletin de L'Academie Polonaise Des Sciences. C.II.* Vol. XXVI, No.10., 665-667.

**4-Ber E. and Muszynska G. (1979).** Chemical Modification of Liver Arginase. *Acta Biochim. Polon.*, Vol.26, 103-114.

**5-Berüter J., Colombo J.P. and Bachmann C. (1978).** Purification and Properties of Arginase from Human Liver and Erythrocytes. *Biochem. J.*, 175, 449-454.

**6-Breazile J. E. (1971).** The Ruminant Stomach. 385-394. In: "Textbook of Veterinary Physiology". Lea-Febiger, Philadelphia, USA.

**7-Brown G.W. and Cohen P.P. (1960).** Activities of Urea-Cycle Enzymes in Various Higher and Lower Vertebrates. *Biochem. J.* 75, 82-91.

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

**9-Campbell J.W. (1965).** Arginine and Urea Biosynthesis in the Land Planarian: Its Significance in Biochemical Evolution. *Nature.* 208, 1299-1301.

**10-Carvajal N. and Cederbaum S.D. (1986).** Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Prolin and Branched-Chain Amino Acids. *Biochim. et Biophys. Acta*, 870, 181-184.

**11-Cederbaum S.D., Moedjono S.J., Shaw K.N.F., Carter M.,**

**Naylor E. and Walzer M.** (1982). Treatment of Hyperargininemia due to Arginase Deficiency with a Chemically Defined Diet. *J. Inher. Metab. Dis.* 5, 95-99.

**12-Chen P.C. and Broome J.D.** (1980). Mouse Macrophage Arginase. *Analyt. Biochem.*,163. 354-359.

**13-Chinard F.P.** (1952). Photometric Estimation of Proline and Ornithine. *J. Biol. Chem.* 199, 91-95.

**14-Church D.C. and Fontenot J.P.** (1971). Nitrogen Metabolism and Requirements. 25-55. Ed. D.C. Church. In: "Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants". 2 nd ed., Vol.2.Nutrition, Corvallis, Oregon 97330, USA.

**15-Colombo J. and Konarska L.** (1984). Arginase. 285-294. Ed. Bergmeyer H.U. In: "Methods of Enzymatic Analysis". 3rd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim.

**16-Currie G.A.** (1978). Activated Macrophages Kill Tumor Cells by Releasing Arginase. *Nature*, 273, 758-759.

**17-Fuentes J.M., Campo M.L. and Soler G.** (1994). Kinetics and Inhibition by Some Aminoacids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique.* 102, 255-258.

**18-Geyer J.W. and Dabich D.** (1971). Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Analy. Biochem.* 39, 412-417.

**19-Gopalakrishna R. and Nagarajan B.** (1979). Use of Centrifuge Column Technique in Estimation of Arginase in Human Serum. *Biochem. Med.* 22, 70-75.

**20-Gözükara E.M.** (1989). Amino Asitlerin Oksidasyonu. 1009-1046. "Biyokimya". Birinci Baskı, Ofset Repromat Ltd.Şti., Ankara.

**21-Gürsu M.F.** (1993). Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve

Kaynaklarının araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

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

**23-Haraguchi Y., Aparicio J.M., Takiguchi M., Akaboshi I. et.al.** (1990). Molecular Basis of Argininemia. J. Clin. Invest. Vol. 86, 347-350.

**24-Harmeyer J., Kurelec B. und Hill H.** (1967). Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin transcarbamylyase. 2. Mitteilung: Ornithin transcarbamylyase funktion. Zbl. Vet. Med., Reihe A, Bd. 15, Heft 6, 510-516.

**25-Hayase K., Yokogoshi H. and Yoshida A.** (1980). Effect of Dietary Proteins and Amino Acid Deficiencies on Urinary Excretion of Nitrogen and the Urea Synthesizing System in Rats. J. Nutr. 110: 1327-1337.

**26-Hirsch-Kolb H., Kolb H.J. and Greenberg D.M.** (1971). Nuclear Magnetic Resonance Studies of Manganese Binding of Rat Liver Arginase. J.Biol. Chem., 246, 395-401.

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

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

**29-İlhan N.** (1992). İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

**30-Jenkinson C.P. and Grigor M.R.** (1994). Rat Mammary Arginase: Isolation and Characterization. Biochem. Med. and Met. Biol. 51,156-165.

**31-Kaplan L.A.** (1987). Urea. 22-27. Ed. Pesce A.J., Kaplan L.A. In:

"Methods in Clinical Chemistry". The C.V. Mosby Company, St. Louis, Washington D.C., Toronto.

**32-Konarska L., Tomaszewski L. and Rolczyk U. (1984).** Studies on L-arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochem. Med. and Met. Biol.*, 35, 170-178.

**33-Konarska L., Tomaszewski L., Colombo J.P. and Terheggen H.G. (1985).** Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininaemia. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* Vol.23, pp. 337-342.

**34-Konarska L. and 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.

**35-Kuhn N.J., Talbot J. and Ward S. (1991).** pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentrations. Vol.286, No.1, *Archs. Biochem. and Biophys.* pp. 217-221.

**36-Kurelec B., Harmeyer J. und Hill H. (1967).** Über Funktionen der Arginase, Urease und Ornithin transcarbamylase. 1.Mitteilung: Arginase und Urease funktion. *Zbl. Vet. Med., Reihe A, Bd. 15, Heft 5,* 460-469.

**37-Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. (1993).** Amino Acid Oxidation and the Production of Urea. 506-538. In: "Principles of Biochemistry". 2 nd ed., Worth Publishers, New York.

**38-Leu S.Y. and Wang S.R. (1992).** Clinical Significance of Arginase in Colorectal Cancer, *Cancer*, Vol.70, No.4, 733-736.

**39-Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951).** Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

**40-Luboinska M.K., Zamecka E. and Porembaska Z. (1988).** The Isolation and Immunological Properties of Two Arginase Forms from Human Erythrocytes. *Biochem. Med. and Met. Biol.* 39, 247-257.

**41-Marescau B., De Deyn P.P., Lowenthal A. et.al. (1990).** Guanidino Compound Analysis as a Complementary Diagnostic Parameter for Hyperargininemia: Follow-Up of Guanidino Compound Levels during Therapy. *Pediatric Research*. Vol. 27, No.3, 297-303.

**42-Martincic T. and 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*, pp. 90-93.

**43-Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and Rodwell V.W. (1991).** Metabolism of Proteins and Amino Acids. 267-330. In:"Harper's Biochemistry". Twenty-second ed., Typopress, Lebanon.

**44-Muszynska G., Severina O.L. and Lobyreva L.W. (1972).** Characteristics of Arginases from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organisms. *Acta Biochem. Polon.*, Vol:19, No:2.

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

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

**47-Ozan S. ve Gülen Ş. (1989).** Sığır Tükürüğünde Arginaz Enzimi ve Özelliklerinin Tükürük Bezleri, Eritrosit ve Karaciğer Arginazları ile Karşılaştırılması. *Doğa TU Vet. ve Hay. D. C* 13,2,154-163.

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

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

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

**51-Özdemir Y., Ozan S., Özdemir N., Gürsu F., Halifeoğlu İ. and Gülen Ş.** (1988). The Evaluation of Methods Used for the Measurement of Arginase Activity. 1.Marmara Tıp Günleri, Biyokimya Seksiyonu,11.

**52-Özgen H.** (1986). Sindirim ve Emilme. 117-129. "Hayvan Besleme". Üçüncü baskı, Yükseköğretim Kurulu Matbaası, Ankara.

**53-Poremska Z. and Zamecka E.** (1984). Immunological Properties of Rat Arginases. Acta Biochim. Polon., Vol:31, No:2, 223-227.

**54-Powers G.S. and Meister T.** (1982). Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. 251-263. Edited by I. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz. In: " The liver: Biology and Pathobiology". Raven Press, New York.

**55-Ratner S.** (1976). Formation and Cleavage of C-N Bonds in Arginine and Urea Biosynthesis. p.227. Ed. Kornberg A., Horecker B.L., Cornudella L. and Oro J. In:"Reflection on Biochemistry". Pergamon Press, New York.

**56-Rawn J.D.** (1989). Catabolism of Amino Acids and and the Urea Cycle. 457-487. In: "Biochemistry". First ed., Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina.

**57-Remesar X., Arola LL., Palou A. and Alemany M.** (1980). Arginase Activity in the Organs of Fed and 24-Hours Fasted Rats. Horm. Metab. Res., 12, 281-282.

**58-Remesar X., Arola LI., Palou A. and Alemany M.** (1985). Activities of Amino Acid Metabolizing Enzymes in the Stomach and Small Intestine of Developing Rats. Reprod. Nutr. Develop. 25 (5), 861-866.

**59-Reyero C. and 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.

**60-Ruegg U.T. and Russell A.S.** (1980). A Rapid and Sensitive Assay for Arginase. *Analyt. Biochem.* 102, 206-212.

**61-Schimke R.T.** (1974). Arginase (Rat Liver). 313. Ed. by Tabor H. and Tabor C.W. In: "Methods in Enzymology". Academic Press, New York.

**62-Schimke R.T.** (1982). Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* Vol.237, No.2, 459-468.

**63-Shimbayashi K. and Yonemura T.** (1970). An Aspect of Urea Cycle Enzymes in Goat. *Agr. Biol. Chem.*, Vol.34, No.11, p.1603-1609.

**64-Skrzypek-Oslecka I., Robin Y. and Poremska Z.** (1983). Purification of Rat Kidney Arginases A<sub>1</sub> and A<sub>4</sub> and Their Subcellular Distribution. Vol.30, No.1, *Acta Biochim. Polon.*, 83-92.

**65-Snodgrass P.J., Lin R.C., Müller W.A. and Aoki T.T.** (1978). Induction of Urea Cycle Enzymes of Rat Liver by Glukagon. *The J. Biol. Chem.* Vol.253, No.8, pp. 2748-2753.

**66-Snodgrass P.J. and Lin R.C.** (1981). Induction of Urea Cycle Enzymes of Rat Liver by Amino Acids. *The Journal of Nutrition.* Vol.111, No.4. 586-601.

**67-Snodgrass P.J.** (1989). Urea Cycle Enzyme Activities are Normal and Inducible by a High-Protein Diet in CCl<sub>4</sub> Cirrhosis of Rats. *Hepatology.* Vol.9, No.3, pp. 373-379.

**68-Snodgrass P.J.** (1991). Dexamethasone and Glucagon Cause Synergistic Increases of Urea Cycle Enzyme Activities in Livers of Normal But Not Adrenalectomized Rats. *Enzyme*; 45. 30-38.

**69-Sondaç Ü.** (1991). Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.

**70-Spector E.B., Rice S.C.H., Moedjono S., Bernard B. and**

**Cederbaum S.D.** (1982). Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochem. Med.* 28, 165-175.

**71-Spector E.B., Rice S.C.H and Cederbaum S.D.** (1983). Immunologic Studies of Arginase in Tissues Normal Human Adult and Arginase-Deficient Patients. *Pediatric Research.* Vol.17, No.12, 941-944.

**72-Spolarics Z. and Bond J.S.** (1988). Multiple Molecular Forms of Mouse Liver Arginase. *Archs. Biochem. and Biophys.*, Vol.260, No.1, pp. 469-479.

**73-Spolarics Z. and Bond J.S.** (1989). Comparison of Biochemical Properties of Liver Arginase from Streptozocin-Induced Diabetic and Control Mice. *Archs. Biochem. and Biophys.* Vol.274, No.2, pp. 426-433.

**74-Straus B., Cepelak I. and Festa G.** (1992). Arginase, a New Marker of Mammary Carcinoma. *Clin. Chim. Acta*, 210, 5-12.

**75-Şenel S.** (1986). Proteinler ve Metabolizması. 25-41. "Hayvan Besleme". Birinci Baskı, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.

**76-Tamir S. and Ratner S.** (1963). Enzymes in Arginine Metabolism in Chick. *Arch. Biochem. and Biophys.* 102, 249.

**77-Taylor A.A. and Stewart G.R.** (1981). Tissue and Subcellular Localization of Enzymes of Arginine Metabolism in *Pisum Sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 1281-1289.

**78-Ulbricht C. and Snodgrass P.J.** (1993). Coordinate Induction of the Urea Cycle Enzymes by Glucagon and Dexamethasone Is Accomplished by Three Different Mechanisms. *Archs. Biochem. and Biophys.* Vol.301, No.2, pp. 237-243.

**79-Van Elsen A.F. and Leroy J.G.** (1975). Arginase Isoenzymes in Human Diploid Fibroblasts. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* Vol.62, No.2, 191-198.

**80-Wu C.W, Wang S.R. and Chang T.J.** (1989). Content of

Glucocorticoid Receptor and Arginase in Gastric Cancer and Normal Gastric Mucosal Tissues. *Cancer*, Vol.64, No.12, 2552-2556.

**81-Yip M.C. and Knox W.E.** (1972). Function of arginase in lactating mammary gland. *Biochem. J.*, 127, 893.

**82-Zamecka E. and Poremska Z.** (1988). Five Forms of Arginase in Human Tissues. *Biochem. Med. and Met. Biol.* 39, 258-266.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

1968'de Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 1985 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi 'nde yüksek öğrenimime başladım. 1990 yılında mezun oldum ve aynı yıl aynı Üniversitenin Veteriner Fakültesi'nin Biyokimya Anabilim Dalına doktora öğrencisi olarak girdim. Halen Biyokimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım ve evliyim.



## 9. TEŞEKKÜR

Yetişmemin her aşamasında, tez konumun seçilmesinde ve daha sonraki deneysel aşamalarda yardımlarına ve rehberliğine başvurduğum hocam sayın Prof.Dr. Sema OZAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda yardımı geçen Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Tayfun GÜLDÜR, Yrd.Doç.Dr. Necmi ÖZDEMİR ve Yrd.Doç.Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, Araştırma Görevlilerinden Arş.Görv. Sema YARALIOĞLU ve Arş.Görv. Tülay İLERİ'ye, ayrıca materyal temininde yardımını esirgemeyen Elazığ Elet Tesisleri çalışanlarına teşekkür ederim.

Y. O. OZAN  
ELAZIĞ ELET TESİSLERİ