

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

TAVŞAN KARACİĞER ARGİNAZİNİN OPTİMİZE
EDİLMESİ VE TAVŞAN DOKULARINDAKİ
ARGİNAZİN DAĞILIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVHER ERDEM

ELAZIĞ-2012

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

S. Ozan

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Mine ERİŞİR

M. Erişir

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

S. Ozan

Prof. Dr. Mine ERİŞİR

M. Erişir

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

N. Özdemir

Prof. Dr. Seval YILMAZ

S. Yılmaz

Prof. Dr. Meryem KARAN

M. Karan

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek tez konumun seçiminde, gerekse araştırmalarımın her aşamasında ilgisini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Prof. Dr. Mine Erişir'e, yardımlarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sema Temizer OZAN' a teşekkür eder, ayrıca Yüksek lisansımın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR, Prof. Dr. Seval Yılmaz ve Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN, yüksek lisans eğitimim boyunca maddi vemanevi desteklerini esirgemeyen, tüm sıkıntılarımda yanımda olan aileme ve eşim İlker ERDEM' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması için maddi destek aldığımız Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimine(Proje No: 2123) teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Üre Sentezi	3
3.2. Amonyak Metabolizması	4
3.2.1. Amonyak Kaynakları	7
3.3. Üre Döngüsü.....	8
3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları.....	8
3.4. Arginaz Enzimi.....	10
4. GEREÇ VE YÖNTEM	18
4.1. Kimyasal Maddeler	18
4.2. Kullanılan Cihazlar.....	18
4.3. Metodlar	19
4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi ve Prensibi	19
4.3.1.1. Kullanılan Ayraçlar	19
4.3.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü	22
4.3.1.3. Tavşan Dokularında Arginaz Aktivesinin Hesaplanması	24
4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü	25
4.3.2.1. Kullanılan Ayraçlar	26
4.3.2.2. Deney Prosedürü	26
5. BULGULAR	27
5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti	27
5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti	27
5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti	28

5.4. Mangan İyonlarının Etkisi	29
5.5. Tavşan Karaciğer Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi.....	30
5.6. Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi.....	31
5.7. Tavşan Dokularında Arginaz Aktivitesinin dokulara göre dağılımı	34
6. TARTIŞMA	35
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ.....	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Tavşan Dokularında Arginaz Düzeylerinin En Yüksek Dokudan

En Düşük Dokuya Doğru Dağılımı 34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Azotun Amino Asitlerden Üreye Geçişi.	4
Şekil 2: Karaciğerdeki Amonyak Metabolizmasının Genel Şeması.....	6
Şekil 3: Üre Döngüsü	10
Şekil 4: TDMU Metodu için Standart Üre Eğrisi.....	24
Şekil 5: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi	27
Şekil 6: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	28
Şekil 7: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	29
Şekil 8: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.	30
Şekil 9: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler.....	31
Şekil 10: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	32
Şekil 11: Tavşan Karaciğer Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi. ...	33
Şekil 12: Tavşan Karaciğer Arginazının L-arginine Karşı Olan K_m 'inin Eadie- Hofstee Eğrisi ile Saptanması	33

1. ÖZET

Bu çalışmada tavşan dokularındaki arginazın ölçülmesi için karaciğer dokusundaki arginazın optimize edilmesi hedeflenmiştir. Karaciğer doku arginazının optimum pH'sının, preinkübasyon ısısının, inkübasyon ve preinkübasyon zamanının, Mn^{++} ve L-arginin konsantrasyonunun tespit edilmiştir. Şartlar optimize edildikten sonra tavşanın farklı dokularındaki arginaz düzeyleri belirlenmiştir.

Tavşan karaciğer doku arginazı için preinkübasyon ısısı $65^{\circ}C$, preinkübasyon zamanı 13 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 10 olarak saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi 2 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda vermiştir. Sonuç olarak enzimin aktivasyonu için Mn^{+2} iyonlarının ve $65^{\circ}C$ de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edilmiştir. Tavşan karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan K_m ' i 1,6 mM olarak saptanmıştır.

Tavşanlardan böbrek, kalp, uterus, beyin, dalak, bağırsak, yemek borusu, kas, dil, akciğer, mide, soluk borusundan alınan örneklerde arginaz enziminin miktarları tespit edilmiştir. Karaciğer $105,09 \pm 12,91$, böbrek $27,03 \pm 3,37$, kalp $7,55 \pm 0,91$, uterus $3,03 \pm 0,23$, kan $3,22 \pm 0,60$, beyin $2,00 \pm 0,21$, dalak $1,91 \pm 0,07$, bağırsak $179 \pm 0,44$, yemek borusu $1,76 \pm 0,09$, kas $1,60 \pm 0,64$, dil $1,56 \pm 0,18$, akciğer $1,56 \pm 0,18$, mide $1,08 \pm 0,57$, soluk borusu $0,45 \pm 0,07$ ünite olarak bulunmuştur. Çalışılan dokular içinde en yüksek aktivite karaciğer dokusunda en düşük aktivite soluk borusunda saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tavşanlar, Karaciğer, Arginaz

2. ABSTRACT

OPTIMIZATION OF RABBIT LIVER ARGINASE AND DISTRIBUTION OF ARGINASE IN TISSUES OF RABBIT

In this study, for measuring of arginase in rabbit tissues was aimed to optimize of arginase in liver tissue. Optimum pH, preincubation temperature, preincubation time, incubation time, Mn^{++} concentration, and L-arginine concentration of arginase in liver tissue was determined. Arginase levels were measured in different tissues of rabbits after conditions were optimized.

Its was found to be preincubation temperature 65 °C, preincubation period 13 minutes, incubation period 10 minutes and optimum pH 10 for arginase in rabbit liver tissue. Enzyme achieved its highest activity at 2 mM $MnCl_2$ concentration. Consequently, it was determined that Mn^{+2} ions and preincubation at 65 °C were essential for the activation of the enzyme. K_m of arginase in rabbit liver tissue for L-arginine were measured to be 1,6 mM.

Levels of the arginase enzyme in liver, kidney, heart, uterus, brain, spleen, intestine, esophagus, muscle, tongue, lung, stomach, trachea tissues of rabbits were determined and found as $105,09 \pm 12,91$; $27,03 \pm 3,37$; $7,55 \pm 0,91$; $3,03 \pm 0,23$; $3,22 \pm 0,60$; $2,00 \pm 0,21$; $1,91 \pm 0,07$; $179 \pm 0,44$; $1,76 \pm 0,09$; $1,60 \pm 0,64$; $1,56 \pm 0,18$; $1,56 \pm 0,18$; $1,08 \pm 0,57$; $0,45 \pm 0,07$ unites, respectively. Among the studied tissues, the highest arginase activity was found in liver, the lowest arginase activity was found in trachea.

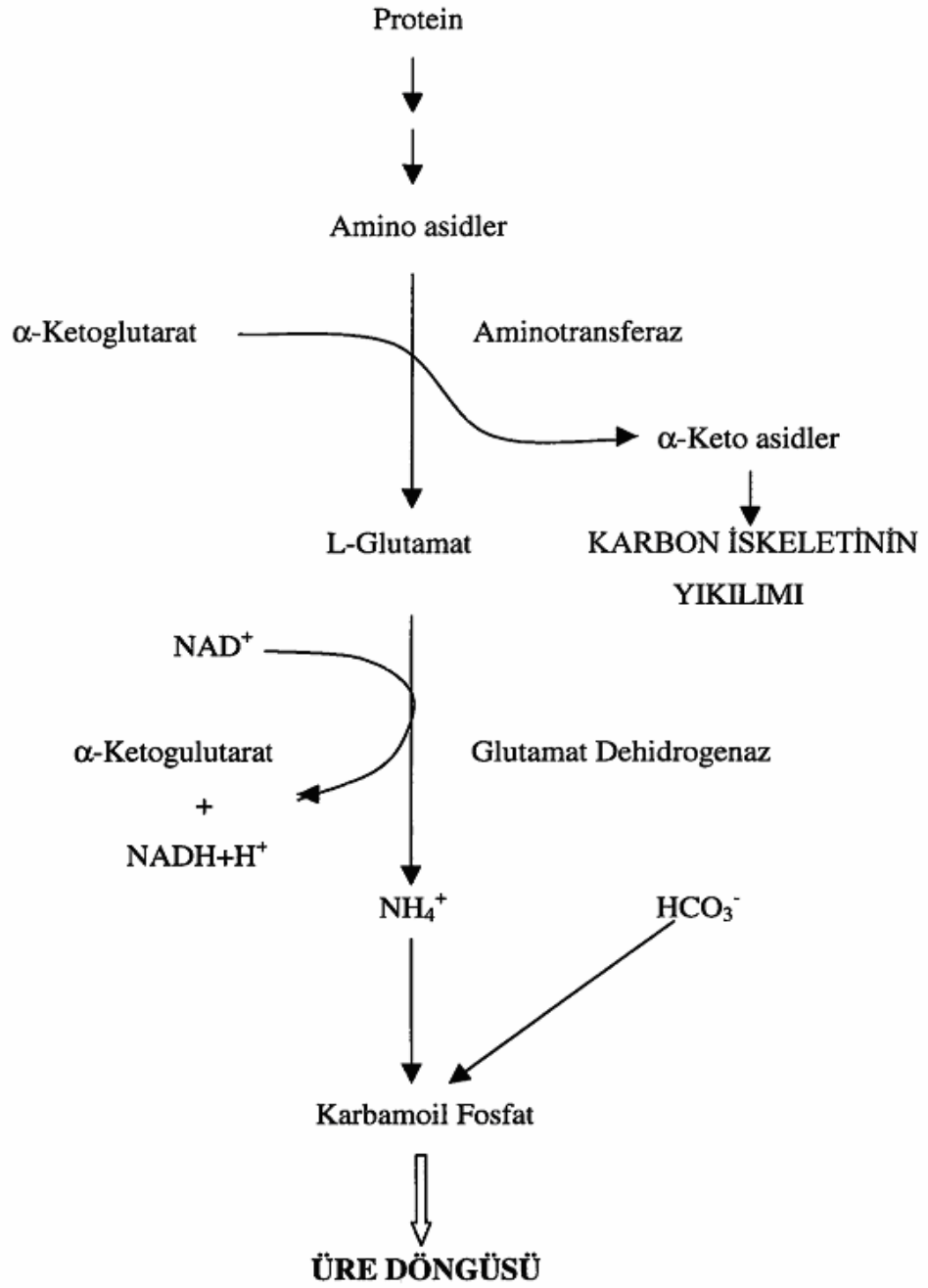
Key Words: Rabbits, Liver, Arginase

3. GİRİŞ

3.1. Üre Sentezi

Omurgalılarda besinlerle alınan amino asitlerin büyük bir kısmı protein halinde alınmaktadır. Metabolik yollara ancak peptit ve proteinden ayrılmış serbest amino asitler girmektedir. Bunun içinde besinlerle alınan proteinlerin gastrointestinal kanalda proteolitik enzimler tarafından hidrolize edilmesi ve serbest amino asitlere ayrılması gereklidir (21).

Canlı organizmanın sindirim kanalından emilen bu amino asitlerin bir kısmı plazma ve doku proteinlerinin, bazı enzimlerin, protein yapılı hormonların, pürin ile pirimidinlerin sentezinde ve enerji üretiminde kullanılırken bir kısmı daha fazla parçalanarak organik asitleri, amonyak ve karbondioksiti meydana getirir. Amino asitlerin katabolizması amino gruplarının transferi ile başlar. Amino asitlerin amino grupları transaminasyon reaksiyonları ile α -ketoglutarik asite transfer edilerek L- glutamik asiti meydana getirirler. L-glutamik asit ise hücrelerin sitoplazmalarından mitokondrionlarına girerek NAD^+ gerektiren glutamat dehidrogenaz ile tekrar α -ketoglutarik asite ve amonyağa dönüşür (Şekil 1) (74).



Şekil 1: Azotun Amino Asitlerden Üreye Geçişi (2).

3.2. Amonyak Metabolizması

Amino asitlerin yıkımı esnasında açığa çıkan amonyak çok toksik olduğundan en kısa zamanda organizmadan uzaklaştırılır (Şekil 2). Amonyakın

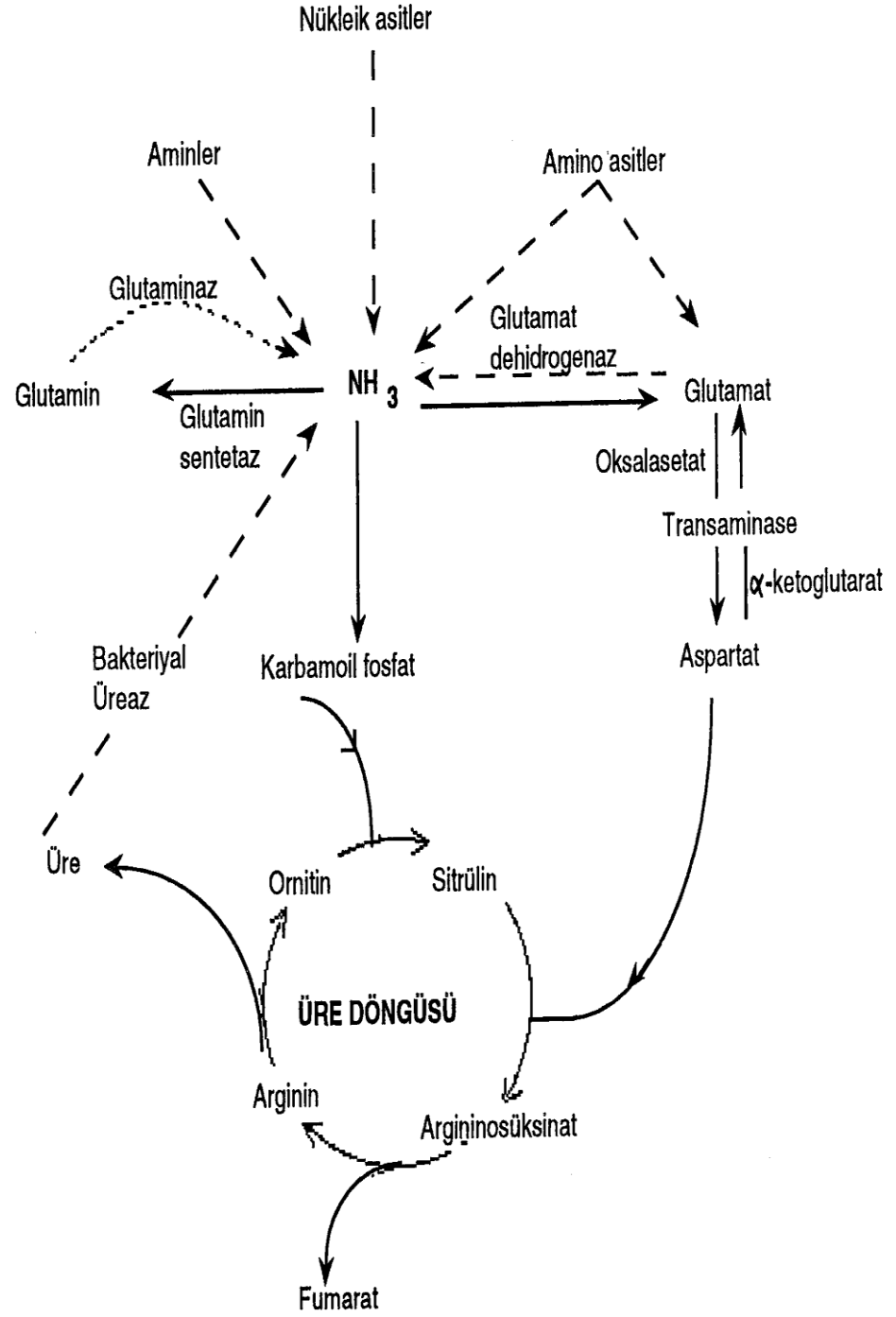
atılım şekli canlının yaşadığı ortamdaki su düzeyine bağlı olarak farklılık gösterir. Azot metabolizması son ürününe göre canlılar üç grupta toplanmaktadır;

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

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

3-Ürikotelik Grup: Bütün kanatlılar ve suyun çok az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler amonyağı pürin biyosentezi yoluyla üreye göre suda daha az çözünen ürik aside çevirmektedir (21,52,69).

Amonyak esansiyel bir madde olmasına karşın insan ve hayvanlarda çok düşük serbest amonyak düzeyleri bile ağır serebral bozukluklara yol açar. Amonyak zehirlenmesinin bulguları arasında ellerde titremeler, konuşmanın zayıflaması, görme bozuklukları ve ağır durumlarda koma ve ölüm sayılabilir. Bu nedenle organizmada amonyak bağlanarak süratle zehirsiz hale getirilmelidir (21).



Şekil 2: Karaciğerdeki Amonyak Metabolizmasının Genel Şeması (18).

3.2.1. Amonyak Kaynakları

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

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

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

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

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

5- Pürin ve pirimidinler: Pürin ve pirimidin katabolizmasında, halkalardaki amino grupları amonyak olarak salınır (12).

3.3. Üre Döngüsü

Üre amino asitlerden elde edilen amino gruplarının esas atılım şeklidir ve idrarın azot içeren bileşiklerinin % 90' ını oluşturur (Şekil 3). Üre molekülünün içerdiği azotlardan birisi serbest NH_3 ' den, diğeri de aspartatdan elde edilir. Glutamat, amonyak ve aspartat azotunun prekürsörüdür. Amonyak azotunu glutamat dehidrogenazın katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonundan, aspartat azotunu da aspartat aminotransferazın katalizlediği okzaloasetatın transaminasyonu reaksiyonundan elde eder. Ürenin karbon ve oksijeni karbondioksitten elde edilir. Üre karaciğerde oluşur ve daha sonra kanla böbreklere taşınarak idrarla atılır (12).

3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları

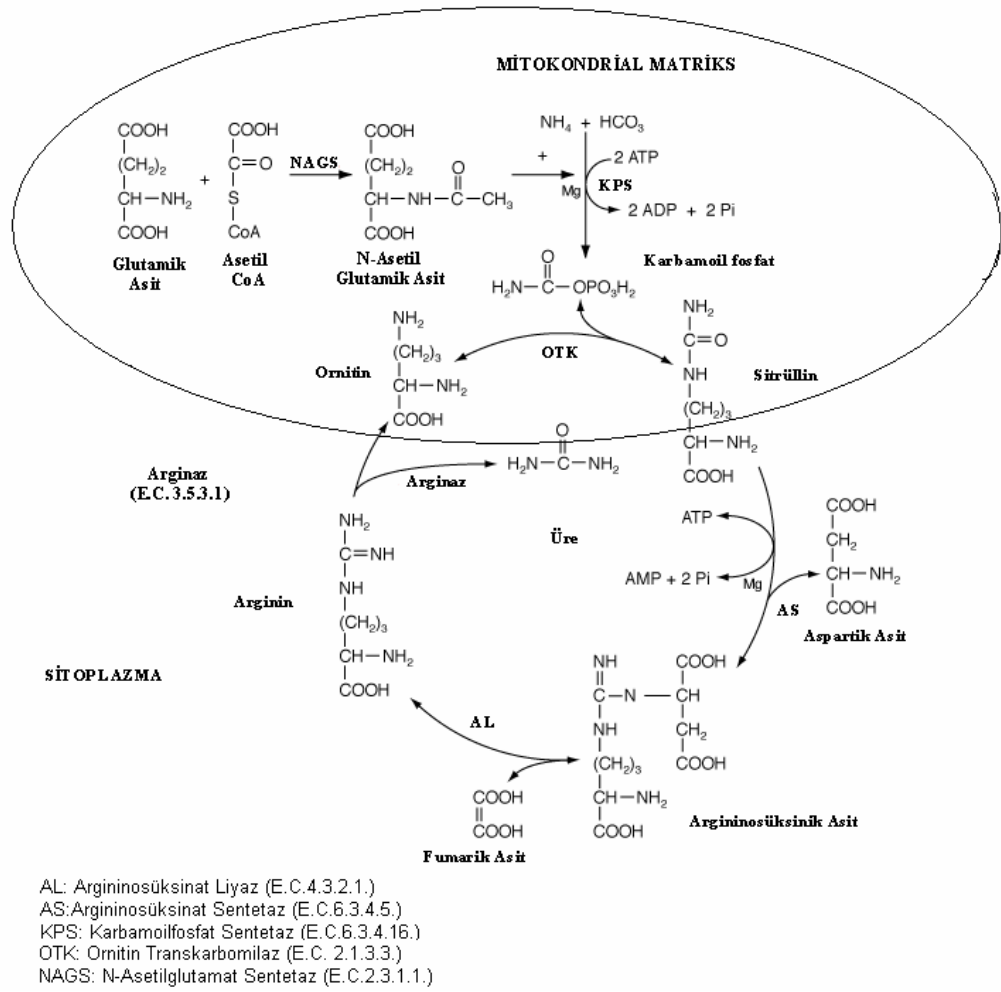
Üre sentezinin ilk iki reaksiyonu mitokondride gerçekleşir. Döngünün diğer enzimleri sitozoldedir (Şekil 3).

Üre sentezi mitokondrionda başlar. Mitokondriyal bir enzim olan karbamoil fosfat sentetaz enzimi iki mol ATP kullanımı altında bikarbonat ve amonyaktan karbamoil fosfat' ı sentezler. Mitokondriyum zarı bikarbonat için geçirgen değildir. Bu nedenle sitozolden alınan karbondioksit, sadece karaciğer mitokondrionlarında bulunan karbonik anhidrazın bir izoenzimi aracılığı ile bikarbonata çevrilir ve üre sentezi için hazırlanır. Karbamoil fosfat doğrudan üreye dönüştürülemez ve bu reaksiyonlar 4 ayrı basamakta gerçekleşir. Öncelikle karbamil fosfatın karbamoil grubu, ornitin karbamoil transferaz enzimi aracılığı ile ornitin üzerine taşınır ve sitrüllin sentezlenir. Oluşan sitrüllin sitozole

gönderilir. Üre sentezi reaksiyonları bu aşamaya kadar mitokondrionlarda gerçekleşirken bundan sonraki aşamalar sitozolde sürdürülür (12,21).

Ornitin yapısındaki karbamoil grubu (sitrüllin) üzerine 1 mol daha amino grubu taşınması gerekir. Fakat bu olay bir transaminasyonla gerçekleştirilemediğinden aspartat döngüsü adı verilen döngüye bağlanır. Bu olayda önce sitrüllinin karbamoil grubu ile aspartik asitin amino grubu arasındaki bağlanmayla argininosüksinik asit oluşur. Reaksiyon argininosüksinik sentetaz tarafından 1 mol ATP kullanımı altında gerçekleşir. Argininosüksinik asit de arginino süksinaz tarafından arginin ve fumarik asite parçalanır ve sonuç olarak bu iki reaksiyonla aspartik asitin amino grubunun sitrüllin üzerine taşındığı ve arginin sentezlendiği söylenebilir. Sentezin son basamağında arginin, arginaz enzimi tarafından ornitin ve üreye parçalanır ve döngü tamamlanır. Sitozolde oluşan ornitin sitrüllin' in mitokondriondan çıkışıyla dengeli olarak enerji kullanılarak mitokondrionlara geri döner ve tekrar kullanıma hazır hale gelir (12,21).

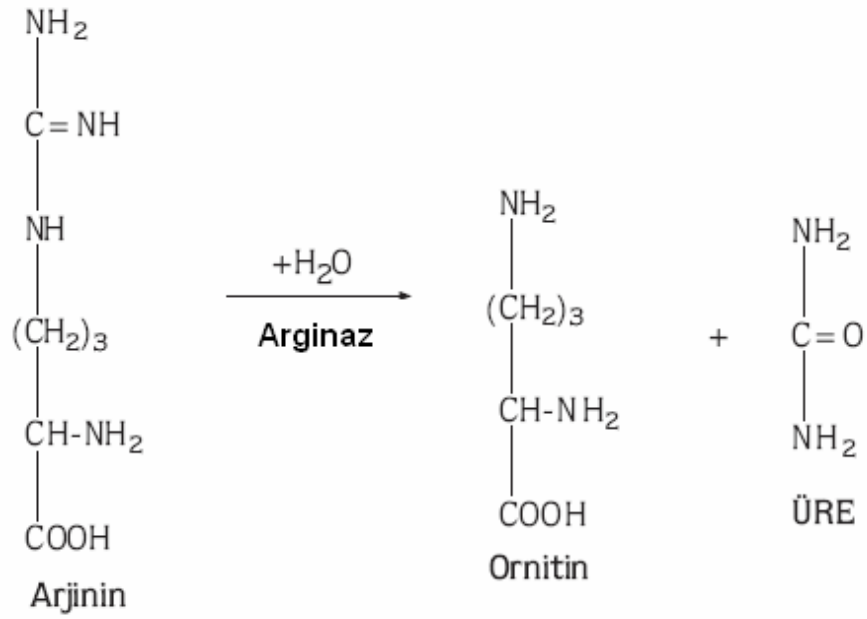
Ürenin atılımı: Oluşan üre karaciğerden kana geçerek böbreklere taşınır ve süzülüp idrarla atılır. Karaciğerde sentezlenen ürenin bir kısmı kandan bağırsaklara diffuze olur ve bakteriyel üreazla CO_2 ve NH_3 ' a parçalanır. Bu amonyak kısmen feçesle çıkar, kısmen de kana reabsorbe olur. Böbrek yetmezliği olan hastalıklarda plazma üre seviyeleri artar ve bağırsaklara üre aktarımı da artar. Üreazın etkisi sonucu artan amonyak miktarı bu hastalarda klinik bir sorun oluşturur ve hiperamonyeminin başlıca sebebidir (12).



Şekil 3: Üre Döngüsü (5).

3.4. Arginaz Enzimi

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; E.C. 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 saptanan arginaz üre döngüsünün son enzimidir (14).



Arginaz bakımından en zengin organ üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (50). Ancak böbrek, beyin, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi üre döngüsünün görülmediği ekstra hepatik dokularda da arginaz enzimi saptanmıştır (2,3,13,19,23,29,32,41,42,49,56,78,83). Arginazın üre döngüsünün olmadığı bu dokulardaki görevinin prolin, glutamat ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitinin kaynağını sağlamak olduğu bilinmektedir (4).

Poliamin biyosentezinde arginaz enzimi başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Poliaminler (putressin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (62,63).

Arginaz enzimi sadece üretelik canlılarda bulunmayıp, bazı ürikotelik, amonotelik canlılarda ve bitkilerde de varlığı tespit edilmiştir (8,34).

Arginaz enziminin izoenzimlerini saptamak amacı ile çeşitli yöntemler kullanılmış, yapılan çalışmalar sonucunda enzimin 5 izoenzimi tespit edilmiş ve bu izoenzimlerin hücre içi yerleşimlerinin farklı olduğu saptanmıştır. Bu enzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir (11,18,30,41,65,88). İnsan dokularında da arginazın 5 izoenzimi (A1, A2, A3, A 4, A5) saptanmıştır (88).

Karaciğer (A1,A2,A3,A5)

Böbrek, bağırsak, beyin (A1, A4)

Eritrosit (A2,A4)

Meme bezi (A1,A2)

Tükürük ve parotis bezi (A1)

Submaksillar tükürük bezi (A3)

Fibroblast (A1, A2, A3)

Plesenta villisi (A1, A2)

5 izoenzimin hepsi bazik protein yapısındadır ve izoelektrik noktaları 7.1-9.3 arasında değişmektedir (88). Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşiminde de farklılık gösterdiği görülmüştür. L-argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden arginazın iki izoformu vardır. Arginaz I sitoplazmada lokalize olurken arginaz II mitokondrionda bulunmaktadır (38). Karaciğer için ana form olan A1 formu sitoplazmada yerleşirken, prolin sentezinde görevli olduğu düşünülen A4 formu mitokondrilerde yerleşim göstermektedir. Böbrek A1 formu ise sitoplazmada bulunmaktadır (10,76). Gebelik döneminde insan plesentadaki arginazın izoformlarının yerleşim yerleri incelendiğinde A1 formunun yalnızca sitotrofoblastlarda, A2 formunun ise hem sitotrofoblastlarda hem de sinsitotrofoblastlarda yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir (30). *Neurospora crassa*'

da arginaz enziminin izoenzimlerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada N. Crassa' nın A1 ve A2 olmak üzere iki tip izoenzimi olduğu görülmüştür (84).

İnsan dokularından izole edilen bu izoenzimler 120.000 ± 5000 dalton molekül ağırlığında olup (88), molekül ağırlıkları 39.200 ± 400 dalton olan üç subünitenin bir araya gelmesiyle oluşan trimerik yapıda olduğu anlaşılmıştır (7,29). Değişik memelilerin karaciğerlerinde yapılan araştırmalarda arginazın moleküler ağırlıkları 38.500-39.700 dalton olan subünitelerin bir araya gelmesi ile moleküler ağırlığı 110.000-150.000 dalton olan tetramerik bir molekül olduğu bildirilmiştir (7,65,69,82).

Arginaz enziminin en azından iki formu AI ve AII farklı gen lokusları tarafından kodlanır. AI enzimi karaciğer ve eritrositlerdeki arginaz aktivitesinin %98' ni oluştururken, böbrek, gastrointestinal kanal ve beyindeki arginaz aktivitesinin %50' sini oluşturur. AII enzimi ise böbrek, gastrointestinal kanal ve beyindeki arginaz aktivitesinin geri kalan %50' sini oluşturur (80).

Hiperarjininemili, karaciğer arginaz aktivitesi yetersiz insanlarda eritrosit enzimide yetersizdir. Bu karaciğer ve eritrositlerin aynı gen lokusu tarafından kodlandığına işaret eder (86) .

Arginaz enzim düzeyi beslenmeye bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Arginaz enziminin diyetle alınan proteine bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve bu değişikliğin enzim kinetiği ile ilgili olmayıp enzim protein miktarının artması şeklinde olduğu belirtilmektedir (71). Yapılan çalışmalarda düşük protein diyetinde üre döngüsü enzimlerinin azaldığı (73), diyetle fazla protein eklendiğinde üre döngüsü enzim aktivitelerinin düşük proteinli diyetle beslenenlere göre arttığı gözlemlenmiştir (72). Fazla

karbonhidratlı yiyeceklerle beslenildiğinde üre döngüsü enzimlerinin azaldığı, karbonhidrat tüketimi azaldığında ise bu enzimlerin arttığı tespit edilmiştir (71).

Arginaz enzimi hormonal etkiye bağlı olarak da değişebilmektedir. Kortizolün karaciğer amino asit alımını artırarak amino asit aktive edici enzimlerin düzeylerinde artışa sebep olduğu saptanmıştır. Yine kortikosteronun karaciğer arginaz aktivitesini (44), testosteronun böbrek arginaz aktivitesini (39), tiroksin ve hidrokortizonun ince bağırsak ve böbrek arginaz aktivitesini artırdığı (41), insülin ve deksametazonun ise üre döngüsü enzimlerini etkilediği gözlemlenmiştir (28). Gebe koyunların tükürüğünde arginaz aktivitesinin arttığı bununda hormonal değişimlere bağlı olduğu bildirilmiştir (59).

Arginaz enziminin vitaminlerden de etkilendiği literatürlerden anlaşılmaktadır. Yüksek dozda glukokortikoid verilmiş ratlarda artmış arginaz düzeyini E vitamininin düşürdüğü saptanmıştır (17). Testosteron uygulanmış tavşanların böbreklerindeki arginaz aktivitesindeki artışı, E vitamininin azalttığı görülmüştür (15).

Bir metaloenzim olan arginazın tam katalitik aktivite gösterebilmesi ve kuaterner yapısının şekillenmesi için her subünitenin bir mol Mn^{+2} içermesi gerekir (5,55). Arginaz aktivitesinin % 90-95' i Mn^{+2} iyonlarına bağımlıdır (43). Mn^{+2} iyonlarının bağlanması enzimin ısıya dayanıklılığını artırmakta ve inhibitörlere karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (16, 66). Ancak enzimin asitle muamelesi sırasında Mn^{+2} iyonlarının enzimi inhibisyona ve denatürasyona karşı koruyamadığı tespit edilmiştir (27).

Tavşan dokularında arginazla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır;

Tavşanlarda kalp yetersizliğinde arginaz II protein sentezinin arttığı bulunmuştur (25).

Rat karaciğerinden izole edilen arginaz tavşanlara enjekte edildiği zaman karaciğer arginazına karşı antikorları üretme yeteneğine sahip olduğu bulunmuş olup karaciğer arginazının otoimmün karaciğer hastalıklarının patogeneğinde karaciğerin önemli bir antijeni olabileceği ve hepatositlerin bu antikorlarla öldürülerek direkt sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (47).

N-hidroksi-D, L-indospisin ve 4-hidroksi-D, L-pehil alanin karaciğer arginazının inhibitörleridir. Tavşanların akciğerlerinden bronko-alveolar lavajla elde edilen makrofajların sahip olduğu arginaz aktivitesinin bu iki kimyasal ile inhibe edilerek L-arjininin NOS (nitrik oksit sentetaz) tarafından kullanımını arttırdığı saptanmıştır (26).

Tavşan karaciğer arginazının moleküler ağırlığı 110.000 Da ve her bir sub ünitenin molekül ağırlığı 36.500 Da olup oligomer yapıdadır. Tavşan karaciğer arginazının izoelektrik noktası 7,2 olarak hesaplanmıştır (85).

Genç dişi tavşanların arjinin gerekliliği üzerine yapılan bir çalışmada yemdeki farklı arjinin (Diyetin % 0,4-1) seviyelerinin karaciğer arginaz aktivitesi üzerine etkisiz olduğu bulunmuştur (1).

Tavşanlarda akut amonyak toksikasyonunun nitrojen metabolizmasına etkisi ile ilgili bir çalışmada karaciğer ve böbrekteki arginaz aktivitesinin azaldığı tespit edilmiş ve bu hiperammonemi altında ATP seviyesinin düşmesiyle ilişkilendirilmiştir (48).

Yangı atherosklerozda önemli bir rol oynar. Arginaz I'in artmasının tavşanlarda atherosklerotik plaklarda yangı ve makrofaj infiltrasyonunu önemli

oranda azalttığı ve Arginaz I ‘in antiinflamator etkilerinin olduğu son yıllardaki çalışmalarla gösterilmiştir (86) .

İdrar kesesi arterinin bağlanmasıyla idrar kesesi iskemisi oluşturulan tavşanlardan 1, 4, 8, 24, 48, ve 72. saatlerde idrar keseleri alınmış zamanla, 48. saatte pik yaparak arginaz aktivitesinin ve putresinin arttığı, 24 saatte ise nitrit/nitrat üretiminin önemli olarak düştüğü tespit edilmiştir. İskemik sidik kesesinde arginazın iki bağımsız role sahip olabileceği bildirilmiştir. 1. Arginaz/ornitin dekarboksilaz /poliamin yolunun iskemiye takiben kas hasarında aktivasyonudur. 2. Nitrik oksit sentaz için L-arginin substratının sınırlanarak nitrik oksit üretiminin endojen negatif regülasyonudur (37).

Hiperglisemi; hipertansiyon, trombosiz, aterosklerozis gibi çeşitli kardiovasküler komplikasyonlarla birleşmiştir. Hiperglisemi karotit arterde intimal hiperplasiye sebep olur. Alloxan ile diabet oluşturulan tavşanların karotid arter endotel hücrelerinde arginaz I ve II nin expressiyonun arttığı dolayısıyla arginaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (31).

Hiperlipidemik tavşanlarda endotel hücrelerinde ve intimal kas hücrelerinde arginaz I ve II’ nin sentezinin arttığı dolayısıyla hücre proliferasyonunun artarak atheromatöz lezyonlara sebep olduğu bulunmuştur. Estradiolün ise arginaz sentezini engelleyerek dolayısıyla hücre proliferasyonu ve atherogenesizi baskıladığı bildirilmiştir (24).

Tavşan arginazının dokulardaki dağılımı ile ilgili literatür taramalarımızda böbrek ve karaciğerde arginazın varlığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastladık. Bu nedenle çalışmada karaciğer dokusunda arginazın optimize edilmesi hedeflenerek, karaciğer doku arginazının optimum pH’sının, preinkübasyon

ısının, inkübasyon ve preinkübasyon zamanının, Mn^{+2} ve L-arginin konsantrasyonunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Şartlar optimize edildikten sonra tavşanın farklı dokularındaki arginaz düzeylerinin belirlenmeside amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 1 yaşında 6 adet New Zealand tavşanı kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan araştırma için etik kurul izni alınmıştır.

Karbondiyoksit solutma yöntemi ile kesilen hayvanlardan kesimden hemen sonra alınan tüm dokular (karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, kalp.....) üzerindeki dokulardan ve kanlardan temizlendikten sonra %0.9' luk NaCl içinde soğuk zincire uyularak laboratuara getirilmiştir. Getirilen dokular folyo kağıdına sarılarak -80 °C' de derin dondurucuda daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

Kanlar 35000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra plazması ayrılmış eritrositler %0.9 NaCl ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra yıkanmış kanlar -80 °C'deki derin dondurucuda işleme kadar saklanmıştır.

4.1. Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan L-arginin, Diasetil monoksim, Tiyosemikarbazid, Sülfürik asit, Mangan klorür gibi kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

4.2. Kullanılan Cihazlar

- 1- Cam-teflon (CAT) homojenizatör
- 2- UV/VİS Spektrofotometre (Shidmadzu UV 240)
- 3- Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 800 R)
- 4- pH metre (pH- Meter CG 810)

5- Sıcak su banyosu (Benmari)

6- Vorteks

7- Deep-freeze (Bosch)

4.3. Metodlar

4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi ve Prensibi

Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil monoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür (20). Diasetilmonoksim, üre ile direk reaksiyona girmez. Önce asit ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil asit solüsyonda üre ile kondanase olarak sarı renkli bileşik olan Diazin' i meydana getirir. Oluşan sarı rengi kararlı kılmak için Tiyosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (36).

4.3.1.1. Kullanılan Ayraçlar

1- 120 mM L-Arginin Solüsyonu:

6,31 g L-arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66 g/mol) 250 ml'e distile suya tamamlanarak pH' sı 9.5' a getirilmiştir.

2- Üre Standartı (0.1 μ mol üre/ ml):

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

3- Asit Karışımı:

a) 0.120 M FeCl_3 / % 56.7 H_3PO_4 3.24 g FeCl_3 (Mol. Ağ. 270.3 g/mol) bir miktar distile su ile çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml % 85' lik H_3PO_4 ' den ($d = 1.71$, Mol. Ağ. 98.0 g /mol) ilave edilir. Distile suyla 100 ml' ye tamamlanarak oda ısısında saklanır.

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

4- Renk Ayracı:

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

5- Stok 10 mM MnCl_2 Çözeltisi:

0.99 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Mol. Ağ. 197.9 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 500 ml' ye tamamlanarak +4 °C' de saklanmıştır. Çalışmada bu stok çözeltiden sulandırma yapılarak istenilen konsantrasyonda kullanılmıştır.

6- NaHCO_3 - Na_2CO_3 Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 9.2-10.2)

a) 8.40 g Na_2CO_3 (Mol. Ağ. 105.99 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 500 ml' ye tamamlanır.

b) 10.5 g NaHCO_3 (Mol. Ağı. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 500 ml' ye tamamlanır. Tampon hazırlarken 200 mM' lık NaHCO_3 çözeltisi behere konarak Na_2CO_3 ile pH' sı 9.2-10.2' i arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Solüsyon +4 °C' de saklanır.

7- Glisin-NaOH Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 8.6-10.6)

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

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

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

8- NaHCO_3 -NaOH Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 9.7-10.9)

a) 4 g NaOH (Mol. Ağı. 40 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 500 ml' ye tamamlanır.

b) 10.5 g NaHCO_3 (Mol. Ağı. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 500 ml' ye tamamlanır.

Tampon hazırlarken 200 mM' lık NaHCO_3 çözeltisi behere konarak NaOH ile pH' sı 9.7-10.9 arası değişen tampon çözeltiler hazırlanan ve solüsyon +4 °C' de saklanır.

4.3.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü

Alınan doku örnekleri üzerindeki kan ve pıhtılar uzaklaştırıldıktan sonra iki süzgeç kağıdı arasında kurutularak 0.5 g tartılmış (ağırlık/hacim) ve distile su ile 5 ml' ye tamamlanmıştır (sulandırma oranı 1/10). Örnekler cam - teflon homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenat +4 °C' de 13500 rpm' de 14 dakika Nüve marka santrifüjde santrifügasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlemden sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöküntü kısmı) birbirinden ayrılmış, süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

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 120 mM L-argininden (pH 9.5) 0.3 ml ve 200 mM karbonat tamponundan (pH 9.5) 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 µmol üre/ml), kör tüpüne ise 1.0 ml distile su konuldu.

c – Homojenizasyon ile elde edilen doku homojenatının, süpernatantı deney aşamasında MnCl₂ ile 1/500 oranında sulandırıldı (500 ml içindeki MnCl₂ konsantrasyonu 1 mM'a ayarlandı) ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

d – Enzim kaynağı 55 °C' deki sıcak su banyosunda 10 dakika preinkübasyona bırakıldı.

e -Vida kapaklı tüpler üzerine enzim kaynağından 0.3'er ml ilave edilerek hemen tüpler inkübasyon için 37 °C' deki metabolik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

f – 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.

g – 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda metabolik su banyosundan alınan vida kapaklı tüpler (enzimatik reaksiyonun geliştiği) üzerine de reaksiyonu durdurmak amacı ile hemen 3 ml asit karışımı konuldu.

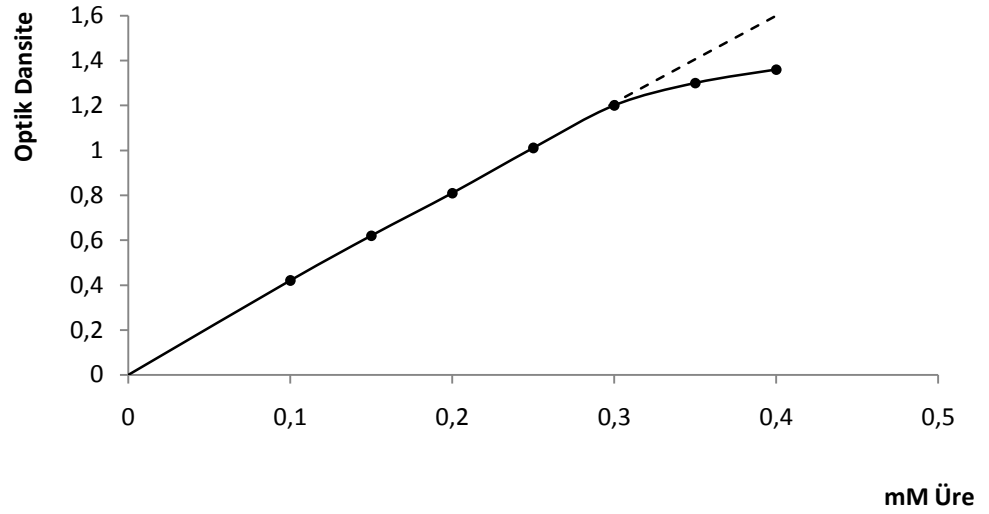
h – Her iki deney setindeki tüplere, 2 ml renk ayırıcı ilave edilip, kapakları kapatılarak vorteks mikserde iyice karıştırıldı.

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

i – 10 dakika sonunda kaynar su banyosundan alınan tüpler musluk suyu altında 3 dakika kadar bekletilerek soğutuldu.

j – Bu süre sonunda standart, örnek ve sıfır zaman tüplerinin absorbanları 520 nm'de Shimadzu UV. Vis. Spektrofotometrede köre karşı okundu.

Bu işlemler standart çalışma tüplerine de uygulanmış, enzim kaynağı yerine 0 ile 0.4 μmol arasında değişen üre standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4). Üre miktarı 0.3 $\mu\text{mol/ml}$ ' i aştığı zaman lineerlik bozulmaktadır.



Şekil 4: TDMU Metodu için Standart Üre Eğrisi

4.3.1.3. Tavşan Dokularında Arginaz Aktivesinin 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 konsantrasyon değerlerinden faydalanılarak her doku için bir faktör bulundu.

Faktör hesaplaması şu şekilde yapıldı;

$$\text{Faktör} = (0.1 \mu\text{mol üre} / \text{ml}) \times (\text{sulandırma katsayısı} \times 3.33 \times 6) / 0.4$$

Sulandırma katsayısı: homojenatın preinkübasyon ortamında MnCl_2 ile sulandırma oranları

Karaciğer: 1/500

Böbrek: 1/30

Kalp: 1/60

Uterus, Beyin, Dalak, Bağırsak, Yemek, Borusu, Kas, Dil, Akciğer, Mide,
Soluk Borusu: 1/5

Kan : 1/250

3.33: inkübasyon ortamında enzim kaynağının sulandırma oranı (1/0.3= 3,33).

6: İnkübasyon ortamında reaksiyon 10 dakika devam ettirildiğinden, bulunan değerin saatteki miktarını ifade etmek için sonuç 6 (60/10= 6) ile çarpıldı.

0.1 µmol üre / ml içeren, standart tüpünün absorbansı ise 0.4' tür.

4- Örneğe ait net absorbans değeri faktör ile çarpılarak µmol 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.

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

Ünite: µmol üre /saat/mg protein

4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız homojenatta protein miktarı modifiye Lowry (46) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptit bağları ile kompleks yapar ve prensip olarak Bakır + protein → 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.

4.3.2.1. Kullanılan Ayıraçlar

1-Alkali Bakır Ayıracı: 10 g Na₂CO₃, 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml' ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

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

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

4- Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılarak) örnek

4.3.2.2. Deney Prosedürü

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

Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.

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

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

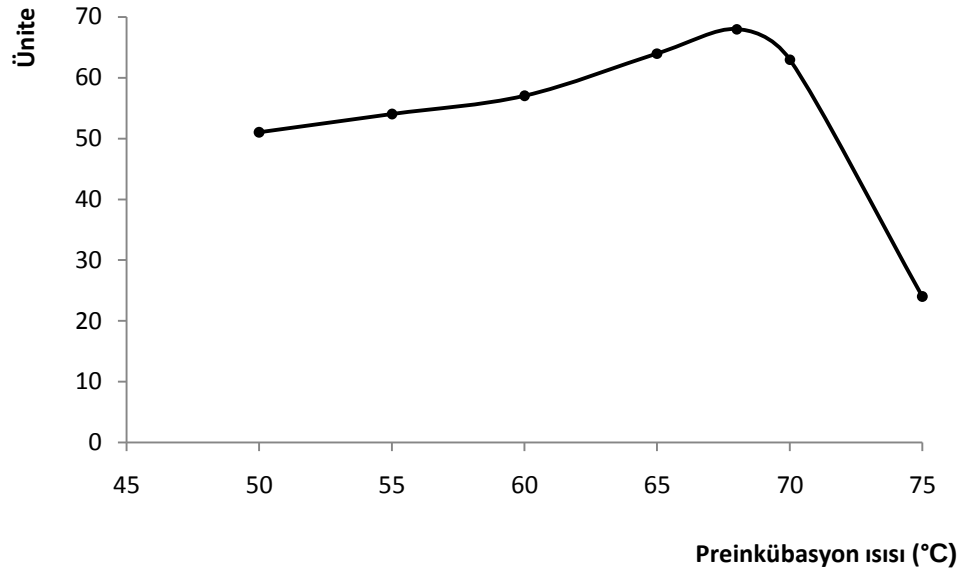
Hesaplama:

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

5. BULGULAR

5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti

Tavşan karaciğer arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır. Enzim kaynağı 1 mM MnCl_2 varlığında 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C' lerde preinkübasyon ısısına tabii tutulmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 67-68 °C arasında saptanmış olup, bu ısıdan sonra aktivitenin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Enzimin aktivasyonu için uygun preinkübasyon ısısı 65 °C olarak kabul edilmiştir (Şekil 5).

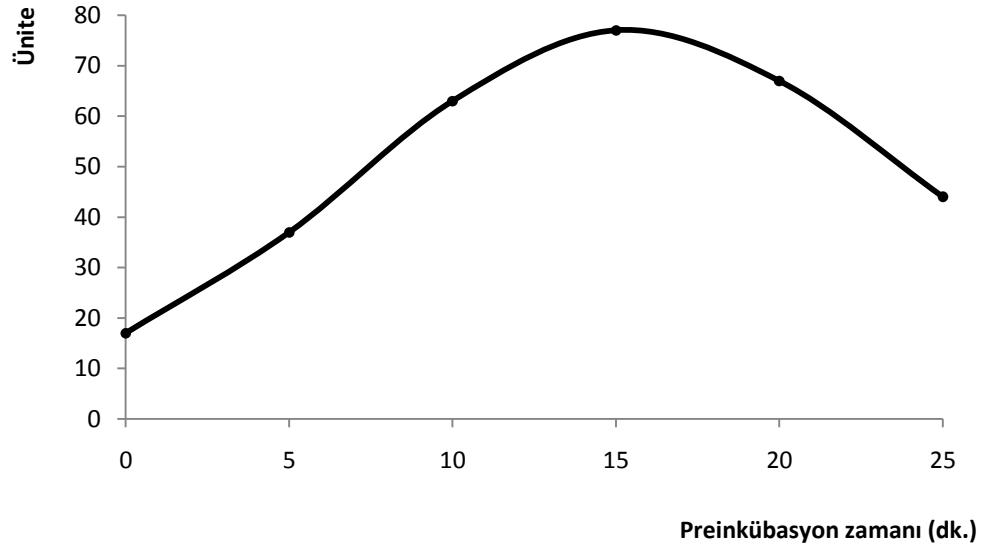


Şekil 5: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti

Tavşan karaciğer arginazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak aktivitesi araştırılmış, 1 mM MnCl_2 varlığında ve 65 °C preinkübasyon ısısında,

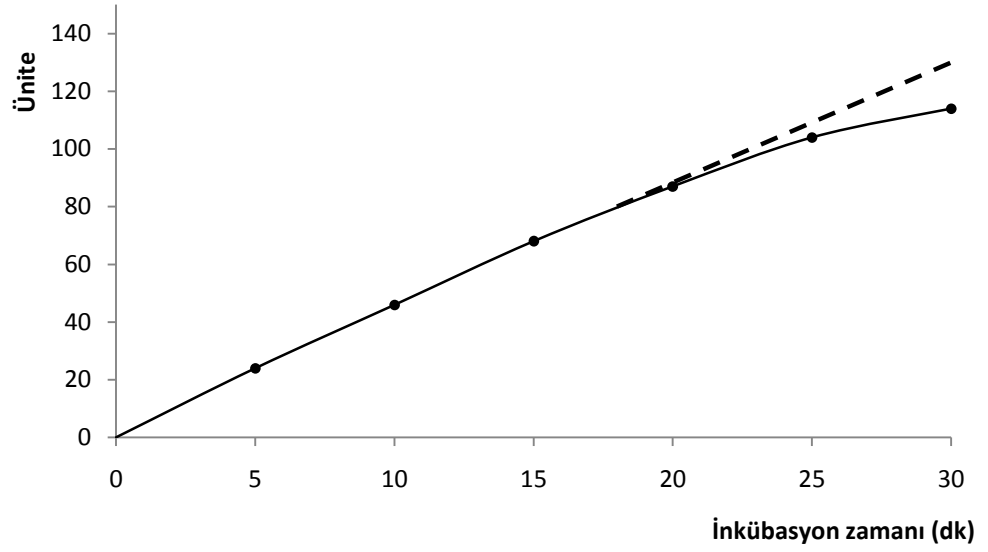
0-25 dakikalık zaman aralıklarında enzimin aktivitesi incelenmiştir. Enzimin maksimum aktiviteye 15 dakika’da ulaştığı görülmüş ve optimal preinkübasyon süresi 13 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti

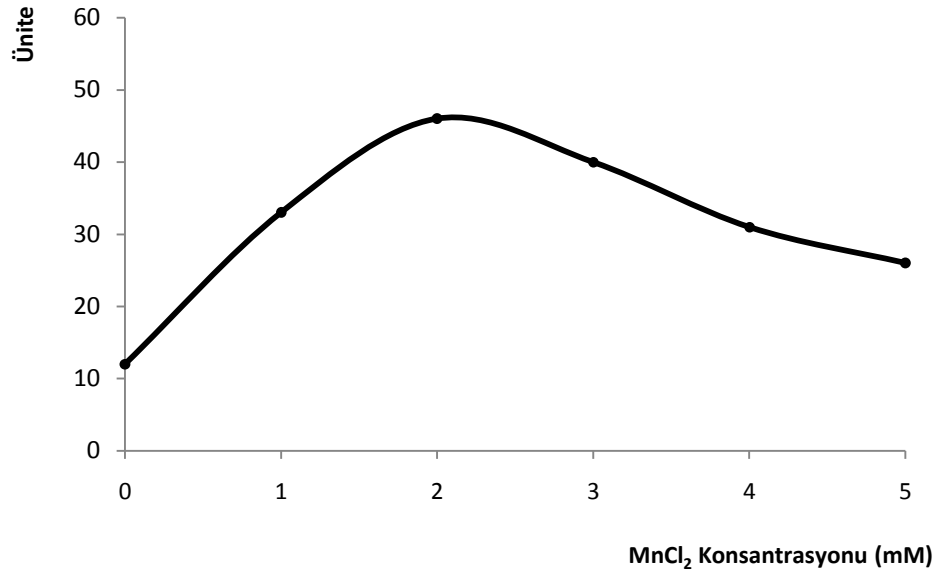
Tavşan karaciğer arginazı için optimum inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynağı 0-30 dakikalık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu argininin hidrolizi izlemiştir. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 7’de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 18. dakikaya kadar doğrusallığını korumuş, bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 7: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.4. Mangan İyonlarının Etkisi

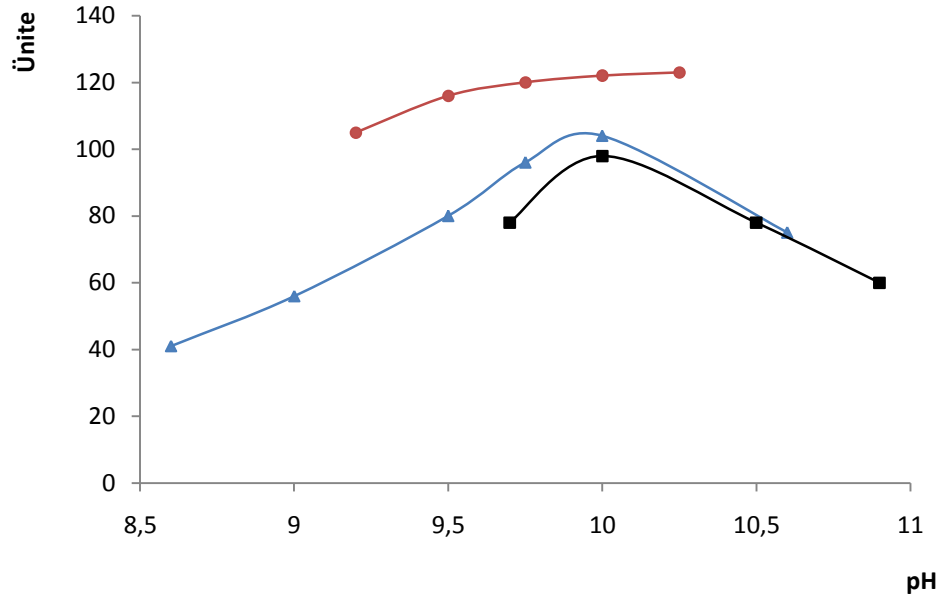
Mangan iyonları arginaz enzimi için gereklidir. Bu yüzden arginaz aktivitesi üzerine mangan iyonlarının etkisini araştırmak için 0-5 mM konsantrasyonları arasında değişen $MnCl_2$, preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Preinkübasyon ortamına Mn^{++} katılmadığı kontrol grubunda enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonları ilave edildiğinde aktivitenin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesi özellikle 2 mM $MnCl_2$ konsantrasyonuna kadar yükselmiş, 2 mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonundan sonra aktivite düşmüştür. Enzimin en yüksek aktiviteyi 2 mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonunda göstermesinden dolayı tavşan karaciğer doku arginazı için en uygun $MnCl_2$ konsantrasyonu 2 mM olarak kabul edilmiştir.



Şekil 8: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

5.5. Tavşan Karaciğer Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi

Tavşan karaciğer doku arginazının optimal pH' sı tespit etmek için pH 8,6' dan pH 11' e kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan pH 8,6-10,6 arasında olan Glisin-Sodyum hidroksit tamponu, pH sı 9,2- 10,2 arasında aktivite gösteren Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponu ve 9,7-10,9 pH' larında olan Sodyum bikarbonat-Sodyum hidroksit tamponu kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin görüldüğü pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 10-10,1' de Sodyum bikarbonat –sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiğinden tavşan karaciğer arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun sodyum bikarbonat- sodyum karbonat tamponu, optimal pH' nın da 10 olduğu kabul edilmiştir (Şekil 8).

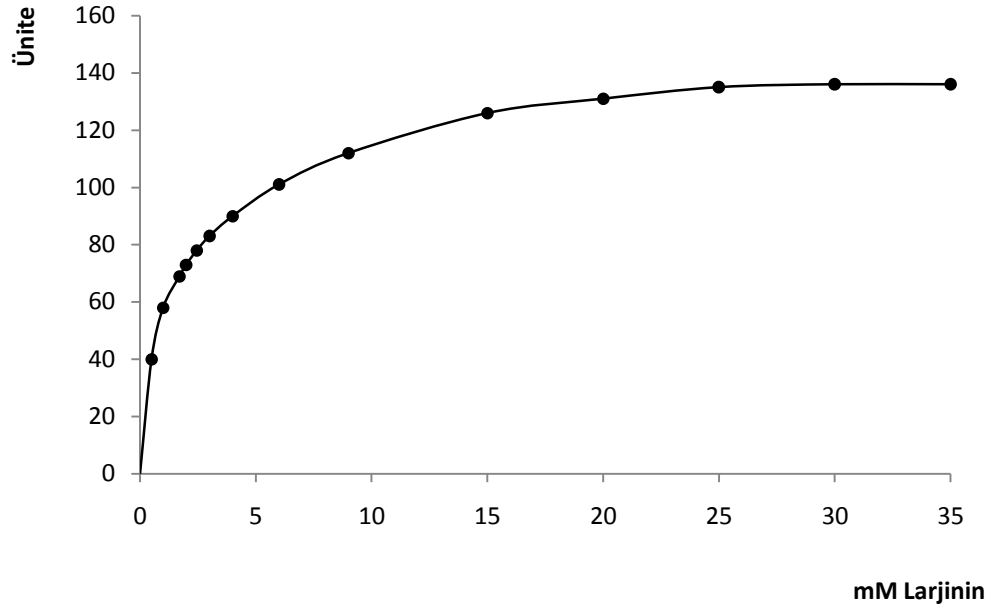


Şekil 9: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler.

(—●— NaHCO₃-Na₂CO₃ tamponu, —▲— Glisin-NaOH tamponu, —■— NaHCO₃-NaOH tamponu)

5.6. Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

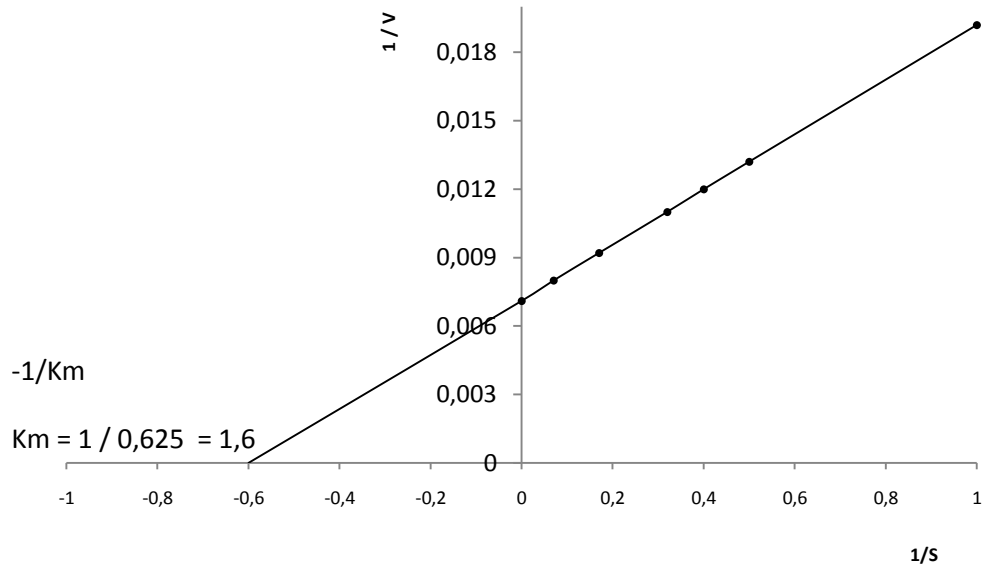
Tavşan karaciğer doku arginazı için optimal şartlar tesbit edildikten sonra, arginazın substratı olan L-arginine karşı Km'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 9). Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesine bakılmıştır. Reaksiyon hızının artışı L-arginin konsantrasyonunun artışına paralellik göstermektedir. Başlangıçta, reaksiyon hızında görülen lineer artış daha sonra hiperbolik bir görünüme bırakmakta ve en sonunda reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymuş hale gelmektedir.



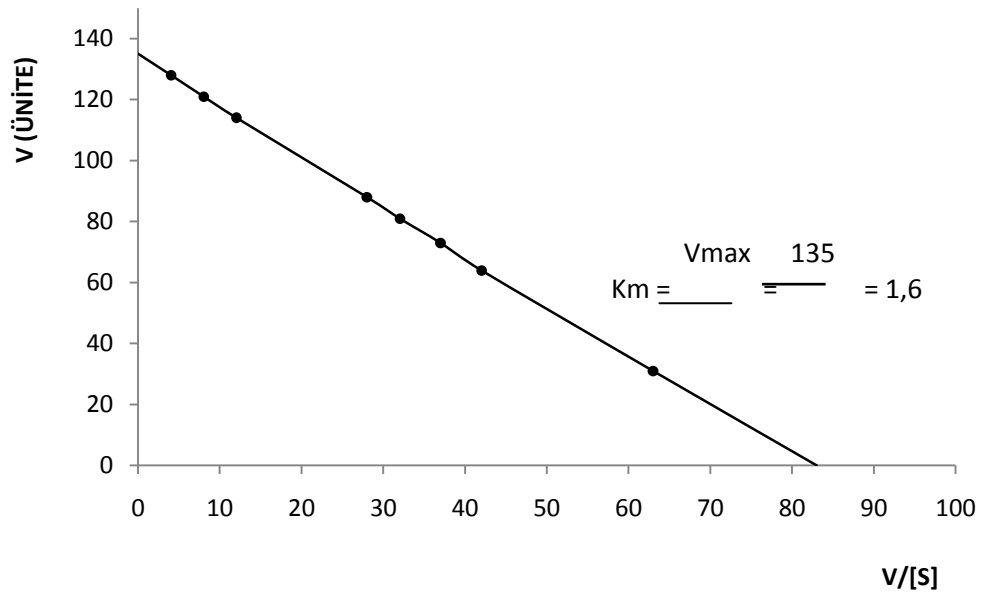
Şekil 10: Tavşan Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi

Şekil 10'da görüldüğü üzere 0.5 mM'a kadar olan L-arginin konsantrasyonundaki artış enzim aktivitesinde lineer bir artışa (birinci mertebe kinetiği) neden olmuş, bu noktadan itibaren doğrusallık yavaş yavaş kaybolarak, yerini hiperbolik bir görünüme (karışık mertebe kinetiği) bırakmıştır. 25 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 tavşan karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan K_m 'inin 1,6 mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 11: Tavşan Karaciğer Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.



Şekil 12: Tavşan Karaciğer Arginazının L-arginine Karşı Olan Km ' inin Eadie- Hofstee Eğrisi ile Saptanması

5.7. Tavşan Dokularında Arginaz Aktivitesinin dokulara göre dağılımı

Tavşanlardan alınan karaciğer örnekleri için preinkübasyon ısısı 65°C, preinkübasyon zamanı 13 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 10 kullanılarak, böbrek, kalp, uterus, beyin, dalak, bağırsak, yemek borusu, kas, dil, akciğer, mide, soluk borusundan alınan örnekler için preinkübasyon ısısı 55°C, preinkübasyon zamanı 10 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 9,5 kullanılarak deneyler yapılmış, dokuların enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Tavşan dokularındaki arginaz enziminin miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 1: Tavşan Dokularında Arginaz Düzeylerinin En Yüksek Dokudan En Düşük Dokuya Doğru Dağılımı (n: 6).

DOKU	Arginaz aktivitesi (U\mg protein)
Karaciğer	105,09 ± 12,91
Böbrek	27,03 ± 3,37
Kalp	7,55 ± 0,91
Uterus	3,03 ± 0,23
Kan	3,22 ± 0,60
Beyin	2,00 ± 0,21
Dalak	1,91 ± 0,07
Bağırsak	1,79 ± 0,44
Yemek Borusu	1,76 ± 0,09
Kas	1,60 ± 0,64
Dil	1,56 ± 0,18
Akciğer	1,51 ± 0,10
Mide	1,08 ± 0,57
Soluk Borusu	0,45 ± 0,07

6. TARTIŞMA

Yapılan bir çok araştırmada farklı doku ve hayvan türlerinde arginaz enziminin optimal şartları ve kinetik özellikleri ortaya konulmuştur. Tavşan karaciğer doku arginaz enziminin kinetik özellikleri ile daha önce çalışıldığına dair hiçbir literatür bilgiye rastlanılmamış ve bu çalışmada enzimin bazı özellikleri ortaya konulmuştur.

Enzimlerin genel yapısının protein kaynaklı olması nedeniyle ısıya dayanıklı değildirler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği ısının üzerine çıkıldığı zaman enzim aktivitesi düşmektedir. Tavşan karaciğer doku arginazının preinkübasyon ısını saptamak için farklı ısılarda (50-75 °C) enzim aktivitesine bakılmış ve en uygun preinkübasyon ısısının 65 °C olduğu, bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği tespit edilmiştir. Preinkübasyon ısısı farklı tür ve dokularda araştırılmış ve tüm metodlarda kullanıldığı görülmüştür. Preinkübasyon ısısı koyun gözü vitreusu için 40 °C (22), koyun meme doku arginazı için 52 °C (60), insan tükürük arginazı (40), tiroid doku arginazı (32), eritrosit ve uterus arginazı (23), bronş lavaj sıvısı arginazı (2) için 55 °C, diabetik rat karaciğeri için 68 °C (16), sığır rumen doku arginazı için 60 °C (18), kobay karaciğer arginazı için 45 °C (77), teleskop balığı karaciğeri için 37 °C (75), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 65 °C (6), M. benedeni arginazı için 53 °C (61) olarak bildirilmiştir.

Preinkübasyon ısısının Mn^{+2} iyonlarına gereksinimini tespit etmek için enzim kaynağı $MnCl_2$ ' lü ve $MnCl_2$ ' süz (distile su ile) preinkübasyona tabii tutulmuştur. $MnCl_2$ ' lü preinkübasyon uygulanan enzim kaynağının, $MnCl_2$ ' süz preinkübasyon uygulanan enzim kaynağından yaklaşık 4 kat daha fazla aktivite

gösterdiği saptanmıştır. Mn^{+2} iyonları preinkübasyon için gereklidir. Mn^{+2} iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğu ve enzim - Mn^{+2} - arginin kompleksinin meydana gelmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (66). Yapılan çalışmalarda preinkübasyon ortamına Mn^{+2} 'nin ilavesinin enzim aktivitesini artırdığı görülmüştür (18,60). Mn^{+2} 'nin preinkübasyon sırasında arginaza bağlanarak enzim aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığı açıklanmıştır (50).

Çeşitli doku arginazları için preinkübasyon ısısının ve Mn^{+2} iyonlarının gerekli olduğu ve aktiviteyi artırdığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (18,58,60). Sıçan karaciğer doku arginazının Mn^{+2} iyonları varlığında 55 °C' de preinkübasyonunun enzim aktivitesini yaklaşık % 110 artırdığı (71), 5 mM $MnCl_2$ ' varlığında ve 55 °C' de 20 dakika preinkübasyonla eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığı saptanmıştır (14). Sonuç olarak arginaz aktivitesi için preinkübasyon ve Mn^{+2} iyonları gereklidir.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn^{+2} katyonlarının gerekli olduğu Muszynska (54) tarafından belirtilmiştir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimi inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (33). Bu nedenle tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine $MnCl_2$ konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin 2 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için gerekli olan $MnCl_2$ konsantrasyonu farklı olup rat karaciğeri (39) ve sığır rumen doku arginazı (18) için 2 mM, M. benedeni arginazı

için 0.5 mM (61), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı için 50 mM (64), insan tiroid arginazı (32) ile karaciğer ve eritrosit arginazı (23) için 2.5 mM, insan tükürük arginazı (40) ve vitreus arginazı (22) için 5 mM, koyun meme doku arginazı için 0.75 mM (60), insan uterusu için 0.8 mM (23), kobay karaciğer arginazı için 10 mM (77), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 1 mM (6), diabetik rat karaciğer arginazı için 1-2 mM, böbrek arginazı için 2 mM olarak bulunmuştur (16). Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta manganın arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal mangan derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir.

Tavşan karaciğer doku arginaz enziminin en uygun preinkübasyon süresini tespit edebilmek için enzim 65 °C’ de 0-30 dakikalar arasında preinkübasyona tabii tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 13 dakika olduğu tespit edilmiştir. Preinkübasyon süresi koyun meme doku arginazı (60) ve insan tiroid doku arginazı (32) için 12 dakika, koyun gözü vitreusu için 9-10 dakika (22), insan tükürük arginazı (40), bronş lavaj sıvısı arginazı (2) ve diabetik rat karaciğeri (16) için 20 dakika, sığır rumen doku arginazı (18), eritrosit arginazı (23) ve kobay karaciğer arginazı (77) için 5 dakika, uterus arginazı için 35 dakika (23), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 15 dakika (6) , *M. benedeni* arginazı için 10 dakika olarak belirlenmiştir (61).

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında oluştuğu için enzim kaynağı 37 °C’ de 0-30 dakikalar arasında inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışılmış, 18. dakikaya kadar lineerliğin devam ettiği, 18. dakikadan sonra lineerliğin yerini hiberbolik bir görünümün aldığı gözlemlenmiştir. Tavşan karaciğer doku arginazı için optimum inkübasyon süresi

10 dakika olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri tesbit edilmiştir. Inkübasyon süresi insan tiroid arginazı için 30 dakika (32), rat karaciğeri (16), insan karaciğer ve uterusu (23) için 20 dakika, koyun gözü vitreusu (22) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (6) için 10 dakika, sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (17), M. Benedeni arginazı (61) ve koyun meme doku arginazı için 15 dakika (60) olarak bulunmuştur.

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır (6, 16, 18, 22, 23, 32, 57, 60, 61). Tavşan karaciğer doku arginazının optimal pH' sını tespit etmek için pH 8,6' dan pH 10,9' a kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan pH 8,6-10,9 arasında olan Glisin-Sodyum hidroksit tamponu, pH sı 9.2- 10.2 arasında olan Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu ve 9,7-10.9 pH' larında olan Sodyum bikarbonat-Sodyum hidroksit tamponu kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 10-10,1' de Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiği için tavşan karaciğer arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu, optimal pH' nın da 10 olduğu kabul edilmiştir.

Karaciğer ve eritrosit arginazı (14), M.expensa arginazı (58), koyun meme doku arginazı (60), M.benedeni arginazı (61) için pH 9.5' deki karbonat tamponu, sığır rumen doku arginazı (18) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (6) için pH 10' daki karbonat tamponu, diabetik rat karaciğeri (16) için pH 10.1' deki karbonat tamponu, insan karaciğer ve eritrositi için pH 9,7' deki, insan uterusu için ise pH 9.6' daki karbonat tamponunun kullanıldığı (23) bildirilmiştir. Koyun

gözü vitreusu için pH 8.8' deki Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı (22), insan tiroid arginazının optimum pH' sının 9,6 (32), kobay karaciğer arginazının pH' sının 10.5 (77), *Genypterus maculatus* türünden balıkların karaciğer arginazının (11) pH'sının 9.5 olduğu tespit edilmiştir. Tavşan karaciğer arginazı için optimum pH diğer arginazlar için belirlenen optimum pH'a benzerdir. Görüldüğü gibi arginazlar bazik optimum pH'a sahiptir.

Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin L-arginine karşı olan Km' i araştırılmış, bu nedenle enzim miktarı sabit tutularak L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüş ve Km değeri 1.6 mM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda farklı türden enzim kaynaklarındaki arginazın L-arginine karşı olan Km' inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değerleri sığır rumen doku arginazı (18) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (6) için 4 mM, *M. benedeni* arginazı için 12.5 mM (61), insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM (23), tiroid arginazı için 2 mM (32), vitreus arginazı için 6 mM (22), koyun meme doku arginazı için 1.35 mM (60), diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM (16), *Mus booduga* karaciğer arginazı için 8.3 mM (68), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı için 29 mM (64), kobay karaciğer arginazı için 19.6 mM (77) olarak bulunmuştur. Tavşan karaciğer doku arginazı için bulduğumuz Km değeri yapılan çalışmalarda elde edilen Km değerleri sınırları içerisindedir.

Tavşanlardan böbrek, kalp, uterus, beyin, dalak, bağırsak, yemek borusu, kas, dil, akciğer, mide, soluk borusundan örnekler alınarak homojenat hazırlanmış, preinkübasyon ısısı 55°C, preinkübasyon zamanı 10 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 9,5 da arginaz aktiviteleri

ölçülmüştür. Tavşan dokularındaki arginaz enziminin miktarları tesbit edilmiştir. Araştırdığımız dokular içerisinde en yüksek arginaz aktivitesi karaciğerde en düşük arginaz aktivitesi soluk borusunda tespit ettik.

Çeşitli memeli türlerinin eritrositlerinde arginaz aktivitesi tayin edildiğinde primatlarla karşılaştırıldığında (maymun, orangutan, gorilla, insan...) primat olmayan türlerde (fare, rat, tavşan, kedi, köpek) eritrosit arginaz aktivitesi tespit edilemeyecek seviyelerde ($< 1.0 \mu\text{mol üre /g Hb/saat}$) bulunmuştur (81). Bu çalışmada ise eritrosit arginaz aktivitesini $3,22 \pm 0.60$ olarak tespit ettik.

Lisowska-Myjak ve ark.(45) 31 türün bağırsak arginaz aktivitesini ölçmüş bağırsak arginaz aktivitesinin türden türe 2 ile 100 misli arasında geniş bir farklılık gösterdiğini ve en yüksek bağırsak arginaz aktivitelerinin tavşan, rat, hamster ve farelerde olduğunu tespit etmiştir. Rat, fare, kobay ve tavşanın sublingual, submandibular ve protis bezlerindeki arginaz aktivitesine göre bu türler iki gruba ayrılır. Fare ve ratların tükürük bezlerinde arginaz aktivitesinin değişen seviyeleri bulunurken tavşan ve kobayın tükürük bezleri hemen hemen hiç arginaz aktivitesine sahip değildir (87).

Bugüne kadar tavşan karaciğer doku arginaz enziminin kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığı literatür taramalarından anlaşılmaktadır. Bu nedenle tavşan karaciğer dokusunda arginaz enziminin kinetik özellikleri saptanmış ve tavşan dokularındaki arginazın dağılımına bakılmıştır. Tavşan karaciğer arginazının aktivasyonu için preinkübasyonun ve Mn^{+2} katyonlarının gerekli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilerin bu konu ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Adamson I, Fisher H. (1976). Further studies on the arginine requirement of the rabbit. *J Nutr.* 106 (6): 717-23.
2. Altundağ Y. (2001). Bronj Lavaj Sıvısında Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
3. Aminlari M, Vaseghi T. (1992). Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 103, 2: 385-389 .
4. Ash DE. (2004). Structure and Function of Arginase. *American Society for Nutritional Sciences.* 22: 2760-2764.
5. Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato PG, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R. (2004). Arginase Pathway in Human Endothelial Cells in Pathophysiological Conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 37: 515-523.
6. Benzer F, Ozan ST. (2002). Fasciolosisli Koyunların Arginaz Enzim Aktivite Düzeyleri ile Karaciğer Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 16, 2: 217-222.
7. Brusdeilins M, Kühner R, Schumacter K. (1985). Purification, Affinity to Anti-Human Arginase Immunoglobulin- Sepharose 4 B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 840: 79-90.
8. Campbell JW, Lee TW. (1963). Ornithine Transcarbamylase and Arginase Activity in Flatworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 8: 29-38.
9. Carnaval N, Bustamante M, Hinrichsen P, Torres A. (1984). Properties of Arginase from the Sea Mollusc *Concholepas Concholepas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 78, 3: 591-594.
10. Carnaval N, Cederbaum SD. (1986). Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Proline and Branched- Chain Amino Acids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 870: 181-184.
11. Carvajal N, Kessi E, Ainol L. (1987). Subcellular Localization and Kinetic Properties of Arginase from the Liver of *Genypterus Maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 88, 1: 229-31.
12. Champe PC, Harvey RA. (Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.) (1997). Lippicott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 236-241
13. Chen PC, Broome JD. (1980). Mouse Macrophage Arginase. *Analyt. Biochem.* 163: 354-359.
14. Colombo JP, Konarska L. (1984). Arginase; In: Bergmayer Grab M. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis.* 3 rd Ed. Weinheim Verlag Chemie. 285-294.

15. Erisir M, Aydilek N, Aksakal M. (2005). Effect of Vitamin E on Arginase Activity in the Liver and Kidneys of Testosterone-Treated and Castrated Rabbits. *Acta Vet. Brno.* 74:527-531.
16. Erisir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. (2005). Evaluation of Optimal Conditions for Arginase Activity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Vet. Med.-Czech.* 50, 2: 69-76.
17. Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M. (2003). Effects of Dietary Vitamin E and Selenioses of Glucocorticoid. Cell Bioum on Arginase Activity in the Liver, Kidney and Heart of Rats Treated with High Dchemstry and Function. 21: 331-335.
18. Erişir M. (1997). Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
19. Fuentes JM, Campo ML. Soler G. (1994). Kinetics and İnhibition by Some Amino acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 102, 5: 255-258.
20. Geyer JW, Dabich D. (1971) Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.* 39: 412-417.
21. Gözükar EM. (1997). Enzimler. “Biyokimya II”. Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 572-678.
22. Gürsu FM. (1993). Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
23. Halifeoğlu İ. (1993). İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
24. Hayashi T, Esaki T, Sumi D, Mukherjee T, Iguchi A, Chaudhuri G (2006). Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* 103(27): 10485-90.
25. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, van de Sand A, Klein K, Rassaf T, Konietzka I, Sewell A, Menazza S, Canton M, Heusch G, Di Lisa F, Schulz R (2010). Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(2): H446-53.
26. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racké K. (1997). İnhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 121 (3): 395-400.
27. Hosoyama Y. (1972). The Reversible İnactivation of Rat Liver Arginase at Low pH. *Eur.J. Biochem.* 27: 48-52.
28. Husson A, Bouazza M, Buquet C, Vaillant R. (1985). Role of Dexamethasone and Insulin on the Development of the Five Urea-Cycle Enzymes in Cultured Rat Foetal Hepatocytes. *Biochem. J.* 225: 271-274.

29. Ikemato M, Tabata M, Murachi T, Totani M. (1989). Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. *Ann. Clin. Biochem.* 26: 547-553.
30. Ishikawa T, Harada T, Koi H, Kubota T, Azuma H, Aso T. (2006). Identification of Arginase in Human Placental Villi. *Placenta.* 1-6.
31. Ishizaka M, Nagai A, Iwanaga M, Imamura M, Azuma H. (2007). Possible involvement of enhanced arginase activity due to up-regulated arginases and decreased hydroxyarginine in accelerating intimal hyperplasia with hyperglycemia. *Vascul Pharmacol.* 47 (5-6): 272-80.
32. İlhan N. (1992). İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
33. İlhan N. (1993). Tiroid Arginaz Enzim Aktivitesinin Farklı Metal İyonları Varlığında Isıya Karşı Stabilitesi. *Biyokimya Dergisi.* 18: 59-67. 74.
34. Kang JH, Cho YD. (1990). Purification and Properties of Arginase from Soybean, *Glycine max*, Axes. *Plant Physiol.* 93: 1230-1234.
35. Kandemir F.M. (2009). Koyun Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ
36. Kaplan LA. (1987) . Urea. “ Methods in Clinical Chemistry”. Pesce AJ, Kaplan LA. (Editörler). The CV Mosby Company, Toronto. Sayfa 22-27.
37. Kawano K, Masuda H, Yano M, Kihara K, Sugimoto A, Azuma H. (2006). Altered nitric oxide synthase, arginase and ornithine decarboxylase activities, and polyamine synthesis in response to ischemia of the rabbit detrusor. *J Urol.* 176 (1): 387-93.
38. Kepka-Lenhart D, Ash DE, Morris SM. (2008). Determination of Mammalian Arginase Activity. *Methods Enzymol.* 440: 221-30.
39. Kochakain CD, Berlett NM. (1948). The Effect of Crystalline Adrenal Cortical Steroids, DL-Thyroxine and Epinefrine on the Alkaline and Acids Phosphatases and Arginase of the Liver and Kidney of the Normal Adult Rat. *J. Biol. Chem.* 176: 243-247.
40. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG. (1985). Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininemia. *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23, 6: 337-342.
41. Konarska L, Tomaszewski L, Rolezyk U. (1986). Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology.*35: 170-178.
42. Konarska L, Tomaszewski L. (1986). Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, *Biochem.Med. and Met. Biol.* 35: 156-169.
43. Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. (1991). pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentration. *Archives of Biochemsitry and Biophysics.* 286, 1: 217-221. 70.

44. Kumar AN, Kalyankar GD. (1984). Effect of Steroid Hormones on Age Dependent Changes in Rat Arginase Isoenzymes. *Experimental Gerontology*. 19: 191-198.
45. Lisowska-Myjak B, Tomaszewski L, Kraszewska-Domańska B. (1987). Intestinal arginase in the phylogenetic development of animals. *Pol Arch Weter*. 25 (2-3): 283-96.
46. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
47. Mafune N, Ideta N, Watabe H, Nagura H, Kobayashi K. (1985). Occurrence of cytotoxic autoantibody in rabbits by immunization with heterologous liver arginase: a possible implication in the mechanism of the autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol*. 59 (1):123-31.
48. Makarenko ON, Skorik LV, Mel'nychuk DA. 64. (1992). The characteristics of nitrogen metabolism in the tissues of rabbits with ammonium toxicosis. *Ukr Biokhim Zh*. 64 (6):105-9.
49. Martincic T, Krvavica S. (1964). Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Ruminal Mucosa of Cattle. *Vet. Arh. Zagreb, Svezak*. 3-4: 90-93.
50. Mohammed SM, Greenberg DM. (1945). Liver Arginase I. Preparation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, Inhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys*. 8: 349-357.
51. Moreno-Vivian C, Soler G, Castillo F. (1992). Arginine Katabolism in the Phototrophic Bacterium *Rhodobactercapsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem*. 204: 531-537.
52. Murray RK., Granner DK., Mayes PA, Rodwell VW. (1991). Metabolism of Proteins and Amino Acids. In: "Harper's Biochemistry". Twenty-second ed., Typopress, Lebanon .267-330.
53. Muszynska G, Wojtczak M. (1979). Influence of Immobilization on Conformation of Rat Liver Arginase. *Int. J. Biochem*. 10, 665-668.
54. Muszynska G, Severina LO, Lobyreva LW. (1972). Characteristics of Arginase from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organism. *Acta Biochem. Pol*. 19, 2: 109-111.
55. Muszynska G. (1976). Immobilization of Rat Liver Arginase. C.I Biospecific Chromatography. *Protides of the Biological Fluids* 23 RD. Colloguim. Oxford and New York. Pergamon Press, 633-637.
56. Nadolska-Lutyk J, Grabon W, Poremska Z. (1990). Arginase in Bull Testis. *Acta Biochimica Polonica*. 37, 3: 377-384.
57. Ozan S, Gülen Ş. (1989). Sığır Tükürüğünde Arginaz Enzimi ve Özelliklerinin Tükürük Bezleri, Eritrosit ve Karaciğer ile Karşılaştırılması. *Doğa Tr. Vet. ve Hay*. 13, 2: 154-163.
58. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. (1993). Kısmen Arıtılmış *Moniezia* Expensa Arginazının Bazı Özellikleri. *Tr. J. Vet. Anim. Sci*. 17: 245-250.
59. Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. (1999). Akkaraman ve İvesi Koyunlarında, Gebelikte ve Doğumdan Sonra Eritrosit, Tükürük ve Serum Arginaz

- Aktiviteleri İle Serum Üre ve Östrojen Düzeyleri. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 23: 345-350.
60. Özçelik M. (2002). Koyun Meme Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
 61. Özdemir N. (1990). Moniezia Benedeni Arginazının Bazı Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
 62. Pegg AE, Mccann P. (1988). Polyamine Metabolism and Function in Mammalian Cells and Protozoans. *Isı Atlas of Sci. Biochem.* 11-18.
 63. Pegg AE, Mccann P. (1982). Polyamine Metabolism and Function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 243, 12: 212-221.
 64. Peiser L, Balinsky JB. (1982). Kinetic Properties of Arginase from *Xenopus Laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 73, 2: 215-220.
 65. Porembska Z, Zamecka E. (1984). Immunological Properties of Rat Arginases. *Acta Biochimica Polonica.* 31, 2: 223-227.
 66. Porembska Z., Grabon W., Zelazowska, Cieczot H, Zamecka E. (1993). Nonidentity of Subunits of Human Kidney Arginase A1 and Human Liver Arginase A5. *Acta Biochimica Polonica.* 40, 4: 465-470.
 67. Powers GS, Meister T. (1982). Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. "The Liver: Biology and Pathobiology". I. Arias, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz. (Eds). Raven Pres, New York. 251-263.
 68. Prasad GV, Lokanatha V, Sreekanth K, Rajendra W. (1997). Purification and Kinetic Properties of Mus Booduga (Gray) Hepatic Arginase. *Journal of Enzyme Inhibition.* 12,4: 255-272.
 69. Rawn JD. (1989). Catabolism of Amino Acids and the Urea Cycle. In: "Biochemistry". First ed., Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina. 457-487.
 70. Reyero C, Dorner F. (1975). Purification of Arginases from Human-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of Their Physicochemical and Kinetic Properties. *Eur. J. Biochem.* 56: 137-147.
 71. Schimke RT. (1962). Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* 237, 2: 59-467.
 72. Shimbayashi K, Yonemura T. (1970). An Aspect of Urea Cycle enzymes in Goat. *Agr. Biol. Chem.* 34, 11: 1603-1609.
 73. Shombough G.E.(1978). Urea Biosynthesis II. Normal Abnormal Regulation. *The American Journal and Nutrition.* 31: 126-133.
 74. Silva V. (1993): The Diagnosis of Urea Cycle Disorders. *Lab. Medica International.* 10,3:13-15.
 75. Singh RA, Singh SN. (1990). Purification and Properties of Liver Arginase from Teleostean Fish *Clarias Batrachus* (L.). *Arch Int Physiol Biochim.* 98, 6: 411-9.

76. Skrzypek-Osiecka I, Robin Y, Porembska Z. (1983). Purification of Rat Kidney Arginases A1 and A4 and Their Subcellular Distribution. *Acta Biochim Pol.* 30, 1:83-92.
77. Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. (1981). Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginase (author's transl)]. *Rev Esp Fisiol.* 37, 1: 37-44.
78. Sondaç Ü. (1991). Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ.
79. Spector EB, Rice SCH, Cederbaum S.D. (1983). Immunologic Studies of Arginase in Tissues of Normal Human Adult and Arginase-Deficient Patients. *Pediatric Research.* 17, 12: 941-944.
80. Spector EB, Kern RM, Haggerty DF, Cederbaum SD. (1985). Differential expression of multiple forms of arginase in cultured cells. *Mol Cell Biochem.* 66 (1): 45-53.
81. Spector EB, Rice SC, Kern RM, Hendrickson R, Cederbaum SD. (1985). Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates, and man: evolution to high activity in primates. *Am J Hum Genet* 37 (6): 1138-45.
82. Spolarics Z, Bond JS. (1988). Multiple Molecular Forms of Mouse Liver Arginase. *Archs. Biochem. Biophys.* 260, 1: 469-479.
83. Straus B, Cepelak I, Festa G. (1992). Arginase, A New Marker of Mammary Carcinoma *Clinica Chimica Acta.* 210: 5-12.
84. Tümer GE, Weiss RL. (2006). Developmental Expression of two Forms of Arginase in *Neurospora Crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1760: 848-857.
85. Vielle-Breitburd F, Orth G. (1972). Rabbit liver L-arginase. Purification, properties, and subunit structure. *J Biol Chem.* 247 (4): 1227-35.
86. Wang XP, Chen YG, Qin WD, Zhang W, Wei SJ, Wang J, Liu FQ, Gong L, An FS, Zhang Y, Chen ZY, Zhang MX. (2011). Arginase I attenuates inflammatory cytokine secretion induced by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(8): 1853-60.
87. Yasuda N, Moriwaki K, Furuyama S. (2004). Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals. *J Comp Physiol B.* 174 (3): 237-42.
88. Zamecka E, Porembska Z. (1988). Five Forms of Arginase in Human Tissues. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39, 3: 258-66.

8. ÖZGEÇMİŞ

1979 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da, tamamladım. 2002 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2006 yılında mezun oldum. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Evli ve bir çocuk annesiyim.