

## Koyun Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri <sup>[1]</sup>

Fatih Mehmet KANDEMİR \*  Necmi ÖZDEMİR \*

[1] "Koyun Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri" adlı Doktora tezinin bir kısmından alınmış olup Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1398)

\* Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/057-A

### Özet

Bu çalışma ile koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri ilk kez laboratuvarımızda optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılan dalak dokuları Elazığ'daki Elkas kesimeviden temin edilmiştir. Arginaz aktivitesini ölçmede tiyosemikarbazid-diasetilmonoksim üre (TDMU) metodu kullanılmıştır. Protein Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre ölçülmüştür. Koyun dalak doku arginazı için preinkübasyon ısı 58°C, preinkübasyon zamanı 13 dak., inkübasyon zamanı 10 dak. ve optimum pH 9.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca koyun dalak doku arginazının çeşitli metal iyonlarına karşı duyarlılığı tespit edilmiş ve metal iyonları (Mn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Ag<sup>+1</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Li<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup>, Al<sup>+3</sup>, Mo<sup>+6</sup>, Na<sup>+1</sup> ve Ca<sup>+2</sup>) içinde enzim aktivitesi üzerine etkili metal iyonunun Mn<sup>+2</sup> olduğu bulunmuştur. Enzim 2 mM'lık MnCl<sub>2</sub> derişiminde en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Pb<sup>+2</sup> ve Ag<sup>+1</sup> iyonları varlığında enzim hiç aktivite göstermemiştir. Koyun dalak doku arginazının arginin için Km'i 6 mM olarak saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** : Arginaz, Koyun dalak dokusu, Kinetik özellikler

## Some Kinetic Properties of Arginase in Sheep Spleen Tissue

### Summary

In this study, some kinetic properties of arginase in the sheep spleen tissue was been optimized at first time in our laboratory. The spleen tissues used in the present study were obtained from the Elkas slaughterhouse in Elazığ. The thiosemicarbazide- diacetylmonoxime urea (TDMU) method was used to measure arginase activity. Protein was measured by the method of Lowry et al. Its was found to be preincubation temperature 58°C, preincubation period 13 min, incubation period 10 min and optimum pH 9.5 for sheep spleen tissues. Furthermore, it was found that arginase in sheep spleen tissue was sensitive to different metal ions. It was found that the most effective was Mn<sup>+2</sup> from among (Mn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Ag<sup>+1</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Li<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup>, Al<sup>+3</sup>, Mo<sup>+6</sup>, Na<sup>+1</sup> and Ca<sup>+2</sup>) metal ions. Arginase showed the highest activity in a 2 mM MnCl<sub>2</sub> concentration. The enzyme has no activity in presence of Pb<sup>+2</sup> and Ag<sup>+1</sup> ions. Km of arginase in sheep spleen tissue for arginine were determined to be 6 mM.

**Keywords:** Arginase, Sheep spleen tissue, Kinetic properties

### GİRİŞ

Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından saptanan arginaz (E.C. 3.5.3.1, L-argininamidohidrolaz) üre döngüsünün son enzimidir <sup>1</sup>. L-argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden arginazın iki izoformu vardır. Arginaz I sitoplazmada lokalize olurken arginaz II mitokondriada bulunmaktadır <sup>2</sup>.

Üre döngüsü sadece karaciğer hücrelerinde olmasına karşın arginaz enzimi birçok hücrede görülmektedir. Arginaz bakımından en zengin organ karaciğer olup üre döngüsüne katılarak amonyağı toksik olma-

yan bileşiklere dönüştürür. Karaciğer dokusu dışında böbrek, beyin, bağırsak, tiroid bezi, eritrosit, lökosit, trombosit, iskelet ve kalp kası, plasenta, testis, meme gibi birçok dokuda düşük düzeyde bulunduğu ve üre döngüsü dışında özellikle poliamin sentezine katılmak ve protein biyosentezi için gerekli olan prolinin sentezlenmesi olmak üzere özel fonksiyonlara sahip olduğu açıklanmıştır <sup>3</sup>.

Arginaz enziminin bir çok metabolik özelliklere sahip olduğu ve bazı hastalıklarda rol oynadığı yapılan



İletişim (Correspondence)



+90 424 2370000/3977



fmk\_03@mynet.com & fmkandemir@firat.edu.tr

çalışmalardan anlaşılmaktadır. Akciğer kanserli hastalarda yapılan bir araştırmada tümör dokusundaki arginaz aktivitesinin kontrole göre arttığı saptanmış, bu artışında poliamin biyosentezindeki hızlanmaya neden olduğu ve bu nedenle arginaz enziminin kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir <sup>4</sup>. Arginaz aktivitesi ile akciğer hastalıklarının ilgisi araştırılmış ve artan arginaz aktivitesinin akciğerdeki hava yollarının tıkanmasına sebep olduğu, bunun da astım, kistik fibrozis gibi diğer akciğer hastalıklarına yol açabileceği bildirilmiştir <sup>5,6</sup>.

Meme kanseri yönünden yüksek riske sahip olan apokrin kist sıvılarında arginaz enzim aktivitesi, düşük risk grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve arginaz enziminin kanser oluşumunda etkili bir ajan olarak gösterilen poliaminlerin sentezini artırarak, özellikle apokrin kiste sahip kistlerde dengenin meme kanseri yönünde kaymasına neden olabileceği kanısına varılmıştır <sup>7</sup>.

Mide kanserli hastaların mide mukozasında arginaz enzimi ile birlikte glukokortikoid reseptör düzeyinde de artış meydana geldiği gözlenmiş ve arginaz enziminin de glukokortikoidler gibi immunosupressif ajan olduğu, artan glukokortikoid reseptörleri ile birlikte arginazında kanser etiyolojisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür <sup>8</sup>. Başka bir çalışmada da arginazın kanser hücrelerinin sitoplazmasında normal hücrelere göre daha fazla bulunduğu, lenfosit proliferasyonunu güçlüce inhibe ettiği ve hücreselel immunitiyi baskıladığı bildirilmiştir <sup>9</sup>. İnsan göbek kordonu epitelyal hücrelerinin L-argininden yararlanabilmesi için arginazın önemli bir metabolik yol olduğu ve normal proliferasyonu için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca yangısal olaylarda arginaz aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada endotelial arginaz aktivitesindeki çeşitliliğin kardiyovasküler fonksiyon, angiogenez ve yara iyileşme sürecinde bir gösterge olabileceğini tahmin edilmektedir <sup>10</sup>.

Arginaz enzimi hormonal etkiye bağlı olarak da değişebilmektedir. Kortikosteronun karaciğer arginaz aktivitesini <sup>11</sup>, testosteronun böbrek arginaz aktivitesini <sup>12</sup>, tiroksin ve hidrokortizonun ince bağırsak ve böbrek arginaz aktivitesini artırdığı <sup>13</sup> bildirilmiştir.

Paraziter enfeksiyonlarda da arginaz aktivitesi değişebilmektedir. Chagas Hastalığına neden olan *Trypanosoma cruzi* ile enfekte farelerin kalplerindeki Th2 sitokinlerinin arginaz üretimini artırdığı tespit edilmiştir <sup>14</sup>. *Fasciola gigantica* ile enfekte koyun karaciğerinde de arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur <sup>15</sup>.

Bugüne kadar değişik hayvan türlerinde ve doku-

larda arginaz enziminin kinetik özellikleri ortaya konmaya çalışılmış ama yapılan literatür taramalarında koyun dalak doku arginazının kinetik özellikleri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle yaptığımız çalışmada koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özelliklerinin ilk kez optimize edilerek ortaya konması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### *Dokuların Toplanması*

Araştırma materyali olan koyun dalağı Elazığ Elkas tesislerine kesim için getirilen 2-3 yaşlarındaki, barınak, bakım ve beslenme şartları aynı olan bir sürüdeki 20 adet Akkaraman ırkı koyunlardan temin edilmiştir. Kesimden sonra alınan dalak dokusu, üzerindeki kan ve pıhtıdan temizlendikten sonra %0.9'luk soğuk NaCl çözeltisi içerisinde behere aktarılmış ve buz içerisinde hızlı bir şekilde laboratuara ulaştırılmıştır. Alınan dokularda toplam arginaz aktivitesine hemen bakılmış olup, dokunun kinetik çalışması için gerekli aktiviteyi içerdiiinden emin olunduktan sonra homojenatlar -18°C'de derin dondurucuda saklanarak kinetik özellikler çalışılmıştır.

### *Biyokimyasal Analizler*

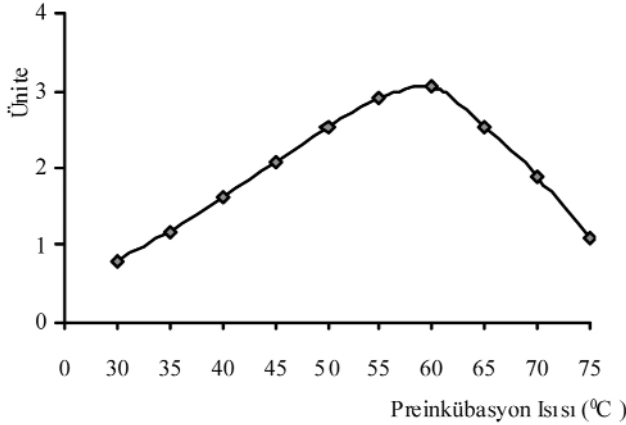
Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra MnCl<sub>2</sub> ile (1/6 w/v) sulandırılarak Potter Elvehjem (cam-cam) homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C, 14000 rpm'de 13 dak. santrifüjasyona tabi tutulmuş ve örneklerin süpernatantları enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil monoksim Üre (TDMU) metodu kullanılarak ölçülmüştür <sup>16</sup>. Diasetilmonoksim, üre ile direk reaksiyona girmez. Önce asit ortamda ısının etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil, asit solusyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan Diazin'i meydana getirir. Oluşan sarı rengi kararlı kılmak için Tiyosemikarbazid ve Fe<sup>+2</sup> iyonları kullanılır <sup>17</sup>. Çalışmamızda kullandığımız homojenatta protein miktarı Lowry <sup>18</sup> yöntemine göre ölçülmüştür. Koyun dalak doku örneklerinin her ml süpernatantına 3 ünite Jack-Bean üreaz enzimi ilave edildikten sonra 37°C'de 15 dak. inkübe edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır <sup>19</sup>.

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

## BULGULAR

**1- Preinkübasyon Isısının Tespiti:** Koyun dalak doku arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır. Mangan varlığında 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75°C'lerde enzim preinkübasyon ısısına tutulmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 58°C'de saptanmış ve bundan dolayı enzimin aktivasyonu için preinkübasyon ısı 58°C olarak kabul edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Arginaz aktivitesi üzerine preinkübasyon ısısının etkisi  
**Fig 1.** Influence of preincubation temperature on arginase activity

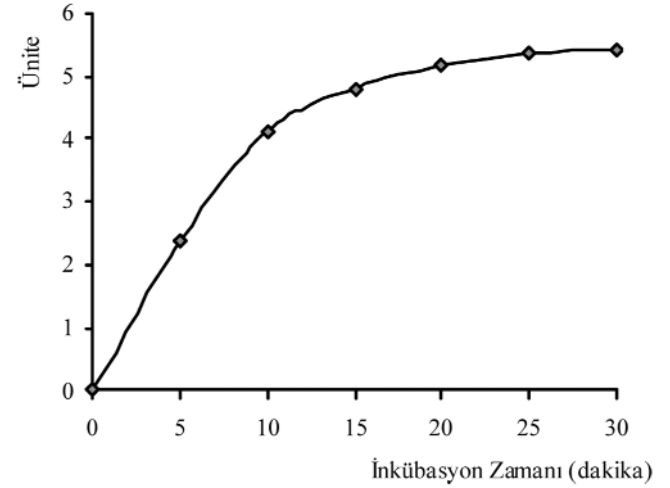
**2- Preinkübasyon Zamanının Tespiti:** Koyun dalak doku arginazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak aktivitesi araştırılmış, MnCl<sub>2</sub> varlığında ve 58°C preinkübasyon ısısında, 0-30 dak.'lık zaman aralıklarında enzimin aktivitesi incelenmiştir. Enzimin maksimum aktiviteye 13 dak.'da ulaştığı görülmüş ve preinkübasyon süresi 13 dak. olarak kabul edilmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Arginaz aktivitesi üzerine preinkübasyon zamanının etkisi  
**Fig 2.** Influence of preincubation period on arginase activity

**3- İnkübasyon Zamanının Tespiti:** Koyun dalak doku arginazı için optimum inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynağı 0-30 dak.'lık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu argininin

hidrolizi takip etmiştir. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 3'te görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 10. dak.'ya kadar doğrusalığını korumuş, bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bundan dolayı enzim için optimum inkübasyon zamanı 10 dak. olarak belirlenmiştir.

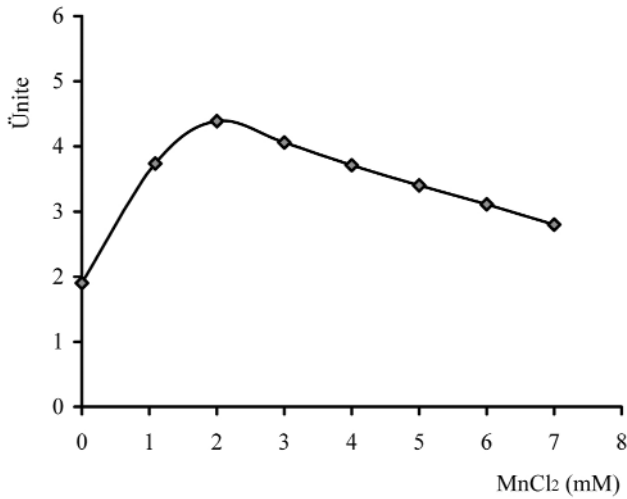


**Şekil 3.** Arginaz aktivitesi üzerine inkübasyon zamanının etkisi  
**Fig 3.** Influence of incubation period on arginase activity

**4- Mangan İyonlarının Etkisi:** Mangan iyonları arginaz enzimi için gereklidir. Bu yüzden arginaz aktivitesi üzerine mangan iyonlarının etkisini araştırmak için 0-8 mM derişimleri arasında değişen MnCl<sub>2</sub>, preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Preinkübasyon ortamına Mn<sup>++</sup> katılmadığı kontrol grubunda enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn<sup>++</sup> iyonları ilave edildiğinde aktivitenin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesi özellikle 1.5-2.0 mM derişimleri arasında yükselmiş, 2 mM'lık MnCl<sub>2</sub> derişiminden sonra aktivite düşmüştür. Enzimin en yüksek aktiviteyi 2 mM'lık MnCl<sub>2</sub> derişiminde göstermesinden dolayı koyun dalak doku arginazı için en uygun MnCl<sub>2</sub> derişimi 2 mM olarak kabul edilmiştir (Şekil 4).

**5- Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine Bazı Metal-lerin Etkisi:** Koyun dalak doku arginaz aktivitesine farklı metal iyonlarının etkisini araştırmak için Mn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Na<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup>, Li<sup>+1</sup>, Al<sup>+3</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Mo<sup>+4,+6</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Cr<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Sn<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup> ve Ag<sup>+1</sup> metal iyonları 2 mM'lık derişimlerde preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar kontrole göre değerlendirilmiştir.

Arginaz en yüksek aktiviteyi Mn<sup>+2</sup> metal iyonu varlığında göstermiştir. % Arginaz aktivitesi Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>,



**Şekil 4.** Arginaz aktivitesi üzerine manganez derişiminin etkisi  
**Fig 4.** Effect of manganese concentration on arginase activity

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Al<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> metal iyonlarında artmıştır. Buna karşın Mo<sup>+</sup>, Ca<sup>+</sup>, Ba<sup>+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Fe<sup>+</sup>, Cr<sup>+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup>, Sn<sup>+</sup> metal iyonları varlığında arginazın % aktivite olarak azaldığı tespit edilmiştir. Arginaz, Pb<sup>+</sup> ve Ag<sup>+</sup> metal iyonları varlığında ise aktivite göstermemiştir (Tablo 1).

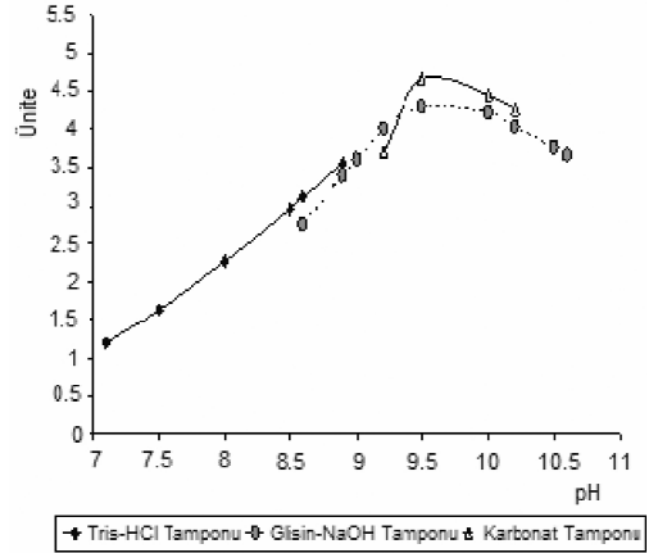
**Tablo 1.** Arginaz aktivitesi üzerine farklı metal iyonlarının etkisi  
**Table 1.** Influence of different metal ions on arginase activity

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

#### 6- Koyun Dalak Doku Arginazı Üzerine pH'nın

**Etkisi:** Koyun dalak doku arginazının optimal pH'sını tespit etmek için pH 7.1'den pH 10.6'ya kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan pH 7.1-8.9 arasında aktivite gösteren Tris-HCl tamponu, pH 9.2-10.2 arasında aktivite gösteren Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu ve 8.78-10.6 pH'larında aktivite gösteren Glisin-NaOH tamponu kullanılarak belirtilen pH sınırları için-

de en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 9.5'da karbonat tamponu varlığında elde edildiği için koyun dalak doku arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun karbonat tamponu, optimal pH'nın da 9.5 olduğu kabul edilmiştir (Şekil 5).

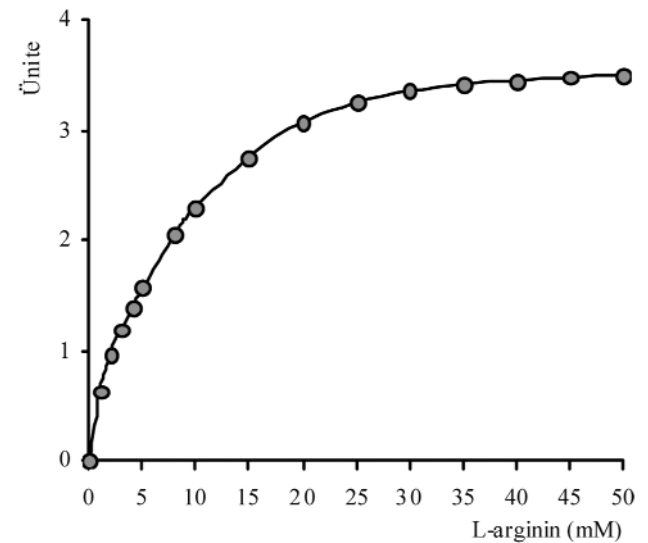


**Şekil 5.** Arginaz aktivitesi için optimum pH'nın tespiti

**Fig 5.** Determination of optimum pH for arginase activity

#### 7- Koyun Dalak Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin

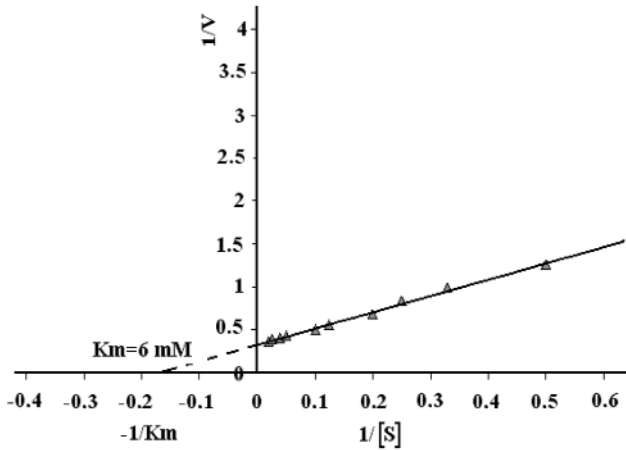
**Derişimine Bağlı Değişimi:** Koyun dalak doku arginazı için optimal şartlar tespit edildikten sonra, arginazın substratı olan argininin değişik derişimlerdeki V<sub>0</sub> hızları Michaelis-Menten grafiği ile değerlendirilmiştir. L-argininin Şekil 6'da görüldüğü gibi 0-50 mM arasında değişen derişimlerinde çalışılmıştır. Reaksiyon hızı 2 mM'a kadar lineerlik gösterirken (I. Mertebe Kinetiği),



**Şekil 6.** Değişik L-arginin derişimlerinde arginaz aktivitesindeki değişiklikler

**Fig 6.** The changes in arginase activity at various L-arginine concentrations

daha sonra yerini hiperbolik bir görünümüne (Karışık Mertebe Kinetiği) bırakmış, enzim 35 mM'lık substrat derişiminde ise enzim doygunluğa (Sıfır Mertebe Kinetiği) ulaşarak reaksiyon sabit hızla devam etmiştir. Enzim aktivitesinin substrat derişimine bağlı değişimi Lineweaver-Burk Eğrisi'ne göre değerlendirildiğinde koyun dalak doku arginazının L-arginine karşı Km'inin 6 mM olduğu bulunmuştur (Şekil 7).



Şekil 7. Arginaz aktivitesinin L-arginin derişimine bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile gösterilmesi

Fig 7. Indicated by the Lineweaver-Burk Plot of change on arginase activity depends on concentrations of L-arginine

Koyun dalak doku arginaz enzimi ile daha önce çalışıldığına dair hiçbir literatür bilgiye rastlanılmamış ve bu nedenle koyun dalak doku arginaz enziminin bazı kinetik özellikleri ilk kez laboratuvarımızda araştırılarak bulgular tartışılmıştır.

Enzimler, genel yapısının protein kaynaklı olması nedeniyle ısıya dayanıklı değildir. Maksimum aktivite gösterdiği ısının üzerine çıktığı zaman enzim aktivitesi düşmektedir. Koyun dalak doku arginazının preinkübasyon ısısını saptamak için farklı ısılarda (30-70°C) enzim aktivitesine bakılmış ve en uygun preinkübasyon ısısının 58°C olduğu, bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği tespit edilmiştir. Preinkübasyon ısısı farklı tür ve dokularda araştırılmış ve tüm metodlarda kullanıldığı görülmüştür. Preinkübasyon ısısı, koyun meme doku arginazı için 52°C<sup>20</sup>, insan tükürük arginazı<sup>21</sup>, tiroid doku arginazı<sup>22</sup>, eritrosit ve uterus arginazı<sup>23</sup>, bronş lavaj sıvısı arginazı<sup>24</sup> için 55°C, diabetik rat karaciğeri için 68°C<sup>25</sup>, sığır rumen doku arginazı için 60°C<sup>26</sup>, *Moniezia benedeni* arginazı için 53°C<sup>27</sup> olarak bildirilmiştir.

Koyun dalak doku arginaz enzimi için en uygun preinkübasyon zamanını tespit edebilmek için enzim 58°C'de 0-30 dak.'lar arasında preinkübasyona tabii

tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 13 dak. olduğu tespit edilmiştir. Preinkübasyon süresi insan tiroid doku arginazı için 12 dak.<sup>22</sup>, insan tükürük arginazı<sup>21</sup>, bronş lavaj sıvısı arginazı<sup>24</sup> ve diabetik rat karaciğer arginazı<sup>25</sup> için 20 dak., sığır rumen doku arginazı<sup>26</sup> ve eritrosit arginazı için 5 dak., uterus arginazı için 35 dak.<sup>23</sup>, fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 15 dak.<sup>28</sup> olarak belirlenmiştir.

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında olduğu için enzim kaynağı 37°C'de 0-30 dak.'lar arasında inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışılmış, 10. dak.'ya kadar lineerliğin devam ettiği, 10. dak.'dan sonra lineerliğin yerini hiperbolik bir görünümün aldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle koyun dalak doku arginazı için optimum inkübasyon süresi 10 dak. olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri tespit edilmiştir. Inkübasyon süresi rat karaciğeri<sup>25</sup>, insan karaciğer ve uterusu<sup>23</sup> için 20 dak., koyun gözü vitreusu<sup>29</sup> ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı<sup>28</sup> için 10 dak., *Moniezia benedeni* arginazı<sup>27</sup> ve koyun meme doku arginazı için 15 dak.<sup>20</sup> olarak bulunmuştur. Ünitenin tanımı inkübasyon süresine göre yapıldığından araştırmacılar buldukları farklı sürelerle göre üniteyi tanımlamışlardır.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn<sup>2+</sup> katyonlarının gerekli olduğu Muszynska<sup>30</sup> tarafından belirtilmiştir. Mn<sup>2+</sup> iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimi inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir<sup>31</sup>. Bu nedenle koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine MnCl<sub>2</sub> derişiminin etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin 2 mM MnCl<sub>2</sub> derişiminde en yüksek aktiviteyi verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda değişik dokular için gerekli olan MnCl<sub>2</sub> derişimi farklı olup rat karaciğeri<sup>25</sup> ve sığır rumen doku arginazı<sup>26</sup> için 2 mM, insan tükürük arginazı<sup>21</sup> ve vitreus arginazı<sup>29</sup> için 5 mM, koyun meme doku arginazı için 0.75 mM<sup>20</sup>, domuz karaciğer arginazı için 10 mM<sup>32</sup>, insan uterusu için 0.8 mM<sup>23</sup>, fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 1 mM<sup>28</sup> ve diabetik rat karaciğer arginazı için 1-2 mM olarak bulunmuştur<sup>25</sup>.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesi üzerine Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mo<sup>4+,6</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> ve Ag<sup>+</sup> metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve enzim en yüksek aktiviteyi MnCl<sub>2</sub> varlığında vermiştir. Enzimi aktive eden metal iyonları sıralamaya göre Mn<sup>2+</sup> (%1645) > Ni<sup>2+</sup> (%1193) > Li<sup>+</sup> (%1080) > Cd<sup>2+</sup> (%603) > Co<sup>2+</sup> (%383) > K<sup>+</sup> (%213) > Al<sup>3+</sup> (%193) > Na<sup>+</sup> (%151) > Mg<sup>2+</sup> (%112)

olarak bulunmuştur.  $\text{Mo}^{+6}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$  iyonları varlığında enzim aktivitesinde düşme görülürken  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Ag}^{+1}$  iyonları varlığında enzim hiç aktivite göstermemiştir.

Metal iyonları bir dokudaki enzimi aktive ederken diğer dokudaki enzimi inhibe edebilmektedir. Spektor ve ark.<sup>33</sup>, yetişkin ve fetal insan karaciğer, eritrosit, böbrek, beyin ve gastrointestinal sistem dokularında metal iyonlarının etkisini araştırmışlar,  $\text{Mn}^{+2} > \text{Co}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$  iyonlarının enzimi aktive ettiğini,  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun ise enzimi inhibe ettiğini bulmuşlardır. Koyun meme doku arginazı üzerine farklı metal iyonlarının etkisi araştırılmış, enzim en yüksek aktiviteyi  $\text{Mn}^{+2}$  metal iyonları varlığında göstermiştir.  $\text{Cd}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  metal iyonları enzim aktivitesini  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarına göre daha fazla artırdığı,  $\text{Hg}^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi değiştirmedığı,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+1}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$  iyonlarının enzim aktivitesini inhibe ettiği,  $\text{Pb}^{+2}$  ve  $\text{Cr}^{+3}$  iyonları varlığında ise enzimin hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir<sup>20</sup>. Sığır rumen doku arginazı üzerine farklı metal iyonlarının etkisi incelenmiş,  $\text{Mn}^{+2}$  metal iyonu varlığında enzimin en yüksek aktiviteyi verdiği,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Li}^{+1}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini  $\text{Mn}^{+2}$ 'a göre daha az artırdığı,  $\text{K}^{+1}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Sn}^{+2}$  iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin azaldığı,  $\text{Hg}^{+2}$  ve  $\text{Ag}^{+2}$  varlığında ise enzimin hiç aktivite göstermediği tespit edilmiştir<sup>26</sup>. Fare makrofaj arginaz aktivitesinin metal iyonları tarafından sırasıyla  $\text{Mn}^{+2} > \text{Co}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Fe}^{+2} > \text{Na}^{+1} > \text{K}^{+1}$  şeklinde artırıldığı saptanmıştır<sup>34</sup>. Kabuklu deniz yumuşakcası (*Concholepas concholepas*) arginazı için<sup>35</sup>  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  iyonlarının gerekli olduğu bildirilmiştir.

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır. Bu nedenle araştırmamızda uygun tampon seçimi ve optimal pH araştırılmış, bu amaçla Tris-HCl (pH 7.1 ile 8.9), Glisin-NaOH (pH 8.78-10.6) ve Sodyum bikarbonat-sodyum karbonat (pH 9.2-10.2) tampon sistemleri kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda koyun dalak doku arginazı için en uygun tampon çözeltisinin karbonat tamponu, optimum pH'nın da 9.5 olduğu saptanmıştır. Çalışmamızla paralel olarak karaciğer ve eritrosit arginazı<sup>1</sup>, *Moniezia expansa* arginazı<sup>36</sup>, koyun meme doku arginazı<sup>20</sup>, *Moniezia benedeni* arginazı<sup>27</sup> için pH 9.5'teki karbonat tamponu, sığır rumen doku arginazı<sup>26</sup> ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı<sup>28</sup> için pH 10'daki karbonat tamponunun uygun olduğu ortaya konulmuştur.

Koyun dalak doku arginaz aktivitesinin L-arginine karşı olan Km'i incelenmiş, bu nedenle enzim miktarı sabit tutularak L-argininin değişen derişimlerinde

enzim aktivitesi ölçülmüş ve Km değeri 6 mM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda farklı türden enzim kaynaklarındaki arginazın L-arginine karşı olan Km'inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değerleri sığır rumen doku arginazı<sup>26</sup> ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı<sup>28</sup> için 4 m, *Moniezia benedeni* arginazı için 12.5 mM<sup>27</sup>, insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM<sup>23</sup>, diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM<sup>25</sup> olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular literatürlerle uyum göstermekte, bulguların değerleri yapılan çalışmalarda elde edilen değerlerin sınırları içerisinde kalmaktadır.

Sonuç olarak, bugüne kadar koyun dalak doku arginaz enziminin kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığının literatür taramalarından anlaşılması üzerine aktif üre döngüsü bulunmayan koyun dalak dokusunda arginaz enzimi saptanmış ve bu enzimin bazı kinetik özellikleri ilk kez laboratuvarımızda çalışılarak ortaya konmuştur. Elde edilen verilerin bu konu ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Colombo JP, Konarska L: Arginase. In, Bergmeyer HU (Ed): Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed. 285-294, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
2. Kepka-Lenhart D, Ash DE, Morris SM: Determination of mammalian arginase activity. *Methods Enzymol*, 440, 221-230, 2008.
3. Kandemir FM, Özdemir N: L-Lizin ve L-ornitin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg (Vet)*, 22 (1): 1-4, 2008.
4. Gökmen SS, Yörük Y, Çakır E, Yorulmaz F, Gülen Ş: Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys*, 17 (1-2): 125-131, 1999.
5. Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasemann H: Developmental changes in arginase expression and activity in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294 (3): 498-504, 2008.
6. Maarsingh H, Pera T, Meurs H: Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*, 378 (2): 171-184, 2008.
7. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu ME: Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. *Turk J Bioch*, 31 (3): 129-134, 2006.
8. Wu CW, Wang SR, Chang TJ, Lin EC, Chang KL, Huang MH, Lui WY, P'eng FK, Chi CW: Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. *Cancer*, 64 (12): 2552-2556, 1989.
9. Wu CW, Chi CW, Tsay SH, Lui WY, Peng FK, Chang KL, Huang MH, Wang SR: The effects of arginase on neoplasm. I. The role of arginase in the immunosuppressive effects of extract from gastric cancer. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*, 20 (4): 279-89, 1987.

- 10. Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato PG, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R:** Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol*, 37 (2): 515-523, 2004.
- 11. Kumar AN, Kalyankar GD:** Effect of steroid hormones on age dependent changes in rat arginase isoenzymes. *Exp Gerontol*, 19 (3): 191-198, 1984.
- 12. Erisir M, Aydilek N, Aksakal M:** Effect of vitamin E on arginase activity in the liver and kidneys of testosterone-treated and castrated rabbits. *Acta Vet Brno*, 74 (4): 527-531, 2005.
- 13. Konarska L, Tomaszewski L, Rolezyk U:** Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. *Biochem Med Metab Biol*, 35 (2): 170-178, 1986.
- 14. Cuervo H, Pineda MA, Aoki MP, Gea S, Fresno M, Girones N:** Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute trypanosoma cruzi infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. *J Infect Dis*, 197 (12): 1772-1782, 2008.
- 15. Mohamed SA, Fahmy AS, Mohamed TM, Hamdy SM:** Urea cycle of *Fasciola gigantica*: Purification and characterization of arginase. *Comp Biochem Physiol, B Biochem Mol Biol*, 142 (3): 308-316, 2005.
- 16. Geyer JW, Dabich D:** Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 39 (2): 412-417, 1971.
- 17. Kaplan LA:** Urea. In, Pesce AJ, Kaplan LA (Eds): Methods in Clinical Chemistry. 22-27, The CV Mosby Company, Toronto, 1987.
- 18. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1): 265-275, 1951.
- 19. Mohammed SM, Greenberg DM:** Liver arginase I. preparation of extracts of high potency, chemical properties, activation, inhibition and pH activity. *Arch Biochem Biophys*, 8, 349-357, 1945.
- 20. Özçelik M, Özdemir N:** Koyun meme doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 27 (3): 719-725, 2003.
- 21. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG:** Human salivary arginase and its deficiency in argininemia. *J Clin Chem Clin Biochem*, 23 (6): 337-342, 1985.
- 22. İlhan N:** İnsan tiroid doku arginazının bazı kinetik özellikleri. *Erciyes Tıp Derg*, 16 (3): 217-221, 1994.
- 23. Halifeoğlu İ:** İnsan karaciğer, eritrosit ve uterus doku arginazının kinetik özellikleri. *Doktora Tezi*. Fırat Üniv Sağ Bil Enst, Elazığ, 1993.
- 24. Altundağ Y:** Bronj lavaj sıvısında arginaz enziminin özellikleri ve klinik diagnostik önemi. *Uzmanlık Tezi*. Trakya Üniv Tıp Fak Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne, 2001.
- 25. Erisir M, Ercel S, Yılmaz S, Ozan S:** Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotosin induced diabetic rats. *Vet Med Czech*, 50 (2): 69-76, 2005.
- 26. Erişir M, Ozan ST:** Some properties of purified and non-purified rumen tissue arginase in cattle. *Turk J Vet Anim Sci*, 23 (3): 597-608, 1999.
- 27. Özdemir N:** *Moniezia benedeni* arginazının bazı özellikleri. *Doktora Tezi*. Fırat Üniv Sağ Bil Enst, Elazığ, 1990.
- 28. Benzer F, Ozan ST:** Fascioliosisli koyunların arginaz enzim aktivite düzeyleri ile karaciğer doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg (Vet)*, 16 (2): 217-222, 2002.
- 29. Gürsu MF, Ozan S, Gülen Ş:** Çeşitli türlerin humor vitreuslarında üre, ornitin ve sitrülün düzeyleri ile arginaz aktiviteleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 18, 87-91, 1994.
- 30. Muszynska G, Wojtczak M:** Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase. *Int J Biochem*, 10 (8): 665-668, 1979.
- 31. İhan N, Gülen Ş:** Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. *Turk J Bioch*, 18 (4): 59-67, 1993.
- 32. Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M:** Physico-chemical properties of guinea pig liver arginase (author's transl). *Rev Esp Fisiol*, 37 (1): 37-44, 1981.
- 33. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum S:** Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem Med*, 28 (2): 165-175, 1982.
- 34. Chen PC, Broome JD:** Mouse macrophage arginase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 163 (3): 354-359, 1980.
- 35. Carnaval N, Bustamante M, Hinrichsen P, Torres A:** Properties of arginase from the Sea mollusc (concholepas concholepas). *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 78 (3): 591-594, 1984.
- 36. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş:** Kısmen arttırılmış *Moniezia expansa* arginazının bazı özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 17, 245-250, 1993.