



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2013; 27 (2): 81 - 86
<http://www.fusabil.org>

**Nevher ERDEM
Mine ERİŞİR**

Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Tavşan Karaciğer Arginazının Optimize Edilmesi ve Dokulardaki Dağılımı *

Tavşan karaciğer arginazı için optimal şartlar ve dokulardaki dağılımının araştırıldığı çalışmada bir yaşında 6 adet New Zealand tavşanının dokuları kullanıldı. Tavşan karaciğer doku arginazı için preinkübasyon ısısı 65°C, preinkübasyon zamanı 13 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 10 olarak saptanmıştır. En yüksek aktiviteyi 2 mM MnCl₂ konsantrasyonunda veren enzimin L-arginine karşı olan Km'i 1.6 mM olarak saptanmıştır. Sonuç olarak enzimin aktivasyonu için Mn⁺² iyonlarının ve 65 °C'de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer, böbrek, kalp, uterus, beyin, dalak, bağırsak, yemek borusu, kas, dil, akciğer, mide, soluk borusundan alınan örneklerde en yüksek aktivite karaciğer, en düşük aktivite soluk borusunda saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tavşan, arginaz, optimizasyon.

Optimization of Liver Arginase in Rabbit and Distribution in Tissues

Optimum conditions for liver arginase in rabbit and distribution in the tissues was investigated. In the study, the tissues of six one-year-old New Zealand rabbits were used. Its was found that 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 MnCl₂ concentration. Km of arginase in rabbit liver tissue for L-arginine were measured to be 1.6 mM. Consequently, it was determined that Mn⁺² ions and preincubation at 65 °C were essential for the activation of the enzyme. Among liver, kidney, heart, uterus, brain, spleen, intestine, esophagus, muscle, tongue, lung, stomach, trachea samples, the highest arginase activity was found in the liver and the lowest arginase activity was found in trachea.

KeyWords: Rabbit, arginase, optimization.

Giriş

Amino asitler, aminler ve nükleik asitlerin katabolizmasından şekillenen amonyağın detoksifikasyonunda görevli olan üre döngüsünün, beşinci ve son basamağında fonksiyon gören arginaz (L-arginin amidinohidrolaz, EC 3.5.3.1), L-argininin üre ve ornitine hidrolizini sağlayan bir enzimdir. Arginaz üre döngüsünün tüm enzimlerini içeren tek organ olan karaciğerde en fazla miktarda bulunmasına rağmen böbrek gibi tam bir üre döngüsü bulunmayan dokularda da bulunur (1, 2). Böbrekteki arginaz arginini hidrolize eder ve oluşturduğu ornitin poliaminlerin, glutamatin [γ -amino butirikasitin (GABA) prekürsörüdür] ve prolinin sentezinde kullanılır (3). Poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) hücre çoğalması için gerekli olup, iyon kanalları ve nörotransmitter reseptörlerin modulatorü olarak bildirilmiştir (4, 5). GABA ve prolin hücre sinyallemede fonksiyonlara sahiptir (6) ayrıca prolin kollojen sentezi için gereklidir (2).

Çeşitli hayvan türlerinde ve dokularında enzimin optimum şartlarının belirlenmesi ve dokulardaki dağılımının araştırılması; ölçümler anında enzimin en aktif olduğu düzeyin saptanması ve enzimin fizyolojik rollerini ortaya çıkarmak için önemlidir. Tavşan karaciğer doku arginaz enziminin optimum özellikleri ile ilgili literatür bilgiye rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmada tavşan karaciğer dokusunda arginazın optimize edilmesi ve farklı dokulardaki aktivitenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç veYöntem

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 1 yaşında 6 adet New Zealand tavşanı kullanıldı. Araştırma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan etik kurul izni alındı.

Karbondioksit solutma yöntemi (%99 karbondioksit içeren kapalı tank) ile ötenazi edilen tavşanlardan kesimden hemen sonra alınan dokular (karaciğer, böbrek, kalp,

* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenen 2123 nolu Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

**Geliş Tarihi : 28.12.2012
Kabul Tarihi : 15.04.2013**

**Yazışma Adresi
Correspondence**

Mine ERİŞİR
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

mineerisir@yahoo.com

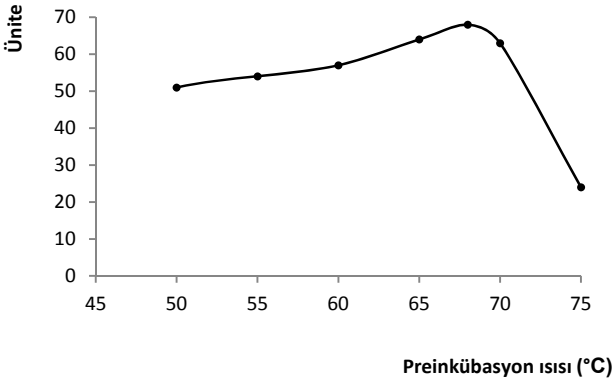
uterus, beyin, dalak, bağırsak, yemek borusu, kas, dil, akciğer, mide, soluk borusu) üzerindeki kanlardan temizlendikten sonra %0.9'luk NaCl içinde soğuk zincire uyularak laboratuara getirildi ve dokular folyo kağıdına sarılarak -80 °C'de derin dondurucuda daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

Alınan doku örnekleri süzgeç kağıdı arasında kurutulularak 0.5 g tartıldı ve distile su ile 5 mL'ye tamamlanarak (ağırlık/hacim) cam-teflon homojenizatörle homojenize edildi. Homojenat +4 °C'de 13500 rpm'de 15 dakika santrifügasyon işlemine tabii tutulduktan sonra ayrılan süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanıldı. Karaciğer arginazının optimum şartlarının belirlenmesi için tüm karaciğer homojenat süpernatantlarının yarısı birleştirilerek bir havuz oluşturuldu.

Arginaz aktivitesi, Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksım Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçüldü (7). Yöntemin prensibi arginaz tarafından L-argininin hidrolizi ile oluşan ürünün spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Arginaz aktivitesinin bir ünitesi 1 saatte 37 °C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir (µmol üre / saat/mg protein). Homojenatta protein miktarı Lowry ve ark. (8)'nin bildirdikleri modifiye yöntemle göre tespit edildi.

Bulgular

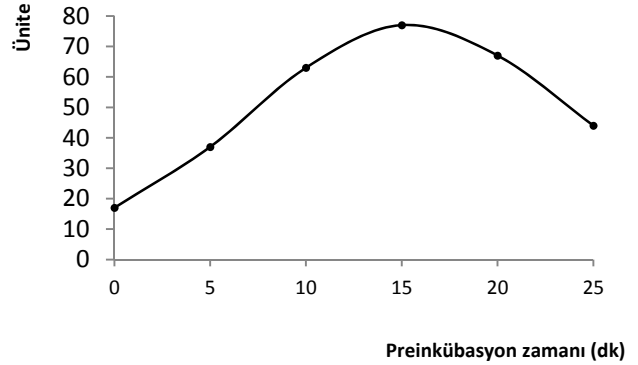
1. Preinkübasyon Isısının Tespiti: Tavşan karaciğer arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisini araştırmak amacı ile enzim kaynağı 1 mM MnCl₂ varlığında 50-75 °C'ler arasında preinkübasyon ısılarına tabii tutulmuştur. En yüksek enzim aktivitesi 67-68°C arasında saptanmış olup, bu ısıdan sonra aktivitenin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Enzimin aktivasyonu için uygun preinkübasyon ısı 65 °C olarak kabul edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişimi

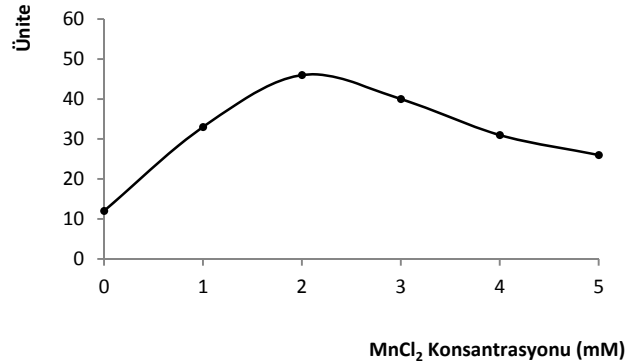
2. Preinkübasyon Süresinin Tespiti: Preinkübasyon süresini tespit etmek için, 1 mM MnCl₂ varlığında ve 65 °C preinkübasyon ısısında, 0-25 dakikalık zaman aralıklarında enzimin aktivitesi

incelenmiştir. 65 °C'de 15 dakikalık preinkübasyon enzim aktivitesinin yaklaşık 4 misli artırmıştır. Enzimin maksimum aktiviteye 15 dakikada ulaştığı görülmüş ve optimal preinkübasyon süresi 13 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 2).



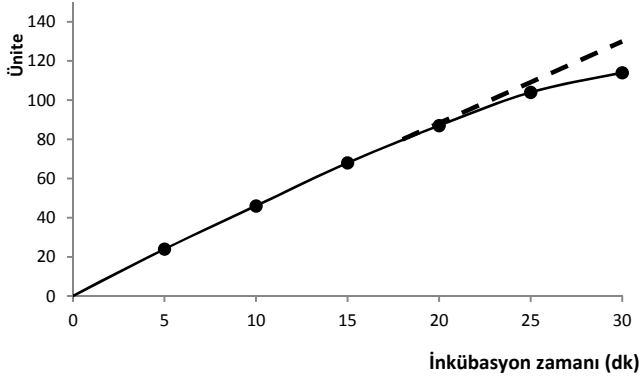
Şekil 2: Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin preinkübasyon zamanına bağlı olarak değişimi

3. Mangan İyonlarının Etkisi: Preinkübasyon ortamına 0-5 mM konsantrasyonları arasında değişen MnCl₂ ilave edilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Enzim aktivitesi 2 mM MnCl₂ konsantrasyonunda yaklaşık 4 misli yükselmiş, daha yüksek konsantrasyonda aktivite düşmüştür. Tavşan karaciğer doku arginazı için en uygun MnCl₂ konsantrasyonu 2 mM olarak kabul edilmiştir (Şekil 3).



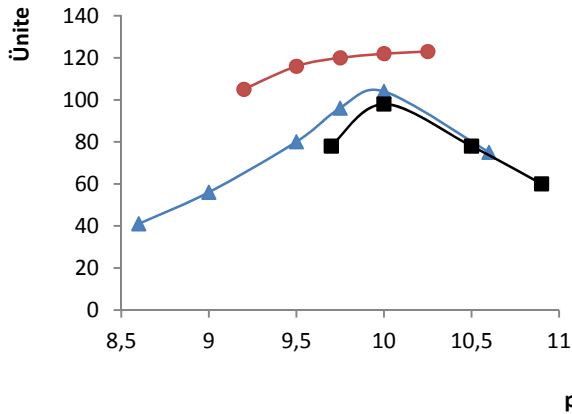
Şekil 3: Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin MnCl₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi

4. İnkübasyon Süresinin Tespiti: Enzim kaynağı 0-30 dakikalık zaman dilimlerinde 37 °C'de inkübasyona tabii tutulmuş ve reaksiyon sonunda meydana gelen ürünün zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 4'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 4. Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin inkübasyon zamanına bağlı olarak değişimi

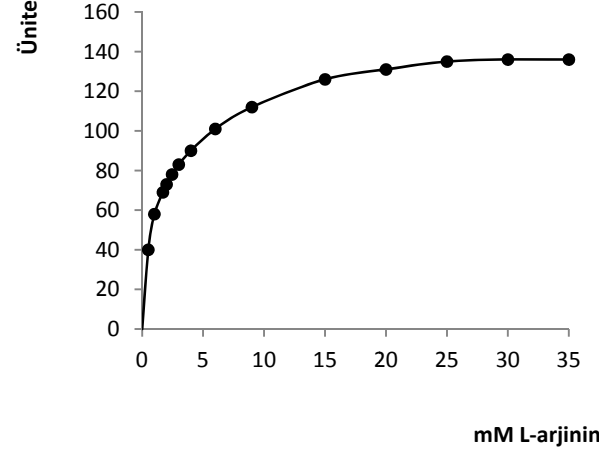
5. pH'nın Etkisi: Glisin-sodyum hidroksit tamponu (pH: 8.6-10.6), sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu (pH:9.2- 10.2) ve sodyum bikarbonat-sodyum hidroksit tamponları (pH:9.7-10.9) kullanılarak değişik pH'larda arginaz aktivitesi ölçülmüş ve pH profili çıkarılmıştır. Şekil 5'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite pH 10-10.1'de sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiğinden tavşan karaciğer arginaz aktivitesi için en uygun tamponun sodyum bikarbonat- sodyum karbonat tamponu, optimal pH'nın da 10 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5. Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin çeşitli tampon sistemlerine ve pH'ya göre gösterdiği değişiklikler (—●— NaHCO₃-Na₂CO₃ tamponu, —▲— Glisin-NaOH tamponu, —■— NaHCO₃-NaOH tamponu)

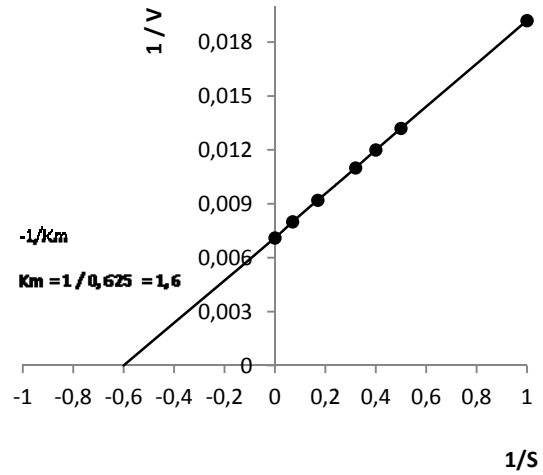
6. Arginin Konsantrasyonunun Etkisi: Tavşan karaciğer doku arginazı için optimal şartlar tespit edildikten sonra, arginazın substratı olan L-arginine karşı Km'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 6). Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesine bakılmıştır. Şekil 6'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 etmiştir.

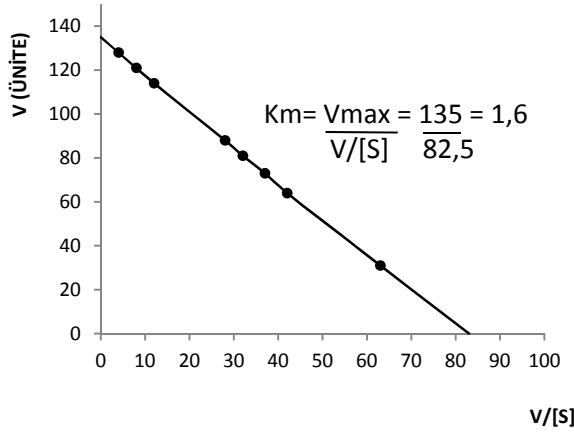


Şekil 6. Tavşan karaciğer doku arginaz aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Michaelis-Menten grafiği ile gösterilmesi

Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında Lineweaver-Burk (Şekil 7) ve Eadie-Hofstee (Şekil 8) eğrileriyle de incelenmiş ve tavşan karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan Km'inin 1.6 mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 7. Tavşan karaciğer arginaz aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişiminin Lineweaver-Burk eğrisi ile gösterilmesi



Şekil 8. Tavşan karaciğer arginazının L-arginine karşı olan Km'nin Eadie-Hofstee eğrisi ile saptanması

7. Tavşanlarda Arginaz Aktivitesinin Dokulara Göre Dağılımı: Tavşan karaciğer doku arginazı ölçümünde tarafımızdan tespit edilen, diğer dokuların arginaz aktivitesinin ölçümünde ise rat böbrek arginazı için saptanmış (9) optimum koşullar kullanılmıştır. Tavşan dokularındaki arginaz aktiviteleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Tavşan dokularında arginaz aktiviteinin dağılımı (n: 6, ortalama±standart sapma)

Doku	Arginaz aktivitesi (U)
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

Tartışma

Çeşitli dokularda ölçülen arginaz enzimi, maksimum aktiviteye ulaşmak için inkübasyondan önce Mn^{+2} iyonları ile ısı aktivasyonu (preinkübasyon) gerektirir (9-11). Tavşan karaciğer doku arginazının 68 °C'de Mn^{+2} iyonları ile preinkübasyonu maksimum aktivite oluşturmuş ve bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği için optimum preinkübasyon ısı

65 °C olarak alınmıştır (Şekil 1). Optimum preinkübasyon ısı, diabetik ve kontrol ratlarının karaciğerinde 68 °C (9), insan (12) ve koyun (13) karaciğer arginazı için bu çalışmaya benzer olarak 60-65 °C olarak bildirilmiştir. Farklı türlerde karaciğer dışındaki dokularda çalışılan arginazların optimal preinkübasyon sıcaklıkları 55 °C civarında bulunmuştur (12, 14, 15). Bu bulgular Mn^{+2} iyonları varlığında karaciğer arginazının diğer doku arginazlarından yükselmiş ısıya karşı daha dayanıklı ve dirençli olduğunun göstergesidir.

Arginazın aktivasyonunda preinkübasyon ısı kadar preinkübasyon süresi de önemlidir. 65 °C'de 15 dakikalık preinkübasyon tavşan karaciğer doku arginazının aktivitesini yaklaşık 4 misli artırmıştır (Şekil 2). Farklı tür ve dokularda çalışılan arginazların preinkübasyon sürelerinin 5 ile 20 dakika arasında değiştiği bildirilmiştir (9, 10, 12-15). Tavşan karaciğer doku arginazının en uygun preinkübasyon süresinin 13 dakika olduğu tespit edilmiş olup bu değer diğer dokular için belirtilen preinkübasyon süresi sınırları içerisinde. Tüm bu çalışmalara zıt olarak rat böbrek arginazının aktivasyonu için preinkübasyon ısı ve süresinin gereksiz olduğu bildirilmiştir (9).

Bir metalloenzim olan arginazın tam katalitik aktivite gösterebilmesi, subunitelerine ayrılmaması ve kuaterner yapısının şekillenmesi için her subunitenin bir mol Mn^{+2} içermesi gerekir (16, 17). 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 (Şekil 4). Tavşan karaciğer arginaz aktivitesi için de preinkübasyon ve Mn^{+2} iyonları gereklidir. Mn^{+2} 'nin preinkübasyon sırasında arginaza bağlanarak enzim aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığı açıklanmıştır (10, 11, 17). Mn^{+2} iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğu ve enzim- Mn^{+2} -arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiği bildirilmektedir (18). Bu konu ile ilgili çalışmalarda ortak nokta Mn^{+2} 'nin arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olması ve optimal Mn^{+2} derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir (10, 11, 16-18).

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 ise lineerliğin yerini hiperbolik bir görünümün aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4). Enzim aktivitesindeki lineer artışın 18. dakikadan sonra lineerlikten sapması reaksiyon sonucu oluşan ornitin ve ürenin, enzimin inhibisyonuna (ürün inhibisyonu) neden olmasından kaynaklanabilir (19, 20).

Farklı tamponlar ve farklı pH'lar kullanılarak memeli arginazlarının bazik optimum pH'a (9.5-10.5) sahip olduğu gösterilmiştir (10-13, 15, 18). Tavşan karaciğer doku arginazı için en yüksek aktivite pH 10-10.1'de sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu varlığında bulunmuştur (Şekil 5).

Tavşan karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan Km değeri 1.6 mM olarak bulunmuştur (Şekil 6). Yapılan çalışmalarda farklı türlerden karaciğer arginazının L-arginine karşı olan Km' inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değeri fascioliosisli koyunlarda 4 mM (13), insanlarda 4.1 mM (12), diabetik ve normal ratlarda 3.2 mM (9), kobaylarda 19.6 mM (21) olarak bulunmuştur. Tavşan karaciğer doku arginazı için tarafımızdan bulunan Km değeri diğer çalışmalarda elde edilen Km değerlerinden daha düşüktür.

Tavşan dokularındaki arginaz aktivitelerinin tespit edildiği bu çalışmada en yüksek arginaz aktivitesi diğer memeli türlerinde olduğu gibi (1,2) karaciğerde tespit edilmiştir. Lisowska-Myjak ve ark. (22) 31 türün bağırsak arginaz aktivitesinin türden türe 2 ile 100 misli arasında geniş bir farklılık gösterdiğini ve en yüksek aktivitenin tavşan, rat, hamster ve farelerde olduğunu tespit etmiştir. Fare ve ratların tükürük bezlerinde arginaz aktivitesinin değişen seviyeleri bulunurken tavşan ve kobayın tükürük

bezlerinin hemen hemen hiç arginaz aktivitesine sahip olmadığı kaydedilmiştir (23).

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 (24). Bu çalışmada ise eritrosit arginaz aktivitesini $3.22 \pm 0.60 \mu\text{mol üre / g Hb / saat}$ olarak tespit edildi.

Yapılan taramalarda tavşan karaciğer doku arginazının kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapıldığı literatüre rastlanmamıştır. Bu nedenle tavşan karaciğer dokusunda arginaz enziminin kinetik özellikleri araştırılmış, tavşan karaciğer arginazının aktivasyonu için preinkübasyonun ve Mn^{+2} iyonlarının gerekli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilerin enzimin fizyolojik rolleri ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanaatine varıldı.

Kaynaklar

- Aminlari M, Vaseghi T. Arginasedistribution in tissue of domestic animals. *Comp Biochemand Physiol B* 1992; 103: 385-389.
- Aminlari M, Shahbazkia HR, Esfandiari A. Distribution of arginase in tissues of cat (*Felis catus*). *J Feline Med Surg* 2007; 9: 133-139.
- Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, et al. Arginases I and II: Do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81: S38-44.
- Hakovirta H, Keiski A, Toppari J, et al. Polyamines and regulation of spermatogenesis: Selective stimulation of late spermatogonia in transgenic mice over expressing the human ornithine decarboxylase gene. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1430-1436.
- Heby O, Emanuelsson H. Role of the polyamines in germ cell differentiation and in early embryonic development. *Med Biol* 1981; 59: 417-422.
- Castillo L, de Rojas TC, Chapman TE, et al. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 193-197.
- Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39: 412-417.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Erişir M, Erçel E, Yılmaz S, Ozan ST. Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Vet Med-Czech* 2005; 50: 69-76.
- Erişir M, Ozan S. Sığır rumen doku arginazının saflaştırılmasından önce ve saflaştırılmasından sonra bazı özellikleri. *Türk J Vet Anim Sci* 1999; 23: 597-608.
- Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem Med* 1982; 28: 165-175.
- Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
- Benzer F, Ozan ST. Fascioliosisli koyunların arginaz enzim aktivite düzeyleri ile karaciğer doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg (Vet)* 2002; 16: 217-222.
- Altundağ Y. Bronj lavaj sıvısında arginaz enziminin özellikleri ve klinik diagnostik önemi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2001.
- Kandemir MF, Özdemir N. Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2009; 15: 553-559.
- Muszynska G. Immobilization of Rat Liver Arginase. In: H. Peeters (Editor). *Protides of The Biological Fluids*. Oxford, New York: Pergamon Press, 1976: 633-637.
- Scolnick LR, Kanyo ZF, Cavalli RC, Ash DE, Christianson DW. Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochem* 1997; 36: 10558-10565.
- Colombo JP, Konarska L. Arginase. In: Bergmayer GM. (Editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Edition, Weinheim: Verlag Chemie 1984: 285-294.
- Glass RD, Knox WE. Arginase isozymes of rat mammary gland, liver, and other tissues. *J Biol Chem* 1973; 248: 5785-5789.
- Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: Kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 31-37.
- Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. Physico-chemical properties of Guinea Pig liver arginase. *Rev Esp Fisiol* 1981; 37: 37-44.

22. Lisowska-Myjak B, Tomaszewski L, Kraszevska-Domańska B. Intestinal arginase in the phylogenetic development of animals. *Pol Arch Weter* 1987; 25: 283-296.
23. Yasuda N, Moriwaki K, Furuyama S. Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals. *J Comp Physiol B*. 2004; 174: 237-242.
24. Spector EB, Rice SC, Kern RM, Hendrickson R, Cederbaum SD. Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates, and man: Evolution to high activity in primates. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 1138-1145.