

## FASCIOLIOSİSLİ KOYUNLARIN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTE DÜZEYLERİ İLE KARACİĞER DOKU ARGİNAZİNİN BAZI BIYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ\*

Fulya BENZER<sup>1</sup>

Sema TEMİZER OZAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Elazığ-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.05.2002

The Levels of Arginase Enzyme Activity in Sheep with Fasciolasis and some Biochemical Properties of Arginase In Liver Tissue

### Summary

The levels of arginase in erythrocyte and liver in sheep with fasciolasis and some biochemical properties of arginase in liver tissue were investigated. This study was carried out using 120 sample of blood and liver. Tiyosemicarbazide-Diasetilmonoxim-Urea method was used to measure arginase activity. There was no difference between groups with fasciolasis and control groups for activity of erythrocyte arginase ( $P>0.05$ ). The levels of arginase activity in liver decreased significantly in the group with fasciolasis when compared with control group ( $p<0.01$ ). There was no difference between healthy sheep and sheep with fasciolasis for biochemical properties of liver arginase enzyme. It was determined that presence of 1 mM  $Mn^{+2}$  ions, 15-minute-preincubation at 65°C and 10 minute-incubation at 37°C are necessary for activation of arginase in liver tissue of sheep. The most suitable buffer for enzyme of arginase in liver tissue is bicarbonate buffer and it was found about optimal pH: 10. Km which is against L-arginine-substrat of enzyme-was found by the method of Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk and it is about 4 mM.

**Key Words:** Fasciolasis, arginase, liver, sheep, biochemical properties

### Özet

Fasciolasislı koyunların eritrosit ve karaciğer arginaz aktivite düzeyleri ile karaciğer doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır. Araştırma ortalaması 120 adet kan ve karaciğer doku örneği ile gerçekleştirılmıştır. Arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre metodu kullanılmıştır. Eritrosit arginaz aktiviteleri fascioliosisli ve kontrol grupları arasında farklılık göstermemiştir ( $P>0.05$ ). Karaciğer arginaz aktiviteleri kontrollere göre fascioliosisli grupta önemli derecede düşmüştür ( $p<0.01$ ). Karaciğer arginaz enziminin biyokimyasal özellikleri fascioliosisli koyunlar ile sağlıklı koyunlar arasında farklılık göstermemiştir. Koyun karaciğer doku arginazının aktivasyonu için ; 1 mM  $Mn^{+2}$  iyonlarının varlığı, 65°C'de 15 dakikalık preinkübasyonun ve 37°C'de 10 dakikalık inkubasyonun gerekliliği saptanmıştır. Karaciğer doku arginazı için en uygun tamponun karbonat tamponu olduğu, optimál pH'nın 10 civarında olduğu bulunmuştur. Enzimin substratı olan L-arginine karşı Km'i Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk yöntemleri ile değerlendirilmiş, Km'in 4 mM civarında olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fasciolasis, arginaz, karaciğer, koyun, biyokimyasal özellikler

### Giriş

Arginaz (L-argininin amidinohidrolaz; E.C. 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininin ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Üre ve böbrekler yolu ile atılırken ornitin, prolin ve poliaminlerin sentezinde rol oynamaktadır (12). Siroz, karaciğer parankiminin gözden kaybolması ve bunun yerini giderek yaygın bir biçimde üreyen interstiyel dokunun alması ile karakterizedir (1). Fasciolasis karaciğerde ciddi tahribatlara yol açan

paraziter bir enfeksiyondur. *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*)'nın yapısında bulunan arginazın biyokimyasal görevinin nedenini Isserof (10) kollagen sentezi için gerekli prolin ve hidroksiprolinin sağlanması olarak izah etmiştir. Isserof (9) sıçanlara prolin enjekte edildiği zaman karaciğerde siroz oluştuğunu göstermiştir. Bu bulgular *F. hepatica* enfeksiyonu sonucu oluşan kronik sirozun parazitin devamlı ortama saldığı prolinden meydana

\* Bu çalışma, doktora tezinden özetlenmiş olup, FÜNAF (Proje No:336) tarafından desteklenmiştir.

gelebileceği şeklinde açıklanmaktadır.

Arginaz enzimi en yüksek aktiviteyi karaciğer dokusunda gösterdiğinde, fasciolasis sonucu oluşan karaciğer harabiyetinde arginaz enzim aktivite düzeyinin ve enzimin kinetik özelliklerinin değişip değişmediğini anlayabilmek için, arginaz aktiviteleri ile enzimin bazı kinetik özellikleri çalışılmıştır.

#### **Materyal ve Metot**

Çalışmada kullanılan kan ve karaciğer doku örnekleri Elazığ Elet Tesislerine getirilerek klinik ve postmortem muayene sonrası sağlıklı ve fasciolasis teşhis konulan koyunlardan alınmıştır. Arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetylmonoksim-Üre (TDMU) metodu kullanılmıştır (6).

Eritrosit arginaz enziminin tayini için okzalatlı kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinin orijinal hacmini belirlemek amacıyla cam tüplerin etrafı çizilmiştir. Daha sonra kanlar santrifüj edilerek plazmaları uzaklaştırılmış ve kalan peletler 3 defa serum fizyolojik ile yıkamıştır. Yıkamış eritrositler 4 mM'lık MnCl<sub>2</sub> ile orijinal hacimlerine tamamlanarak, bir gece +4°C'de bekletilmiş ve eritrositlerin hemoliz olmaları sağlanmıştır. Hemolizatlarda arginaz aktivitesi ve hemoglobin tayinleri yapılmıştır.

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulup 1 g olarak tartılmış ve 4 mM'lık MnCl<sub>2</sub> ile 1/10 oranında (w/v) sulandırılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 15000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak protein ve enzim tayinleri yapılmıştır.

Hemoglobin tayininde Siyanomethemoglobin (25) metodu, protein miktarının ölçümünde ise Lowry (16) metodu kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen veriler, ortalama ± standart hata olarak gösterilmiş olup, grupların karşılaştırılmasında Student- t testi (4) kullanılmıştır.

Çalışmada spesifik aktivite ; 1 saatte, 37°C'de, L-argininden 1 μmol üre oluşturan enzim aktivitesinin

doku için mg protein, eritrosit için g hemoglobin cinsinden ifadesi olarak tarif edilmiştir.

#### **Bulgular**

Sağlıklı ve fascioliosisli koyunların eritrosit arginaz aktiviteleri sırasıyla  $84.66 \pm 28.29$  ile  $87.11 \pm 22.41$  U/g Hb iken, dokuda bu değerler sırasıyla  $236.65 \pm 57.64$  ile  $50.37 \pm 19.63$  U/mg protein olarak bulunmuştur (Tablo 1).

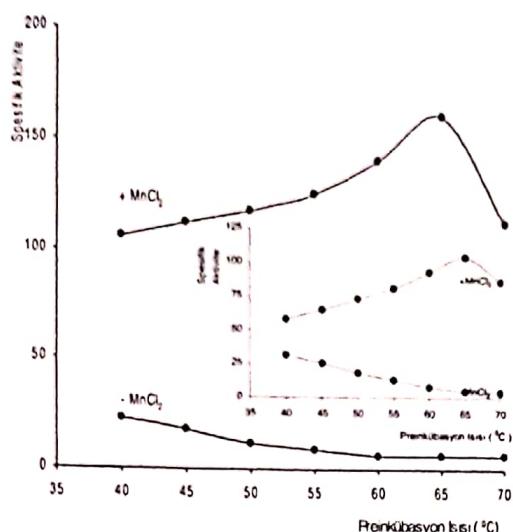
Mn<sup>2+</sup> iyonlarının varlığında ve yokluğunda, preinkübasyon ısıları değiştirilerek arginaz enzimi preinkübasyonda edildiğinde MnCl<sub>2</sub> varlığında preinkübasyon uygulanmasının enzim aktivitesini preinkübasyona oranla kontrol grubunda MnCl<sub>2</sub>'süz preinkübasyona oranla yaklaşık 21 misli, fascioliosisli grupta ise yaklaşık 21 misli artışı saptanmıştır (Şekil 1). Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginazı için en uygun preinkübasyon ısısı 65°C olarak kabul edilmiştir.

Koyun karaciğer doku arginazı için optimal preinkübasyon zamanını tespit etmek amacıyla enzim, MnCl<sub>2</sub> varlığında ve 55, 60, 65, 70°C'lik preinkübasyon ısılarında değişik sürelerde bekletilmiş, enzim en yüksek aktiviteye 65°C'de 15 dakikada ulaşmıştır. 65°C'de 15 dakikalık bir preinkübasyon uygulaması, enzim aktivitesini preinkübasyon uygulanmamış doku örneklerine oranla sağlıklı dokuda %51, fascioliosisli dokuda ise %57 oranında artırmıştır (Şekil 2). Sağlıklı ve fascioliosisli dokuda optimal preinkübasyon süresi 15 dakika olarak kabul edilmiştir.

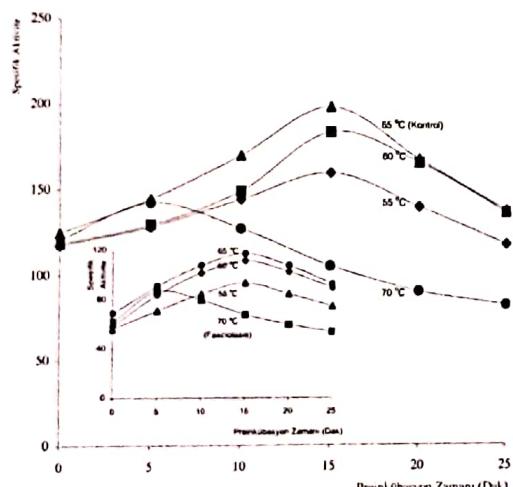
Koyun karaciğer doku arginazı için en uygun inkubasyon süresini saptamak amacıyla MnCl<sub>2</sub> varlığında, inkubasyon süresi değiştirilerek arginin-arginaz reaksiyonunun oluşması sağlanmıştır. Karaciğer doku arginazı 15. dakikaya kadar lineer bir artış gösterip 15. dakikadan sonra bu lineer artış yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır (Şekil 3). Bu nedenle sağlıklı ve fascioliosisli karaciğer doku arginazı için optimal inkubasyon zamanı 10 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 1: Sağlıklı ve fascioliosisli koyunların eritrosit ve karaciğer arginaz aktiviteleri

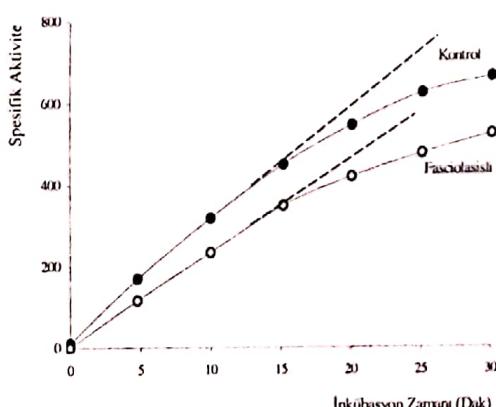
	Arginaz (Eritrosit) U/g Hb		Arginaz (Karaciğer) U/mg protein	
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$
Kontrol grubu	72	$84.66 \pm 28.29$	50	$236.65 \pm 57.64$
Fascioliosisli grup	73	$87.11 \pm 22.41$	20	$50.37 \pm 19.63$
P		>0.05		<0.01



Şekil 1. Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesinin preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişimi

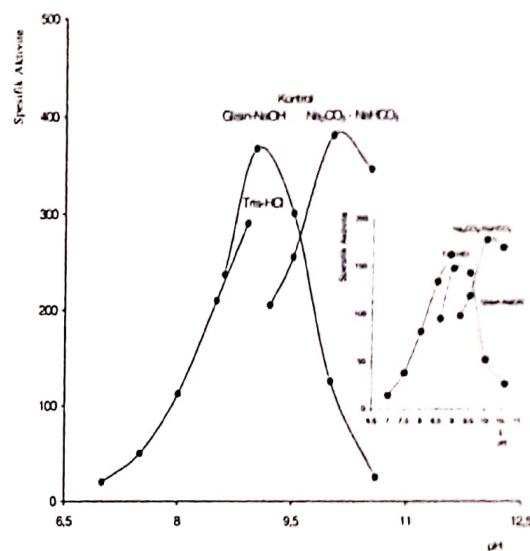


Şekil 2. Farklı ıslarda preinkübasyon zamanına bağlı olarak sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesindeki değişimler



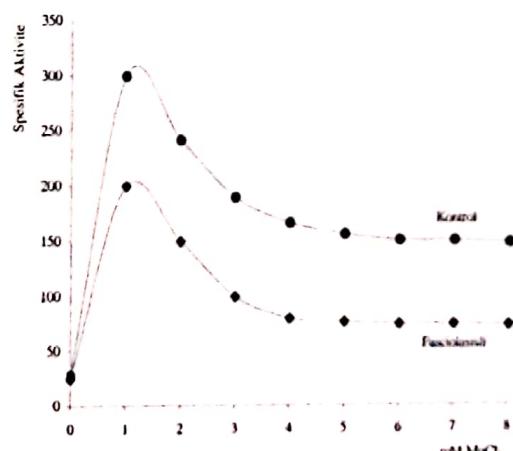
Şekil 3. Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesinin inkubasyon zamanına bağlı olarak değişimi

Karaciğer doku arginazının optimal pH'larını saptamak için 7.0 ile 10.5 arasında değişen çeşitli tampon sistemleri kullanılmıştır. Bu tampon sistemleri Tris-HCl, Glisin-NaOH, Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponları olup, arginin pH'sı ile tamponların pH'sı aynı tutulmuştur. Sağlıklı ve fascioliosisli (Şekil 4) koyun karaciğer doku arginaz aktivitelerinin ölçümü için en uygun tampon, Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tampon sistemi olup, en uygun pH ise 10.0'dur.



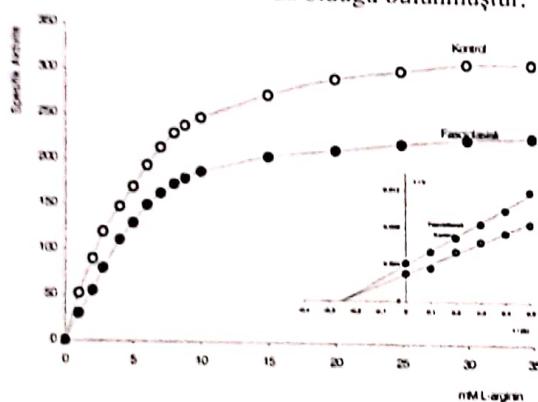
Şekil 4. Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesinin çeşitli tampon sistemlerine ve pH'ya göre gösterdiği değişiklikler

Koyun karaciğer arginaz aktivitesinin  $MnCl_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini araştırmak amacıyla preinkübasyon ortamına 0-8 mM arasında değişen konsantrasyonlarda,  $Mn^{+2}$  iyonları ilave edilmiş ve optimal  $Mn^{+2}$  konsantrasyonu 1 mM olarak saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesinin  $MnCl_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi

Karaciğer doku arginazı için optimal koşullar belirlendikten sonra arginazın substrati L-arginine karşı olan Km'ı Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir. Şekil 6'da da görüldüğü gibi L-arginin konsantrasyonunda sağlıklı koyun karaciğer dokusunda 3 mM, fascioliosisli karaciğer dokusunda 3,5 mM'a kadar olan artış, enzim aktivitesinde linear bir artışa (birinci mertebe kinetiği) neden olmuş, bu noktadan itibaren doğrusallık yavaş yavaş kaybolarak, yerini hiperbolik bir görünümme (karışık mertebe kinetiği) bırakmıştır. 20 mM'lik L-arginin konsantrasyonunda ise arginaz L-arginin ile doygunluğa ulaşarak (sıfır mertebe kinetiği) reaksiyon sabit hızla devam etmiştir. Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında, Lineweaver-Burk (Şekil 6) eğrileriyle de incelenmiş ve koyun karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan Km'inin 4 mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 6. Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginaz aktivitesinin L-arginin derişimine bağlı olarak değişiminin Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileriyle gösterilmesi

### Tartışma

Plazma enzim analizleri yoluyla sığırlarda *F. hepatica* enfeksiyonunun diagnozu ile ilgili yapılan bir çalışmada (27), plazmada albumin, total bilirübün, total protein, arginaz, aspartat aminotransferaz (AST) ve gamma-glutamil transpeptidaz (GGT) aktiviteleri ölçülmüştür. Plazma arginaz aktivitesi ile parazit enfeksiyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Arginaz aktivitesinin plazmada değişiklik göstermemesi arginazın mitokondriye bağlı bir enzim olmasıyla ve genç parazitin göçü esnasında enzimin etrafını çevreleyen sıvının içerişine salınmamasıyla açıklanmıştır (3). Karaciğerde hasar meydana getiren organik çözücüler kullanılarak köpeklerde oluşturulan intoksikasyonda plazma arginaz aktivitesinde artışlar meydana gelmiştir (19).

Türkoğlu (26)'nun yaptığı çalışmada  $CCl_4$  enjekte

edilerek siroz oluşturulan sıçanların karaciğer arginaz aktivitelerinde önemli düşüşler bulunmuştur.

Ozan ve Gülen (20) tarafından yapılan bir çalışmada *F. hepatica* enfeksiyonu sonucu oluşan sirotik sığır karaciğerleri ile plazmalarında bazı amino asit metabolizması enzim düzeyleri ölçülmüş ve yapılan çalışmada plazma arginaz aktivitesinde artış, sirotik karaciğer arginaz aktivitesinde ise düşüş kaydedilmiştir.

Sağlıklı ve Fascioliosisli koyunların eritrosit arginaz aktivite düzeyleri arasında istatistik olarak bir fark gözlenmezken, karaciğer arginaz aktivitesi açısından fascioliosisli hayvanlarda önemli bir düşüş gözlenmiştir. Eritrosit ve karaciğer arginaz aktivitesi ile ilgili bulduğumuz sonuçlar yukarıdaki çalışmalar ile uyum içerisindeidir.

Daha önce birçok dokuda çalışılan arginazların optimal preinkübasyon ısısı 50-60°C civarında bulunmuştur. Preinkübasyon ısısı insan tükürü (14), tiroid dokusu (11), uterus (8), eritrositi (2,8) için 55°C, *Moniezia expansa* (22) için 53°C, sığır rumen doku arginazı için (5) ise 60°C olarak bulunmuştur.

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimal ısuya 40-50°C'ler arasında erişir, bu derecelerin üstünde enzimlerin ısuya bağlı olarak denatüre olma hızı, enzimin reaksiyon hızı artıından daha süratli olduğu için enzim aktivitesi azalmaktadır. Şekil 1'de de görüldüğü gibi enzim aktivitesi  $Mn^{+2}$  varlığında 65°C'ye kadar yükselmekte, 65°C'den itibaren ise düşmektedir. Bu sonuçlara göre sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginazının diğer arginazlardan daha fazla ısuya dayanıklı olduğu söyleyenebilir.

Çalışmamızın diğer bir bölümünde, değişik süreçlerde farklı preinkübasyon ısları uygulanarak; maksimum aktiviteye ulaşmak için gereken preinkübasyon zamanı tespit edilmiştir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi enzim 55, 60, 65, 70°C'lık ıslarda preinkübe edildiğinde; en yüksek aktiviteye 65°C'de 15 dakikada ulaşmaktadır.

Bu konu ile ilgili çalışmalara baktığımızda preinkübasyon süresi, insan tiroid dokusu (11), tükürü (14), karaciğer ve eritrosit (2) arginazı için 20 dakika olarak bulunmuştur. Kedra-Lubońska ve arkadaşları (13) insan eritrositleri için bu süreyle 15 dakika, Erişir ve Ozan (5) sığır rumen doku arginazı için 9 dakika olarak bulmuşlardır.

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında cereyan ettiğinden inkübasyon ısısı 37°C olarak alınıp reaksiyon için gerekli inkübasyon zamanını tespit etmek amacı ile 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakikalarda

enzim inkübasyona tabii tutulmuştur. Elde edilen veriler grafice uygulandığında Şekil 3'den de anlaşılaceği gibi enzim aktivitesi 15. dakikaya kadar lineer bir artış göstermekte, bu dakikadan sonra lineerlikten sapmaktadır. 15. dakikadan sonra lineeritenin bozulması dikkate alınarak inkübasyon süresi sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 10 dakika olarak alınıp ünite tarifi saate göre yapılmıştır.

İnkübasyon süresine göre ünite tanımı yapıldıgından, araştırmacılar bu konuda farklı süreler kullanmış ve aktiviteyi buna göre tanımlamışlardır. İnsan tiroid doku arginazı için bu süre 30 dakika (11), karaciğer için 20 dakika (8), eritrosit için 8 dakika (8,23), uterus için 20 dakika (8), vitreus için 9 dakika (7), sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (5) olarak alınmıştır.

Çalışmada, enzim aktivitesi üzerine farklı pH'ların ve tamponların etkileri araştırılmıştır. Arginazın optimal pH'sı bir çok doku türündede çalışılmış ve argininin arginaz ile hidrolizi için gerekli optimal pH'nın doku türüne göre değiştiği ve bu pH'nın 9.3-11 arasında bazik pH sınırları içinde olduğu bildirilmiştir (2,14,24).

Arginazın, arginini hidrolize edebilmesi için optimal pH'nın 9.4-9.8 arasında olması gereklidir (18,24). Arginaz enzimi ölçümünde araştırmacılar farklı tampon sistemleri kullanmışlardır. Colombo ve Konarska (2), hem karaciğer hem de eritrosit için karbonat tampon (pH: 9.5) sistemi kullanmışlardır. Ozan ve ark.(22)'ları *Moniezia expansa* arginazı için en uygun tamponun karbonat tamponu (pH: 9.5) olduğunu tespit etmişlerdir. Erişir ve Ozan (5) sığır rumen doku arginazı için en uygun tamponun bikarbonat-karbonat tamponu olduğunu (pH: 9.7) saptamışlardır. Ozan ve Gülen (20,21) yaptıkları çalışmada *F. hepatica*'nın arginaz enzim aktivitesinin optimal pH'sını 10.5 olarak bulurken, sığır tükürük arginazının optimal pH'sını 9.2-9.3 arasında saptamışlardır.

Şekil 4'de de görüldüğü gibi sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginazı da bazik pH'da optimum aktivite vermektedir ve diğer doku arginazları için belirlenmiş olan pH değerleri ile uyum göstermektedir.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için  $Mn^{+2}$  katyonlarının gerekli olduğu Muszynska (17) tarafından bildirilmiştir.  $Mn^{+2}$  iyonlarının enzime bağlanması, ısiya dayanıklılığı artırmaktadır ve enzimin inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (11,21).

Sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğer doku arginazı 1 mM'lık  $Mn^{+2}$  iyonları varlığında maksimum aktivite göstermektedir (Şekil 5). Yapılan çalışmalarla dokular için  $Mn^{+2}$  konsantrasyonları farklı olup insan karaciğeri için 2.0 mM (2), insan tükürüğü için 5.0 mM (14), tiroid doku arginazı için 2.5 mM (11), eritrosit arginazı için 5.0 mM (2,15), sığır rumen doku arginazı için 1 mM (5) olarak tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarla ortak nokta, manganın arginaz aktivitesi için vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal  $Mn^{+2}$  derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir.

Koyun karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan  $K_m$ 'ni araştırmak amacıyla enzim miktarı sabit tutulup, L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Burada maksimum aktivitenin yarısına tekabül eden substrat konsantrasyonu  $K_m$ 'i, yani enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (Şekil 6) eğrileri ile  $K_m$ 'ler değerlendirildiğinde sağlıklı ve fascioliosisli koyun karaciğerlerinde  $K_m$ 'in 4 mM civarında olduğu gözlenmiştir.

İnsan karaciğer arginazı için  $K_m$  10.14 mM (24), insan eritrosit arginazı için  $K_m$  1.5 mM (23), *Moniezia expansa* arginazı için 7 mM (22), sığır rumen doku arginazı için  $K_m$  4 mM olarak bulunmuştur (5). Ozan ve Gülen (21) tarafından yapılan bir çalışmada  $K_m$  değerleri sığırların tükürüklerinde 5-5.5 mM, eritrositlerinde 2.5 mM ve karaciğerlerinde ise 2.3 mM civarında bulunmuştur.

Yukarıda verilen örneklerden de anlaşılaceği üzere arginaz enziminin arginine karşı  $K_m$  değeri dokuların farklılığına göre değişmektedir. Ancak karaciğer gibi benzer doku çalışmalarında da uyum görülmemektedir. Dokular aynı olduğu halde sonuçların uyum içinde olmaması, canlıların türlerinin ve optimize edilen şartların farklılığından kaynaklanabilir şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak, eritrosit arginaz aktiviteleri bakımından fascioliosisli ile kontrol grupları arasında fark gözlenmemesine rağmen, karaciğer arginaz aktiviteleri bakımından fascioliosisli grupta önemli derecede bir azalma gözlenmiştir. Bu aktivitedeki düşüş karaciğer dokusunun ileri derecede fibrotik olmasından kaynaklanabilir. Fasciolasisin karaciğer dokusunun biyokimyasal özelliklerini etkilemediği, sadece enzim aktivitesinde düşüşe sebep olduğu gözlenmiştir.

## Kaynaklar

1. Aykan TB, Tüzeliner N, Sav A, Ince Ü. Kısa Patoloji. İstanbul. Nobel Tıp Kitapları, 1990.
2. Colombo JP, Konarska L. Arginase. In: Bergmeyer, Grab M (Eds). Methods of enzymatic analysis. 3<sup>rd</sup> Ed. Weinheim. Verlag Chemie, 1984; 285-294.
3. Cornelius CE. Liver function In: Kaneko JJ Editor. Clinical chemistry of domestic animals. 3th ed. New York. Academic Pres Inc., 1980; 201-257.
4. Dülzüneş O, Kesici T ve Gürbüz F. İstatistik Metotları 1. Ankara. AÜ Ziraat Fak Yayınları No: 861, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1983.
5. Erişir M, Ozan TS. Sığır rumen doku arginazının saflaştırılmamasından önce ve saflaştırılmışından sonra bazı özellikler. Tr J Vet Anim Sci 1999; 23(3): 597-608.
6. Geyer JW and Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Anal Biochem 1971; 39(2): 412-417.
7. Gürsu MF. Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre Ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
8. Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit Ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
9. Isseroff H, Tunis M, Read CP. Changes in amino acid of bile in *F. hepatica* infections. Comp Biochem Physiol 1972; 41B: 157-163.
10. Isseroff H, Sawma JT, Reino D. Fasciolasis: Role of proline in bile duct hyperplasia. Science 1977; 198: 1157-1159.
11. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ışıya karşı stabilitesi. Biyokimya Dergisi 1993; 4: 59-67.
12. Jackson JM, Beaudet AL, O'Brien WE. Mammalian Urea cycle enzymes. Ann Rev Genet 1986; 20: 431-464.
13. Kedra-Lubomska M, Zamecke E, Poremba Z. The isolation and immunological properties of two arginase form human erythrocytes. Biochem Med Metab Biol 1988; 39: 247-257.
14. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG. Human salivary arginase and its deficiency in argininaemia. J Clin Chem Clin Biochem 1985; 23: 337-342.
15. Konarska L, Tomaszewski L, Rolczyk U. Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. II. Effect of hydrokortisone and thyroxine. Biochem. Med Metab Biol 1986; 35(2): 170-178.
16. Lowry By O H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
17. Muszynska G. Immobilization of rat liver arginase. Cl Biospecific Chromatography. Protides of Biological Fluids 23 RD. Colloquium, Oxford and New York. Pergamon Press, 1976; 633-637.
18. Nikumb SK, Santhanam K, Rama K, Rao MV. Hepatic and serum arginase and ornithine transcarbamylase activities of rats maintained on diets of different protein quality. Ann Nut Metab 1987; 31: 387-394.
19. Noonan NE, Meyer DJ. Use of plasma arginase and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase as specific indicators of hepatocellular or hepatobiliary disease in dogs. Am J Vet Res 1979; 40: 942-947.
20. Ozan S, Gülen Ş. *Fasciola hepatica* enfeksiyonu sonucu oluşan sirotik sığır karaciğer ve plazmalarında bazı amino asit metabolizması enzim düzeyleri üzerinde çalışmalar. FÜ Sağlık Bil Derg 1987; (1-A): 113-126.
21. Ozan S, Gülen Ş. Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması. Tr J Vet Anim Sci 1989; 13 (2).
22. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. Kısmen arıtılmış *Moniezia expansa* arginazının bazı özellikleri. Tr J Vet Anim Sci 1993; 17: 245-250.
23. Sondaç Ü. Orak hücre hastalığında eritrosit arginaz aktivitesi ve karbamilasyonun etkisi. Uzmanlık Tezi, FÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 1991.
24. 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.
25. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia. WB Sounders Company, 1986; 1532-1534.
26. Türkoğlu C. Studies on some Hepatic Urea Cycle Enzymes and Pyrimidine Biosynthesis in  $CCl_4$  Injected Rat. Doktora Thesis, Middle East Technical University, 1985.
27. Wyckoff III JH and Bradley RE. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in beef calves by plasma enzyme analysis. Am J Vet Res 1985; 46 (5): 1015-1019.