



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2015; 29 (1): 37 - 43  
http://www.fusabil.org

Fatih DEMİR  
Gonca OZAN  
Penbe Sema TEMİZER OZAN

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

### Ratlara Uygulanan Kurşun Asetatın Karaciğer Arginazına Etkisi ve Enzimin Bazı Kinetik Özellikleri\*

Kentlerde bulunan endüstriyel atıklar ve motorlu araç egzozlarından yayılan kurşun (Pb) çeşitli sağlık problemlerine yol açmaktadır. Kent yaşamında ve kurşun kullanılan endüstri dallarında kurşuna maruziyet sonucu akut veya kronik zehirlenmeleri görülmektedir. Üre siklusunun son basamağını katalize eden arginaz arginini ornitin ve üreye hidrolize eden bir enzimdir. Arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu organ karaciğerdir ve arginaz, memeli karaciğerinde amonyağın detoksifikasyonundan da sorumlu bir enzimdir. Bu çalışmada; kurşun asetatın rat karaciğer doku arginazı üzerine olan etkisi ve enzimin bazı kinetik özellikleri araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 8 haftalık 250±20 g ağırlığında, 28 adet erkek Wistar cinsi rat dört gruba ayrıldı. Grup-I; kontrol grubu, Grup-II; 25 mg/kg kurşun asetat uygulanan grup, Grup-III; 50 mg/kg kurşun asetat uygulanan grup, Grup-IV; 75 mg/kg kurşun asetat uygulanan grup. Kurşun asetat Grup II, III, IV'deki ratlara 1 mL serum fizyoloji içinde 7 gün boyunca sabah akşam intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlar anestezi altında dekapite edildi, karaciğer dokuları alındı ve spektrofotometrik yöntemlerle arginaz aktiviteleri ve enzimin bazı kinetik özellikleri çalışıldı. Kontrol ve kurşun asetat içeren denek gruplarında karaciğer doku arginazı için preinkübasyon ısısı 65°C, preinkübasyon zamanı 20 dakika, inkübasyon zamanı 18 dakika ve optimum pH: 10 olarak saptandı. Enzimin en yüksek aktiviteyi 3 mM MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda verdiği belirlendi. Arginaz enziminin aktivasyonu için Mn<sup>+2</sup> iyonlarının ve 65°C'de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edildi. 50mg/kg kurşun asetat içeren rat karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan Km'inin 8.5 mM, kontrol grubunun ise 11.5 mM civarında olduğu bulunduğu ve Pb varlığında Km ve Vmax'ın azaldığı gözlemlendi ve meydana gelen inhibisyonunun kompetitif olduğu saptandı. Ayrıca uygulanan kurşun miktarı arttıkça arginaz aktivitesinin azaldığı tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kurşun asetat, arginaz, kinetik, rat, karaciğer.

#### Effects of Lead-Acetate on Liver Arginase and Some Kinetic Properties of the Enzyme in Rat

The lead spreading from the industrial wastes and exhaust of the motor vehicles causes various health problems. The occurrence of chronic and acute poisoning is observed as a consequence of lead exposure in industrial branches in urban life. Arginase which is the last enzyme of the urea cycle is responsible for the detoxification of ammonia in mammals by hydrolysing arginine to ornithine and urea. Also the liver is the organ which has the highest arginase activity. The aim of this study was to find out some kinetic properties of rat liver arginase applied lead acetate. In this study, 28 Wistar albino male rats were used with the weight of 250±20 grams and approximately 8 weeks old, and divided 4 groups; Group-I: Control group, 1 mL physiological-saline-solution/i.p, Group-II: Lead-acetate 25 mg/kg-i.p, Group-III: Lead-acetate 50 mg/kg-i.p, Group-IV: Lead-acetate 75 mg/kg ip. The lead-acetate was added into 1 mL physiological saline solution within 7 days, it was applied twice a day (morning-evening) intraperitoneally. At the end of the experiment, the rats in all groups were sacrificed by using the anesthesia and liver tissues were taken. The preincubation temperature for rat liver tissues was determined at 65°C and the preincubation time at 20 minutes, incubation time at 18 minutes and optimum pH at 10. It was observed that the enzyme showed the highest activity of 3 mM MnCl<sub>2</sub> concentration. As a result, it was determined that Mn<sup>+2</sup> ions and preincubation at 65°C is required for the activation of the enzyme. It was observed that Km of the rat liver which was opposite to L-arginine of tissue arginase including lead-acetate 50 mg/kg-i.p was approximately 8.5 mM and control group was a proximately 11.5 mM. As a result, it was observed that decreasing Km and Vmax in the presence of Pb caused uncompetitive inhibition. Besides it was determined that when the amount of lead-acetate increased the arginase activity decreased.

**Key Words:** Lead-acetate, arginase, kinetic, rat, liver.

Geliş Tarihi : 05.01.2015  
Kabul Tarihi : 18.02.2015

Yazışma Adresi  
Correspondence

Penbe Sema TEMİZER OZAN  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı,  
Elazığ - TÜRKİYE

stozan@firat.edu.tr

#### Giriş

Kurşun (Pb) organizma için toksik bir metaldir. Endüstride; pil, akümülatör, boya, pigment, plastik, oyuncak, seramik sanayinde ve dökümlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Konserveler, gıdaların saklanması, sular, endüstriyel baca dumanları

\* Bu araştırma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP, Proje No: VF.12.16) tarafından desteklenen Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

ve benzin içindeki kurşunun motorlu araç egzozlarından yayılması sonucu oluşan buhar ve dumanlarının solunması ile insan ve hayvan sağlığı zarar görmektedir (2). Kurşun organizmaya genel olarak en fazla solunum havasıyla akciğerlerden, daha az sindirim yoluyla su ve gıdaların mide sıvısında çözülüp emilmesiyle alınırken, en az da cilt yoluyla emilerek alınmaktadır (2). Kurşun kan aracılığıyla; beyin, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek, hematopoetik sisteme girerek organlar üzerinde akut ve kronik zehirlenme etkisi gösterip, dışkı, idrar ve ter yoluyla da organizmadan atılmaktadır (3, 4). Akut kurşun zehirlenmesinde; vücut salgılarında artışa, kusmaya, şiddetli karın ağrısına, idrar çıkarmada zorluğa ve ölümlere sebep olabilmektedir (2). Kronik zehirlenmede ise; mukozalarda özel gri-sarımtırak soluk renge, sinir uçlarında felç, yorgunluk, bitkinlik, baş ve eklem ağrılarına, iştahsızlık, mide-bağırsak bozuklukları, kabızlık, anemi, damar daralmaları sonucu böbrek yetmezliğine neden olmaktadır. Ayrıca hemolitik anemi, toksik hepatit ve ensefalopatiye de sebep olmaktadır (3, 5).

Aminoasitlerin yıkımı sonucu ortaya çıkan toksik bir madde olan amonyağın detoksifikasyonu ile karaciğerde bir dizi reaksiyon sonucu Krebs Henseleit üre döngüsü ile ürenin biyosentezi gerçekleşmektedir (6, 7). Üre siklusunun en son basamağını katalize eden bir enzimi olan arginaz (L-Arginin amidinohidrolaz; EC3.5.3.1) L-arginini, üre ve ornitine hidrolize eder. Üre böbrek yolu ile atılırken, ornitin de prolin ve poliamin sentezinde rol oynar (8). Karaciğer dışında üre döngüsü olmayan; eritrosit, lökosit, trombosit, beyin, bağırsak, böbrek, pankreas, akciğer, meme bezi, testis, tükürük bezi, plesenta, deri, iskelet ve kalp kası gibi birçok doku ve organda da arginaz enzimine rastlanmaktadır (9, 10).

Bu çalışmada, yaşam alanlarında yaygın olarak bulunan ve toksik bir madde olan kurşun asetatın, ratlara farklı dozlarda uygulanması sonucu, rat karaciğer arginaz aktivitelerine etkisi ve enzimin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden temin edilen, 8 haftalık, 250±20 gram ağırlığında 28 adet erkek Wistar cinsi albinoratlardan kullanıldı. Ratlar deney öncesi ve deney sırasında standart şartlarda (22-24°C sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık fotoperiyodunda olmak üzere) 4'erli gruplar halinde özel kafeslerde bekletildi. Ratların beslenmesinde standart rat pellet yemi ve içme suyu kullanıldı.

Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (22/05/2012 tarih 2012/6 sayılı toplantı, karar no:62) alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak yapıldı.

Seviz haftalık 28 adet erkek Wistar cinsi albino ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı (n=7). Gruplar şu şekilde oluşturuldu; Grup-I; kontrol grubu, Grup-II; 25 mg/kg

kurşun asetat uygulanan grup, Grup-III; 50 mg/kg kurşun asetat uygulanan grup ve Grup-IV; 75 mg/kg kurşun asetat uygulanan grup. Kurşun asetat 1 mL serum fizyolojik içerisinde hazırlanarak, 7 gün boyunca sabah akşam birer kez olmak üzere intraperitoneal (i.p) yolla uygulandı. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlar ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Dekapite edilen ratların karaciğer dokuları %0.9'luk NaCl ile yıkandı ve paketlenerek -80°C de derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı.

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulmuş 1 g tartıldı ve distile su ile 10 mL'ye (ağırlık/hacim) tamamlanarak, örnekler parçalandıktan sonra Potter-elvehjem (cam-cam) homojenizatörle homojenize edildi. Homojenatlar +4°C'de 13.500 rpm'de 15 dakika santrifüjasyona tabi tutulduktan sonra ayrılan süpernatantlar enzim kaynağı olarak kullanıldı.

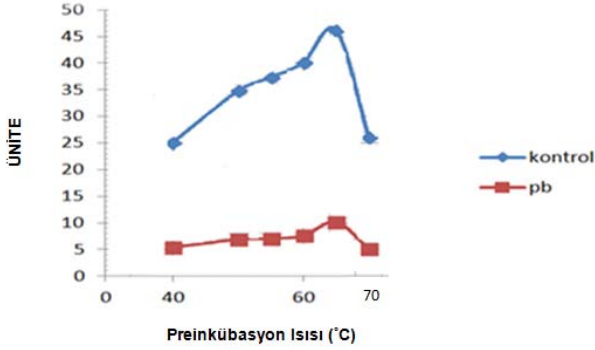
Arginaz aktivitesi, tiyosemikarbazid-diasetilmonoksim üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçüldü (11). Yöntemin prensibi, arginaz tarafından L-argininin hidrolizi ile oluşan ürenin 540 nm dalga boyunda spektrometrik ölçümüne dayanmaktadır. Bir ünite Arginaz aktivitesi; 1 saatte 37°C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir (µmol üre/saat/mg protein) (11, 12). Doku proteinlerinin ölçümünde ise modifiye edilmiş Lowry ve ark. (13) yöntemi kullanıldı.

Arginaz aktivite tayini için, süpernatant 1 mM MnCl<sub>2</sub> çözeltisi ile sulandırıldı, 65°C'de 20 dakika metabolik su banyosunda preinkübe edildi. Preinkübe edilen örnekler enzim kaynağı olarak kullanıldı. Tüp içindeki enzimatik karışım 1 mL olup; 65 mM'luk L-arginin'den (pH=10) 0.3 mL ve 150 mM'luk karbonat tamponundan (pH=10) 0.4 mL içerecek şekilde düzenlendi. Tüplere önce L-arginin, sonra karbonat tamponu, daha sonra da üzerine preinkübasyon uygulanan enzim kaynağından 0.3 mL ilave edilip, 37°C'de 10 dakika sallantılı metabolik su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatıldı. 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda tüplere 3 mL asit karışımı ilave edilip enzimatik tepkime durduruldu. Asit ilavesinden sonra tüplere 2'şer mL renk ayırıcı eklendive tüpler vorteksle karıştırılarak, 10 dakika kaynar su banyosunda tutuldu ve renk oluşumu sağlandı. Kaynar su banyosundan çıkan tüpler musluk suyu altında soğutulduktan sonra UV/VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV-240, Japonya), 520 nm dalga boyunda okundu, üre miktarları sıfır zaman körlerinin (zero time blank) absorbanslarının çıkarılmasından sonra değerlendirildi.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 programı ile Kruskal Wallis ve Mann Whitney-U testi kullanılarak yapıldı. Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile gruplar arası karşılaştırmalar, Mann-Whitney-U testi ile gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı test edildi. Tüm sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi ve P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

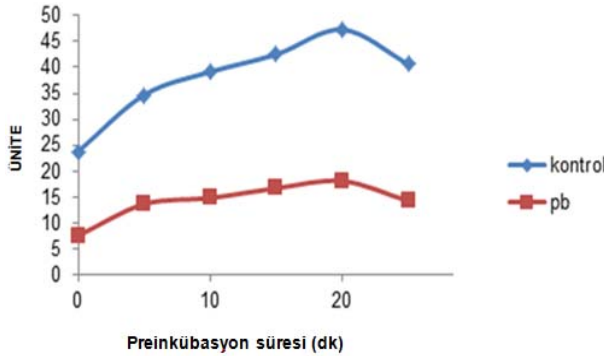
## Bulgular

**1-Preinkübasyon Isısının Tesbiti:** Rat karaciğer arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisini araştırmak için enzim kaynağı 1 mM  $MnCl_2$  varlığında 40-70°C'ler arasında preinkübasyon ısılarına tabi tutuldu ve enzim aktivasyonunda en uygun preinkübasyon ısı 65°C olarak kabul edildi (Şekil 1).



**Şekil 1.** Rat karaciğer doku arginazının preinkübasyon ısısına bağlı olarak değişimi

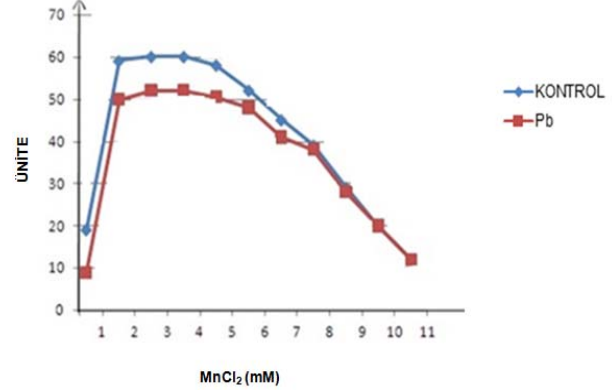
**2- Preinkübasyon Süresinin Tesbiti:** Preinkübasyon süresinin tesbit etmek için, 1 mM'lık  $MnCl_2$  varlığında ve 65°C preinkübasyon ısısında, 0-25 dakikalık zaman aralıklarında enzim aktivitesi incelendi. Enzimin maksimum aktiviteye 20. dakikada ulaştığı görüldü ve optimal preinkübasyon süresi 20 dakika olarak kabul edildi (Şekil 2).



**Şekil 2.** Rat karaciğer doku arginazının preinkübasyon süresine bağlı olarak değişimi

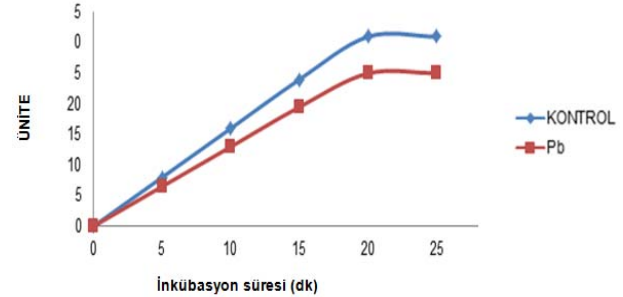
**3- Mangan İyonlarının Etkisi:** Mangan iyonları arginaz enzimi için gereklidir. Bu yüzden arginaz aktivitesi üzerine mangan iyonlarının etkisini araştırmak için 0-10 mM konsantrasyonları arasında değişen  $MnCl_2$ , preinkübasyon ortamına ilave edildive enzim aktivitesi incelendi. Enzim aktivitesinin özellikle 2 mM  $MnCl_2$  konsantrasyonuna kadar yükseldiği, 2 mM'lık  $MnCl_2$  konsantrasyonundan sonra 5 mM  $MnCl_2$  varlığında aktivite sabit devam ettiği, 5 mM  $MnCl_2$

konsantrasyonundan sonra düştüğü tespit edildi. Enzimin en yüksek aktiviteyi, 2 mM'lık  $MnCl_2$  konsantrasyonunda göstermesinden dolayı rat karaciğer doku arginazı için en uygun  $MnCl_2$  konsantrasyonu 3 mM olarak kabul edildi (Şekil 3).



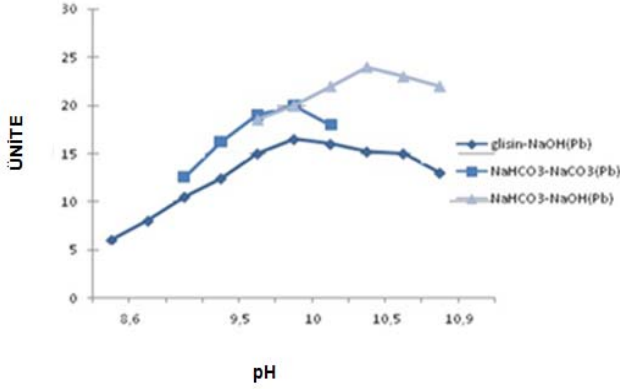
**Şekil 3.** Rat karaciğer arginazının  $MnCl_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi

**4- İnkübasyon Süresinin Tesbiti:** Rat karaciğer arginazı için optimum inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynağı 0-25 dakikalık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutuldu ve bunu argininin hidrolizi izlendi. Enzim için optimum inkübasyon süresi 18 dakika olarak belirlendi (Şekil 4).

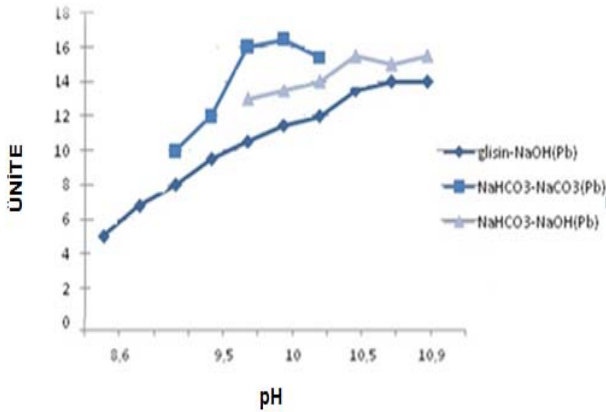


**Şekil 4.** Rat karaciğer arginazının inkübasyon zamanına bağlı olarak değişimi

**5- pH'nın Etkisi:** Rat karaciğer doku arginazının optimal pH'sını tespit etmek için pH 8.6'dan pH 11'e kadar olan sınırlar içinde farklı tampon çözeltileri hazırlandı. 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 9.0-10.9 pH'larında olan sodyum bikarbonat-sodyum hidroksit tamponu kullanılarak belirlenen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin görüldüğü pH ortamı tespit edilmeye çalışıldı. En yüksek aktivite pH 10-10.1'de sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildi. Sonuçta rat karaciğer arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu ve optimal pH'nın da 10 olduğu kabul edildi (Şekil 5-6).



Şekil 5. Kontrol rat karaciğer doku arginazının pH'si



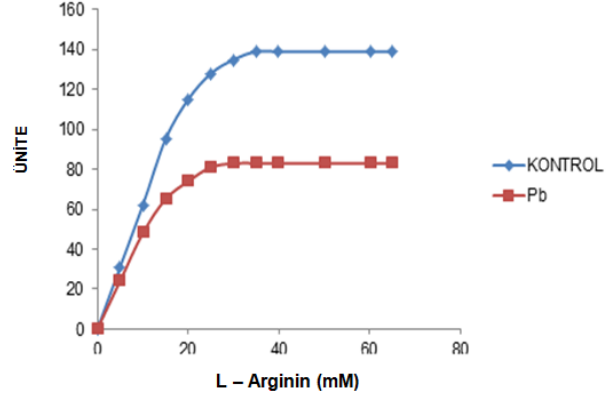
Şekil 6. 50 mg/kg kurşun-asetat uygulanan rat karaciğer arginazının pH'si

**6-Arginin Konsantrasyonunun Etkisi:** Rat karaciğer doku arginazı için optimal şartlar tesbit edildikten sonra, arginazın substratı olan L-arginine karşı  $K_m$ 'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelendi (Şekil 7). Görüldüğü üzere kontrol grubu 15 mM'a, Pb grubu 10 mM'a kadar olan L-arginin konsantrasyonundaki artış enzim aktivitesinde lineer bir artışa neden oldu ve bu noktadan itibaren doğrusallık yavaş yavaş kaybolarak, yerini hiperbolik bir görünüme bıraktı (Şekil 7). Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında, Lineweaver-Burk eğrileriyle de incelendi (Şekil 8); 50 mg/kg kurşun-asetat içeren grubun karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan  $K_m$ 'inin 8.5 mM civarında, kontrol grubunun ise 11.5 mM civarında olduğu bulundu. Neticede, enzimin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin farklı olması inhibisyonunun kompetatif tipte olduğunu göstermektedir.

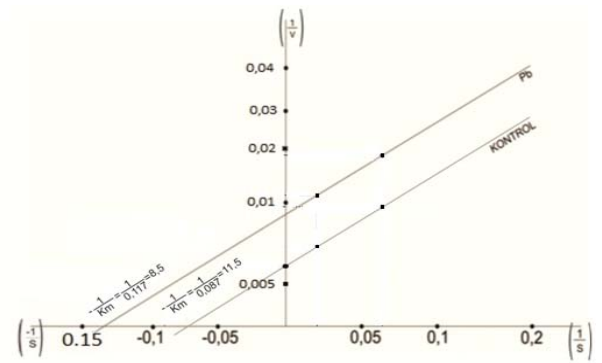
Tablo 1. Grupların karaciğer arginaz aktivitesi ortalama değerleri

Gruplar	Grup I (Kontrol) $\bar{X} \pm SE$	Grup II (25 mg/kg Pb) $\bar{X} \pm SE$	Grup III (50 mg/kg Pb) $\bar{X} \pm SE$	Grup IV (75 mg/kg Pb) $\bar{X} \pm SE$	P
Arginaz Aktivitesi (Ünite)	$20 \pm 2.7^a$	$40 \pm 2.1^b$	$34.28 \pm 1.4^b$	$20 \pm 1.3^c$	0.002

<sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harfler arasında anlamlı farklılık vardır ( $P < 0.05$ ).

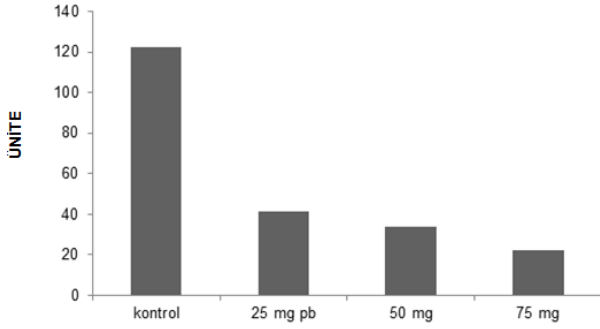


Şekil 7. Rat karaciğer arginazının Michaelis-Menten Grafiği ile gösterilmesi



Şekil 8. Rat karaciğer arginaz aktivitesinin Lineweaver-Burk eğrisi ile gösterilmesi

**7- Grupların Arginaz Aktiviteleri:** Karaciğer doku örneklerinin; kontrol grubunda 1/1500 sulandırma, kurşun gruplarında 1/300 sulandırma yapıldı. Kontrol grubu ile 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 75 mg/kg kurşun asetat uygulanan grupların arginaz aktiviteleri karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg kurşun asetat gruplarının arginaz aktiviteleri arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğu ( $P < 0.05$ ), uygulanan kurşun-asetat dozundaki artışla, enzim aktivitesindeki azalmanın arttığı belirlendi. 25 mg/kg ve 50 mg/kg'lık kurşun asetat grupları arasındaki farklılığın ise istatistiki açıdan önemli olmadığı saptandı (Tablo 1, Şekil 9).



**Şekil 9.** Gruplarının karaciğer doku arginaz aktivitelerinin karşılaştırılması

### Tartışma

Genel olarak enzim yapılarının protein kaynaklı olması nedeniyle enzimler ısıya dayanıklı değildir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği ısının üzerine çıktığı zaman aktiviteleri azalmaktadır. Preinkübasyon ısısının tüm arginaz metodlarında kullanıldığı gözlenmektedir. Preinkübasyon ısısının; koyun gözü vitreusu için 40°C (14), insan ve sığır tükürüğü (15), eritrositi (16) ve uterusu (17) için 55°C, diabetik rat karaciğeri için 68°C (18), sığır rumen dokusu için 60°C (19) kobay karaciğeri için 45°C (20), fascioliosisli koyun karaciğeri için 65°C (21) olduğu bildirilmiştir. Rat karaciğeri doku arginazının preinkübasyon ısısını saptamak için farklı ısılarda (40-70°C) enzim aktivitelerine bakılmış ve en uygun preinkübasyon ısısının 65°C olduğu, daha yüksek ısılarda ise enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği tespit edildi (Şekil1).

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 daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3).  $Mn^{+2}$  iyonlarının preinkübasyon için gerekli olduğu  $Mn^{+2}$  iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğu ve enzim- $Mn^{+2}$ -arginin kompleksinin meydana gelmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (22). Yapılan çalışmalarda (23-25)  $Mn^{+2}$ 'nin preinkübasyon sırasında arginaza bağlanarak enzim aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığı açıklanmıştır. Sıçan karaciğeri doku arginazının  $Mn^{+2}$  iyonları varlığında 55°C'de preinkübasyonun enzim aktivitesini yaklaşık %110 artırdığı (24), 2 mM'lık  $MnCl_2$ 'ün varlığında ve 55°C'de 20 dakika preinkübasyonla; eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat, karaciğeri arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığı saptanmıştır. 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 ve ark. (25) tarafından belirtilmiştir.  $Mn^{+2}$  iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimin aktivasyonlara karşı daha

dayanıklı hale getirmektedir. Bu nedenle, rat karaciğeri doku arginaz aktivitesi üzerine  $MnCl_2$  konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin 3mM  $MnCl_2$  konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için gerekli olan  $MnCl_2$  konsantrasyonu da farklı olup, rat karaciğeri ve sığır rumen doku arginazı (19) için 2 mM, insan karaciğeri ve eritrosit arginazı (17) için 2.5 mM, insan tükürük arginazı (15) ve vitreus arginazı (14) için 5 mM, insan uterusu arginazı için 0.8 mM (17), fascioliosisli koyun karaciğeri arginazı için 1 mM (21), diabetik rat karaciğeri arginazı için 1-2 mM, böbrekarginazı için 2mM olarak bulunmuştur (18). Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta, manganın arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal mangan derişiminin dokulara göre farklılık göstermesidir. Rat karaciğeri doku arginaz enziminin en uygun preinkübasyon süresini tespit edebilmek için 65°C'de 0-25 dakikalar arasında preinkübasyona tabii tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 20 dakika olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Preinkübasyon süresi koyun gözü vitreusu için 9-10 dakika (14), insan tükürük arginazı (15) ve diabetik rat karaciğeri (18) için 20 dakika, sığır rumen dokusu (19), eritrositi (17) ve kobay karaciğeri arginazı (20) için 5 dakika, uterus arginazı için 35 dakika (17), fascioliosisli koyun karaciğeri arginazı için 15 dakika (21) olarak belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında olduğu için enzim kaynağına 37°C'de 0-25 dakikalar arasında inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışıldı, 18. dakikaya kadar lineerliğini devam ettiği, 18. dakikadan sonra lineerliğini yerini hiperbolik bir görünüme dönüştürdüğü gözlemlendi. Rat karaciğeri doku arginazı için optimum inkübasyon süresi 18 dakika olarak kabul edildi (Şekil 4). Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri tesbit edilmiştir. Inkübasyon süresi insan tiroidarginazı için 30 dakika, rat karaciğeri (18), insan karaciğeri ve uterusu arginazları (17) için 20 dakika, koyun gözü vitreusu (14) ve fascioliosisli koyun karaciğeri arginazı (20) için 10 dakika, sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (26) olarak bulunmuştur.

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır (17-19). Rat karaciğeri doku arginazının optimal pH'ını tespit etmek için pH 8.6'dan pH 10.9'a kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlandı. En yüksek aktivite pH 10-10.1'de sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiği için rat karaciğeri arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu, optimal pH'nın da 10 olduğu kabul edilmiştir (Şekil 5).

Karaciğeri ve eritrosit arginazı (21) için pH 9.5, sığır rumen doku arginazı (19) ve fascioliosisli koyun karaciğeri arginazı (21) için pH 10, diabetik rat karaciğeri (18) için pH 10.1, insan karaciğeri ve eritrositi için pH 9.7, insan uterusu için ise pH 9.6'daki karbonat tamponunun kullanıldığı bildirilmiştir (17). Koyun gözü vitreusu için pH8.8'deki Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı (14),

kobay karaciğer arginazının pH' sının 10.5 (20) olduğu ve karbonat tamponunun kullanıldığı tespit edilmiştir. Rat karaciğer arginazı için optimum pH diğer arginazlar için belirlenen optimum pH'a benzerdir. Görüldüğü gibi arginazlar bazik optimum pH'a sahiptir.

Rat 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 50 mg/kg kurşun asetat içeren grupta Km değeri 85 mM, kontrol grubunda ise 11.5 mM olarak bulundu (Şekil 7). Yapılan çalışmalarda farklı türden enzim kaynaklarındaki arginazın L-arginine karşı olan Km'inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değerleri sığır rumen doku arginazı (20) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (22) için 4 mM, insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM (19), koyun meme doku arginazı için 1.35 mM, diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM (18), kobay karaciğer arginazı için 19.6 mM (20) olarak bulunmuştur.

Çalışmada farklı dozlarda kurşun asetat uygulamalarının rat karaciğer arginaz aktivitesini kontrol grubuna göre azalttığı ve aktivitedeki bu azalmanın doz arttıkça daha da etkili olduğu tespit edildi. Caylak ve

Halifeoğlu (27) kurşuna maruziyetin dokularda oksidatif hasara yol açtığını, prooksidan/antioksidan dengenin de bozduğunu gösterilmişlerdir. Neticede hücrelerdeki birçok enzimatik aktivite olumsuz yönde etkilenirken farklı dozlarda uygulanan kurşun asetatın, artan kurşun asetat dozu ile orantılı olarak karaciğer doku arginaz aktivitesini düşürdüğü görülmüştür.

Sonuç olarak, kontrol ve kurşun asetat içeren denek gruplarında karaciğer doku arginazı için preinkübasyon ısısı 65°C, preinkübasyon zamanı 20 dakika, inkübasyon zamanı 18 dakika ve optimum pH 10 olarak saptandı. Enzimin en yüksek aktiviteyi 3 mM MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda verdiği belirlendi. Arginaz enziminin aktivasyonu için Mn<sup>+2</sup> iyonlarının ve 65°C'de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edildi. 50 mg/kg kurşun asetat kurşun içeren rat karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan Km'inin 8.5 mM, kontrol grubunun ise 11.5 mM civarında olduğu bulundu ve Pb varlığında Km ve Vmax'ın azaldığı gözlenerek meydana gelen inhibisyonunun kompetitif olduğu saptandı. Günümüzde birçok nedenle kurşuna sıkça maruz kalınmasının, oksidatif stresi arttırdığı düşünülürse, uygulanan kurşun miktarı arttıkça karaciğer doku arginazının da etkileyebileceği kaçınılmaz görülmektedir.

## Kaynaklar

1. Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı Demir Dışı Metaller Özel İhtisas Komisyonu. Kurşun. Çinko, Kurşun ve Kadmiyum Raporu. TC Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Yayın No: DPT: 2318-ÖİK: 419, Ankara: 1992, 39-40.
2. World Health Organisation (WHO). Environmental Health Criteria 165-Inorganic Lead. Geneva, 1995.
3. Hayes E, McElvaine MD, Orbach HG, et al. Long-term trends in blood lead levels among children in Chicago: Relationship to air lead levels. *Pediatrics* 1994; 93: 195-200.
4. Dündar Y, Aslan R. Effects of lead as a life surrounding heavy metal. *The Medical Journal of Kocatepe* 2005, 6: 1-5.
5. American Academy of Pediatrics. Committee on Environmental Health. Screening for elevated blood lead levels. *Pediatrics* 1998; 101: 1072-1076.
6. Balisteri WF, Rej R. Liver function. In: Burtis A, Ashwood ER. (Editors). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Edition, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994; 1449-1509.
7. Rodvell VW. Harper'ın Biyokimyası. Dikmen N (Çeviren). İstanbul: Nobel, 2004.
8. Jackson MJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Mammalian urea cycle enzymes. *Ann Rev Genet* 1986; 20: 431-464.
9. Nakamura H, Saheki T, Nakagawa S. Differential cellular localization of enzymes of L-arginin metabolism in therat. *Brain Res* 1990; 530: 108-112.
10. 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.
11. Colombo J, Konarska L. Arginase. In: Bergmeyer HV. (Editor). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Edition, Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1984; 285-294.
12. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, et al. Arginase I and II: Do their function overlap. *Mol Genet Metab* 2004; 81: 38-44.
13. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
14. Gürsu FM. Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
15. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, et al. Human salivary arginase and its deficiency in argininemia. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23, 6: 337-342.
16. Ozan S, Gülen Ş. Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* 1989; 13: 154-163.
17. Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1993.
18. Erişir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. Evaluation of optimal conditions from arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Vet Med-Czech* 2005; 50: 69-76.



19. Erişir M, Ozan S. Sığır rumen doku arginazının saflaştırılmasından önce ve saflaştırılmasından sonra bazı özellikleri. Turk J Vet Anim Sci 1999; 23: 597-608.
20. Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. Physico-chemical properties of Guinea Pig liver arginase. Rev Esp Fisiol 1999; 37: 37-44.
21. Benzer F, Ozan ST. Fascioliosisli koyunların arginaz enzim aktivite düzeyleri ile karaciğer doku arginazının bazı biyokimyasal özellikleri. FÜ Sağ Bil Derg 2002; 16: 217-222.
22. Poremska Z, Grabon W, Zelazowska, et al. Nonidentity of subunits of human kidney arginase A1 and human liver arginase A5. Acta Biochemica Polonica 1993; 40: 465-470.
23. Mohammed SM, Greenberg DM. Liver Arginase I. Preperation of extracts of high potency, chemical properties, activation, inhibition and pH activity. Arch Biochem Biophys 1945; 8: 349-357.
24. Schimke RT. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the Rat. J Biol Chem 1962; 237: 59-467.
25. Muszynska G, Severina LO, Lobyreva LW. Characteristics of arginase from plant, ureotelic and uricotelic organism. Acta Biochem Pol 1972;19: 109-111.
26. Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M. Effects of dietary vitamin E and selenium on arginase activity in the liver, kidney and heart of rats treated with high doses of glucocorticoid. Cell Biochem Funct 2003; 21: 331-335.
27. Caylak E, Halifeoglu İ. Sülfür içeren antioksidanların kurşuna maruz kalmış ratlarda karaciğer, böbrek ve beyin malondialdehit ve katalaz düzeylerine antioksidan etkileri. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27: 1-8.