

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

**RATLARA DENEYSEL OLARAK UYGULANAN
FARKLI DOZLARDAKİ KURŞUN ASETATIN
ARGİNAZ ENZİMİ AKTİVİTE DÜZEYLERİNE
ETKİSİ VE ARGİNAZ ENZİMİNİN KİNETİK
ÖZELLİKLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih DEMİR

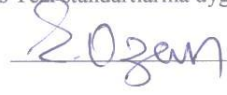
ELAZIĞ-2014

ONAY SAYFASI

Prof.Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü


Bu tez Y.Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. P. Sema TEMİZER OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

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



Prof. Dr. P. Sema TEMİZER OZAN

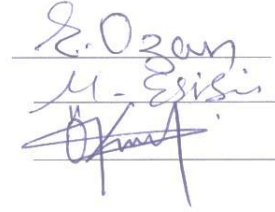
Danışman

Y.Lisans Tezi Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. P Sema TEMİZER OZAN

Prof. Dr. Mine ERİŞİR

Prof. Dr. Ömer KIZIL



TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca ve tez çalıŐmalarım sırasında benden gerekli her tŸrlŸ ve yardımı esirgemeyen değerli danışman hocam ve Anabilim dalı baŐkanımız Prof.Dr. Sema Temizer OZAN ‘ a teŐekkŸrŸ bir borç bilirim.

ÇalıŐmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Anabilim dalımızın ōđretim Ÿyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gonca OZAN ‘a sonsuz teŐekkŸrlerimi sunarım. Anabilim dalımızın değerli ōđretim Ÿyeleri Prof. Dr.Seval YILMAZ’a ve Prof. Dr. Mine ERİŞİR’e, teŐekkŸr ederim. ÇalıŐmam sırasında yardımını esirgemeyen ve beraber çalışma imkanı bulduğum değerli asistanlar ArŐ.gŸr. M. Ali Kısaam ve Ar.gŸr. Emre Kaya ‘ ya, Biyokimya Anabilim Dalında gŸrevli tŸm personele, sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim eŐime ve aileme teŐekkŸr ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Üre Sentezi.....	5
3.2. Amonyak Metabolizması	6
3.2.1. Amonyak Kaynakları	7
3.3. Üre Döngüsü	8
3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları.....	9
3.4. Arginaz Enzimi.....	11
3.4.1. Arginazın İzoenzimleri ve Özellikleri.....	14
3.4.2. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri	14
3.4.3. Klinik Olarak Arginaz Enzimi	16
3.4.4. Arginazın Biyokimyasal ve Patolojik Önemi	17
3.4.5. Arginaz Enzimi Eksikliği	20
3.5. Kurşun.....	21
3.5.1. Kurşun metabolizması.....	22
3.5.2. Kurşunun organizma üzerine etkileri ve tanı.....	24
3.5.3. Biyokimyasal parametreler	25

4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
4.1. Deney Hayvanları.....	29
4.2. Kimyasal Maddeler.....	29
4.3. Kullanılacak Cihazlar	30
4.4. Metodlar	30
4.4.1. ArginazAktivitesinin Ölçülmesi	30
4.4.1.1. Kullanılan Ayraçlar	31
4.4.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü	33
4.4.2. Homojenatta Protein Ölçümü	34
4.4.2.1. Kullanılan Ayraçlar	34
4.4.2.2. Deney Prosedürü.....	35
5. BULGULAR.....	37
5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti	37
5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti.....	38
5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti.....	39
5.4. Mangan İyonlarının Etkisi	39
5.5. Rat Karaciğer Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi.....	41
5.6. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi	42
5.7. Rat Karaciğer Dokularında Arginaz Aktivitesinin Kurşun miktarlarına göre karşılaştırılması;	44
6. TARTIŞMA.....	47
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Glutamattan amonyağın serbestleşmesi	5
Şekil 2. Amonyak Metabolizması	7
Şekil 3. İdrardaki azot içeren bileşiklerin dağılımı	9
Şekil 4. Üre döngüsü.....	11
Şekil 5. Protein Sentezi.....	14
Şekil 6. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi	37
Şekil 7. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.....	38
Şekil 8. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	39
Şekil 9. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.....	40
Şekil 10. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler-kontrol grubu.....	41
Şekil 11. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler-kurşun(Pb) asetat grubu	42
Şekil 12. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	43
Şekil 13. Rat Karaciğer Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.	44

Şekil 14. Kontrol grubu (grup 1) ve 25 mg Pb (grup 2) verilen grubların dokularındaki Arginaz aktivite düzeyleri.....	45
Şekil 15. Kontrol grubu (grup 1) ve 50 mg Pb (grup 3) verilen grubların dokularındaki Arginaz aktivite düzeyleri.....	45
Şekil 16. Kontrol grubu (grup 1) ve 75 mg Pb (grup 4) verilen grubların dokularındaki Arginaz aktivite düzeyleri.....	46

KISALTMALAR LİSTESİ

AL	: Fumarik Asit Argininosüksinat Liyaz
ALAD	: ALA dehidrataz
BSA	: Rat serum albumin
EPA	: Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi
İ.P	: İntra Peritoneal
KPS	: Karbonilfosfat Sentetaz
NAGS	: Argininosüksinat Sentetaz
NAGS	: N- Asetilglutamat Sentetaz
OAT	: Ornitinaminotransferaz
ODC	: Ornitindekarboksilaz
OTK	: Ornitin Transkarbomoiaz
PP	: Protoporfirin
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
TDMU	: Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim Üre
TSC	: Tiosemikarbazid
ZnPP	: ÇinkoProtoporfirin

1. ÖZET

Kent yaşamında ve kurşun kullanan endüstri dallarında kurşuna maruziyet oluşmakta, sonuçta akut veya kronik zehirlenmeler görülmektedir. Günümüzde kırsal bölgelerde su ve besinlerle birkaç mg kurşun alınmaktadır. Kentlerde bulunan endüstriyel artıklar ve motorlu araç egzozlarından yayılan kurşun canlıları etkilemektedir. Kurşun maruziyeti tüm toplumu etkilemekte ve çeşitli sağlık problemlerine yol açmaktadır.

Üre siklusunun son enzimi olan arginaz (L-arginin üre hidrolaz veya amidinohidrolaz (E.C 3.5.3.1)), arginini, ornitin ve üreye hidrolize ederek, özellikle memelilerde karaciğerde amonyağın zehirsizleştirilmesinden sorumludur. Karaciğer, arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu organdır. Ekstra hepatic dokulardaki aktivitesi, karaciğerden belirgin olarak daha düşüktür. Biz de çalışmamızda kurşun asetatın karaciğer dokusunda bulunan arginazın aktivitesine etkisini araştırdık.

Çalışmada ortalama 8 haftalık 28 adet 250 +/- 50 gram ağırlığında Wistar cinsi albino rat kullanılmıştır. Örnekler rastgele alınarak dört gruba ayrılmıştır.

Grup I; kontrol grubu 1 ml serum fizyolojik i.p ,

Grup II; kurşun asetat 25 mg/kg-i.p ,

Grup III; kurşun asetat 50 mg/kg-i.p ,

Grup IV; kurşun asetat 75 mg/kg - ip şeklinde düzenlenmiştir.

Kurşun asetat 1 ml serum fizyolojik içerisine katılarak 7 gün boyunca sabah akşam birer kez olmak üzere periton içi uygulanmıştır. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlara ketamin 75 mg/kg+xylozine 10 mg/kg periton içi (i.p)

uygulanarak denekler anestezi altında dekapite edilmiştir. Dekapitasyonun ardından ratların karaciğer dokuları hızla çıkarılarak 0,9 luk NaCl ile yıkanmış, daha sonra paketlenerek soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılarak -80 °C de derin dondurucada saklanmıştır

Rat karaciğer doku arginazı için preinkübasyon ısısı 65°C, preinkübasyon zamanı 20 dakika, inkübasyon zamanı 18 dakika ve optimum pH 10 olarak saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi 3 mM MnCl₂ konsantrasyonunda vermiştir. Sonuç olarak enzimin aktivasyonu için Mn⁺² iyonlarının ve 65 °C' de preinkübasyonun gerekli olduğu tespit edilmiştir. Kurşun içeren rat karaciğer doku arginazının L- arginine karşı olan Km'inin 8,5 mM civarında, kontrol grubunun ise 11,5 mM civarında olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, Pb varlığında Km ve Vmax nun azaldığı gözlenerek meydana gelen inhibisyonun unkompetatif olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kurşun Asetat, Arginaz, Rat

2. ABSTRACT

THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL APPLIED TO DIFFERENT DOSES LEAD-ACETATE IN RATS ON ARGINASE ACTIVITY AND KINETIC PROPERTIES OF THE ARGINASE ENZYME

In the city life and the industrial branches which lead is used, an exposure to lead occurs and as a consequence acute or chronic poisonings are observed. Nowadays, in rural regions few mg of leads are taken with food and water. The lead spreading from the industrial wastes and exhaust of the motor vehicles has an effect on creatures. The lead exposure affects all society and causes various health problems.

Arginase which is the last enzyme of the urea cycle (L-arginine urea hydrolase or amidohydrolase (E.C 3.5.3.1) is responsible for the detoxification of the liver and ammoniac in mammals by hydrolyzing arginine to ornithine and urea. The liver is the organ which has the highest arginase activity. Its activity in extra-hepatic tissues is distinctly lower than liver.

We have examined the effect of the lead acetate on the arginase activity found in the liver tissues.

In the experiment, 28 Wistar type albino rats were used with the weight of 250 +/- 50 grams and approximately 8 weeks old. The samples were randomly taken and divided into four groups.

The groups are regulated as follows;

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 has been added into 1 ml physiological saline solution and during 7 days it was applied in peritoneum one per night and day. At the end of the experiment 10 mg/kg peritoneal spread was applied into 75 mg/kg+ xylazine to the rats in all groups under the anesthesia. Following the decapitation, the liver tissues of the rats are displaced rapidly and were washed with % 0,9 NaCl and were storage in deep freezer at 80 °C C by being packaged and taken to laboratory in cold chain.

The preincubation temperature for rat liver tissues was determined as 65 °C and the preincubation time as 20 minutes , incubation time as 18 minutes and optimum pH as 10. The enzyme has given the highest activity in 3 mM $MnCl_2$ concentration. As the result, it is determined that Mn^{+2} ions and preincubation at 65 °C is required for the activation of the enzyme. It is observed that K_m of the rat liver which is opposite to L-arginine of tissue arginase including lead is approximately 8,5 mM and control group is approximately 11,5 mM. As the result, it is observed that K_m and V_{max} in the presence of Pb causes uncompetitive inhibition by decreasing.

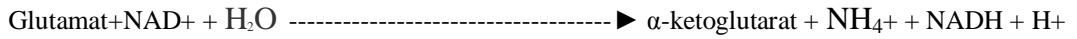
Key Words: Lead acetat, Arginase, Rats

3. GİRİŞ

3.1. Üre Sentezi

Üre biyosentezi, karaciğerde meydana gelen üre döngüsü sonucu amonyağın detoksifikasyonu ile gerçekleşir (1). İlk basamak amino grubunun ayrılmasıdır. Ayrılan amino gruplarını α -ketoglutarat toplar ve glutamat meydana gelir. Oluşan glutamat, glutamatdehidrogenaz enzimi ile tekrar α -ketoglutarata dönüşür (Şekil 1). Amino asitler transaminasyona uğrayarak α -ketoasite dönüşürler ve L-glutamat meydana gelir. Geriye kalan α -ketoasitin karbon iskeleti asetil-CoA' ya veya sitrik asit döngüsünün ara metabolitlerine dönüşerek yıkıma uğrar. L-glutamat ise L-glutamatdehidrogenaz ile α -ketoglutarat ve amonyum iyonuna (NH_4^+) dönüşür. Toksik etkileri kanıtlanmış olan amonyum iyonu, karaciğere transfer edilerek detoksifiye edilir. Bir dizi reaksiyon sonrasında üreye dönüştürülür(2).

GlutamatDehidrogenaz



Şekil 1. Glutamattan amonyağın ayrılması (2).

Periferde meydana gelen amonyak, glutamin sentetaz enzimi varlığında glutamatla birleşerek glutamini meydana getirir. Glutamin karaciğere gelerek, glutaminaz enziminin varlığında tekrar glutamat ve amonyum iyonuna ayrılır. Meydana gelen amonyak Krebs-Henseleit üre döngüsüne girerek karaciğerde

üreyeye dönüşür ve üreye idrarla atılır . Üreye suda kolayca çözünen ve amonyağa göre toksik olmayan bir maddedir.

3.2. Amonyak Metabolizması

Amino asitlerin yıkımı esnasında açığa çıkan amonyak çok toksik olduğundan en kısa zamanda organizmadan uzaklaştırılmalıdır (Şekil 2). Amonyakın atılım şekli canlının yaşadığı ortamdaki su düzeyine bağlı olarak farklılık gösterir. Azot metabolizması son ürününe göre canlılar üç grupta toplanmaktadır;

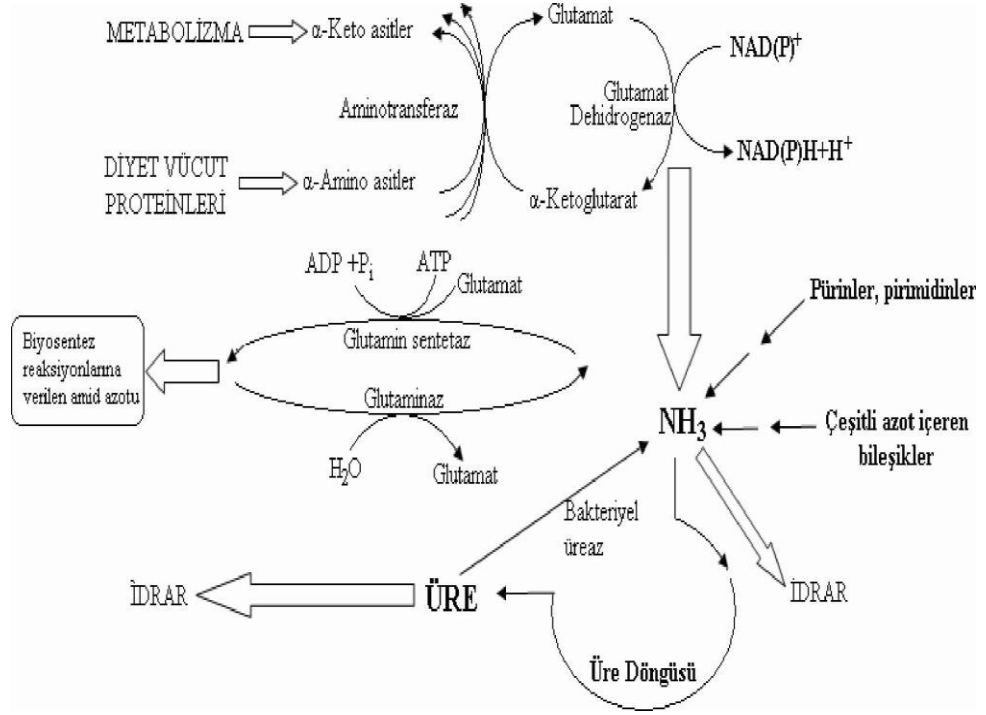
1- Amonyotelik Grup: Deniz memelilerinin dışında suda yaşayan bütün canlılar amonyağı bir değişikliğe uğratmadan amonyak şeklinde çıkarırlar.

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

3- Ürikotelik Grup: Bütün kanatlılar ve suyun çok az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler amonyağı pürin biyosentezi yoluyla üreye göre suda daha az çözünen ürik aside çevirmektedir (3,4,5).

Amonyak esansiyel bir madde olmasına karşın insan ve hayvanlarda çok düşük serbest amonyak düzeyleri bile ağır serebral bozukluklara yol açar. Amonyak zehirlenmesinin bulguları arasında ellerde titremeler, konuşmanın

zayıflaması, görme bozuklukları ve ağır durumlarda koma ve ölüm sayılabilir. Bu nedenle organizmada amonyak bağlanarak süratle zehirsiz hale getirilmelidir (3).



Şekil 2. Amonyak Metabolizması

3.2.1. Amonyak Kaynakları

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

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

2-Glutamin: Böbrekler renal glutaminazın etkisiyle glutaminden amonyak oluşturur.

Bu amonyağın çoğu idrarla NH_4^+ iyonu halinde atılır. Bu mekanizma vücudun asit-baz dengesinin sürdürülmesi için önemlidir. Amonyak aynı zamanda glutaminin intestinal glutaminaz tarafından hidrolizi ile elde edilir. Mukoza hücreleri ile glutamini hem kandan hem de diyet proteinlerinin sindirimi ile elde ederler.

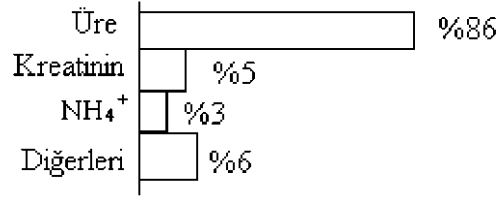
3-Bağırsaklardaki bakterilerin etkisi: Amonyak, bağırsak lumenindeki ürenin bakteriyel yıkımı ile oluşur. Portal vene geçen amonyağın hemen hemen tamamı daha sonra karaciğerde tekrar üreye çevrilir.

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

5-Pürin ve pirimidinler: Pürin ve pirimidin katabolizmasında, halkalardaki amino grupları amonyak olarak salınır (6).

3.3. Üre Döngüsü

Üre amino asitlerden elde edilen amino gruplarının esas atılım şeklidir ve idrarın azot içeren bileşiklerinin % 90' ını oluşturur (Şekil 3). Üre molekülünün içerdiği azotlardan birisi serbest NH_3 ' den, diğeri de aspartatdan elde edilir. Glutamat, amonyak ve aspartat azotunun prekürsörüdür. Amonyak azotunu glutamat dehidrogenazın katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonundan, aspartat azotunu da aspartat aminotransferazın katalizlediği okzaloasetatın transaminasyonu reaksiyonundan elde eder. Ürenin karbon ve oksijeni karbondioksitten elde edilir. Üre karaciğerde oluşur ve daha sonra kanla böbreklere taşınarak idrarla atılır (7).



Şekil 3. İdrardaki azot içeren bileşiklerin dağılımı (7)

3.3.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları

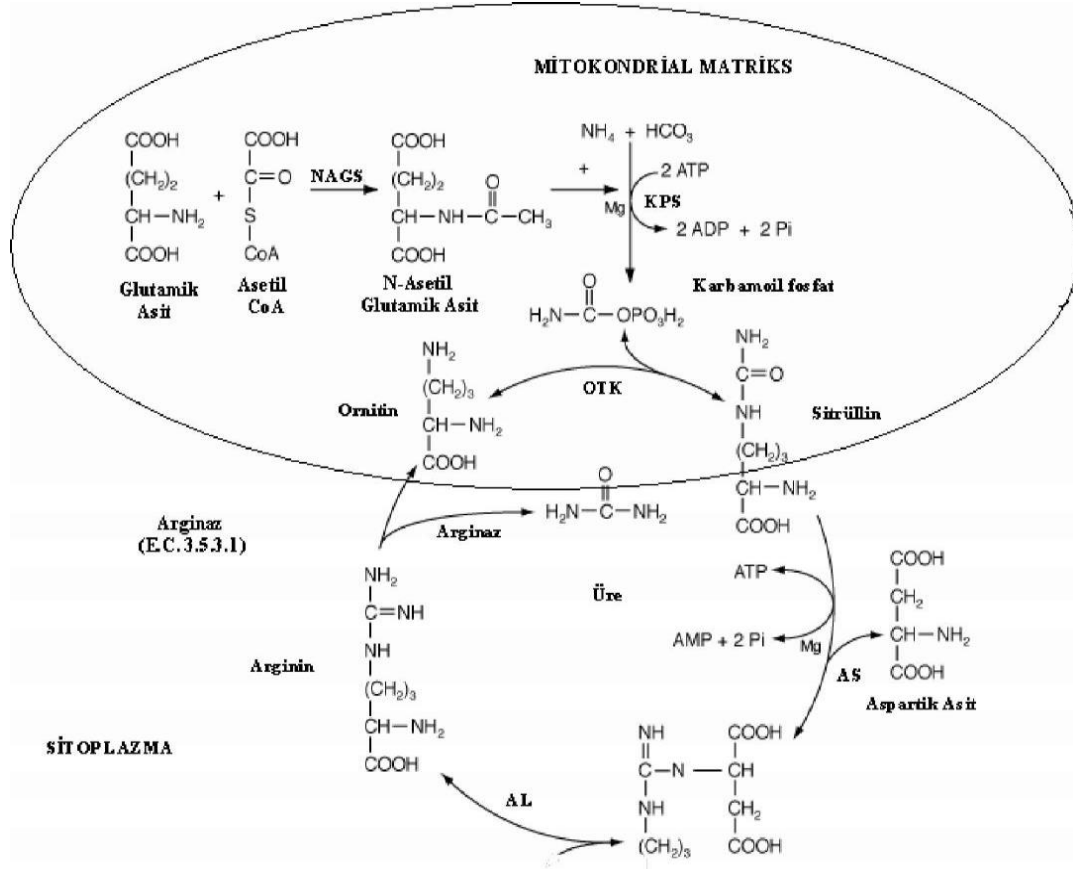
Üre sentezinin ilk iki reaksiyonu mitokondride gerçekleşir. Döngünün diğer enzimleri sitozoldedir (Şekil 4).

Üre sentezi mitokondriyumda başlar. Mitokondriyal bir enzim olan karbamoil fosfat sentetaz enzimi iki mol ATP kullanımı altında bikarbonat ve amonyaktan karbamoil fosfat'ı sentezler. Mitokondriyum zarı bikarbonat için geçirgen değildir. Bu nedenle sitozolden alınan karbondioksit, sadece karaciğer mitokondriyumlarında bulunan karbonik anhidrazın bir izoenzimi aracılığı ile bikarbonata çevrilir ve üre sentezi için hazırlanır. Karbamoil fosfat doğrudan üreye dönüştürülemez ve bu reaksiyonlar 4 ayrı basamakta gerçekleşir. Öncelikle karbamil fosfatın karbamoil grubu, ornitin karbamoiltransferaz enzimi aracılığı ile ornitin üzerine taşınır ve sitrüllin sentezlenir. Oluşan sitrüllin sitozole gönderilir. Üre sentezi reaksiyonları bu aşamaya kadar mitokondriyumlarda gerçekleşirken bundan sonraki aşamalar sitozolde sürdürülür (7,8).

Ornitin yapısındaki karbamoil grubu (sitrüllin) üzerine 1 mol daha amino grubu taşınması gerekir. Fakat bu olay bir transaminasyonla gerçekleştirilemediğinden aspartat döngüsü adı verilen döngüye bağlanır. Bu olayda önce sitrüllinin karbamoil grubu ile aspartik asitin amino grubu arasındaki bağlanmayla arginosüksinik asit oluşur. Reaksiyon arginosüksiniksintetaz

tarafından 1 mol ATP kullanımı altında gerçekleşir. Arginosüksinik asit de arginosüksinaz tarafından arginin ve fumarik asite parçalanır ve sonuç olarak bu iki reaksiyonla aspartik asitin amino grubunun sitrüllin üzerine taşındığı ve arginin sentezlendiği söylenebilir. Sentezin son basamağında arginin, arginaz enzimi tarafından ornitin ve üreye parçalanır ve döngü tamamlanır. Sitozolde oluşan ornitin sitrüllin' in mitokondriyumdan çıkışıyla dengeli olarak enerji kullanılarak mitokondriyumlara geri döner ve tekrar kullanıma hazır hale gelir (7,8).

Ürenin atılımı: Oluşan üre karaciğerden kana geçerek böbreklere taşınır ve süzülüp idrarla atılır. Karaciğerde sentezlenen ürenin bir kısmı kandan bağırsaklara diffuze olur ve bakteriyel üreazla CO_2 ve NH_3 ' a parçalanır. Bu amonyak kısmen feçesle çıkar, kısmen de kana reabsorbe olur. Böbrek yetmezliği olan hastalıklarda plazma üre seviyeleri artar ve bağırsaklara üre aktarımı da artar. Üreazın etkisi sonucu artan amonyak miktarı bu hastalarda klinik bir sorun oluşturur ve hiperamonyeminin başlıca sebebidir (7).

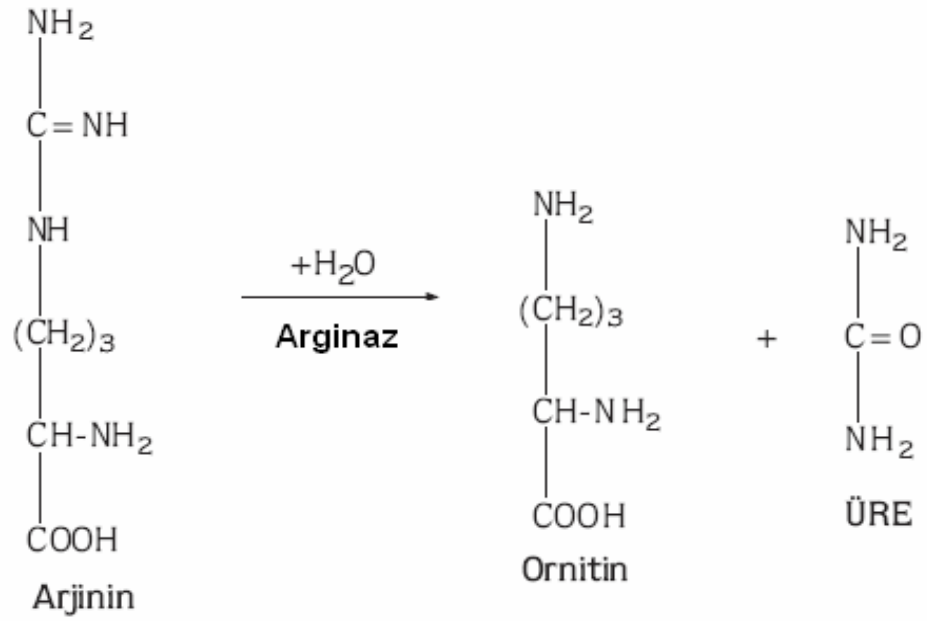


Şekil 4. Üre döngüsü (6).

AL: Fumarik Asit Argininosüksinat Liyaz (E.C.4.3.2.1.) NAGS: Argininosüksinat Sentetaz (E.C.6.3.4.5.) KPS: Karbamoilfosfat Sentetaz (E.C.6.3.4.16.) OTK: OrnitinTranskarbomilaz (E.C.2.1.3.3.) NAGS: N-Asetilglutamat Sentetaz (E.C.2.3.1.1.)

3.4. Arginaz Enzimi

Üre siklusunun son enzimi olan arginaz (L-Argininamidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) L-arginini, üre ve ornitine hidrolize eder. Enzim ilk kez 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından tanımlanmış olup (9), 1932 yılında Krebs-Henseleit tarafından üre döngüsünün bir enzimi olduğu kanıtlanmıştır (9,10). Memeli karaciğerinde amonyağın detoksifikasyonundan (zehirsizleştirilmesinden) sorumludur (11,12). Güçlü bir immün sistem inhibitörü olup lenfosit proliferasyonunda da inhibitör etkiye sahiptir (13).



Arginaz enzimi karaciğer dışında; eritrosit, lökosit, trombosit, beyin, bağırsak, böbrek, pankreas, akciğer, meme bezi, testis, tükürük bezi, plësenta, deri, iskelet ve kalp kası gibi dokularda da bulunmaktadır (11,12).

Eritrosit arginaz aktivitesinin, serumun arginaz aktivitesinden yaklaşık 200 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Tükürük arginaz aktivitesi ise eritrosit aktivitesinin 1/6'sı kadardır (14). Çeşitli kanser türlerinin kan plazmalarında eritrosit arginaz aktiviteleri ve üre düzeyleri ölçülmüş, L-argininin eritrosit membranlarından geçerek arginaz ile hidrolize olduğu ve oluşan ürenin de süpernatant ürelerini arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (15).

Eritrositler üre döngüsü ile üre sentez edememelerine rağmen; insan, koyun ve sığır eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiş, ancak keçi ve tavuk eritrositlerinde bu enzime rastlanmamıştır (16,17).

Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyonun iki ürünü; üre ve ornitindir. (11). Üre böbrek yolu ile atılırken, ornitin de prolin ve poliamin sentezinde rol

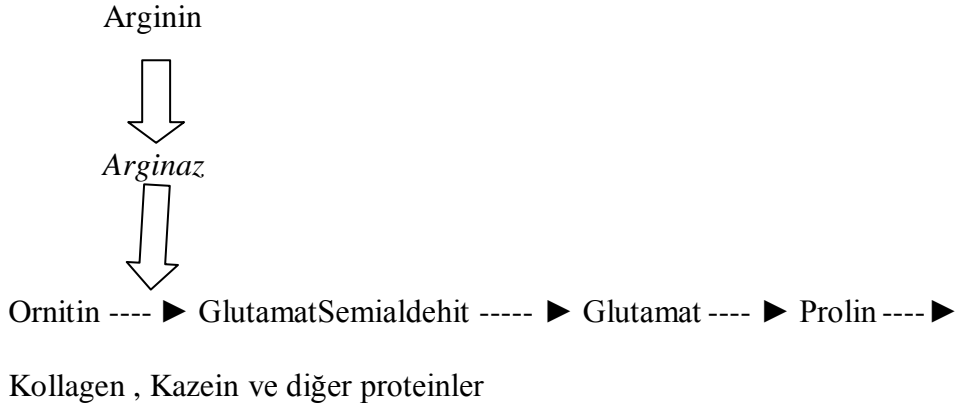
oynar. Ornitindekarboksilaz (ODC) aracılığı ile poliaminlerin, ornitinaminotransferaz (OAT) aracılığı ile de prolin ve glutamatın sentezini sağlar (18,19).

Hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli biyomoleküller olan poliaminler (putressin, spermin ve spermidin) tüm memeli hücrelerinde bulunurlar (20). Putressin, spermin ve spermidin; hücre büyümesi için gerekli olan transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasını kolaylaştıran alifatik poliaminlerdir (21). Poliaminler bakteri ve memeli hücre kültürleri için büyüme faktörleridir. Farmakolojik dozlarda hipotermik ve hipotansif etkilidirler (22).

Poliamin sentezinin ilk basamağında ODC enzimi, ornitinden putressin oluşumunu katalizler. Bu enzim; arginaz enzim aktivitesinin yükselmesi ile doğru orantılı olarak aktive olmaktadır. Poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir (22,23,24). Putressin, daha sonra spermidin sentaz ile spermidini, spermidin de spermin sentaz ile spermini oluşturur. Poliaminler hücre bütünlüğünün, hücre içi organel ve membranlarının stabilizasyonundan sorumludurlar. Çok sayıda pozitif yük taşıdıkları için, polianyonik özellikte olan DNA ve RNA'larla kolayca birleşerek, DNA ve RNA'nın biyosentezinin uyarılması, DNA stabilizasyonu ve bakteriyofajlarda DNA paketlenmesi gibi temel olaylarda başlıca rolü oynarlar (22).

Hücre içi poliamin metabolizmasının ve dolaşımdaki poliamin miktarının malign olaylarda arttığı, özellikle de eritrosit poliamin miktarının hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılabileceği ve eritrosit poliamin düzeylerinin tümörün gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (24). Poliaminler için en ideal taşıyıcının eritrositler olduğu ve geniş bir poliamin

depolama kapasitelerinin bulunduğu belirtilmiştir (25). Poliamin ve protein sentezinin ilk basamağı arginaz enzimi tarafından katalizlenen argininin ornitine dönüşümüdür (Şekil 5).



Şekil 5. Protein Sentezi (22)

3.4.1. Arginazın İzoenzimleri ve Özellikleri

Gerek insan gerekse kobay dokularında çeşitli çalışmalar sonucunda arginaz enziminin beş izoenzimi mevcut olduğu immunoelektroforez ve immün diffüzyon testleri ile anlaşılmıştır. Bu beş izoenzim A1, A2, A3, A4, A5 olarak simgelenirilmiş olup, dokulara göre dağılımı şu şekilde belirtilmiştir (26).

Karaciğer

A₂,A₅

Böbrek

A₁,A₄ A₃

Tükürük Bezi

A₃

3.4.2. Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri

Arginaz enzimi tetramerik bir yapıya sahiptir. Bu yapının oluşması, enzimin ısıya dayanıklılığının artması ve inaktive olmasını önleyebilmek için Mn⁺⁺ iyonlarına ihtiyaç vardır. Mn⁺⁺ iyonları arginaz enziminin maksimum

aktivite göstermesini sağlamaktadır (19,27,28). Arginazın doğal substratı olan arginini hidrolize edebilmesi için, optimal pH'sının 9.4-9.8 arasında olması gerekmektedir (29,30). Ph 7.4'te enzimin aktivitesi %10-30 oranında azalırken, pH 7'nin altında ise ortadan kalkmaktadır (31,32).

Preinkübasyon uygulanmış insan tükürüğünde ortalama aktivite, preinkübasyon uygulanmamış tükürük aktivitesine göre yaklaşık olarak 3 kez daha yüksektir. Maksimum enzim aktivasyonu için Mn^{++} iyonları yanında; preinkübasyon ısısının da $55^{\circ}C$ de olması gereklidir. Bu durumda enzim aktivitesi %110 civarında gerçekleşmektedir (14,29,32).

Yapılan çalışmalarda tükürük bezleri ve karaciğer arginazının Mn^{++} iyonları ile aktivasyona uğradıkları, ancak eritrosit arginazında bu oranda bir aktivasyonun gözlenmediği ortaya konmuştur (32). Mn^{++} iyonları ile aktivasyonun; karaciğer arginaz aktivitesinde 4-5 kat, eritrosit arginaz aktivitesinde 2-6 kat arttığı bildirilmiştir (33).

Arginaz aktivitesini, Mn^{++} iyonlarından başka, Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} iyonları da artırmaktadır. Hg^{++} , Ag^{++} gibi ağır metal iyonları ise enzimin aktivitesini azaltmaktadır (3). Arginaz enzimi katalizörlüğünde meydana gelen reaksiyonun ürünlerinden ornitin, arginaz inhibe ederken; diğer ürün olan üre ise inhibe etmemektedir. Ornitin dışında; lösin, izolösin, lizin, prolin, sistein, valin, tirozin gibi L-amino asitlerin de arginaz üzerine inhibitör etkisi vardır. Ornitin ve lizin yarışmalı; valin, izolösin, lösin ve sistein ise yarışmasız inhibisyona neden olur (27).

Arginaz enziminin iki izoenzimi olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arginaz tip 1 (A-I) ve arginaz tip 2 (A-II)' dir (34). A-I izoenzimi sitozolik form olup,

karaciğerde baskın olan tiptir ve ürogenizde primer rol alır. A-II izoenzimi ise eritrositlerde ve ekstrahepatik dokularda bulunur. Poliamin sentezinde rol oynar. Toplam arginaz aktivitesinin %98'inden A-I izoenzimi sorumludur (35).

3.4.3. Klinik Olarak Arginaz Enzimi

Arginaz enzimi üre döngüsünün anahtar enzimidir ve ana kaynağı karaciğerdir. Üre döngüsünün gerçekleşmediği birçok doku ve organda da bulunmaktadır. Serum arginaz düzeyleri, sağlıklı kişilerde oldukça düşüktür (36). Akut hepatit, karaciğer metastazları, siroz safra kanallarının malign tümörleri gibi hücre harabiyetine sebep olan benign ve malign karaciğer hastalıklarında serum arginaz aktivitesi artar (37).

Eritrosit arginaz aktivitesinin persinoyöz anemi, talesemi major, megaloblastik anemi, orak hücreli anemi gibi hematolojik hastalıklarda arttığı gösterilmiştir (38).

Kalitsal olarak arginaz enzimi eksikliğine nadir olarak rastlanmaktadır. Eksikliğinde hiperamonyemi atakları, sistein ve lizin kaynaklı aminoasidüri gözlenir. Üre döngüsünün bozulmasına ve sonuç olarak hiperargininemiye yol açar. Hiperargininemik hastalarda enzim aktivitesi yoktur. Plazma arginin düzeyinde 5-10 kat artış olması ve eritrosit arginaz aktivitesindeki azalma, hastalığın tanısında önem taşır. Amniyon sıvısında arginaz aktivitesi doğru olarak ölçülemediğinden hastalığın prenatal tanısı zordur (35,39). Kalitsal arginaz enzimi eksikliğinde, karaciğer, eritrosit, lökosit ve tükürükte arginaz enzim eksikliği gözlenirken, böbrek arginaz aktivitesinde belirgin bir artış saptanmıştır (35,39, 40,41).

Hormonların, arginaz enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda, glukokortikoidlerin protein katabolizmasına yol açarak üre döngüsü enzimlerini ve arginazı artırdığı, kortikosteroidlerin karaciğer arginazını aktive ettiği, ancak böbrek arginazı üzerine bir etkisi olmadığı saptanmıştır (42,43).

Arginazın kanserle olan yakın ilişkisi, birçok araştırmacı tarafından çeşitli kanser türlerinde ortaya konmuştur. Stratus ve ark. (37), meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz düzeyinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğunu bulmuşlardır. Leu ve ark. (13), kolorektal kanserli hastalarda serum arginaz düzeyini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kolorektal kanserli dokuların normal mukozal dokulara göre 2 kat fazla arginaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Wu ve ark. (36), gastrik kanserli hastalarda plazma arginaz aktivitesini normale oranla yüksek saptamışlardır. Hepatobilier kanaldaki malign tmrl hastalarda serum arginaz aktivitesinin artması, arginazdan zengin karaciğer hücrelerinden enzim salındığını göstermektedir. Bu durum akut hepatitte de serum arginaz aktivitesinin yükselmesine yol açmaktadır.

Bu uygulamalar gösterilerek arginazın kanser hastaları için belirleyici bir enzim olabileceği ileri sürülmektedir (13,37).

3.4.4. Arginazın Biyokimyasal ve Patolojik nemi

Arginaz, prolin ve poliamin sentezi için ornitin sağlar ki bu moleküller hücre proliferasyonunu kontrol ederler ve kollagen üretimini sağlarlar (44,45). Dolayısıyla normal yara iyileşme sürecinde arginaz önemlidir (46,47). Arginaz aktivitesi yaralanmalarda artar, bu artan arginaz aktivitesi, argininin çok fazla

kullanılması, ornitinin ve poliaminin aşırı üretimi ile ilişkilidir (45). İmmun sistemde Arginaz I ve II nin ekspresyonlarının artışı, immünsitokin cevabına yol açar. Arginaz I ve II nin artışı, immün yetersizlik ile ilgili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli rol oynayabilir (45).

İnsan meme kanseri hücrelerinde arginaz seviyeleri yüksek bulunmuştur. Arginaz II' nin, özellikle kolon ve mide kanseri, akciğer kanseri ve renal hücre karsinoma hastalarında yükseldiği belirtilmiştir. Prostat kanseri de, arginaz çalışmaları için hedef gösterilmiştir. Çünkü arginaz bu dokuda da yüksek seviyede eksprese edilmektedir ve bu dokunun fonksiyonu için rol oynamaktadır. Prostat kanserli hastaların serumunda arginaz seviyeleri yüksek bulunmuştur. Arginaz aktivitesi, sküamöz hücrelerde ve insan derisinin bazal hücre kanserinde yükseldiği belirtilmiştir ve hücre ornitin konsantrasyonu yükselmiştir. Bu durum malign deri tümörlerinin gelişmesine neden olabileceği belirtilmiştir. Arginaz enziminin tümör belirteci olup olmadığının açıklanması için daha erken olduğu savunulmaktadır (46, 47,48,49)

T helper 2 (Th 2) sitokinleri (IL-4, 5 ,9 ,10,13), arginaz ekspresyonlarını indükler (50). Alerjik inflamasyon sırasında bu sitokinlerin ekspresyonlarının artışı, arginaz ekspresyonlarının artışına neden olur ve beraberinde NO üretimi baskılanır, mukus ve kollagen üretiminde artış meydana gelir. Arginaz, astımda inflamasyona neden olur. Yapılan insan çalışmalarında, arginazın astımın patogeneze katkıda bulunduğu açıklanmıştır (44,51,52)

Ratlarda yaşlı beyinde arginaz düşük bulunmuştur. Yaşlı beyinde arginazın azalmasıyla NO üretiminin arttığı, bu durumun yaşlanma sürecinde nörodejeneratif bozukluğa yol açtığı açıklanmıştır.(53,)

Yapılan rat çalışmalarında, arginazın hipertansiyonda NO'nun biyoyararlılığında kritik bir faktör olduğu açıklanmıştır: Arginaz, ayrıca endotelial ve düz kas hücrelerinden de eksprese edilir. Vasküler arginaz aktivitesi hipertansiyonda artış gösterir. Arginazın inhibisyonu, endotelial disfonksiyonu ve artmış kan basıncını iyileştirir, hipertansiyon gelişimini önler. NO'nun biyoyararlılığını arttırır (54,55)

Ratlarda yapılan diğer çalışmalarda arginazın, hepatoseluler hasarın erken dönem belirlenmesinde en yararlı belirteç olduğu savunulmaktadır. Kupfer hücrelerinin hepatoseluler koruyucu fonksiyonu olarak karaciğerde arginazın yükseldiği belirtilmiştir (56,57). Glomerulonefritte arginaz yüksek bulunmuştu (58). Tıkanma sarılığında karaciğerde hepatositlerde morfolojik değişimler gelişmekle birlikte arginaz enzimi de dahil üre siklusu aktivitesi, önemli derecede artış gösterdiği açıklanmıştır (59).

Cerrahi indüklü travmalarda dahil, birçok travmalarda, insanda periferik mononükleer hücrelerde arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre arginaz I, travmada yükselmekte, ornitin üretimi artmakta ve NO metabolitleri önemli derecede düşmektedir. Travmanın sonucunda ve patofizyolojisinde arginazın önemli rol oynadığı düşünülmektedir (45).

Yapılan in vitro çalışmalarda, arginazın nöronal oksidatif stres üzerinde nöronlar koruyucu özellikleri açıklanmıştır. Arginazın nöronları koruma özelliği, nörorejeneratif etkileri, poliaminleri oluşturmasıyla ilişkili olduğu savunulmaktadır (60). Arginaz I'in, nöronlarda anti-apoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir (61). İnsanda, orak hücre hastalıklarında eritrosit arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur (62).

3.4.5. Arginaz Enzimi Eksikliği

Arginaz bütün hücreler için önemlidir. Hücrelerde bu enzim eksikliğinde, büyümede azalma görülür (46). Arginaz eksikliğinde kişide, klinik olarak nöronal hasara bağlı ilerleyen mental zayıflık, psikomotor davranışta ve büyümede gecikme görülür (44,63). Arginaz I geni, 6q23'de lokalize olmuştur. Arginaz enzimi eksikliği, otozomal resesif genetik bir hastalıktır (64).

Üre siklusu enzimlerinin eksikliği dramatik sonuçlar doğurur. Amonyak artışıyla oluşan ensefalopati, koma ve ölüm meydana gelebilir. Üre siklusunun son enzimi olan arginaz eksikliği, bebekliğin son dönemlerinde ve nadiren de yetişkin çağda ortaya çıkar. Gelişimin gecikmesi ve kasılmalarla kendini gösterir. Çok nadir ölümle sonuçlanır. Üre siklusu krizi, serebral ödeme yol açar. Fakat arginaz I eksikliği, diğer üre siklusu enzimlerinin eksikliği ile ortaya çıkan hastalıklara göre daha ılımlıdır. Diğer üre siklusu enzimlerinin eksikliği ciddi sorunlara yol açabilir. Fakat Arginaz I eksikliği tedavi edilebilir. Bu enzimin eksikliğinde, hiperargininemiye bağlı olarak ilerleyen bunama, kasılmalar, kortekste fonksiyon bozukluğu görülür (65,66).

Arginaz I eksikliği tandem mass spektrometresiyle ortaya çıkartılır. Yeni doğanda Arginaz I eksikliği tablosunda; özel, ağır ve külfetli bir diyet ile bu hastalığa doğumdan itibaren etkin ve sonuç verici tedavi uygulanır. Bu hastaların çoğunda akut hiperamonyemi riski çok yüksek değildir (47). Arginaz II eksikliğine şimdiye kadar nadir rastlanılmıştır (44,67).

Arginaz I eksikliğinde, arginaz II ekspresyonu artar. Bu hastalarda arginaz II artışı, serebrospinal sıvıda beklenmedik glutamin artışına neden olur. Glutamin seviyelerinin aşırı yükselmesi, hiperamonyemi ve hücre içi osmolarite artışı ile

birlikte beyinde toksik ödem meydana getirir. Ender olarak yaşlılarda arginaz eksikliği serebral ödem ve çabuk ölümle sonuçlanır (67) .

3.5. Kurşun

Kurşun kullanılmakta olan en eski metallere biridir. Kurşun bileşikleri; PbO (kurşun monoksit=mürdesenk), Pb₃O₄ (kurşuntetraoksit =sülyen= kırmızı kurşun), PbCO₃ (kurşun karbonat=üstübeç=beyaz kurşun), PbSiO₃ (kurşun silikat), PbS (kurşun sülfür) ve PbCrO₄ (kurşun kromat)dır. En dayanıklısı PbO'dir. Kurşun alaşımlarından en çok kullanılanı kurşun antimondur (68).

Endüstride akümülatör, su, ses ve radyasyon izolasyonunda, muşamba, boya ve alaşımlarda, elektronik iletkenler, lastik, lehim ve oyuncak yapımında yaygın olarak kullanılır. Diğer kullanım alanları; cephane içinde (kurşun mermi), bronz ve pirinçte, kozmetik ve mücevherlerde bulunur (69).

Kurşun, şehir çevrelerinde yaygın olarak bulunan bir toksindir. En önemli kaynaklar; kurşunla kontamine olmuş boya, toz, toprak ve sudur (68,70).

Çevresel kurşun dağılımının en önemli yolu havadır. Havadaki kurşun kaynakları; kurşun ilave edilmiş petrolün yanma ürünleri, yakma fırınları, maden tasfiyehaneleri gibi kaynaklar ve bazı endüstriyel maddeleri içeren yanmış fosil yakıttır. Havadaki en önemli kurşun inorganik kurşundur ve esas kaynak benzine eklenerek kullanılan tetraetil ve tetrametil kurşunun yanmasından kaynaklanır (71).

Bitkisel ilaçlar, kurşun kozmetikler, benzin koklamak ve mermiler kurşun zehirlenmesinde daha az önemli kaynaklardır. Yeraltı ve yüzey sularında kurşun düzeyleri genelde düşüktür fakat su dağıtım sistemlerine girdiğinde artmaktadır.

İçme suyundaki kurşun, yiyeceklerdeki kurşundan daha fazla absorbe edilir. Erişkinler içtikleri sudaki kurşunun %30-50'sini absorbe ederken, çocuklar %60'dan fazlasını absorbe eder (71).

3.5.1. Kurşun metabolizması

İnorganik kurşun, vücuda özellikle yutularak ve inhalasyon yoluyla girer ve biyolojik transformasyona uğramaz. Buna karşın organik kurşun -birincil olarak benzinde tetraetil ve tetrametil kurşun olarak bulunur , vücuda inhalasyon yoluyla, yutularak ve deriden girer ve karaciğerde suda eriyen kurşun trialkillere çevrilir. Bunlar sindirim sistemine özel bir affinite gösterir (72,73).

Kurşunun absorpsiyon, dağılım ve toksisitelerini etkileyen birçok faktör vardır. İnorganik kurşun bileşikleri yetişkin gastrointestinal sisteminden (GİS) %10 veya daha az düzeyde absorbe edilmektedir. Absorpsiyon kurşunun formu ve partikül büyüklüğü ile ilişkilidir. Demir, kalsiyum, protein ve çinko eksikliği kan kurşun düzeyini artırıcı etki gösterir ve kurşunun zararlı etkilerinin artmasına neden olur (70, 73).

Kan dolaşımında absorbe edilen kurşunun büyük kısmı eritrositlere bağlı olarak bulunur. Serbest plazma fraksiyonu beyin, karaciğer, böbrek, deri, iskelet ve kaslara dağılır, burada kolaylıkla değişebilir. Akut ve yüksek doz maruziyet ile bu dokulardaki konsantrasyon artar. Erişkinde absorbe edilen kurşunun majör depolanma yeri kemik dokudur. Kalsiyuma benzer şekilde kemik matriksle birleşir. Yoğun kemikteki kurşun yavaşça mobilize olur ve zaman içinde yavaş yavaş artar (73, 74).

Bununla birlikte çocuklarda iskelet kurşunu oldukça mobildir. Büyük miktar kurşun yumuşak dokularda bulunur ve yarılanma ömrü 2 aydır. Beyin bir istisna oluşturur. Kurşun, kan-beyin bariyerini yavaş geçer ve biyolojik yarı ömrü 1 yıldan fazladır. Plasenta kurşun geçişinde bir bariyer değildir ve fetus anneden geçen kurşuna maruz kalır. Kurşunun kandaki yarılanma ömrü 25 gün, yumuşak dokudaki 40 gün ve kemikteki 25 yıldan fazladır (75,76).

Çok düşük konsantrasyonda kurşun insan sütünde bulunmuştur (10). Atılım yavaştır, esas olarak idrarla atılır. Fekal yol ve ter diğer atılım şekilleridir.

Kemik hastalıkları (osteoporoz, fraktürler) depo kurşunun serbest kalmasını artırır ve kan kurşun düzeyi artar (73).

Kurşunun vücutta nörolojik, hematolojik, endokrin, renal, iskelet, üreme sistemleri üzerine etkileri bulunmaktadır. Ayrıca karsinojenik etki yapabilir.

Kurşunun yüksek dozları hem çocukların hem de yetişkinlerin sinir sisteminde çeşitli patojen etkiye sebep olur. Ensefalopati kronik kurşun zehirlenmelerinin en önemli belirtisidir. Yetişkinlerde daha az görülen bu durum, yüksek dozda kurşun zehirlenmesine uğrayan çocuklarda daha sık görülür. Yetişkinlerde ek olarak nöbetler, demans veya periferik nöropatiye yol açabilir. Çocuklarda ise mental retardasyon, artmış intrakranial basınç, baş ağrısı, nöbetler, optik atrofi ve distonia gelişebilir. Elektroensefologram (EEG) genellikle diffuz yavaşlama gösterir, paroksizmal deşarjlar oluşabilir (73, 76). Sinir sistemindeki bu etkilere ek olarak yüksek dozda kurşunun kan, endokrin sistem, böbrekler ve üreme sistemleri üzerine etkileri bulunmaktadır. Ayrıca karsinojenik etkisi bulunduğu bildirilmiştir (77, 78). Kurşunun primer olarak etkisi periferik ve

santral sinir sistemi, kan hücreleri ve vitamin D ve kalsiyum metabolizması üzerinedir (79).

3.5.2. Kurşunun organizma üzerine etkileri ve tanı

Kurşunla akut karşılaşmada geri dönüşümlü olarak karaciğer fonksiyonlarında bozukluk (AST ve ALT'de artış), kronik karşılaşmada ise böbreklerde hiperürinemi ve kreatinin klerensinde azalma görülebilir .Kan kurşun değerlerinin (PbB) 10 mg /dl'nin altında olduğu değerlerde dahi PbB'de normale göre her 10 kat artışta serum kreatininin 0.14 mg/dl kadar arttığı gözlenmiştir (16). Kurşuna bağlı proksimal tubüler zedelenme, glomerüler skleroz ve interstisyel fibroz gibi böbrek rahatsızlıkları özellikle meslekleri nedeniyle kurşunla karşılaşan işçilerde görülmektedir. Belirtiler arasında proteinüri, glukoz ve organik anyonların taşınmasında bozulma ve glomerüler filtrasyon oranında düşüş bulunur (80,81).

Yükselmiş PbB (20,28 mg /dl) ile tüm dolaşım ve kalp-damar sistemi hastalıklarına bağlı mortalité oranlarında önemli artış görülmüştür (82). Aynı şekilde klinik ve popülasyon çalışmalarında meslek nedeniyle karşılaşmış bireylerde hipertansiyon, serebrovasküler ve kalp-damar sistemine ait hastalıklarla ilgili korelasyon bildirilmiştir (83,84). Uzun süreli düşük dozda kurşunla karşılaşmanın da insan ve hayvanlarda hipertansiyona yol açtığı gösterilmiştir (85). Kurşunla artan hipertansiyonun etki mekanizması endotelyum kaynaklı nitrik oksidin inaktivasyonunun arttırılmasından ve reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturulmasından kaynaklanabilir. Ding ve arkadaşları ise hipertansiyonun

kurşunun oluşturduğu hidroksil radikallerinin endotelial disfonksiyona sebep vermesiyle oluştuğunu bildirmiştir (86) .

Kurşun dolaşımında yoğun olarak bulunduğu için en yoğun etkisini hemapoietik sistemde göstermektedir. Kurşun tarafından alyuvarların ömrü kısaltılmakta, "Hem" sentezinin çeşitli adımları inhibe edilerek , hemoglobin sentezi engellenmekte ve mikrositer anemi ortaya çıkmaktadır (87). Kurşunun kadın ve erkek üreme sisteminde toksik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Kurşunla ilgili işlerde çalışan kadınlarda spontan abortus, ölü doğum ve düşük ağırlıkta çocuk doğurma sıklığında artış olduğu bildirilmiştir. Erkeklerde ise sperm ve testisler üzerine toksik etki, hiperspermi (aşırı meni hacmi), teratospermi (morfoloji bozukluğu), astenospermi (az hareketlilik) ve hipogonadizm (gonadlarda küçüklük) oluşabilmektedir (87,88) .

Kurşun, Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi (IARC) tarafından insanlar için muhtemel karsinogenliğe yükseltilmiştir (89). İnsanlarda sigara içimi ile kurşun alınması sonucunda akciğer kanseri ve kurşunla karşılaşmaya bağlı olarak gelişen böbrek, mide ve idrar kesesi kanserleri bildirilmiştir (90).

3.5.3. Biyokimyasal parametreler

Kurşun zehirlenmesinin tanısı zordur; çünkü belirtileri özel değildir. Erişkin hastada kolik ağrısı, anoreksi, kabızlık, uykusuzluk ve huzursuzluk; bazen düşük hemoglobin düzeyleri ve serum bilirubin düzeyinde artışın ortaya çıkması ile tanı konulabilir (91,87). Ayrıca kurşunla karşılaşma olan bir işte çalışma öyküsü ile klinik belirti ve bulguların da önemi olmakla birlikte; kesin tanı atomik absorpsiyon yöntemi kullanılarak kan kurşun düzeylerinin (PbB) belirlenmesiyle

yapılır. Çocuklarda ve gebe kadınlarda 10 /mg/dl, yetişkinlerde 40 /mg/dl'nin üstü PbB anlamlı kabul edilmektedir. Özellikle kan çinko protoporfirin (ZnPP) düzeyinin ölçülmesinden de faydalanılmaktadır. Erişkin erkeklerde PbB 25 /mg/dL'nin üzerinde olduğunda, ZnPP konsantrasyonu da anlamlı olarak artmaktadır (87). Kadınlarda demir düzeyinin daha az olması nedeniyle daha düşük PbB'de ZnPP'de artış gözlenir. Çocuklarda PbB 15 /mg/dl olduğunda ZnPP'de artış olur (92). Kurşunla karşılaşma için en çok başvuru alan ve en güçlü biyomarker PbB'nin ölçülmesidir; ancak Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency-EPA) kurşun için toksik bir eşik düzey olmadığını açıklamıştır. Bu da vücuda zarar vermeyecek miktarda kurşun seviyelerinin olmadığı anlamına gelmektedir. Ayrıca EPA su ile alınabilecek en fazla PbB' nin sıfır olması gerektiğini de vurgulamıştır (93).

Kurşun zehirlenmesinin en çok etkilediği hücreler eritrositlerdir. In vitro çalışmalarda kurşunun eritrositlerde de oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (94,95). Bu durum kurşunla karşılaşan işçilerin eritrositlerinde de ölçülmüştür (96,97). Eritrositler oksidatif zedelenmeye karşı; oksijen'e yüksek konsantrasyonda karşılaşmaları, yapılarındaki hemoglobinin kolayca otooksidasyona uğraması, membranlarının lipid peroksidasyonuna duyarlı olması ve zedelenen yapı taşlarını tamir etme yeteneklerinin sınırlı olması nedeniyle oldukça duyarlıdır. Kurşun bu sistemi; hem ve hemoglobin yapımını önleyerek, eritrosit morfolojisini ve ömrünü değiştirerek etkiler (95,98). Kurşun hem sentezinde yer alan ALA sentaz, ferroşelataz ve ALA dehidrataz (ALAD) enzimlerinin aktivitesini engellemektedir (94). Özellikle PbB 20 Hg/dl'nin üzerine çıktığında ALAD aktivitesinin %50'si inhibisyona uğramaktadır. Buna rağmen

ALAD ile PbB değerleri birbiri ile pozitif korelasyon göstermediği için kurşun zehirlenmesinin tanısında kullanılmamaktadır (99). ALAD'ın inhibisyonu sonucunda ortamda biriken amino levülinik asit (ALA)'nm idrar düzeyleri sıklıkla tanıda kullanılmasına rağmen sadece yetişkinlerde 35 mg/dl'nin;Çocuklarda ise 25-75 mg/dl'nin üzerindeki PbB'de etkili olmaktadır. Fakat düşük dozda karşılaşmada tam olarak ölçülebileceği bir biyomarker bulunmamaktadır (100).

Ferroşelataz enzimi protoporfirin (PP) içerisine demirin sokulmasını katalizlemekte ve kurşun tarafından inhibe edilmektedir. Böylece eritrosit ZnPP düzeyleri ortamda yükselmekte ve demir yerine çinko bağlanmaktadır. Oluşan ZnPP değerleri ancak PbB 35 mg/dl'nin üzerine çıktığı zaman akut kurşun zehirlenmesinin tanısında kullanılabilir. ZnPP için eşik tanı değeri yetişkinlerde 30 mg/dl; çocuklarda ise 15 mg/dl'dir (101). Fakat porfirialar, karaciğer sirozu, demir yetersizliği, alkolizm gibi etkenlerin de hem sentezine aynı etkiyi yapabilmesi ZnPP'nin tanıda kullanımına sınırlama getirmektedir (100).

Kurşun yine pirimidin 5'-nükleotidazın aktivitesini de azaltarak, alyuvarlardaki pirimidin nükleotidlerinin miktarında bir artışa ve olgunlaşmalarını engelleyerek mikrositer anemiye neden olmaktadır. Mikroskopta alyuvarlarda bazofilik cisimciklerin görülmesi ve hemoliz tanıya yardımcı olur; fakat benzen ve arsenik gibi diğer zehirlenmeler ve enzim eksikliğinde de benzer belirtiler görülebilir. Bazofilik cisimcikler ile mikrositer, normositer ya da hipokromik anemi ancak yetişkinlerde 50 mg/dl; çocuklarda ise 25-40 mg/dl PbB'de görülmektedir ve yine ne bazofilik cisimcikler ne de hipokromik anemi düşük dozlarda kurşunla karşılaşmanın bir ölçütü olamamaktadır (102). Hemoglobin

değeri ise PbB yetişkinlerde 50 mg/dL; çocuklarda ise 40 mg/dL olmadıkça düşmeye başlamamaktadır (101).

Kurşun besinle alınan D vitaminin aktif şekli olan 1,25-dihidroksivitamin D'ye dönüşümünü engellemektedir. Çocuklarda yapılan çalışmalarda bu etkinin anlamlı düşük düzeylerinin PbB 33-120 mg/dl arasında görüldüğü, hatta 12 mg/dL kadar düşük PbB'de bile belirlendiği bildirilmiştir (103). Yine 62 mg/dl'nin üzerindeki PbB'de total ve iyonize serum kalsiyum değerleri düşerken; parathormonun ise yükseldiği bildirilmiştir (104).

Bu çalışmada, yaşam alanlarımızda yaygın olarak bulunan bir toksik madde olan kurşunun asetatlı birleşiminin, ratlara farklı dozlarda uygulanması ile rat karaciğerinde arginaz enzimi aktivite düzeylerine etkisi ve kinetik özelliklerine incelenmesi amaçlandı. Ayrıca, optimize edilen koşullar ileride ratlarda farklı dozlardaki kurşun asetatın verilmesiyle dokularda oluşacak arginaz enzimi aktivitesi ile ilgili çalışmalarda referans olması da amaçlanmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ortalama 8 haftalık 28 adet 250 +/- 50 gram ağırlığında Wistar cinsi albino ratlar kullanıldı. Örnekler rastgele alınarak dört gruba ayrıldı;

Grup I ; kontrol grubu 1 ml serum fizyolojik i.p. ,

Grup II ; kurşun asetat 25 mg/kg-i.p ,

Grup III ; kurşun asetat 50 mg/kg-i.p ,

Grup IV ; kurşun asetat 75 mg/kg – i.p şeklinde olacaktır.

Kurşun asetat 1 ml serum fizyolojik içerisine katılarak 7 gün boyunca sabah akşam birer kez olmak üzere periton içi uygulandı. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlara ketamin 75 mg/kg+xylazine 10 mg/kg periton içi uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından ratların karaciğer dokuları hızla çıkarılarak % 0,9 luk NaCl ile yıkandı, daha sonra paketlenerek soğuk zincirde laboratuvara ulaşılarak -80 °C de derin dondurucada çalışma gününe kadar saklandı.

4.2. Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan kurşun asetat, L-arginin, Diasetil Monoksim, Tiyosemikarbazid, Sülfürik Asit, HCl , Mangan Klorür gibi kimyasal maddeler Sigma, Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup piyasadan sağlanmıştır.

4.3. Kullanılacak Cihazlar

- 1- Cam-cam ve cam-teflon (Pottern-Elvehjem) homojenizatör
- 2- UV/VİS Spektrofotometre (Shidmadzu UV 240)
- 3- Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 800 R)
- 4- pH metre (pH- MeterCG 810)
- 5- Sıcak su banyosu (Benmari)
- 6- Vorteks
- 7- Mikser
- 8- Deep-freeze (Bosch)
- 9- Büstri
- 10- Folyo kağıt
- 11- Ependorf

4.4. Metodlar

4.4.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Arginaz aktivitesi;Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçümler yapılmıştır (35). 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^{+2} iyonları kullanılır (105).

4.4.1.1. Kullanılan Ayraçlar

1- 65 mM'lık L-Arginin Solusyonu:

13.65g L-arginin monohidroklorit (Mol.Ağ. 210.66g/mol) tartılıp, 1lt distile su ile balon jodede tamamlanarak pH' sı 10' a getirilmiştir.

2-Asit Ayıracı:

a) FeCl₃ hazırlanması;

1,62g FeCl₃ (Mol. Ağ. 270.3g/mol) tartılarak, % 56,7'lik H₃PO₄ (d=1.71,Mol.Ağ.98.0g/mol) ile hacim 50 ml'e tamamlanmıştır.

b) 206 ml 'lik H₂SO₄ (d=1.84, Mol.Ağ. 98.08g/mol) üzerine 794 ml distile su koyulmuş, üzerine 1 lt FeCl₃ eklenir ve koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklanmıştır.

3-Renk Ayıracı:

0.328g tiosemicarbazid (TSC,Mol.Ağ.91.14g/mol) ve 6.23g Diasetilmonoksim bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklanmıştır.

4-1mM MnCl₂ Çözeltisi:

0.270 g MnCl₂ (Mol. Ağ. 270.9 g/mol) tartılıp, distile suda çözüldükten sonra son hacim 500 ml'ye tamamlanarak +4°C'de saklanmıştır.

5-Karbonat Tampon Çözeltisi (150 mM NaHCO₃ / Na₂CO₃):

a) 150 mM NaHCO₃ hazırlanması;

12.6g NaHCO₃ (Mol.Ağ.84.01 g/mol) tartılmış ve 1000 ml' ye yakın distile su konmuştur.

b) 150 mM Na₂CO₃ hazırlanması;

7,87gr Na₂CO₃ (Mol.Ağ.105.99 g/mol) tartılıp ve 500 ml distile su

eklenir. 150 mM ' lik NaHCO_3 ve 150 mM Na_2CO_3 ile pH' 10 a ayarlanılır ve solüsyon $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır

6-Glisin-NaOH Tampon Çözeltisi (150mM, pH 8.78-10.6)

a) 3.76g Glisin (Mol.Ağ.75.07g/mol) bir miktar distile suda çözdürülerek ve 250 ml'ye tamamlanmıştır.

b) 2g NaOH (Mol.Ağ.40g/mol) bir miktar distile suda çözdürülmüş daha sonra 250 ml' ye tamamlanmıştır.Tampon çözelti hazırlanırken 200 mM'lık Glisin çözeltisi behere koyulmuştur. 200mM' lık NaOH çözeltisi ile pH'sı 8.6-10.6 arasında değişen çözeltiler hazırlanmıştır.

7- NaHCO_3 - Na_2CO_3 Tampon Çözeltisi (150 mM, pH 9.2-10.2)

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

b) 10.5 g NaHCO_3 (Mol. Ağ. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözdürülmüş ve 500 ml' ye tamamlanmıştır. Tampon hazırlarken 150 mM' lık NaHCO_3 çözeltisi behere konarak Na_2CO_3 ile pH' sı 9.2-10.2' i arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Solüsyon $+4^\circ\text{C}$ ' de saklanmıştır.

8- NaHCO_3 -NaOH Tampon Çözeltisi (150 mM, pH 9.7-10.9)

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

b) 10.5 g NaHCO_3 (Mol. Ağ. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 500 ml' ye tamamlanmıştır. Tampon hazırlarken 150 mM' lık NaHCO_3 çözeltisi behere konarak NaOH ile pH' sı 9.7-10.9 arası değişen tampon çözeltiler hazırlanan ve solüsyon $+4^\circ\text{C}$ ' de saklanmıştır.

4.4.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü

Alınan doku örnekleri üzerindeki kan ve pıhtılar uzaklaştırıldıktan sonra iki süzgeç kağıdı arasında kurutulmuş ve 1g tartılarak distile su ile 10 ml' ye (ağırlık/hacim) tamamlanmıştır (sulandırma oranı 1/10). Örnekler omni-mikserde parçalandıktan sonra Potter-Elvehjem (cam-cam) homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C'de 13000 xg'de 15 dakika Nüve marka santrifüjde santrifügasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemde sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöküntü kısmı) birbirinden ayrılmıştır, süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Her bir arginaz aktivite düzeyi 3 örnek, 2 zero time blank tüpü kullanılarak saptanmıştır. Örnekler daha sonra 1mM MnCl₂ çözeltisi ile sulandırılmış, 65°C'de 20 dakika metabolik su banyosunda tutulmuş ve böylece preinkübasyon işlemi sağlanmıştır. Preinkübasyondan sonra örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Tüp içindeki enzimatik karışım 1ml olup 65 mM'lık L-arginin'den (pH 10) 0.3ml ve 150 mM'lık karbonat tamponundan (pH 10) 0.4 ml içerecek şekilde düzenlenmiştir. Tüplere önce L-arginin sonra karbonat tamponu daha sonra da üzerine preinkübasyona tabii tutulan enzim kaynağından 0.3 ml eklenmiş, 37 °C' de 10 dakika sallantılı metabolik su banyosunda tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır. 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda tüplere 3 ml asit karışımı ilave edilerek enzimatik tepkime durdurulmuştur. Asit ilavesinden sonra tüplere 2'şer ml renk ayırıcı eklenerek ve tüpler vorteksle karıştırılarak 10 dakika kaynar su banyosunda tutulmuş ve renk oluşumu sağlanmıştır. Kaynar su banyosundan çıkan tüpler soğutularak UV/VİS Spektrofotometrede (Shimadzu UV-240), 520 nm dalga boyunda örnekler okunmuş, üre miktarları sıfır zaman körlerinin (zerotimeblank)

absorbanslarının çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

4.4.2. Homojenatta Protein Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız homojenatta protein miktarı modifiye Lowry (106) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayıracı peptit bağları ile kompleks yapar ve prensip olarak Bakır+protein \longleftrightarrow Bakır-protein basit ilişkisini içerir. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm'de okunmuştur. Bu metod biüret reaksiyonundan 100 kat daha hassastır.

4.4.2.1. Kullanılan Ayıraçlar

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

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

3-Protein Standartı: 50 mg BSA (Rat serum albumin)/ ml

4-Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılarak)

4.4.2.2. Deney Prosedürü

	Kör	standart	örnek
Alkali Bakır Ayıracı (ml)	1	1	1
Örnek (ml)			1
Distile su (ml)	1		
Protein Standartı(ml)		1	
Tüpler karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında beklenir.			
Fenol Ayıracı (ml)	4	4	4

Tüpler iyice karıştırılmış ve 5 dakika 55 °C' de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutularak örnek ve standart tüpleri 650 nm' de kör tüpüne karşı okunmuştur.

Hesaplama; mg protein/ ml = (Örnek Abs./ Std. Abs.) x Std. Konsantrasyonu

Rat Dokularında Arginaz Aktivesinin Hesaplanması

1-Her örnek deney tüpünün absorbansından, kendisine ait sıfır zaman tüpünün absorbansının farkı alınarak net absorbans elde edildi.

2-Örneğe ait protein değerleri, Lowry yöntemi ile ölçüldü, mg/ml olarak hesaplandı.

3-Enzim kaynağının preinkübasyon ve inkübasyon aşamasında sulandırılma oranları, standart konsantrasyon değerlerinden faydalanılarak her doku için bir faktör bulundu.

Faktör hesaplaması şu şekilde yapıldı;

Faktör = (0.1 µmol üre / ml) x (sulandırma katsayısı x 3.33 x 6) /0.4

Sulandırma katsayısı: homojenatın preinkübasyon ortamında $MnCl_2$ ile sulandırma oranları

Kontrol grubu: 1/1500 oranında sulandırıldı.

Kurşun grubu:1/300 oranında sulandırıldı.

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

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

0.1 μ mol üre / ml içeren, standart tüpünün absorbanı ise 0.4' tür.

6- Örneğe ait net absorban değeri faktör ile çarpılarak μ mol üre / ml homojenat/ saat cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

7- Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için; enzim aktivitesi homojenatın protein (mg/ml) değerine bölündü.

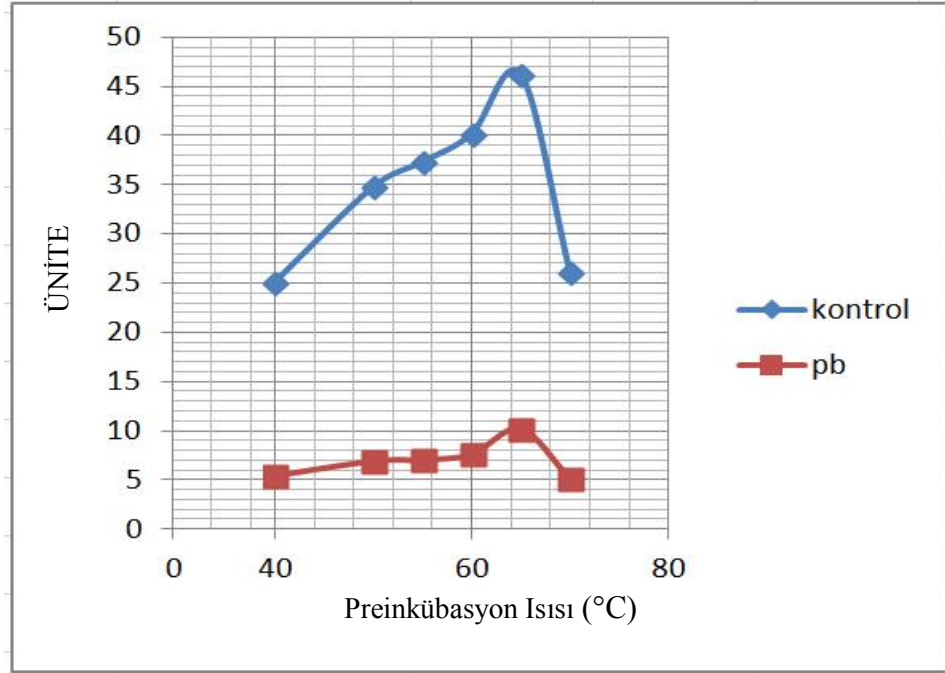
Ünite: 1 saatte $37^{\circ} C$ 'de L-argininden 1 μ mol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir.

Ünite: μ mol üre / saat/ mg protein

5. BULGULAR

5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti

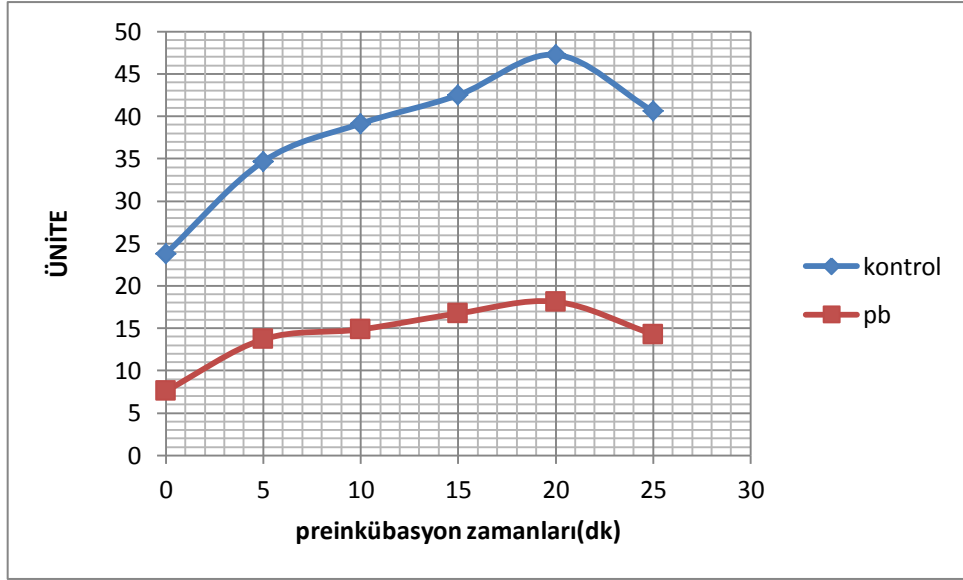
Rat karaciğer arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır. Enzim kaynağı 1 mM $MnCl_2$ varlığında 40,50, 55, 60, 65, 70 °C' lerde preinkübasyon ısısına tabii tutulmuştur. Kontrol grubu 1/300, kurşun asetat grubu (50 mg/kg) 1/2000 sulandırma yapılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi 67- 68 °C arasında saptanmış olup, bu ısıdan sonra aktivitenin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Enzimin aktivasyonu için uygun preinkübasyon ısısı 65 °C olarak kabul edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti

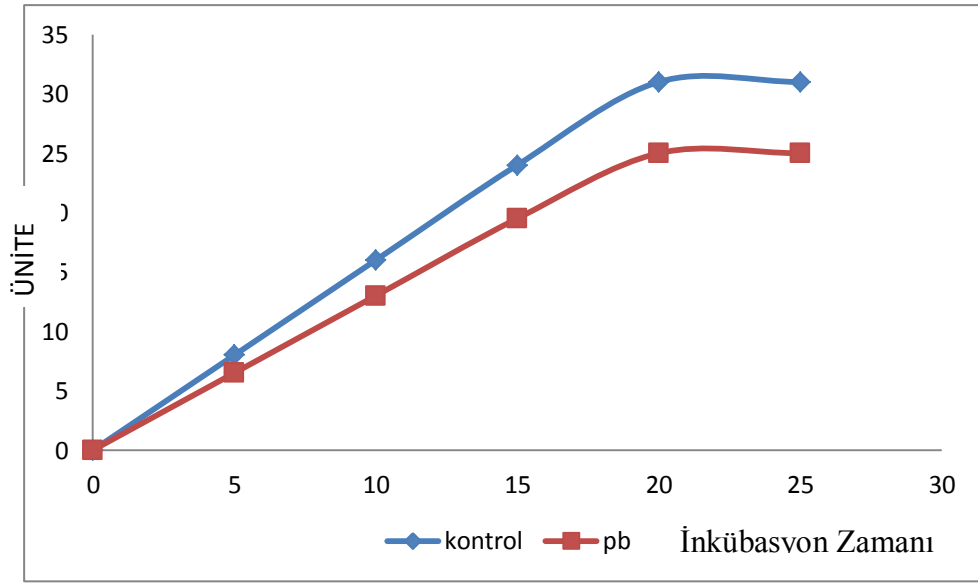
Rat karaciğer arginazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak aktivitesi araştırılmış, 1 mM $MnCl_2$ varlığında ve 65 °C preinkübasyon ısısında, 0-25 dakikalık zaman aralıklarında enzimin aktivitesi incelenmiştir. Kontrol grubu 1/300, 50 mg/kg Pb asetat uygulanarak yapılan karaciğer doku arginaz 1/2000 sulandırma yapılmıştır. Enzimin maksimum aktiviteye 20 dakika'da ulaştığı görülmüş ve optimal preinkübasyon süresi 20.nci dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.3. İnkübasyon Süresinin Tesbiti

Rat karaciğer arginazı için optimum inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynağı 0-25 dakikalık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu argininin hidrolizi izlemiştir. Kontrol grubu 1/300, kurşun asetat grubu (50 mg/kg) 1/2000 sulandırma yapılmıştır. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürünün zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 8 '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 18 dakika olarak belirlenmiştir.

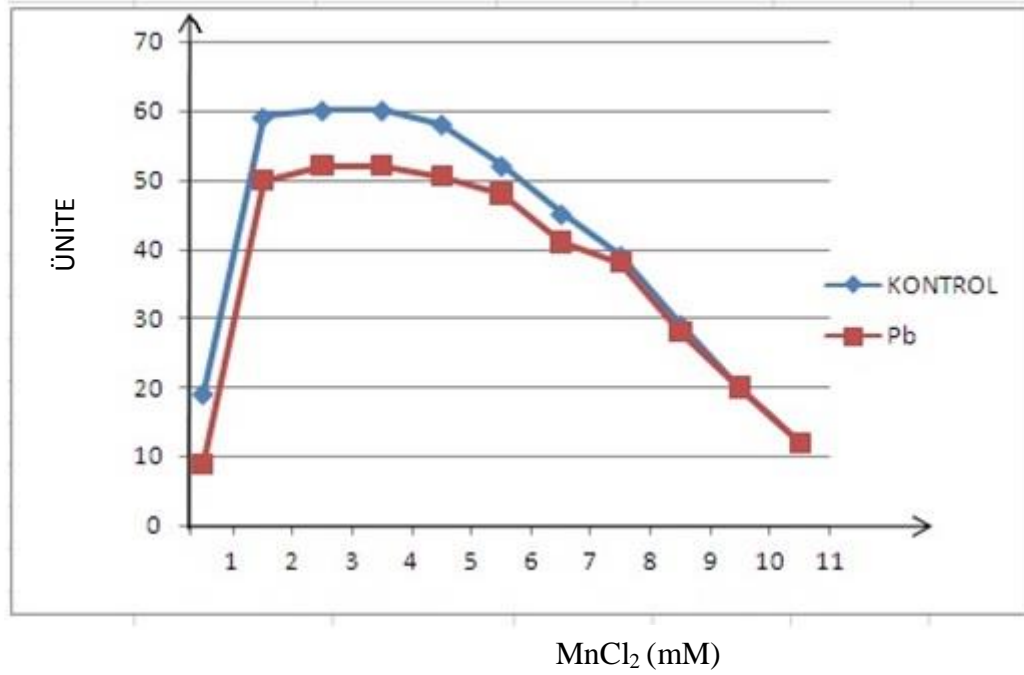


Şekil 8. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.4. Mangan İyonlarının Etkisi

Mangan iyonları arginaz enzimi için gereklidir. Bu yüzden arginaz aktivitesi üzerine mangan iyonlarının etkisini araştırmak için 0-10 mM

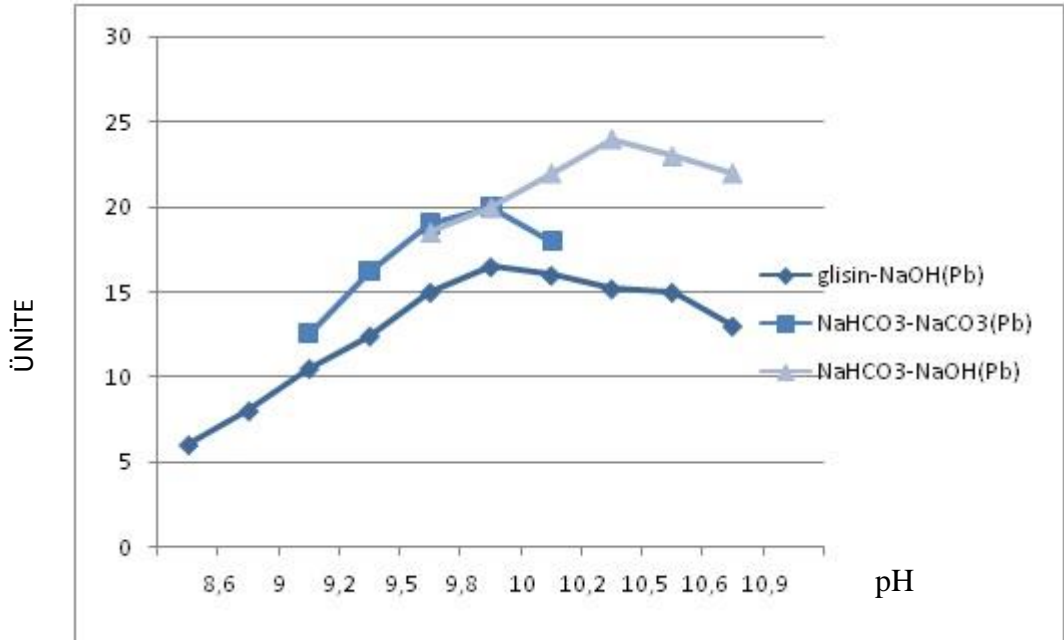
konsantrasyonları arasında değişen $MnCl_2$, preinkübasyon ortamına ilave edilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Kontrol grubu 1/300 ,kurşun asetat grubu (50 mg/kg) 1/2000 sulandırma yapılmıştır Preinkübasyon ortamına Mn^{++} katılmadığı zaman kontrol grubunda enzim aktivitesi çok düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonları ilave edildiğinde enzim aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Enzim aktivitesi özellikle 2 mM $MnCl_2$ konsantrasyonuna kadar yükselmiş, 2 mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonundan sonra 5 Mm $MnCl_2$ varlığında aktivite sabit devam etmiş, 5 Mm $MnCl_2$ dan sonra düşmüştür. 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 edilmiştir (şekil 9).



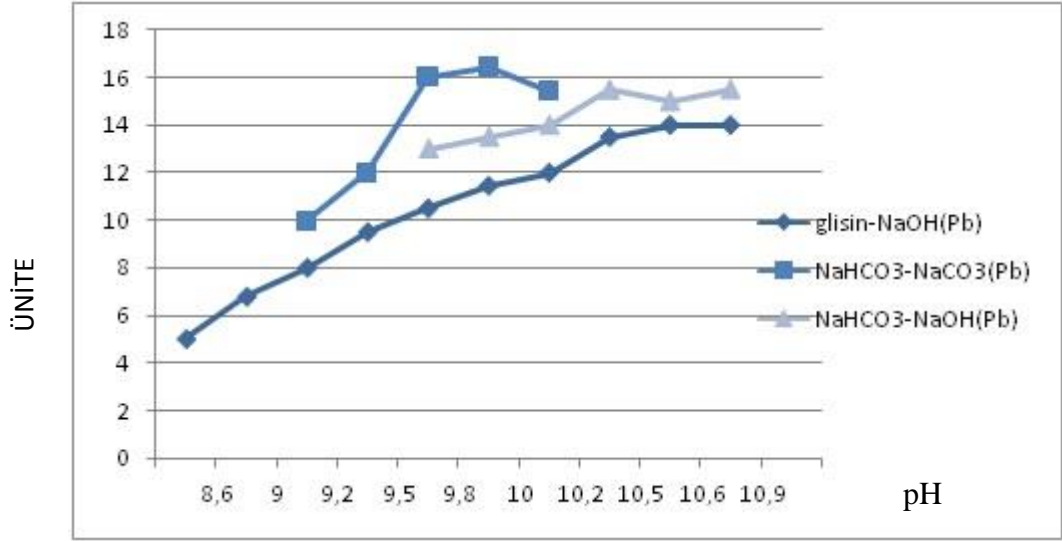
Şekil 9. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

5.5. Rat Karaciğer Doku Arginazi Üzerine pH' nın Etkisi

Rat karaciğer doku arginazının optimal pH' sını tespit etmek için pH 8,6' dan pH 11' e kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Kontrol grubu 1/300 ,kurşun asetat grubu (50 mg/kg) 1/2000 sulandırma yapılmıştır. 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 belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin görüldüğü pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 10-10,1' de Sodyum bikarbonat –sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiğinden Rat karaciğer arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun sodyum bikarbonat-sodyum karbonat tamponu ve optimal pH' nın da 10 olduğu kabul edilmiştir (Şekil 10-11).



Şekil 10. Kontrol grubunda Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler



Şekil 11. 50 mg/kg kurşun(Pb) asetat grubu periton içi uygulanmış Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya göre Gösterdiği Değişiklikler

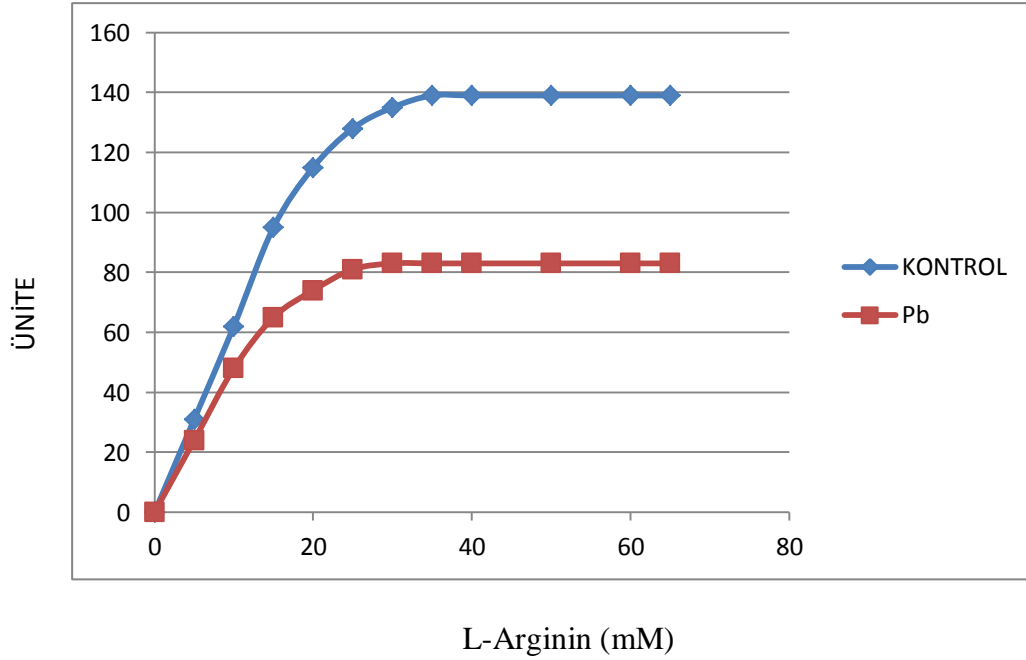
5.6. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin

Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Rat karaciğer doku arginazı için optimal şartlar tesbit edildikten sonra, arginazın substratı olan L-arginine karşı K_m 'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 12) . Kontrol grubu 1/300, kurşun grubunda (50 mg/kg) 1/2000 sulandırma yapılmıştır Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesine bakılmıştır.

0-65 mM a kadar L-arginin konsantrasyonu kullanılmıştır. Reaksiyon hızının artışı L-arginin konsantrasyonunun artışına paralellik göstermektedir. Başlangıçta, reaksiyon hızında görülen lineer artış daha sonra yerini hiperbolik bir

görünümüne bırakmakta ve en sonunda reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymun hale gelmektedir

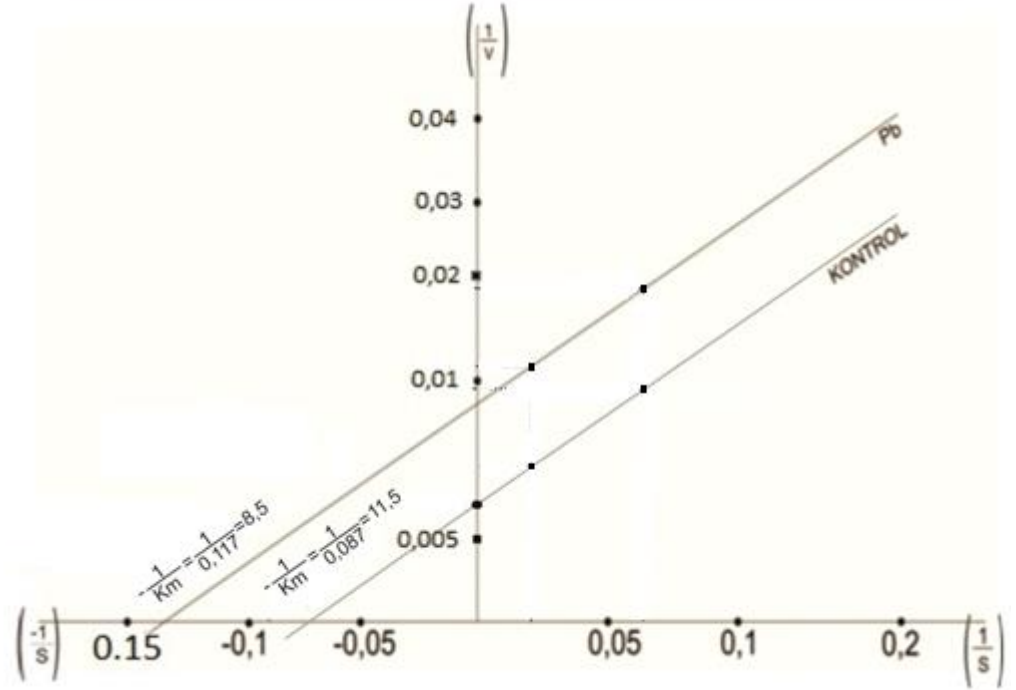


Şekil 12. Rat Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi

Şekil'12 de görüldüğü üzere kontrol grubu 15 mM'a, Pb grubu 10 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. Kontrol grubu 35 mM'lık, Pb grubu 30 mM'lık L-arginin konsantrasyonundan itibaren, arginaz L-arginin ile doymunluğa ulaşarak (sıfır mertebe kinetiği) reaksiyon sabit hızla devam etmektedir.

Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında Lineweaver-Burk (Şekil 13) eğrileriyle de

incelenmiş rat karaciğer kurşun içeren grubun doku arginazının L- arginine karşı olan K_m 'inin 8,5 mM civarında, kontrol grubunun ise 11,5 mM civarında olduğu bulunmuştur. Yani enzimin V_{max} ve K_m lerinin farklı olması inhibisyonun kompetatif olduğunu gösterir.

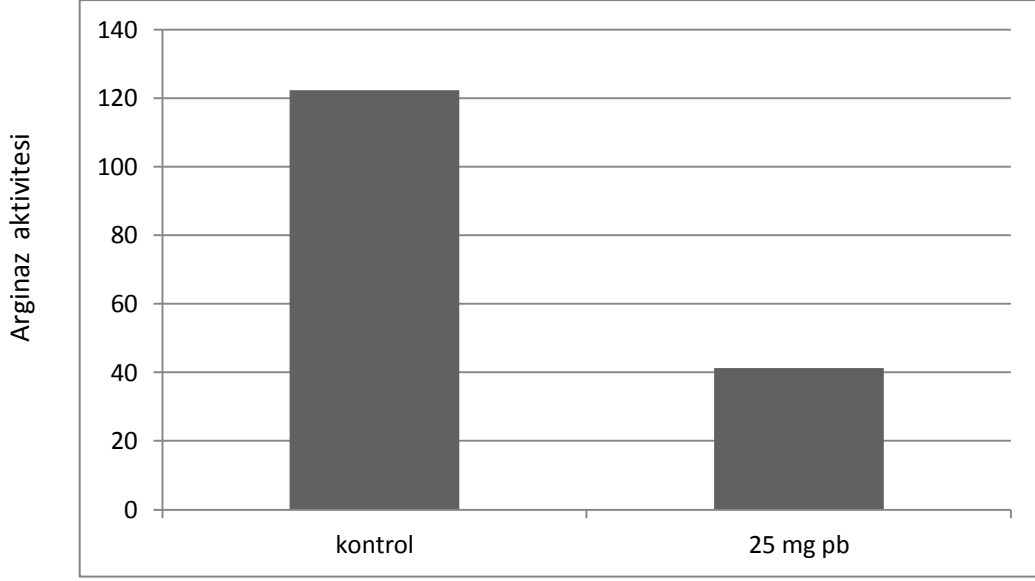


Şekil 13. Rat Karaciğer Arginaz Aktivitesinin L-Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi.

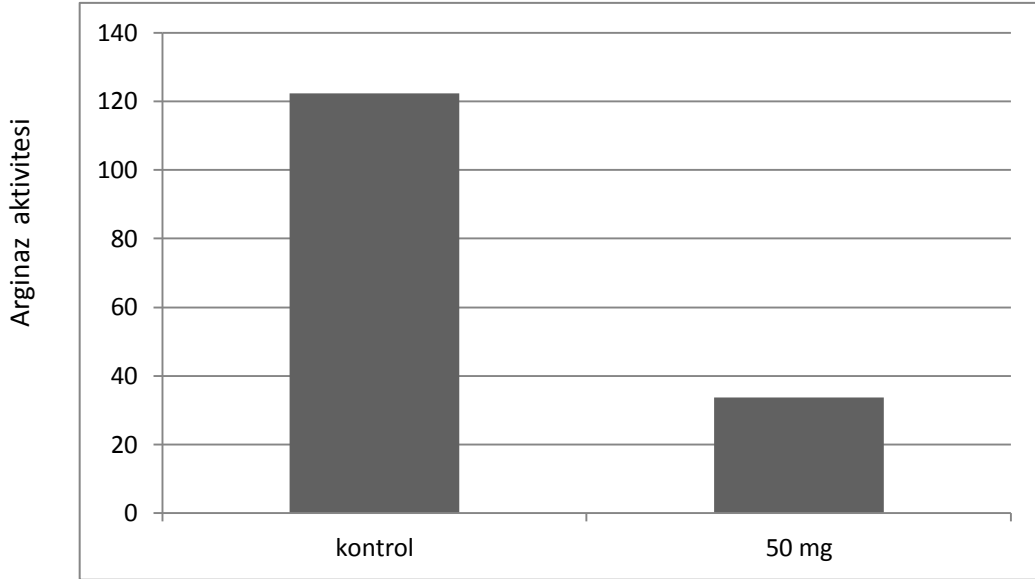
5.7. Rat Karaciğer Dokularında Arginaz Aktivitesinin Kurşun

miktarlarına göre karşılaştırılması;

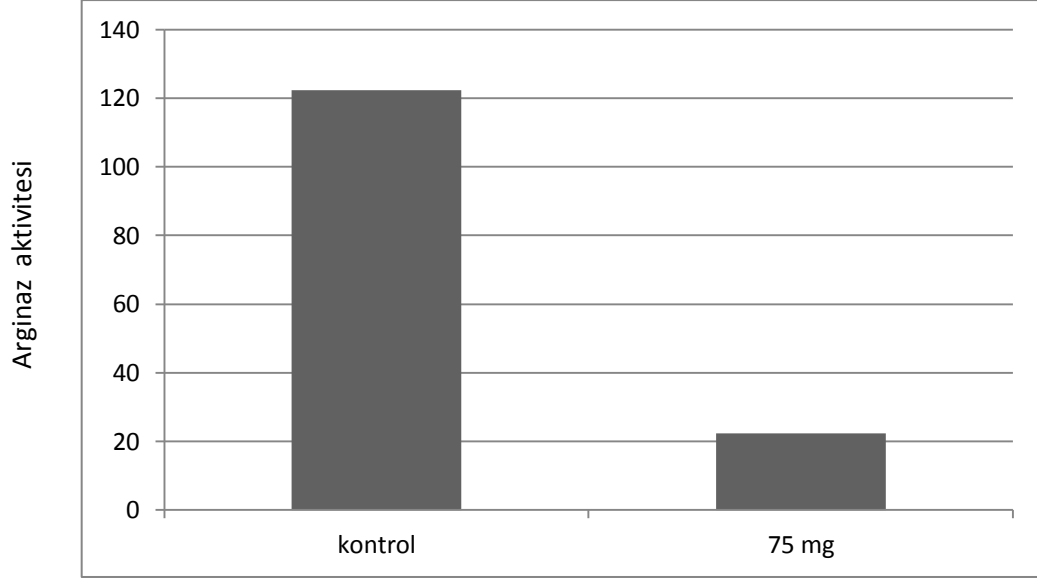
Kontrol grubu 1/1500 sulandırma, kurşun gruplarında 1/300 sulandırma yapılmış, kontrol grupları sırasıyla 25 mg, 50 mg, 75 mg Pb grupları ile karşılaştırılmış ve Arginaz aktivite düzeyine bakılmıştır. Arginaz aktivite düzeyinin Pb miktarı arttıkça azaldığı görülmüştür (Şekil : 14-15-16).



Şekil 14. Kontrol Grubu (grup 1) ve 25 mg Pb (grup 2) verilen Grupların Karaciğer Doku Arginaz Aktivite Düzeyleri



Şekil 15. Kontrol Grubu (grup 1) ve 50 mg Pb (grup 3) Verilen Grupların Karaciğer Doku Arginaz Aktivite Düzeyleri



Şekil 16. Kontrol Grubu (grup 1) ve 75 mg Pb (grup 4) verilen Grubların Karaciğer doku Arginaz Aktivite Düzeyleri

6. TARTIŞMA

Yapılan bir çok araştırmada farklı doku ve hayvan türlerinde arginaz enziminin optimal şartları ve kinetik özellikleri ortaya konulmuştur. **Kurşun Asetatın Rat dokularında Arginaz Enzimi Aktivite Düzeylerine Etkisi ve Kinetik özellikleri** ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığı literatür taramalarından anlaşılmaktadır, bu nedenle Rat karaciğer dokusunda arginaz enziminin kinetik özellikleri saptanmış ve Rat dokularındaki arginazın dağılımına bakılmıştır

Enzimlerin genel yapısının protein kaynaklı olması nedeniyle ısıya dayanıklı değildirler. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği ısının üzerine çıkıldığı zaman enzim aktivitesi azalmaktadır. Rat karaciğer doku arginazının preinkübasyon ısısını saptamak için farklı ısılarda (40-70 °C) enzim aktivitesine bakılmış ve en uygun preinkübasyon ısısının 65 °C olduğu, bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği tespit edilmiştir. Preinkübasyon ısısı farklı tür ve dokularda araştırılmış ve tüm arginaz metodlarında kullanıldığı görülmüştür. Preinkübasyon ısısı koyun gözü vitreusu için 40 °C (107), koyun meme doku arginazı için 52 °C (108), insan tükürük arginazı (109), tiroid doku arginazı (19), eritrosit ve uterus arginazı (110), bronş lavaj sıvısı arginazı (111) için 55 °C, diabetik rat karaciğeri için 68 °C (112), sığır rumen doku arginazı için 60 °C (113), kobay karaciğer arginazı için 45 °C (114), teleskop balığı karaciğeri için 37 °C (115), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 65 °C (5), M. benedeni arginazı için 53 °C (116) olarak bildirilmiştir.

Preinkübasyon ısısının Mn^{+2} iyonlarına gereksinimini tespit etmek için enzim kaynağı $MnCl_2$ lü ve $MnCl_2$ süz (distile su ile) preinkübasyona tabii

tutulmuştur. $MnCl_2$ ' lü preinkübasyon uygulanan enzim kaynağının, $MnCl_2$ ' süz preinkübasyon uygulanan enzim kaynağından daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır. Mn^{+2} iyonları preinkübasyon için gereklidir. Mn^{+2} iyonlarının enzim ile substrat arasında metal bir köprü kurduğu ve enzim - Mn^{+2} - arginin kompleksinin meydana gelmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (117). Yapılan çalışmalarda preinkübasyon ortamına Mn^{+2} 'nin ilavesinin enzim aktivitesini artırdığı görülmüştür (108,113). Mn^{+2} nin preinkübasyon sırasında arginaza bağlanarak enzim aktivitesini ve dayanıklılığını artırdığı açıklanmıştır (118).

Çeşitli doku arginazları için preinkübasyon ısısının ve Mn^{+2} iyonlarının gerekli olduğu ve aktiviteyi artırdığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (108,113,119). Sıçan karaciğer doku arginazının Mn^{+2} iyonları varlığında $55\text{ }^\circ\text{C}$ ' de preinkübasyonunun enzim aktivitesini yaklaşık % 110 artırdığı (120), 2 mM $MnCl_2$ ün varlığında ve $55\text{ }^\circ\text{C}$ ' de 20 dakika preinkübasyonla, eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığı saptanmıştır (33). 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 (121) tarafından belirtilmiştir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimi inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (27). Bu nedenle Rat karaciğer doku arginaz aktivitesi üzerine $MnCl_2$ konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin 3 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için gerekli olan $MnCl_2$ konsantrasyonu farklı olup rat karaciğeri (122) ve sığır rumen

doku arginazı (113) için 2 mM, *M. benedeni* arginazı için 0.5 mM (116), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı için 50 mM (123), insan tiroid arginazı (19) ile karaciğer ve eritrosit arginazı (110) için 2.5 mM, insan tükürük arginazı (109) ve vitreus arginazı (107) için 5 mM, koyun meme doku arginazı için 0.75 mM (108), insan uterusu için 0.8 mM (110), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 1 mM (5), diabetik rat karaciğer arginazı için 1-2 mM, böbrek arginazı için 2 mM olarak bulunmuştur (112). Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta manganın arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal mangan derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir.

Rat karaciğer doku arginaz enziminin en uygun preinkübasyon süresini tespit edebilmek için enzim 65 °C' de 0-25 dakikalar arasında preinkübasyona tabii tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 20 dakika olduğu tespit edilmiştir. Preinkübasyon süresi koyun meme doku arginazı (108) ve insan tiroid doku arginazı (19) için 12 dakika, koyun gözü vitreusu için 9-10 dakika (107), insan tükürük arginazı (109), bronş lavaj sıvısı arginazı (111) ve diabetik rat karaciğeri (112) için 20 dakika, sığır rumen doku arginazı (113), eritrosit arginazı (110) ve kobay karaciğer arginazı (114) için 5 dakika, uterus arginazı için 35 dakika (110), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 15 dakika (5) , *M. benedeni* arginazı için 10 dakika olarak belirlenmiştir (116).

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında oluştuğu için enzim kaynağı 37 °C' de 0-25 dakikalar arasında inkübasyona bırakılarak optimum inkübasyon süresi tespit edilmeye çalışılmış, 18. dakikaya kadar lineerliğin devam ettiği, 18. dakikadan sonra lineerliğin yerini hiperbolik bir görünümün aldığı gözlemlenmiştir. Rat karaciğer doku arginazı için optimum inkübasyon süresi 18

dakika olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri tesbit edilmiştir. İnkübasyon süresi insan tiroid arginazı için 30 dakika (19), rat karaciğeri (112), insan karaciğer ve uterusu (110) için 20 dakika, koyun gözü vitreusu (107) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (5) için 10 dakika, sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (124), M. Benedeni arginazı (116) ve koyun meme doku arginazı için 15 dakika (108) olarak bulunmuştur.

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır (5,19,32,107,108,110,112,113,116). Rat karaciğer doku arginazının optimal pH' sını tespit etmek için pH 8.6' dan pH 10.9' a kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan pH 8.6-10.6 arasında olan Glisin-Sodyum hidroksit tamponu, pH sı 9.2- 10.2 arasında olan Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu ve 9.7-10.9 pH' larında olan Sodyum bikarbonat-Sodyum hidroksit tamponu kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 10-10.1' de Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu varlığında elde edildiği için Rat karaciğer arginaz aktivitesi için gerekli olan tamponun Sodyum bikarbonat- Sodyum karbonat tamponu, optimal pH' nın da 10 olduğu kabul edilmiştir.

Karaciğer ve eritrosit arginazı (33), M.expensa arginazı (119), koyun meme doku arginazı (108), M.benedeni arginazı (116) için pH 9.5' deki karbonat tamponu, sığır rumen doku arginazı (113) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (5) için pH 10' daki karbonat tamponu, diabetik rat karaciğeri (112) için pH 10.1' deki karbonat tamponu, insan karaciğer ve eritrositi için pH 9.7' deki,

insan uterusu için ise pH 9.6' daki karbonat tamponunun kullanıldığı (110) bildirilmiştir. Koyun gözü vitreusu için pH 8.8' deki Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı (107), insan tiroid arginazının optimum pH' sınm 9,6 (19), kobay karaciğer arginazının pH' sınm 10.5 (114), Genypterus maculatus türünden balıkların karaciğer arginazının (125) pH'sının 9.5 olduğu 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 8,5 mM, kontrol grubunun ise 11,5 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 (113) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (5) için 4 mM, M. benedeni arginazı için 12.5 mM (116), insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM (110), tiroid arginazı için 2 mM (19), vitreus arginazı için 6 mM (107), koyun meme doku arginazı için 1.35 mM (108), diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM (112), Mus booduga karaciğer arginazı için 8.3 mM (126), Xenopus leavis karaciğer arginazı için 29 mM (123), kobay karaciğer arginazı için 19.6 mM (114) olarak bulunmuştur. Rat karaciğer doku arginazı için bulduğumuz Km değeri yapılan çalışmalarda elde edilen Km değerleri sınırları içerisindedir.

Bugüne kadar kurşun asetatın rat karaciğer dokusunda arginaz enzimi aktivite düzeylerine etkisi ve kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığı literatür taramalarından anlaşılmaktadır. Bu nedenle rat karaciğer dokusunda arginaz enziminin kinetik özellikleri saptanmıştır. Rat karaciğer arginazının aktivasyonu için preinkübasyonun ve Mn^{+2} katyonlarının gerekli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilerin bu konu ile ilgili yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Balisteri WF, Rej R. Liver function.in: Burtis A, Ashwood ER. (Eds) Tietz textbook of clinical chemistry. 2 nd ed. Philadelphia. W.B.Saunders Company, 1994; 1449-1509
2. Rodvell VW (Çeviri: N.Dikmen). Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması. Harper' ın Biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004; 307-59
3. Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasmann H.. Developmental Changes in Arginase Expression and Activity in the Lung. Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol. (2008);294(3): 498-504.
4. Benzer F, Ozan ST, Yılmaz S. Koyun Karaciğer Doku Arginazının Guanidin ve Bazı Amino Asitler Tarafından İnhibisyonu ve İnhibisyonunun Kinetiği. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. (2003); 17(3): 173-178
5. Benzer F, Ozan ST. Fascioliosisli Koyunların Arginaz Enzim Aktivite Düzeyleri ile Karaciğer Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. (2002);16(2): 217-222.
6. Lemone P, Burke KM. Medical Surgical Nursing-Critical Thinking in Client Care, California 1996; 2039-2057
7. Champe PC, Harvey RA. (Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.) (1997). Lippicott's Mustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, , İstanbul.236-241
8. Gözükara EM. Enzimler. "Biyokimya II". Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. (1997).
9. Colombo JP, Konarska L. (1984). Arginase; In : Bergmayer Grabı M. (Eds). Methods of Enzymatic Analysis. 3rd Ed.Weinheim Vertag Chemie. 285-294.
10. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet 2001; 2(9): 533-43.
11. Nakamura H, Saheki T, Nakagawa S. Differential Cellular Localization of Enzymes of L-Arginin Metabolism in the rat. Brain Res 1990; 530:108-112
12. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. Biochem Med 1982;28:165-75.
13. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. Cancer 1992; 70 (4):733-736
14. Konarska L, Tomaszewski L. Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney I. Ontogenic Evaluation of arginase isoenzymes. Biochem Med and Met Biol 1986; 35:156-69.
15. Pederson SB, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Richelsen B. Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hipertrophy in experimental diabetes. Mol Cell Endoc 1992; 86:67-72.
16. Ozan S, Gürsu F, Bayraktutan U, Gülen Ş. Farklı türlerin eritrositlerindeki Arginaz aktivitesi ile üre düzeyleri arasındaki ilişki. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi. 1. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi; Sivas:1990.

17. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T, Totani M. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26(6):547-553.
18. Jackson MJ, Beaudet AL, O' Brien WE. Mammalian urea cycle enzymes. *Ann Rev Genet* 1986; 20:431-64
19. İlhan N. İnsan tiroid arginazının kinetik özellikleri (tez). Elazığ. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1992
20. Pegg AE, Mc Cann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982; 243(12):212-221
21. Morgon DM. Polyamines-Essays *Biochem* 1987; 53:749-90
22. Rodvell VW (Çeviri: N.Dikmen). Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması. Harper' ın Biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004; 307-59.
23. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 274:342-8.
24. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol* 1991; 37(8):773-783.
25. Campbell RA. Polyamines and uremia. *Adv Exp Med Biol* 1987; 223:47-54
26. Straus B, Cepebk J, Festa G. Arginase a new marker of mammary carcinoma. *ClinChim Acta* 1992;210:5-12
27. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. *Biyokimya Dergisi* 1993; 18:59-67
28. Mora A, del ara Rangel M, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. Implications of the S-shaped domain in the quaternary structure of human arginase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1476(2):181-190.
29. 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.
30. 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; 31:387-94
31. Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-Sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. *Arch Biochem Biophys* 1991; 286:217-21.
32. Ozan S, Gülen Ş. Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması. *Doğa Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 1989; 13:154-63.
33. Colombo J, Konarska L. Arginase.in: Bergmeyer HV. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1984; 285-94
34. Cederbaum SD, Yu H, Grody W W, et all. Arginase I and II : Do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81:38-44.
35. Geyer JW, Dabich D. (1971) Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.* 39: 412-417

36. Akiho H, Iwai A, Katoh- Suodh M, Tsukamoto S, Koshiya K, Yamaguchi T. Postischaemic treatment with orotic acid prevents neuronal injury in gerbil brain ischaemia. *Neuroreport* 1997; 8(3):607.
37. Straus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta* 1992; 210:5-12.
38. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. Deneysel kurşun zehirlenmesinin köpeklerde transaminaz ve arginaz düzeylerine etkisi. Karakaş ES (Editör). 11.Gevher Nesibe Tıp Günleri' nde. 1993 Nisan 19-22, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Matbaası 1993; 79-86.
39. Jackson MJ, Beudet AL, O' Brien WE. Mammalian urea cycle enzymes. *Ann Rev Genet* 1986; 20:431-64.
40. Konarsa L, Tomaszewski L. A simple quantitative micromethod of arginase assay in blood sports dried on filter paper. *Clin Chim Acta* 1986; 154: 7-18.
41. Scheuerle AE, Mc Vie R, Beudet AL, Shapira SK. Arginase deficiency presenting as cerebral palsy. *Pediatrics* 1993; 91:995-996.
42. Rodrigez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell response. *Cancer Res* 2004; 64:5839.
43. Kumar AN, Kalyankar GD. Effect of steroid hormones on age dependent changes in rat arginase isoenzymes. *Exp Gerontol* 1984; 19:191-198.
44. Vercelli D. Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma? *J Clin, Invest.*, (2003). 111;1815-1817.
45. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2003);6, 223-228.
46. Grillo MA, Colombatto S.: Arginine revisited: Minireview article. *Amino Acids*, (2004);26, 345-351.
47. Wheatley DN., Campbell E.: Arginine Catabolism, Liver Extracts and Cancer. *Pathology Oncology Research*, 8, No:1, 18-25 (2002).
48. Cederbaum SD, Yu H, Grody W, et al.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, (2004);81, 38-44.
49. Ash DE. Structure and Function of Arginases. *J Nutr*, (2004);134: 2760-2764S
50. Boucher JL, J P Tenu CM. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*, (1999);55:1015-1028
51. Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, (2003); 24(9), 450-455
52. King NE, Rothenberg ME, Zimmermann N. Arginine in Asthma and Lung Inflammation. *J. Nutr*, (2004);134: 2830-2836
53. Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Nitric Oxide Synthase and Arginase in the Rat Hippocampus and the Entorhinal, Perirhinal, Postrhinal, and Temporal Cortices: Regional Variations and Age-Related Changes. *Hippocampus* (2003);13: 859-867

54. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, (2005);23: 971-978
55. Luft FC. Arginase is an enzyme that nephrologists can love. *Journal of Hypertension*, (2005); 23: 933-934
56. Ikemoto M, Tsunekawa S, Toda Y, Totani M. Liver-Type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats. *Clin Chem* (2001); 47 :46-48.
57. Prins HA, Meijer C, Nijveldt RJ, Wiezer MJ, van Leeuwen PA. High plasma levels of arginine and liver arginase in Kupffer-cell-depleted rats after partial hepatectomy. *J Hepatol* (2000); 32:399-405.
58. Waddington SN. Arginase in glomerulonephritis. *Kidney International*, (2002); 61: 876-881
59. Beck B, Ciszek M, Polaniak R, Beyga Z, Kröl W, Drozd M, Shani J. The Activity of Ornithine Transcarbamoylase and Arginase during Mechanical Jaundice in the Rat Model. *Journal of Surgical Research*, (2005); 126: 19-26.
60. Lange PS, Langley B, Lu P, Ratan R. Novel Roles for Arginase in Cell Survival, Regeneration, and Translation in the Central Nervous System. *J Nutr* (2004); 134: 2812-2817
61. Cai D, Deng K, Mellado W, et al. Arginase I and Polyamines Act Downstream from Cyclic AMP in Overcoming Inhibition of Axonal Growth MAG and Myelin In Vitro. *Neuron*, (2002); 35: 711-719.
62. Iyamu EW, Cecil R, Parkin L, et al. Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *British Haematology* 2005; 131: 389-394.
63. Yu H, Iyer RK, Kern RM, et al. Expression of Arginase Isozymes in Mouse Brain. *Newscience Research*, 2001; 66: 406-422.
64. Crombez EA, Cederbaum SD. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2005; 84: 243-251.
65. Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, et al. The human arginases and arginase deficiency. *J Inher Metabol Dis* 1998; 21(Suppl 1): 86-100 .
66. Picker JD, Puga AC, Levy HL. Arginase Deficiency with lethal neonatal expression: Evidence for the glutamine hypothesis of cerebral edema. *J Pediatr*, 2003;142: 349-52.
67. Lopez V, Alarco' n R, Orellana MS, et al. Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. Alteration of substrate specificity by replacement of Asn149 with Asp. *FEBS Journal*, 2005;272: 4540-4548.
68. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Central for Disease Control. Preventing Lead Poisoning in Young Children: A Statement by the Central for Disease Control and Prevention. Atlanta., October, 1991.

69. Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı Demir Dışı Metaller Özel İhtisas Komisyonu. Kurşun, Çinko, Kurşun ve Kadmiyum Raporu. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Yayın No: DPT: 2318-ÖİK: 419. Kasım, Ankara: 1992, 39-40.
70. Lanphear BP, Winter NL, Apetz L, Eberly S, Wietzman MA. Randomized Trial of the effect of dust control on children's blood lead levels. *Pediatrics* 1996; 98 (1) 35-40
71. World Health Organisation. Environmental Health Criteria 165- Inorganic Lead. Geneva. WHO.1995
72. Tonguç E. Meslek hastalıklarına genel bakış. İş Hekimliği Ders Notları. Ed. Topuzoğlu İ, Orhun H. (eds) 3. Basım. Ankara, Türk Tabipleri Birliği Yayını, Ocak 1993, 69-73.
73. Hayes E, McElvaine MD, Orbach HG, et al. term trends in blood lead levels among children in Chicago: Relationship to air lead levels *Pediatrics*. 1994; 93(2): 195-200
74. Lewis R. Metals. *Occupational Medicine*. Ed. La Dou J.(ed) USA, Appleton and Lange A. Publishing Division of Prentice Hall, 1990, 306-310.
75. Grandjean P, Wallace RB. Health significance of metals- lead. Maxcy-Rosenau-Last *Public Health and Preventive Medicine*. Last JM (Ed). 13.nd.Ed. 1992: 389-391
76. Hu H. Knowledge of diagnosis and reproductive history among survivors of childhood plumbism. *Am J Public Health*. 1991; 81(8): 1070-72.
77. U.S. Department of Human Services, Public Health Service Case Studies in Environmental Medicine. Lead Toxicity., Agency for Toxic Substance and Disease Registry. 1992
78. American Academy of Pediatrics. Committee on Environmental Health. Screening for elevated blood lead levels. *Pediatrics* 1998; 101(6): 1072-76
79. Yapıcı EG. Silivri Merkezde Yaşayan 6 Ay- 6 Yaş Arası Çocuklarda Asemptomatik Kurşun Zehirlenmesi Prevalansı -Bir Epidemiyolojik Çalışma, Uzmanlık tezi, Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp fakültesi, İstanbul, 1999
80. Burbure C, Buchet JP, Leroyer A, et al. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 584-590.
81. Loghman-Adham M. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 928-938.
82. Fanning D. A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch Environ Health* 1988; 43: 247-251
83. Lin JL, Lin-Tan DT, Yen TH, et al. Blood lead levels, malnutrition, inflammation, and mortality in patients with diabetes treated by long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2008; 51: 107-115.
84. Schober SE, Mirel LB, Graubard BI, Brody DJ, Flegal KM. Blood lead levels and death from all causes, cardiovascular disease, and cancer: results from the NHANES III mortality study. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1538-1541.
85. Staessen JA, Bulpitt CJ, Fagard R, et al. Hypertension caused by low-level lead exposure: myth or fact? *J Cardiovasc Risk* 1994; 1: 87-97.

86. Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens* 2000; 13: 552-555
87. WHO. Environmental Health Criteria 165-Inorganic lead. Geneva: 1995
88. Grandjean P. Health significance of metals- lead. *Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine* 1992; 389-391
89. Rousseau MC, Straif K, Siemiatycki J. IARC carcinogen update. *Environ Health Perspect* 2005; 113: A580-581
90. Fu H, Boffetta R. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup Environ Med* 1995; 52: 73-81
91. Kaya S, Akar F. Metaller ve diğer inorganik ve radyoetkin maddeler. İçinde: Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (ed). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji (İkinci baskı)*. Ankara: Medisan Yayınları, 1998: 134-138
92. Petrone LR. Iron deficiency, lead poisoning, and development. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161: 523-524.
93. Elevated Lead in D.C. Drinking Water-A Study of Potential Causative Events, Final Summary Report; EPA-815-R-07-021, 2008.
94. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 529-539
95. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 927-945
96. Solliway BM, Schaffer A, Pratt H, Yannai S. Effects of exposure to lead on selected biochemical and haematological variables. *Pharmacol Toxicol* 1996; 78: 18-22.
97. Machartova V, Racek J, Kohout J, Senft V, Trefil L. Effect of antioxidant therapy on indicators of free radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek* 2000; 46: 444-446.
98. Warren MJ, Cooper JB, Wood SP, Shoolingin-Jordan PM. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 217-221
99. Philip AT, Gerson B. Lead poisoning-Part II. Effects and assay. *Clin Lab Med* 1994; 14: 651-670
100. Somashekaraiah BV, Venkaiah B, Prasad AR. Biochemical diagnosis of occupational exposure to lead toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990; 44: 268-275
101. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2005: 63.
102. Paglia DE, Valentine WN, Fink K. Lead poisoning. Further observations on erythrocyte pyrimidine-nucleotidase deficiency and intracellular accumulation of pyrimidine nucleotides. *J Clin Invest* 1977; 60: 1362-1366

103. Mahaffey KR, Rosen JF, Chesney RW, et al. Association between age, blood lead concentration, and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 1327-1331.
104. Rosen JF, Chesney RW, Hamstra A, DeLuca HF, Mahaffey KR. Reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. *N Engl J Med* 1980; 302: 1128-1131.
105. Kaplan LA. Urea. "Methods in Clinical Chemistry". Pesce AJ, Kaplan LA. (Eds). The CV Mosby Company, Toronto. 1987; 22-27.
106. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
107. Gürsu FM. (1993). Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
108. Özçelik M. (2002). Koyun Meme Dokusu Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
109. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG. (1985). Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininemia. *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23, 6: 337-342.
110. Halifeoğlu İ. (1993). İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
111. Altundağ Y. (2001). Bronj Lavaj Sırasında Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
112. Erişir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. (2005). Evaluation of Optimal Conditions for nmArginase Activity in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Vet. Med.-Czech.* 50, 2: 69-76.
113. Erişir M. (1997). Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
114. Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. (1981). Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginase (author's transl)]. *Rev Esp Fisiol.* 37, 1: 37-44.
115. Singh RA, Singh SN. (1990). Purification and Properties of Liver Arginase from Teleostean Fish *Clarias Batrachus* (L.). *Arch Int Physiol Biochim.* 98, 6: 411-9.
116. Özdemir N. (1990). Moniezia Benedeni Arginazının Bazı Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
117. Poremska Z., Grabon W., Zelazowska, Cieczot H, Zamecka E. (1993). Nonidentity of Subunits of Human Kidney Arginase A1 and Human Liver Arginase A5. *Acta Biochemica Polonica.* 40, 4: 465-470.
118. Mohammed SM, Greenberg DM. (1945). Liver Arginase I. Preparation of Extracts of High Potency, Chemical Properties, Activation, Inhibition and pH Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 8: 349-357.

119. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. (1993). Kısmen Arıtılmış *Moniezia Expensa* Arginazının Bazı Özellikleri. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 17: 245-250.
120. Schimke RT. (1962). Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* 237, 2: 59-467.
121. Muszynska G, Severina LO, Lobyreva LW. (1972). Characteristics of Arginase from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organism. *Acta Biochem. Pol.* 19, 2: 109-111.
122. Kochakain CD, Berlett NM. (1948). The Effect of Crystalline Adrenal Cortical Steroids, DL-Thyroxine and Epinefrine on the Alkaline and Acids Phosphatases and Arginase of the Liver and Kidney of the Normal Adult Rat. *J. Biol. Chem.* 176: 243-247.
123. Peiser L, Balinsky JB. (1982). Kinetic Properties of Arginase from *Xenopus Laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 73, 2: 215-220.
124. Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M. (2003). Effects of Dietary Vitamin E and Selenioses of Glucocorticoid. *Cell Bioum on Arginase Activity in the Liver, Kidney and Heart of Rats Treated with High Dchemistry and Function.* 21: 331-335.
125. Carvajal N, Kessi E, Ainol L. (1987). Subcellular Localization and Kinetic Properties of Arginase from the Liver of *Genypterus Maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 88, 1: 229-31
126. Prasad GV, Lokanatha V, Sreekanth K, Rajendra W. (1997). Purification and Kinetic Properties of *Mus Booduga* (Gray) Hepatic Arginase. *Journal of Enzyme Inhibition.* 12,4: 255-272.

8. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılı Elazığ doğumluyum. İlk, Ortaokul ve liseyi Elazığ da bitirdikten sonra 1997 Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2002 de bitirdim. 2010 Yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anbilimdalında Yüksek Lisansa başladım. Çeşitli özel öğretim kurumlarında öğretmen olarak çalıştım,halen özel bir kurumda öğretmen olarak çalışmaktayım.