

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVŞAN BÖBREK ARGİNAZ AKTİVİTESİ İÇİN
OPTİMAL ŞARTLARIN BELİRLENMESİ

Beytullah ŞENGÜL

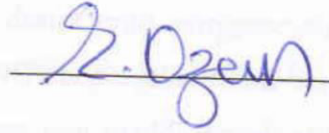
2015-ELAZIĞ

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa Kaplan

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



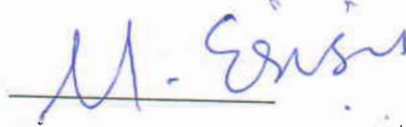
Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

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

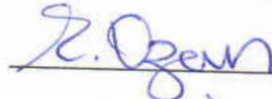
Prof. Dr. Mine ERİŞİR

Danışman

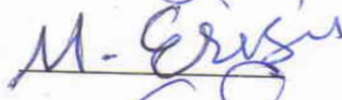


Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN



Prof. Dr. Mine ERİŞİR



Prof. Dr. Fulya BENZER



İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ.....	3
3.1. Amonyak Kaynakları.....	3
3.2. Amino Asitlerin Amino Gruplarının Metabolizması	4
3.3. Amonyak Metabolizması.....	5
3.4. Üre Döngüsü.....	11
3.4.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları.....	12
3.5. Arginin.....	14
3.6. Arginaz Enzimi.....	15
4. GEREÇ VE YÖNTEM	20
4.1. Kimyasal Maddeler	21
4.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
4.3. Metodlar	21
4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi ve Prensibi	22
4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü	27
5. BULGULAR.....	29
5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti	29

5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti	30
5.3. İnkübasyon Süresinin Tespiti	31
5.4. Mangan İyonlarının Etkisi	32
5.5. Tavşan Böbrek Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi.....	32
5.6. Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi	34
5.7. Farklı Türlerin Böbrek Arginaz Aktiviteleri	36
6. TARTIŞMA.....	37
7. KAYNAKLAR.....	42
8. ÖZGEÇMİŞ	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 :	Farklı Türlerin Böbrek Arginaz Aktiviteleri	36
------------------	---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Amonyak Metabolizması.....	6
Şekil 2: Proteinden Üre Oluşumu	10
Şekil 3: Üre Döngüsü	11
Şekil 4: Üre Döngüsü	14
Şekil 5: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.....	29
Şekil 6: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.....	30
Şekil 7: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi	31
Şekil 8: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.	32
Şekil 9: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Bağlı Olarak Değişimi.	33
Şekil 10: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi	34
Şekil 11: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi	35

1. ÖZET

Bu çalışmada tavşan böbrek dokusundaki arginazın ölçülmesi için böbrek dokusundaki arginazın optimize edilmesi hedeflenmiştir. Böbrek doku arginazının optimum pH'sının, preinkübasyon ısısının, inkübasyon ve preinkübasyon zamanının, Mn^{++} ve L-arginin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Şartlar optimize edildikten sonra farklı türlerin böbrek arginaz düzeyleri belirlenmiştir.

Tavşan böbrek doku arginazı için preinkübasyon ısısı 53°C, preinkübasyon zamanı 15 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika, en uygun tampon $NaHCO_3$ -NaOH tamponu ve optimum pH 10,1 şeklinde tesbit edilmiştir. Enzimin aktivitesi, 1 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek değere ulaşmıştır. Enzimin aktive olması için Mn^{+2} iyonlarının ve 53 °C' de preinkübasyonun uygun olduğu kabul edilmiştir. Tavşan böbrek doku arginazının L-arginine karşı olan K_m 'i 12,5 mM şeklinde bulunmuştur.

Tavşan, inek, koyun, keçi, rat, tavuk ve bildircından alınan örneklerde arginaz enziminin miktarları tespit edilmiştir. Koyun, keçi, sığır, tavşan, tavuk, bildircın ve rat böbrek arginaz aktiviteleri sırasıyla $4,17 \pm 1,19$, $13,51 \pm 1,97$, $1,22 \pm 0,25$, $20,84 \pm 3,38$, $20,86 \pm 4,53$, $59,68 \pm 13,03$ ve $16,28 \pm 2,04$ ünite olarak bulunmuştur. Çalışılan dokular içinde en yüksek aktivite bildircın böbrek dokusunda en düşük aktivite sığır böbrek dokusunda saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tavşan, Böbrek, Arginaz, Optimizasyon

2. ABSTRACT

DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR ARGINASE ACTIVITY IN KIDNEY OF RABBIT

In this study, for measuring of arginase in rabbit kidney was aimed to optimize of arginase in kidney tissue. Optimum pH, preincubation temperature, preincubation time, incubation time, Mn^{++} concentration and L-arginine concentration of arginase in kidney tissue was determined. Arginase levels were measured in kidney tissues of different species after conditions were optimized.

Its was found to be preincubation temperature 53 °C, preincubation period 15 minutes, incubation period 10 minutes and optimum pH 10,1 in $NaHCO_3$ -NaOH buffer for arginase in rabbit kidney tissue. Enzyme achieved its highest activity at 1 mM $MnCl_2$ concentration. Consequently, it was determined that Mn^{+2} ions and preincubation at 53 °C were essential for the activation of the enzyme. K_m of arginase in rabbit kidney tissue for L-arginine were measured to be 12,5 mM.

Levels of the arginase enzyme in kidney of the sheep, goat, cattle, rabbit, chicken, quail and rat were determined and found as $4,17 \pm 1,19$; $13,51 \pm 1,97$; $1,22 \pm 0,25$; $20,84 \pm 3,38$; $20,86 \pm 4,53$; $59,68 \pm 13,03$; $16,28 \pm 2,04$ unites, respectively. Among the studied species, the highest arginase activity was found in kidney of the quails, the lowest arginase activity was found in kidneys of the cattles.

Key Words: Rabbit, Liver, Arginase, Optimization

3. GİRİŞ

3.1. 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 glutamat dehidrogenaz reaksiyonlarıyla amino asitlerden amonyak üretir.

2- Glutamin: Böbrekler renal glutaminaz ile glutaminden amonyak meydana getirir. Üretilen bu amonyağın büyük oranı idrarla NH_4^+ olarak atılır. Bu durum vücudun asit-baz dengesinin sürdürülmesi için önemlidir. Amonyak glutaminin intestinal glutaminaz tarafından hidrolizi ile de elde edilir. Mukoza hücreleri glutamini kan ve diyet proteinlerinin sindirimi ile elde ederler.

3- Bağırsaklardaki bakterilerin etkisi: Amonyak, bağırsak lumenindeki ürenin bakteriler tarafından parçalanması ile oluşur. Portal vene geçen amonyağın tamamına yakını daha sonra karaciğerde tekrar üreye çevrilir.

4- Aminler: Besinler ile birlikte alınan 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 parçalanmasında, halkalarda bulunan amino grupları amonyak olarak ortaya çıkar (1).

Omurgalılar besinlerle aldıkları amino asitlerin büyük bir kısmını protein halinde almaktadır. Metabolik yollara ancak peptit ve proteinlerin parçalanması ile serbest kalan amino asitler girmektedir. Bunun için de besinlerle alınan

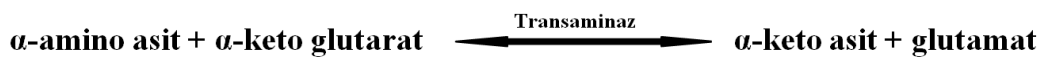
proteinlerin gastrointestinal kanalda proteolitik enzimler tarafından hidrolize edilerek parçalanması ve serbest amino asitlere ayrılması gereklidir (2).

Canlı organizmanın sindirim kanalından emilen amino asitlerin bir kısmı plazma ve doku proteinlerinin, bazı enzimlerin, protein yapılı hormonların, pürin ile pirimidinlerin sentezinde ve enerji üretiminde kullanılırken bir kısmı daha fazla parçalanarak organik asitleri, amonyak ve karbondioksiti meydana getirir.

Amino asitlerin parçalanması amino gruplarının uzaklaştırılması ile başlar. Amino asitlerin amino grupları transaminasyon reaksiyonları ile α -ketoglutarik asite transfer edilerek L-glutamik asiti meydana getirirler. Şekil 1’de görüldüğü gibi, L-glutamik asit ise hücrelerin sitoplazmalarından mitokondrionlarına girerek NAD gerektiren glutamat dehidrogenaz ile tekrar amonyağa dönüşür (3).

3.2. Amino Asitlerin Amino Gruplarının Metabolizması

Transaminasyon: Bir amino asidin alfa-amino grubunun, bir alfa keto aside taşınma reaksiyonuna transaminasyon denir. Reaksiyonun sonunda serbest NH_3 şekillenmez. Transaminazlar veya Aminotransferazlar reaksiyonun katalizör enzimlerdir. Koenzim olarak Piridoksal fosfatı (PLP) kullanırlar. Amino grupların alıcısı şeklinde görev yapan α -keto asit çoğu zaman, α -keto glutarattır. Böylece oluşan glutamat, oksidatif olarak deamine olur ve amonyum iyonu oluşur veya amino asit sentezi için NH_2 grubunu verir. Glutamat amino asit sentezinin en büyük amino vericisidir. Çünkü hızlı şekilde oksidatif deaminasyona uğrayan tek amino asittir (4).



Oksidatif Deaminasyon: Esas olarak karaciğer ve böbrekte olmak üzere sadece mitokondrilerde meydana gelir. Transaminasyon aracılığı ile glutamata taşınmış amino grupları, glutamat dehidrogenaz enziminin katalizi ile oksidatif deaminasyona uğrar. Böylece, amino asitlerin amino grupları amonyak halinde açığa çıkar (4).



Koenzim: NAD^+ veya NADP^+ ‘dir.

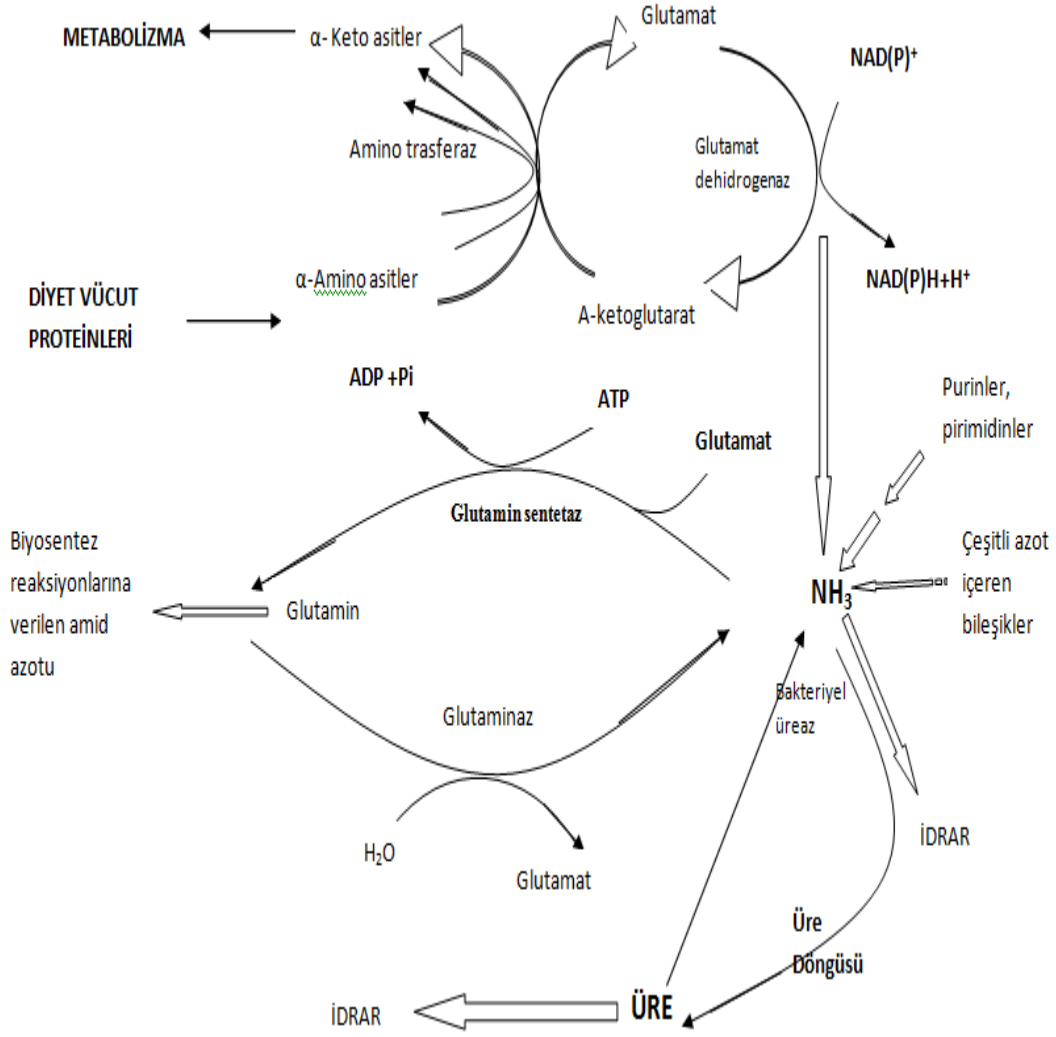
Non oksidatif Deaminasyon: Serin ve Treonin gibi hidroksilli amino asitler için geçerlidir. Serbest amonyak (NH_3) oluşur. Etkili enzimler serin dehidrataz ve treonin dehidrataz enzimleridir. Koenzim olarak PLP (B 6 vitamini) kullanılır (4).

3.3. Amonyak Metabolizması

Amino asit yıkımının ilk aşaması α - amino gruplarının uzaklaştırılmasıdır. Bu azot uzaklaştırıldıktan sonra ya diğer bileşiklerin yapısına girer ya da vücuttan atılır. Uzaklaştırma işleminde ilk olarak α - amino grupları, α -ketoglutarat'a aktarılır ve glutamat şekillenir. α -ketoglutaratın amino asit metabolizmasındaki tek rolü, glutamat şekline geçerek diğer amino asitlerden amino gruplarını toplamaktır. Bu olay transaminasyon reaksiyonları ile gerçekleştirilir (3).

Oksidatif deaminasyon reaksiyonları sonucu ise, amino grubu serbest kalan amonyak (NH_3) şeklinde açığa çıkar. Deaminasyon reaksiyonları karaciğer, böbrek, barsak mukaza hücrelerinde gerçekleşir. Sonuçta, enerji metabolizmasının ana yollarına giren, α - keto asitler ve üre sentezinde azot kaynağı olan amonyak oluşur. Aslında tüm dokular amonyak oluşturur.

AMP'nin inozin mono fosfata deamine olması amonyak veren bir başka reaksiyondur. Bu reaksiyon özellikle kaslarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan adenilat deaminaz tarafından katalize edilir. Kaslarda yüksek miktarda IMP bulunması, bu reaksiyondan kaynaklanır. Yine barsak kanalında mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu amonyak oluşur. Oluşan amonyak emilerek kana geçer. Emilimden sonra en yüksek serbest amonyak miktarı (%0,1mg) vena porta kanında görülür. Bu nedenle pratikte “perifer kanda amonyak bulunmaz” denir, oysa perifer kanda %0,03 mg'dan az amonyak vardır.



Şekil 1: Amonyak Metabolizması (3)

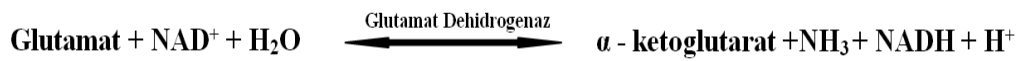
Amonyak, başta karaciğer ve böbrek olmak üzere bütün dokularda oluşur. Bağırsak bakterileri gerek amino asitlerden, gerekse dolaşımdan difüzyonla bağırsağa geçen üreden amonyak ve bikarbonat oluşturur. Bu amonyak portal dolaşımla karaciğere gittiğinden diğer dokular etkilenmez. Ekstrahepatik dokularda oluşan amonyak kan yolu ile karaciğere taşınır ve üre sentezine girer.

Amonyak vücutta daha çok amonyum iyonu (NH_4^+) halinde bulunur. Kaynağı ne olursa olsun amonyum iyonları (amonyak şeklinde) insan ve memiler için (özellikle sentral sinir sistemi) çok zehirlidir. Çünkü amonyak karaciğer mitokondrilerinde, α -ketoglutarat ile birleşerek glutamat oluşturur. Bu reaksiyonda α -ketoglutarat kaybı vardır ve bu kayıp hücre solunumunu inhibe eder. Sonuçta bol miktarda keton cisimleri ve asetil-CoA oluşur. Bu nedenle hemen zehirsizleştirilip atılması gerekir.

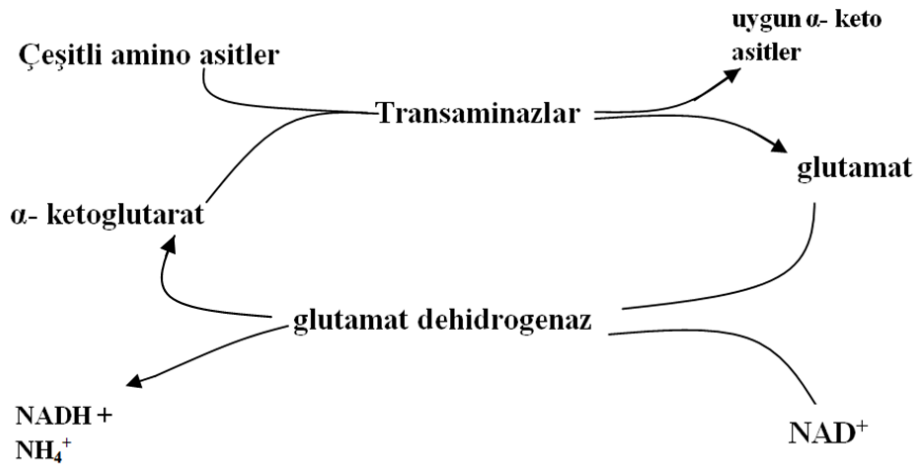
Amonyak esansiyel bir madde olmasına rağmen insan ve hayvanlarda çok düşük serbest amonyak düzeyleri bile ağır serebral bozukluklara yol açar. Amonyak zehirlenmesinin bulguları arasında ellerde titremeler, konuşmanın zayıflaması, görme bozuklukları ve ağır durumlarda koma ve ölüm sayılabilir. Bu nedenle organizmada amonyak bağlanarak süratle zehirsiz hale getirilmelidir (2).

Amonyak şu yollarla zehirsizleştirilir:

1. α - ketoglutarata taşınarak glutamik asit oluşabilir. Bu Oksidatif deaminasyon reaksiyonunun NAD^+ ve NADP^{++} yı koenzim olarak kullanan nadir enzimlerden olan glutamat dehidrogenaz katalize eder.

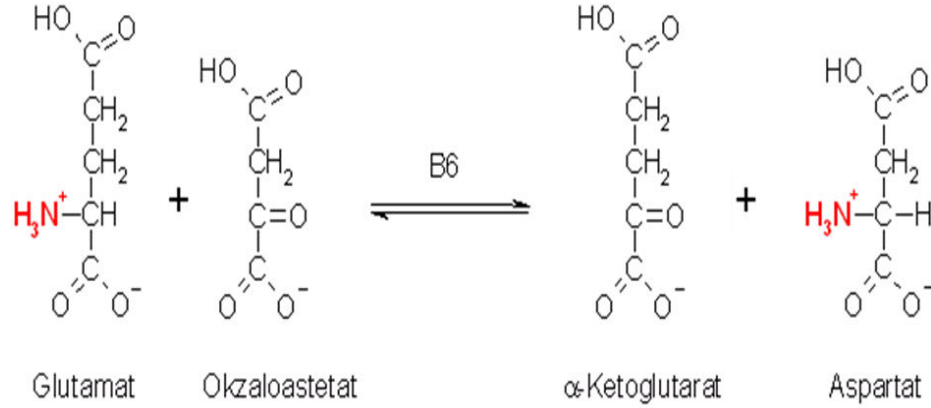


Glutamat dehidrogenaz, bütün dokularda mitokondrilerin içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve hidrojen atomlarını NAD^+ ' ye taşır.



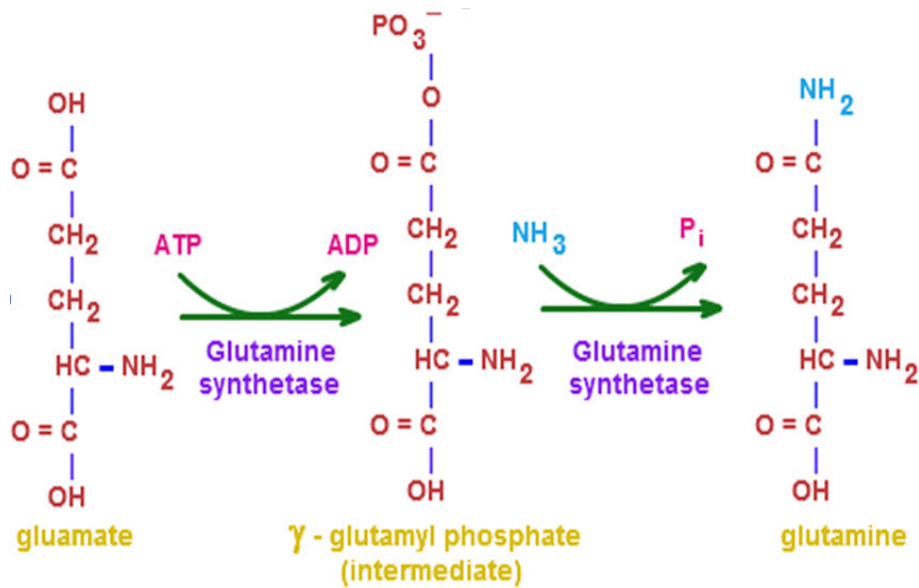
Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi glutamat dehidrogenaz ve çeşitli amino transferazların birlikte çalışması ile bir çok amino asitin amino grupları uzaklaştırılabilir. Amino asitlerin çoğunun amino grubu, α - ketoglutarat ile transaminasyona girerek glutamat biçiminde toplanırlar. Glutamat hızlı şekilde Oksidatif deaminasyona giren tek amino asittir, bu reaksiyon ise glutamat dehidrogenaz enzimi tarafından katalize edilir. Böylece, amino gruplarının glutamata oluşturmak üzere α - ketoglutaratta toplanması ve daha sonra glutamatın Oksidatif deaminasyonu (tekrar α - ketoglutarat oluşur) amino asitlerin amino gruplarının amonyak olarak serbest kalmasına sebep olur. Glutamat

dehidrogenazın allosterik inhibitörleri ATP ve GTP, aktivatörleri ise ADP ve GDP'dir. Böylece hücre içinde enerji düzeyi düşünce, glutamat dehidrogenaz tarafından amino asit yıkımı artar ve elde edilen α -ketoglutarat T.C.A. 'da substrat olarak kullanılır.



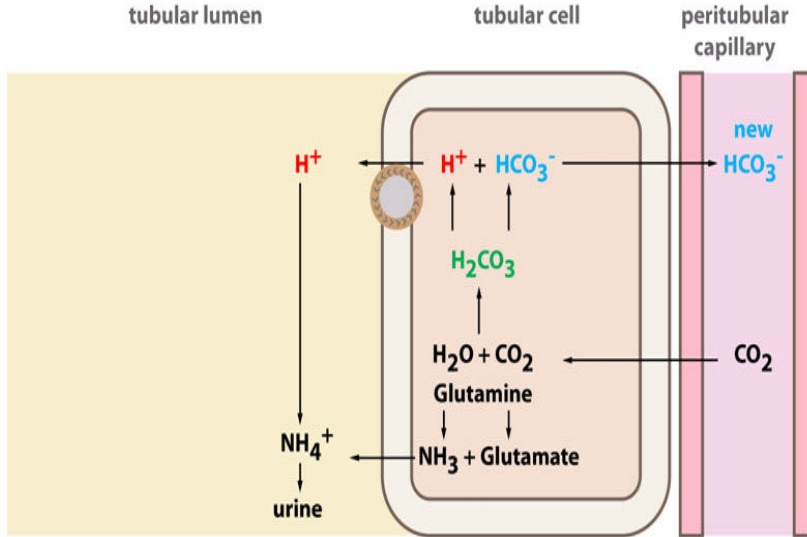
Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi aminotransferaz (AST) diğer adıyla glutamat oksalasetat transferaz (GOT) amino gruplarının glutamattan oksalasetata taşınmasını katalize eder. Bu reaksiyon üredeki azot atomlarından biri amonyum iyonlarından, diğeri ise aspartik asitten elde edildiği için çok önemlidir. Meydana gelen aspartat azot kaynağı olarak üre döngüsüne katılır.

- Glutamik asitin δ -COOH grubuna taşınarak, amonyağın amid bağı ile bağlı olduğu glutamin oluşabilir.** Bu reaksiyon ATP gerektirir ve glutamin sentetaz tarafından katalize edilir. Glutamin sentetaz enzimi, beyinde bol miktarda bulunur. Beyin amonyum iyonlarını glutamine çevirerek zehirsizleştirir.



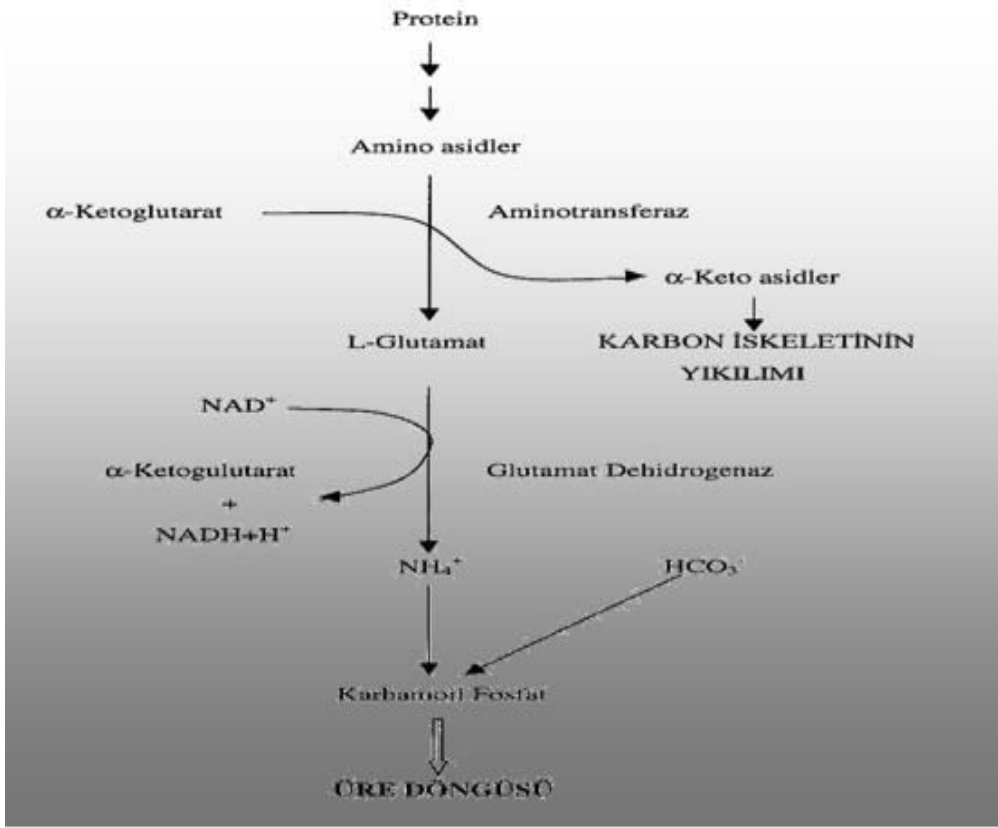
Dolaşımdaki glutaminin büyük bir bölümü, özellikle böbreklerde bulunan glutaminaz

enzimiyle glutamat veya amonyum iyonlarına hidrolize olur. İdrarda amonyum tuzlarının büyük bir kısmı bu reaksiyonla oluşur. Böbrekte amonyak glutaminden glutaminaz kataliziyle oluşur. Amonyum tuzları şeklinde atılır (5).



Böbrekte Amonyanın Tubuler Lumene Geçışı

3. Doğrudan karaciğerde üre biyosentezinde kullanılabilir. Üre amino asitlerden elde edilen amino gruplarını vücuttan uzaklaştırmanın temel şeklidir (Şekil 2). İdrardaki azotun %90'ını oluşturur. Ürenin taşıdığı azotlardan biri serbest NH₃'tan (amonyak, azotunu glutamat dehidrogenazın katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonundan elde eder) diğeri de aspartat'tan (aspartat ise azotunu aspartat aminotransferaz'ın katalizlediği oksalasetatın transaminasyon reaksiyonundan elde eder) gelir. Glutamat, amonyak ve aspartat azotunun prekürsörüdür. Ürenin, karbon ve oksijeni CO₂'ten temin edilir. Üre karaciğerde şekillenir, daha sonra kan yoluyla böbreklere taşınarak idrar ile uzaklaştırılır (3).



Şekil 2: Proteinden Üre Oluşumu (6)

Amino asitler vücut tarafından okside edilerek üre ve karbon dioksit oluşur. Oksidasyon yolu amino gurubunun transferaz ile uzaklaştırılması ile başlar. İlk basamak proteinden amino asit parçalamasında alfa amino-nitrojenin uzaklaştırılmasıdır. Alfa amino-nitrojeninin uzaklaştırılması amonyak ile sonuçlanır. Amonyak toksik olduğundan memelilerde üreye, kuşlarda ürik aside çevrilip, balıklarda ise hemen amonyak olarak atılır (7). Amonyakın atılım biçimi canlının yaşadığı ortamın su seviyesine bağlı olarak farklı olabilir. Azot metabolizması son ürününe göre canlılar üç gruba ayrılır;

1-Amonotelik Grup: Deniz memelileri hariç suda yaşayan bütün canlılar amonyağı bir değişikliğe uğratmadan amonyak şeklinde dışarı atarlar.

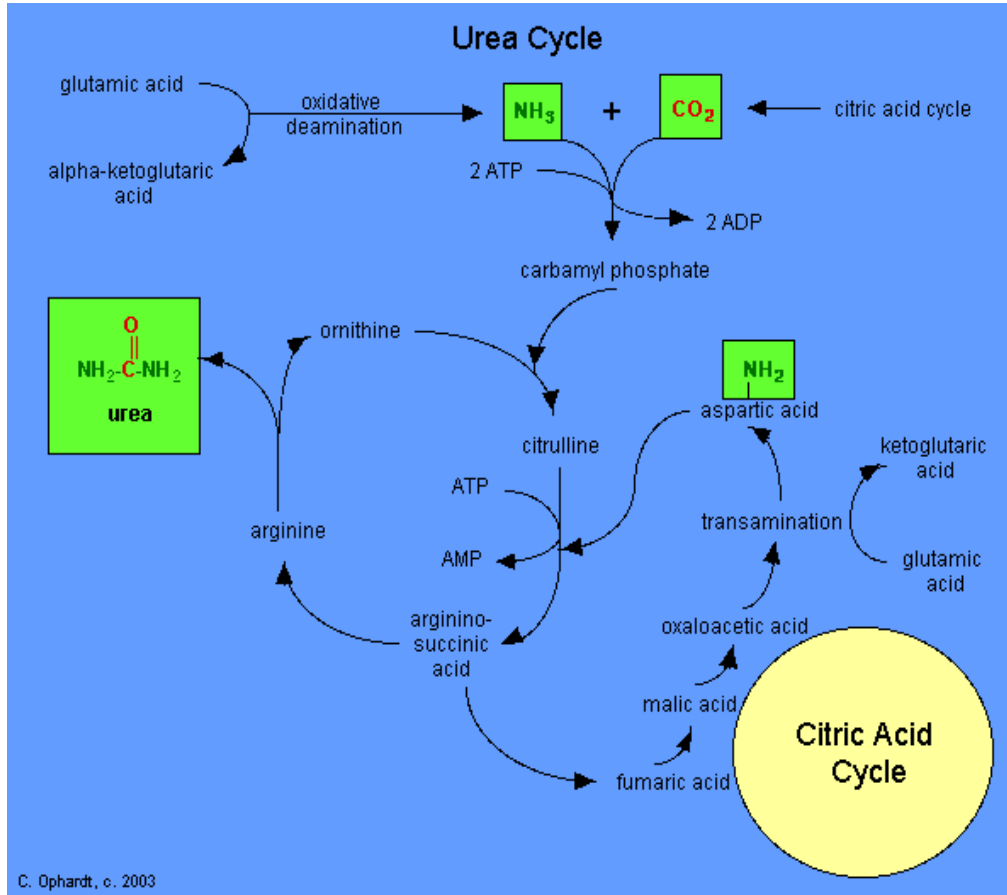
2-Üreotelik Grup: Suda yaşayan memeliler ve bazı omurgalılar bu sınıfa girerler. Üreotelik canlılarda üre bir döngü sonunda argininin arginaz ile hidrolizinden meydana gelir. Arginin protein sentezi için gerekli bir amino asit olup tüm hücrelerde bulunmaktadır. Üre döngüsü her hücrede bulunmaz ancak bir çok hücre arginaz enzimine sahiptir. Karaciğer arginazı ve üre döngüsünün diğer enzimlerini kapsadığından üre sentezi büyük oranda bu organda oluşur.

3-Ürikotelik Grup: Bütün kanatlılar ve suyun çok az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler amonyağı pürin biyosentezi ile ürik asite çevirmektedir. Ürik asit üreye göre suda daha az çözünmektedir (8,9,10).

3.4. Üre Döngüsü

Kandaki amonyum iyonları karaciğerde üreye dönüştürülerek zehirsizleştirilir. Amonyağın kesin zehirsizleştirilmesi için üreye dönüştürülmesi gerekir. Ürenin elektrik yükü yoktur, toksik değildir ve biyolojik membranlardan kolayca geçerek böbrekler yolu ile vücuttan uzaklaştırılabilir. Ürenin sentral sinir sistemi için toksisitesi oldukça düşüktür.

Memeli hayvanlarda protein azotunun başlıca atılma ürünü üredir. Protein azotunu vücuttan üre olarak atan üretelik organizmalar karaciğerlerinde fazla miktarda arjinaz enzimi taşırlar. Arjinaz, arjininden üreyi ayıran bir enzimdir. Üre biyosentezinin mekanizması 1932 yılında Krebs ve Henseleit tarafından aydınlatılan, bir seri reaksiyonları içerdiğinden **üre döngüsü veya Krebs-Henseleit döngüsü** adı verilmiştir.



Şekil 3: Üre Döngüsü (11)

Amino asitlerden elde edilen amino gruplarının esas atılım şekli üredir. İdrardaki azot içeren bileşiklerinin % 90' ını oluşturur. Üre molekülünün içerdiği azotlardan birisi serbest NH_3 ' den, diğeri de aspartatdan elde edilir. Glutamat hem amonyak hem aspartat azotunun prekürsörüdür. Amonyak azotunu glutamat dehidrogenazın katalizlediği oksidatif deaminasyon reaksiyonundan, aspartat azotunu da aspartat aminotransferazın katalizlediği okzaloasetatın transaminasyonu reaksiyonundan elde eder. Üredeki karbon ve oksijen karbondioksitten elde edilir. Aspartik asit ise sitrik asit döngüsünde fumarattan oluşur (Şekil 3). Üre karaciğerde oluşurak, daha sonra kanla böbreklere taşınıp idrarla atılır (12).

3.4.1. Üre Döngüsünün Reaksiyonları

Sentez reaksiyonları beş aşamada incelenir. Üre sentezindeki başlangıçtaki iki reaksiyon mitokondride gerçekleşir. Döngüde görevli diğer enzimler sitozoldedir (Şekil 4).

Üre sentezi mitokondrionda 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 mitokondrionlarında bulunan karbonik anhidrazın bir izoenzimi aracılığı ile bikarbonata çevrilir ve üre sentezi için hazırlanır.

1. Karbamoil fosfat oluşumu: Bu aşamada bikarbonat ve amonyum iyonlarından, 2 ATP harcanarak yüksek enerjili bir bileşik olan karbamoil fosfat sentezlenir. ATP kullanıldığı için irreversible olan bu reaksiyon sayesinde çok zehirli olan amonyum iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılması garanti altına alınmış olur.

Karbamoil fosfat sentetaz 1 mitokondri matriksinde ve aktivite gösterebilmek için N-asetil glutamatı kofaktör olarak kullanılır. Karbamoil fosfat sadece üre sentezinde önemli bir bileşik değildir. Pirimidin sentezi sırasında da karbamoil fosfat oluşur. Ancak bu reaksiyonda görevli enzim Karbamoil fosfat sentetaz II' dir. Bu enzim aktivitesi için N-asetil glutamat gerekmez, reaksiyon ise sitozolde gerçekleşir. N-asetil glutamat, karbamoil fosfat sentetaz I' in esas aktivatörüdür. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon ise üre döngüsü reaksiyonlarının hızını kısıtlayan aşamadır.

2. Sitrullin oluşumu: Karbamoil fosfat, mitokondri içinde aktivitesi için Mg^{+2}

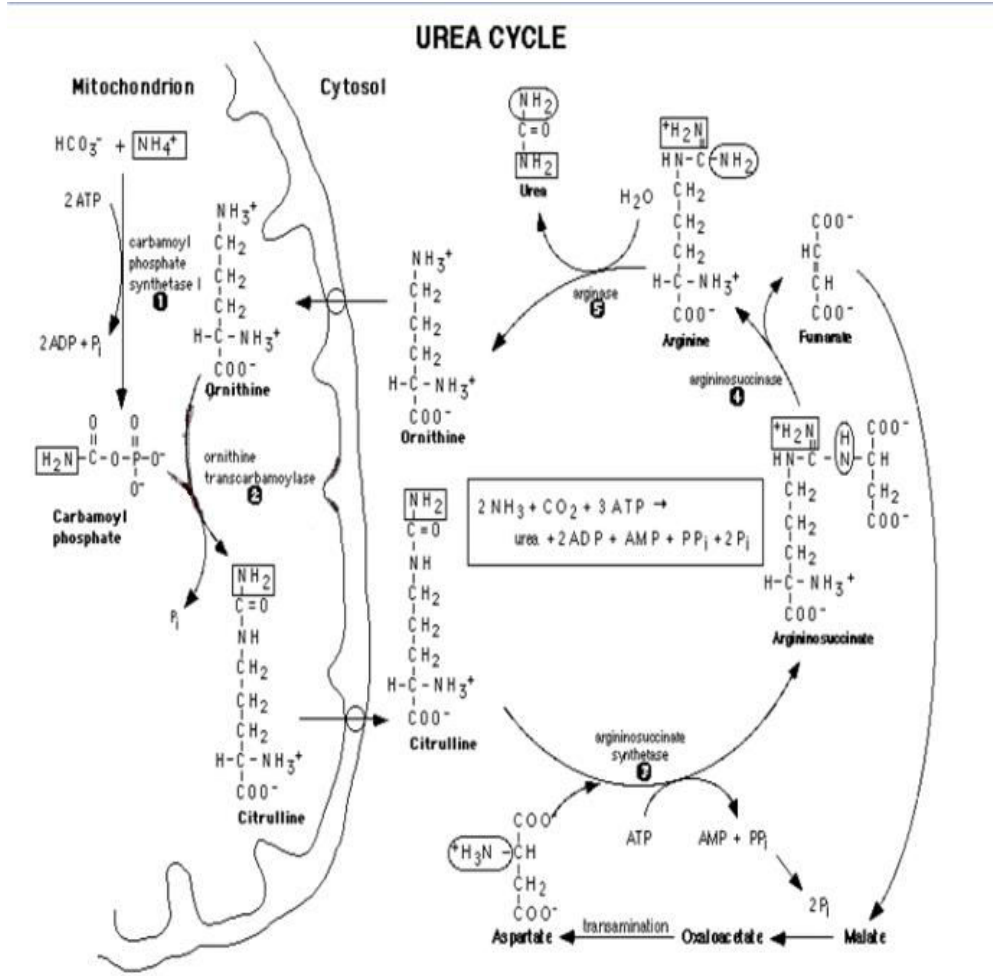
gerektiren mitokondrial ornitin transkarbamilaz enzimi yardımı ile ornitin ile reaksiyona girerek sitrullin oluşturur ve inorganik fosfat (P_i) açığa çıkar. Ornitin ve sitrullin üre döngüsüne katılan esas amino asitlerdir. Bu amino asitler genetik kodona sahip olmadıklarından hücre proteinlerine katılmazlar. Ornitin üre döngüsü reaksiyonlarında her seferinde tekrar rejenere olur. Reaksiyonda oluşan sitrullin daha sonra sitozole geçer.

3-Arjininosüksinat oluşumu: Sitrullin, stoplazmada bulunan Mg^{+2} gerektiren arjinino süksinat sentaz enzimi yardımı ile aspartat ile birleşerek arjininosüksinat oluşur. Reaksiyonda aspartatın amino grubu, üre molekülün ikinci azotunu sağlar.

4-Arjininosüksinatın parçalanması: Arjininosüksinat hidrolitik bir reaksiyonla arjinin ve fumarata parçalanır. Reaksiyonu katalize eden enzim arjininosüksinaz (arjininosüksinat liyaz)'dır. Sitoplazmada oluşan fumarat ya yine sitoplazmada bulunan enzim ile malata dönüşür (T.C.A. döngüsüne katılır.) ya da sitozolik malat oksalasetata okside olarak aspartat veya glukozaya dönüşür.

5-Arjinin'in ornitin ve üreye parçalanması: Son aşamada arjinin, hidrolitik bir enzim olan arjinaz ile ornitin ve üreye parçalanır. Oluşan ornitin ikinci üre döngüsünü başlatmak üzere başka bir karbomoil fosfat molekülü ile birleşmeye hazırdır. Bu 5 aşama ardarda devam ettiği zaman bir döngü oluşur. Döngü sırasında amonyum iyonlarından ve CO_2 'ten üre oluşurken diğer tüm ara bileşikler, döngünün ikinci dönüşünde yer almak üzere tekrar sentezlenirler (2,1).

Ornitin bağlı karbomoil grubu (sitrüllin) üzerine 1 mol amino grubu daha taşınması gerekir. Ancak bu olayın bir transaminasyonla gerçekleştirilmesi mümkün olmadığından aspartat döngüsüne bağlanır. Bu reaksiyonda sitrüllinin karbomoil grubu ve aspartik asitin amino grubu arasındaki bağ oluşarak argininosüksinik asit meydana gelir. Reaksiyon argininosüksinik sentetaz tarafından 1 mol ATP harcaması ile gerçekleşir. Argininosüksinik asit ise arginino süksinaz tarafından arginin ve fumarik asite parçalanır. Sonuç olarak bu iki reaksiyonla aspartik asitin amino grubunun sitrüllin üzerine taşındığı ve arginin sentezlendiği söylenebilir. Sentezin son basamağında oluşan arginin, arginaz enzimi tarafından ornitin ve üreye parçalanarak döngü tamamlanır. Sitozolde oluşan ornitin sitrüllin'in mitokondriondan çıkışıyla dengeli olarak enerji kullanılarak mitokondrionlara geri döner ve tekrar kullanıma hazır hale gelir (2,1).



Şekil 4: Üre Döngüsü (13)

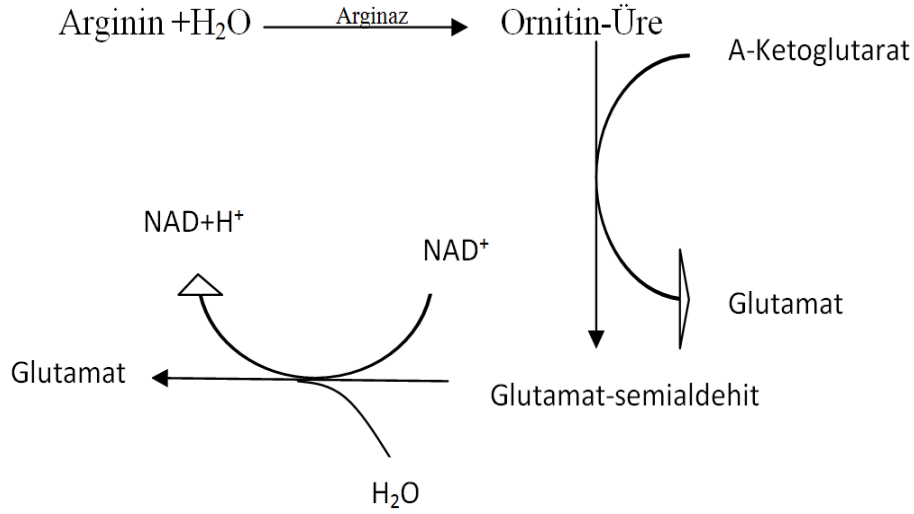
Ürenin atılımı: Üre, karaciğerden kan yolu ile böbreklere taşınır ve süzülerek idrarla atılır. Karaciğerde sentezlenen ürenin bir bölümü kandan bağırsaklara diffuze olur ve bakteriyel üreaz ile CO_2 ve NH_3 'a parçalanır. Amonyakın bir bölümü dışkı ile atılır, bir kısmı da kana geri emilir. Böbrek yetmezliğinde plazma üre seviyeleri artar, aynı zamanda bağırsaklara üre girişi de artar. Üreazın etkisi ile artan amonyak miktarı bu hastalarda klinik bir sorun oluşturur ve hiperamonyeminin temel sebebidir (2).

3.5. Arginin

Arginin karaciğerde glutamattan sentezlenen ornitin üzerinden oluşur. Glutamattan oluşan ornitin, üre döngüsü enzimleri ile arginine dönüşür. Böbrekte arginin sitrülinden sentez edilir. Bağırsağın mukoza hücrelerinde sentezlenen sitrülin böbreğe taşınarak arginin sentezine katılır.

Arginin metabolizması:

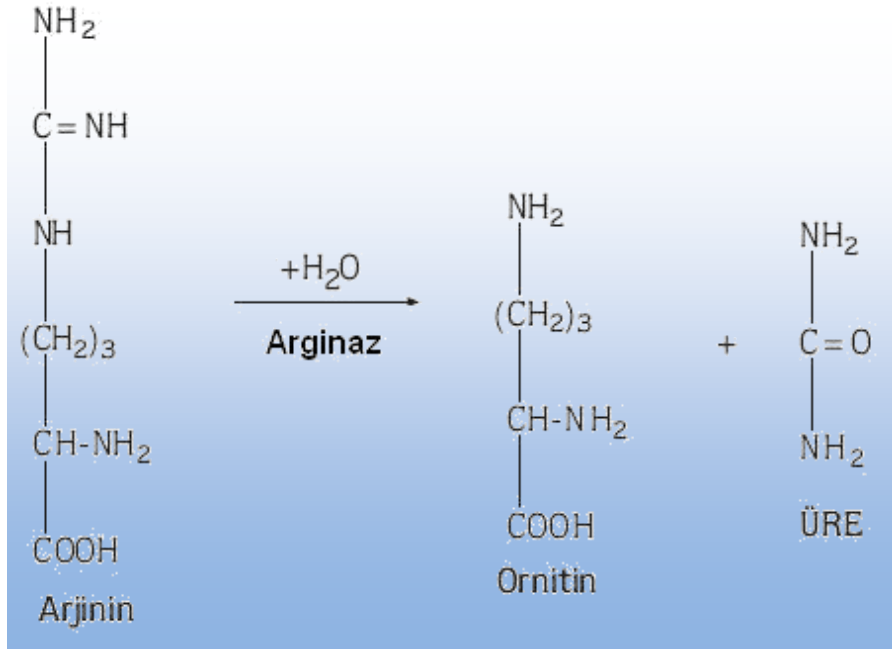
1. Arginin-glisin transaminidaz enzimi aracılığı ile böbrekte **kreatin** sentezine katılır.
2. Glutamat -Y-semialdehit üzerinden **glutamata** ve **proline** dönüşür.



3. Beyinde antihipertansif olan **agmatin** arginin türevidir.
4. Bir çok hücre tarafından nitrik oksit (NO) oluşturmak üzere kullanılır. Nitrik oksit (NO): vazodilatatör etkili nitrik oksit yarılanma ömrü çok kısa (2-3 saniye) olan önemli bir habercidir. Arginin bir monooksijenaz olan nitrik oksit sentaz (NOS) ile **sitrülin** ve **NO**'ya katabolize olur (5).
5. Arginin **üre** oluşumunu sağlayan ve bu arada **ornitin** veren bir amino asittir. Üre döngüsünde meydana gelen ornitinin tamamı döngü reaksiyonlarına yeniden katılır. Ayrıca proline de çevrilebilir ve kreatin sentezine de katılır.
6. Arginin ornitin üzerinden **poliaminlere** dönüşebilir (3).

3.6. Arginaz Enzimi

Arginaz mangan içeren bir enzim olup, **arginin+ H₂ O $\rightarrow$ ornitin + üre** reaksiyonunu katalize eden üre döngüsünün son enzimidir. Aynı zamanda üreohidrolaz enzim ailesindendir. Arginaz üre döngüsünün beşinci ve son basamağını katalize eder. Memelilerin çoğunda iki izoformu vardır; arginaz I ve arginaz II. (14), Arginaz I (karaciğer tipi) üre döngüsünde görevli olup en çok karaciğer hücrelerinde stoplazmada lokalize olmuştur. Arginaz II (mitokondrial tip) hücredeki arginin/ornitin konsantrasyonu ile ilişkilidir (15). Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; E.C. 3.5.3.1) aşağıdaki reaksiyon vasıtasıyla L-arginini üre ve ornitine hidrolize eder. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından tespit edilen Arginaz üre döngüsünün son enzimidir (16).



Argininin Arginaz Enzimi Vasıtası ile Ornitin ve Üreye dönüşümü

Arginaz enzimi bakımından en zengin organ karaciğerdir (17). Ancak böbrek, beyin, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi üre döngüsünün şekillenmediği ekstrahepatik dokularda arginaz enzimi saptanmıştır (18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29).

Üre döngüsünün olmadığı dokularda, arginazın görevi prolin, glutamat ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitini sağlamak olduğu bilinmektedir (30). Arginaz enzimi, poliamin biyosentezi reaksiyonunda ilk enzimdir. Oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin ise daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Putressin, spermin ve spermidin (poliamin olarak adlandırılırlar) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (31,32).

Arginaz enzimi yalnızca üreotelik canlılarda bulunmaz. Bazı ürikotelik, amonotelik canlılarda ve bitkilerde de varlığı saptanmıştır (33,19).

Arginaz enziminin izoenzimlerini belirlemek için çeşitli yöntemler

kullanılmış, yapılan çalışmalar neticesinde enzimin 5 izoenzime sahip olduğu tespit edilmiş ve bu izoenzimlerin hücrede lokalizasyonlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir. İnsan dokularında da arginazın 5 izoenzimi (A1, A2, A3, A4, A5) saptanmıştır (34). Bu enzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir (35,36, 37,38,26,34) ;

Karaciğer (A1,A2,A3,A5)

Böbrek, bağırsak, beyin (A1,A4)

Eritrosit(A2,A4)

Meme bezi (A1,A2)

Tükürük ve parotis bezi (A1)

Submaksillar tükürük bezi(A3)

Fibroblast (A1, A2, A3)

Plesenta villisi (A1,A2)

5 izoenzimin hepsi bazik protein yapılıdır ve izoelektrik noktaları 7.1- 9.3 arasında değişkenlik göstermektedir (34). Bu izoenzimlerin hücre içi lokalizasyonlarında da farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. L-argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalizinde görevli arginaz iki izoforma sahiptir. Arginaz I sitoplazmada yerleşmiş durumdayken, arginaz II mitokondrionda bulunmaktadır (23). Böbrek için ana form olan A1 formu sitoplazmada yerleşirken, prolin sentezinde görevli olduğu düşünülen A4 formu mitokondrilerde lokalize olmuştur(39,40). Gebelik döneminde insan plesentasındaki arginazın izoformlarının yerleşim yerleri incelendiğinde A1 formunun yalnızca sitotrofoblastlarda, A2 formunun ise hem sitotrofoblastlarda hem de sinsitotrofoblastlarda lokalize olduğu görülmüştür (37).

İnsan dokularından izole edilen bu izoenzimler 120.000 ± 5000 dalton molekül ağırlığında olup (34), molekül ağırlıkları 39.200 ± 400 dalton olan üç subünitenin bir araya gelerek oluşturdukları trimerik yapılı enzim olduğu anlaşılmıştır (41,42). Değişik memelilerin böbreklerinde yapılan çalışmalarda, arginazın moleküler ağırlıkları 38.500-39.700 dalton olan subünitelerin bir araya gelmesi ile moleküler ağırlığı 110.000-150.000 dalton olan tetramerik bir molekül olduğu bildirilmiştir (41,43,44,45).

Arginaz enziminin en az iki formu AI ve AII farklı gen lokusları tarafından kodlanır. AI enzimi karaciğer ve eritrositlerdeki arginaz aktivitesinin

%98' ni oluştururken, böbrek, gastrointestinal kanal ve beyindeki arginaz aktivitesinin %50' sini oluşturur. AII enzimi ise böbrek, gastrointestinal kanal ve beyindeki arginaz aktivitesinin diğer %50' sini oluşturur (46).

Hiperarjiniemili, karaciğer arginaz aktivitesi yetersiz olanlarda eritrosit enzimi yetersizliği de vardır. Bu durum karaciğer ve eritrositlerin aynı gen lokusu tarafından kodlandığına işaret eder (47) .

Arginaz enzim seviyesi beslenme ile ilişkili değişkenlik gösterebilmektedir. Arginaz enziminin diyetle alınan proteine bağlı olarak değişiklik gösterdiği ve bu değişikliğin enzim kinetiği ile ilgili olmayıp enzim protein miktarının artması şeklinde olduğu ifade edilmektedir (48). Yapılan araştırmalarda düşük proteinli diyetlerde üre döngüsü enzimlerinin azaldığı (49), diyetle daha fazla protein eklendiğinde üre döngüsü enzim aktivitesinin düşük proteinli diyetle beslenenlere göre arttığı bildirilmiştir (50). Karbonhidratça zengin yiyeceklerle beslenilmesi durumunda üre döngüsü enzimlerinin azaldığı, karbonhidrat tüketimi az olması durumunda ise aynı enzimlerin arttığı görülmüştür (48).

Arginaz enzimi hormonal durum göre de değişiklik gösterir. Kortizolün karaciğer amino asit alımını artırarak amino asit aktive edici enzimlerin düzeylerinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Kortikosteronun (28), testosteronun (24), tiroksin ve hidrokortizonun ince bağırsak ve böbrek arginaz aktivitesini artırdığı (26), insülin ve deksametazonun ise üre döngüsü enzimlerini etkilediği gözlemlenmiştir (51). Gebe koyunların tükürüğünde arginaz aktivitesinin arttığı bununda hormonal değişimlere bağlı olduğu bildirilmiştir (52).

Arginaz enziminin vitaminlerle etkileşimi literatürlerden tespit edilebilmektedir. Yüksek dozda glukokortikoid verilmiş ratlarda artmış arginaz düzeyini E vitaminini düşürdüğü bildirilmiştir (53). E vitamininin testosteron uygulanmış tavşanların böbreklerindeki arginaz aktivitesindeki artışı azalttığı saptanmıştır (54).

Bir metaloenzim olan arginazın tam katalitik aktivite gösterebilmesi ve kuaterner yapısının oluşması için her bir subünitenin bir mol Mn^{+2} içermesi gerekir (55,56). Arginaz aktivitesinin % 90-95' i Mn^{+2} iyonlarına bağlıdır (27).

Mn^{+2} iyonlarının bağlanması ile enzim ısıya daha dayanıklı olmakta ve

inhibitörlere karşı dayanıklılığı artmaktadır (57,58). Ancak enzimin asitle muamelesi sırasında Mn^{+2} iyonlarının enzim için inhibisyona ve denatürasyona karşı koruma sağlamadığı görülmüştür (59).

Tavşan dokularında arginazla ilgili çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tavşanlarda kalp yetersizliğinde arginaz II protein sentezinin arttığı gözlemlenmiştir (60). Rat karaciğerinden izole edilen arginaz tavşanlara enjekte edilip karaciğer arginazına karşı antikorları üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (61). Karaciğer arginazının otoimmün karaciğer hastalıklarının patogenezisinde karaciğerin önemli bir antijeni olabileceği ve hepatositlerin bu antikorlarla öldürülerek direkt sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (61).

Karaciğer arginazının inhibitörleri N-hidroksi-D, L-indospisin ve 4-hidroksi-D, L-fenil alanindir. Bronko-alveolar lavaj ile Tavşanların akciğerlerinden elde edilen makrofajların sahip olduğu arginaz aktivitesinin bu iki kimyasal ile inhibe edilerek L-arjininin NOS (nitrik oksit sentetaz) tarafından kullanımını arttırdığı görülmüştür (62).

Tavşan karaciğer arginazının moleküler ağırlığı 110.000 Da ve her bir subünitenin molekül ağırlığı 36.500 Da olup oligomer yapıdadırlar. İzoelektrik nokta tavşan karaciğer arginazı için 7,2 olarak hesaplanmıştır (63).

Genç dişi tavşanların arjinin gerekliliği üzerine yapılan çalışmada yemdeki farklı arjinin (Diyetin % 0,4-1) seviyelerinin karaciğer arginaz aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı tesbit edilmiştir (64).

Tavşanlarda akut amonyak zehirlenmesinin nitrojen metabolizmasına etkisi ile ilgili bir çalışmada karaciğer ve böbrekteki arginaz aktivitesinin azaldığı görülmüştür (65). Bu hiperammonemi altında ATP seviyesinin düşmesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür (65).

Yangı atherosklerozda önemli bir role sahiptir. Arginaz I'in artmasının tavşanlarda atherosklerotik plaklarda yangı ve makrofaj infiltrasyonunu önemli oranda azalttığı saptanmıştır (47). Arginaz I 'in antiinflamator etkilerinin olduğu son yıllardaki çalışmalarla belirtilmiştir (47).

İdrar kesesi arteri bağlanarak idrar kesesi iskemisi oluşturulan tavşanlardan 1, 4, 8, 24, 48, ve 72. saatlerde idrar kesesi örnekleri alınmış, 48. saatte pik yaparak arginaz aktivitesinin ve putresinin arttığı, 24. saatte ise nitrit/nitrat üretiminin önemli oranda düştüğü saptanmıştır. İskemik sidik

kesesinde arginazın iki bağımsız role sahip olabileceği bildirilmiştir.

- 1- Arginaz/ornitin dekarboksilaz /poliamin yolunun iskemiye takiben kas hasarında aktivasyonudur.
- 2- Nitrik oksit sentaz için L-arginin substratının sınırlanarak nitrik oksit üretiminin endojen negatif regülasyonudur (22).

Hiperglisemi; hipertansiyon, trombosiz, aterosklerozis gibi çeşitli kardiovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir. Hiperglisemi karotit arterde intimal hiperplasiye neden olur. Alloxan ile diabet oluşturulan tavşanların karotid arter endotel hücrelerinde arginaz I ve II nin expressiyonun arttığı dolayısıyla arginaz aktivitesinin arttığı görülmüştür (66).

Hiperlipidemik tavşanlarda endotel hücrelerinde ve intimal kas hücrelerinde arginaz I ve II' nin sentezinin arttığı saptanmıştır (67). Dolayısıyla hücre proliferasyonunun artarak atheromatöz lezyonlara sebep olduğu gözlemlenmiştir. Estradiolün ise arginaz sentezini engelleyerek dolayısıyla hücre proliferasyonu ve atherogenesizi baskı altına aldığı ifade edilmiştir (67).

Tavşan böbrek doku arginaz aktivitesinin ölçümü için optimum şartların belirlenmemiş olması nedeni ile tavşan böbrek dokusunda arginazın optimize edilmesi hedeflenerek, böbrek doku arginazının optimum pH'sının, preinkübasyon ısısının, inkübasyon ve preinkübasyon zamanının, Mn^{+2} ve L-arginin konsantrasyonunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. Şartlar optimize edildikten sonra farklı türlerdeki böbrek arginaz düzeylerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu alışmada Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen 1 yaşında 6 adet New Zeland tavşanı kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan araştırma için etik kurul izni (Protokol No: 2014/107) alınmıştır.

Karbondioksit solutma yöntemi ile kesilen hayvanlardan kesimden hemen sonra alınan tüm böbrek dokuları, üzerindeki doku ve kanlardan temizlendikten sonra %0.9' luk NaCl içinde soğuk zincire uyularak laboratuara getirilmiştir. Getirilen dokular folyo kağıdına sarılarak, daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

4.1. Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan L-arginin, Diasetil monoksim, Tiyosemikarbazid, Sülfürik asit, Mangan klorür gibi kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

4.2. Kullanılan Cihazlar

- 1- Cam-teflon (CAT) homojenizatör
- 2- UV/VİS Spektrofotometre (Shidmadzu UV 240)
- 3- Soğutmalı Santrifüj (Nüve NF 800 R)
- 4- pH metre (pH- Meter CG 810)
- 5- Sıcak su banyosu (Benmari)
- 6- Vorteks
- 7- Deep-freeze (Bosch)

4.3. Metodlar

4.3.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi ve Prensibi

Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil monoksim Üre (TDMU) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür (68). Diasetilmonoksim, üre ile direk reaksiyona girmez. Önce asit ortamda ısıнын etkisiyle diasetil ve hidroksilamine hidroliz olur. Diasetil asit solüsyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan Diazin' i oluşturur. Oluşan sarı rengi kararlı kılmak için Tiyosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (21).

4.3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

1- 90 mM L-Arginin Solüsyonu:

4,73 g L-arginin monohidroklorit (Mol. Ağ. 210.66 g/mol) 250 ml'e distile su ile tamamlanarak, HCl ile pH' sı 10' a getirilmiştir.

2- Üre Standartı:

0,6 mg üre 100 ml'de çözülerek 0,1 μ mol üre/ml'lik üre standartı hazırlanmıştır.

3- Asit Karışımı:

a) 0.120 M $FeCl_3$ / % 56.7 H_3PO_4 , 3.24 g $FeCl_3$ (Mol. Ağ. 270.3 g/mol) bir miktar distile su ile çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml % 85' lik H_3PO_4 ' den ($d = 1.71$, Mol. Ağ. 98.0 g /mol) ilave edilir. Distile suyla 100 ml' ye tamamlanarak oda ısısında saklanır.

b) 999 ml % 20 (v/v) ' lik H_2SO_4 ($d = 1.84$, Mol. Ağ. 98.08 g/mol) üzerine 1,0 ml yukarıda hazırlanan 0.120 M $FeCl_3$ / % 56.7 H_3PO_4 çözeltisinden ilave edilerek oda ısısında saklanır.

4- Renk Ayracı:

Bu karışım 0.0036 M Tiyosemikarbazid (TSC, Mol. Ağ. 91.14 g/mol) ve 0.0617 M Diasetilmonoksim (DAM, Mol. Ağ. 101.1 g/mol) içermektedir. 0.33 g TSC ve 6.24 g DAM bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile litreye tamamlanarak koyu renkli reaktif şişesinde, oda ısısında saklanmıştır.

5- Stok 10 mM MnCl₂ Çözeltisi:

0.99 g MnCl₂. 4H₂O (Mol. Ağ. 197.9 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 500 ml' ye tamamlanarak +4 °C' de saklanmıştır. Çalışmada bu stok çözeltiden sulandırma yapılarak istenilen konsantrasyonda kullanılmıştır.

6- NaHCO₃-Na₂CO₃ Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 9.2-10.2)

a) 5,29 g Na₂CO₃ (Mol. Ağ. 105.99 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 250 ml' ye tamamlanarak hazırlanır.

b) 5,29 g NaHCO₃ (Mol. Ağ. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 250 ml' ye tamamlanır.

Tampon hazırlarken 200 mM' lık NaHCO₃ çözeltisi behere konarak Na₂CO₃ ile pH' sı 9.2-10.2' i arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Solüsyon +4 °C' de saklanır.

7- Glisin-NaOH Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 8.6-10.6)

a) 3,75 g Glisin (Mol. Ağ. 75.07 g/mol) bir miktar distile suda çözünür ve 250 ml' ye tamamlanır.

b) 2 g NaOH (Mol. Ağ. 40 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra 250 ml' ye tamamlanmıştır.

Tampon çözelti hazırlanırken 200 mM'lık Glisin çözeltisi behere konmuş ve 200 mM'lık NaOH çözeltisi ile pH'sı 8.6-10.6 arasında değişen tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

8-NaHCO₃-NaOH Tampon Çözeltisi (200 mM, pH 9.7-10.9)

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

b) 4,20 g NaHCO₃ (Mol. Ağı. 84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 250 ml'ye tamamlanır.

Tampon hazırlarken 200 mM'lık NaHCO₃ çözeltisi behere konarak NaOH ile pH'ı 9.7-10.9 arası değişen tampon çözeltiler hazırlanmış ve solüsyonlar +4 °C' de saklanmıştır.

4.3.1.2. Arginaz Aktivitesinin Ölçümü

Alınan doku örnekleri üzerindeki kan ve pıhtılar uzaklaştırıldıktan sonra iki süzgeç kağıdı arasında kurutularak 0,5 gr tartılmış (ağırlık/hacim) ve distile su ile 5 ml'ye tamamlanmıştır (sulandırma oranı 1/10). Örnekler cam - teflon homojenizatörle homojenize edilmiştir. Homojenat +4 °C' de 13500 rpm' de 14 dakika Nüve marka santrifüjde santrifügasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlemten sonra örneklerin süpernatantları ve peletleri (çöküntü kısmı) birbirinden ayrılmış, süpernatant kısımlarından havuz oluşturularak enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

İşlem

a – Enzim aktivitesi tayininde ağzı vida kapaklı tüpler kullanıldı. Bu amaçla iki deney seti oluşturuldu. Birinci sete numaralanmış deney tüpleri, ikinci sete ise kör (blank), standart ve sıfır zaman tüpleri (zero time blank) konuldu. Birinci düzenekteki tüpler üçlü, ikinci düzenekteki tüpler çift olarak kullanıldı.

b - Deney ve sıfır zaman tüplerine oda ısısına gelmiş 90 mM L-argininden (pH 10) 0.4 ml ve 200 mM karbonat tamponundan (pH 10) 0.4 ml konuldu. Kör tüpüne ise 1.0 ml distile su konuldu. Standart tüpüne 0,6 mg/dl (0,1 μ mol üre/ml) olan çözeltiliden 1 ml konuldu.

c – Homojenizasyon ile elde edilen doku homojenatının, süpernatantı deney aşamasında $MnCl_2$ ile 1/35 oranında sulandırıldı (35 ml içindeki $MnCl_2$ konsantrasyonu 1 mM'a ayarlandı) ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

d – Enzim kaynağı 53 °C' deki sıcak su banyosunda 15 dakika preinkübasyona bırakıldı.

e -Vida kapaklı tüpler üzerine enzim kaynağından 0,2'er ml ilave edilerek tüpler hemen inkübasyon için 37 °C' deki metabolik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

f – Oda ısısında bekleyen sıfır zaman tüplerine 0,2 ml enzim kaynağı ilave edildikten sonra, tüplere reaksiyonu durdurmak için hemen 3 ml asit karışımı ilave edildi. Ayrıca standart ve kör tüpüne de 3 ml asit karışımı ilave edildi.

g – 10 dakikalık inkübasyon süresi sonunda metabolik su banyosundan alınan vida kapaklı tüpler (enzimatik reaksiyonun geliştiği) üzerine de reaksiyonu durdurmak amacı ile hemen 3 ml asit karışımı konuldu.

h – Her iki deney setindeki tüplere, 2 ml renk ayırıcı ilave edilip, kapakları kapatılarak vorteks mikserde iyice karıştırıldı.

ı – Örnek, sıfır zaman, standart ve kör tüplerinin hepsi kaynar su

banyosunda 10 dakika tutularak reaksiyonun tamamlanması sağlandı.

i – 10 dakika sonunda kaynar su banyosundan alınan tüpler musluk suyu altında 3 dakika kadar bekletilerek soğutuldu.

j – Bu süre sonunda standart, örnek ve sıfır zaman tüplerinin absorbansları 520 nm’de Shimadzu UV. Vis. Spektrofotometrede köre karşı okundu.

4.3.1.3. Tavşan Böbrek 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 bir faktör bulundu.

Faktör hesaplaması şu şekilde yapıldı;

$$faktör = \frac{1\mu\text{mol}\frac{\text{üre}}{\text{ml}} \times \Delta.O.D \times 35 \times 5 \times 6}{0,4 O.D} \cong 263$$

- **5:** inibasyon ortamında enzim kaynağını sulandırma oranı
- **35:** homojenatın preinkübasyon ortamında MnCl₂ ile sulandırma oranları
- **6:** İnkübasyon ortamında reaksiyon 10 dakika devam ettirildiğinden, bulunan değer in saatteki miktarını ifade etmek için sonuç 6 (60/10= 6) ile çarpıldı.
- 0,1 µmol üre/ml içeren standart tüpünün absorbansı ise 0,4’tür.

4- Örneğe ait net absorbans değeri faktör ile çarpılarak µmol üre / ml

homojenat/ saat cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

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

Ünite: 1 saatte 37 ° C'de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir.

Ünite: µmol üre /saat/mg protein

4.3.2. Homojenatta Protein Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız homojenatta protein miktarı modifiye Lowry (69) yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptit bağları ile kompleks yapar ve prensip olarak **Bakır + Protein** $\rightleftharpoons$ **Bakır – Protein** basit ilişkisini içerir. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir.

4.3.2.1. Kullanılan Ayıraçlar

1. **Alkali Bakır Ayırıcı:** 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 Ayırıcı:** 2 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayırıcından 3.75 ml alınarak distile su ile 67.5 ml' ye tamamlanır. Bu çalışma örnek sayısına göre günlük olarak hazırlanmalıdır.
3. **Protein Standartı:** 50 µg BSA (Sığır serum albumin)/ ml
4. Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılarak) örnek

4.3.2.2. Deney Prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Alkali Bakır Ayırıcı (ml)	1.0	1.0	1.0
Protein Standartı (ml)	-	1.0	-
Örnek (ml)	-	-	1.0
Distile su (ml)	1.0	-	-

Tüpler iyice karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.

Fenol Ayırıcı (ml)	4.0	4.0	4.0
--------------------	-----	-----	-----

Tüpler iyice karıştırılır ve 5 dakika 55 °C’ de bekletilir. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutularak örnek ve standart tüpleri 650 nm’ de kör tüpüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\frac{\mu\text{gr protein}}{\text{ml}} = \frac{\text{Örnek Abs.}}{\text{Std.Abs.}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

5. BULGULAR

5.1. Preinkübasyon Isısının Tesbiti

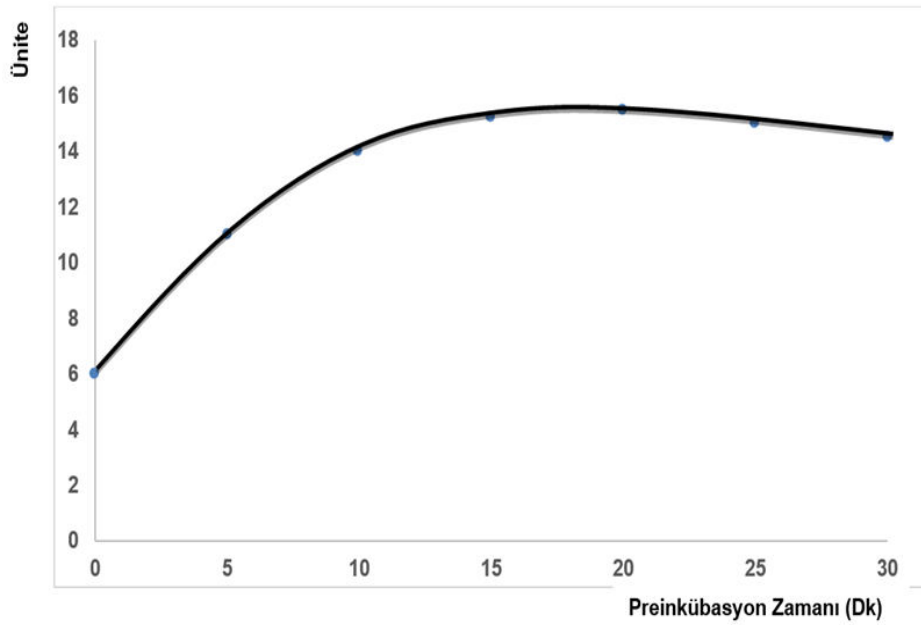
Tavşan böbrek arginazı üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır. Enzim kaynağı 1 mM $MnCl_2$ varlığında 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 °C’ lerde preinkübasyon ısısına tabii tutulmuştur. Enzimin en yüksek aktivitesi 50-55 °C arasında saptanmıştır. Bu ısıdan sonra giderek azalan bir aktivite saptanıp, enzimin aktivasyonu için optimum preinkübasyon ısısı 53 °C olarak tesbit edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

5.2. Preinkübasyon Süresinin Tesbiti

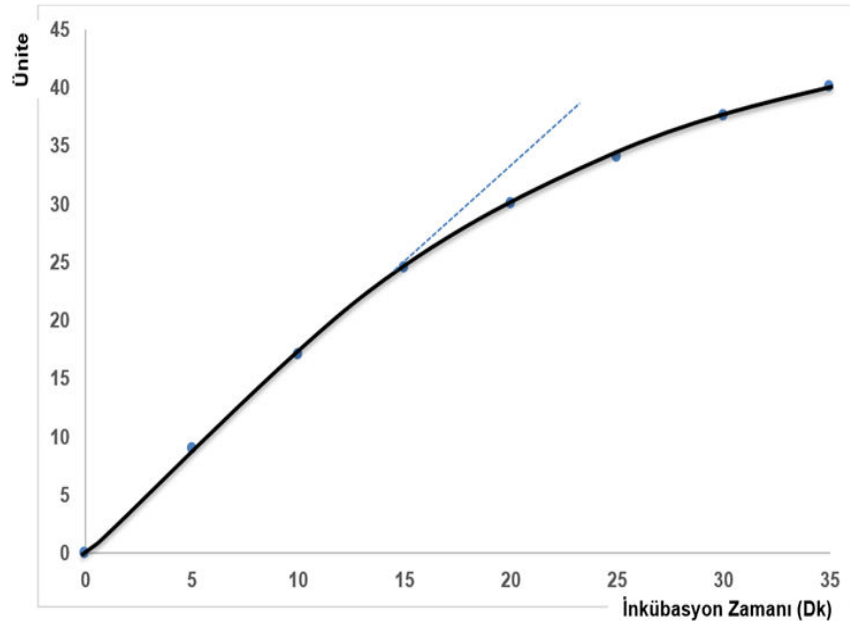
Tavşan böbrek arginazının değişik preinkübasyon zamanlarında aktivitesi araştırılmış, 0-30 dakikalık zaman aralıklarında ve 1 mM $MnCl_2$ varlığında ve 53°C preinkübasyon ısısında enzimin aktivitesi incelenmiştir. Enzimin maksimum aktiviteye 15 dakika'da ulaştığı görülmüş ve uygun preinkübasyon süresi 15 dakika olarak kabul edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.3. İnkübasyon Süresinin Tespiti

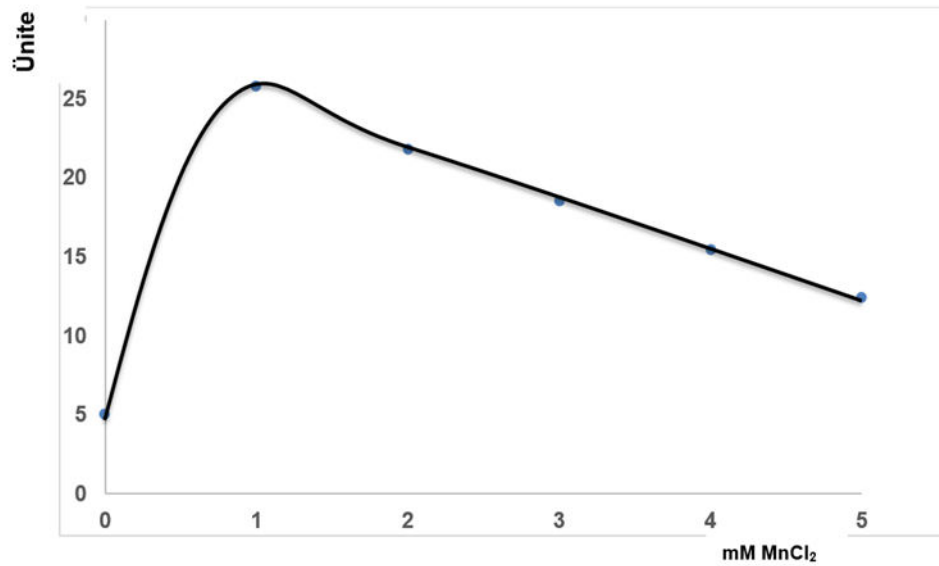
Tavşan böbrek arginazı için optimal inkübasyon süresinin tespit edilmesinde enzim kaynağı 0-35 dakikalık zaman dilimlerinde inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyonun sonunda oluşan ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir. Şekil 7’de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 15. dakikaya kadar lineer durumda sabit kalmış, bu sürenin sonunda lineer çizginin yerini hiperbolik bir görünüm almıştır. Böylece enzim için optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak kabul edilmiştir.



Şekil 7: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi

5.4. Mangan İyonlarının Etkisi

Arginaz enzimi aktivasyon için mangan iyonlarına ihtiyaç duyar. Bu nedenle arginaz aktivitesi üzerinde mangan iyonlarının etkisini araştırmak için 0-5 mM konsantrasyonları arasında değişen MnCl_2 , preinkübasyon ortamına eklenmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Enzim aktivitesi, preinkübasyon ortamına Mn^{++} eklenmeyen kontrol grubunda çok düşüktür. Ortama Mn^{++} iyonlarının ilavesi ile aktivitenin belirgin bir artışı tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi özellikle 1 mM MnCl_2 konsantrasyonuna kadar yükselmiş, 1 mM'lık MnCl_2 konsantrasyonundan sonra aktivite düşmüştür. En yüksek enzim aktivitesi 1 mM'lık MnCl_2 konsantrasyonunda görüldüğünden dolayı tavşan böbrek doku arginazı için optimal MnCl_2 konsantrasyonu 1 mM olarak tespit edilmiştir (Şekil 8).

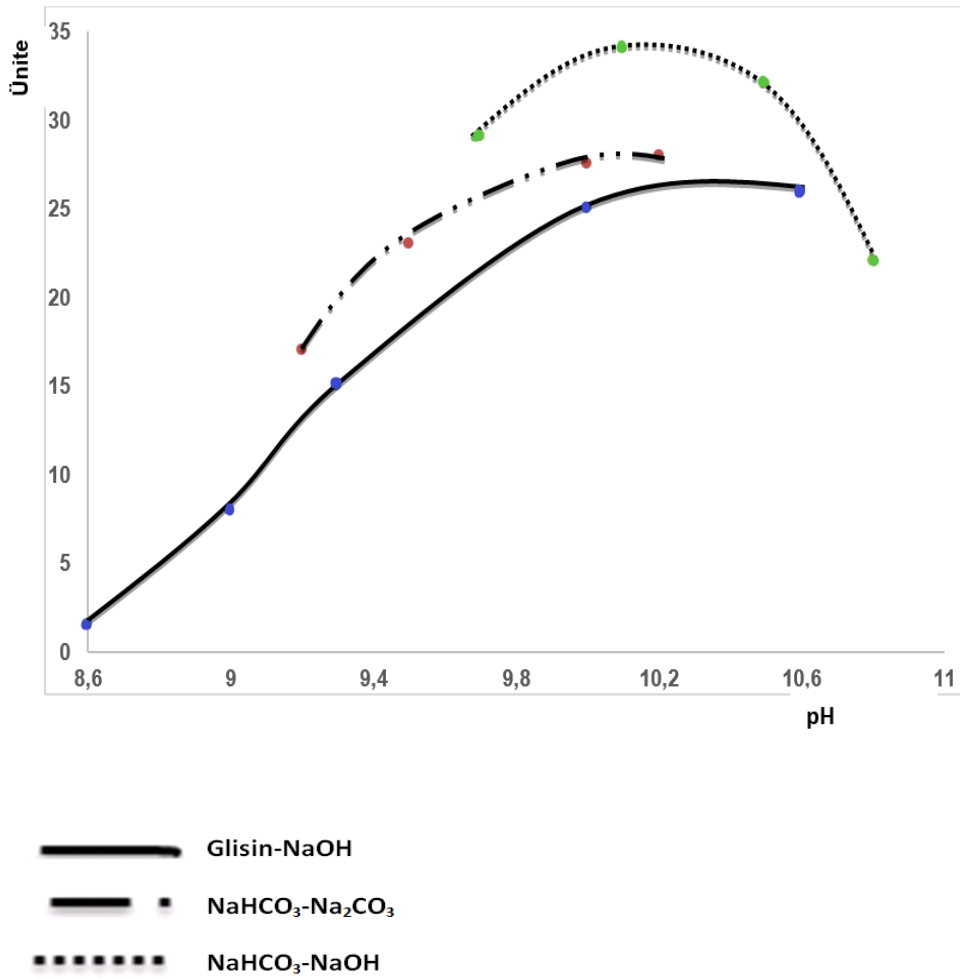


Şekil 8: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin MnCl_2 Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

5.5. Tavşan Böbrek Doku Arginazı Üzerine pH' nın Etkisi

Tavşan böbrek doku arginazının optimal pH' sını tespit etmek için pH 8,6' dan pH 11' e kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponlardan pH 8,6-10,6 arasında olan Glisin-Sodyum hidroksit (NaOH)

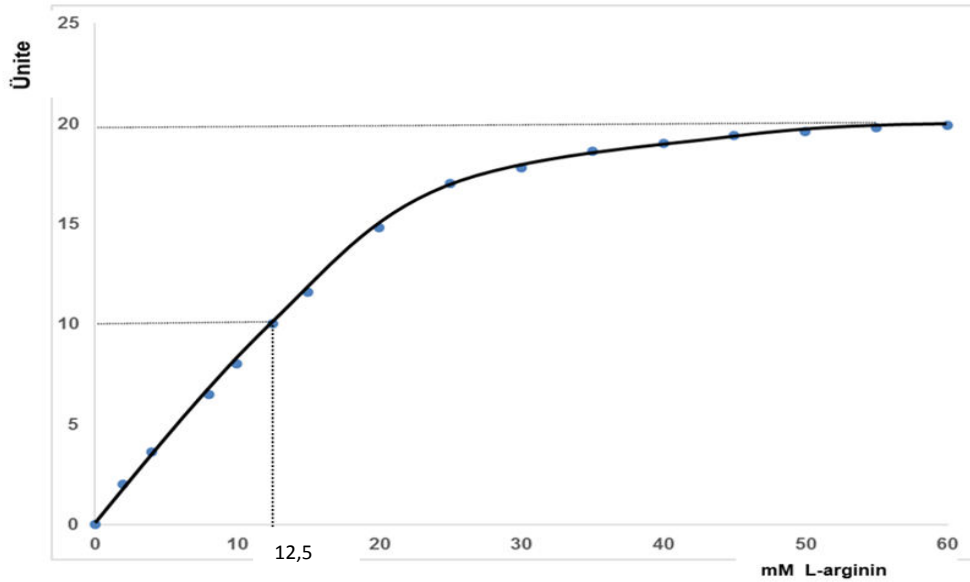
tamponu, pH'sı 9.2-10.2 arasında aktivite gösteren Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)-Sodyum karbonat (NaCO_3) tamponu ve 9.7-10.9 pH' larında olan Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)-Sodyum hidroksit (NaOH) tamponu kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin saptandığı pH ortamı saptanmaya çalışılmıştır. En yüksek aktivite pH 10-10,2' de Sodyum bikarbonat –sodyum hidroksit tamponu varlığında saptanan tavşan böbrek arginaz aktivitesi için lazım olan tamponun sodyum bikarbonat (NaHCO_3)-sodyum hidroksit (NaOH) tamponu, en uygun pH' nın da 10,1 olduğu saptanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Bağlı Olarak Değişimi.

5.6. Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonuna Bağlı Değişimi

Tavşan böbrek doku arginazı için uygun şartlar saptandıktan sonra, arginaz enziminin substratı olan L-arginine karşı K_m 'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir (Şekil 10). Bu amaçla enzim miktarı aynı tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesi incelenmiştir. Reaksiyon hızının artışı L-arginin konsantrasyonunun artışına paraleldir. İlk etapta, reaksiyon hızında görülen doğrusal artış, daha sonra hiperbolik bir görünüm kazanmaktadır. En sonunda reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymun hale gelmektedir.

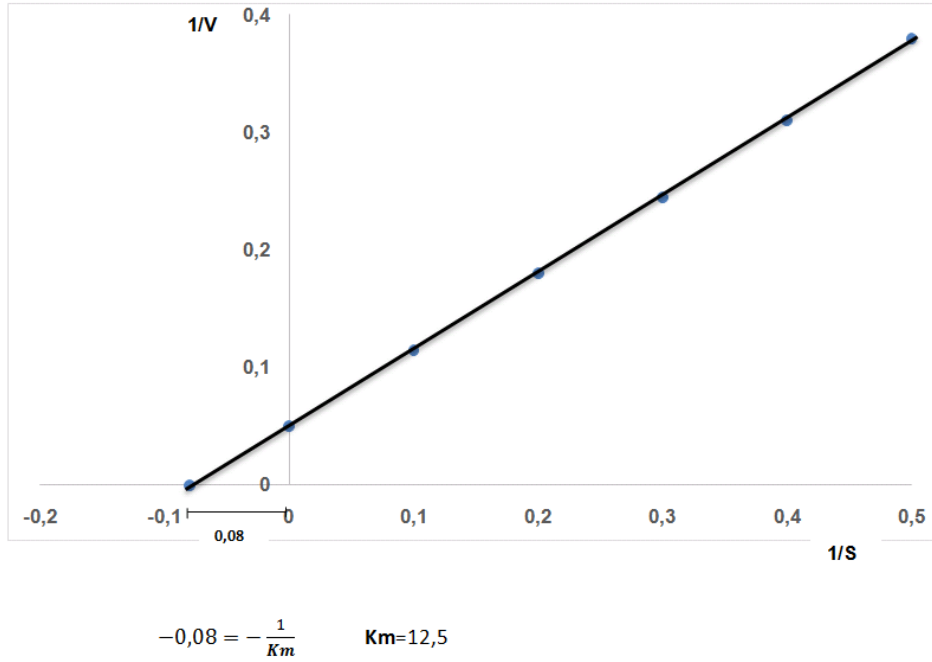


$K_m=12,5$

Şekil 10: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Michaelis-Menten Grafiği ile Gösterilmesi

Şekil 10'da görüldüğü üzere 12.5 mM'a kadar olan L-arginin konsantrasyonundaki artış, enzim aktivitesinde doğrusal bir artışa (birinci mertebe kinetiği) neden olmuş, bu noktadan sonra lineerlik yavaş yavaş kaybolarak, hiperbolik bir görünüm (karışık mertebe kinetiği) kazanmıştır 45 mM'lık L-arginin konsantrasyonundan itibaren, arginaz L-arginin ile doygunluğa ulaşarak (sıfır mertebe kinetiği) reaksiyon sabit hızla devam etmektedir.

Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği ile beraber Lineweaver-Burk (Şekil 11) eğrisi ile de incelenmiş olup, tavşan böbrek doku arginazının L-arginine karşı olan K_m 'inin 12,5 mM civarında olduğu saptanmıştır.



Şekil 11: Tavşan Böbrek Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Gösterilmesi

5.7. Farklı Türlerin Böbrek Arginaz Aktiviteleri

Tavşan, koyun, keçi, sığır, tavuk, rat ve bildırcın böbreklerinden alınan doku örnekleri için preinkübasyon ısısı 53°C, preinkübasyon zamanı 15 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika, 1 mM MnCl₂ ve optimum pH 10,1 kullanılarak deneyler yapılmış, dokuların enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Farklı türlerin böbrek arginaz aktiviteleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 1: Farklı Türlerin Böbrek Arginaz Aktiviteleri

TÜR	Enzim Aktivitesi (Ünite)
Bıldırcın	59,63 ± 13,03
Tavuk	20,86 ± 4,53
Tavşan	20,84 ± 3,38
Rat	16,28 ± 2,04
Keçi	13,51 ± 1,97
Koyun	4,17 ± 1,19
Sığır	1,22 ± 0,25

En düşük arginaz aktivitesi koyun ve sığır böbreğinde saptanırken, en yüksek arginaz aktivitesi bildırcın böbreğinde bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Çeşitli hayvan türlerinde ve dokularında enzimin optimum şartlarının belirlenmesi, ölçümler anında enzimin aktif olduğu düzeyin saptanması ve enzimin fizyolojik rollerini ortaya çıkarmak için önemlidir. Tavşan böbrek doku arginaz enziminin optimum özellikleri ile ilgili daha önce çalışıldığına dair literatür bilgiye rastlanılmamış ve bu çalışmada enzimin optimum özellikleri ortaya konulmuştur.

Arginaz enzimi diğer organlara göre, üre döngüsünün bulunduğu karaciğerde daha fazladır. Fakat böbrek, beyin, kalp gibi üre döngüsünün bulunmadığı ekstrahepatik dokularda da arginaz enzimi tespit edilmiştir (70,71,72,73,74,42,75,76,26,77,78,79,80). Arginazın üre döngüsünün olmadığı bu dokulardaki görevinin prolin, glutamat ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitini oluşturmak olduğu bilinmektedir (30). Poliamin biyosentezinde arginaz enzimi başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitindekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Poliaminler (putressin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (31,32).

Enzimler genel olarak protein yapılı olduklarından ısıya hassastırlar. Enzim aktivitesinin pik yaptığı ısının üzerine çıkılması durumunda enzim aktivitesi düşmektedir. Tavşan böbrek doku arginazının preinkübasyon ısını tespit etmek için farklı ısılarda (30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 °C) enzim aktivitesine bakılmış ve optimal preinkübasyon ısısının 50-55°C arası olduğu, bu sıcaklıktan sonra enzim aktivitesinde düşme meydana geldiği görülmüştür. Farklı türlerin farklı dokularında da preinkübasyon ısılarına bakılmıştır. Preinkübasyon ısısı koyun gözü vitreusu için 40 °C (81), koyun meme doku arginazı için 52 °C (82), insan tükürük arginazı (25), tiroid doku arginazı (75), eritrosit ve uterus arginazı (74), bronş lavaj sıvısı arginazı (70) için 55 °C, diabetik rat karaciğeri için 68 °C (57), sığır rumen doku arginazı için 60 °C (36), kobay karaciğer arginazı için 45 °C (83), teleskop balığı karaciğeri için 37 °C (84), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 65 °C (85), M.

benedeni arginazı için 53 °C (86) olarak bildirilmiştir.

Tavşan böbrek doku arginaz enziminin optimum preinkübasyon zamanını saptamak için enzim 53 °C’ de 0-30 dakikalar arasında preinkübasyona tabii tutulmuş ve en uygun preinkübasyon süresinin 15 dakika olarak saptanmıştır. Preinkübasyon süresi koyun meme doku arginazı (82) ve insan tiroid doku arginazı (75) için 12 dakika, koyun gözü vitreusu için 9-10 dakika (81), insan tükürük arginazı (25), bronş lavaj sıvısı arginazı (70) ve diabetik rat karaciğeri (57) için 20 dakika, sığır rumen doku arginazı (85), eritrosit arginazı (74) ve kobay karaciğer arginazı (83) için 5 dakika, uterus arginazı için 35 dakika (74), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 15 dakika (85), M. benedeni arginazı için 10 dakika olarak belirlenmiştir (86).

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında şekillendiği için enzim kaynağı 37 °C’de 0-35 dakikalar arasında inkübasyona tabi tutularak en uygun inkübasyon süresi saptanmaya çalışılmış, 15. dakikaya kadar doğrusallığın devam ettiği, 15. dakikadan sonra lineerlik yerini hiberbolik bir görünüm aldığı gözlemlenmiştir. Tavşan böbrek doku arginazı için optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için farklı inkübasyon süreleri belirtilmiştir. Inkübasyon süresi insan tiroid arginazı için 30 dakika (75), rat karaciğeri (57), insan karaciğer ve uterusu (74) için 20 dakika, koyun gözü vitreusu (81) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (85) için 10 dakika, sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (1), M. Benedeni arginazı (86) ve koyun meme doku arginazı için 15 dakika (82) olarak bulunmuştur.

Preinkübasyon ısısı ve Mn⁺² iyonları çeşitli doku arginazları için gerekli olduğu ve aktivitelerini artırdığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (36,87,82). Sıçan karaciğer doku arginazının Mn⁺² iyonları varlığında 55°C’de preinkübasyonunun enzim aktivitesini yaklaşık % 110 artırdığı (48), 5 mM MnCl₂ varlığında ve 55 °C’ de 20 dakika preinkübasyonla eritrosit arginaz aktivitesinin 2-6 kat, karaciğer arginaz aktivitesinin 4-5 kat arttığı tespit edilmiştir (88). Netice olarak arginaz aktivitesi için preinkübasyon ve Mn²⁺ iyonları gereklidir.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn⁺² katyonlarına ihtiyaç duyduğu Muszynska (89) tarafından

belirtmiştir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması, enzimin ısıya dayanıklılığını artırmakta ve enzimi inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (18). Bundan dolayı tavşan böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine $MnCl_2$ konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve arginaz enziminin en yüksek aktivitesi 1 mM $MnCl_2$ konsantrasyonunda tespit edilmiştir. 1 mM $MnCl_2$ varlığında tavşan böbrek arginazı aktivitesi 5 misli artmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı dokular için gerekli olan $MnCl_2$ konsantrasyonu farklı olup rat karaciğeri (24), sığır rumen doku arginazı (36) için 2 mM, *M. benedeni* arginazı için 0.5 mM (86), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı için 50 mM (90), insan tiroid arginazı (75) ile karaciğer ve eritrosit arginazı (74) için 2.5 mM, insan tükürük arginazı (25) ve vitreus arginazı (81) için 5 mM, koyun meme doku arginazı için 0.75 mM (82), insan uterusu için 0.8 mM (74), kobay karaciğer arginazı için 10 mM (83), fascioliosisli koyun karaciğer arginazı için 1 mM (85), diabetik rat karaciğer ve böbrek arginazı için 2 mM olarak bulunmuştur (57). Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta manganın arginaz aktivitesinde vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve en uygun mangan konsantrasyonunun dokuya göre değişiklik göstermesidir.

Arginaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda farklı tampon sistemleri kullanılmıştır (85, 57, 36, 81, 74, 75, 91, 82, 86). Tavşan böbrek 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 10,1' de Sodyum bikarbonat-Sodyum hidroksit tamponu varlığında elde edildiği için tavşan böbrek arginaz aktivitesi için en uygun tamponun Sodyum bikarbonat- Sodyum hidroksit tamponu, optimal pH' nın da 10,1 olduğu kabul edilmiştir.

Karaciğer ve eritrosit arginazı (88), *M.expensa* arginazı (87), koyun meme doku arginazı (82), *M.benedeni* arginazı (86) için pH 9.5' deki karbonat tamponu, sığır rumen doku arginazı (36) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (85) için pH 10' daki karbonat tamponu, diabetik rat karaciğeri (57)

için pH 10.1' deki karbonat tamponu, insan karaciğeri ve eritrositi için pH 9,7' deki, insan uterusu için ise pH 9.6' daki karbonat tamponunun (57) kullanıldığı bildirilmiştir. Koyun gözü vitreusu için pH 8.8' deki Glisin-NaOH tamponunun kullanıldığı (81), insan tiroid arginazının optimum pH' sının 9,6 (75), kobay karaciğer arginazının pH' sının 10.5 (83), *Genypterus maculatus* türünden balıkların karaciğer arginazının (35) pH'sının 9.5 olduğu tespit edilmiştir. Tavşan böbrek arginazı için optimum pH diğer arginazlar için belirlenen optimum pH'a benzerdir. Görüldüğü gibi arginazlar bazik optimum pH'a sahiptir.

Tavşan böbrek doku arginaz aktivitesinin L-arginine karşı olan Km' i araştırılmış, bu nedenle enzim miktarı sabit tutularak L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüş ve Km değeri 12,5 mM olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda farklı türlerden enzim kaynaklarındaki arginazın L-arginine karşı olan Km'inin geniş sınırlar içinde değiştiği görülmüştür. Km değerleri sığır rumen doku arginazı (36) ve fascioliosisli koyun karaciğer arginazı (85) için 4 mM, *M. benedeni* arginazı için 12.5 mM (86), insan eritrositi için 3.2 mM, karaciğeri için 4.1 mM, uterusu için 5.9 mM (74), tiroid arginazı için 2 mM (75), vitreus arginazı için 6 mM (81), koyun meme doku arginazı için 1.35 mM (82), diabetik rat karaciğer arginazı için 3.2 mM, böbrek arginazı için 6.7 mM (57), *Mus booduga* karaciğer arginazı için 8.3 mM (92), *Xenopus leavis* karaciğer arginazı için 29 mM (90), kobay karaciğer arginazı için 19.6 mM (83) olarak tespit edilmiştir. Tavşan böbrek doku arginazı için bulduğumuz Km değeri yapılan çalışmalarda elde edilen Km değerleri sınırları içerisinde yer almaktadır.

Koyun, keçi, sığır, tavşan, tavuk, rat ve bildircin böbrek dokularından örnekler alınarak homojenat hazırlanmış, preinkübasyon ısısı 53°C, preinkübasyon zamanı 15 dakika, inkübasyon zamanı 10 dakika ve optimum pH 10,1'de arginaz aktiviteleri ölçülmüştür. Farklı tür böbrek dokularındaki arginaz enziminin miktarları saptanmıştır. Araştırdığımız türler içerisinde en yüksek arginaz aktivitesini bildircinde en düşük arginaz aktivitesini sığırdan tespit ettik.

Bugüne kadar tavşan böbrek doku arginaz enziminin kinetik özellikleri ile ilgili bir çalışmanın yapılmadığı literatür taramalarından anlaşılmaktadır. Bu

nedenle tavşan böbrek dokusunda arginaz enziminin kinetik özellikleri saptanmış ve farklı türlerin böbrek dokularındaki arginazın aktivitesine de bakılmıştır. Tavşan böbrek 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. Champe PC, Harvey RA. (Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E.) Lippicott's Mustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. (1997). 236-241
2. Gözükara EM. Enzimler. "Biyokimya II". Üçüncü baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. (1997). 572-678.
3. N. Bayşu Sözbilir, N. Bayşu, Proteinler ve Metabolizmaları. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 225-232
4. <http://www.drtus.com/yeni/modules/pocketus/biyo.pdf> 29.06.2015
5. Gürdöl, F. Ademoğlu, E. Azotlu Biyomoleküllerin Metabolizması, Biyokimya. İkinci Baskı Nobel Tıp Kitabevleri. (2010). 339-341.
6. Erdem, N. Tavşan Karaciğer Arginazının Optimize Edilmesi ve Tavşan Dokularındaki Arginazın Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (2012).
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Urea> 29.06.2015
8. Rawn JD. Catabolism of Amino Acids and the Urea Cycle. In: "Biochemistry". First ed., Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina. (1989). 457-487.
9. Murray RK., Granner DK., Mayes PA, Rodwell VW. Metabolism of Proteins and Amino Acids. In: "Harper's Biochemistry". Twenty-second ed., Typopress, Lebanon. (1991). 267-330.
10. <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/633ureacycle.html> 30.06.2015
11. Carnaval N, Bustamante M, Hinrichsen P, Torres A. Properties of Arginase from the Sea Mollusc Concholepas Concholepas. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. (1984). 78, 3: 591-594.
12. Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlioğlu M, Başpınar N, Tiftik AM. Biyokimya. Birinci Baskı. Selçuk Üniversitesi Yayınevi Ünitesi, Konya. (1998).
13. http://education.med.nyu.edu/courses/molecular/AminoAcids06/questions/answers/ans6d_right.html 07.07.2015

14. <http://worthington-biochem.com/AR/default.html>)
15. <https://en.wikipedia.org/wiki/Arginase> 29.06..2015
16. Colombo JP, Konarska L. Arginase; In: Bergmayer Grabı M. (Eds). Methods of Enzymatic Analysis. 3 rd Ed. Weinheim Verlag Chemie. (1984). 285-294.
17. Murray RK., Granner DK., Mayes PA, Rodwell VW. Metabolism of Proteins and Amino Acids. In: "Harper's Biochemistry". Twenty-second ed., Typopress, Lebanon. (1991). 267-330.
18. İlhan N. Tiroid Arginaz Enzim Aktivitesinin Farklı Metal İyonları Varlığında Isıya Karşı Stabilitesi. Biyokimya Dergisi. (1993). 18: 59-67. 74.
19. Kang JH, Cho YD. Purification and Properties of Arginase from Soybean, Glycine max, Axes. Plant Physiol. (1990). 93: 1230-1234.
20. Kandemir F.M. Koyun Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ (2009).
21. Kaplan LA. Urea. " Methods in Clinical Chemistry". Pesce AJ, Kaplan LA. (Editörler). The CV Mosby Company, Toronto. (1987). Sayfa 22-27.
22. Kawano K, Masuda H, Yano M, Kihara K, Sugimoto A, Azuma H. Altered nitric oxide synthase, arginase and ornithine decarboxylase activities, and polyamine synthesis in response to ischemia of the rabbit detrusor. J Urol. (2006). 176 (1): 387-93.
23. Kepka-Lenhart D, Ash DE, Morris SM. Determination of Mammalian Arginase Activity. Methods Enzymol. (2008). 440: 221-30.
24. Kochakain CD, Berlett NM. 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. (1948). 176: 243-247.
25. Konarska L, Tomaszewski L, Colombo JP, Terheggen HG. Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininemia. J.Clin. Chem. Clin. Biochem. (1985). 23, 6: 337-342.
26. Konarska L, Tomaszewski L, Rolezyk U. Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. Biochemical Medicine

- and Metabolic Biology. (1986). 35: 170-178.
- 27.** Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentration. Archives of Biochemistry and Biophysics. (1991). 286, 1: 217-221. 70.
 - 28.** Kumar AN, Kalyankar GD. Effect of Steroid Hormones on Age Dependent Changes in Rat Arginase Isoenzymes. Experimental Gerontology. (1984). 19: 191-198.
 - 29.** Lisowska-Myjak B, Tomaszewski L, Kraszewska-Domańska B. Intestinal arginase in the phylogenetic development of animals. Pol Arch Weter. (1987). 25 (2-3): 283-96.
 - 30.** Ash DE. Structure and Function of Arginase. American Society for Nutritional Sciences. (2004). 22: 2760-2764.
 - 31.** Pegg AE, Mccann P. Polyamine Metabolism and Function in Mammalian Cells and Protozoans. ISI Atlas of Sci. Biochem. (1988). 11-18.
 - 32.** Pegg AE, Mccann P. Polyamine Metabolism and Function. Am. J. Physiol. Cell Physiol. (1982). 243, 12: 212-221.
 - 33.** Campbell JW, Lee TW. Ornithine Transcarbamylase and Arginase Activity in Flatworms. Comp. Biochem. Physiol. (1963). 8: 29-38.
 - 34.** Zamecka E, Porembka Z. Five Forms of Arginase in Human Tissues. Biochem. Med. Metab. Biol. (1988). 39, 3: 258-66.
 - 35.** Carvajal N, Kessi E, Ainol L. Subcellular Localization and Kinetic Properties of Arginase from the Liver of *Genypterus Maculatus*. Comp. Biochem. Physiol. B. (1987). 88, 1: 229-31.
 - 36.** Erişir M. Sığır Rumen Doku Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (1997).
 - 37.** Ishikawa T, Harada T, Koi H, Kubota T, Azuma H, Aso T. Identification of Arginase in Human Placental Villi. Placenta. (2006). 1-6.
 - 38.** Porembka Z, Zamecka E. Immunological Properties of Rat Arginases. Acta Biochimica Polonica. (1984). 31, 2: 223-227.
 - 39.** Carnaval N, Cederbaum SD. Kinetics of Inhibition of Rat Liver and Kidney Arginases by Proline and Branched-Chain Amino Acids. Biochimica et Biophysica Acta. (1986). 870: 181-184.

40. Skrzypek-Osiecka I, Robin Y, Porembaska Z. Purification of Rat Kidney Arginases A1 and A4 and Their Subcellular Distribution. *Acta Biochim Pol.* (1983). 30, 1:83-92.
41. Brusdeilins M, Kühner R, Schumacter K. Purification, Affinity to Anti-Human Arginase Immunoglobulin- Sepharose 4 B and Subunit Molecular Weights of Mammalian Arginases. *Biochimica et Biophysica Acta.* (1985). 840: 79-90.
42. Ikemato M, Tabata M, Murachi T, Totani M. Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. *Ann. Clin. Biochem.* (1989). 26: 547-553.
43. Porembaska Z, Zamecka E. Immunological Properties of Rat Arginases. *Acta Biochimica Polonica.* (1984). 31, 2: 223-227.
44. Rawn JD. Catabolism of Amino Acids and the Urea Cycle. In: "Biochemistry". First ed., Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina. (1989). 457-487.
45. Spolarics Z, Bond JS. Multiple Molecular Forms of Mouse Liver Arginase. *Archs. Biochem. Biophys.* (1988). 260, 1: 469-479.
46. Spector EB, Kern RM, Haggerty DF, Cederbaum SD. Differential expression of multiple forms of arginase in cultured cells. *Mol Cell Biochem.* (1985). 66 (1): 45-53.
47. Wang XP, Chen YG, Qin WD, Zhang W, Wei SJ, Wang J, Liu FQ, Gong L, An FS, Zhang Y, Chen ZY, Zhang MX. Arginase I attenuates inflammatory cytokine secretion induced by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2011). 31(8): 1853-60.
48. Schimke RT. Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* (1962). 237, 2: 59-467.
49. Shombough G.E. Urea Biosynthesis II. Normal Abnormal Regulation. *The American Journal and Nutrition.* (1978). 31: 126-133.
50. Shimbayashi K, Yonemura T. An Aspect of Urea Cycle enzymes in Goat. *Agr. Biol. Chem.* (1970). 34, 11: 1603-1609.

51. Husson A, Bouazza M, Buquet C, Vaillant R. Role of Dexamethasone and Insulin on the Development of the Five Urea-Cycle Enzymes in Cultured Rat Foetal Hepatocytes. *Biochem. J.* (1985). 225: 271-274.
52. Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve İvesi Koyunlarında, Gebelikte ve Doğumdan Sonra Eritrosit, Tükürük ve Serum Arginaz Aktiviteleri İle Serum Üre ve Östrojen Düzeyleri. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences.* (1999). 23: 345-350.
53. Erişir M, Beytut E, Ozan S, Aksakal M. 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 Dchemstry and Function. (2003). 21: 331-335
54. Erisir M, Aydılek N, Aksakal M. Effect of Vitamin E on Arginase Activity in the Liver and Kidneys of Testosterone-Treated and Castrated Rabbits. *Acta Vet. Brno.* (2005). 74:527-531.
55. Bacheti, T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato PG, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R. Arginase Pathway in Human Endothelial Cells in Pathophysiological Conditions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* (2004). 37: 515-523
56. Muszynska G. Immobilization of Rat Liver Arginase. C.I Biospecific Chromatography. *Protides of the Biological Fluids 23 RD. Colloguim.* Oxford and New York. Pergamon Press, (1976). 633-637.
57. Erisir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. Evaluation of Optimal Conditions for Arginase Activity in Streptozotosin İnduced Diabetic Rats. *Vet. Med.-Czech.* (2005). 50, 2: 69-76.
58. Porembaska Z., Grabon W., Zelazowska, Czczot H, Zamecka E. Nonidentity of Subunits of Human Kidney Arginase A1 and Human Liver Arginase A5. *ActaBiochemica Polonica.* (1993). 40, 4: 465-470.
59. Hosoyama Y. The Reversible Inactivation of Rat Liver Arginase at Low pH. *Eur.J. Biochem.* (1972). 27: 48-52.
60. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, van de Sand A, Klein K, Rassaf T, Konietzka I, Sewell A, Menazza S, Canton M, Heusch G, Di Lisa F, Schulz R Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II

- expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2010). 299(2): H446-53.
61. Mafune N, Ideta N, Watabe H, Nagura H, Kobayashi K. Occurrence of cytotoxic autoantibody in rabbits by immunization with heterologous liver arginase: a possible implication in the mechanism of the autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol.* (1985). 59 (1):123-31.
 62. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racké K. Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N-hydroxy-D,L-tyrosyl-L-arginine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* (1997). 121 (3): 395-400.
 63. Vielle-Breitburd F, Orth G. Rabbit liver L-arginase. Purification, properties, and subunit structure. *J Biol Chem.* (1972). 247 (4): 1227-35.
 64. Adamson I, Fisher H. Further studies on the arginine requirement of the rabbit. *J Nutr.* (1976). 106 (6): 717-23.
 65. Makarenko ON, Skorik LV, Mel'nichuk DA. 64. The characteristics of nitrogen metabolism in the tissues of rabbits with ammonium toxicosis. *Ukr Biokhim Zh.* (1992). 64 (6):105-9.
 66. Ishizaka M, Nagai A, Iwanaga M, Imamura M, Azuma H. Possible involvement of enhanced arginase activity due to up-regulated arginases and decreased hydroxyarginine in accelerating intimal hyperplasia with hyperglycemia. *Vascul Pharmacol.* (2007). 47 (5-6): 272-80.
 67. Hayashi T, Esaki T, Sumi D, Mukherjee T, Iguchi A, Chaudhuri G. Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. *Proc Natl Acad Sci.* (2006). 103(27): 10485-90.
 68. Geyer JW, Dabich D. Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal. Biochem.* (1971) 39: 412-417.
 69. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* (1951). 193: 265-275.
 70. Altundağ Y. Bronj Lavaj Sıvısında Arginaz Enziminin Özellikleri ve Klinik Diagnostik Önemi. Uzmanlık Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. (2001).

71. Aminlari M, Vaseghi T. Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* (1992). 103, 2: 385-389
72. Chen PC, Broome JD. Mouse Macrophage Arginase. *Analyt. Biochem.* (1980). 163: 354- 359.
73. Fuentes JM, Campo ML. Soler G. Kinetics and İnhibition by Some Amino acids of Lactating Rat Mammary Gland Arginase. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* (1994). 102, 5: 255-258.
74. Halifeoğlu İ. İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (1993).
75. İlhan N. İnsan Tiroid Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ. (1992).
76. Konarska L, Tomaszewski L. Studies on L- arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, *Biochem. Med. and Met. Biol.* (1986). 35: 156-169.
77. Martincic T, Krvavica S. Enzymatic Investigations in the Mucosa of the Rumen. II. On the Presence of Arginase in the Ruminal Mucosa of Cattle. *Vet. Arh. Zagreb, Svezak.* (1964). 3-4: 90-93.
78. Nadolska-Lutyk J, Grabon W, Poremska Z. Arginase in Bull Testis. *Acta Biochimica Polonica.* (1990). 37, 3: 377-384.
79. Sondaç Ü. Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ. (1991).
80. Straus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, A New Marker of Mammary Carcinoma *Clinica Chimica Acta.* (1992). 210: 5-12.
81. Gürsu FM. Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (1993).
82. Özçelik M. Koyun Meme Dokusu Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ. (2002).
83. Soler G, Mataix FJ, Ruiz-Amil M. Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginase (author's transl)]. *Rev Esp Fisiol.* (1981). 37, 1: 37-44.

- 84.** Singh RA, Singh SN. Purification and Properties of Liver Arginase from Teleostean Fish *Clarias Batrachus* (L.). *Arch Int Physiol Biochim.* (1990). 98, 6: 411-9.
- 85.** 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.
- 86.** Özdemir N. Moniezia Benedeni Arginazının Bazı Özellikleri. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (1990).
- 87.** Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. Kısmen Arıtılmış Moniezia Expensa Arginazının Bazı Özellikleri. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* (1993). 17: 245-250.
- 88.** Colombo JP, Konarska L. Arginase; In: Bergmayer Grabı M. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis.* 3 rd Ed. Weinheim Verlag Chemie. (1984). 285-294.
- 89.** Muszynska G, Severina LO, Lobyreva LW. Characteristics of Arginase from Plant, Ureotelic and Uricotelic Organism. *Acta Biochem. Pol.* (1972). 19, 2: 109-111.
- 90.** Peiser L, Balinsky JB. Kinetic Properties of Arginase from *Xenopus Laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* (1982). 73, 2: 215-220.
- 91.** Ozan S, Gülen Ş. Sığır Tükürüğünde Arginaz Enzimi ve Özelliklerinin Tükürük Bezleri, Eritrosit ve Karaciğer ile Karşılaştırılması. *Doğa Tr. Vet. ve Hay.* (1989). 13, 2: 154-163.
- 92.** Prasad GV, Lokanatha V, Sreekanth K, Rajendra W. Purification and Kinetic Properties of *Mus Booduga* (Gray) Hepatic Arginase. *Journal of Enzyme Inhibition.* (1997). 12,4: 255-272.

8. ÖZGEÇMİŞ

1983 Elazığ-Arıcak doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da, tamamladım. 2000 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2007 yılında mezun oldum. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.