

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moniezia benedeni ARGİNAZİNİN ÖZELLİKLERİ

Araş.Gör. Necmi ÖZDEMİR
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı.

(DOKTORA TEZİ)

ELAZIĞ-1990

İÇİNDEKİLER

I.BÖLÜM

SAYFA

GİRİŞ-----	1
I.1.Üre Sentezi-----	1
I.2.Arginazın Moleküler Yapısı-----	7
I.2.Parazitlerde Üre Biyosentezi-----	8
I.3.Moniezia benedeni'nin Oluşumu, Yapısı ve Özellikleri---	11
I.4.Araştırmanın Amacı-----	16

II.BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

II.1.Parazitlerin Toplanması-----	17
II.2.Kimyasal Maddeler-----	17
II.3.Kullanılan Cihazlar-----	18
II.4.Metodlar-----	18
II.4.1.Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi-----	18
II.4.2.Protein Ölçümleri-----	22
II.4.3.Amonyak Miktar Tayini-----	23
II.4.4.Ürenin Ölçülmesi-----	24

III.BÖLÜM

SAYFA

BULGULAR -----	25
III.1.Moniezia benedeni'de Arginaz Aktivitesinin Aranması -----	25
III.2.İnkübasyon Süresinin Tesbiti -----	25
III.3.Preinkübasyon Isısının Tesbiti -----	25
III.4.Preinkübasyon Zamanının Tesbiti -----	25
III.5.pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi -----	29
III.6.Metal İyonlarının Arginaz Aktivitesine Olan Etkisi -----	29
III.7.Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Miktarına Bağlı Olarak Değişimi -----	32
III.8.Arginazın Arginine Karşı Olan K_m'i -----	35
III.9.Moniezia benedeni Arginazının Bazı Özellikleri -----	35
III.9.a.Arginazın Hücre İçi Yerleşimi -----	35
III.9.b.Moniezia benedeni Arginazının İnhibitörleri -----	41
III.9.b.a.Ornitinin Moniezia benedeni Arginazı Üzerindeki İnhibisyon Etkisi -----	41
III.9.b.b.L-Lizinin Moniezia benedeni Arginazı Üzerine inhibisyon Etkisi -----	41
III.9.b.c.Monezia benedeni Arginazı Üzerine EDTA'nın İnhibisyon Etkisi -----	48
III.9.b.d.Moniezia benedeni Arginazı Üzerine p-CMBA İnhibisyon Etkisi -----	48

III.9.b.e.Moniezia benedeni Arginazı üzerine N-Etil Malemit'in inhibisyon Etkisi-----	55
III.9.b.f.M.benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Metilen Mavisi Derişimlerinin Etkisi-----	55
III.9.b.f.a.Değişik Işık Koşullarında Metilen Mavisinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi-----	62
III.9.b.f.b.MnCl₂,Metilen Mavisi ve Işığın Moniezia benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkileri-----	62
III.9.c.Moniezia benedeni'nin Farklı Ortamlarda Gösterdiği Değişiklikler.-----	65



IV.BÖLÜM

SAYFA

TARTIŞMA VE SONUÇLAR-----	73
Enzimin Aktivasyonu-----	74
Preinkübasyonun Etkisi-----	74
Mn++ katyonlarının Etkisi-----	75
pH'nın Etkisi-----	76
Moniezia benedeni Arginazının Km'lerine Göre Sınıflandırılması----	77
L-Amino Asitlerin Arginaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri-----	78
Arginaz Aktivitesini İnhibe Eden Bazı Kimyasal Maddeler-----	81

V.BÖLÜM

ÖZET-----	87
SUMMARY-----	88
KAYNAKLAR-----	89
TEŞEKKÜR-----	95
ÖZGEÇMİŞ-----	96

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

TABLolar

Tablo 1: Metal İyonlarının Moniezia benedeni Arginazı Üzerine Etkisi-----	31
Tablo 2: 0.25 M Sükroz İle Yapılan Homojenizasyonda Arginaz Aktivitesinin Hücre İçi Dağılımı-----	39
Tablo 3: 0.16 M KCl'de Yapılan Homojenizasyonda Arginaz Aktivitesinin Hücre İçi Dağılımı-----	39
Tablo 4: Değişik Işık Koşullarında Metilen Mavisinin Arginaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi-----	63
Tablo 5: MnCl ₂ , Metilen Mavisi ve Işığın Moniezia benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkileri.-----	64
Tablo 6: Moniezia benedeni pH:7'de Distile Su, % 0.9NaCl, %20 NaCl, İçinde 2 Saat 37 °C'de Bekletildikten Sonra Atılan Üre ,Toplam Üre, Arginaz,Protein,% µ gr NH ₄ Değerleri.-----	70
Tablo 7: Moniezia benedeni pH:9.5'da Distile Su,%0.9NaCl,%0.20 NaCl İçinde 2 Saat 37°C'de Bekletildikten Sonra Atılan Üre,Toplam Üre,Arginaz,Protein,% µ gr NH ₄ Değerleri.-----	71
Tablo 8: Parçalanmamış Tüm Bir Moniezia benedenin Baş,Orta ve Kuyruk Kısımları 2 saat 37 °C'de Distile Su içinde Bekletildikten Sonra Atılan Üre,Tutulan Üre,Toplam Üre,Arginaz,Protein,% µ g NH ₄ Değerleri-----	72

ŞEKİLLER

Şekil 1: Amonyak Metabolizması-----	2.
Şekil 2: Üre Döngüsü-----	4
Şekil 3: Faciola hepatica'da Arginin Katabolizması-----	10
Şekil 4: Moniezia benedeni Olgun halkası-----	13
Şekil 5: Moniezia benedeni'nin Yumurtası-----	13
Şekil 6: Moniezia benedeni'nin Çeşitli Gelişme Safhaları-----	14
Şekil 7: Oribatidealardan Çeşitli Türler-----	14
Şekil 8: Moniezia benedeni'nin Biyolojik Gelişme Siklusu-----	15
Şekil 9: TDMU Metodu İçin Standart Üre Eğrisi-----	21
Şekil 10: Moniezia benedeni Arginaz Enziminin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.-----	26
Şekil 11: Moniezia benedeni Arginaz Enziminin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.-----	27
Şekil 12: Moniezia benedeni Arginazının Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.-----	28
Şekil 13: Moniezia benedeni Arginazı İçin En Yüksek Aktiviteyi Veren pH'nın Saptanması.-----	30
Şekil 14: Moniezia benedenide Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Miktarına Bağlı Olarak Değişimi.-----	33
Şekil 15: Mn^{++} İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının Moniezia benedeni Arginazı Üzerindeki Etkileri.-----	34
Şekil 16: Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Değişimi-----	36
Şekil 17: Moniezia benedeni Arginazının L-Arginine Karşı Olan K_m 'nin Lineweaver-Burk Yöntemi İle Saptanması-----	37

Şekil 18: Fraksiyonel-Santrifüjasyon ile Arginazın Hücre İçi Yerleşiminin Saptanması-----	40
Şekil 19: Değişik Ornitin Konsantrasyonlarının Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri.-----	42
Şekil 20: Ornitinin Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.-----	43
Şekil 21: Ornitinin Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver- Burk Yöntemi İle Değerlendirilmesi.---	44
Şekil 22: Değişik Lizin Konsantrasyonlarının Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi-----	45
Şekil 23: Lizinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.-----	46
Şekil 24: Lizinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi İle Değerlendirilmesi.-----	47
Şekil 25: Moniezia benedeni Arginazı Üzerine EDTA'nın İnhibisyon Etkisi-----	49
Şekil 26: EDTA'nın Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi-----	50
Şekil 27: EDTA'nın Moniezia benedeni Arginaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluklarına Bağlı Olarak Değişiminin Lineweaver-Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.-----	51
Şekil 28: M.benedeni Arginazı Üzerine p-CMBA'in İnhibisyon Etkisi----	52
Şekil 29: p-CMBA'in M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.-----	53
Şekil 30: p-CMBA'in Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi İle Değerlendirilmesi--	54

Şekil 31: <u>M.benedeni</u> Arginazı Üzerine N-Etil Malemit'in İnhibisyon Etkisi-----	56
Şekil 32: N-Etil Malemit'in <u>M.benedeni</u> Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.-----	57
Şekil 33: N-Etil Malemit'in <u>M.benedeni</u> Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi---	58
Şekil 34: Moniezia benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Metilen Mavisi Derişimlerinin Etkisi.-----	59
Şekil 35: Metilen Mavisinin Moniezia benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat yoğunluklarına Göre Etkisi-----	60
Şekil 36: Metilen Mavisinin <u>M.benedeni</u> Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi İle Değerlendirilmesi---	61

I.BÖLÜM

GİRİŞ

1.1.ÜRE SENTEZİ

Canlılar tarafından besinlerle alınan proteinler,gastrointestinal sistemde proteaz ve peptidaz enzimlerinin etkisi ile peptitlere ve amino asitlere kadar parçalanmaktadırlar. Canlı organizma sindirim kanalından emilen amino asitleri,plazma ve doku proteinlerinin,enzimlerin protein yapılı hormonların,pürin ve primidinlerin sentezinde ve enerji üretiminde kullanır.Amino asitlerin katabolizması amino gruplarının transferi ile başlar ve bu olay daha çok karaciğer hücrelerinde meydana gelir.

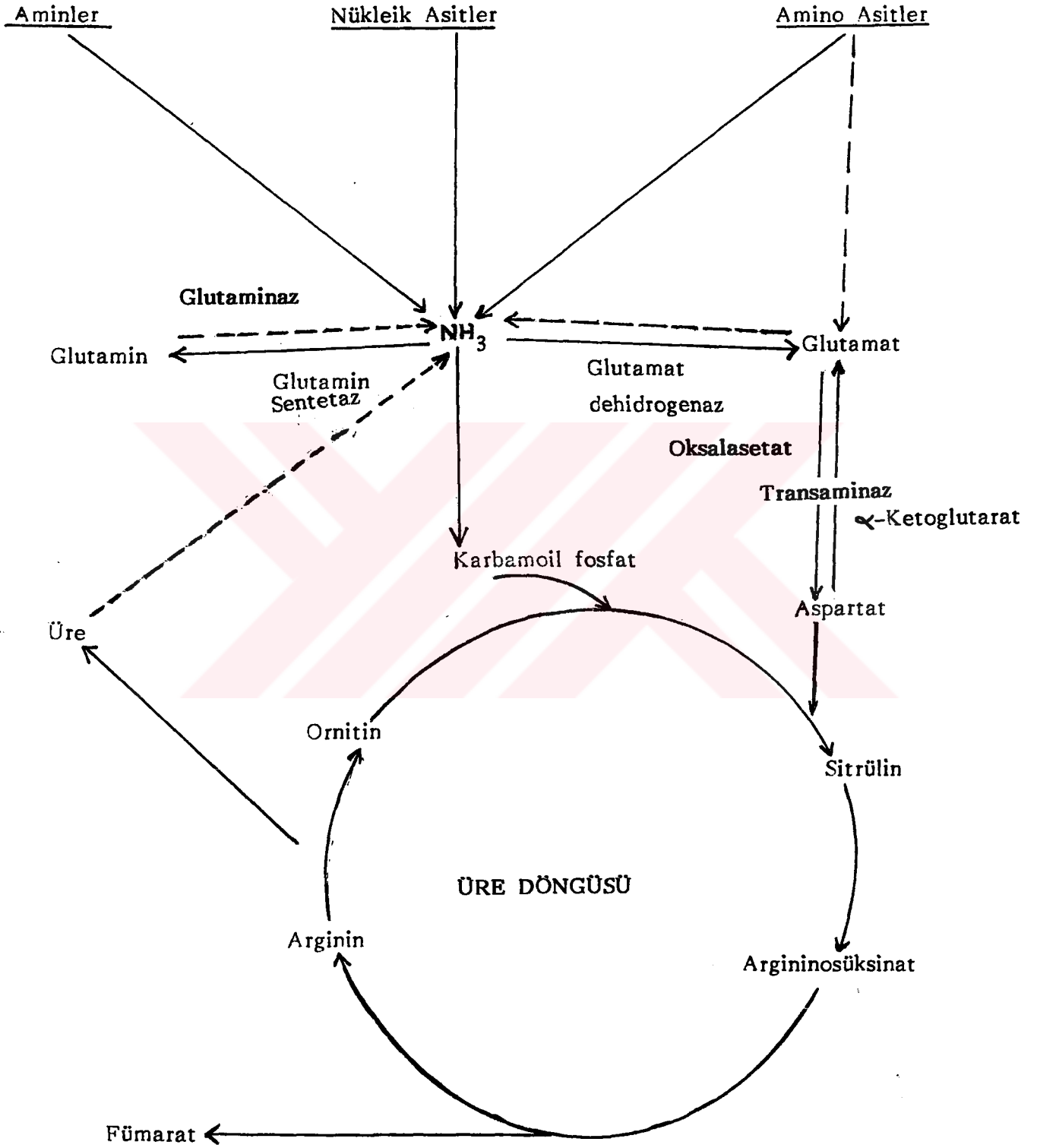


Amino asitlerin amino grupları transaminasyon reaksiyonları ile α -ketoglutarik asit'e transfer edilerek L-Glutamik asit'in meydana gelmesine neden olurlar.L-Glutamik asit de hücrelerin sitoplazmalarından mitokondrialarına girer ve NAD gerektiren Glutamat dehidrogenazla tekrar α -Ketoglutarik asite ve amonyağa dönüşür(1). Organizmada önemli miktarda amonyak da bu yolla meydana gelmiş olur. Amino asitlerin yıkımı ile açığa çıkan amonyak çok toksik bir madde olduğundan en kısa zamanda organizmadan uzaklaştırılması gerekir.

Azot metabolizmasında merkezi bir yere sahip olan amonyağın karaciğerdeki metabolik rolü Şekil1'de gösterilmiştir(2).

Amonyağın organizmadan atılımı canlının bulunduğu ortamdaki

AMONYAK METABOLİZMASI (2)



Şekil: 1

su miktarına bağımlı olarak farklılıklar gösterir. Azot metabolizmasının son ürünlerine göre canlılar üç grupta toplanmaktadır.

1-Amonyotelik Grup:

Suda yaşayan tüm canlılar amonyağı hiçbir değişikliğe uğratmadan amonyak olarak atarlar. Deniz memelileri bunun dışında kalırlar.

2-Üreotelik Grup :

Yaşadığı ortamda yeterli miktarda su bulunanlar ve karada yaşayan canlılar amonyağı Krebs-Henseleit üre döngüsü ile üre halinde atarlar. Suda yaşayan memeliler ve bazı omurgasızlar da bu grupta yer alırlar.

3-Ürikotelik Grup :

Suyun az bulunduğu koşullarda yaşayan sürüngenler ve tüm kanatlılar amonyağı suda daha az çözünen ürik asite çevirerek vücutlarından uzaklaştırırlar(3,4).

Üreotelik canlılarda üre, bir siklus sonunda arginin arginaz ile hidrolizinden meydana gelir. Arginin protein sentezi için gerekli bir amino asit olup bütün hücrelerde bulunmaktadır. Üre döngüsü her hücrede bulunmamakla beraber genellikle **arginaz (EC 3.5.3.1; L-arginin amidinohidrolaz)** üre döngüsü olmayan organizma ve organlarda da bulunmaktadır. Karaciğer hem arginazı hemde üre döngüsünün diğer enzimlerini kapsadığından üre sentezinin önemli bir kısmı bu organda oluşmaktadır.

Üre sentezi: amino asitlerin yıkımı esnasında açığa çıkan serbest amonyak ,dekarboksilasyonlardan meydana gelen ve büyük bölümü solunumla atılan CO_2 ve iki mol ATP ile karaciğer hücrelerinin mitokondriasında karbamoil fosfat sentetaz I enzimi ile karbamoil fosfata dönüşmesi sonucu başlar (Şekil 2).Enzimin aktivasyonu N-asetil glutamat (NAG) ve Mg^{+2} iyonları ile sağlanmaktadır (5).

Ornitin transkarbamoilaz,karbamoil fosfatın karbamoil grubunu ornitine aktararak sitrülin'i oluşturur.Sitrülin aspartik asitle kondansasyona uğrayarak arginino süksinik asit teşekkül eder.Bunun hidrolizi ile arginin ve f marik asit oluşur.Meydana gelen arginin arginaz etkisiyle üre ve ornitini oluşturur.Ornitin tekrar reaksiyona girerek döngüyü yeniden başlatır.Ornitin döngüde temel madde olduğundan dolayı,Krebs-Henseleit  re döngüsüne ornitin-üre siklusu da denilmektedir.şekil 2 'de görüldüğü gibi üre sentezinde karbamoil fosfat ve sitr linin teşekkülü mitokondriada ,siklusun diğer reaksiyonları ise sitoplazmada meydana gelir.

Reaksiyonların devamlı oluşabilmesi için ornitinin mitokondriyaya girmesi,sitr linin ise mitokondriyayı terketmesi gerekmektedir(6).

Bu döngü ile bir mol ürenin atılması için 3 mol ATP'nin harcanması gerektiğinden bu metabolik yolun son derece masraflı olduğu da bilinmektedir.

Üre döngüsü olmayan koyun plasentasında da,ilerleyen gebelik süresine paralel olarak yükselen bir arginaz aktivitesi Edwards ve arkadaşları(7) tarafından gözlenmiştir.

Arginaz enziminin bulunduğu organlar arasında bağırsakta bulunmaktadırlisowska ve arkadaşları(8) Annelidalar ve insan dahil evrim sırasını takip eden 30 türde,bağırsaklarda arginaz aktivitesini ölçmüşlerdir.

Eritrositler Krebs-Henseleit  re döngüsü ile üre sentezleyemezler, fakat aktif bir arginaza sahiptirler.At,sığır,koyun(9) ve insan(10,11) eritrositlerinde enzimin varlığı gösterilmiştir.Bununla beraber keçi tavuk eritrositlerinde arginazın varlığına rastlanmayıp arginin düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır(12).

Özellikle insan eritrositlerinde arginaz aktivitesinin düşük

düzeyde olması veya bulunmaması Arginemia denilen ve ciddi sonuçlar doğuran metabolik bozukluklara neden olmaktadır(13).

Gülen ve Özgen'in(14) yaptıkları çalışmada koyunlarda gebelik ve laktasyon sürelerine bağlı olarak amonyakın bir kısmının orotik asit halinde idrar ve süt ile atıldığı bildirilmiştir.

Üreotelik olmayan organ ve organizmalarda bulunan arginazın varlığı konusunda değişik görüşler bulunmaktadır.

Gülen(15) bu konuda; "Arginaz ,üre döngüsü olmayan organizma ve organlarda da bulunmakta ve bu biyolojik sistemlerde ,çeşitli kaynaklardan sağlanan argininin hidrolize olmasını katalize etmektedir .Üre döngüsünün olmadığı sistemlerde arginazın varlığının nedeni ve fonksiyonu bugün modern biyokimyanın cevaplandıramadığı sorulardan biridir" demektedir.

Campbell'e(16) göre evrimin ilk dönemlerinde bütün canlılarda üre döngüsü bulunmakta idi.Evrin süresince canlılar çevre koşulları ile uyum sağlamak için bazı biyokimyasal değişmelere uğramışlardır.Bu dönem süresince ya yeni biyokimyasal sistemler kazanmış veya bazılarınıda gerek kalmadığı için kaybetmişlerdir.Bu varsayıma göre,ürikotelik sistemlerde üre döngüsünün bazı enzimleri kaybolduğu halde arginaz varlığını muhafaza edebilmiştir(16).

Bazılarına göre de arginaz ,poliamin biyosentezinde ilk basamak olarak kabul edilir.Arginin arginazla hidrolize olduktan sonra oluşan ornitin,ornitin dekarboksilaz ile poliamin biyosentezini başlatmaktadır (17,18).

Ratner'de(19,20,21) kanatlılarda arginazın varlığını bu nedenlere bağlamakta ve enzimi"Evrinden arta kalmış" olarak vasıflandırmaktadır.

Sıçanların meme dokusunda tam çalışan bir üre döngüsü bulunmamaktadır. Arginazın sıçan meme dokusunda gebeliğin son zamanlarında belirgin olmaya başladığı ve laktasyon dönemlerinde en yüksek düzeye

ulaştığı Yip ve Knox(22) tarafından gösterilmiştir.

Ozan ve Gülen(23) ilk kez sığır tükürük bezlerinde,eritrosit ve karaciğerlerinde arginazın varlığını ve bazı özelliklerini göstermişlerdir.

Arginazın ozmoregülasyon için gerekli olup olmadığı tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Labratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada;sığırlarda ve koyunlardaki arginazın eritrositlerde'de aktif olduğunu ama bu aktivite-lerin hiç bir zaman bir karaciğer düzeyinde olduğu gibi yüksek olmadığı saptanmıştır(12).

Keçi eritrositlerinde her ne kadar enzimatik olarak arginaz aktivitesi saptanamamışsa da hemolizatlarda üreaza spesifik üre saptanabilmiştir. Bu durumda keçi eritrositlerinde üreaza hassas(sensitiv) ürenin bulunması arginaz aktivitesinin bulunmaması büyük bir olasılıkla bize belirtildiği gibi arginazın dayanıklı olmadığını göstermektedir(12).

Arginazın Moleküler Yapısı:

Arginazın moleküler ağırlığı hakkında çeşitli buluşlar mevcuttur. Schimke'ye göre sıçan karaciğer arginazının moleküler ağırlığı 142.000 daltondur(24).

Bir başka araştırmacı grup ise, arginazın moleküler ağırlığının 118.000 dalton olduğunu,ve enzimin moleküler ağırlığı 30.000 dalton olan dört alt birimden oluştuğunu çalışmalarında bildirmişlerdir(25).

Farooqui ve grubu, kobay karaciğer arginazının moleküler ağırlığını 130.000 dalton olarak saptamışlardır(26).At karaciğerinde ise enzimin moleküler ağırlığının 38.000 dalton olduğunu Greenberg ve grubu tarafından bildirilmiştir(27).

Moro ve grubu ise, tavuk karaciğeri arginazının moleküler ağırlığının 276.000 dalton olduğunu saptamışlardır(28). Ayrıca Moro

Neurospora crassa'da arginazın 278.000 daltonluk bir moleküler ağırlığa sahip olduğunu belirlemiştir(28).

Yukarıdaki veriler göz önüne alınırsa;üriketelikle arginazlarının moleküler ağırlıkları üreoteliklerinkinden bir misli daha fazla olduğu saptanmıştır.

Tiol(sülfihidril) gruplarının enzim aktivitesinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. -SH ve S-S gruplarının arginaz aktivitesi için gerekli olup olmadığı araştırılmıştır.At karaciğeri enziminin aktivitesinde -SH ve S-S gruplarının etkileri bulunmaktadır(27). Aynı şekilde serbest SH gruplarının rolü, sıçan karaciğeri arginazında Ber ve arkadaşları (29) tarafından incelenmiştir.Arıtılmış sıçan karaciğer enziminin aktivitesi p-kloromerküribenzoat ve N-etilmaleimid'in 200 mM 'a varan derişiminden etkilenmemiştir.Ber ve grubu(29) bu sonuçları sıçan karaciğeri arginazının serbest -SH gurubu içermediğine kanıt olarak yorumlamıştır.

Arıtılmış sıçan karaciğer ve insan tükürük arginazları metilen mavisi varlığında 150 watt'lık ışık kaynağına maruz bırakıldığı zaman enzimdeki histidil artıklarının modifikasyonu sonucu katalitik aktivitelerini önemli ölçüde kayıp ettiği ortaya konulmuştur(30,31).

1.2.Parazitlerde Üre Biyosentezi :

Memelilerde ve memeli olmayan sınıflarda üre döngüsünün enzimleri ve denetimleri birçok araştırmacı tarafından incelendiği halde; parazitlerde üre metabolizması ve enzimleri hakkındaki çalışmalar çok kısıtlıdır. Parazitlerde tam çalışır bir üre döngüsünün varlığı gösterilememiş olmasına rağmen parazitlerin büyük bir çoğunluğunda genellikle arginazın varlığı tesbit edilebilmiştir.Döngünün ilk enzimleri olan karbamoil fosfat sentetaz ile ornitin transkarbamoilaz büyük çoğunluğunda saptanamamış-

tır.Arginino süksinat sentetaz ve liyaz enzimleri ise bazı türlerde gösterilmiş bazılarında ise gösterilememiştir. Bu nedenle parazitleri amonyanın detoksifikasyonu bakımından sınıflandırma olanağı yoktur.

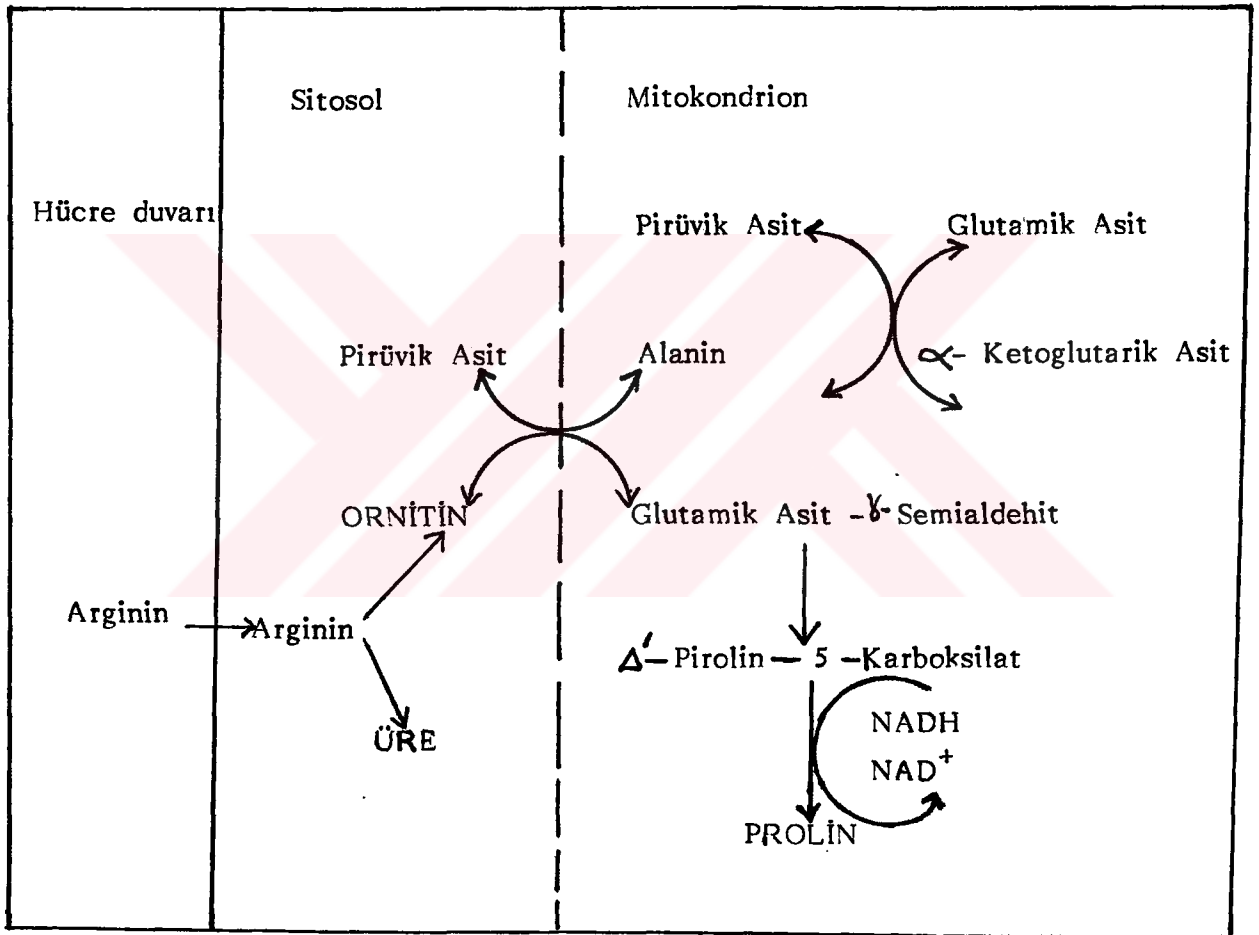
Aynı bir canlılar grubunu oluşturan parazitlerde üre biyosentezi konusunda yapılan araştırmalarda sadece serbest yaşayan bir nematod olan **Panagrellus silusiae**'de üre döngüsünün varlığı septanmış ise'de döngünün enzimlerinin aktiviteleri çok düşük bir düzeydedir(32).Bunun dışında paraziter helmintlerde(Trematodlar,Cestodlar,Nematodlar) tam çalışan bir üre siklusunun varlığı ortaya konulamamıştır.Jansens ve Kurelec(33)**M.expansa**,**E.granulosus**,**D.caninum**,**T.pisiformis**,**F.hepatica**'da, **T. canis** ve **M.dubius**'ta ornitin üre siklusunu incelemişler,karbamoil fosfat sentataz aktivitesini sadece **F. hepatica**'da argininosüksinat sentataz aktivitesin **M. expansa** ve **T.pisiformis**'te argininosüksinat liyaz ve arginaz aktivitelerini **M.dubius** hariç hepsinde ,ornitin transkarbamoilaz aktivitesini ise **D. caninum** dışındaki diğer parazitlerde bulduklarını bildirmişlerdir(33).Karbamoil fosfat sentetaz bazı helmintlerde bulunduğu bildirilmesine rağmen daha sonraki araştırmalarda varlığı doğrulanamamıştır(32).

Yapılan çalışmaların bir çoğunda parazitlerde arginaz enziminin varlığı kanıtlanmıştır.**Hymenolepis dimunata** (34),**Schistosoma japonicum**(35),**Fasciola hepatica**(36,37,38),**Ascaris lumbricoides** 'te(39) arginazın varlığı ortaya çıkarılmıştır.

Fasciola hepatica'da arginazın varlığının biyokimyasal önemini Kurelec(33),Şekil 3 'de gösterilen prolin sentezine bağliyerek izaha çalışmaktadır.

Konunun biyokimyasal izahı Kurelec'e göre(33) şöyledir;

"Bu metabolik yol ile prolin sentez edilirken glukoz oksidasyonu sırasında indirgenen NAD tekrar oksitlenmekte ve glikolisis için hazırlanmaktadır.



Şekil 3 : *Fasciola hepatica*'da Arginin Katabolizması (33)

Görüşün karanlıkta kalan kısmı,Kurelec'inde kabul ettiği gibi,bu yolla oksitlenen NADH'ın toplam oksidasyon-redüksiyon olaylarına olan katkısıdır" denilmektedir(33).

Paraziter helmintlerde azot metabolizmasının son ürünü olarak % 2-10 üre,% 3 ürik asit'in atıldığı ve ayrıca larval Cestodlarda ve nematodlarda amin salgılandığı belirtilmiştir.Cestodlardan T.taeniaeformis ve nematodlardan A. lumbricoides, N.brasiliensis ve T.spiralis'in larvalarının amin salgıladıkları bildirilmiştir.Yine E.granulosus hidatik kistlerinden alınan protoskolekslerde amin olarak betain tesbit edilmiştir(32).

Paraziter helmintlerde üre ve ürik asitin gerekse çok toksik olan aminlerin varlığının biyokimyasal izahı henüz yapılamamıştır. M.benedeni'de de tarafımızdan arginaz enziminin varlığı saptanmıştır .

1.3. Moniezia benedeni'nin Oluşumu , Yapısı ve Özellikleri:

M.benedeni sığırların ince barsaklarında yaşamını sürdüren ve ince bağırsaklarda bol miktarda bulunan Anocephalidea ailesine ait bir Cestod türüdür.Bu parazit hayvanları kaşeksiye uğratarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Bu parazit 0.5 -4 m uzunluğuda 2.5 cm genişliğindedir.Halkaları geniş ve kısadır ,her halkada ikişer tane tenasüllü kısım bulunmaktadır. İki halka arasında interproglottideal bezleri vardır.Bunlar grup tarzında 12-30 adettir.Her bir halkada 300-400 testis bulunmaktadır(40)(Şekil 4).

Bu parazitin yumurtaları ya bağırsaklarda serbest hale geçerek gaita ile dışarı çıkarlar veya olgun halkalarla dışarıya atılıp dışarıda çürüme neticesi serbest hale gelirler(Şekil 5). Bu yumurtalar gri renkte ve tavla zarı şeklinde olmaları ile karakterize edilirler .Onkosferleri yumurta içinde ve armut biçiminde bir membran dahilinde bulunurlar(Şekil 5) .

Bunların biyolojileri ilk önce 1937'de Stunhard tarafından ortaya koyulmuştur. Gaita ile dışarıya çıkan yumurtalar ,iyice kurumadan akarlar tarafından alınmazlar(41).

Arakonakçı olarak sorumlu olan akarlar; *Galumna emarginatum*, *G. nigra*, *G. virginienensis*, *G. obivus*, *Schelaribates laevigatus*, *Potoschelobates seghetti*, *Oribatula minutus*, *Cepheus ocellatus*, *Damoerus monilipes*, *Seutovertex maculatus*, *Notaspis lacustris*, *Notaspis licnophorustur*. Bu akarlar ıslak yerlerde fazla miktarda bulunup ,ağaç gölgelerinin ve 15 cm kadar uzun olan çayır otlarının bulunduğu yerlerde görülürler. Şiddetli yağmurlardan sonra meralarda daha fazla raslanmaktadır (Şekil 7).

Gaita ile dışarıya atılan yumurtalar kuruduktan sonra koprofaj akar tarafından alınır. Otların dibinde yaşayan bu akarların vücut boşluğunda *cyticercoïd* şeklini alırlar. Bu akarlar rutubetli sıcak havalarda çayır yapraklarının üzerine çıkar, sığırlarda merada bu gibi enfekte olmuş koprofaj akarları yutmakla bu paraziti almış olurlar(Şekil 8)(42).

Gevişenlerin bağırsaklarında bu *cysticercoïdler* serbest kalmakta ve larvanın *scolexi* son konakcının bağırsak mukozasına yapışarak orada gelişmeye ve büyümeye başlamaktadır. Bunların gelişmelerini tamamlama süresi her parazit türüne ve iklim şartlarına göre değişiklik göstermekte ancak bu müddet uzun olmaktadır(Şekil 6). (43)

M. benedeni sığırlarda **Monieziasis** denilen hastalığa yol açmaktadır. *Monieziasis* hastalığı klinikman kronik, akut ve subklinik seyretmekte ve bazan diğer hastalıklarla komplikasyon halinde bulunmaktadır. Genel olarak olayların çoğunda *Moniezia* enfeksiyonları kronik bir seyir takip

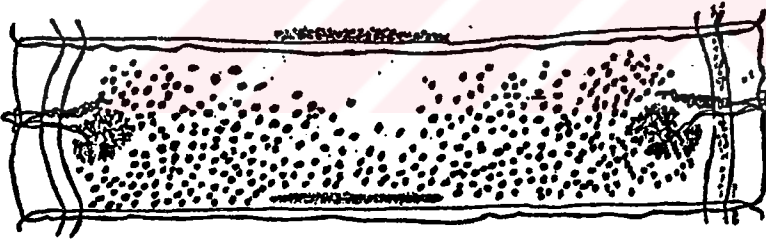
etmektedir. Bu halde ;

1-En çok dikkati çeken klinik işaret,yavaş ilerleyen bir anemi olup,bu durum Trichostrongylosis ve Fascioliasis enfeksiyonlarındakine benzerse de tabiatıyla son hastalığa oranla daha az ciddi olmaktadır .

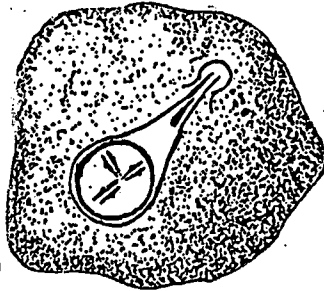
Hayvanlarda zafiyet görülmektedir.Hayvanların tüyleri kuru sert olmakta , kolay kırılmakta ve büyümeleri gecikmektedir.Kan tablosunda kötü beslenen hayvanlarda görülen anemiye benzer bir kansızlık,alyuvarlarda azalma ve hemoglobin düşüşü dikkati çekmektedir.

2-Sindirim bozuklukları enfeksiyonun ancak sonunda başlamakta ve fazlada belirli olmamaktadır. Bu bozukluklar diyare ile kendini göstermekte sonradan konstipasyon bunun yerini almakta ve bazen bağırsakların tam atonisi ile sonuçlanmaktadır.

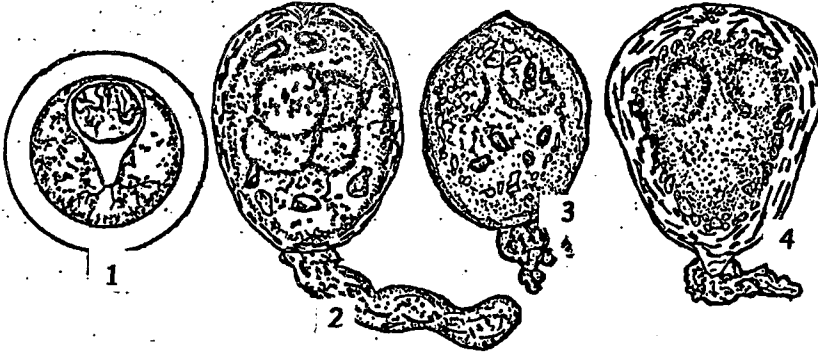
Lokal septomlar ise ,büyük ölçüde ince bağırsakları etkileyen değişik derecelerdeki enteritistir.Akut şeklinde bu enteritis exudatif ve bazen ise hemorajik olmaktadır(41).



Şekil 4 : Moniezia benedeni olgun halkası.



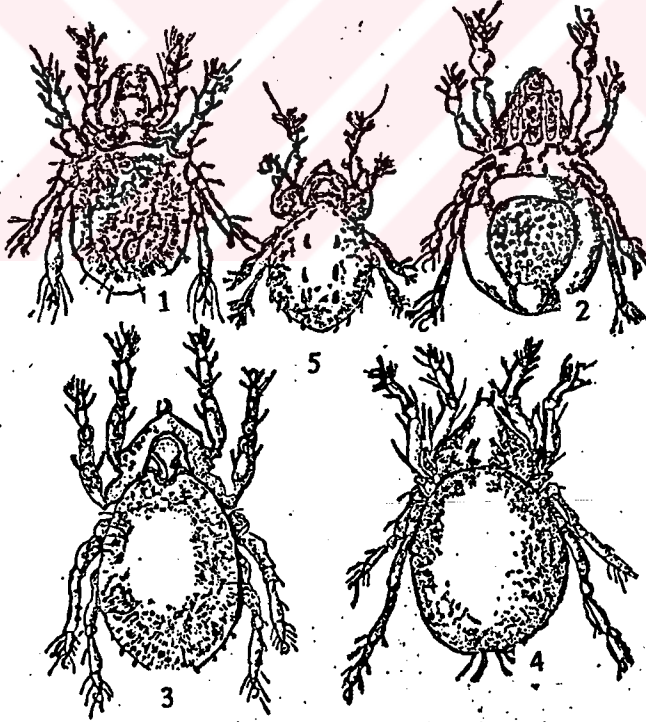
Şekil 5 :Moniezia benedeni'nin Yumurtası



Şekil 6 : Moniezia benedeni'nin Çeşitli Gelişme Safhaları

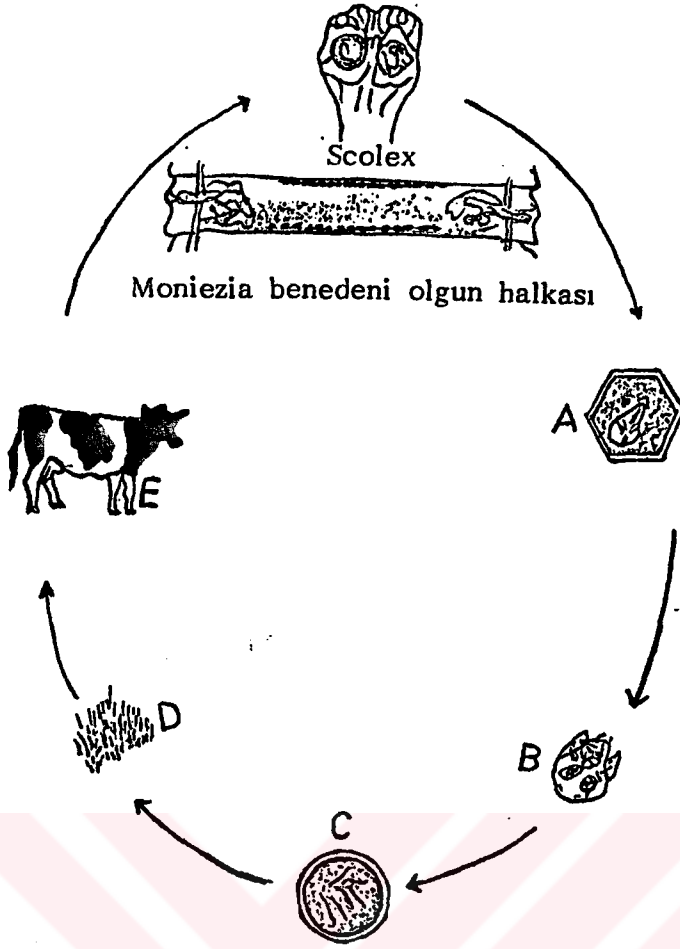
1-Armut biçimi apareyi taşıyan yumurta

2,3,4 Oribatidae'lerin organizmasında Cysticercoide'in büyümesi.



Şekil 7 : Oribatidae'lerden çeşitli türler

1-Cepheus ocellatus 2-Damoeus monilipes 3-Scutovertex maculatus 4-Notaspis lacustris 5-Notaspis lichenophorus



Şekil 8: Moniezia benedeni'nin biyolojik gelişme siklusu(43)

(Morgan ve Hawkins'e göre)

A-Gaita ile çıkan yumurtanın şekli

B-Yumurtalar koprofaj akarlar tarafından alınır

C-Otların dibinde yaşayan bu akarların vücut boşluğunda Cysticercoid şeklini alırlar.

D-Bu akarlar rutubetli sıcak havalarda çayır yapraklarına çıkarlar.

E-Sığırlar merada bu gibi enfekte olmuş koprofaj akarları yutmakla bu şeridi almış olurlar.

1.4.Araştırmanın Amacı:

Monizia benedeni sığırları kaşeksiye uğratarak ekonomik kayıplara neden olup, ulusal ekonomimize zarar veren bir parazittir.

Bu araştırmada M.benedeni Arginazının varlığı ilk kez saptanarak enzimin genel ve kinetik özelliklerinin yanısıra biyokimyasal koşulları optimize edilmiştir.

Yaptığımız bilgi taramalarında konu ile ilgili daha önce hiç bir araştırmaya raslanmamıştır.



II.BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

II.1.Parazitlerin Toplanması:

Araştırmada kullanılan *Moniezia benedeni*'ler Elazığ Et ve Balık Kurumu kesim evinde kesilen sığırların ince bağırsaklarından elde edilmiştir.

Yeni kesilen sığırların ince bağırsaklarından alınan *M.benedeni*'ler % 0.9 soğuk NaCl çözeltisi içeren beherlere aktarılmış ve en kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir.Laboratuvara getirilen parazitler tekrar isotonik %0.9 NaCl çözeltisi ile yıkanarak bağırsak içerikleri uzaklaştırılmıştır.Temizlenen parazitler ya hemen kullanılmış veya daha sonra kullanmak üzere -20 °C de derin dondurucuda (Deep-Freeze) saklanmıştır.

II.2.Kimyasal Maddeler:

Araştırmada kullanılan L-Arginin,üre,triklor asetik asit,tris (hidroksi metil-amino metan) ,sodyum karbonat,sodyum hidrojen karbonat,mangan klorür,metilen mavisi,sülfirik asit,fenol,sodyum nitro purisit,disodyum hidrojen fosfat ve amonyum sülfat, Merck(Batı Almanya) firmasından alınmıştır.

Diasetilmonokzim,tiosemikarbazit,L-Ornitin,EDTA(Etilen diamintetra -asetik asit),L-Glisin,L-Lizin,N-Etilmaleimide,p-cMBA(Parakloromercuri-benzoik asit) Sigma Chemical Company(ABD) den temin edildi.

Araştırmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup piyasadan sağlanmıştır.

III.3. KULLANILAN CİHAZLAR

- 1-Potter-Elvenjem(Cam-cam) homojenizatör.
- 2- Potter-Elvenjem (Cam-teflon) homojenizatör.
- 3-Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge.
- 4-UV/Vis Spectrofotometer(Shimadzu UV-240).
- 5-Deep Freeze (Bosch).
- 6-pH-metre(Schott -Mainz).

II.4.METODLAR

II.4.1.Arginaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi:

Tiosemikarbazit diasetilmonokzim üre(TDMU) yöntemi esas alınarak arginaz düzeyleri saptanmıştır(44).

KULLANILAN AYIRAÇLAR:

Asit Ayıracı:(1 litre için)

H_2SO_4 (%98 lik) den 206 ml

* $FeCl_3$ Ayıracından 1 ml

alınıp 793 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Renk Ayıracı:(1 litre için)

0.33gr Tiosemikarbazit

6.24 gr Diasetilmonoksim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

***Demir klorür Ayıracı:**

6.67 ml H_3PO_4 (%85 lik) ,3.33 ml H_2SO_4 (%98 lik) 0.32 gr $FeCl_3$ ilave edilmiştir.

120 mM L-Arginin Çözeltisi :2.527 gr L-Arginin(Mol.wt: 210.66 g/mol) tartılıp distile su ile pH'sı 9.5 'a 100 ml'ye tamamlanarak getirilmiştir.

Kullanılan Tampon Çözeltiler:

125 mM Sodium Karbonat- Sodiumbikarbonat Tamponu(pH:9.2-11):

2.625 gr NaHCO_3 (Mol.wt:84.01 g/mol)) tartılıp, 250 ml distile su içinde eritildi.3.31 gr Na_2CO_3 (Mol.wt:105.99 g/mol) tartılıp 250 ml distile suda çözüldükten sonra NaHCO_3 behere koyulup Na_2CO_3 ile tampon çözeltinin pH'ları ayarlandı.

125 mM Tris-HCl Tamponu(pH:7.1-8.9):1.514 gr Tris(Hidroksi metil-amino metan) 100 ml distile suda çözüldü.Daha sonra Tris(Mol.wt:121.14 g/mol) çözeltisi beher glase koyulup 125 mM HCl(%37 lik) çözeltisi ile pH'sı ayarlandı.

125 mM Glisin-NaOH Tamponu(pH:8.78-10.6): 0.937 gr Glisin (Mol.wt:75.07 g/mol) 100 ml distile suda eritildi . 0.5 gr NaOH(Mol.wt:40 g/mol) tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.Daha sonra 125 mM Glisin beher glase koyulup 125 mM'lık NaOH çözeltisi ile pH'ları ayarlandı.

Kullanılan İnhibitör Çözeltiler

40 mM L-Ornitin Çözeltisi:0.674 gr L-Ornitin(Mol.wt:168.6 g/mol) tartılarak 100 ml distile su içinde eritilmiştir.

40 mM L-Lizin Çözeltisi:0.728 gr L-Lizin(Mol.wt:182.7) tartıldı ve 100 ml distile suda eritildi.

4 mM EDTA(Etilen diaminotetra -asetik asit) çözeltisi:0.1344 gr EDTA(Mol.wt:336.2 g/mol) tartıldı 100 ml distile suya tamamlandı.

100 uMol p-CMBA Çözeltisi:0.036 gr p-CMBA(Mol.wt:357.2 g/mol) tartılıp 1 litre distile suya tamamlanmıştır.

100 uMol NEM(N-Etil Malemit) Çözeltisi:0.0125 gr N-Etil Malemit

(Mol.wt: 125.1 g/mol)1 litre distile suya tamamlandı.

0.3 mM'lık Metilen Mavisi:0.096 gr Metilen mavisi(Mol.wt:319.86 g/mol tartılıp 1litre distile su içinde eritilmiştir.

METOD

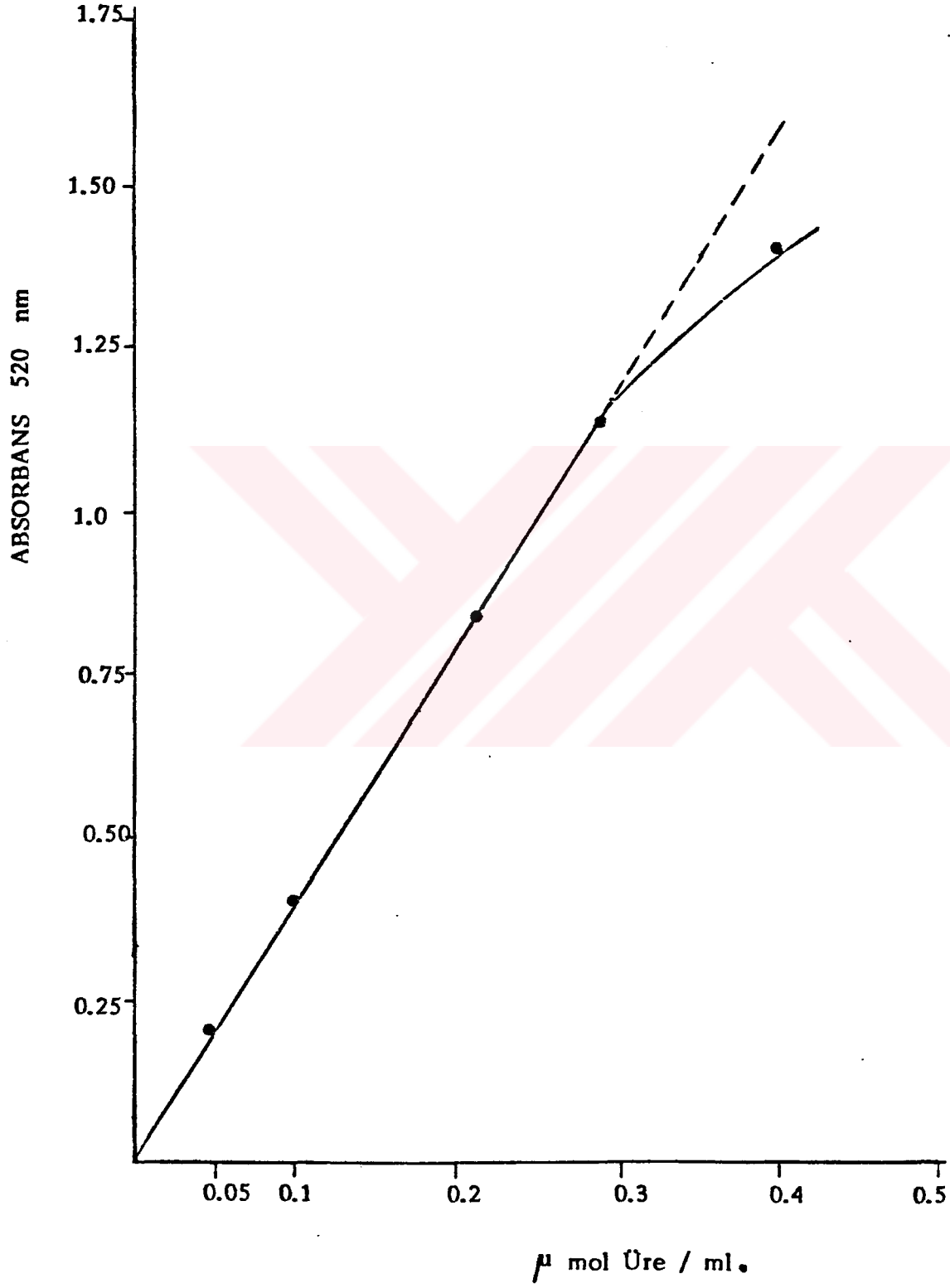
Arginaz Aktivitesi:

L-Arginin arginaz ile hidrolizi sonucu oluşan üreninT.D.M.U. (Thiosemicarbazide-diacetylmonoxime urea) yöntemi ile ölçülmesi sonucu saptanmıştır(44).

Alınan **M.benedeni** örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında tutulup,4 gr tartılarak (ağırlık/hacim) saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır(dilusyon oranı 1x5 tir).Daha sonra bu örnekler Potter-Elvenjem (cam-cam) homojenizatörle homojenize edilip homojenatlar +4 °C15000 r.p.m'de (Sorvall RC-5B) 15 dakika santrifigasyon işlemine tabii tutulmuştur. Santrifigasyon işleminden sonra örneklerin süpernatant ve pellet kısımları birbirlerinden ayrılmıştır.Daha sonra **M.benedeni** süpernatantlarının her mililitresi için 3 ünite "Jack Bean" üreaz ilave edilmiş,30 °C'de 10 dakika inkube edilerek endojen ürenin parçalanması sağlanmıştır(23).

Üreaz tepkimesi sonunda örnekler 0.5 mM'lık $MnCl_2$ çözeltisi ile 40 misli sulandırılmıştır ve bu örnekler 53 °C 'de 10 dakika metabolik su banyosunda,tutularak preinkübasyon işlemi sağlanmıştır.Preinkübasyon işleminden sonrada örnekler enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Enzimatik karışım 1ml olup 36 mM'lık L- Arginin(pH:9.5) ve 50 mM'lık karbonat tamponu (pH:9.5) 0.3 ml enzim kaynağı içerecek şekilde düzenlenmiştir.Tüplere sırası ile önce L-Arginin ve sonra karbonat tamponu daha sonrada üzerlerine preinkübasyona tabi tutulmuş enzim kaynağından 0.3



Şekil 9 : TDMU Metodu için Standart Üre Eğrisi.

ml eklenerek örnekler 37⁰C 'de sallantılı metabolik su banyosunda 15 dakika tutularak enzimatik tepkime başlatılmıştır .15 dakikalık inkübas -
yon süresi 3 ml Asit karışımı ilavesi ile sona erdirilmiştir.Asit ilavesin-
den sonra tüplere 2 ml renk ayıracı ilave edilmiş tüpler vortex-mixerde
karıştırılarak ve 10 dakika kaynar su içinde tutulmuş ve renk oluşumu
sağlanmıştır.

520 nm(UV/Vis Spectrofotometer–Shimadzu UV-240) dalga boyunda
örneklerin üre miktarları sıfır zaman körlerinin absorbanslarının(Zero
time Blank) çıkarılmasından sonra değerlendirilmiştir.

II.4.2. Protein Ölçümü :

Protein miktarları Biüret yöntemi ile saptanmıştır(45)

Biüret Yöntemi:İki veya daha fazla peptid bağı içeren proteinlerin
alkali ortamda bakır iyonları ile erguvani(mor) renk alma esasına dayanır.

Biüret Ayıracı:1.5 gr bakır sülfat ve 6 gr sodyum potasyum tartarat 500
ml distile su içinde çözüldü.300 ml % 10'luk(w/v) sodyum hidroksit ilave
edildi. Toplam hacim 800 ml'e tamamlandı.

Standart protein:2.5 mg BSA(Sığır serum albumin)/ml dir.

Metod

	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>Örnek</u>
Süpernatant(ml)	–	–	1
Protein Standartı(ml)	–	1	–
Distile Su(ml)	1	–	–
Biüret Ayıracı(ml)	4	4	4

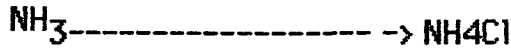
İyice karıştırılır ve 30 dakika oda ısısında tutularak 540 nm'de okunur.

Hesaplama:Örnek Absorbans/Standart AbsX2.5: mg Protein/ml

11.4.3.Amonyak Miktar Tayini:

Amonyak miktar tayini Bauer'e göre yapılmıştır(46).

Prensip:Amonyak deproteinizasyon yöntemi ile süpernatanta geçirilir. Süpernatant hipoklorit ile muamele edilince amonyum klorüre dönüşür Buda fenolik ortamda indo fenol denilen kompleks yapı oluşturur.Oluşan mavi rengin yoğunluğu ortamdaki amonyak miktarı ile orantılıdır.



Ayırıcılar

Fenol ayıracı: 5 gr fenol,25 mg sodyum nitro purisit bir miktar suda çözülür, distile su ile 500 ml'ye tamamlanır ve siyah şişede saklanır.

Hipoklorit ayıracı: 45 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$,5 gr NaOH suda çözülür. 5ml % 5 NaOCl eklenir distile su ile 500 ml 'ye tamamlanır.

Standart Çözeltisi : 0.472 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000 ml distile suda çözüldü ve çözelti%10000 mg NH_4 içermektedir.

METOD

Santrifüj tüplerine 2ml %10'lukTCA (Triklor asetik asit) konuldu; üzerine 2 ml hazırlanmış M.benedeni süpernatantı konulup daha sonra cam bagetle iyice karıştırılarak, 10 dakika 3000 rpm de santrifüj edilip süpernatantlar alınarak saklanır.

Metod iki seri halinde yapılmıştır.

1.SERİ

	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>
Standart Çözeltisi(ml)	–	0.04
Deiyonize Su(ml)	2	1.96
TCA(Triklor asetik asit ml)	2	2

Tüpler parafilm ile kapatılıp iyice karıştırılır.

2.SERİ

	<u>KÖR</u>	<u>STD.</u>	<u>ÖRNEK</u>
1. Seri(Kör) ml	0.5	–	–
2.Seri Standart(ml)	–	0.5	–
Örneğin Süpernatantı(ml)	–	–	0.5
Fenol Ayıracı(ml)	6	6	6
Hipoklorit Çözeltisi(ml)	6	6	6

Tüpler iyice karıştırılır 37 °C deki su banyosunda 30 dakika bekletilir.

625 nm dalga boyunda spektrofotometrede su körüne karşı okunur.

Değerlendirme: % NH₄ u gr= $\frac{\text{Örnek O.D}-\text{Kör O.D}}{\text{Std O.D}-\text{Kör O.D}} \times 200$

Std O.D- Kör O.D

Sıfır ayarı deiyonize su ile yapıldı.

II.4.4.Ürenin Ölçülmesi

Üre miktarları ise T.D.M.U.(Thiosemicarbazide-diacetylmonoxime urea) yöntemi esas alınarak yapılmıştır(44)

Ünite: μ mol üre/mg. ProteinXSaat olarak alınmıştır.

1 mg proteinin 1 saatte oluşturduğu üre miktarının μ mol cinsinden ifadesidir.

III.BÖLÜM

BULGULAR

III.1.Moniezia benedeni'de Arginaz Aktivitesinin Aranması:

M.benedeni 'de arginazın varlığının saptanmasından sonra, bu parazitde bulunan enzimin kinetik özellikleri tesbit edilmiştir.

III.2.İnkübasyon Süresinin Tesbiti:

Moniezia benedeni arginazı için en uygun inkübasyon süresinin saptanmasında enzim kaynakları değişik zaman sürelerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve bunu arginin'in hidrolizi izlemiştir.Reaksiyon sonunuda meydana gelen ürenin zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlenmiştir.Şekil 10'da görüldüğü gibi üre sentezindeki artış zamana bağlı olarak 15 dakikaya kadar doğrusallığını koruyup ,bu sürenin sonunda lineerlik yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır.Bundan dolayı enzim için optimal inkübasyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir.

III.3.Preinkübasyon Isısının Tesbiti:

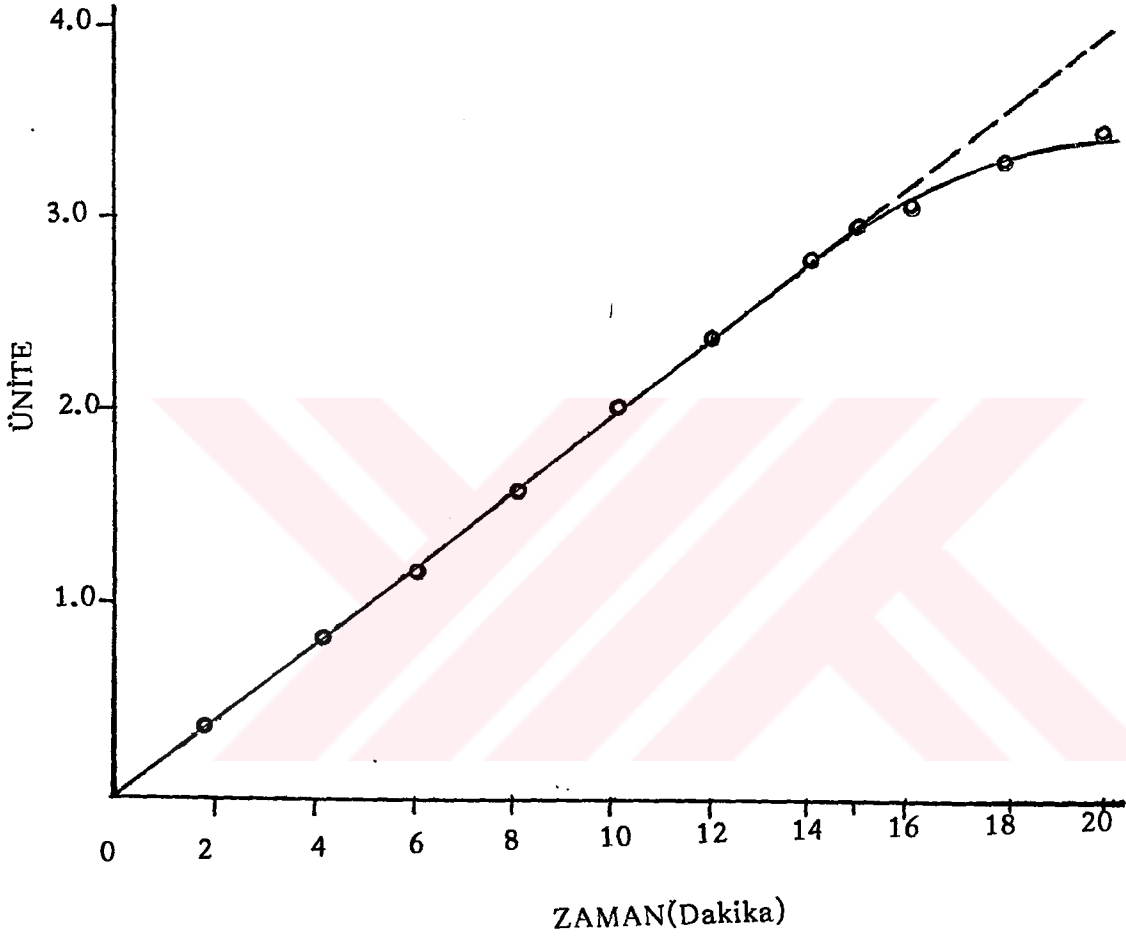
M.benedeni arginazının enziminin aktivasyonu için gerekli şartlardan birisi de preinkübasyon ısısıdır.

Arginaz üzerine preinkübasyon ısısının etkisi araştırılmıştır (Şekil 11).

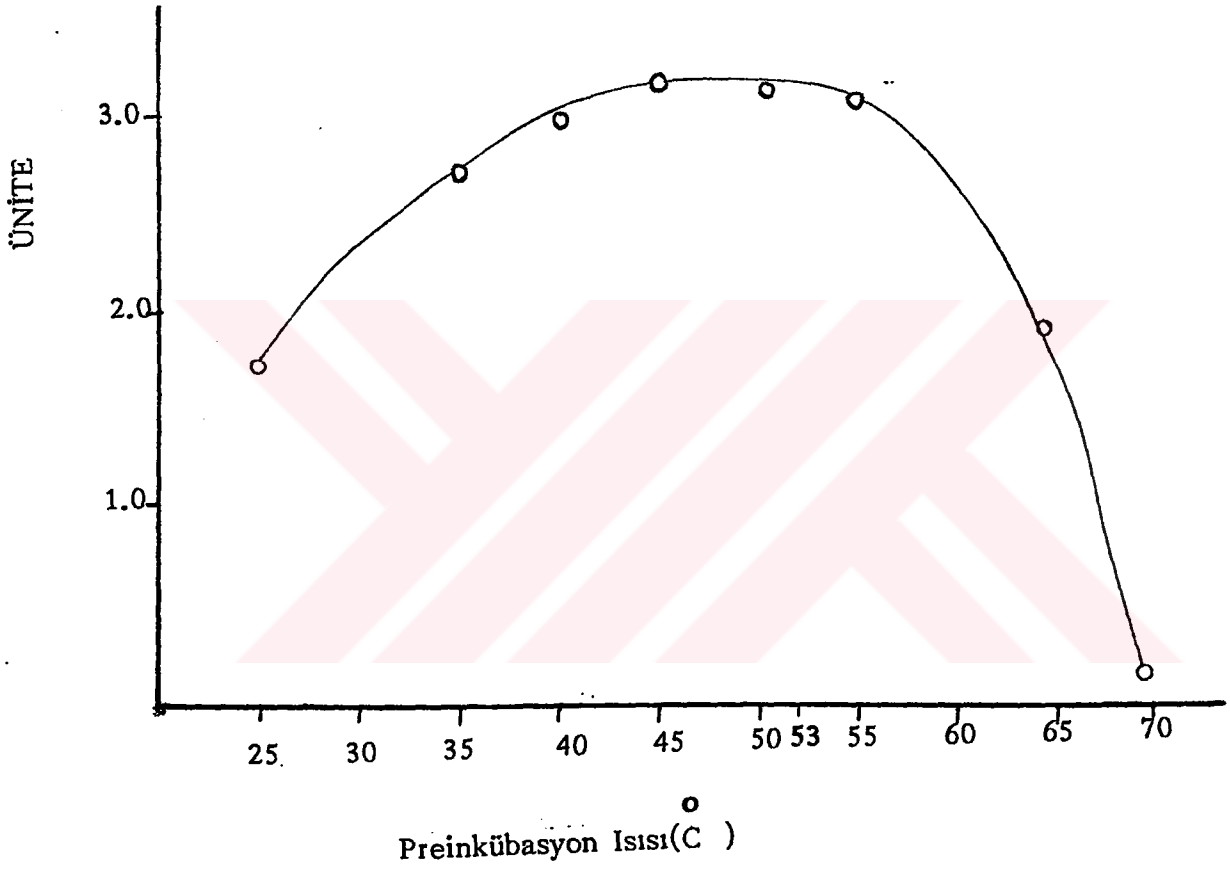
Enzim 36mM L-Arginin(pH:9.5) 50mM karbonat tamponu(pH:9.5) ve $MnCl_2$ 'ün varlığında 25, 30,35,40,45,50,55,60,65,70 $^{\circ}C$ de preinkübasyon ısılarına tabi tutulmuştur.En yüksek enzim aktivitesi 50-55 $^{\circ}C$ 'ler arasında saptanmıştır.Bu nedele enzimin aktivasyonu için preinkübasyon ısısı 53 $^{\circ}C$ olarak kabul edilmiştir.

III.4.Preinkübasyon Zamanının Tesbiti:

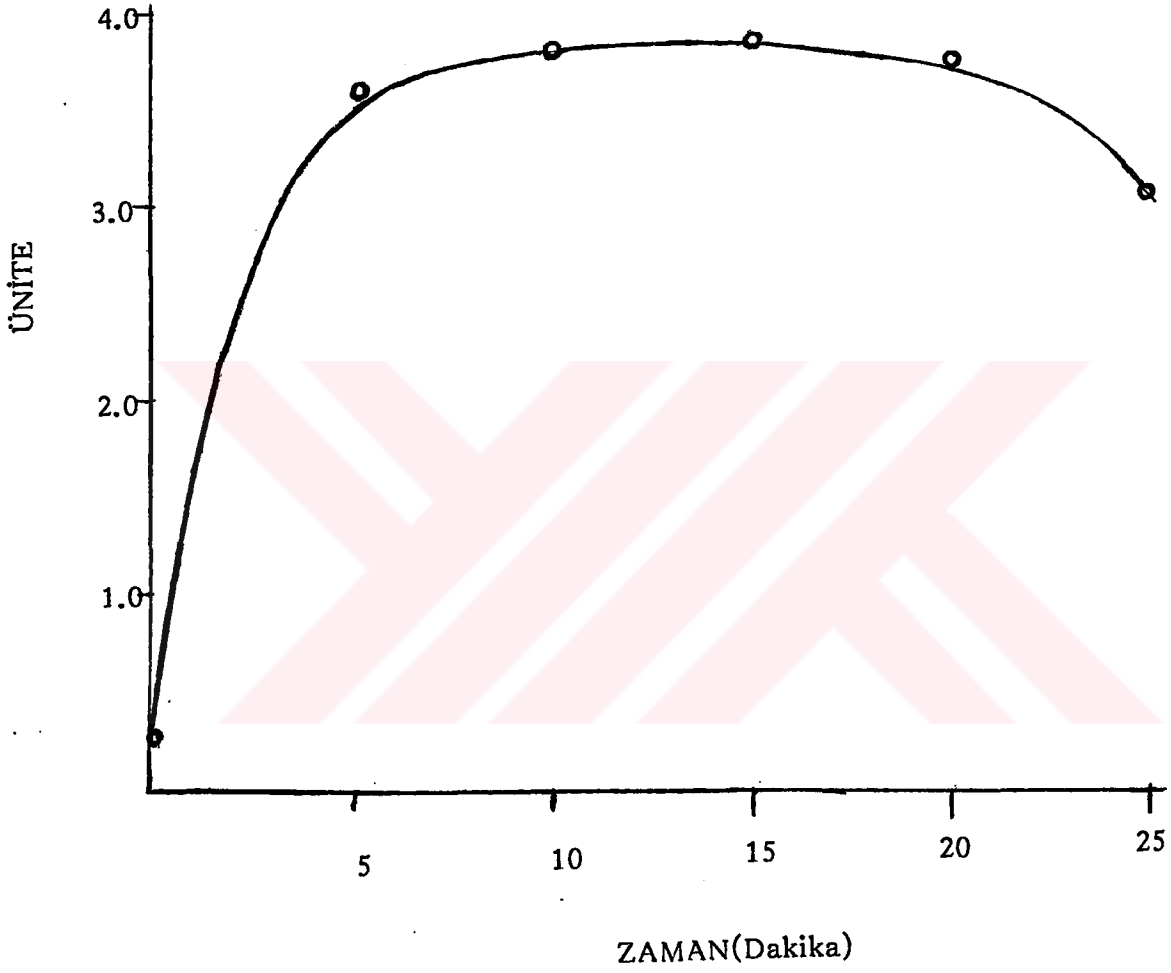
M.benedeni arginazının preinkübasyon zamanına bağlı olarak değişimi $MnCl_2$ 'ün varlığında ve 53 $^{\circ}C$ 'lik preinkübasyon ısısında 5-25



Şekil 10 : M.benedeni Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 11 : M.benedeni Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 12 : M.benedeni Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

dakikalık zaman aralıklarında incelendiğinde maksimum aktiviteye 7 ile 20 inci dakikalar arasında ulaşıldığı görülmüş ve preinkübasyon zamanı 10 dakika olarak kabul edilmiştir(Şekil 12)

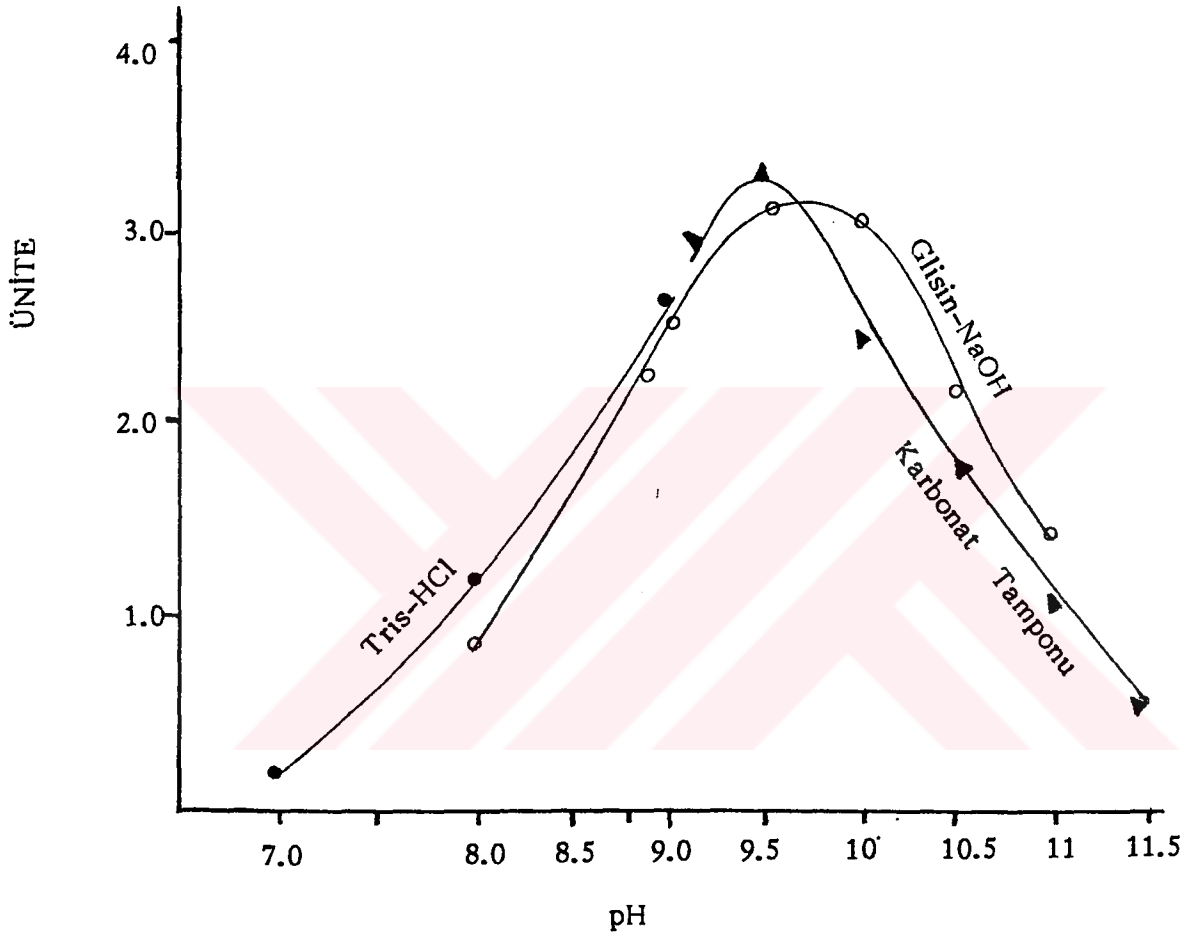
III.5. pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi:

M.benedeni arginazının optimal pH'sını tesbit etmek için pH'7 den pH:11.5'a kadar olan sınırlar içinde çeşitli tampon çözeltiler hazırlanmıştır.Tris-HCl tampon pH:7.1-8.9 arasında,Glisin-KOH tamponu pH:7.8-10.6 arasında,karbonat tamponu ise pH:9.33-11.33'de iyi çalışan tamponlardır. Bu tamponlar kullanılarak belirtilen pH sınırları içinde en yüksek aktivitenin alındığı pH ortamının tesbitine çalışılmıştır.Şekil13'de görüldüğü gibi pH profili tipik bir çan eğrisi(Bell Shape) şeklindedir. Karbonat tamponu glisin tamponu ile pH:9.5'te overlap yapmaktadır .Ayrıca karbonat tamponunun arginaz aktivitesi için spesifik bir tampon olması ve maliyetinin ucuz olması nedeni ile tercih edilmiştir.Enzim en yüksek aktiviteyi pH:9.5'da vermiştir.Bu nedenlerle pH:9.5'daki karbonat tamponu enzim aktivitesi için optimal pH olarak kabul edilmiştir(Şekil 13).

III.6.Metal İyonlarının Arginaz Aktivitesine Olan Etkileri:

M.benedeni arginazının çeşitli metal iyonlarına karşı duyarlılığını tesbit etmek için;

Mn⁺⁺,Cu⁺⁺,Hg⁺⁺,Fe⁺⁺⁺,Ag⁺,Ca⁺⁺,Ba⁺⁺,Cl⁺⁺,Cd⁺⁺Co⁺⁺,Mg⁺⁺,Zn⁺⁺,Ni⁺⁺,Cr⁺⁺, Pb⁺⁺, Sn⁺⁺,varlığında enzim aktivitesine bakılmıştır.Adı geçen metal iyonları 0.5 mM'lık konsantrasyonlarda pre-inkübasyon ortamına ilave edilmiştir.Elde edilen sonuçlar kontrole göre değerlendirilip Tablo 1'de gösterilmiştir.Cu,Hg,Fe,Ag,Ca,Ba,Cl,Zn,Cr,Pb,Sn'in varlığında enzim katalitik gücünü kaybederken Mn'in varlığında enzimin katalitik aktivitesinde artışlar görülmüştür.(Tablo1) Mn ilave edilmeden yapılan deneylerde



Şekil 13 : M.benedeni Arginazı İçin Optimal pH'nın Saptanması.

(Arginin pH'sı tamponların pH'ları ile aynı tutulmuştur)

Tablo 1 : METAL İYONLARININ M.benedeni ARGİNAZİ ÜZERİNE ETKİSİ

DENEY KOŞULLARI	% AKTİVİTE
Kontrol	100
MnCl ₂	1274
CuSO ₄	38
HgCl ₂	82
FeCl ₃	34
AgNO ₃	23
CaCl ₂	51
BaCl ₂	97
CdCl ₂	50
CoSO ₄	131
MgCl ₂	160
ZnSO ₄	53
NiSO ₄	472
CrO ₃	41
Pb(NO ₂) ₂	26
SnCl ₂	15
xx: MnCl ₂	582

xx:Enzim kaynağı olarak kullanılan kısım MnCl₂ süz Preinkübe edilmiş

aynı molariteyi sağlayacak miktardaki MnCl₂ enzimatik karışıma eklenmiş

(Metal iyonlarının konsantrasyonları 0.5 mM olarak alınmıştır.)

ise enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş saptanmıştır(Şekil 15).Metal iyonları içinde enzimin aktivitesi üzerine en etkili metalin Mn^{++} olduğu bulunmuştur . Mn^{++} 'dan sonra en etkin olan metal iyonu Ni^{++} 'dir. $MnCl_2$ enzim aktivitesini % 1174 artırırken $NiCl_2$ % 372 artırmıştır. $CoSO_4$ %31 ve $MgCl_2$ %60 oranında enzim aktivitesinde $MnCl_2$ ve $NiCl_2$ göre daha az artışlara neden olmuştur(Tablo 1).

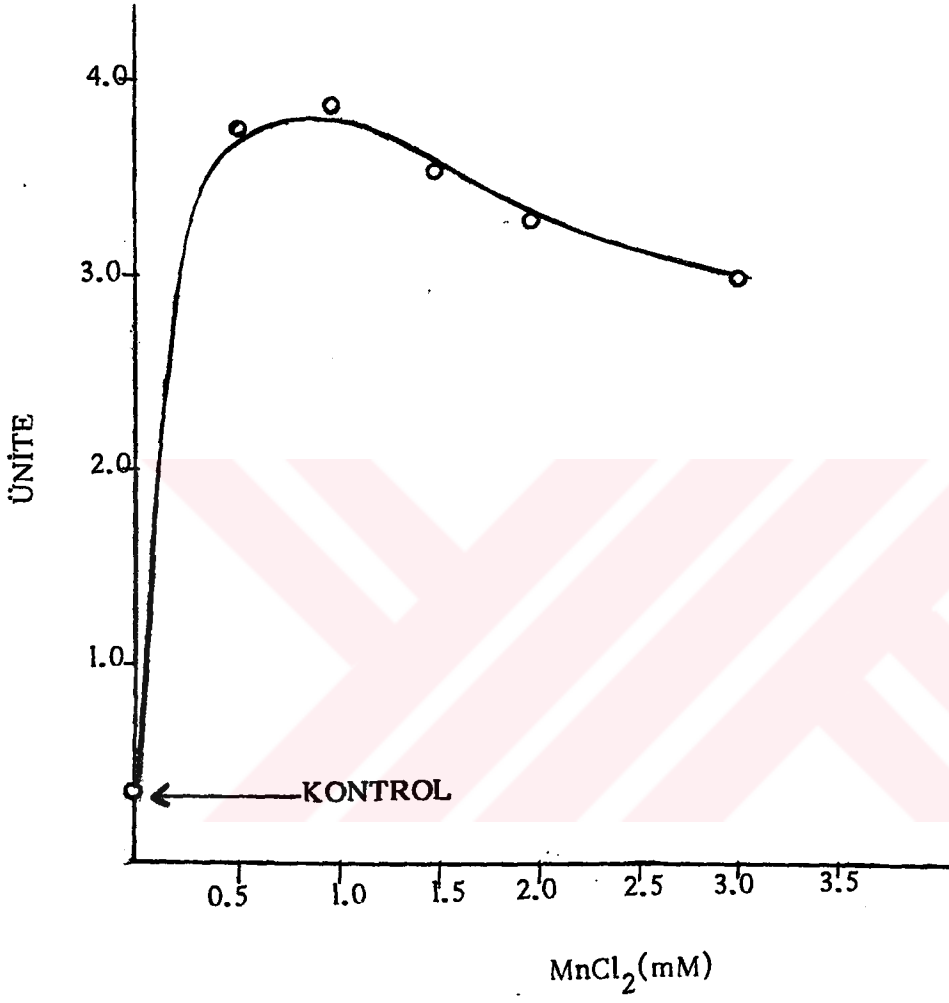
III.7.M.benedeni arginaz aktivitesinin $MnCl_2$ miktarına bağlı olarak değişimi:

Mn^{++} iyonlarının arginaz için gerekli olduğu anlaşıldıktan sonra değişik konsantrasyonlarda Mn iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri incelenmiştir(Şekil 14).

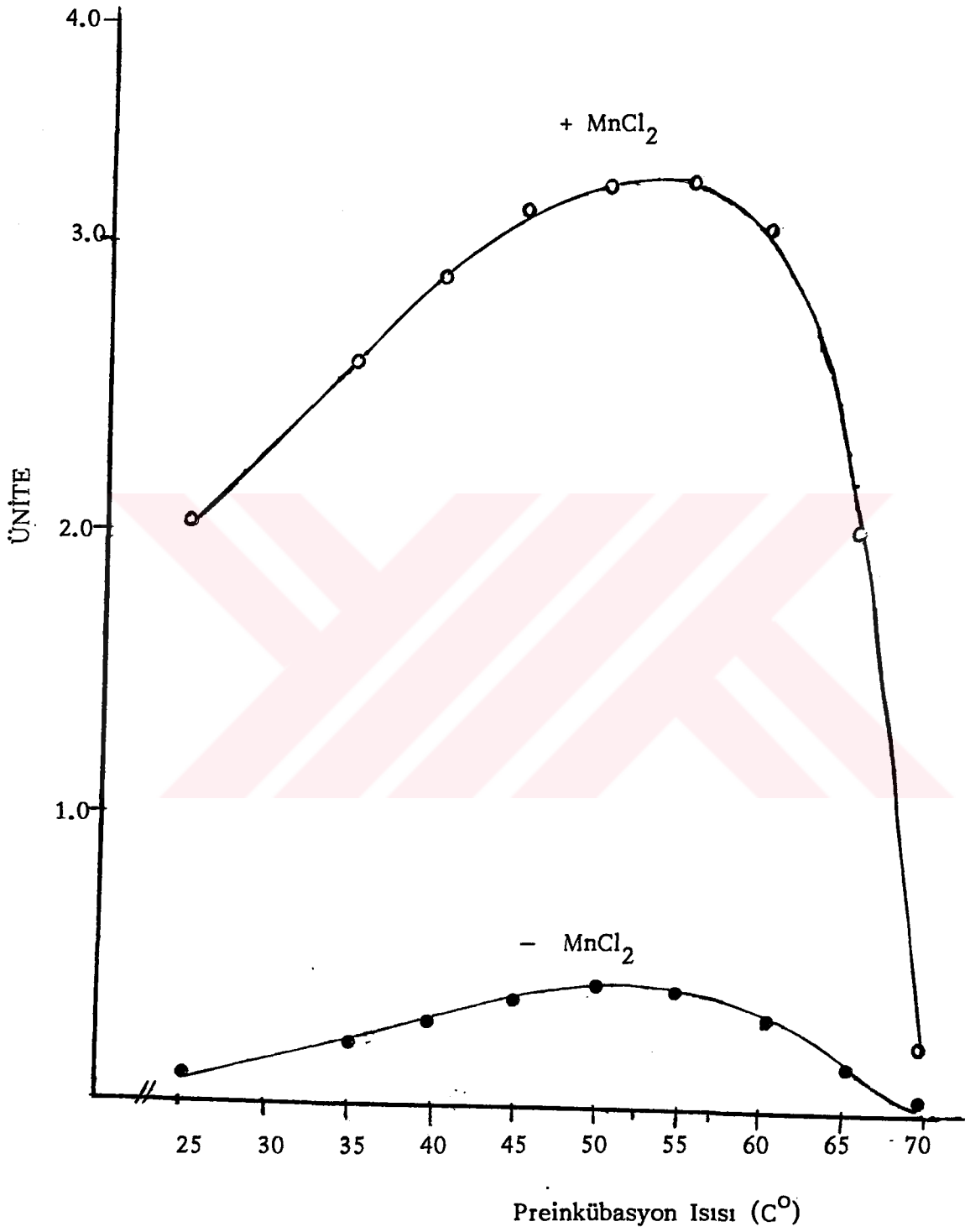
Enzim en yüksek aktivasyonu 0.5 mM 'lık $MnCl_2$ varlığında göstermiştir. Mn konsantrasyonu 0.5 mM'ın üstüne çıktığında ise enzimin aktivasyon hızında belirgin bir düşme gözlenmiştir.Enzim 0.5mM'lık $MnCl_2$ konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi göstermesinden dolayı bu molarite enzim için "Optimal $MnCl_2$ " konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.

$MnCl_2$ 'ün arginaz üzerindeki etkisini daha iyi açıklığa kavuşturmak amacıyla çeşitli preinkübasyon ısılarında $MnCl_2$ 'lü ve $MnCl_2$ 'süz (distile su ile) preinkübasyon işlemlerine tabi tutulmuştur(Şekil 15). Çeşitli konsantrasyonlardaki $MnCl_2$ 'lü preinkübasyon ile $MnCl_2$ 'süz(distile su ile) preinkübasyonun enzim aktivasyonu üzerine etkileri Şekil 15'de incelenmiştir.

$MnCl_2$ 'lü ortamdaki enzim aktivitesinde $MnCl_2$ 'süz ortamdaki enzim aktivitesine göre %1174 kadar bir artışın varlığı saptanmış ve sonuçta



Şekil 14 : *M. benedeni*'de Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Miktarına Bağlı Olarak Değişimi



Şekil 15 : Mn^{++} İyonlarının ve Preinkübasyon Isısının M.benedeni Arginazı Üzerindeki Etkileri.

enzimin mutlak aktivatörünün $MnCl_2$ olduğu kabul edilmiştir(Tablo 1).

III.8.Arginazın Arginine Karşı Olan K_m 'i:

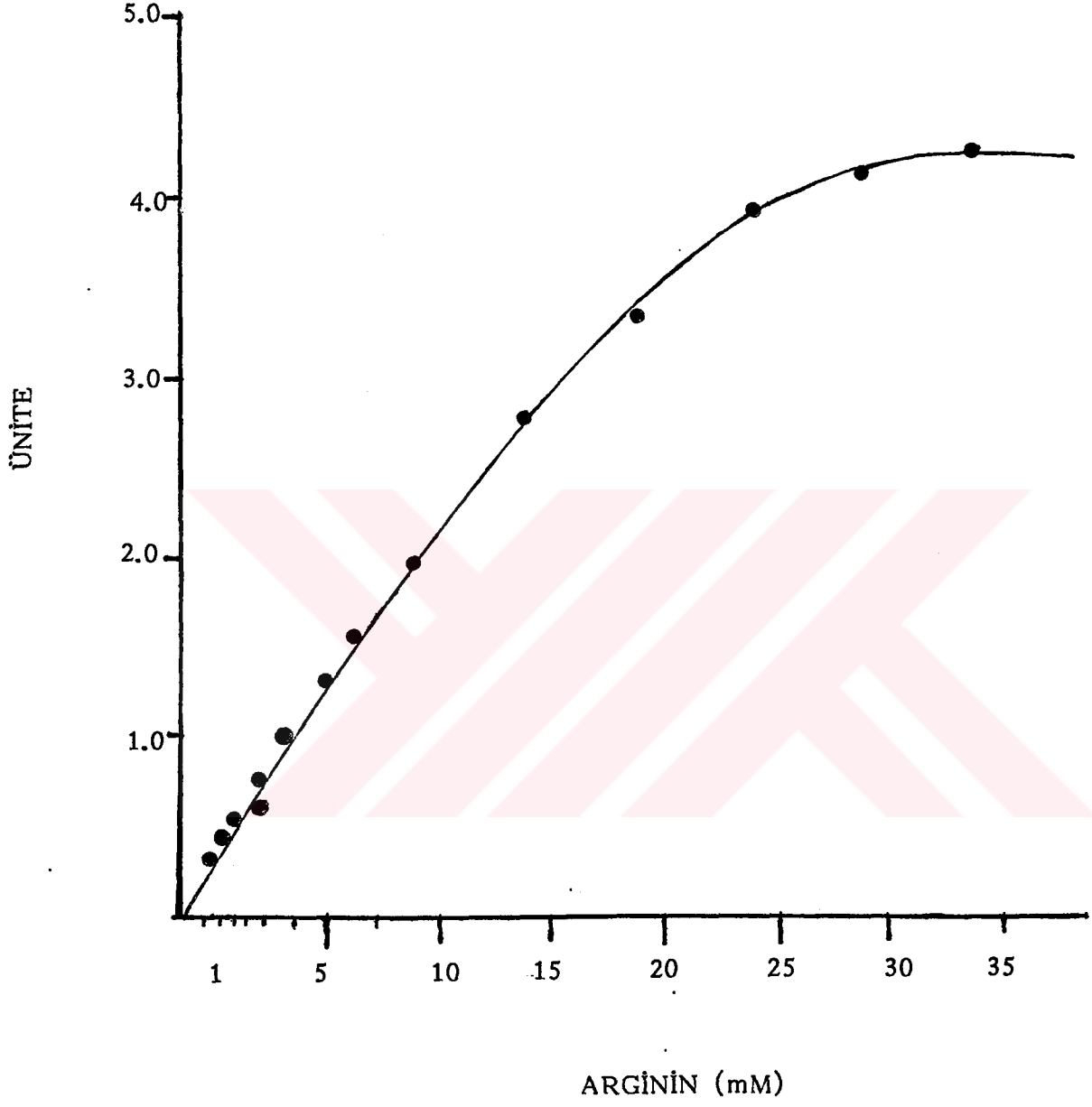
M.benedeni arginazı için optimal koşulların belirlenmesinden sonra enzimin spesifik substratı olan L-Arginine karşı K_m 'i tesbit edilmiştir.Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten kinetiğine uygun olarak gelişmiş ve tipik substrat doygunluğu profilini vermiştir(Şekil 16).15 mM'a kadar olan L-arginin konsantrasyonlarında aktivitede lineer bir artış,daha ileri arginin konsantrasyonlarında ise eğri hiperbolik bir görünüm almaya başlamıştır.36 mM 'lık L-arginin konsantrasyonundan sonra ise enzimin substratıyla doygunluğa erişmesi sonucu aktivitedeki artış,sıfır mertebe(Zero-Order) kinetiğine uymuştur.Enzim aktivitesinin substrat miktarına bağlı olarak değişimini gösteren Şekil 16'deki sonuçlar Lineweaver-Burk yöntemine göre değerlendirilmiştir.

Bir kaç kez tekrarlanan deney sonuçlarından arginazın L-arginine karşı olan K_m 'i 12.5 mM sınırları içinde belirlenmiştir(Şekil 17).

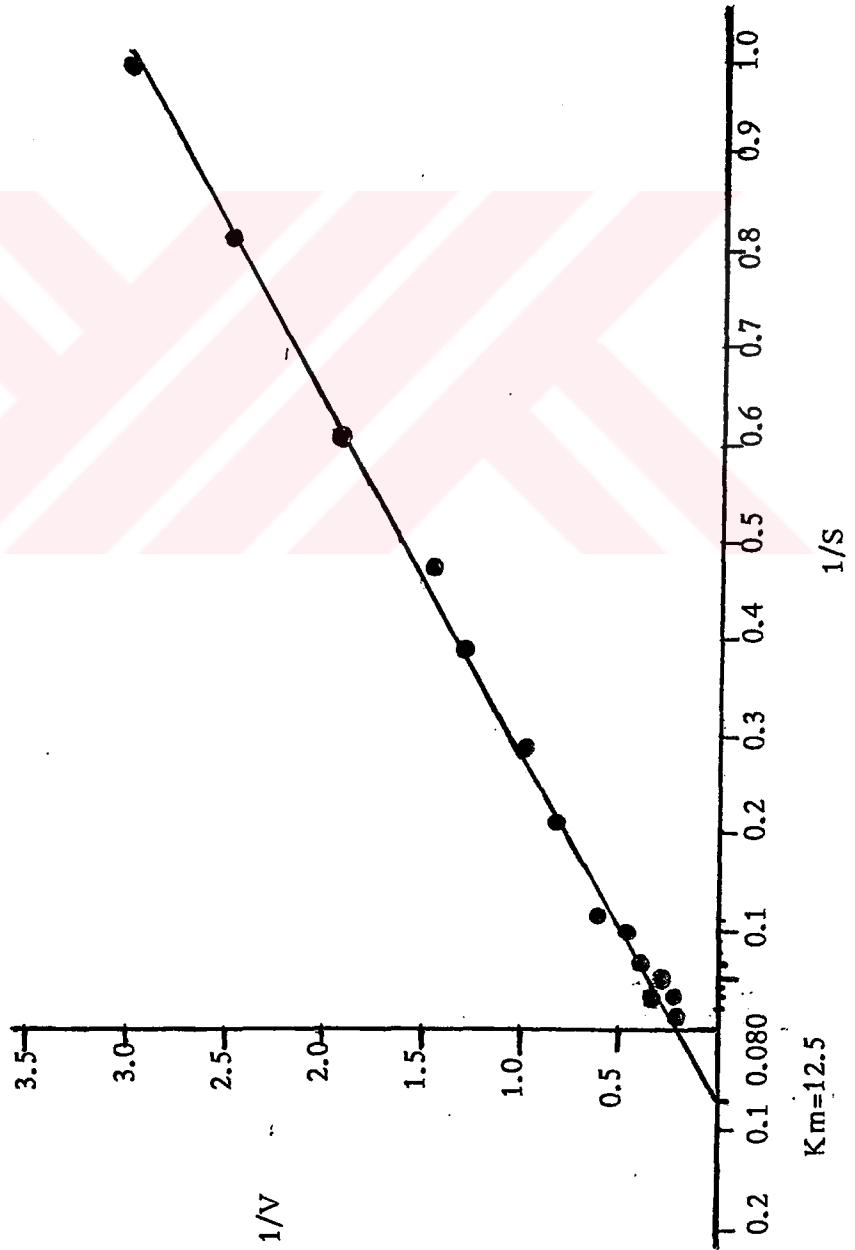
III.9.Moniezia benedeni ARGİNAZININ BAZI ÖZELLİKLERİ

III.9.a.Arginazın Hücre İçi Yerleşimi:

M. benedeni arginazının hücre içindeki yerinin saptanması için; 4 gr parazit alınıp 20 ml 0.25 M'lık süktroz çözeltisinde potter-elvenjem cam -teflon homojenizatörü ile parçalanmış ve süktroz çözeltisi ile toplam hacim 20 ml'ye tamamlanarak (1x5 oranında sulandırma(Ağırlık/Hacim) homojenat elde edilmiştir.Bu homojenattan 4 ml ayrılarak arginaz düzeyine bakılmıştır.Daha sonra homojenattan 1 ml alınıp 7 ml 0.5 mM'lık $MnCl_2$ 'lü süktroz çözeltisi katılarak 1x40 dilüsyon yapılmıştır.Geri kalan 17



Şekil 16 : M.benedeni Arginaz Aktivitesinin Arginin Konsantrasyonlarına Bağlı olarak Değişimi.



Şekil 17 : M.benedeni Arginazının L-Arginine Karşı olan Km'nin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Saptanması

ml 'lik bölüm 600xg 'de 10 dakika +4 °C de santrifüstasyon işlemine sokulmuştur.Üste kalan süpernatant uzaklaştırılmış ve sükröz çözeltisi ile toplam hacim 17 ml'ye getirilmiştir.Böylece elde edilen çökelekte ve süpernatantlarda enzim aktivitesine bakılmıştır.17 ml'ye tamamlanan 600 xg'lik süpernatantan alınan 10 ml'lik bölüm tekrar 16000xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve iki bölüme ayrılmıştır.Süpernatant ve pellet sükröz çözeltisi ile ayrı ayrı 11 ml'ye tamamlanmıştır.Çeşitli hücre sel kısımlardan oluşan bu fraksiyonlar 53°C de 10 dakika preinkübasyona tabi tutulduktan sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.Tablo 2'de görüldüğü gibi en yüksek arginaz aktivitesi 600x g'de elde edilmiş buda enzimin hücrenin çekirdeğinde lokalize olduğu savını güçlendirmiştir.77xg'deki santrifigasyon işlemi sonunda hemen hemen homojenattaki aktivitenin yarısı elde edilmiştir.600xg süpernatantı 16000xg'de santrifüj edildiğinde çökelekte toplam aktivitenin %25'i bulunduğu gözlenmiştir.16000xg çökeleği mitokondriaları kapsamaktadır. 600xg süpernatantında toplam aktivitenin %25-30'nun bulunmasının nedeni 3 olasılığa bağlanabilir.

1-Çekirdek sel kısımlar tam çökmemiştir.

2-Santrifigasyon sırasında çekirdekler parçalanmış ve enzim sitoplazmik fraksiyona geçmiştir.

3-Arginazın bir izoenzimi bulunabilir.

Tablo 2'deki sonuçlar şekil 18'e göre uygulanmıştır.

Tablo 2'den de anlaşıldığı gibi enzim her ne kadar hücre çekirdeğine bağlı isede ,eğer homojenizasyon iyonik bir çözeltide yapıлып iyonik güç artırılırsa enzimin çekirdek sel kısmından sitoplazmanın çözünen kısmına kolayca geçtiği görülür(Tablo 3).

0.16 M'lık KCl çözeltisi ile yapılan homojenizasyon işleminden sonra arginaz aktivitesinin hücre içi dağılımı incelendiği zaman görülmüştür ki; Tablo'2 deki sonuçların aksine iyonik gücün artması ile 16000xg'deki

M.benedeni ARGİNAZININ HÜCRE İÇİ YERLEŞİMİ

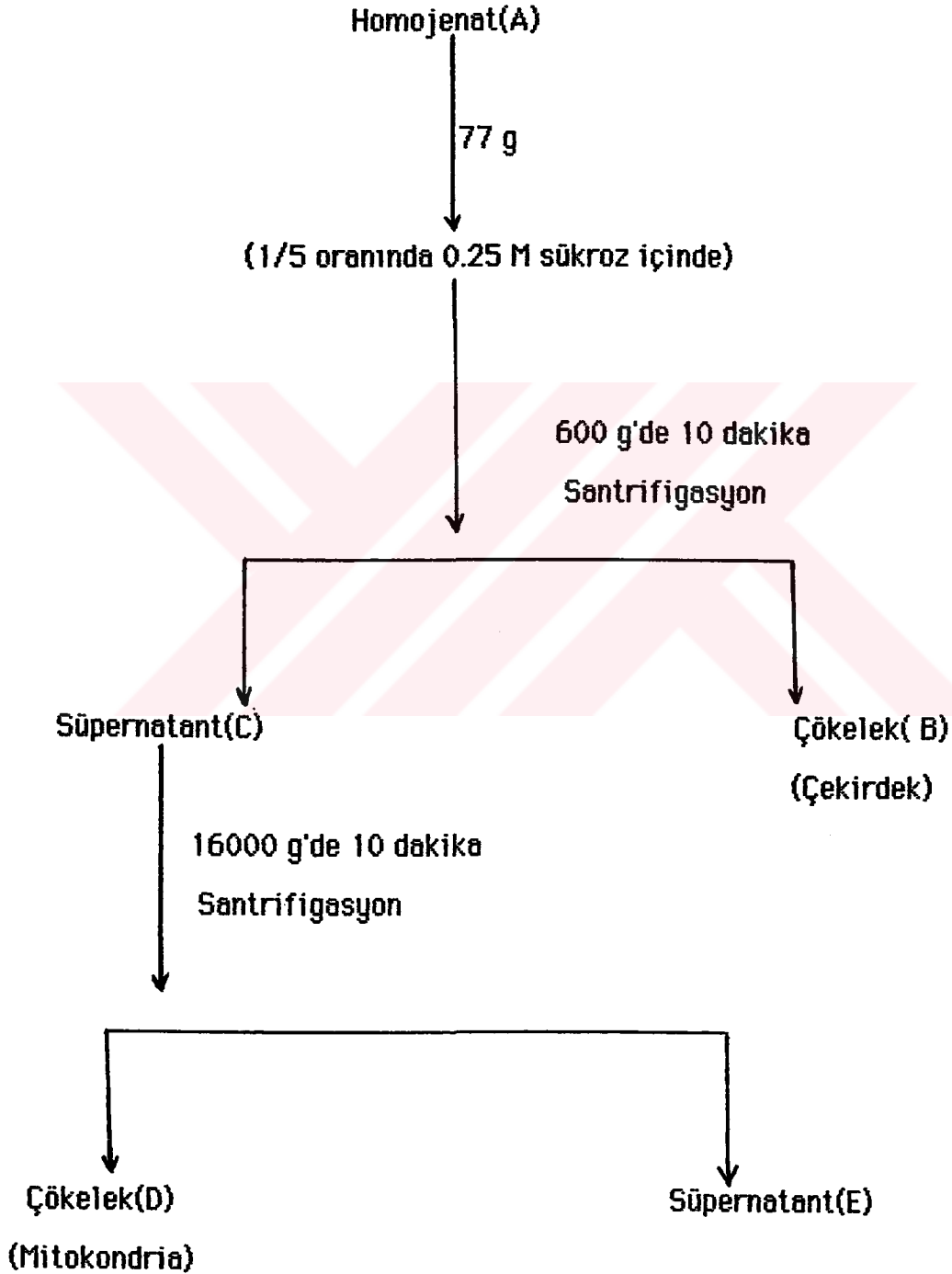
Tablo 2 : 0.25 M süktroz ile yapılan homojenizasyonda Arginaz aktivitesinin hücre içi dağılımı.

SAPTANAN HÜCRESEL KISIM	ARGİNAZ AKTİVİTESİ(ÜNİTE)
A)HOMOJENAT	4.323
B) 77 g	4.384
C) 600 g ÇÖKELEK	2.960
D) 600 g SÜPERNATANT	1.704
E) D'NİN 16000 g ÇÖKELEĞİ	1.228
F) D'NİN 16000 g SÜPERNATANTI	0.604

blo 3 : 0.16 M KCl'de yapılan homojenizasyonda Arginaz aktivitesinin hücre içi dağılımı

SAPTANAN HÜCRESEL KISIM	ARGİNAZ AKTİVİTESİ(ÜNİTE)
A) HOMOJENAT	4.54
B) 77 g	4.256
C) 600 g ÇÖKELEK	1.652
D) 600 g SÜPERNATANT	2.660
E) D'NİN 16000 g ÇÖKELEĞİ	0.776
F) D'NİN 16000 g SÜPERNATANTI	1.328

çökeleği yerine süpernatant fraksiyonu daha çok arginaz aktivitesi içermektedir(Tablo 3).Aynı zamanda 0.16 M'lık KCl çözeltisi yapılan bu deneyler sonunda enzimin hücre çekirdeğinde lokalize olduğu bir kez daha gözlenmiştir(Tablo 3).



Şekil 18:Fraksiyonel-Santrifügasyon ile Arginazın Hücre İçi Yerleşiminin Saptanması.

Tablo 2,3'de gösterilen deneylere Şekil 18'deki yöntem uygulanmıştır.

III.9.b. M.benedeni ARGİNAZININ İNHİBİTÖRLERİ

III.9.b.a.Ornitinin M.benedeni Arginazı Üzerindeki İnhibisyon

Etkisi:

Değişik ornitin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi incelenmiştir. 5 mM'lık ornitin varlığında enzim aktivitesinde %55 dolaylarında inhibisyonun varlığı saptanmıştır.L-Ornitin konsantrasyonu 20 mM 'a ulaştığında arginaz aktivitesinin %77 'sini kaybettiği saptanmıştır(Şekil 19).

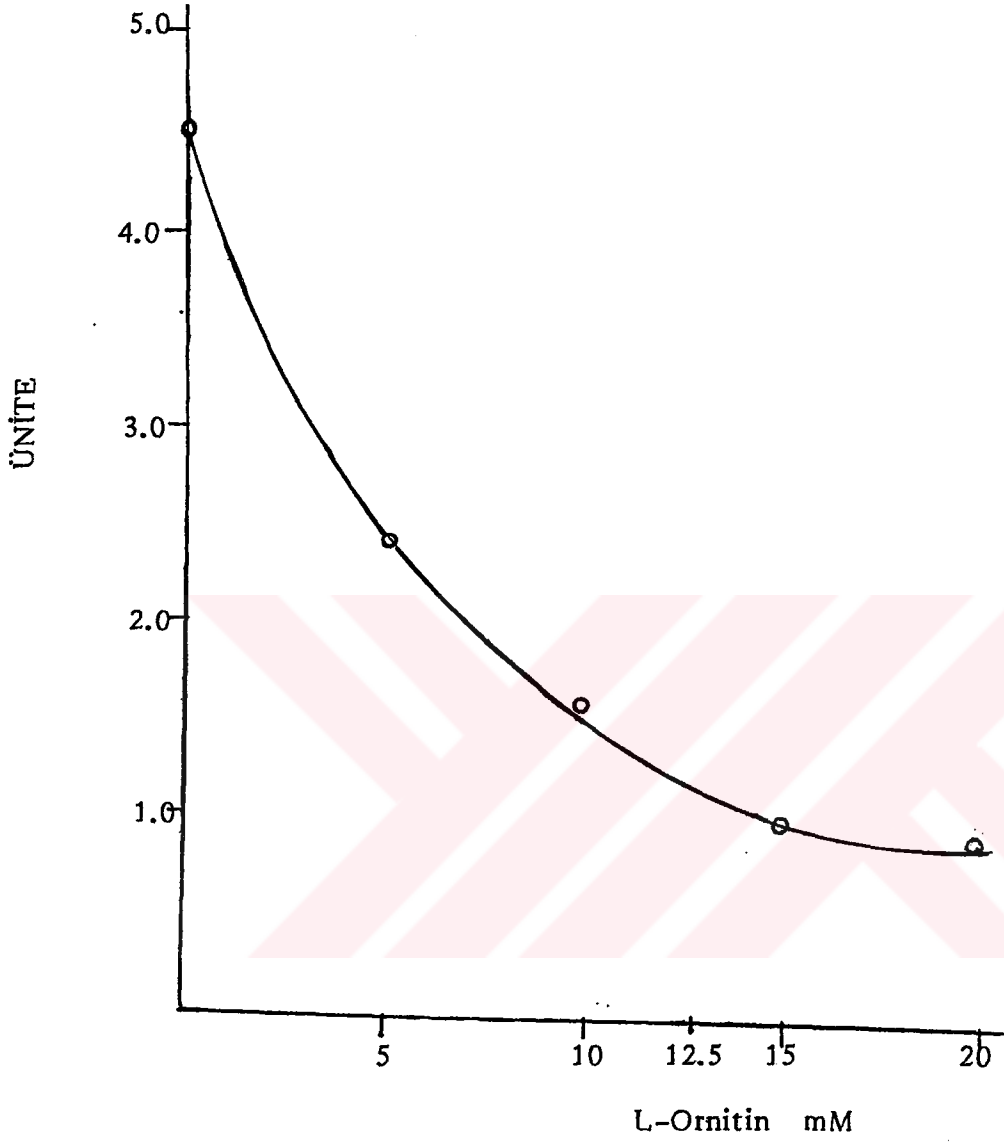
L- Ornitinin yaptığı inhibisyon tipini karakterize edebilmek için ,arginaz aktivitesi değişen arginin konsantrasyonlarında 12.5 mM'lık ornitin varlığında ölçülmüştür(Şekil 20).Kontrole göre ve sabit yoğunluklardaki ornitin varlığında enzimin değişik arginin konsantrasyonlarında gösterdiği görünüm yani inhibisyon etkisi şekil 20'de görülmektedir.

Ornitinin M.benedeni arginaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinin hangi tip inhibisyona neden olduğunu anlayabilmek için Michaelis-Menten grafiği Lineweaver-Burk grafiğine göre değerlendirilmiştir(Şekil 21). Görüldüğü gibi ornitin varlığında,enzimin V_{max} 'ının değişmediği fakat K_m 'nin büyüdüğü tesbit edilmiştir .Bu deney sonucunda enzimin arginine karşı K_m 'nin 12.5 mM civarında olduğu ve L-Ornitinin enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği saptanmıştır.

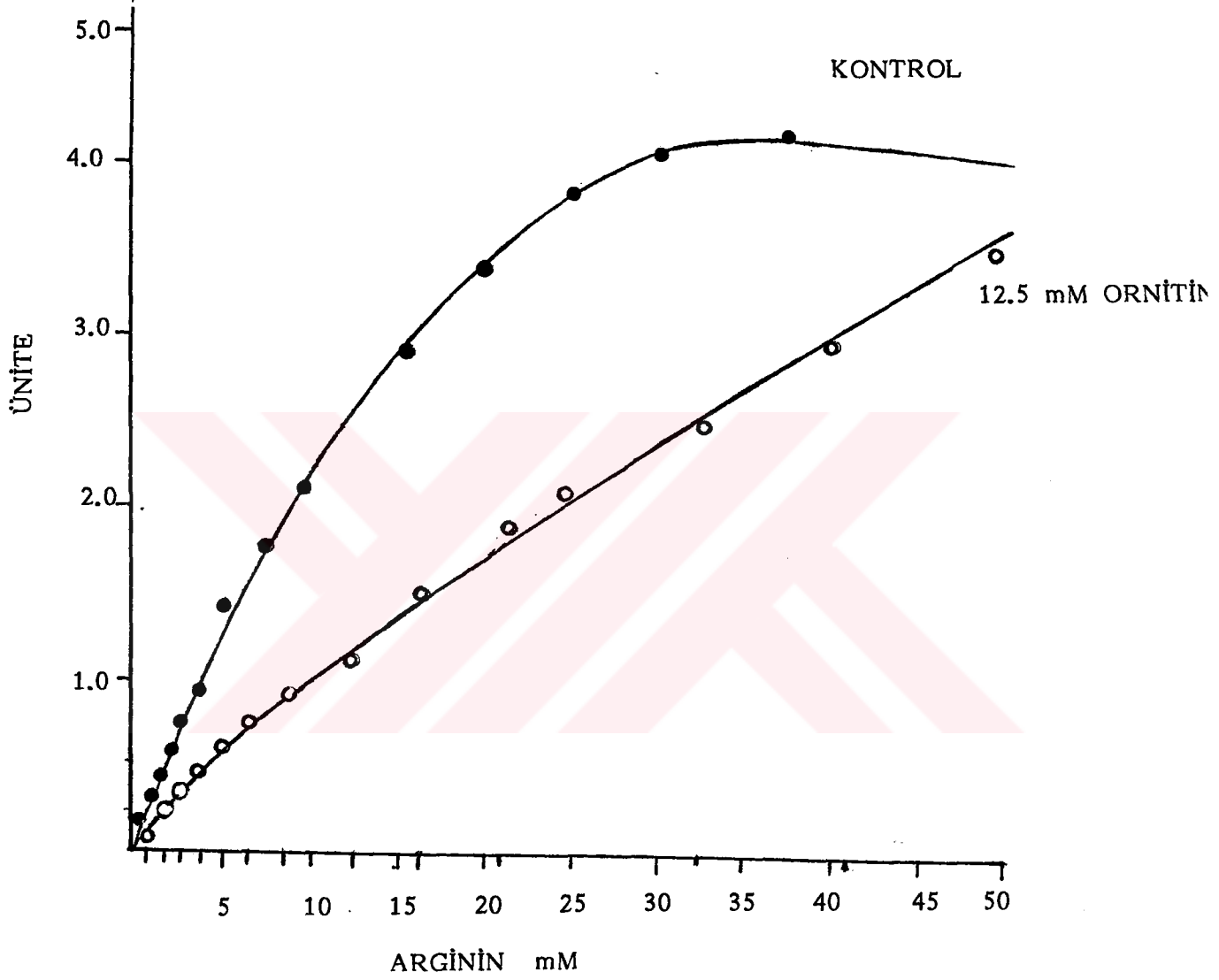
III.9.b.b.L-Lizinin M.benedeni Arginazı Üzerindeki İnhibisyon

Etkisi:

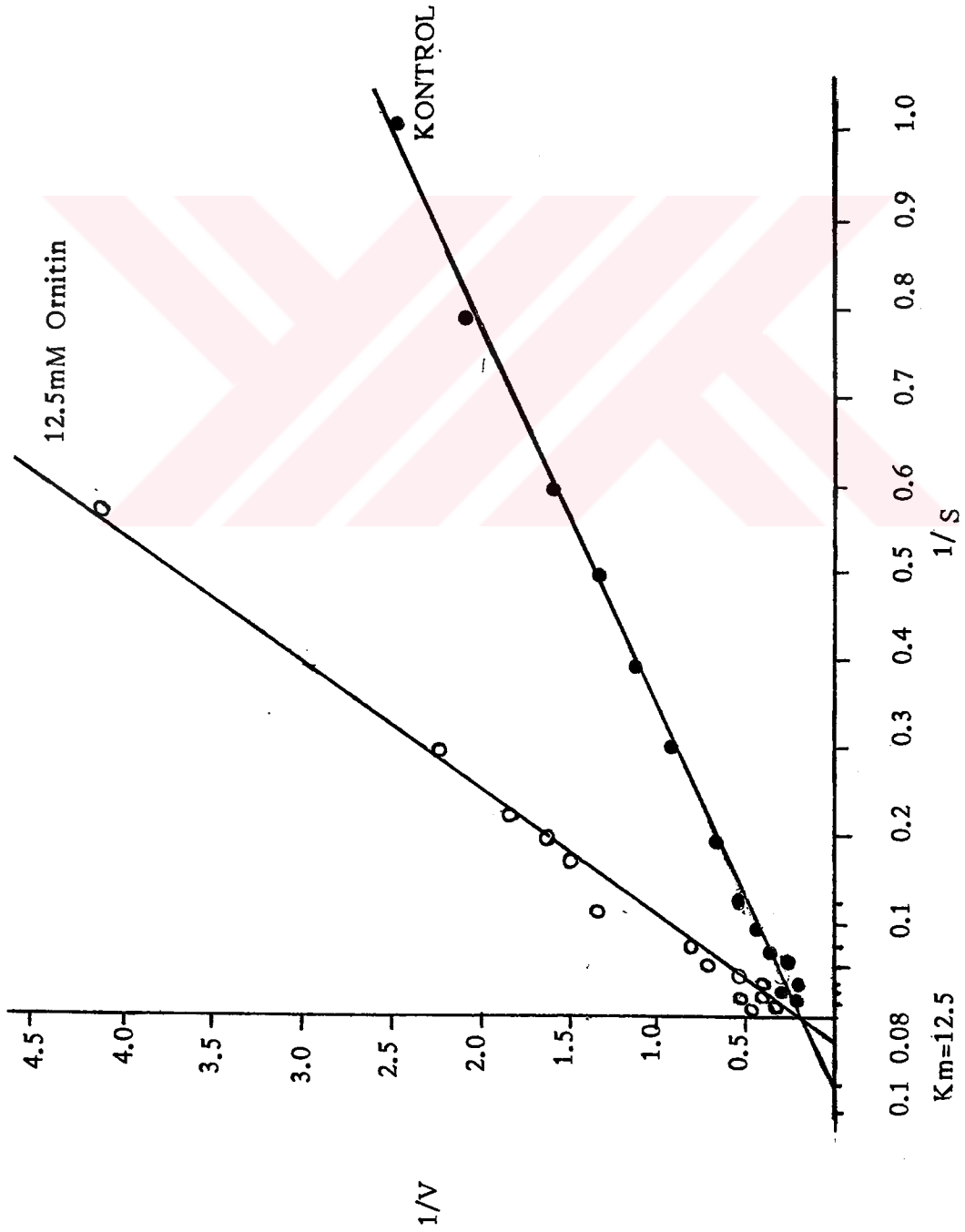
Değişik Lizin konsantrasyonlarının M.benedeni arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi incelendiğinde lizinin inhibitör etkisinin L- Ornitime benzediği saptanmıştır.



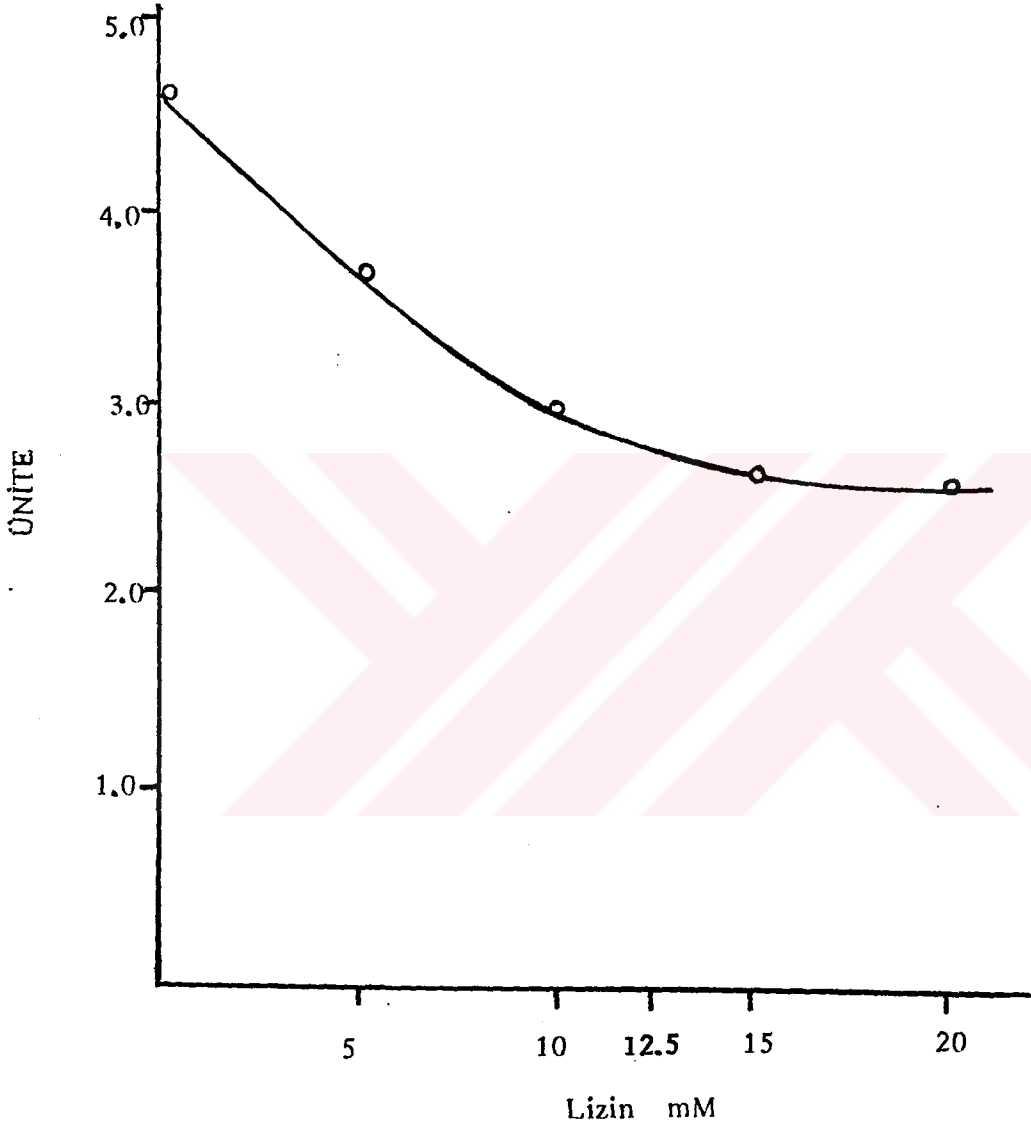
Şekil 19 : Değişik Ornithin konsantrasyonlarının M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri.



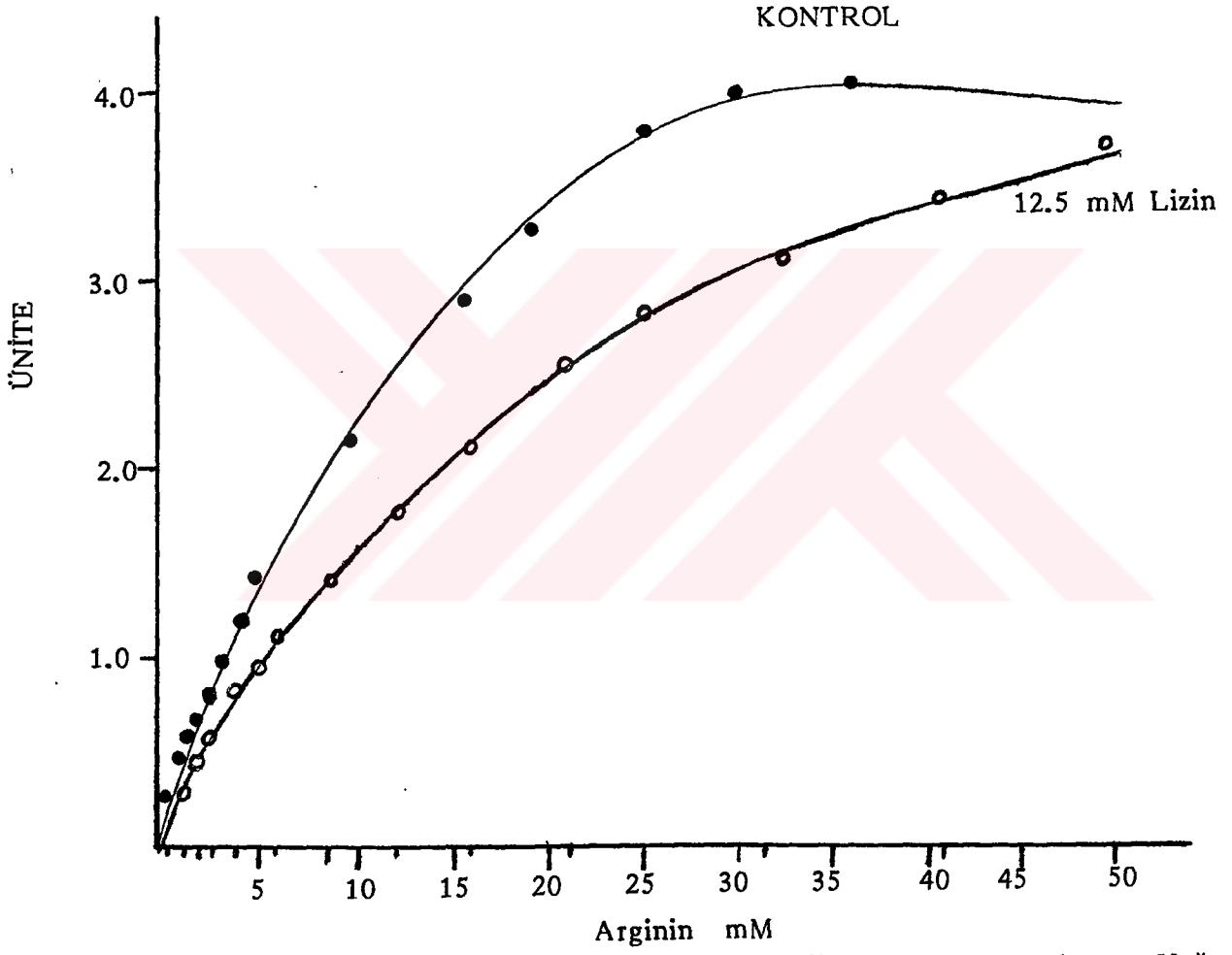
Şekil 20 :Ornitinin *M.benedeni* Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi



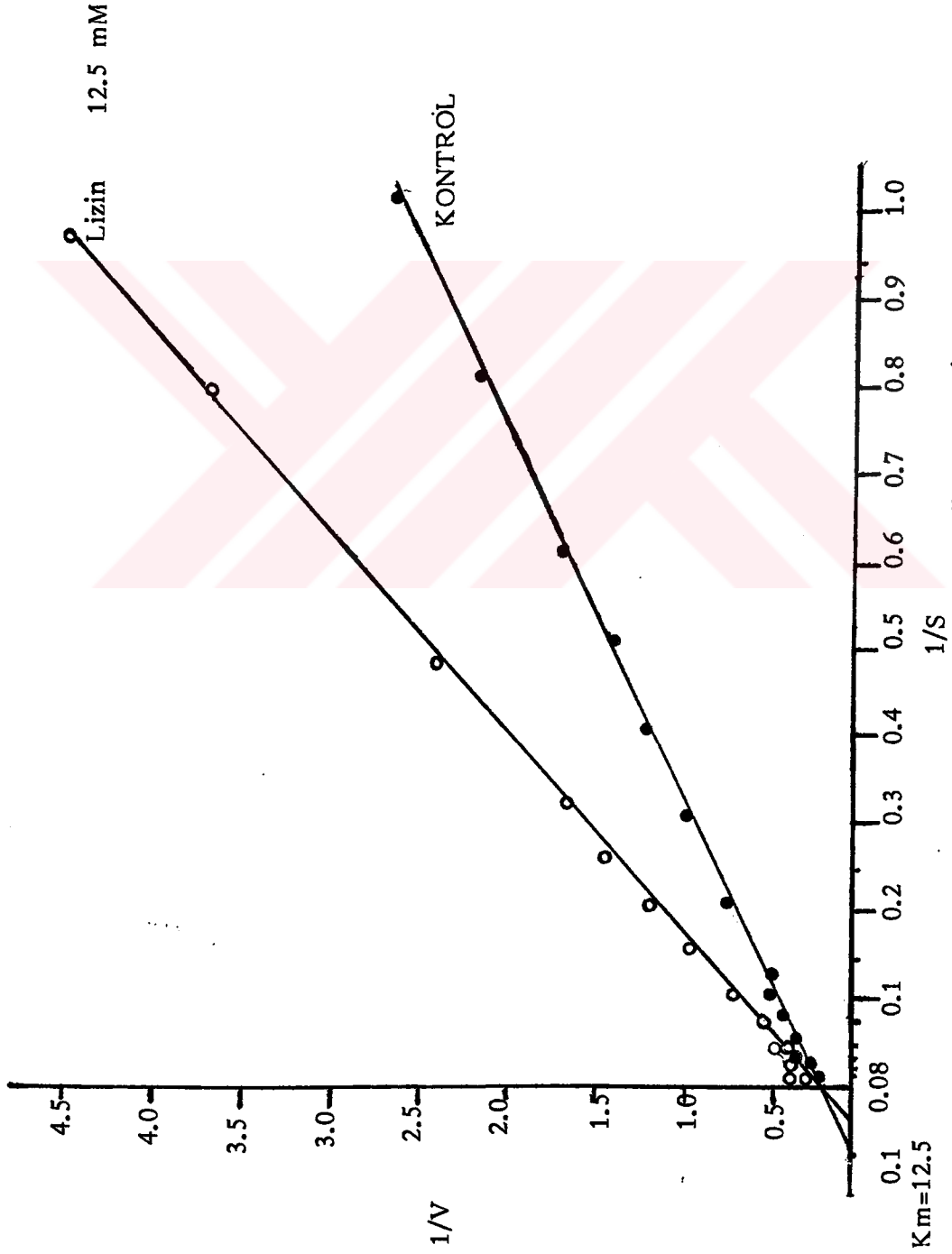
Şekil 21 : Ornitinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi.



Şekil 22 : Değişik Lizin Konsantrasyonlarının M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 23 : Lizinin *M.benedeni* Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.



Şekil 24 : Lizin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi İle Değerlendirilmesi.

12.5 mM 'lık Lizin konsantrasyonunun enzimin %55 oranında aktivite kaybetmesine neden olduğu saptanmıştır(Şekil 22).12.5 mM'lık L-Lizin varlığında ve değişik arginin konsantrasyonlarında arginazın gösterdiği aktiviteler saptanarak Michaelis-Menten grafiğinde kontrolleri ile birlikte gösterilmiştir.(Şekil 23).

L-Lizinin M.benedeni arginaz aktivitesi üzerindeki etkisi Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirilirse inhibisyonunun kompetitif tipte olduğu V_{max} 'nın değişmediği K_m 'lerinin farklı olduğu ortaya çıkmıştır(Şekil 24).

III.9.b.c.M.benedeni Arginazı Üzerine EDTA'nın İnhibisyon Etkisi:

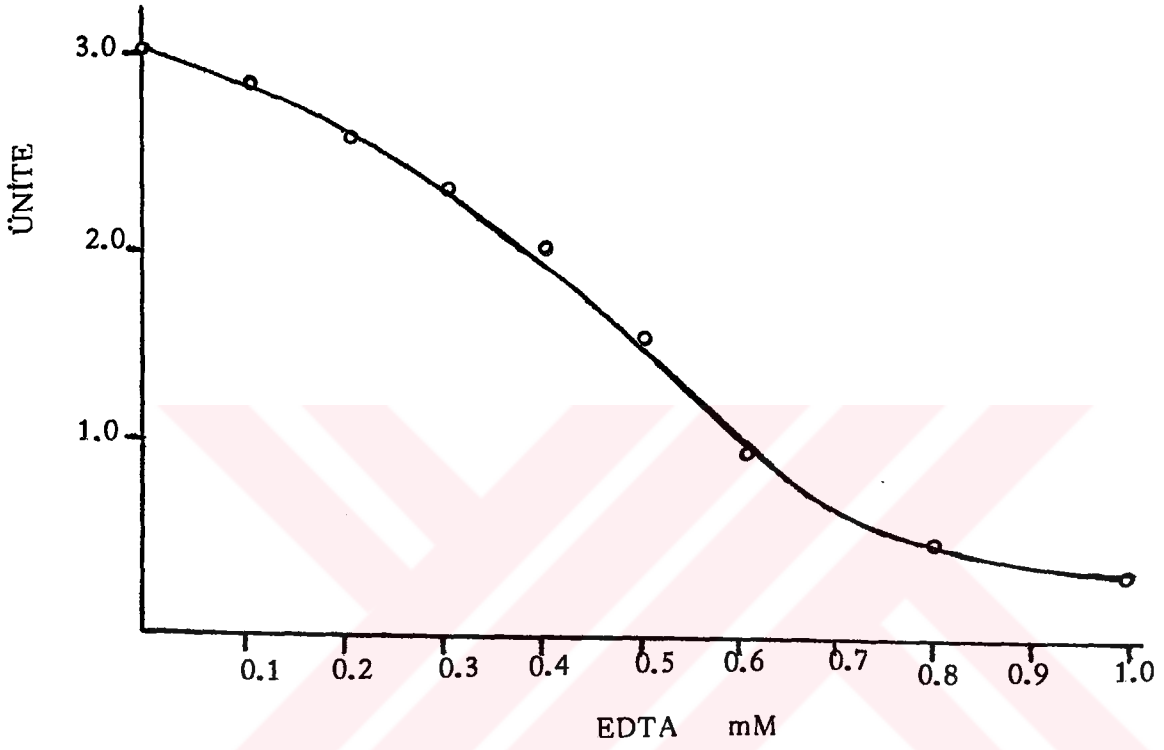
Değişik EDTA konsantrasyonlarında M.benedeni arginazının aktivitesi incelenmiş ve Şekil 25'de gösterilmiştir. 0.5 mM 'lık EDTA varlığında ve değişik arginin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi saptanıp ,inhibisyon etkisinin varlığı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir(Şekil 26). Sonuçlar Michaelis-Menten grafiğine dökülmüş ,daha sonra Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirilmiştir.EDTA 'nın varlığında enzimin V_{max} 'nın değiştiğini fakat K_m 'nin değişmediği ortaya konulmuştur(Şekil27).

Bu deney sonunuda enzimin arginine karşı K_m 'nin 12.5 mM civarında olduğu EDTA'nın enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği görülmüştür.

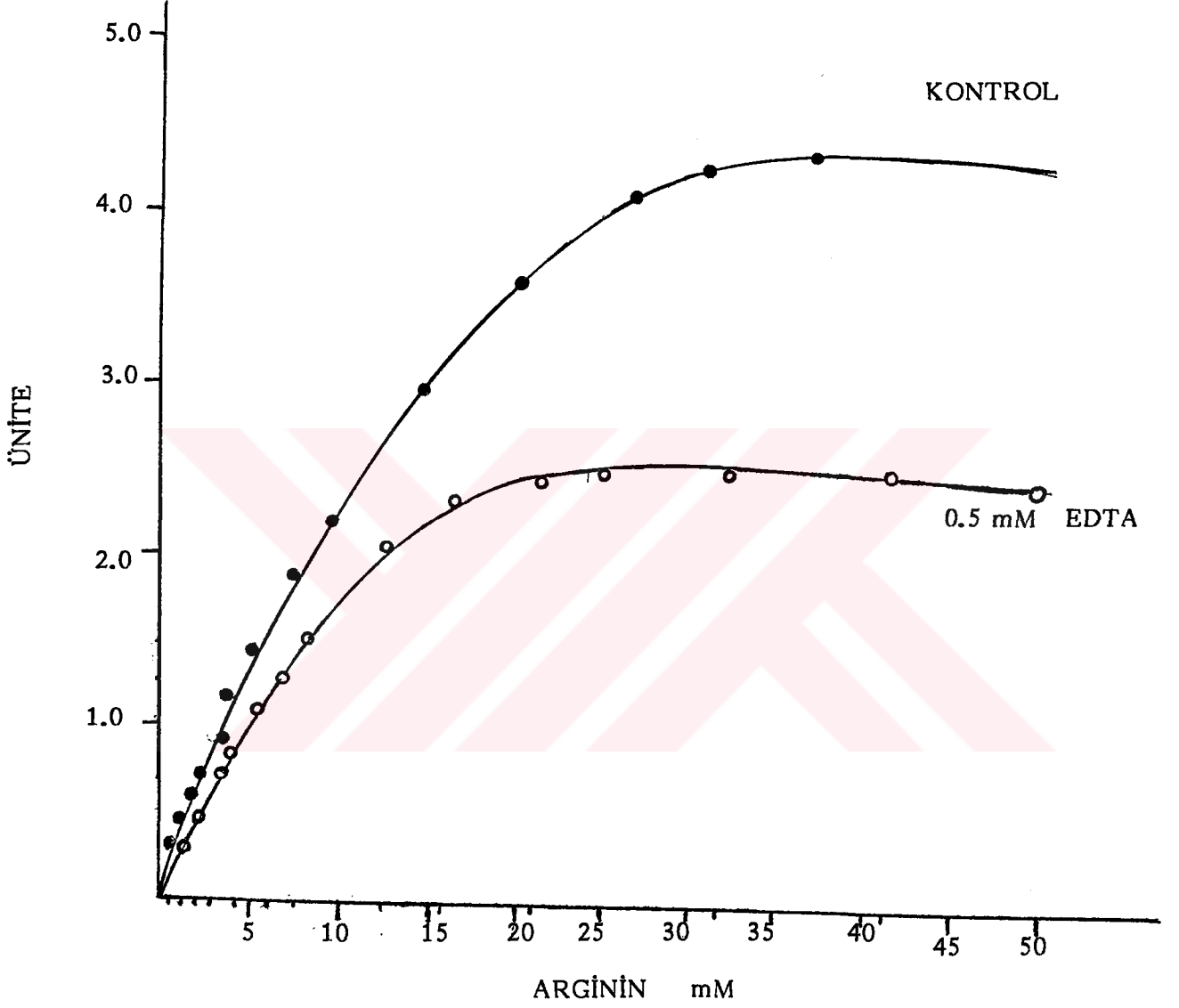
III.9.b.d.M.benedeni Arginazı Üzerine p-CMBA'in İnhibisyon Etkisi:

Değişik p-CMBA konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi incelenmiştir. 30 Mmol p-CMBA enzim aktivitesinde %50 dolaylarında inhibisyona neden olmuştur.(Şekil28).

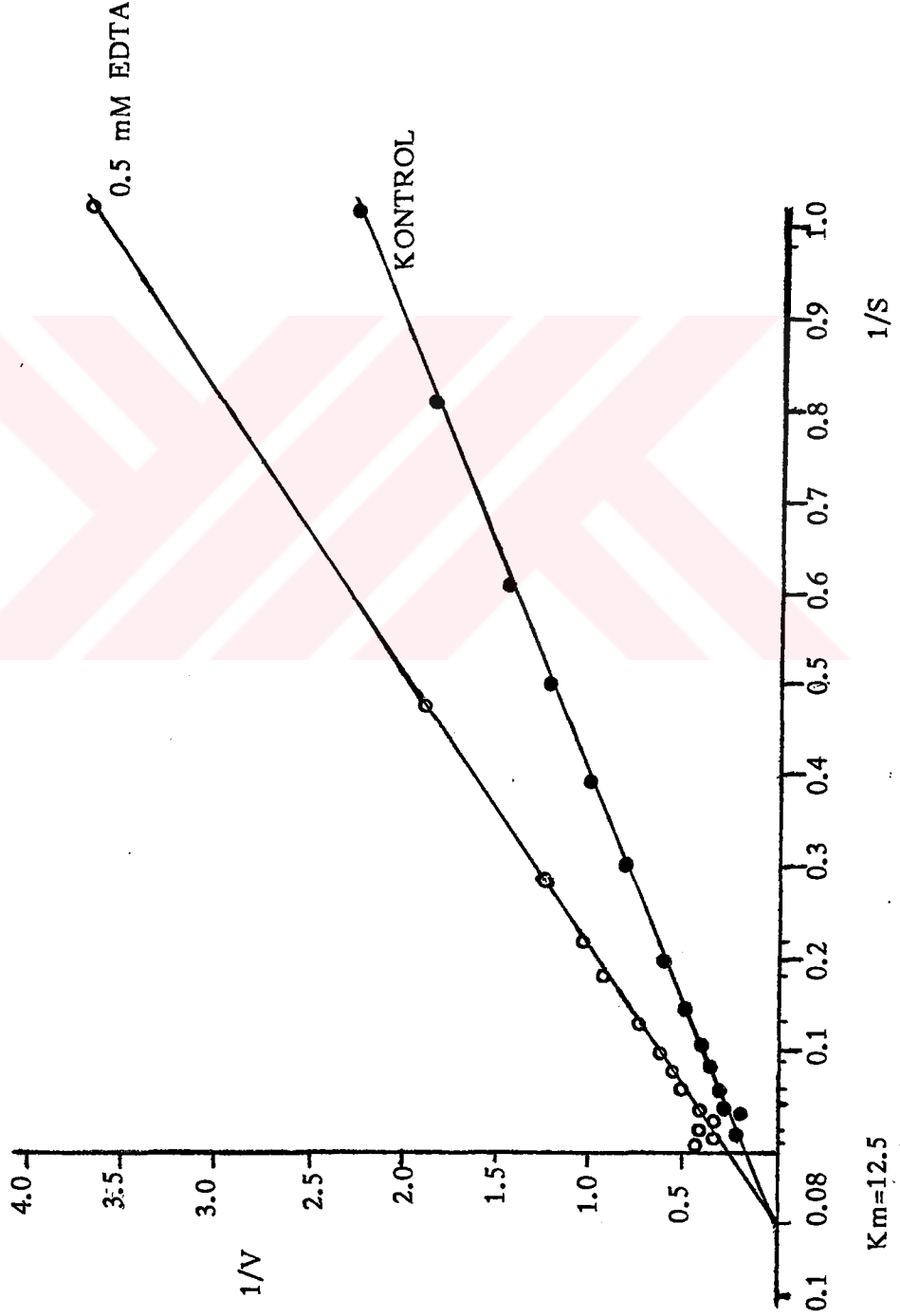
20 M Mol'luk p-CMBA varlığında ve değişik arginin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi saptanıp inhibisyon etkisinin varlığı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir(Şekil 29).Sonuçlar Michaelis-Menten



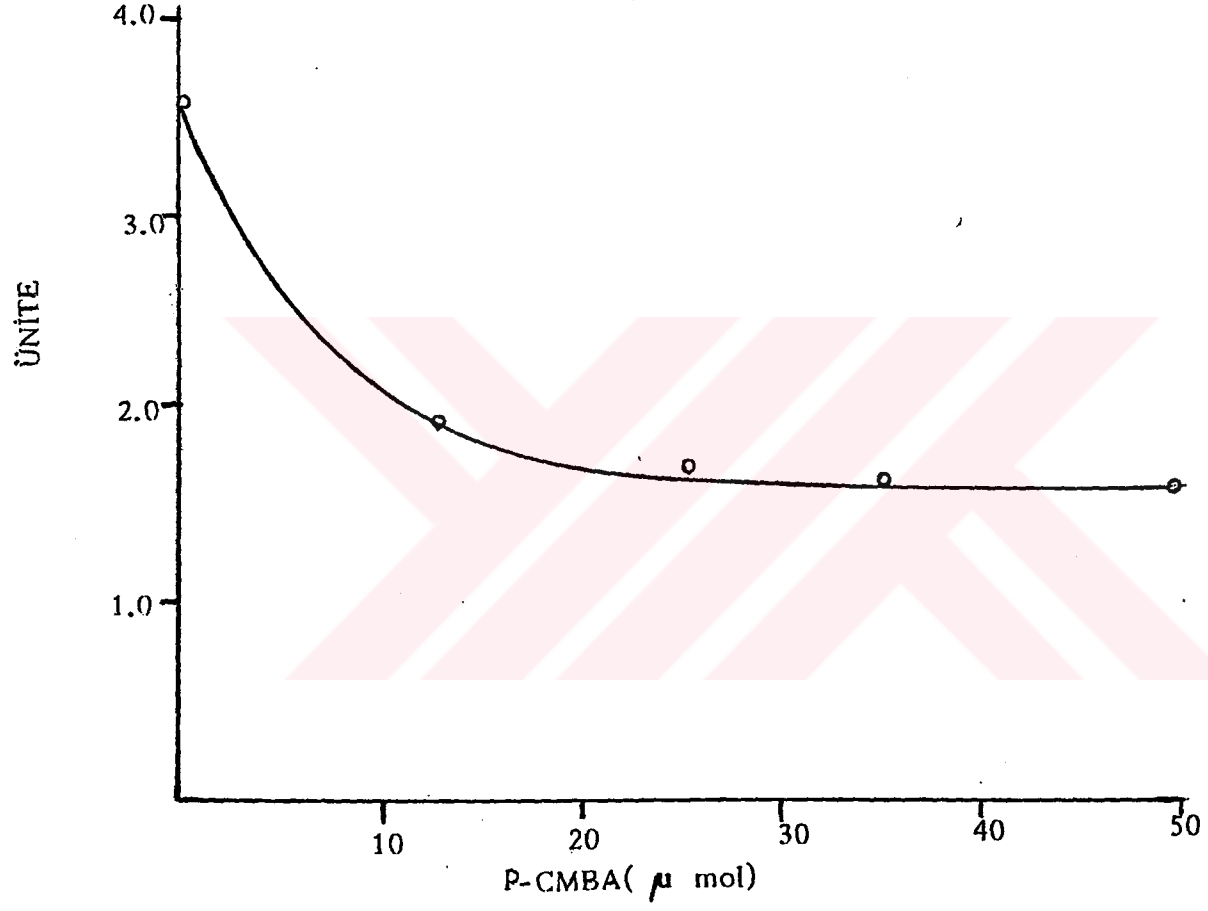
Şekil 25 : M.benedeni Arginazı Üzerine EDTA'in İnhibisyon Etkisi.



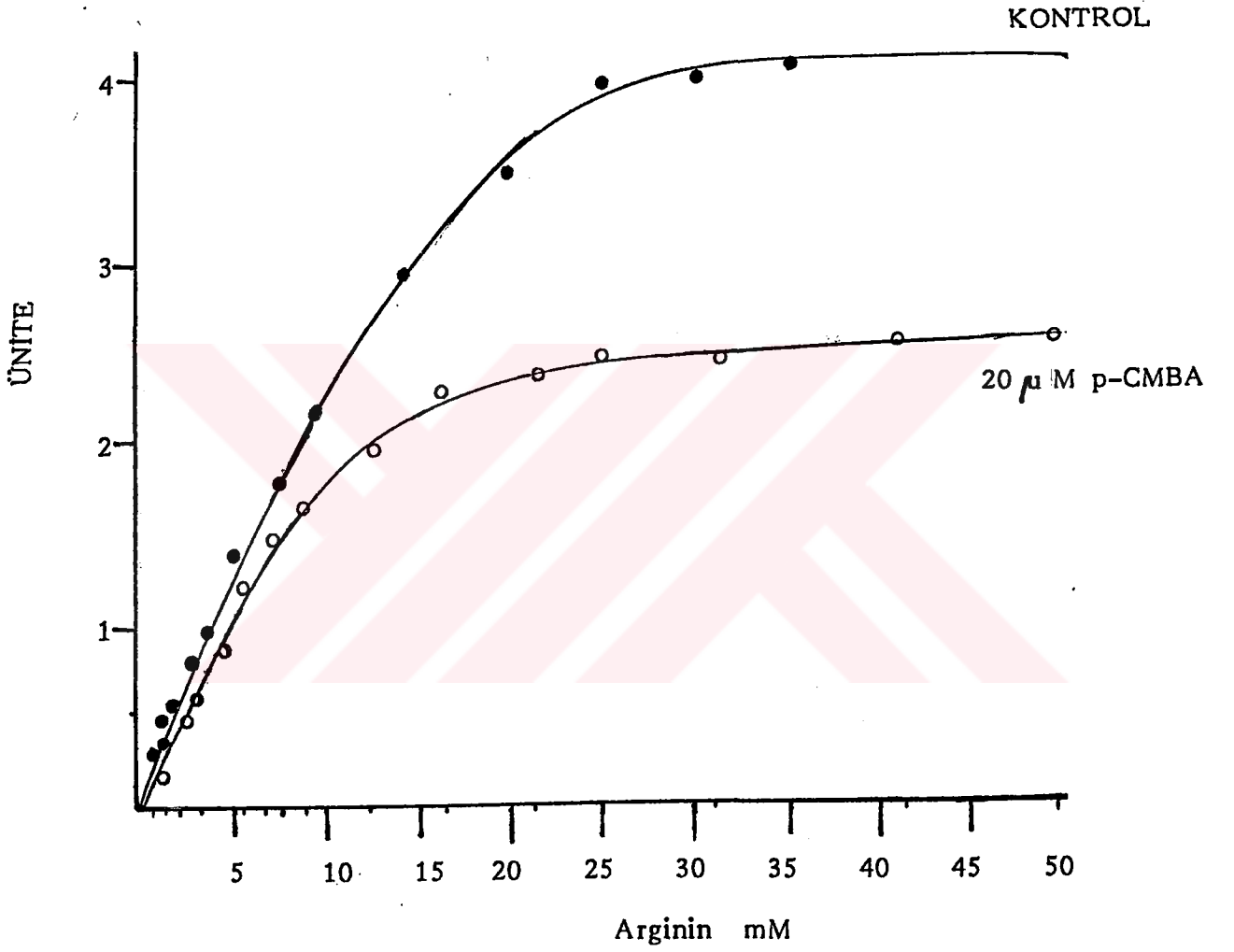
Şekil 26 : EDTA'nın *M. benedeni* Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunlukları Göre Etkisi.



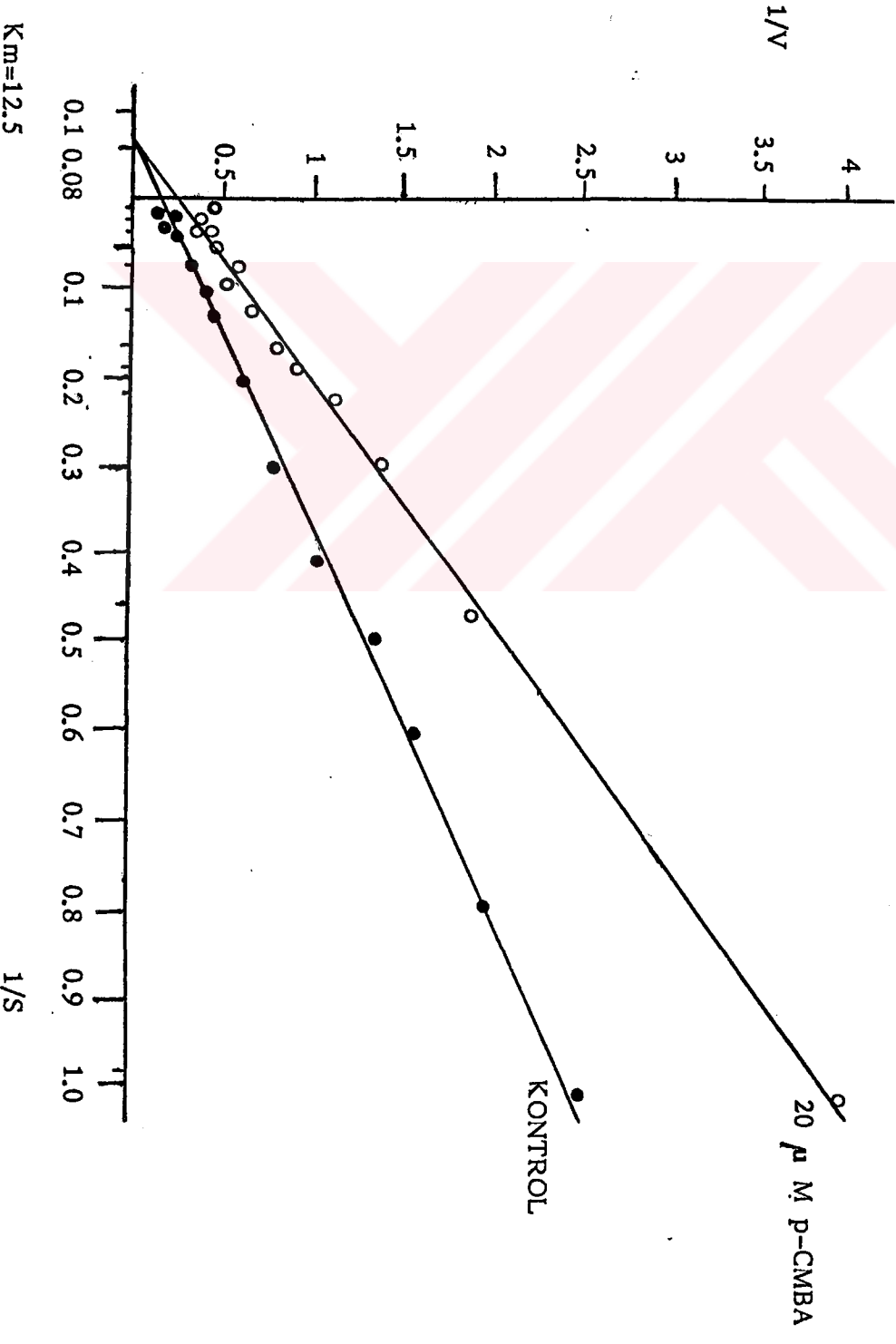
Şekil 27 : EDTA'nın M.benedeni Arginaz Enzimi Üzerine Substrat Yoğunluklarına Bağlı olarak Değişiminin Lineweaver – Burk Yöntemiyle Değerlendirilmesi.



Şekil 28 : M.benedeni Arginazı Üzerine P-CMBA'nın İnhibisyon Etkisi



Şekil 29 : p-CMBA'nın *M. benedeni* Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.



Şekil 30 : p-CMBA'nın M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki

grafiğine dökülmüş,daha sonra Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirilmiştir.p-CMBA'in varlığında enzimin V_{max} 'nın değiştiğini fakat K_m 'in değişmediği ortaya konulmuştur.

Bu deney sonunda enzimin arginine karşı K_m 'nin 12.5 mM civarında olduğu p-CMBA 'in enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği görülmüştür(Şekil 30).

III.9.b.e.M.benedeni Arginazı Üzerine N-Etil Malemit'in İnhibisyon Etkisi:

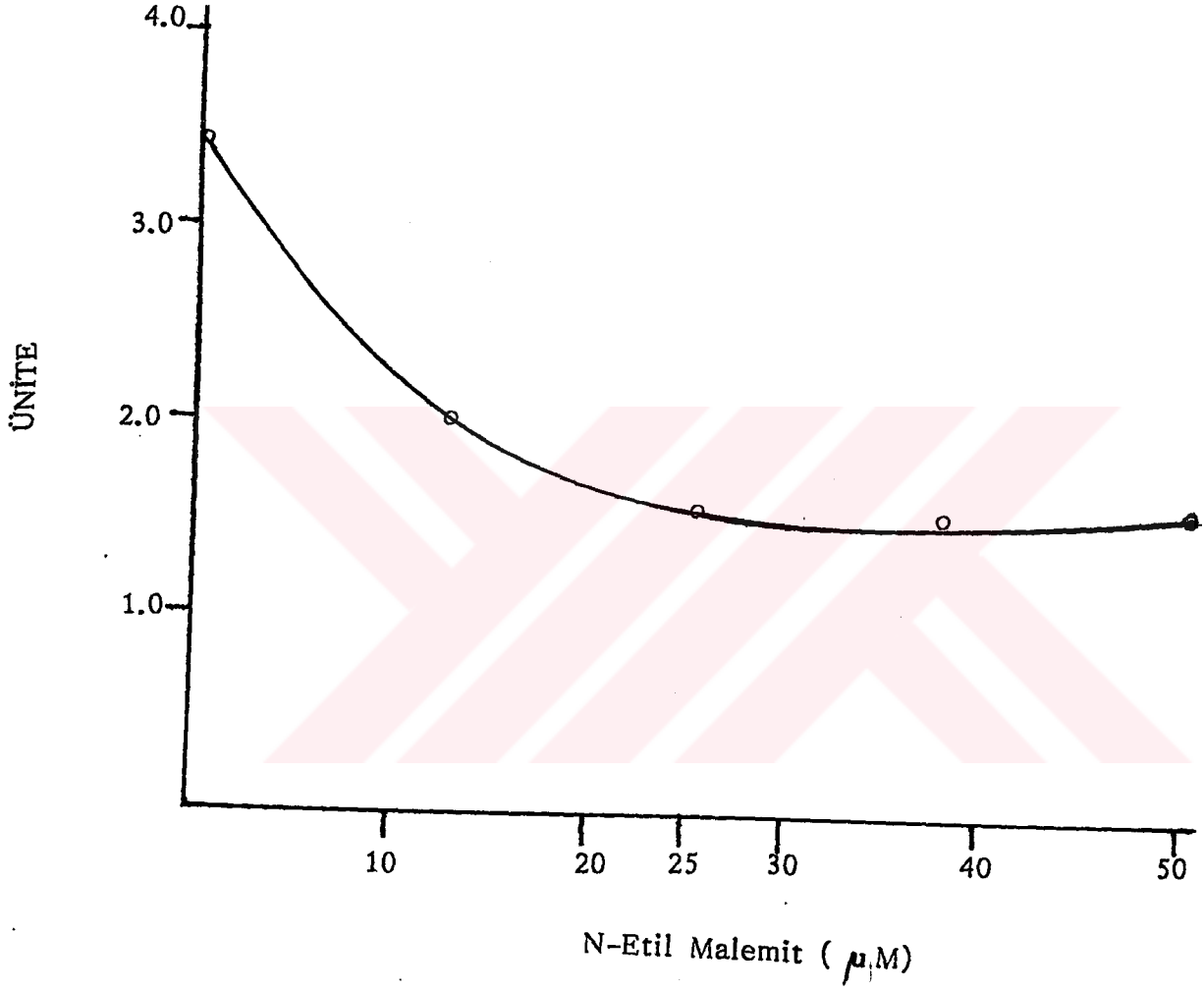
Değişik N-Etil Malemit konsantrasyonlarında arginaz enziminin aktivitesi incelenmiş 50 μ mol N-Etil Malemit 'in %57 dolaylarında inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir(Şekil 31).

20 μ Mol'luk N-Etil Malemit varlığında ve değişik arginin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi saptanıp inhibisyon etkisinin varlığı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir(Şekil 32).Sonuçlar Michaelis -Menten grafiğine döküldü daha sonra Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirildi .N-Etil Malemit'in varlığında enzimin V_{max} 'nın değiştiğini fakat K_m 'in değişmediği ortaya konulmuştur.

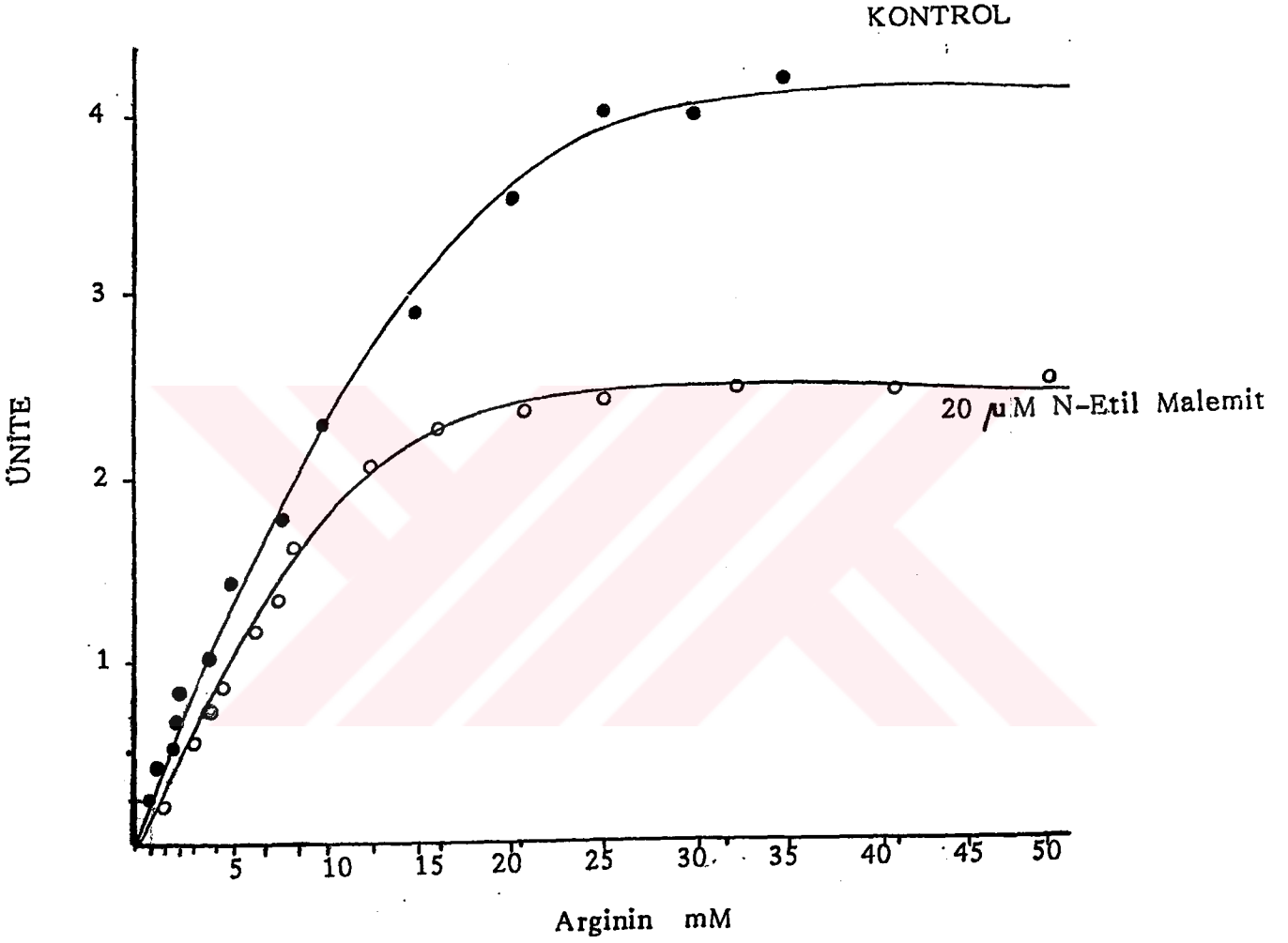
Bu deney sonunda enzimin arginine karşı K_m 'nin 12.5 mM civarında olduğu N-Etil Malemit'in enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiği görülmüştür(Şekil33).

III.9.b.f.a.M.benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Metilen Mavisi Derişimlerinin Etkisi:

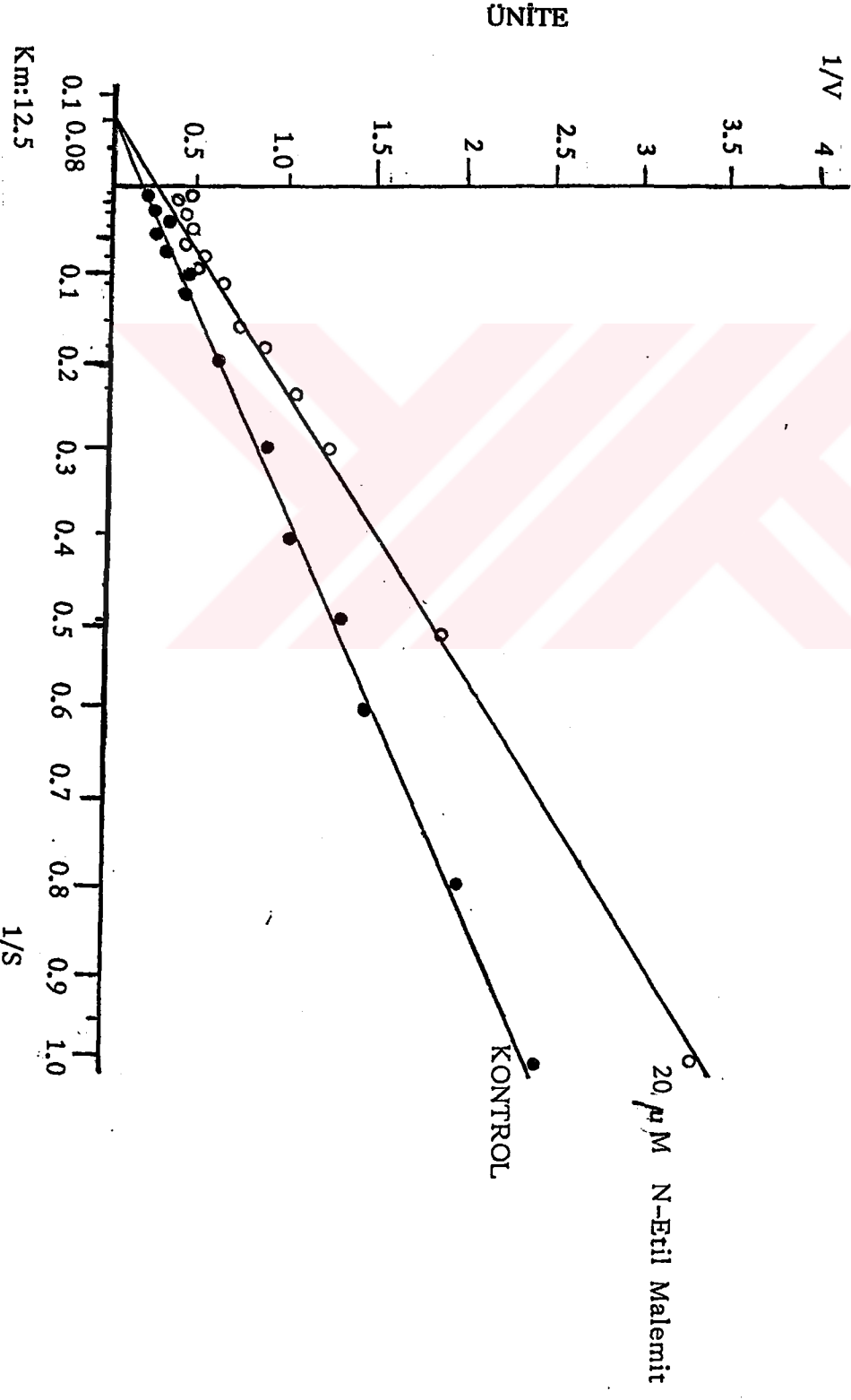
Değişik metilen mavisi konsantrasyonlarında 150 watt'lık projeksiyon ışığı altında M.benedeni arginazının fotoinaktivasyonu incelenmiştir.0.3 mM metilen mavisinin varlığında ve projeksiyon ışığı altında enzim aktivitesinin %55.3 oranında aktivite kaybettiği



Şekil 31 : M.benedeni Arginazı Üzerine N-Etil Malemit'in İnhibisyon Etkisi.

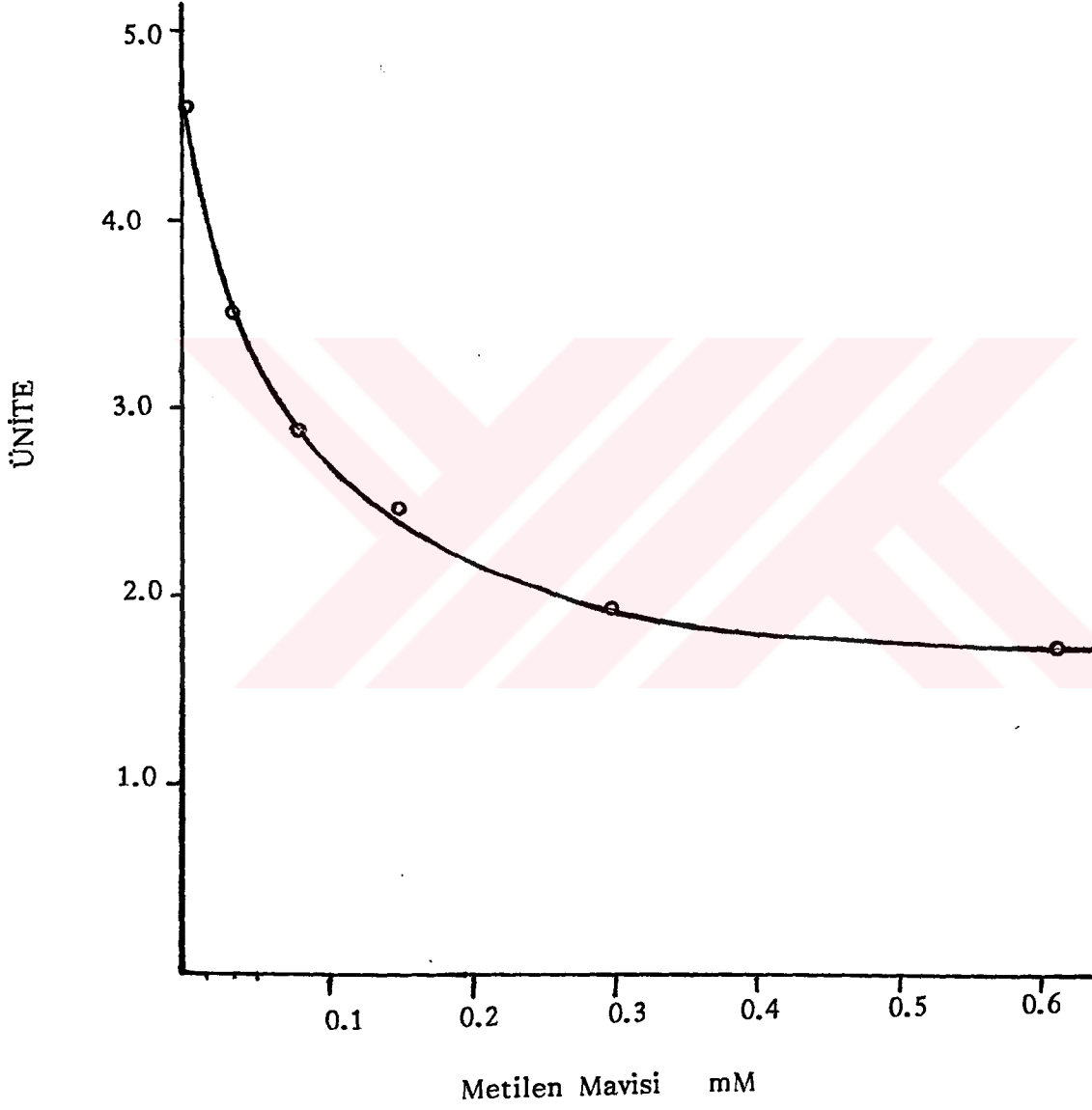


Şekil 32 : N-Etil Malemit'in M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi.

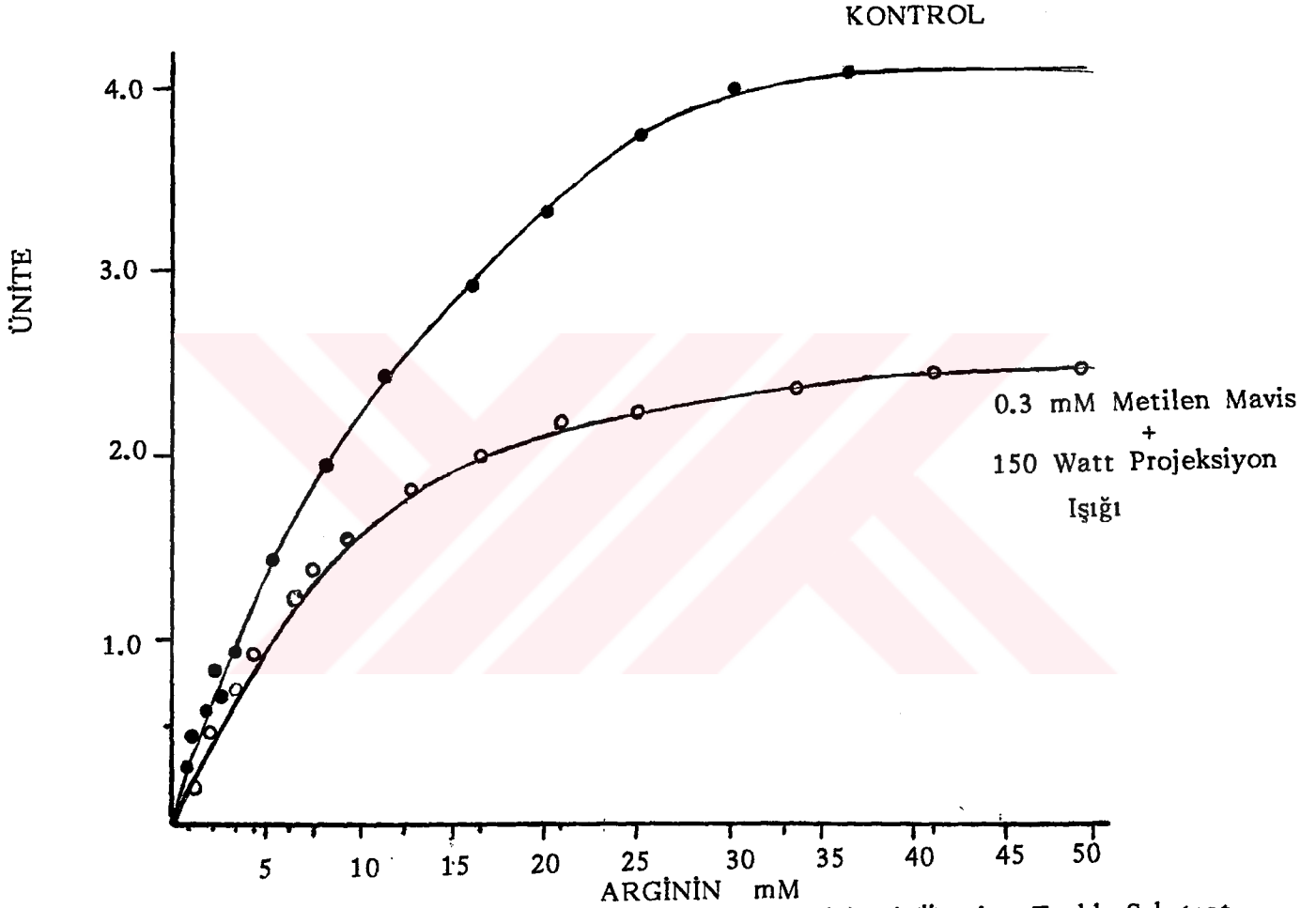


Şekil 33 : N-Etil Malemit'in M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon

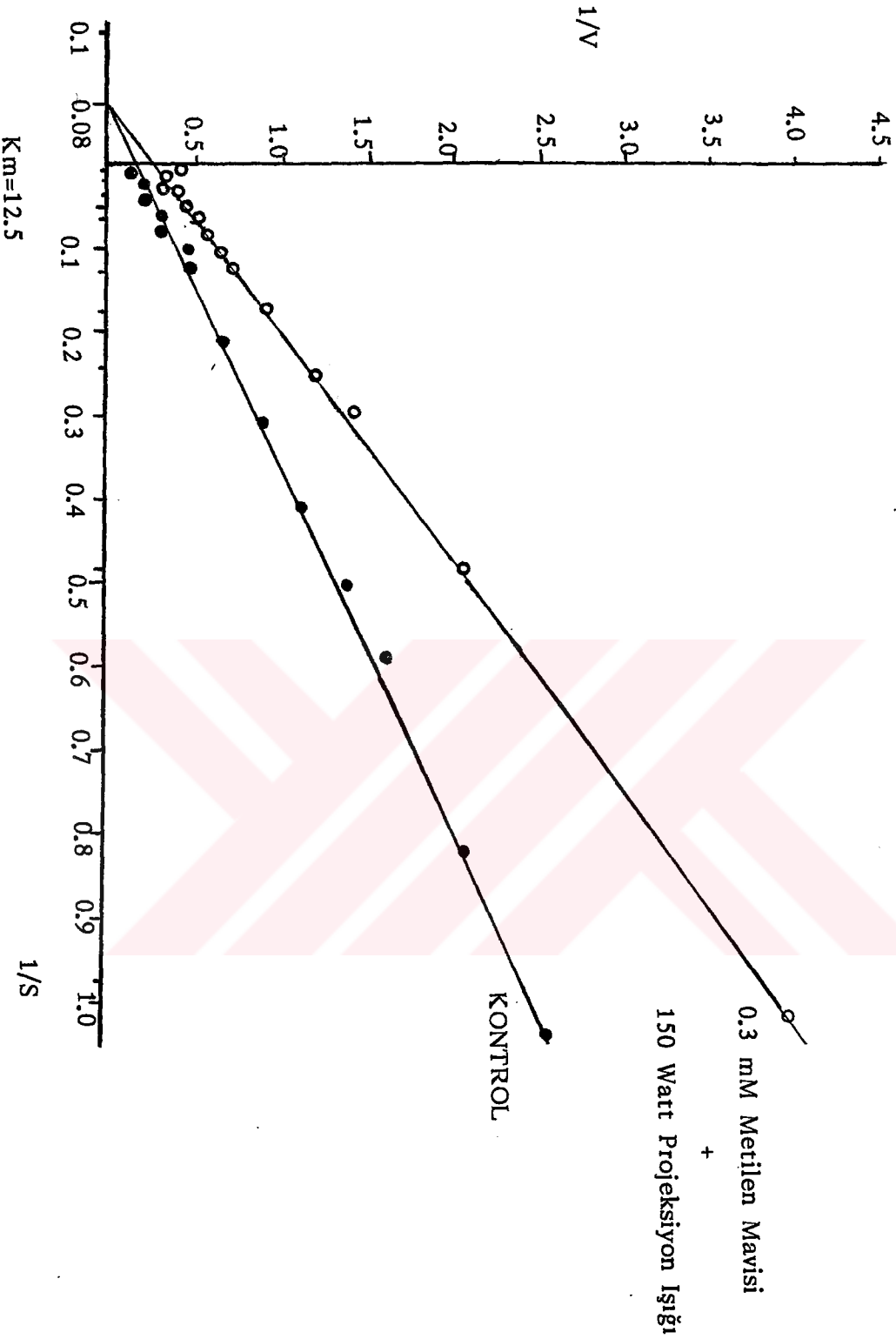
Etkisinin Lineweaver -Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi.



Şekil 34 : *M. benedeni* Arginazının Fotoinaktivasyonuna Metilen Mavisi Derişimlerinin Etkisi.



Şekil 35 : Metilen Mavisinin *M. benedicti* Arginaz Aktivitesi Üzerine Farklı Substrat Yoğunluklarına Göre Etkisi



Şekil 36 : Metilen Mavisinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Lineweaver-Burk Yöntemi ile Değerlendirilmesi.

saptanmıştır(Şekil 34).

0.3 mM'lık metilen mavisi ve 150 watt'lık ışık kaynağı altında değişik arginin konsantrasyonlarında M.benedeni arginazının aktivitesi saptanarak Michaelis -Menten grafiğine göre değerlendirilmiştir(Şekil 35).

Arginazının fotoinaktivasyonu ve kontrol grubu Lineweaver -Burk yöntemi ile değerlendirildiğinde inhibisyonunu non-kompetitif olduğu saptanmıştır (Şekil 36).

III.9.b.f.a.Değişik Işık Koşullarında Metilen Mavisinin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi:

Homojenize ve santrifüje edilen M.benedeni örneklerindeki endojen üre üreaz tepkimesi sonucu parçalandıktan sonra elde edilen fraksiyonlar enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.Tablo'4 de görüldüğü gibi M.benedeni örnekleri 0.5 mM'lık $MnCl_2$ 0.3 mM'lık metilen mavisi varlığında 53 °C'de 10 dakika preinkübasyona tabi tutulduğu zaman,oda ışığı ve karanlıkta enzim aktivitesinde %25-27 oranında bir düşüşün olduğu ortaya koyulmuştur. 150 watt'lık ışık kaynağı altında ise bu düşüşün %48'e kadar ulaştığı saptanmıştır.

Metilen mavisi ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kabul edilmiş ve aktivite %100 olarak tanımlanmıştır.Metilen mavisi ilave edilmiş örneklerdeki aktivite,kalan aktiviteyi göstermektedir.

III.9.b.f.b. $MnCl_2$,Metilen Mavisi ve Işığın M.benedeni Arginazının Fotoinaktivasyonuna Olan Etkileri:

Enzim kaynağı olarak kullanılan M.benedeni homojenatlarına değişik preinkübasyon işlemleri uygulandığı zaman enzim aktivitesinde çok belirgin değişimler görülmektedir.

Preinkübasyon işlemi 53 °C'de 10'ar dakikalık iki aşama halinde toplam 20 dakika olarak uygulanmıştır.Metilen mavisi koşullara göre birinci veya

KOŞULLAR	AKTİVİTE %	
	KONTROL	X +METİLEN MAVİSİ
ODA IŞIĞI	100	72.8
KARANLIK	100	74.1
150 WATT'LİK IŞIK	100	52.3

Tablo 4 : DEĞİŞİK IŞIK KOŞULLARINDA METİLEN MAVİSİNİN ARGİNAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

X:Metilen mavisi ilave edilmemiş örnekler kontrol olarak kabul edilmiş ve aktivite %100 olarak tanımlanmıştır.

Metilen mavisi ilave edilmiş örneklerdeki aktivite kalan aktiviteyi göstermektedir.

MnCl ₂	METİLEN MAVİSİ	METİLEN MAVİSİ	MnCl ₂	IŞKLANDIRMA		XX %AKTİVİTE
				150 WATT	ODA IŞIĞI	
+	-	-	-	-	+	100
+	-	+	-	+	-	30.6
+	+	-	-	+	-	18.73
-	+	-	+	+	-	15.7
I.PREİNKÜBASYON		II.PREİNKÜBASYON				

Tablo 5 : MnCl₂, METİLEN MAVİSİ VE IŞIĞIN M.benedeni ARGİNAZİNİN FOTOİNAKTİVASYONUNA OLAN ETKİLERİ.

Birinci ve ikinci preinkübasyon aşamalarında tabloda belirtildiği şekilde M.benedeni örneklerine metilen mavisi ve MnCl₂ ilave edilmiş preinkübasyon işlemi 150 Watt'lık ışık altında veya oda ışığında gerçekleştirilmiştir.

XX:Kalan aktiviteyi göstermektedir.

ikinci preinkübasyon aşamalarında ortama ilave edilmiştir. Metilen mavisinin ilave edildiği koşullara göre aynı şekilde preinkübasyonun değişik aşamalarda 8-10 cm mesafeden 150 watt'lık ışık kaynağına maruz bırakılmıştır (Tablo 4).

I. ve II. preinkübasyon işlemi 53 °C 'de 10'ar dakika 0.5 mM'lık $MnCl_2$ ile oda ışığında yapıldığı zaman elde edilen enzimatik aktivite düzeyi kontrol olarak kabul edilmiştir. Enzimatik aktivitedeki değişmeler bu kontrole göre değerlendirilmiştir (Tablo 5).

M.benedeni homojenatlarının 150 watt'lık ışık varlığında I. preinkübasyon işlemi $MnCl_2$ ile yapıp (53 °C 10 dakika) metilen mavisi ikinci preinkübasyon aşamasında ilave edildiği zaman enzimatik aktivitedeki düşüş %69.4 dolaylarında olmaktadır.

Örnekler 150 watt'lık ışık varlığında $MnCl_2$ ve metilen mavisi ile aynı anda I. preinkübasyon aşamasında (53 °C'de 20 dakika) ortama ilave edilirse enzim aktivitesindeki kaybı %81'e vardığı saptanmıştır.

M.benedeni homojenatlarına 150 watt'lık ışık kaynağının varlığında I. preinkübasyon aşamasında metilen mavisi ilave edilip ,II. preinkübasyon aşamasında ; $MnCl_2$ ortama ilave edilince enzimatik aktivitede %84.3'e ulaşan bir kaybın varlığı gözlenmiştir (Tablo 5).

III.9.c. M.benedeni'nin FARKLI ORTAMLARDA GÖSTERDİĞİ DEĞİŞİKLİKLER.

Bilindiği gibi M.benedeni sığırların ince bağırsaklarında yaşayan bir parazittir. Bu parazit bağırsak ortamında belli bir ozmotik basınca maruz kalmaktadır. Buradan yola çıkarak alınan M.benedeni parazitleri Distile Su, %0.9 NaCl ve %20'lik NaCl 'lü yoğunlukları ve pH'ları farklı

çeşitli ortamlarda 37⁰C 2 şer saat inkübe edilmiştir.İnkübasyon sonucu parazitler bu farklı ortamlardan dışarı alınmış ve parazitlerin bu ortamlara saldığı external üre (dışarı atılan) miktarları ve amonyak düzeyleri ölçülmüştür.

Dışarı alınan parazitler elvehjem (cam -cam) homojenizatör^Aden geçirilip,(Sorvall RC-5B) soğutmalı santrifüjde 10 dakika 15000 rpm'de santrifigasyon işlemine tabi tutulmuşlardır.Elde edilen süpernatantlarda internal üre (içeride kalan) ve amonyak düzeyleri saptanmış , sonuçlar % olarak değerlendirilmiştir(Tablo 6,7,8).

Daha sonra parazitin çeşitli seksiyonları arasında arginaz enzim aktivitelerinde bir farklılığın olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır. Bunun içinde tüm bir M.benedeni paraziti alınmıştır. Parazitin baş, orta ve kuyruk kısımları ayrılmış ve enzim aktivitelerine bakılmıştır.

Örneklerde en yüksek enzim aktivitesinin alındığı distile su'da ve pH:7'de 2 saat süreyle 37 ⁰C 'de inkübe edilmiş inkübasyon sonucu parazitler dışarı taşınıp farklı seksiyonların ortama attıkları ;atılan üre ,amonyak miktarları saptanmıştır.Daha sonra da parazitler homojenize ve santrifüje edilerek parazitin içindeki internal üre,amonyak miktarları bulunmuştur.Bu parazitlerde ayrıca arginaz aktiviteleri ve protein miktarları da tesbit edilmiştir(Tablo 8).

TABLO 6:

Tablo'6 da görüldüğü gibi pH:7'de atılan üre miktarları %'ye vurulduğunda distile suda bu oranın %70-72 ,%0.9 NaCl'de %68-69 ve %20 NaCl'de ise % 70-71 μ mol/gr parazitxsaat olduğu saptanmıştır.Yoğunluk farkı olan bu üç ortamda atılan üre miktarları yaklaşık olarak aynıdır(Tablo 6).

Aynı parazitler alınıp homojenize edilmiş santrifüj işleminden sonra

süpernatantlarda parazitin içinde tutulan üre miktarları(internal üre) ölçülmüştür.

İnternal üre düzeyleri ise,pH:7'de; distile suda ortalama %27 -29 ,%0.9 NaCl'de %31,%20 NaCl'de ise %28-30 olduğu saptanmıştır . Aynı pH'da ve farklı yoğunluklarda tutulan parazitlerdeki internal üre miktarlarının değişmediği de böylece gözlenmiştir(Tablo 6).

Yani sonuç olarak diyebiliriz ki inkübe edilen parazitlerin dışarıya atıkları(external) üre miktarları ve yine bu parazitlerin içlerinde tuttıkları(internal) üre miktarları yoğunlukları farklı ortamlarda da değişiklik göstermemektedir.

Tablo 6'da görüldüğü gibi M.benedeni arginazı pH:7'de; Distile suda %0.9 NaCl ve %20 NaCl içinde 2 saat 37⁰C 'de bekletildikten sonra arginaz aktivitelerine bakıldığında ise enzim aktivitelerinin 0.5-0.7 üniteler arasında değişip görüldüğü gibi yok denecek kadar düşük düzeyde arginaz aktivitesi saptanmıştır(Tablo 6).

Protein miktarlarının ise her üç ortamda da değişmediği gözlenmiştir. Parazitin dışarıya attığı amonyak miktarı ise;Distile su'da ortalama 569 μ g/100 ml,%0.9 NaCl'de 349 μ g /100 ml,%20 NaCl'de320 μ g /100 ml olarak saptanmıştır(Tablo6). Tutulan amonyak miktarı ise,Distile su'da ortalama 486 μ g ,%0.9 NaCl 391 μ g,%20 NaCl 215 μ g/100 ml olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

TABLO 7:

Ayrıca M.benedeni'ler pH:9.5'da; Distile su, %0.9 NaCl,%20 NaCl içinde 2 saat 37 ⁰C 'de bekletildikten sonra parazitin oluşturduğu external ve internal üre, amonyak düzeyleri de saptanarak aynı örneklerde arginaz aktiviteleri ve protein miktarları ölçülmüştür(Tablo 7).

Atılan ortalama % üre miktarları en yüksek % 20 NaCl'de %69.8-71.8 μ mol/ gr parazitxsaat,ikinci olarak distile su'da %69.9-70.8 μ mol/gr

parazitxsaat daha az olarakta %0.9 NaCl'de %57.9-60.9 μ mol/g parazitx saat olarak saptanmıştır (Tablo7).

Atılan ortalama amonyak değerleri tablo 7'de görüldüğü gibi sırası ile en yüksek distile su'da ortalama 850 μ g/100 ml , ikinci olarak %0.9 NaCl'de 637 μ g/100 ml,en düşük olarakta %20'lik NaCl de 468 μ g/100 ml olarak bulunmuştur(Tablo 7).

Tutulan % üre miktarları ise,sırasıyla en yüksek distile su'da %29.1-30.09 μ molüre/gr parazitxsaat,daha sonra %20 NaCl'de %28.1-30.1 μ mol, daha az olarak da %0.9 NaCl %39-42.1 μ mol olarak bulunmuştur (Tablo 7).

Tutulan ortalama amonyak miktarları tablo 7'de de görüldüğü gibi Distile su'da 565 μ g/100 ml ,ikinci olarak %0.9 NaCl'de 415 μ g/100 ml ,%20 NaCl'de 246 μ g/100 ml olarak saptanmıştır(Tablo 7).

Aynı örneklerin arginaz aktivitelerine bakıldığında en yüksek enzim aktivitesi Distile suda 3.92 ünite ,daha sonra %0.9 NaCl'de 3.41 ünite,daha az olarakta %20 NaCl'de 2.6 ünite olarak saptanmıştır.Protein değerlerinin yaklaşık olarak üç ortamda 'da değişmediği gözlenmiştir (Tablo 7).

TABLO 8:

Parçalanmamış tüm bir M.benedeni paraziti alınıp baş, orta ve kuyruk kısımları 2 saat 37⁰C'de Distile su içinde bekletildikten sonra atılan üre,tutulan üre,arginaz ,protein, μ gr NH₄/100 ml değerleri saptanmıştır.

Atılan % üre miktarları baş kısmında %67.6-68.6 ,orta kısım da %67.3-67.8 , kuyruk kısımlarında %67.4-68.6 μ mol/gr parazitxsaat olarak saptanmıştır.

Atılan amonyak miktarlarının baş kısmında ortalama 154 μ g/100 ml , orta kısmında 92.7 μ g/100 ml,kuyruk kısmında 98.1 μ g/100 ml olarak bulunmuştur.Tutulan üre miktarlarının baş,orta ve kuyruk kısmında

yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür .

Parazitte tutulan amonyak değerleri baş kısmında ortalama 193.5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ olup en yüksek,daha sonra orta kısımda 95.3 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$,en düşük olarakta kuyruk kısmında 63.6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ bulunmuştur.Toplam üre miktarları ise baş ,orta ve kuyruk kısımlarında yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür.Tutulan % üre miktarları ise baş, orta ve kuyruk kısımlarında yaklaşık olarak %32 civarında olduğu ortaya çıkmıştır.

Arginaz aktiviteleri açısından baş, orta ve kuyruk kısımlarında bir farklılığın olmadığı saptanmıştır(Tablo 8).Ayrıca bu seksiyonlarda protein değerlerinde de bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir(Tablo 8).

Tablo 6 : Moniezia benedeni pH: 7'de Distile Su,%0.9 NaCl,%20 NaCl içinde 2 Saat 37 C°de bekletildikten sonra Atılan Üre, Tutulan Üre, Toplam Üre ,Arginaz, Protein, NH₄ Değerleri .

	Örnek Sayısı	ATILAN		TUTULAN		TOPLAM ÜRE	ÜRE		ARGİNAZ (ÜNİTE)	PROTEİN mg/ml
		ÜRE	% /µg NH ₄	ÜRE	% /µg NH ₄		ATILAN %	TUTULAN%		
Distile Su	I	7.55	558	2.84	483	10.39	72.6	27.3	0.722	36.75
	II	7.58	580	3.16	489	10.74	70.5	29.4	0.710	38.30
%0.9 NaCl	I	5.4	358	2.53	389	7.93	68.09	31.9	0.655	38.89
	II	5.24	340	2.59	394	7.83	69.1	30.9	0.659	37.80
%20 NaCl	I	8.30	318	3.59	205	11.89	70.3	30.1	0.512	36.4
	II	8.26	323	3.24	225	11.50	71.50	28.20	0.504	38.50

Tablo 7 : Moniezia benedeni pH:9.5'da Distile su,%0.9 NaCl, %20 NaCl içinde 2 saat 37 C^o'de bekletildikten sonra Atılan Üre,Toplam Üre,Arginaz,Protein, NH₄ Değerleri .

	Örnek Sayısı	ATILAN		TUTULAN		TOPLAM ÜRE	ÜRE		ARGINAZ (ÜNİTE)	PROTEİN mg/ ml
		ÜRE	% /µg NH ₄	ÜRE	% /µg NH ₄		ATILAN %	TUTULAN %		
Distile Su	I	6.84	869	2.79	572	9.22	69.9	30.09	4.12	44.1
	II	6.70	832	2.75	558	9.45	70.8	29.10	3.73	37.8
% 0.9 NaCl	I	3.20	656	2.05	410	5.25	60.9	39	3.46	42.7
	II	3.17	618	2.30	421	5.47	57.9	42.1	3.37	42
%20 NaCl	I	7.25	478	2.84	265	10.09	71.8	28.14	2.64	37.1
	II	7.05	458	3.05	227	10.1	69.8	30.19	2.56	41.3

ablo 8 : Parçalanmamış tüm bir M. benedeninin baş ,orta ve kuyruk kısımları 2 saat 37 C° de Distile Su içinde bekletildikten sonra Atılan Üre,Tutulan Üre,Toplam Üre,Arginaz,Protein,NH₄ Değerleri .

	Örnek Sayısı	ATILAN		TUTULAN		TOPLAM ÜRE	ÜRE		ARGİNAZ (ÜNİTE)	PROTEİN mg/ml
		ÜRE	% $\mu\text{g NH}_4$	ÜRE	% $\mu\text{g NH}_4$		ATILAN %	TUTULAN %		
Distile Su BAŞ	I	7.37	149	3.37	187	10.74	68.6	31.37	3.26	35.7
	II	7.34	160	3.51	200	10.85	67.64	32.35	3.44	36.4
Distile Su ORTA	I	6.95	101.8	3.30	83.6	10.25	67.80	32.19	3.30	37.1
	II	7.13	83.6	3.49	107	10.62	67.3	32.86	3.17	39.9
Distile Su KUYRUK	I	7.72	96.3	3.53	54.5	11.25	68.62	31.37	3.18	37.1
	II	7.37	100	3.56	72.7	10.93	67.4	32.57	3.02	35

IV.BÖLÜM

TARTIŞMA

M.benedeni 'de arginaz enziminin özellikleri çok az bilinmektedir. Konu ile ilgili hiç bir literatüre raslanamamıştır.Bu çalışmada enzimin bazı özellikleri ortaya koyulmuştur.

M.benedeni'de Arginazın Özellikleri

M.benedeni arginazının %77'ye varan bir bölümünün hücrenin çekirdeğine bağlanmış durumda olduğu saptanmıştır(Tablo 2) . Değişik santrifüstasyon yöntemleri sonucu mitokondriada enzimin yerleşmediği ve iyonik gücün artması ile sitoplazmanın çözünebilen kısmına geçebileceği gözlenmiştir(Tablo 3).Santrifüstasyonun değişik hızlarda yapılmasına rağmen hala sitoplazmanın çözülür kısmında belirli bir ölçüde arginazın bulunuşu enzimin sitoplazmik bir izoenziminin olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

Enzimin hücre çekirdeğine bağlı olmasının metabolik denetimi açısından önemi Moss tarafından speküle edilmektedir(47). Moss'a göre ; Mn^{++} iyonları daha çok hücre çekirdeğinde bulunanlar ve bunların çekirdekten sitoplazmaya geçişleri ile arginaz aktivite edilerek arginin düzeyleri değişmeler göstermekte ve bunun sonucu protein sentezi denetim altına alınmaktadır(47).Enzimin yaklaşık %25'i ise mitokondrial fraksiyonda bulunmuştur.Bu fraksiyonda enzimin bulunması çekirdeksel fraksiyonun tam çökmemesine veya bir kısmının süpernatanta geçip daha sonra 16000 g 'de santrifüje olunca mitokondrial fraksiyon ile çökmesi şeklinde izah edilebilir.

M.benedeni'de arginazın hücre içi yerleşiminde çekirdeğe bağlı olmasının metabolizma yönünden etkinliği tartışılmaya açık kalmaktadır.

ENZİMİN AKTİVASYONU

Pre-Inkübasyonun Etkisi

Arginazın aktivasyonu için iki faktör gereklidir pre-inkübasyon ve Mn^{++} . Her iki faktörün bir arada olması sonucu aktivasyon meydana gelmektedir. Arginazın ölçülmesinde kullanılan bütün metodlar pre-inkübasyonu önermektedirler(44). M.benedeni'den elde edilen ve enzim kaynağı olarak kullanılan çekirdeksel kısımlara pre-inkübasyon işlemi uygulanmadığı zamanlarda belirli bir düzeyde aktivite göstermektedirler. Aktivite pre-inkübasyon ısısına paralel olarak artmakta $53^{\circ}C$ 'de ise en yüksek düzeye ulaşmaktadır(Şekil 11). Pre-inkübasyonun etkisi ancak Mn^{++} iyonun varlığında görülebilir. Eğer enzim kaynağı $MnCl_2$ olmadan pre-inkübe edilirse bu artış olmaktadır (Şekil 14).

Hellermann Mn^{++} iyonunun enzim ile substrat arasında bir metal köprü kurduğunu ve Enzim- Mn^{+2} -arginin kompleksi meydana gelmesinin aktivasyona neden olduğunu bildirmektedir(48).

Pre-inkübasyonun ve $MnCl_2$ 'ün enzim aktivasyonuna olan etkisini değişik şekilde açıklayanlar vardır.

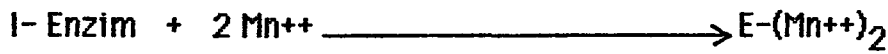
Mohamed ve Greenberg'e göre ;pre-inkübasyon sırasında $MnCl_2$ arginaza bağlanarak,enzimin aktivitesini veya dayanıklılığını artırmaktadır(49).

Parazitlerde arginazın Mn^{++} iyonuna karşı olan gereksinimi Campbell tarafından H.dimunata'da incelenmiştir H.dimunata arginazı Mn^{++} iyonu ile aktive edilmiş ve enzimin aktivitesi %80'lik bir artış göstermiştir(50).

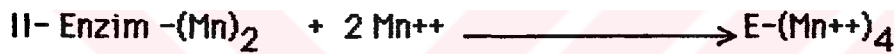
Gülen'de F.hepatica'da arginaz enzimi için pre-inkübasyonun gerekli olduğunu ortaya koymuştur(51).

Ozan ve Gülen'de; sığır tükürük arginaz enziminin aktivasyonu için pre-inkübasyon işleminin ve Mn^{++} iyonlarının gerekliliğini saptamışlardır (23).

Ratner(52) daha değişik bir yaklaşımla arginazın Mn^{++} ile aktivasyonunu açıklamaktadır."Sıçan ve sığır arginazları dört alt birimden meydana gelmiş olup her bir alt birime bir Mn iyonu bağlanır.



(Kompleks I)



(Kompleks II)

Kompleks I ,kompleks II'ye oranla %50 daha az aktiftir.Kompleks I'in Kompleks II'ye dönüşüm basamağı belkide tepkime hızının kontrol edildiği basamaktır.Pre-inkübasyon bu basamak için gerekli olan ısı ve zamanı sağlamaktadır(52).

Araştırmamızda Şekil 11 ve Şekil 14'de görüldüğü gibi enzimin aktivasyonunu, pre-inkübasyonun $MnCl_2$ ile yapılması halinde olmaktadır.

Örneğin pre-inkübasyon işlemi $MnCl_2$ 'süz ortamda uygulandığı zaman enzimin aktive edilemediği gözlenmektedir.

Araştırmada ortaya çıkan ilginç nokta da $MnCl_2$ konsantrasyonunun 0.75 mM'ın üstünde olduğu durumlarda inhibisyonun gözlenmesidir (Şekil 15). Sonuçta M.benedeni arginazında pre-inkübasyon ısısı 53 °C

olarak belirlenmiştir (Şekil 11).

M.benedeni'deki bulgulara göre arginaz en belirgin şekilde $MnCl_2$ (%1174) ve daha az olarak $NiSO_4$ (%372) tarafından aktive edilmiştir. $MgCl_2$ ve $CoSO_4$ 'ın etkilerinin büyük önem taşımadığı görülmüştür (%31-60). $CuSO_4$, $HgCl_2$, $FeCl_3$, $AgNO_3$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $CdCl_2$, $ZnSO_4$, CrO_3 , $Pb(NO_2)_2$, $SnCl_2$ enzimi %3-85 oranında olumsuz olarak etkilemişlerdir (Tablo 1).

Yapılan bir çalışmada sığır, tavşan ve kurbağa karaciğerlerinden artırılmış arginazlar $MnCl_2$ ile aktive edilmelerinin yanısıra $NiCl_2$ ve $CoCl_2$ ile aktive edilmektedirler. Buna karşılık $AgCl$ ve $HgCl_2$ olumsuz etkide bulunmaktadır (49).

Artırılmış kobay karaciğer arginazının Co ile aktivasyonu Mn^{++} ile eşdeğerdedir. Mg^{++} ve Ca^{++} da, Mn^{++} etkisine yakın aktivasyon sağlamaktadırlar. Kobay karaciğer arginazı Hg^{++} , Cd^{++} , Fe^{+++} ve Ni^{++} ile inhibe edilirken, Co^{++} , Mg^{++} enzimi aktive etmektedirler (26).

Bizim yaptığımız çalışmada enzimin en yüksek aktivasyonu fizyolojik sınırların üzerinde 53^0 C'lık bir pre-inkübasyonla sağlanmaktadır (Şekil 11). Asıl sorun 53^0 C 'de $MnCl_2$ ile pre-inkübasyon sonucu aktivasyondur. $MnCl_2$ 'ün aktivasyon etkisini gösterebilmesi için pre -inkübasyona gereksinimi kolayca yok edilememektedir. Zira parazitin yaşadığı ince bağırsaktaki ısı 37^0 C civarındadır.

pH'nın Etkisi :

Arginaz enziminin pH'sı yapılan çalışmaların bir çoğunda 9.5-9.7 olarak bildirilmiştir (15,36,53).

Parazitlerde ilk kez arginazın optimal pH'sı H.dimunata'da (54) saptanmış ve 9.5 olarak tesbit edilmiştir. Ayrıca pH profili simetrik olup

tipik bir çan eğrisi şeklindedir.M.benedeni arginazının optimal pH'sı 9.5 olarak bulunmuş ve pH profili simetrik olup yine tipik bir çan eğrisi görünümündedir(Şekil 13).Belirlenen optimum pH ile bu kısımlarda bulunan arginaz,H. dimunata'ya benzerlik göstermektedir.

Gülen(51) F.hepatica arginazı için optimal pH'yı 10.5 olarak saptamış ve pH eğrisi'nin asimetrik bir eğri görünümü olduğunu ortaya koymuştur.

Yine Gülen(15) kısmen artırlmış koyun karaciğeri arginazı için optimal pH'nın 10.3 olduğunu saptamıştır.

Çelik(55) E.granulosus hidatik kistlerindeki arginazın optimal pH'sının 9.5 olduğunu,pH profili simetrik bir görünümde olup tipik bir çan şeklini andırdığını ortaya koymuştur.

M.benedeni arginazının Km'i araştırılmış ve Km'i 12.5 mM olarak bulunmuştur(Şekil 17).Parazitlerde incelenen arginazların Km'leri F. hepatica'da 10 mM(37) H. dimunata'da 3.57 mM (56),E.granulosus'da 1-2 mM(55) olarak tesbit edilmiştir.Kertenkele ve yılan karaciğerinde bulunan arginazların Km'leri 100-200 mM ,insan karaciğerinde 6.12 mM,Sığır karaciğerinde 4.5 mM olarak bildirilmiştir(15).Koyun karaciğeri arginazının Km'i 8-10 mM olduğu ortaya koyulmuştur(15).

Bu bilgilerin ışığı altında sığırların ince bağırsaklarında yaşayan M.benedeni'de varlığı saptanan arginazın Km'ine göre kinetik özelliği irdelendiğinde enzimin daha çok Üreotelik sınıfa yakın olduğu görülmektedir.

Mora ve arkadaşları ,arginazları Km'lerine göre iki gruba ayırmaktadırlar.Bu gruplandırmaya göre üre döngüsüne sahip olan canlılardaki arginazların L-Arginine karşı Km'leri 10-20 mM arasında olup bu gibi

arginazlar "Üreotelik " grup altında toplanırlar(57).

Üre döngüsü olmayan sistemlerdeki arginazların Km'leri ise çok daha büyük olup 200 mM 'a kadar çıkmaktadır.Bu grup arginazlar"Ürikotelik" grubu oluştururlar(57).

Varlığı saptanan M.benedeni arginazının Km'inin yukarıda belirtilen parazitlerin Km'lerine yakın olduğu görülmektedir.

L-Amino Asitlerin M.benedeni Arginaz Aktivitesi Üzerindeki Etkileri:

Lizin ve Ornitin:

L-Amino asitlerden ornitin ve lizinin F.hepatica arginaz aktivitesini etkilediği Gülen(51) tarafından bildirilmiştir.

F.hepatica arginazı L-amino asitlere karşı değişiktir.Ornitin konsantrasyonu 8 mM olduğu zaman inhibisyon %40 ,15 mM 'da %50 dolaylarındadır.Lizin ise 10 mM konsantrasyonda enzimin aktivitesinde %60'a varan maksimum bir engellemeye neden olmaktadır .Ornitin ve lizinin çok belirgin olarak enzimi inhibe ettiği inhibisyonunun ise kompetitif tipte olduğu ortaya koyulmuştur(51).

Bizim yaptığımız çalışmada,değişik ornitin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi incelenmiştir,5 mM ornitin varlığında %55 dolaylarında inhibisyonun varlığı ortaya koyulmuştur.Ornitin konsantrasyonu 20 mM'a ulaştığında arginaz aktivitesinin %77'sini kaybettiği saptanmıştır (Şekil 19,20,21).

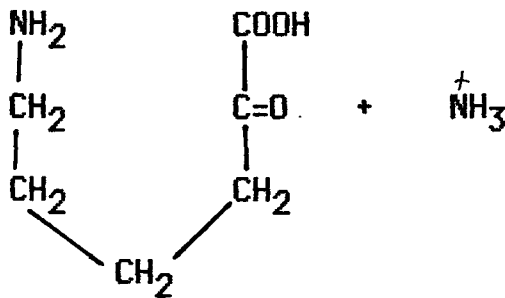
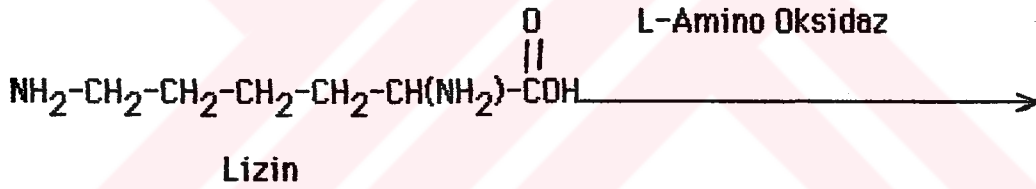
Aynı şekilde lizinin'de enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiş lizinin inhibitör etkisi'nin L-Ornitine benzediği saptanmıştır. 12.5 mM lizin konsantrasyonunda %55 oranında aktivite kaybettiği

saptanmıştır(Şekil23,24,25).

E.granulosus'da (55) değişik ornitin ve lizin konsantrasyonlarında arginaz enzim aktivitesi incelenmiş 2.5 mM ornitinde %14,5 ,10 mM ornitin'de %50,15 mM ornitin'de ise %70 civarında inhibisyona neden olduğu görülmüştür.Aynı şekilde arginazın en çok bilinen inhibitörlerinden olan L-Lizinin arginaz üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmış, 15 mM konsantrasyondaki L-lizinin %50'ye varan bir inhibisyona neden olduğu görülmüştür.

L-ornitin ve L-lizinin arginazı kompetitif olarak inhibe ettiği ortaya koyulmuştur(55).

Klinik açıdan önemli olan ve en çok incelenen arginazın lizin tarafından engellenmesidir.Lizinin aşağıda gösterilen yolla deamine edilmemesi sonucu kanda lizin miktarı artmakta ve **arginiemia** oluşmaktadır.



α - keto γ -amino kaproik asit

Argininemia'da görülen klinik tablo;devamlı kusma,baş dönmesi,geri zekalılık ve vücut gelişiminde duraksamadır.Biyokimyasal bulgular ise kan ve idrarda normalin çok üstünde arginin,lizin,sitrülin ve

amonyanın bulunmasıdır.Bu tablo Colombo ve arkadaşları tarafından **"Lysine intolerance"** olarak isimlendirilmektedir. Karaciğer arginaz aktivitesinde bir değişiklik olmamakla beraber eritrositlerdeki arginaz aktivitesi normalin çok altında bulunmuştur.

Colombo grubu hastalığın nedenini, lizinin arginazı engellemesine bağlamaktadırlar(54,58,59).

Oyanagi ve arkadaşları ise lizinin arginazdan ziyade argininosüksinat sentetazı engellediğini savunmaktadırlar(60).

Fakat Michelis ve Beandet aynı görüşü paylaşmamaktadırlar(61).Lizinin arginazı engellemesinden yararlanarak,üremiyi önlemek amacı ile üremik hastalara lizin tatbik edildiği zaman sonuç belirli bir ölçüde başarılı olmuştur.

Ayrıca iki taraflı nefrektomize edilmiş köpeklere lizin verilmesi; üre sentezini bir ölçüde azaltmış ve köpeklerin yaşam süresini uzatmıştır (62).

Tavuk böbrek arginazıda lizin ve ornitin tarafından kompetitif olarak inhibe edilmektedir(63).

Gülen(15) ornitin ve lizinin koyun karaciğer arginazını kompetitif olarak inhibe ettiğini ortaya koymuştur.Bu bulgulara göre ornitinin enzim üzerindeki bağlandığı bölge,arginin bağlandığı bölgeden değişiktir.Ayrıca ornitinin enzime bağlanması sonucu enzimin üç boyutlu yapısında bir değişiklik meydana gelmekte ve Km büyümekte sonuçta enzimin arginine olan ilgisi azalmaktadır.Lizinde aynı türde bir engellemeye neden olduğundan ,ornitin hakkında öne sürülenler.Lizin için de geçerli olabilir .

Yukarıda izah edilen çalışmalar bizim yaptığımız çalışmayı desdeklemektedir.

M.benedeni ARGİNAZ AKTİVİTESİNİ İNHİBE EDEN KİMYASAL MADDELER.

E.D.T.A.'nın Etkisi:

Bizim yaptığımız çalışmada 0.5 mM'lık EDTA konsantrasyonunun , arginazı %33 dolaylarında inhibisyona uğrattığını ve inhibisyon tipinin ise non- kompetitif olduğu ortaya koyulmuştur(Şekil25,26,27).

EDTA'nın etkisi sıçan böbrek arginazı üzerinde incelenmiştir(64). 10 mM konsantrasyondaki EDTA sıçan böbrek arginazını 10 mM $MnCl_2$ 'ün varlığında ancak %2 inhibe edebilmiştir(64).

Arıtılmış kobay karaciğer arginazı ; 10 mM $MnCl_2$ 'ün bulunduğu ortamda,EDTA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe edilmektedir.EDTA konsantrasyonu 1 mM iken inhibisyon düzeyi %36 , 4 mM iken ise %69'dur (26).

Arıtılmış sıçan karaciğer arginazıda EDTA tarafından inhibe edilmektedir.3 mM EDTA ve 2 mM $MnCl_2$ 'ün varlığında enzimin inhibisyonu %90 oranında iken ,aynı molaritedeki EDTA'nın neden olduğu inhibisyon düzeyi %60'tır(65).

Muszynska ve Wojtczak(65) arıtılmış sıçan karaciğer arginazının EDTA ile inhibisyonunu; EDTA'nın enzimin tetramerik formunun oluşması için gerekli $MnCl_2$ 'ü tutsak etmesi ve bu nedenle enzim aktivasyonunun olmamasına bağlamaktadırlar.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar da bu görüşü desteklemektedir. EDTA'nın Mn^{++} katyonlarının enzime bağlanmasını önlemesi sonucu ,enzim büyük ölçüde inhibe edilmektedir.

Koyun karaciğer arginazı EDTA tarafından çok belirgin olarak inhibe

edilmektedir. 5 mM EDTA konsantrasyonunda enzimin aktivitesi %98 oranında inhibe edilmektedir(15).

p-CMBA Etkisi:

p-CMBA'nın M.benedeni arginazı üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmış ve 30 μ mol p-CMBA konsantrasyonunun enzim üzerinde %50 dolaylarında inhibisyona yol açtığı ve inhibisyon türünün non-kompetetif olduğu ortaya çıkarılmıştır(Şekil 28,29,30). p-CMBA inhibisyon etkisini, enzimin aktif merkezinde bulunan SH gruplarını bloke ederek göstermektedir(66). p-CMBA enzimin substratla birleşmesini önleyen spesifik bir inhibitördür.

N-Etil Malemit'in Etkisi:

N-Etil malemit'in M.benedeni arginaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi'de incelenip, 50 μ mol N-Etil malemit konsantrasyonunda enzimin %50 dolaylarında inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Inhibisyon tipinin ise non-kompetetif olduğu gözlenmiştir(Şekil 31,32,33).

Ber ve arkadaşları (66) tarafından yapılan bir çalışmada sıçan karaciğer arginaz enziminin p-CMBA ve NEM'in (N-ethylmaleimide) inhibisyon etkilerini araştırmışlardır.

Sıçan karaciğer arginazı üzerine 50 μ mol konsantrasyondaki p-CMBA %55 dolaylarında inhibisyona neden olmuştur.

Aynı şekilde 50 μ mol NEM'in sıçan karaciğer arginazını %65 inhibisyona uğrattığı ortaya çıkmıştır(66). NEM'in enzim üzerindeki inhibisyon etkisini, enzimin aktif merkezinde bulunan SH gruplarını bloke ederek göstermektedir(66).

Metilen Mavisinin ,Fotoinaktivasyonun ve $MnCl_2$ 'ün Etkisi:

M.benedeni arginazının fotoinaktivasyonuna metilen mavisi

derişimlerinin etkisi incelenmiştir .Değişik metilen mavisi konsantrasyonlarında ve 150 watt'lık projeksiyon ışığı altında M.benedeni arginazının fotoinaktivasyonu gözlenmiştir .0.3 mM'lık metilen mavisinin varlığında ve projeksiyon ışığı altında enzim aktivitesini %55.5 oranında kaybettiği saptanmıştır(Şekil 34).

0.3 mM'lık metilen mavisi ve 150 watt'lık projeksiyon ışığı altında değişik arginin konsantrasyonlarında M.benedeni arginazının aktivitesi saptanarak Michaelis-Menten grafiğine göre değerlendirilmiştir(Şekil 35). Arginazın fotoinaktivasyonu ve kontrol grubu Lineweaver-burk yöntemi ile değerlendirildiğinde inhibisyonun non-kompetetif olduğu saptanmıştır (şekil36). Enzim oda ışığı ve metilen mavisinin varlığında aktivitesini %22'sini kaybetmektedir(Tablo4).

Metilen mavisi varlığında ve karanlıkta arginazın aktivitesinin %26'sını kaybettiği,150 watt'lık projeksiyon ışığı ve metilen mavisinin varlığında ise %48'ni kaybettiği ortaya koyulmuştur(Tablo4)

Enzim'in $MnCl_2$ ile I. pre-inkübasyonu yapıp,II.Pre-inkübasyon aşamasında metilen mavisi ilave edilip 150 watt'lık oda ışığına maruz bırakıldığında enzim aktivitesinin yaklaşık olarak %70'ni kaybettiği ortaya koyulmuştur(Tablo5)

$MnCl_2$ ve metilen mavisi ile I.preinkübasyon yapıp II.preinkübasyonda ortama hiç bir şey ilave edilmediği zaman 150 Watt'lık projeksiyon ışığına maruz bırakılınca,enzim aktivitesinin yaklaşık %82'sini kayıp ettiği saptanmıştır(Tablo5).

Yine I.preinkübasyon aşamasında metilen mavisi II.preinkübasyon $MnCl_2$ ortama ilave edildiğinde aynı şekilde 150 watt'lık projeksiyon ışığına maruz bırakıldığı zaman enzimin yaklaşık %85 aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir(Tablo5).

M.benedeni arginazı artırılmış sıçan karaciğer arginazının bazı özelliklerini taşımaktadır.Burada enzim 150 watt'lık ışıık varlığında metilen mavisi ile çok belirgin olarak fotoinaktivasyona uğramakta ve inhibe edilmektedir .Bu özellikler daha önce artırılmış sıçan karaciğer arginazının özelliklerine çok benzemektedir(30,65).

Metilen mavisi ancak 150 watt'lık ışıık varlığında etkili olabilmektedir. Fotoinaktivasyon düzeyi enzime uygulanan pre-inkübasyon koşullarına bağlıdır.Preinkübasyon önce Mn^{++} katyonları ile yapılırsa fotoinaktivasyon etkisi daha az olmaktadır. Mn^{++} katyonlarının arginazı E- Mn_2 olarak adlandırılan dimer yapısından en yüksek aktiviteye sahip E- Mn_4 halindeki tetramerik(Oligometrik) yapıya döndüğü bilinmektedir(67).

Fotoinaktivasyonun, enzimdeki histidil'in(Histidyl residues) imidazol gruplarının parçalanması sonucu oluştuğu ve bu suretle enzime ligantın bağlanamadığı,neticede Mn^{++} katyonlarının etkili olmadığı daha önce öne sürülmüştür(30).

Yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçlarda bu görüşüdesteklemektedir.

Histidil artıklarının imidazol gruplarına Mn^{++} katyonları bağlanınca enzim tetramerik forma geçebilmektedir.Histidil'in imidazol grupları yıkıma uğrayınca, Mn^{++} katyonları tetramerik yapının oluşumunu sağlayamamakta yapının değişimini ancak belli miktarda etkilemektedir.

M.benedeni arginazı, önce Mn^{++} katyonları ile preinkübasyonuna sokulup daha sonra metilen mavisi ile ışıığa maruz bırakılmaları sonucunda inaktivasyon düzeyi düşmektedir.Enzimin oligometrik yapıya kavuştuktan sonra histidil artıklarının yıkımı ,oligometrik yapının değişimini ancak belli miktarda etkilemektedir.

M.benedeni Arginazının Farklı Ortamlarda Gösterdiği Değişiklikler:

M.benedeni pH:7,pH:9.5 gibi farklı fizyolojik ortamlarda tutulunca

çeşitli farklılıklar göstermiştir.Parazitin gerek pH:7 ve gerekse pH:9.5 da en fazla %20 NaCl 'de dışarıya üre attığı ortaya çıkarılmıştır(External Üre

Tablo 6 ve Tablo 7'de görüldüğü gibi ; pH:7 ve pH:9.5'luk distile su ortamında en yüksek amonyak miktarına raslanmıştır.Parazitin iç kısmında tutulan amonyak miktarının iki tabloda'da(Tablo 6,7) aynı olduğu gözlenmiştir.İçerde tutulan amonyak miktarı iki tablo da karşılaştırıldığında, en yüksek değer distile suda bulunmuştur.

Parazitin dışarıya attığı amonyak ile içerde tuttuğu amonyak en fazla distile suda saptanmıştır.

pH:7 ve pH:9.5'da parazitteki toplam üre üç ortamda karşılaştırıldığında; distile su ve %20 NaCl'deki toplam üre değerlerinin yaklaşık olarak aynı olduğu fakat %0.9 NaCl'de çok düşük olduğu bulunmuştur.

Parazitin distile su,%0.9 NaCl ve %20 NaCl'de attığı üre üç ortamda da yaklaşık olarak %70 civarında,içerde tuttuğu üre miktarının ise yaklaşık %30 olduğu saptanmıştır(Tablo 6,7).

Arginaz aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek enzim aktivitesi pH:9.5'da,çok az miktarda da pH:7'de alınmıştır.

Enzim pH:7'de aktivite göstermediği saptanmış pH:9.5'da ise en yüksek enzim aktivitesi distile su ortamında bulunmuştur.

Her üç tabloda'da (Tablo 6,7,8) protein değerlerinin aynı olduğu değişmediği saptanmıştır.

Tablo 8 'de görüldüğü gibi tüm bir M.benedeni alınıp baş ,orta ve kuyruk kısımlarında Tablo 6 ve 7'deki değerler saptanmış ve bu seksiyonlarda atılan üre miktarlarının aynı olduğu,atılan amonyak miktarlarının ise en yüksek distile suda olduğu gözlenmiştir.

Parazitin farklı seksiyonlarında tuttuğu üre miktarlarının aynı olduğu görülmüştür.

Yukarıda yaptığımız açıklamada pH:7 ve PH:9.5 şartlarında tutulan ürelerin yaklaşık olarak aynı olduğu ortaya çıkmıştır. Parazitin içeride

tuttuğu amonyak miktarında en yüksek baş kısmında bulunmuştur.Total üre miktarlarının baş, orta ve kuyruk kısımlarında yaklaşık aynı olduğu görülmüştür.

Tablo 8'de yine parazitin baş orta ve kuyruk kısımlarında dışarıya attığı üre miktarlarının diğer iki tabloda(Tablo 6,7) olduğu gibi %70 civarındadır.

Aynı seksiyonlarda içeride tutulan üre miktarının baş ,orta ve kuyruk kısımlarında yaklaşık %30 olduğu saptanmıştır.

Dolayısıyla arginaz aktivitelerinin parazitin baş ,orta ve kuyruk kısmında aynı aktivite gösterdiği ve protein değerlerinin de aynı olduğu görülmüştür. Kanımızca burada arginaz aktivitesinin azalması çoğalması sorun olmayıp,üreyle hiç bir ilgisinin olmadığı fikrinin ortaya çıkmasıdır.

Bu konuda yapılan taramalar sonucu hiç bir çalışmaya raslayamadığımız için konu spekülasyona açıktır.

ÖZET

Moniezia benedeni sığırların ince bağırsaklarında yaşayan kaşeksiye ve ekonomik kayıplara sebep olan bir parazittir.

Bu çalışma ile **Moniezia benedeni** arginazının laboratuvarımızda biyokimyasal tüm özellikleri optimize edilmiştir.

M.benedeni arginazının aktivasyonu için preinkübasyon ve $MnCl_2$ gereklidir.

L-amino asitlerden Ornitin ve Lizin, enzim aktivitesini inhibe etmektedir.

L-Lizin ve L-Ornitin'nin neden oldukları inhibisyon kompetitif tiptedir.

EDTA,p-CMBA,NEM,Metilen mavisi'nin varlığında **Moniezia benedeni**'nin arginaz aktivitesinin önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir.

Argininin yıkımından sorumlu olan arginaz hücre çekirdeğine bağlı olup en yüksek aktiviteyi pH 9.5'da göstermektedir.

Değişik ışık koşullarında metilen mavisinin arginaz aktivitesi üzerine olan etkileri ortaya koyulmuştur.Yine $MnCl_2$,metilen mavisi ve ışığın **Moniezia benedeni** arginazının fotoinaktivasyonuna olan etkileri saptanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca **Moniezia benedeni** arginazının distile Su,% 0.9 NaCl ve %20 NaCl gibi farklı fizyolojik koşullarda parazit'de atılan üre,tutulan üre ,toplam üre ,atılan amonyak,tutulan amonyak arginaz ve protein değerleri saptanmıştır.

M.benedeni arginazının L-Arginine karşı olan K_m 'i 12.5 mM'dır.Buda parazitin üreotelik tipte düşük K_m 'li bir arginaza sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız **M.benedeni** arginazının biyokimyasal özelliklerini göstermektir.

SUMMARY

M.benedeni is a parasite living in intestines of beefs which causes weight loss in beefs.

Biochemical properties of arginase of M.benedeni were optimized in the laboratory and it was found that pre-incubation and $MnCl_2$ were essential for its activation. L-amino acids such as L- ornitin and L-Lizin were determined to inhibit enzyme activity. Inhibition caused by L-Lizin and L-Ornitin was competitive type.

Arginase activity of M.benedeni was observed to be reduced in the presence of methylene blue, NEM, p-CMBA and EDTA.

Arginase which is responsible for the breakdown of arginine are attached to cell nucleus and is most active at pH 9.5 .

This study yielded the effects of methylene blue under various light intensities. In addition, effects of $MnCl_2$, methylene blue and light intensity on photoinactivation of M.benedeni arginase were also determined .

In this study external, internal and total urea as well as external ammonia, internal ammonia, arginase and protein values for the parasite determined in % 0.9 and %20 NaCl and distilled water.

Km of M.benedeni arginase against L-Arginine was only 12.5 mM since the parasite possess an arginase of ureolytic type with low Km.

The purpose of this research was to show biochemical properties of arginase of M.benedeni.

V.BÖLÜM
KAYNAKLAR

- 1-Krebs,H.A.,Hems,R.,Lund,P.Halliday,D.,Reed,W.W.C.Sources of ammonia for mammalian urea synthesis.Biochem.J.,176,733-737,1978.
- 2-Powers,S.G. , Meister, A.,Urea synthesis and ammonia metabolism.P.251-252.The Liver Biology and Pathobiology, edited by I.Arias,H.,Popper, D. Schachter,D.A.Shafritz.Raven press.New York.,1982.
- 3-Baldwin,E.Excretory metabolism of proteins and aminoacids.p.263-269 Dynamic Aspects of Biochemistry,5th Edition.Cambridge of the University Press, London.1967
- 4-Ratner,S.,Formation and cleavage of C-N bonds in arginine and urea biosynthesis,p.227-233,Horecker B.L.,Cornudella,Reflections on Biochemistry, Permagon Press,New York.1976
- 5-Meljer,A.j., Hansgens,H.E.S.J.,Ureogenesis.p.263-269.Metabolic Compartmentation,edited by.H.Sies.Academik Press.1986.
- 6-Brosnan,M.E.,Colbourne,S.A.,Brosnan,J.T., Regulation of urea synthesis in vivo :facts and speculations .p.313-320.short-term regulation of liver metabolism.Edited by Hue, L.V.Gerald.Elsevier,North.Holland Biomedical Press. Amsterdam,New York.,1981
- 7-Edwards E.M,Rattenbury J.M,Varnam G.C.E,Dhand U.K,Jeacock M.K and Shepherd D.A.L.,Enzyme activities in the sheep placenta during the last three months of pregnancy.Biochem.Biophys.Acta.497,133-140,1977.
- 8- Myjak B.L, Lisowska, B.,Tomaszewski, L., Hryckiewicz ,L.,Intestinal arginase in vertebrates and invertebrates.Comp.Biochem.Physiol 61,545-551,1978.
- 9- Owczarczyk ,B., Barej ,W., The different activities of arginase,arginine synthetase,ornithine transcarbamoylase and ornithine transaminase in

the liver and blood cells of some form animals. *Comp.Biochem.Physiol.* 50,555-603,1975.

10- Cederbaum ,S.D.,Shaw ,K.N.F.,Spector, E.B., Veity M.A.,Snodgrass P.j.,Sugarman ,G.I:Hperargininemia with arginase deficiency. *Pediat.Res.* 13,827-833,1979.

11- Spector, E.B.,Kiernan, M.,Bernard,B., Cederbaum S.D:Properties of fetal and adult red blood cell arginase:a possible prenatal diagnostic test for arginase deficiency.*Am.J.Hum.Genet* 32:79-87,1980

12-Ozan,S.,Gürsu,F.,Bayraktutan,U.,Gülen,Ş.,Farklı türlerin eritrositlerindeki arginaz aktivitesi ile üre düzeyleri arasındaki ilişki,Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, s.44-45 I.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi,Sivas ,1990.

13-Michels,V.U., Beaudet,N.,Arginase deficiency in multiple tissues and in arginemia.*Clin.Genet.*13,61-67,1978.

14- Gülen,Ş., Özgen,H.,Koyunlarda gebelik öncesi ,gebelik ve laktasyon dönemlerinde idrar,kan ve sütte,orotik asit ,üre ve amonyak miktarlarının belirlenmesi üzerinde araştırma .A.Ü.Vet.Fak.Der.XXV,62-841978

15- Gülen,Ş.,Koyun karaciğeri arginazının artırılması ve enzimin özellikleri O.D.T.Ü.Biyolojik bilimler bölümü.Doçentlik Tezi .Ankara.1981

16-Campbell, J.W.,Arginine and urea biosynthesis in the land planarian:Its significance in biochemical evolution.*Nature*,208,1299-1301.1965

17-Pegg,A.E.,McCann,P.,Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans.*Isı Atlas of Science Biochemistry,Pennsylvania.p* 11-18,1988.

18-Pegg,A.E.,McCann,P.,Polyamine metabolism and function.*Am.J.physiol.* 243 (cell physiol.12):p.212-221.,American Physiological Society,19

19-Tamir H.,Ratner S.Enzymes of arginin metabolism in chick.*Arch.Biochem .Biophys.*102,249-257,1963

- 20-Tamir,H.,Ratner S.A ,Study of ornithine, citrulline and arginine synthesis in growing chick.Arch.Biochem.102,259-269.1963.
- 21-Ratner ,S., Reflections on biochemistry. Editors:A.Kornberg and Horecker page:227-230.Pergamon press,New York.1976
- 22-Yip M.C. , Knox W.E.,Function of arginase in lactating mammary gland. Biochem .J.127,893-902,1972.
- 23-Ozan,S.,Gülen,Ş.,Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması . DOĞA TÜ. Vet.ve Hay.D.13,154-163,1989.
- 24-Schimke, R.T.,Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J.Biol.Chem.237,459-468,1962.
- 25-Hirsch-Kolp.H., Greenberg D.M., Molecular characteristics of rat liver arginase J.Biol.Chem.243,6123-6129,1968
- 26-Farooqui ,J.Z.,Saxena K.C. ,Sharma R.N.,Molecular forms of rat liver arginase.Ind.J.Biochem.Biophys.15,200-212,1978
- 27-Greenberg, D.M.,Bagot A.E. , Roholt D.A.,Liver Arginase III.Properties of highly purified arginase.Arch.Biochem.Biophys.62,446-455,1956.
- 28-Mora,J.,Tarrab R.,Martuscelli J., Soberon G.,Characteristics of arginases from ureotelic and non ureotelic arginase Biochem.J.96,588-596 1965.
- 29-Ber, E.,Muszynska G., Cechova D., Circular dichroic properties of rat liver arginase ,Bull.de L' A cod.pol.des Sci.26,665-674,1978.
- 30-Ber,E.,Muszynska, G.,Chemical modification of rat liver arginase Acta Biochemica polonica 26,103-114,1979.
- 31-Ozan,S.,Gürsu,F.,Gülen,Ş.,Photoinactivation of human salivary arginase, Marmara Medical Journal vol.1.No:3, S.13,1988.
- 32-Barrett,J.,Biochemistry of parasitic,helminths.The scientific and medical division,p.141-143,222-225 Macmillan publishers ltd.London.1981

- 33- Kurelec,B.,Molecular biology of helmint parasites.The International Journal of Biochemistry.6,375-381,1975.
- 34-Jassens,A.P., Brant,C.The ornithine,urea cycle in some parasitic helminths.Comp.Biochem.physiol.,30,261-272.1968
- 35-Tao,I.,Huang, T.V.,Studies on arginase of *Schistosoma japonicum* Scientia Sin.14,417-423,1965.
- 36-Kurelec,B.,Urea synthesis in the liver fluke(*F.hepatica* L.) I.Krebs-Henseleit cycle enzymes. Veterinarski Archiv.I,193-201.1964
- 37 -Gülen,Ş.,The properties and the regulation of arginase in *Fasciola hepatica*.FEBS special meeting on enzymes.Dubrownik,Cavtat. Yugoslavia.S-4,23.1979
- 38- Gülen,Ş.,*Faciola hepatica*'da üre sentezi ve kaynağı.Fırat Üniversitesi Dergisi (Sağlık Bilimleri) 1(1-A)81-94.1987
- 39-Paltridge,R.W. , Janssens, P.A.,A reinvestigation of the status of the ornithine -urea cycle in the adult *Ascaris lumbricoides* .Comp.Biochem. Physiol.40,503-514,1971.
- 40- Soulsby,E.J.L;Helminths,Arthropods and protozoa of domesticated animals.7th.ed,Beilliere Tindall.London Philadelphia Toronto,Mexicocity Rio De Janeriro.Sydney Tokyo.,Hong Kong.,pp.93-99.,1986.
- 41-Güralp,N.,Helmintoloji.Ankara Üniversitesi,Veteriner Fakültesi Yayınları 307, s.159-174,1974.
- 42-Dunn,A.M.,Veterinary helminthology William Heinemann Medical Books Ltd.London p.p 305-328.1965
- 43-Oytun,H.Ş..Genel parazitoloji ve helmintoloji,Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları,55,s.236-240.Ankara,195
- 44-J.W.Geyer;D.Dabich;Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates.Analytical Biochemistry.39,412-417,1971
- 45-Gornall,A.G.,Bardawill,C.J.,David,M.M.,Determination of serum proteins

by means of biuret reagent.J.Biol.Chem.177,751-758,1949

46-Bauer,J.D.;M.D;Clinical laboratory methods.9th.ed St.Louis.Toronto. Princeton pp.491-492,1982

47-Moss,S.,Sodium nucleate inhibition of arginase activity:Interreaction of arginase with nucleic acids.Science 69,115-117,1952.

48-Boyer, P.D.The Enzymes .3rd Edition vol:11,p.485-488.Academic Press. Newyork .1970

49-Mohamed, S.M. , Greenberg D.M. Liver arginase I.preparation of extracts of high potency,chemical properties, activation, inhibition and pH activity .Arch.Biochem.Biophys.8,349-357,1945.

50- Campbell, J.W. Urea formation and urea cycle enzymes in the cestode; Hymenolepsis diminuta.Comp.Biochem .Physiol.8,13-20,1963.

51-Gülen,Ş.Faciola hepatica'da arginaz enzimi ve özellikleri,Fırat Üniversitesi Dergisi (Sağlık Bilimleri)1(1-A),95-112,Elazığ,1987

52-Ratner S.,Enzymatic synthesis of arginine(condensing and splitting enzymes).In Methods in Enzymology, Academic Press,Inc.,Vol 2,p.359-364,1955.

53- Kurelec,B.,Loack of carbamyl phosphate synthesis in some parasitic Platyhelminths.Comp.Biochem.Physiol. 43 B,769-780.1974

54- Bürgi W.,Richterich R. ,Colombo J.P.L-Lysine dehydrogenase deficiency in a patient with congenital Lysine intolerance .Nature 211,845-850,1960

55-Çelik,C.,Echinococcus granulosus Hidatik kistlerinde üre ve primidin biyosentezi üzerinde araştırmalar.Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı Doktora Tezi.Elazığ.1985

56- Capbell,J.W.Urea Formation and urea cycle enzymes in the cestode, Hymenolepsis diminuta.Comp.Biochem.Physiol.8,13-21,1963.

57- Mora J.,Tarrab R., Martuscell,J., Soberon G.,Characteristics of arginases from ureotelic and nonureotelic animals. Biochem.J. 96, 588-

594,1965.

58-Colombo, J.P., Richterich R., Donath A., Rossi E., Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication. *Lancet* 1, 1014-1023, 1964

59-Colombo J.P., Bürgi W., Richterich R., Rossi E., Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication: A defect in L-lysine dehydrogenase. *Metabolism*. 16, 910-918, 1967.

60- Oyanagi, K., Sogawa, H., Sato, S., Orii, T., Nakao, T., Fujika, S. Clinical and biochemical studies on periodic Hyperammonia with Hyperlgysinemia and Homocitrullinuria. *Tohoku J. Exp. Med.* 120, 105-112. 1976.

61- Michelis, V.U., Beaudet A.Z. Arginase deficiency in multiple tissues and in argininemia *Clin. Gen.* 13, 61-69, 1976.

62-Wilson, L., Klystra, J.A., Effect of L-lysine monohydrochloride upon urea formation in two patients with chronic renal failure. *Med. J. Austr.* 51, 232-240, 1963.

63- Kardowaki, H., Nesheim M.C., Molecular properties and metabolic control of the "ureotelic" arginase from chicken kidney. *Int. J. B. Int. J. Biochem.* 10, 303-311, 1979.

64-Kaysen, G.A., Strecker, H.J., Chemical properties of mouse kidney arginase *Biochem. J.* 133, 779-785, 1973.

65- Muszynska, G., Wojtczk, M., Influence of immobilization on conformation of rat liver arginase *Int. J. Biochem.* 10, 665-668, 1979

66-Ber, E., Muszynska, G., Cechova, D., The lack of free SH groups in rat liver arginase. *Bulletin de L'academie polonaise des Sciences, Serie des Sciences biologiques Cl. II. Vol. XXVI, No. 10*, 568-573, 1978.

67-Muszynska, G., Immobilization of Rat Liver Arginase. *C.I. Biospecific Chromatography, Protides of the Biological Fluids 23rd Colloquium* Edited by H. Peteers, Pergamon Press - Oxford and New York, 633-637, 1976

TEŞEKKÜR

Tezimin her safhasında yakın ilgi alakalarını esirgemeyen, bilimsel yardımları ile sürekli beni destekleyen değerli hocam tez danışmanım Doç.Dr.Sema OZAN'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bizlere her zaman her konuda yardımcı olan sayın hocamız Prof.Dr.Şendoğan GÜLEN'e de teşekkürü bir borç bilirim.

Biyokimya Anabilim dalı öğretim elemanlarından Uzman Ferit GÜRSU'ya,Araş.Gör.Ulvi BAYRAKTUTAN'a,Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreterlerinden Ayşen ÖNLER ve Mehtap YAZ'a,Elazığ E.B.K.Veteriner Hekimleri ile kesimevi Personeline,bu çalışmada emeği geçen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Elazığ 1962 doğumluyum.İlk,orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım.1981 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim. 1986 yılında mezun oldum.1986 Temmuz ayında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinin açmış olduğu Araştırma Görevlisi Sınavını kazandım.Aralık 1986'da Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında göreve başladım.Halen bu anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.Evliyim ve bir çocuğum var.