

SIĞIR VE KOYUN HİDATİK KİST TABAKALARINDA (stratum germinativum, stratum cuticularis) ARGİNAZ ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Cemil Çelil*

The Investigation of Kinetic Characteristics of Arginase Activity in the Hydatid Cyst Layers (Stratum germinativum, Stratum Cuticularis) of Cattle and Sheep

Summary: *In this study the activity of arginase was examined in the layers of liver and lung cyst hydatics of cattle and sheep. The enzyme activity was observed only in the yellowish layers of some old cattle liver and lung cyst hydatics. The kinetic properties of the arginase in the yellowish layers of the old cattle liver and lung cyst hydatics can be summarized as follows.*

- 1- *The K_m of the enzyme for arginine is around 1-2 mM.*
- 2- *Mn^{+2} ions and pre-incubation are absolutely necessary for the enzyme activation.*
- 3- *Optimal pH is around 9.5*
- 4- *Ornithine and lysine significantly inhibit the arginase activity (competitive inhibition).*

The other layers of cattle and sheep liver and lung cyst hydatics have not showed arginase activity.

Özet: *Bu araştırma ile siğir ve koyun akciğer ve karaciğer hidatik kist tabakalarında arginaz aktivitesine bakılmıştır. Enzim aktivitesine sadece yaşlı siğirlerin akciğer ve karaciğer hidatik kistlerinde sarımtırak renkli tabakalarda rastlanmıştır. Yaşlı siğirlerin sarımtırak renkli olan hidatik kist tabakalarında varlığı kanıtlanan arginaz enziminin kinetik özellikleri şöyle bulunmuştur.*

- 1- *Enzimin arginine karşı olan K_m 'i, 1-2 mM civarındadır.*
- 2- *Enzim, aktivasyonu için Mn^{+2} iyonlarına ve Pre-inkübasyona mutlaka ihtiyaç duymaktadır.*

* Yrd. Doç. Dr., Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

3- Enzim için optimal pH 9.5 civarındadır.

4- Ornitin ve lizin çok belirgin olarak enzim aktivitesini inhibe etmekte ve inhibisyonun kompetitif tipte olduğu görülmektedir.

Diğer sığır ve koyun karaciğer ve akciğer hidatik kist tabakalarında ise arginaz aktivitesine rastlanılmamıştır.

Giriş

Arginaz (L-arginine amidinohydrolase EC 3.5.3.1) Krebs-Henseleit üre siklusunun en son üyesidir. (8,13) Arginin'i hidrolize ederek üre ve ornitin'e ayırır. Ancak, üre döngüsüne sahip olmayan birçok canlıda ve dokuda da arginaz enziminin varlığı kanıtlanmış olmakla birlikte, henüz biyokimyasal önemi aydınlığa kavuşturulmamıştır (1,4,5).

Arginaz enzimi bulunduğu canlılara ve dokulara göre üreotelik ve ürikotelik olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Her iki sınıf arginaz'ın kinetik özellikleri, molekül büyüklükleri, dialize olup olmadıkları, inhibisyon yönleri bazı canlılarda araştırılmıştır (6).

İnsan, sığır ve koyun eritrositlerinde (5,6,11), koyun plasentasında (3), kanatlı karaciğer ve böbreğinde (6), sıçan meme dokusunda (16) ve daha birçok organ ve dokuda (4,6) arginaz enziminin varlığı gösterilmiştir.

Parazitler'den *M. expansa*, *E. granulosus*, *D. caninum*, *pisiformis*, *F. hepatica*, *T. canis*'de (7) arginaz'ın bulunduğu, ancak üre döngüsünün diğer enzimlerinin tamamına rastlanılmadığı belirtilmiştir. Paraziter helmintlerden *Hymenolepis diminuta*'da varlığı bildirilen arginaz'ın bazı kinetik özellikleri ilk olarak araştırılmıştır (2). *Schistosoma japonicum* (15) ve *Ascaris lumbricoides*'de (12) arginaz enziminin varlığı kanıtlanmış bulunmaktadır.

F. hepatica'da arginazın varlığı ve biyokimyasal işlevini Kurelec (10) prolin sentezine bağlayarak izaha çalışmaktadır. Aynı şekilde *N. crassa*'da (6) bulunan arginaz'ında aynı amaçla kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu görüşlere göre prolin sentezi için önerilen alternatif bir yolda arginin ara metabolit olarak kullanılabilmekte ve arginaz ise burada argininin katabolizmasında rol oynamaktadır.

Bu çalışmada ilk kez sığır ve koyun hidatik kist tabakalarında üre metabolizmasını araştırmak amacı ile arginaz enzim aktivitesine bakılmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan siğir ve koyun hidatik kistleri Elazığ Et ve Balık Kurumundan temin edilmiştir. Deneylerde yaklaşık olarak 100 siğir karaciğer ve akciğer hidatik kisti ve 50 koyun karaciğer ve akciğer hidatik kisti kullanılmıştır. İki saat içerisinde laboratuvara getirilen deney materyali küvetlere alınıp bir makas yardımı ile kist duvarları açılmıştır. Parazite ait olan kist tabakaları (stratum germinativum, stratum kütikulum) bir pens yardımı ile petri kutularına konulmuştur. Özellikle arginaz aktivitesine rastlanılan yaşlı siğirlerin sarımtırak renkli kist tabakaları ise kist duvarları bir makasla açıldıktan sonra, Kilejian ve ark. nın (9) yaptıkları gibi keskin olmayan bir bıçakla kazınarak petri kutularına alınmıştır. Bu tabakalar üç kez serum fizyolojiktan geçirildikten sonra hemen enzim çalışmalarında kullanılmış veya kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

Araştırmada kullanılan L-arginin, L-glisin, L-ornitin, L-lizin, üre, α -izonitrozopropiofenon (1-2 butanedione monoxime), Sigma firmasından (ABD) temin olunmuştur. Tris (hidroksi metil-amino-metan) Merck (Batı Almanya) firmasından alınmıştır. Yararlanılan diğer kimyasal maddeler analitik safliktadır.

Arginaz aktivitesinin tayini, enzimin arginin'i hidrolize etmesi sonucu meydana gelen ürenin α -izonitrozopiofenon ile asitik ortamda meydana getirdiği rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına göre yapıldı (14).

Enzimin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde aşağıdaki deney sırası takip edilmiştir.

İnkübasyon süresinin tesbiti: Enzim için en uygun inkübasyon süresinin tesbiti için enzim değişik zaman sürelerinde inkübasyona alındı. Arginin hidrolizi izlendi. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürenin zamana bağlı olarak miktarı ölçüldü.

Pre-inkübasyonun enzim aktivitesine etkisi: Enzim aktivitesi üzerine olan pre-inkübasyonun etkisi araştırıldı. Enzim glisin-KOH tamponu (pH:9.5) ve $MnCl_2$ 'ün varlığında + 4 °C ile + 70 °C arasındaki sıcaklıklarda ön inkübasyona tabi tutuldu.

pH'nin enzim aktivitesine etkisi: Enzimin optimal pH'sının tesbiti için pH 7 den 10.5'a kadar olan sınırlar içerisinde enzim için en yüksek aktivasyonun görüldüğü pH ortamı saptandı.

Metal katyonların enzim aktivitesine olan etkileri: Ba⁺⁺, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺ ve Mn⁺⁺ in varlığında enzim aktivitesine bakıldı. Enzimin pre-inkübasyonu belirtilen katyonların inkübasyon ortamına 1mM konsantrasyonlarda ilavesi ile yapıldı.

Arginazın arginin'e karşı olan K_m'inin tesbiti: Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten (8) kinetiğine göre incelendi. Ayrıca enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee (8) yöntemlerine göre de değerlendirildi. Her üç yöntemle enzimin arginin'e karşı olan K_m'i tesbite çalışıldı.

Arginaz'ın denetimi: L-ornitin ve L-lizin'in arginaz aktivitesine olan etkileri değişik konsantrasyonlarda inkübasyon ortamına ilave olunarak denendi.

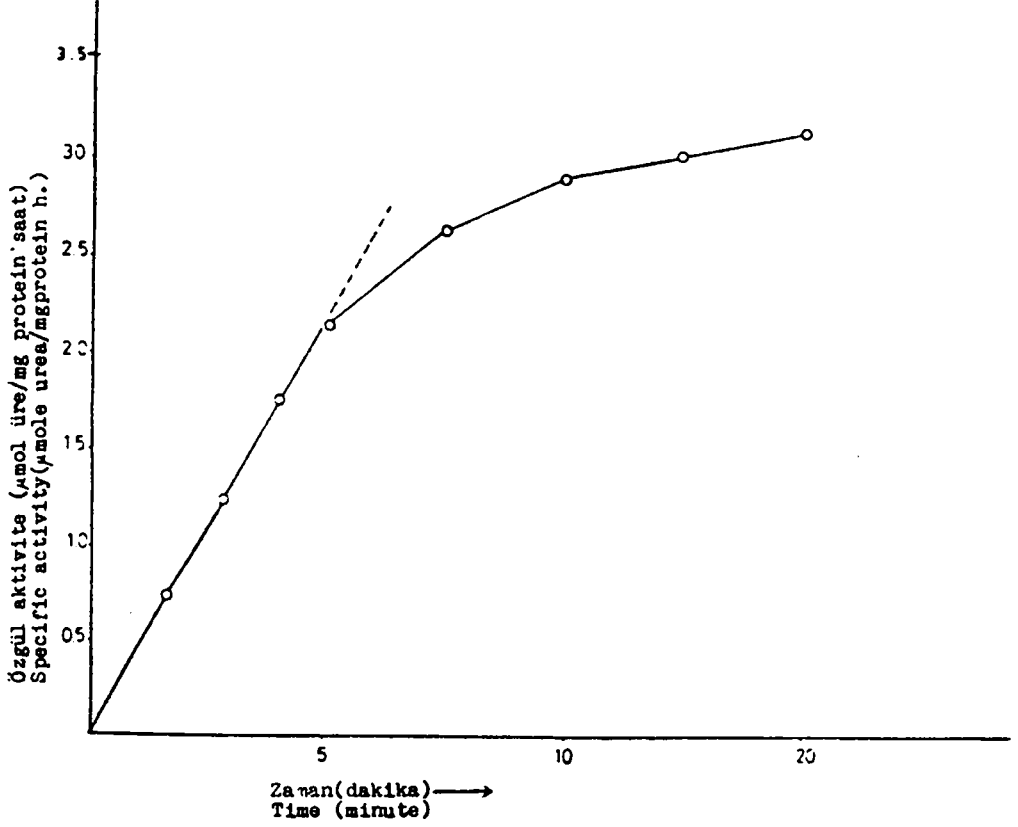
Bulgular

Echinococcus granulosus ile enfekte koyun ve sığır hidatik kist tabakalarında arginaz enzim aktivitelerine bakılmış olup, sadece yaşlı sığırlarda rastlanılan sarımtırak renkli karaciğer ve akciğer hidatik kist tabakalarında arginaz aktivitesi bulundu. Bulunan arginazın kinetik özellikleri şöyle belirlendi.

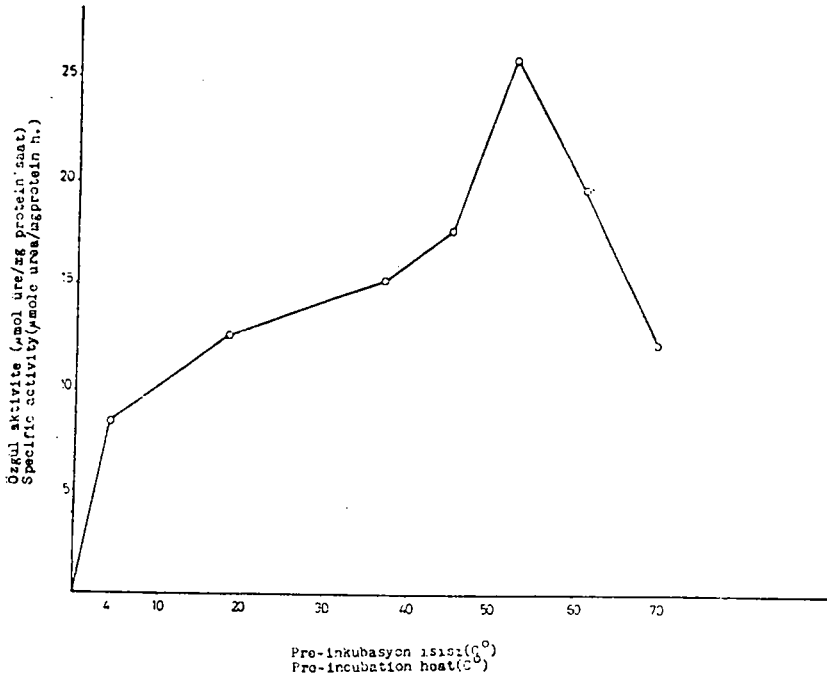
Inkübasyon süresinin tesbiti: Belirtilen kist tabakalarında bulunan arginazın en uygun inkübasyon süresinin tesbiti için enzim değişik zaman sürelerinde inkübasyona alındı. Argininin hidrolizi izlendi. Reaksiyon sonunda meydana gelen ürünün zaman faktörüne bağlı olarak miktarları belirlendi. Şekil 1'de görüldüğü gibi üre sentezindeki artış, zamana bağlı olarak 5 dakikaya kadar doğrusallığını korudu. Bu sürenin sonunda doğrusallık yerini hiperbolik bir görünüme bıraktı. Enzim için inkübasyon süresi bundan dolayı 5 dakika olarak belirlendi.

Pre-inkübasyonun etkisi: Arginaz enzimi üzerinde pre-inkübasyonun etkisi araştırıldı. Enzim Glisin-KOH tamponu (pH: 9.5) ve MnCl₂ ün varlığında + 4 °C ile + 70 °C arasındaki ısılarda ön inkübasyona tabi tutuldu. Pre-inkübasyonun en yüksek aktivasyona (+ 51 °C de 10 dakika) neden olduğu görüldü (Şekil 2).

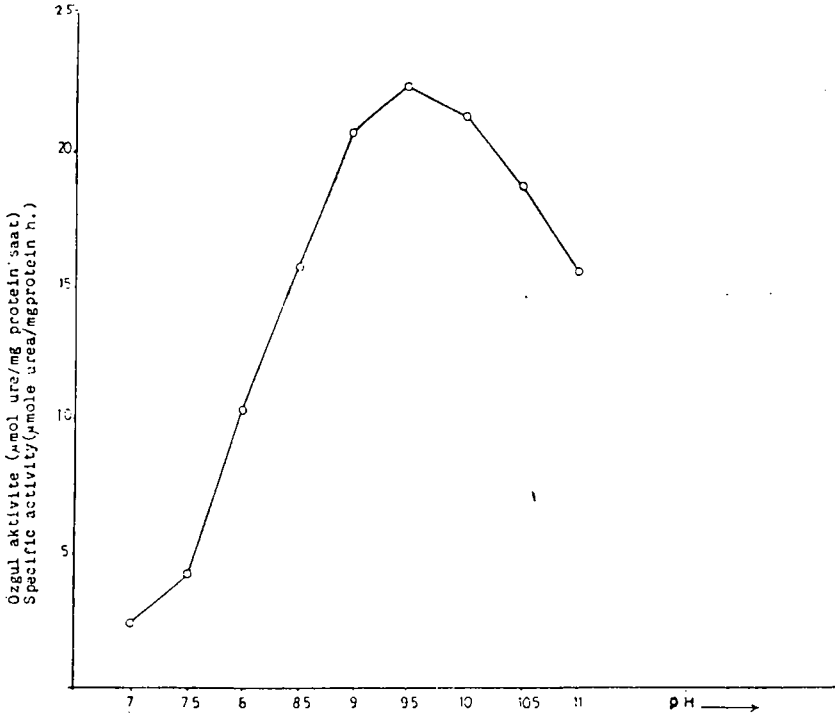
pH nin enzim aktivitesine etkisi: Enzimin optimal pH sınırın tesbiti için pH 7 den 10.5'a kadar olan sınırlar içerisinde en yüksek aktivasyonun saptandığı pH ortamı tesbiti çalışıldı. Şekil 3'de görüldüğü gibi



Şekil - 1 Arginaz aktivitesinin inkübasyon sürecine bağlı olarak değişimi
Figure - 1 The variation of arginase activity depending on the incubation time



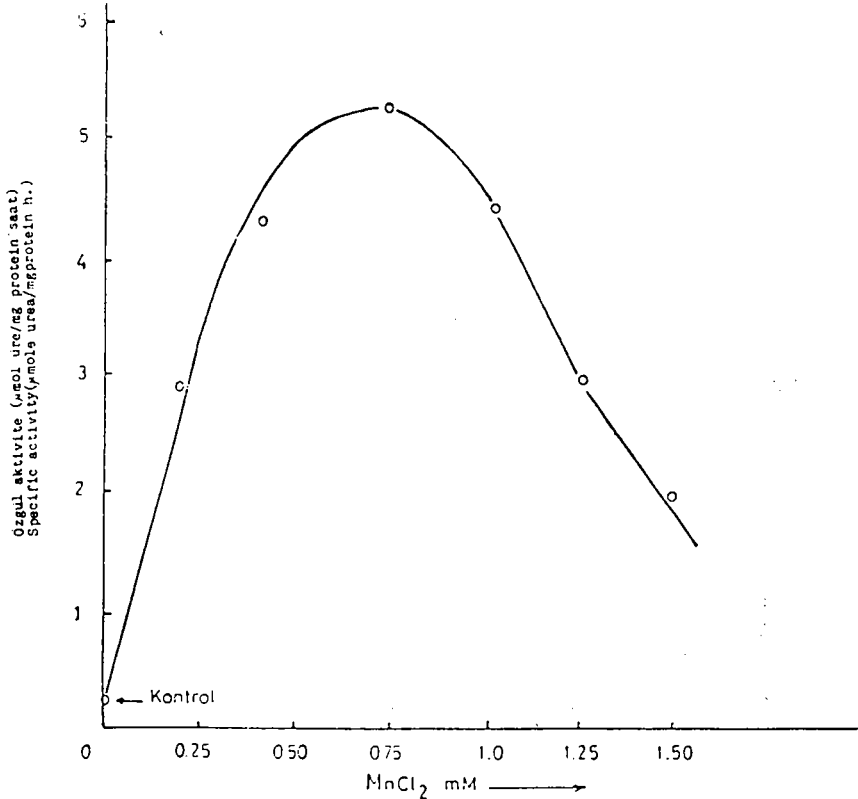
Şekil - 2 Arginaz'ın pre-inkübasyon ile aktivasyonu
Figure - 2 The activation of arginase with the pre-incubation



Şekil - 3 Arginaz aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi
Figure - 3 The variation of arginase activity depending on the pH

pH profili tipik bir çan şeklindedir. Enzim en yüksek aktiviteyi pH: 9.5'ta verdiğinden bu pH ortamı optimal olarak kabul edildi.

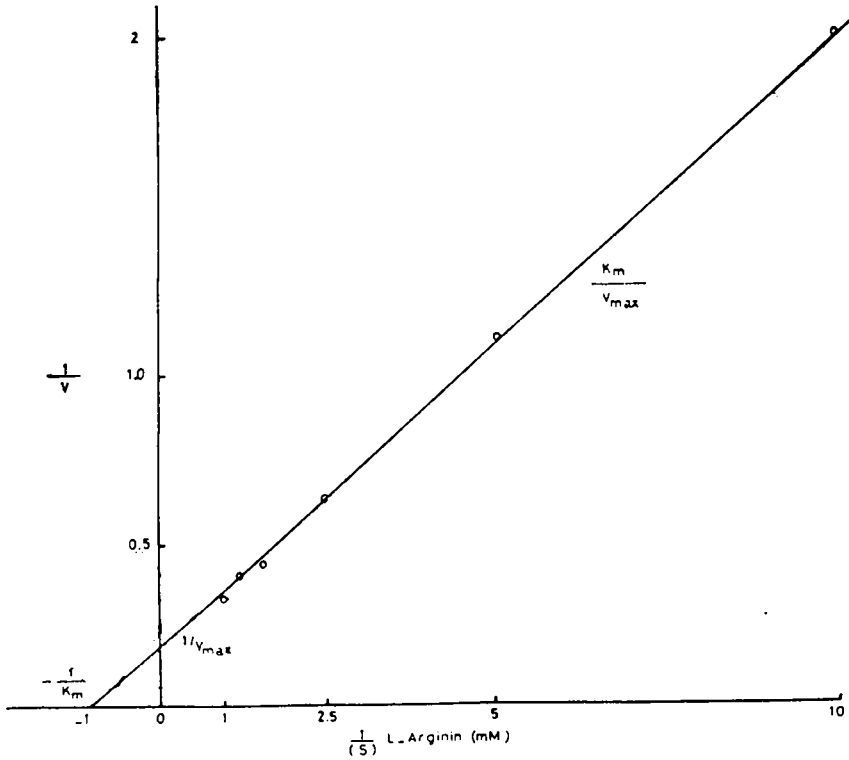
Metal katyonların arginaz aktivitesine olan etkileri: Belirtilen tabakalarda varlığı tesbit olunan arginazın çeşitli metal katyonlarına karşı duyarlılığını tesbit etmek için Ba^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} ve Mn^{++} 'in varlığında enzim aktivitesine bakıldı. Enzimin pre-inkübasyonu, adı geçen katyonların 1 mM konsantrasyonlarında inkübasyon ortamına ilâvesi ile yapıldı. Sadece Mn^{++} 'in varlığında enzim belirgin katalik aktivite gösterdi. Diğerlerinin varlığında ise enzim belirgin bir aktivite göstermedi. Mn iyonlarının arginaz için gerekli olduğunun anlaşılmasından sonra değişik konsantrasyonlarda Mn iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri incelendi. Mn iyonlarının enzim aktivitesine olan etkisi 0.25 mM düzeyinden başladı ve en yüksek aktivasyonu 0.75 mM da verdi. Mn iyonlarının konsantrasyonu 1 mM in üzerine çıktığında ise enzimin aktivasyon hızında belirgin bir düşme gözlemlendi (Şekil 4).



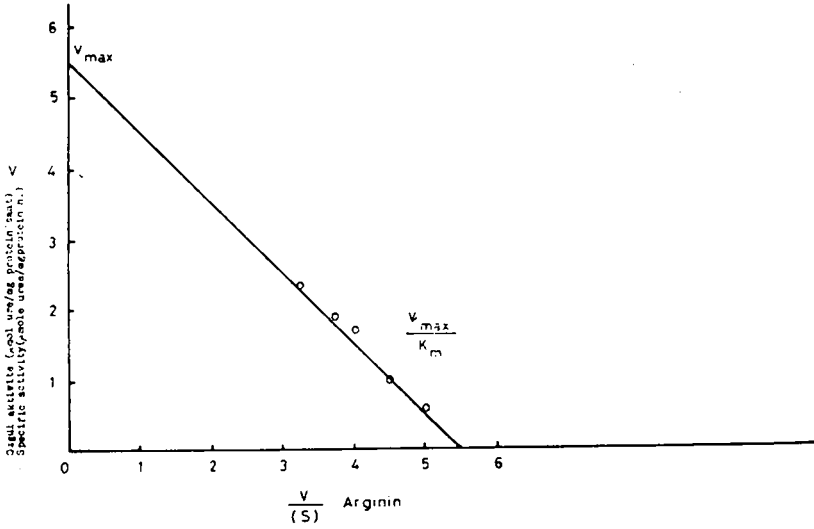
Şekil - 4 Arginaz aktivitesinin $MnCl_2$ miktarına bağlı olarak değişimi
Figure - 4 The variation of the arginase activity depending on the $MnCl_2$ concentration

Arginaz'ın arginin'e karşı olan K_m i : Optimal koşulların belirtilmesinden sonra enzimin spesifik substratı olan L-arginine karşı olan K_m 'i tesbite çalışıldı. Enzimin aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten (8) kinetiğine uyarak gelişti ve tipik substrat doygunluğu profilini verdi. Enzim aktivitesinin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Lineweaver-Burk ve Eadie-Hofstee (8) yöntemine göre değerlendirildi (Şekil 5,6). Enzimin L-arginine karşı K_m 'i bu sonuçlara göre 1-2 mM sınırları içerisinde belirlendi.

Arginaz'ın denetimi : Enzim 5 dakikadan sonra doğrusallıktan saptığı için bir ürün inhibisyonunun bulunup bulunmadığının anlaşılması için L-ornitin'in enzim aktivitesi üzerine olan etkisi araştırıldı. Deği-



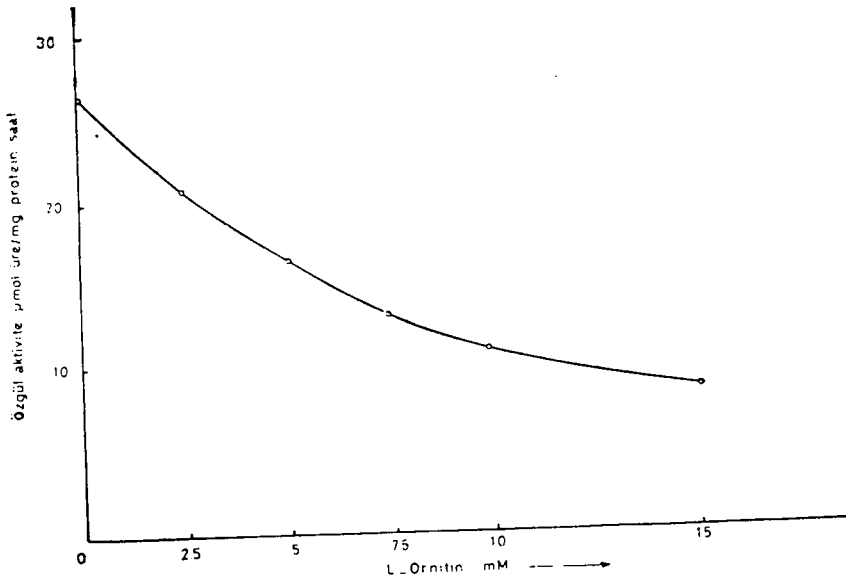
Şekil - 5 Arginazın L-arginine karşı olan K_m 'inin Lineweaver-Burk yöntemi ile saptanması
Figure - 5 The determination K_m of arginase by the Lineweaver-Burk method



Şekil - 6 Arginazın L-arginine karşı olan Km'inin Eadie-Hofstec yöntemi ile değerlendirilmesi

Figure - 6 The determination Km of arginase by the Eadie-Hofstec method versus the the L-arginine

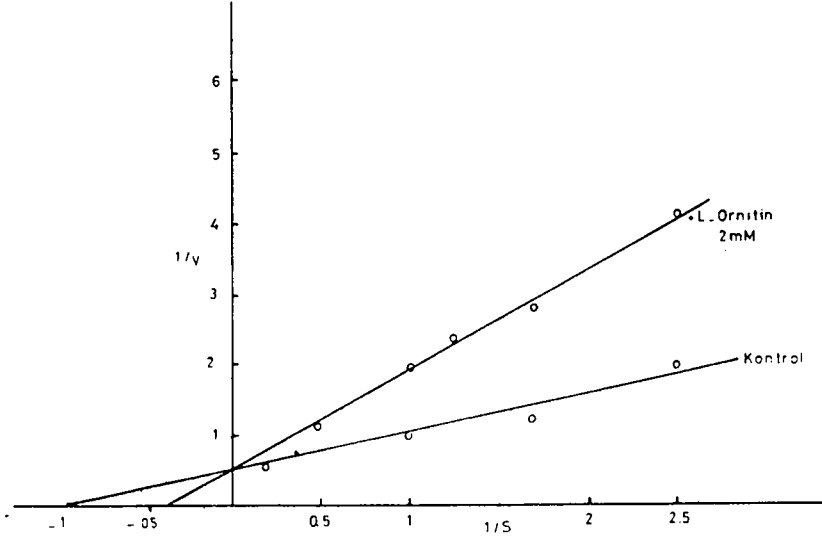
şik ornitin konsantrasyonlarında arginaz aktivitesi incelendiğinde 2.5 mM ornitin % 14,5 mM ornitin ise % 70 civarında inhibisyona neden olduğu görüldü (Şekil 7). Ornitin inhibisyonunun tipini belirt-



Şekil - 7 L-ornitin'in arginaz aktivitesi üzerine olan etkisi

Figure - 7 The effect of L-ornithine on the arginase activity

mek için, enzim aktivitesi değişen arginin konsantrasyonlarında ve 2 mM ornitin varlığında ölçüldü. Sonuçlar Lineweaver-Burk yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 8). Ornitin'in varlığında enzimin V_{max} 'ının değişmediği fakat K_m 'inin büyüdüğü tesbit edildi. Bu sonuçlara göre L-ornitin'in enzimi kompetitif olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil - 8 L-Ornitinin arginaz üzerindeki inhibisyonunun Lineweaver-Burk yöntemi ile gösterilmesi

Figure - 8 The indication of L-ornithine inhibition on the arginase by the Lineweaver-Burk method.

L-lizinin arginaz üzerinde olan inhibisyonu araştırıldığında, L-ornitininkine benzer bir inhibisyonun olduğu anlaşıldı.

Sarımturak renkli ve kazınarak alınan yaşlı sığırların hidatik kist tabakalarında kinetik özellikleri tesbite çalışılan arginazın üreotelik sınıfa benzerlik gösterdiği görüldü.

Tartışma ve Sonuç

Arginazın üre döngüsüne sahip olmayan canlı ve dokulardaki biyokimyasal önemi hakkında sadece bazı yorumlar yapılmıştır (4,6,10). Bunun dışında kesin bir izah yolu ortaya konulmamıştır.

Özellikle, paraziter helmintlerde bugüne kadar yapılan araştırmalarda tam bir üre döngüsünün bulunamadığı ancak araştırılan parazitlerin bir çoğunda arginaz enziminin varlığı ortak bir kanıt olarak belirlenmiştir (1,2,10,12,15,16). Paraziter helmintlerde bulunan arginazın biyokimyasal önemi prolin sentezine bağlanmaktadır (6,10). Bu görüşe göre arginin, azot kaynağı olarak kullanılabilmesi gibi aynı zamanda prolin sentezi için alternatif bir yolda ara metabolit olarak da kullanılabilir. İşte bu alternatif yolda arginaza gerek duyulmaktadır denilmektedir.

Asıl amacı hidatik kistlerde üre metabolizmasını araştırmak olan bu çalışmanın ilk basamağında varlığı belirtilen arginaz enziminin kinetik özellikleri irdelenecek olursa:

Yaşlı sığırların karaciğer ve akciğer hidatik kistlerinde sarımtırak renkte olan tabakalarda varlığı bildirilen arginazın L-arginine karşı K_m 'inin 1-2 mM sınırları içerisinde olduğu görülmüştür (Şekil 5,6). Paraziter helmintlerde arginazların K_m 'leri *F. hepatica*'da 10 mM *Hymenolepis diminuta*'da 3.57 mM (2) olarak bildirilmiştir.

Kertenkele ve yılan karaciğerinde bulunan arginazın K_m 'i 100-200 mM, insan karaciğerinde 6.12 mM, sığır karaciğerinde 5.5 mM olarak bulunmuştur (5,6). Bu bilgilerin ışığında hidatik kist tabakalarında bulunan arginaz'ın K_m 'ine göre kinetik bakımından ürikotelik canlılardan ziyade üreotelik sınıfa yakın olduğu anlaşılmıştır. Aynı durum, *Hymenolepis diminuta* ve *F. hepatica*'da da görülmektedir. Üreotelik oldukları bu güne kadar ispatlanamamış olan parazitler helmintlerde ürikotelik arginazın bulunuşu ilginç bir durum arz etmektedir.

Arginaz enziminin pH'sı yapılan araştırmaların bir çoğunda 9.5 olarak belirtilmiştir (4,5). Paraziter helmintlerde ilk olarak arginazın pH'sı *Hymenolepis diminuta*'da (2) 9.5 olarak tesbit olunmuştur. pH profilinin çan şeklinde olduğu da bu çalışma ile gösterilmiştir. Kist tabakalarında bulunan arginazın optimal pH sınırı ve pH profilinin de bu parazite benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 3).

Enzimin aktivasyonu için diğer arginazlarda olduğu gibi (6) Mn iyonlarına ve pre-inkübasyona gerek duyduğu anlaşılmaktadır (Şekil 2,4). Paraziter helmintlerde bulunan arginazın Mn iyonlarına olan gereksinimi Campbell (2) tarafından araştırılmıştır. *H. diminuta*'da Mn iyonlarının varlığında arginaz aktivitesinin % 80 arttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada Ba^{+2} , Ca^{+2} ve Fe^{+2} in varlığında enzim aktivi-

tesi görülmemiş, Mn'in varlığında ise enzimin katalitik aktivitesinde çok belirgin bir artışın olduğu görülmüştür. Enzim aktivitesinde artış 0.25 mM Mn⁺² konsantrasyonundan başlamış ve 0.75 mM Mn konsantrasyonunda en yüksek düzeye ulaşmıştır (Şekil 4). Bu sonuçtan enzimin aktivasyonu için mutlaka Mn iyonlarına ihtiyaç duyduğu anlaşılmaktadır.

Enzimin en yüksek aktivasyonunun fizyolojik sınırların üzerinde (51 °C) olan bir pre-inkübasyon ile sağlanması ayrı bir özellik göstermektedir (Şekil 2).

Anılan kist tabakalarındaki arginazın varlığı ve kinetik özellikleri bu çalışmada tesbit olunmakla birlikte, fizyoloji ve biyokimyasal önemi konusunda bu aşamada yorum yapmak mümkün olmamaktadır.

Yaşlı sığır hidatik kistlerinde rastlanan sarımtırak görümlü hidatik kistlerin iç yüzüne bakan tabakaların mahiyeti hakkında yeterli bilgiye bu araştırma süresince rastlanılamamış olup konunun bu yönünde cevaplandırılmayı bekleyen ayrı bir problem teşkil etmektedir.

Kaynaklar

1. **Barratt, J.** (1981). *Biochemistry of parasitic helminths. The scientific and medical division.* Macmillan publishers Ltd. London.
2. **Campbel, J.M.** (1963). *Urea formation and urea cycle enzymes in the cestode. Hymenolepis diminuta.* Comp. Biochem. Physiol., 8: 13.
3. **Edwards, E.M., Rattenbury, J.M. Vanam, G.C.E., Dhand, U.K. Jeacock, M.K. and Shepherd, D.A.L.** (1977). *Enzyme activities in the sheep placenta during the last three months of pregnancy.* Biophys. Acta, 497: 133.
4. **Gülen, Ş.** (1981). *Koyun karaciğeri arginazının arıtılması ve enzimin özellikleri,* O.D.T.Ü. Biyolojik Bilimler Bölümü, Doçentlik tezi, Ankara.
5. **Gülen, Ş., Türkoğlu, C. ve Ayabakan, Ş.** (1983). *Bazı orta anadolu koyunlarının eritrositlerinde arginaz aktivitesinin dağılımı,* Doğa bilim dergisi: Veterinerlik ve hayvancılık. 7: 175-186.
6. **Guillermo, S. and Rafael, P.** (1976). *Arginase, The urea cycle,* Edited by Santiago, G. Rafael, B. and Federico, M., s. 221-235, John Willey and sons, New York/London.
7. **Janssens, A.P. and Byrant, C.** (1968). *The ornithine-urea cycle in some parasitic helminths.,* Comp. Biochem. Physiol., 30: 261-272.
8. **Lehninger, A.L.** (1976). *Biochemistry, Second Edition.* Worth Publishers Inc. New York.
9. **Kilejian, A., Schinazi, L.A. and Schwabe, C.W.** (1961). *Host-parasite relationships in Echinococcus V. Histochemical observations on E. granulosus.,* J. Parasitol., 47: 181-188.

10. **Kurelec, B.** (1975). *Molecular biology of helminth parasites*. Inter. J. Biochem., 6: 375-377.
11. **Owczarczyk, B. and Barc, W.** (1975). *The different activities of arginase arginine synthetase, ornithine transcarbamoylase and ornithine transaminase in the liver and blood cells of some farm animals*. Comp. Biochem. Physiol., 50B: 555.
12. **Paltridge, R.W. and Janssens, P.A.** (1971). *A reinvestigation of the status of the ornithine-urea cycle in the adult Ascaris lumbricoides*. Comp. Biochem. Physiol., 40: 503.
13. **Ratner, S.** (1976). *Formation and cleavage of C-N bonds in arginine and urea biosynthesis*. Edited by, Horecker B., Cornudella, L., Reflections on biochemistry, Pergamon press, New York.
14. **Schimke, R.T.** (1974). *Arginase (rat liver)*. *Methods in enzymology*, 17A, Edited by: Tabor, H. and Tabor, C.W., 313. Academic press, New York.
15. **Tao, I. and Huang, T.V.** (1965). *Studies on arginase of Schistosoma Japonicum*. Scientia Sin., 14: 417.
16. **Yip, M.C.P. and Knox, W.E.** (1972). *Function of arginase in lactating mammary gland*. Biochem. J., 127: 893.