

577.152.353:636.3

G 971 b

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
VETERİNER ve HAYVANCILIK ARAŞTIRMA GRUBU
PROJE NO : VHAG - 451

**BAZI ORTA ANADOLU KOYUNLARININ ERİTROSİTLERİNDE
ARGİNAZ AKTİVİTESİNİN DAĞILIMI**

1997-688

ŞENDOĞAN GÜLEN

GELAETTİN TÜRKOĞLU ŞÜKRÜ AYABAKAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

ANKARA

- 1982 -

TÜRKİYE
BİLİMSEL VE TEKNİK
ARAŞTIRMA KURUMU
KÜTÜPHANESİ

TÜRKİYE
BİLİMSEL VE TEKNİK
ARAŞTIRMA KURUMU
KÜTÜPHANESİ

577.152.353:636.3

69716

TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
VETERİNER ve HAYVANCILIK ARAŞTIRMA GRUBU
PROJE NO: VHAG - 451

BAZI ORTA ANADOLU KOYUNLARININ ERİTROSİTLERİNDE
ARGİNAZ AKTİVİTESİNİN DAĞILIMI

ŞENDOĞAN GÜLEN

CELALETTİN TÜRKÖĞLU ŞÜKRÜ AYABAKAN

ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ

S- 37
R- 40

Tr, En

ANKARA

-1982-

13592

ÖZET

GÜLEN Şendoğan, TÜRKÖĞLU Celalettin ve AYARAKAN Şükürü

BAZI ORTA ANADOLU KOYUNLARININ ERİTROSİTLERİNDE ARGİNAZ AKTİVİTESİNİN DAĞILIMI

Arginaz, arginini üre ve ornitine parçalayan enzimdir. Bu enzimin insan eritrositlerinde bulunmadığı durumlarda, çocuklarda kanda arginin düzeyi yükselmekte ve "Arginemia" denilen klinik tablonun şekillenmesi sonucu çocuklar ölmektedir. Koyunlarda ise eritrositlerde arginaz düzeyinin değişmesi fizyolojik bozukluklar yaratmamaktadır.

Araştırmamızda; Akkaraman, Dağlıç ve Ramboçillet koyunlarında bir yıl süre ile eritrositlerde arginaz aktivitesi ölçülerek, enzim aktivitesi ile yapağı kalitesi arasında bir ilişki aranmıştır.

Ayrıca enzim aktivitesinin ölçülmesi için gerekli yöntem, sahada çalışan zootechnistlerin kullanabilmesi amacı ile basitleştirilmiştir.

Yapağı kalitesinin düşük olduğu; Akkaraman ve Dağlıçlarda enzim aktivitesi yüksek bulunurken, iyi kalite yüne sahip Ramboçillet'lerde ise enzim aktivitesi önemli derecede düşük bulunmuştur. Genellikle enzim aktivitesi yağtan ziyade mevsime bağlı olarak değişmekte fakat bu değişiklikler, ırklar arasındaki farklılık sınırlarını aşmamaktadır.

ABSTRACT

GÜLEN Şendoğan, TÜRKÖĞLU Celalettin and AYABAKAN Şükru

THE VARIABILITY OF ARGINASE ACTIVITY IN THE ERYTHROCYTES OF CERTAIN CENTRAL ANATOLIAN SHEEP

Arginase is an enzyme which converts arginine into urea and ornithine. The lack of enzyme activity in human erythrocytes causes an increase in blood arginine level, a lethal clinical symptom called arginemia, that eventually leads to the death of children. On the other hand low enzymatic activity, in sheep erythrocytes, does not create any metabolic disorder.

In our research we measured the activity of arginase in the erythrocytes of Akkaraman, Dağlıç and Rambouillet merinos sheep for a year period, to seek a relationship between the quality of wool and the levels of enzyme activities.

Also we simplified the method for the enzymatic assay of arginase that can be easily utilized by the zootechnist working in the field.

The sheep having lower quality of wool, Akkaraman, Dağlıç showed very high enzymatic activities, whereas; Rambouillet merinos, with high quality wool, rather gave much lower activities.

In general, the activity of arginase was not affected by age, however seasonal variations were observed. The variations in enzyme activity due to the seasons, could not exceed the ranges between the races.

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerekleŒmesinde katkısı olan Trkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Veteriner ve Hayvancılık Grubu'na, bu alışmada kullanılan materyalin sağlanmasında byk emeği geen, ifteler Harası Mdr M. Hulusi Ada'ya ve koyunculuk ubesinde alışan veteriner hekimlere, sonuların tartişmasında, grş ve eleğtirilerinden yararlandığımız; Dr.Vet.Hek.Reğat znacar'a, Uzm. Vet.Hek.Kamuran znacar'a, Dr.Vet.Hek.şefik Niftoğlu'na, ve İstatistiki değerlendirmelerde yardımlarını unutamayacağımız Do.Dr.Aykut Kence'ye teğekkr bor biliris.

Araştırma sresinde hoggr ve sabırla bizi destekleyen Prof.Dr.Tayyip alışlar'a ayrıca teğekkr ederiz.

Değerli alışma arkadaşımız Yk.Kimyağer Suna Trkoğlu'na Œkranlarımızı bildirmek bizim iin ayrıca bir grev olmaktadır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
I. GİRİŞ.....	1
II. Kimyasal maddeler ve Yöntemler.....	6
2.1. Kimyasal maddeler	6
2.2. AntiKoagulantın hazırlanması ...	6
2.3. Koyun eritrositlerinde Arginaz aktivite- sinin ölçülmesi.....	7
2.4. Ürenin Spektrofotometrik olarak ölçülmesi	8
III. BULGULAR	10
3.1. Arginaz Enziminin Toplam Kanda ve erit- rositlerde Yerleşimi	10
3.2. Arginaz Maksimum Aktivitesi için En Uygun koşulların Tesbiti	10
3.3. Pre-inkubasyonun Etkisi	11
3.4. $MnCl_2$ 'ün Etkisi	12
3.5. İnkübasyon süresi	14
3.6. Enzimin Arginine Karşı olan duyarlılığı...	14
3.7. pH'nın Etkisi	14
3.8. Dağlıç Koyunlarda Yaşın Arginaz Aktivitesine Etkisi	14
3.9. Rambouillet Koyunlarda Yaşın Arginaz Aktivitesine Etkisi	19
3.10. Irk Faktörünün Koyun Eritrosit-Arginaz Aktivitesine Etkisi	19

3.11. Dağlıç, Rambouillet, Melez Kuzulardaki Arginaz Dağılımı	19
3.12. Eritrosit-Arginaz Aktivitesinin Yapağı Verimi ile ilgisinin Saptanması	24
IV. TARTIŞMA	26
V. KAYNAKLAR	33

I- GİRİŞ

Aminoasitlerin katabolizmaları esnasında meydana gelen amonyak çok toksik olması nedeni ile canlının organizmasından en kısa sürede atılır. Amonyakın detoksifikasyonunun canlının yaşadığı ortamdaki suyun miktarına bağlı olarak değişik şekillerde olduğu bilinmektedir. Suda yaşayan canlılarda, memeliler hariç, amonyakın bir değişikliğe uğramadan organizmadan uzaklaştırıldığı, karada yaşayanlarda ise amonyakın genellikle üreye çevrildiği ve suyun az olduğu ortamlarda yaşayan canlılarda ürik aside dönüştürülerek organizmadan atıldığı gösterilmiştir. Bu atılım şekillerine göre canlılar amonyatelik, ureotelik ve ürikotelik olarak sınıflandırılmaktadırlar (1).

Ureotelik canlılarda amonyak şema I'de görüldüğü gibi Krebs-Henseleit üre döngüsü ile üreye dönüşür. Üre döngüsü bütün enzimleri ile karaciğerde bulunmaktadır.

Karaciğer dışındaki (extrahepatic) organlarda ise tam çalışan bir üre döngüsü saptanamamaktadır. Bu organlarda üre döngüsünün yokluğuna rağmen ölçülebilecek düzeyde üre sentezi gözlenmektedir.

Üre döngüsü olmayan canlılarda ve organlarda üre; çeşitli kaynaklardan gelen argininin arginaz (L-Arginin ureohidrolaz E.C. 3.5.3.1) ile hidrolizasyonu sonucu ortaya çıkar.

I- GİRİŞ

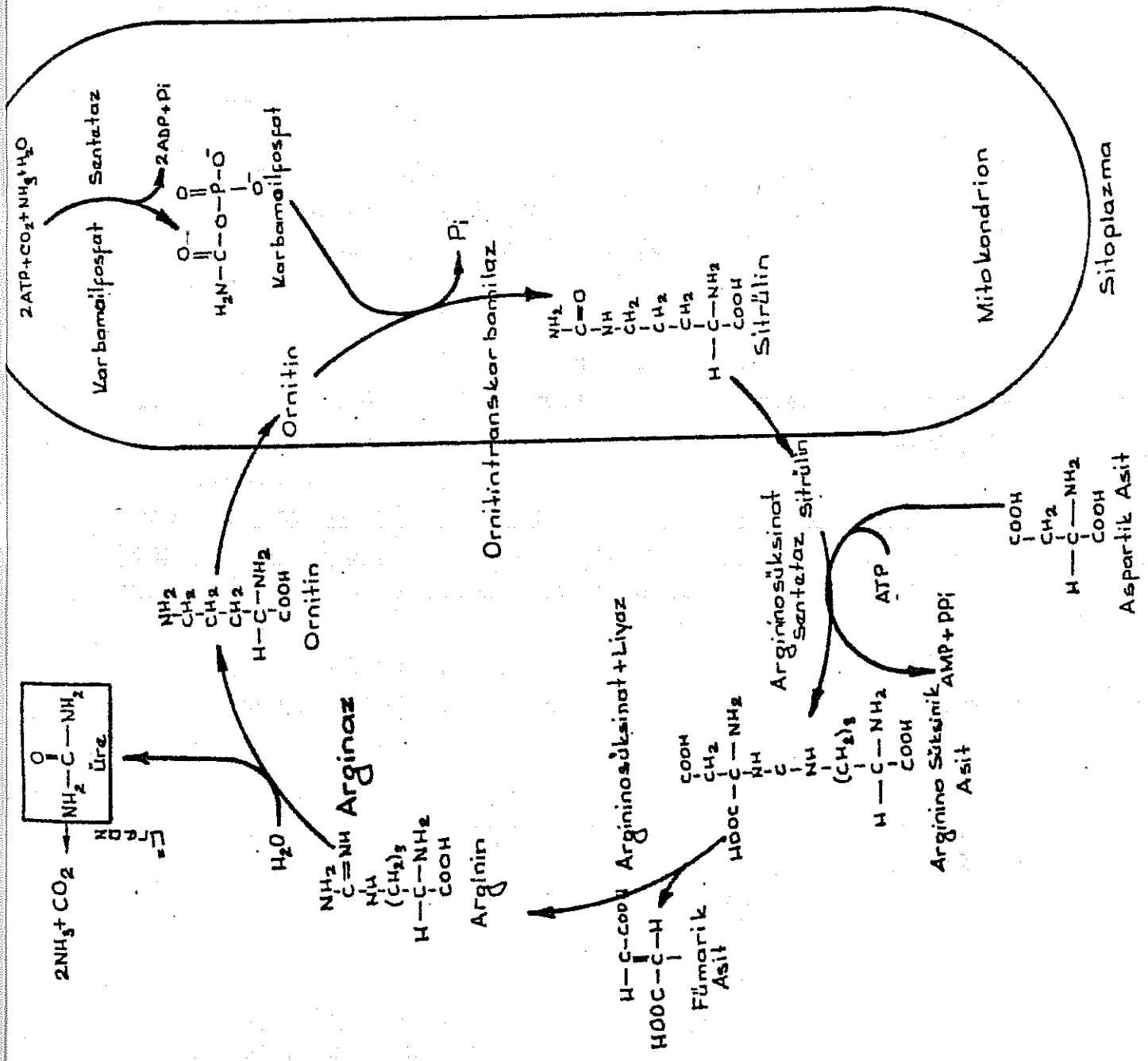
Aminoasitlerin katabolizmaları esnasında meydana gelen amonyak çok toksik olması nedeni ile canlının organizmasından en kısa sürede atılır. Amonyakın detoksifikasyonunun canlının yaşadığı ortamdaki suyun miktarına bağlı olarak değişik şekillerde olduğu bilinmektedir. Suda yaşayan canlılarda, memeliler hariç, amonyağın bir değişikliğe uğramadan organizmadan uzaklaştırıldığı, karada yaşayanlarda ise amonyağın genellikle üreye çevrildiği ve suyun az olduğu ortamlarda yaşayan canlılarda ürik aside dönüştürülerek organizmadan atıldığı gösterilmiştir. Bu atılım şekillerine göre canlılar amonyatelik, üreotelik ve ürikotelik olarak sınıflandırılmaktadırlar (1).

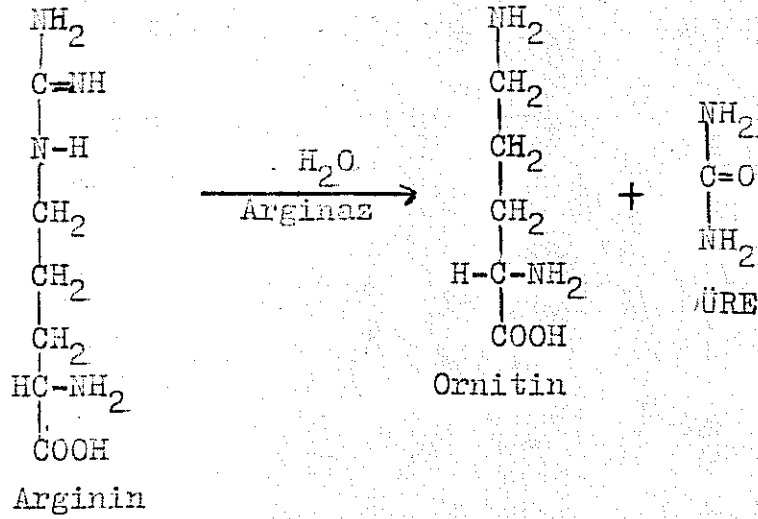
Üreotelik canlılarda amonyak Şema I'de görüldüğü gibi Krebs-Henseleit üre döngüsü ile üreye dönüşür. Üre döngüsü bütün enzimleri ile karaciğerde bulunmaktadır.

Karaciğer dışındaki (extrahepatic) organlarda ise tam çalışan bir üre döngüsü saptanamamaktadır. Bu organlarda üre döngüsünün yokluğuna rağmen ölçülebilecek düzeyde üre sentezi gözlenmektedir.

Üre döngüsü olmayan canlılarda ve organlarda üre; çeşitli kaynaklardan gelen argininin arginas (L-Arginin üreohidrolaz E.C. 3.5.3.1) ile hidrolizasyonu sonucu ortaya çıkar.

Sema 1
Krebs-Henseleit
Üre döngüsü





Üre döngüsünün üyesi olmayan bu tip arginaz enzimi sıcağ meme dokusunda (2), koyun plasentasında (3), fare bey-ninde (4), civcivlerin karacigerinde (5,6) ve böbreklerinde (7) saptanmıştır.

Ayrı bir canlılar grubunu oluşturan parazitlerde tam çalışan bir üre döngüsünün varlığının belirlenmemesine rağmen, incelenen parazitlerin büyük bir çoğunluğunda arginaz aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir.

Örneğin; Hymenolepis diminata (8), Ascaris lumbricoides (9), Schistosoma japonicum (10), Fasciola hepatica (11), arginaz enzimine sahip parazitler olarak belirtilebilir.

Protozoolardan, tripanozomatidlerin Crithidia (12) ve Herpetomonas (13) türlerinde arginaz enziminin varlığı ortaya konmuştur.

Protozooların yanısıra diğer mikroorganizmalarda da arginaz aktivitesi saptanmıştır. Sacchromyces cerevisiae (14) ve Neurospora grubu (15) örnek olarak verilebilir.

Üre döngüsünün bir üyesi olan arginaz enzimi ile, döngünün üyesi olmayan enzim arasında iki önemli fark bulunmaktadır. Üre döngüsünde gören yapan arginazın Km'i, çok küçük olup 10-20mM sınırları içinde bulunur. Diğer enzimin Km'si ise 40-200mM arasındadır. Bu değerler göz önüne alınırsa, görülürki birinci tip enzim arginine özel-

likle daha fazla duyarlıdır (16).

Diğer bir farklılıkta enzimlerin aktiviteleridir. Örneğin sıçanlarda; karaciğerde üre döngüsünde bulunan enzim, diğer dokulardaki arginazlara oranla 50-4000 misli daha fazla aktivite göstermektedir. (17,18).

Çiftlik hayvanlarında da aynı durum saptanmıştır. At, koyun, sığır ve tavşanların karaciğerindeki enzim, eritrositlerdeki enzime oranla çok daha aktiftir (19).

Üre döngüsü olmayan organ ve organizmalarda arginaz enziminin varlığı bugün modern biyokimyanın cevap veremediği sorulardan biridir ve çeşitli varsayımlara neden olmaktadır.

Campbell'e (20) göre üre sentez edemeyen canlılar veya organlar evrimin ilk başlangıç dönemlerinde üreotelik özelliklere sahiptirler fakat zamanla bu yeteneklerini kaybetmişler, ancak arginaz enzimini koruyabilmişlerdir. Tamir ve Ratner'de (5,6) aynı görüşü paylaşmakta, enzimi "Evrimden arta kalmış" olarak vasıflandırmaktadır. Yip ve Knox (2) ise meme dokusundaki arginazın varlığını sütte bulunan prolinin sentezi için gerekli ornitin sağlanmasına bağlamaktadır.

Parazitlerde arginazın varlığını ve biyokimyasal işlevliğini Kurelec (21) ise daha değişik bir yaklaşımla ele almaktadır. Bu görüşe göre argininin, arginaz ile hidrolizasyonu sonucu ortaya çıkan ornitin, proline dönüşmekte ve bu arada glikoz parçalanması (glikolisis) sırasında meydana gelen NADH (indirgenmiş nikotin amid dinükleotid) oksitlenerek NAD'ye dönüşmektedir. Görüşün karanlıkta kalan kısmı Kurelec'inde (21) kabul ettiği gibi, bu yolla oksitlenen NADH'nun toplam biyolojik oksidasyon-redüksiyon olayları içindeki katkısıdır.

Yukarıda sıralanan görüşler, daha öncede belirtildiği üzere bir spekülasyondan öteye gidememektedir.

Eritrositler, kırmızı kan hücreleri, Krebs-Henseleit

üre döngüsü ile üre sentez edemezler, fakat aktif bir arginaz enzimine sahiptirler. Enzimin varlığı at, koyun, sığır (19) ve insan (22,23), eritrositlerinde saptanmıştır.

Özellikle insanların eritrositlerinde arginaz enziminin aktivitesinin çok düşük düzeyde bulunması veya tamamen kaybolması sonucu kanda ve idrarda arginin miktarı yükselmekte "Arginemia" diye adlandırılan klinik tablonun şekillenmesine neden olmaktadır. Genellikle ölümle sonuçlanan bu kalıtsal bozuklukta, kanda yükselen arginin ve amonyak düzeylerinin yanısıra özellikle küçük çocuklarda geri zekalılık, tendon reflekslerinin artması (spastisiti), epileptik kasılmalar, anormal EEG, ataksi, serebral atrofi, kusma, karaciğerin büyümesi (hepatomegali) klinik tabloyu oluşturur (24-27).

İnsanlarda ölümle sonuçlanan metabolik bozukluklara neden olan, veya kısaca arginemia olarak tanımlanan tablo koyunlarda aynı durumu yaratmamaktadır. Finlandiya'da koyunlar üzerinde yapılan bir araştırma sonucuna göre, eritrositlerde arginaz enziminin yokluğu hayvanlarda fizyolojik hiçbir değişikliğe neden olmamaktadır. Homozigot olanlarda, enzim tamamen ortadan kalkmakta, heterozigotlarda ise aktivite çok düşük düzeylerde bulunmaktadır (28).

İnsanlarda eritrositlerdeki arginaz enziminin yokluğu veya aktivitesinin düşüklüğü ciddi sonuçlara neden olurken, aynı durum koyunlarda görünüşte fizyolojik bir bozukluk sergilememektedir.

Her iki canlılar grubunun, aynı biyokimyasal değişime karşı gösterdikleri farklı tepkiler araştırmamıza konu olmuştur. Koyunlarda arginaz enziminin klinik açıdan belirgin bir durum ortaya koymamasına rağmen, verim yönünden etkisinin saptanması düşünülmüştür. Özellikle koyunlarda sağlıklı bir ölçüme dayanan verim kriteri olarak yapağı kalitesi ele alınmıştır. Araştırmanın bu aşamasında enzim aktivitesinin ölçümü için en basit, pratik ve sağlıklı olabilecek yöntem bulunarak, aynı koşullarda yaşayan değişik türdeki koyunlarda ve bunların melezlerinde çalışmalar yürütülmüştür.

II- KİMYASAL MADDELER ve YÖNTEMLER

Kimyasal Maddeler:

L-Arginin monohidroklorit, Mangan(II)klorür, üre, amonyum okzalat, potasyum okzalat, E.Merck' (AG.D61 Darmstadt, Batı Almanya) firmasından, 1-fenil-1,2 propandion-2-okzim(α -izonitrozopropiofenon) Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri U.S.A)'dan getirtilmiştir. Araştırmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup, piyasa-
dan sağlanmıştır.

Yöntemler:

Bu araştırmada Ankara Çayır-Mera Yem Bitkileri ve Zootekni Araştırma Enstitüsü Akkaraman, Çifteler Harası Dağlıç, Rambouillet ve F₁ melezi koyunlar kullanıldı.

Kan alınması: Yukarıda bildirilen kurumlarda kanlar günün erken saatlerinde steril kanüllerle koyunların vena jugularislerinden, 5ml. miktarlarında içinde kurutulmuş anti-koagülant bulunan küçük şişelere alındı.

Anti-Koagülantın hazırlanması (29):

Amonyum okzalat 3 gr.

Potasyum okzalat 2 gr.

Damıtık su ile 100 ml.e tamamlanır.

Her 5ml. kan için 0,2ml. anti-koagülant, kanların alınacağı küçük şişelere konuldu, ve bir gece 45°C'de bırakılarak kurutuldu.

Kan alınmasını müteakip şişeler özenle sallanarak, anti-koagülantın çözülmesi sağlanarak pıhtılaşma önlendi.

Kan alma işlemini takiben, kan örnekleri en kısa süre içinde laboratuvara getirilip 4°C'de buzdolabında saklandı.

Koyun Eritrositlerinde Arginaz Enziminin Aktivitesinin Ölçülmesi:

Arginaz aktivitesinin ölçülmesinde uygulanan yöntem, sahada çalışan zooteknistlerin biyokimya bilgi ve tecrübeleri gözönüne alınarak en basit düzeye indirilmiştir. Kanımızca basitleştirilen bu yöntem zooteknistler tarafından, fazla araç ve gereçe gerek duyulmadan kolayca uygulanabilir.

Gerekli aletler:

- a) Su banyosu
- b) Masa santrifüjü
- c) Basit bir spektrofotometre veya kolorimetre
- d) Yeterli sayıda deney ve santrifüj tüpleri

Bulgular kısmında daha geniş şekilde belirtildiği üzere, ilk yapılan çalışmalarımızın sonuçları kan serumunda belirli düzeyde bir enzim aktivitenin olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle enzim sadece eritrositlerde yerleştiğinden, hemolize edilmiş kan enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Her kan örneğinden 0,5ml. pipetle alınıp bir deney tüpüne aktarılmış ve üzerine 7ml. soğuk, mangan klorürlü su (mililitresinde 2,5umol $MnCl_2$ içeren) ilave edilerek 10 dakika kırılmış buz içerisinde tutuldu ve eritrositlerin hemolize olmaları sağlandı. Hemoliz için kırılmış buz yerine tüplerin buzdolabına konulması da aynı sonucu sağlayabilir. Hemolizi müteakiben enzimin aktivasyonunu sağlamak amacı ile, aynı tüpler ısısı $37^{\circ}C$ olan su banyosuna aktarıldı ve 10 dakika bekletildi (preinkübasyon).

Enzimatik reaksiyonun yapılacağı tüplere, her 1 mililitresinde 50umol arginin bulunan ve pH'sı 10,5'a getirilmiş arginin çözeltisinden 1ml. konuldu. Enzimin aktivasyonu sürerken, aynı tüplerde $37^{\circ}C$ 'lık su banyosunda 10 dakika bekletilerek ısı dengesi sağlandı.

Deneylerin sağlıklı sonuç vermesi amacı ile her kan örneği için ikili uygulama (duplicate) yapıldı.

Enzim aktivasyonu ve ısı dengesinin sağlanmasından sonra içinde arginin çözeltisi bulunan tüplere aktive edilmiş enzimi içeren, hemolize edilmiş kan fraksiyonundan bir mililitre ilave edildi ve 37°C'lik sallantılı su banyosunda 15 dakika tutularak inkübasyon sağlandı. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 1,5 Molarlık HClO₄ çözeltisinden birer mililitre konularak enzimatik tepkime durduruldu. Asit ilavesi sonucu proteinlerin daha iyi çökertilmesi amacı ile tüpler tekrar kırılmış buz içine konuldu ve 10 dakika bekletildi.

Çöken proteinlerin uzaklaştırılması amacı ile tüpler EBA-III Hettich marka klinik santrifüjünde 10 dakika 5000 RPM'de santrifüj edildi. Argininin eritrositlerde bulunan arginaz ile parçalanması sonucu meydana gelen üreyi içeren, üstteki sıvı kısım, ürenin ölçülmesi için özen gösterilerek ayrıldı.

Ürenin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi:

Enzimatik olarak meydana gelen üre Schinke(30)'nin metodu ile ölçüldü.

20 mililitrelik tüplere aşağıda içeriği bildirilen 5ml. asit karışımı konuldu.

Asit karışımı:

Derişik H ₂ SO ₄	90 ml.
Derişik H ₃ PO ₄	270 ml.
Damıtık su	640 ml.

Üzerlerine 1ml, deney sonucu elde edilen ve üreyi içeren sıvıdan ilave edildi. Bu işlemi takiben üzerlerine 0,25ml. 3%'lük (96%'lük etanol içinde) 1-fenil-1,2-propan-dion 2-okzim (α -isonitrozopropiofenon) konuldu ve Vortex karıştırıcıda çok iyi bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sırasında karıştırma yeterince yapılmaz ise renk oluşumu homojen şekilde sağlanamamakta ve sonuçlar yanıltıcı olmaktadır. Kör olarak kullanılan tüplere 1ml. damıtık su ve

standart olarak kullanılan tüplere ise 1 mililitresinde 2,5 ve 5µmol üre ihtiva eden çözeltilerden ilave edildi.

Karıştırma işlemi sonucu tüpler, ortalarına pastör pipeti geçirilen özel lastik tıpalarla kapatıldı ve kaynayan suda, direkt ışık almaması için etrafları alüminyum kağıtla kaplanarak, 30 dakika tutuldu. Kaynama süresinin sonunda tüpler soğuk su içinde bir süre tutularak iç ısıları oda ısısına düşüncüye kadar bekletildi. Meydana gelen erguvanin rengin optik yoğunluğu (optical density) 1cm. uzunluğunda ışık yolu olan küvetlerde 540nm'de; köre karşı okundu. Okuma işlemi bölümümüzde bulunan Carl-Zeiss PMQ-II marka spektrofotometresi ile sağlandı. Meydana gelen ürenin miktarı standartların optik yoğunluğuna göre değerlendirildi. Sonuçlar 1ml. kanda 1 saatta meydana gelen µmol. üre olarak belirlendi.

$$\text{Değerlendirme} \quad \frac{A_{O.D} \times 900}{B_{O.D}}$$

$A_{O.D}$ Örneğin verdiği optik yoğunluk

$B_{O.D}$ 5µmol ürenin verdiği optik yoğunluk

Verilerin İstatistikî Değerlendirilmesi:

Değişik hayvan gruplarındaki, arginaz aktivitelerinin farklılığının önemlilik dereceleri değişkenlik çözümlemesi (variance analysis) ile değerlendirilmiştir.

Arginaz aktiviteleri ele yapağa verimleri arasındaki ilgi de korrelasyon katsayısı (product-moment correlation co-efficient) hesaplanarak sonuca gidilmiştir (31).

III- BULGULAR

3.1 Arginaz Enziminin Toplam Kanda ve Eritrositlerde Yerleşimi:

Daha önceki bölümlerde belirtildiği üzere; çalışmanın diğer bir amacı da enzim aktivitesinin saptanması için uygulanacak yöntemlerin, sahada çalışan zooteknistler tarafından uygulanabilecek düzeyde basitleştirilmesi idi. Bu nedenle eritrositleri ayırmadan total kanın hemolize edilerek enzim kaynağı olarak kullanılabilme olanağı araştırıldı.

Tablo 1'de görüldüğü üzere lml. kanda mevcut eritrositlerin enzimatik aktiviteleri ile lml. total kanın aktivitesi arasında belirgin bir farklılık saptanamamıştır. Tablo 2'de sunulan varyans analizinde sonucu doğrulamaktadır. Bu arada serumda belirgin bir düzeyde arginaz enziminin bulunmadığı ortaya çıkmaktadır. Normal, fizyolojik, koşullarda serumda aktivitenin saptanamamasının Veteriner Hekimlik açısından önemli olabileceği kanısındayız. Bu sayede proplasmosis gibi eritrosit parçalanmasına neden olan hastalıkların teşhisinde; kanda enzim aktivitesinin araştırılmasından bir biyokimyasal bulgu olarak yararlanabilme olasılığı üzerinde çalışmaktayız.

Enzimin sadece eritrositlerde lokalize olduğunun saptanmasından sonra, eritrositlerin ayrılmasına gerek kalmadan, hemolize edilmiş kanın enzim kaynağı olarak kullanılabilmesi anlaşılmıştır. Bu nedenle araştırma süresince enzim kaynağı olarak hemolize edilmiş kan kullanılmıştır.

3.2 Arginazın Maksimum Aktivitesi İçin En Uygun Koşulların Tesbiti:

Koyun eritrositlerindeki arginaz enziminin maksimum aktivitesi için en uygun koşulları sağlamak amacı ile; ko-faktörün, preinkübasyonun, ısının, inkübasyon sürecinin, sübstrat derişiminin, pH'nın enzim aktivitesine olan etkileri

araştırıldı.

3.3 Pre-inkübasyonun Etkisi:

Arginaz enzimi aktivasyonu için pre-inkübasyona gerek duymaktadır. Enzim belirli bir ısıda, belirli bir süre $MnCl_2$ ile pre-inkübasyona tabi tutulursa aktivitesi birkaç misli artmaktadır. Örneğin arıtılmış koyun karaciğer arginazının aktivitesi pre-inkübasyon ($50^{\circ}C$ 'de 10 dakika) ile 3 misli artmaktadır (32). Koyun eritrositleri arginazıda pre-inkübasyon ile etkilenmektedir. Tablo 3'de görüldüğü üzere $55^{\circ}C$ 'ye kadar değişen 10 dakikalık pre-inkübasyon koşullarında $37^{\circ}C$ 'de aktivasyon maksimum düzeye erişmekte ve enzim 15 kez daha fazla aktif hale gelmektedir. Araştırma süresinde enzim $37^{\circ}C$ 'de 10 dakika ($MnCl_2$ varlığında) pre-inkübasyona rutin olarak tabi tutulmuştur.

Tablo 1. Kan ve eritrositlerdeki arginaz aktivitesi

Enzim Kaynağı	Deney Tekrarı	Arginaz Aktivitesi umolüre/mlkan.saatt
Kan	6	415.63 ± 36.36
Eritrosit	8	459.35 ± 34.26

Deney koşulları, yöntemler kısmında anlatıldığı gibi uygulandı. 5ml. antikoagülant katılmış kan 2000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çöken eritrositlerin üzerine özenle serum fizyolojik (%0.9 NaCl çözeltisi) ilave edilerek hacim 5ml.e tamamlandı. Dikkatlice karıştırılıp tekrar santrifüj edildi ve bu işlem iki kere tekrarlandı. Yıkanmış eritrositlerin hacmi tekrar 5ml.e serum fizyolojik ile getirildi. İzole edilmiş eritrositler ve kan materyal ve metod kısmında anlatıldığı gibi hemolize edilerek enzim kaynağı olarak kullanıldı. Sonuçlar, enzim etkinliği ± SH (standart hata) olarak yazıldı.

Tablo 2. Varyans analizi

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri Olasılık ($p > 0.05$)
$\bar{Y}-\bar{Y}$ (koyunlar arası)	1	6550	
$y-\bar{Y}$ (hata, gruplar arası)	12	105202	1.338 önemsiz
$\bar{Y}-\bar{Y}$ (Toplam)	13	111752	

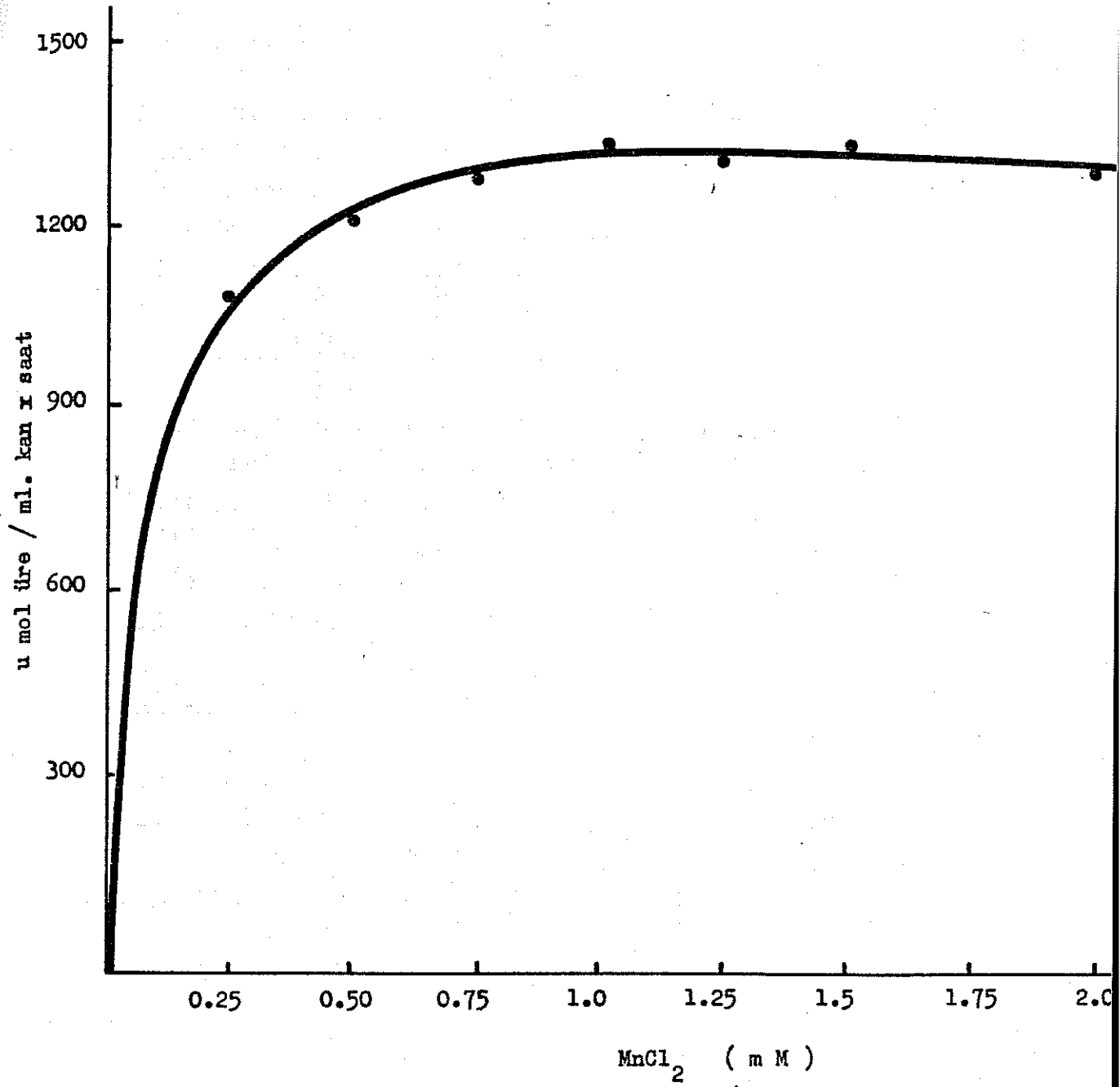
Tablo 3. Pre-inkübasyon sıcaklığının saptanması

Örnek numarası	Sıcaklık(°C)	Arginaz aktivitesi umolüre/ml.kan.saatt
1	-	93,60 ± 13.23
2	37	1366,56 ± 105.89
3	45	1375,92 ± 6.62
4	50	1099,80 ± 135.68
5	55	1235,52 ± 66.19

Deney koşulları Tablo 1'dekinden farklı olarak pre-inkübasyon sıcaklığı farklı tutuldu. Her örnek 4'er kez yinelandı.

3.4 MnCl₂'ün Etkisi:

Arginaz enziminin kofaktörü olarak Mn katyonuna gerek duyduğu bilinmektedir. Bu nedenle koyun eritrositi arginazında Mn katyonlarına karşı olan ilgisi araştırılmış ve Şekil 1'de görüldüğü üzere enzimin maksimum aktiviteyi göstermesi için Mn⁺⁺ katyonlarına gerek duyduğu saptanmıştır. 0,75mM MnCl₂ derişiminde enzim en yüksek aktivite düzeyine ulaşmıştır. Araştırma süresince enzimatik sistemin MnCl₂ derişimi 1mM. olarak tutulmuştur.



Şekil.1 $MnCl_2$ 'ün Arginaz aktivitesine etkisi.

3.5 İnkübasyon Süresi:

En uygun inkübasyon süresinin saptanması amacı ile enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen ürünün zamana bağlı olarak sentezi incelendi. 20 dakika boyunca enzimatik reaksiyon birinci merteye (first order) kinetiğine uymakta, bundan sonra doğrusallıktan (linearity) uzaklaşmaktadır (Şekil 2). Bu nedenle 15 dakikalık inkübasyon süresi optimal süre olarak kabul edilmiştir.

3.6 Enzimin Arginine Karşı Olan Duyarlılığı:

Enzimin substratına karşı olan ilgisini saptamak amacıyla, arginazın değişik arginin derişimlerine bağlı olarak aktivitesi incelenmiş (Şekil 3) ve sonuç Lineweaver-Burk (33) yöntemi ile değerlendirilerek K_m 'i saptamıştır. Şekil 4'de görüldüğü üzere enzimin L-arginine karşı olan K_m 'i 4.34 mM olarak bulmuştur.

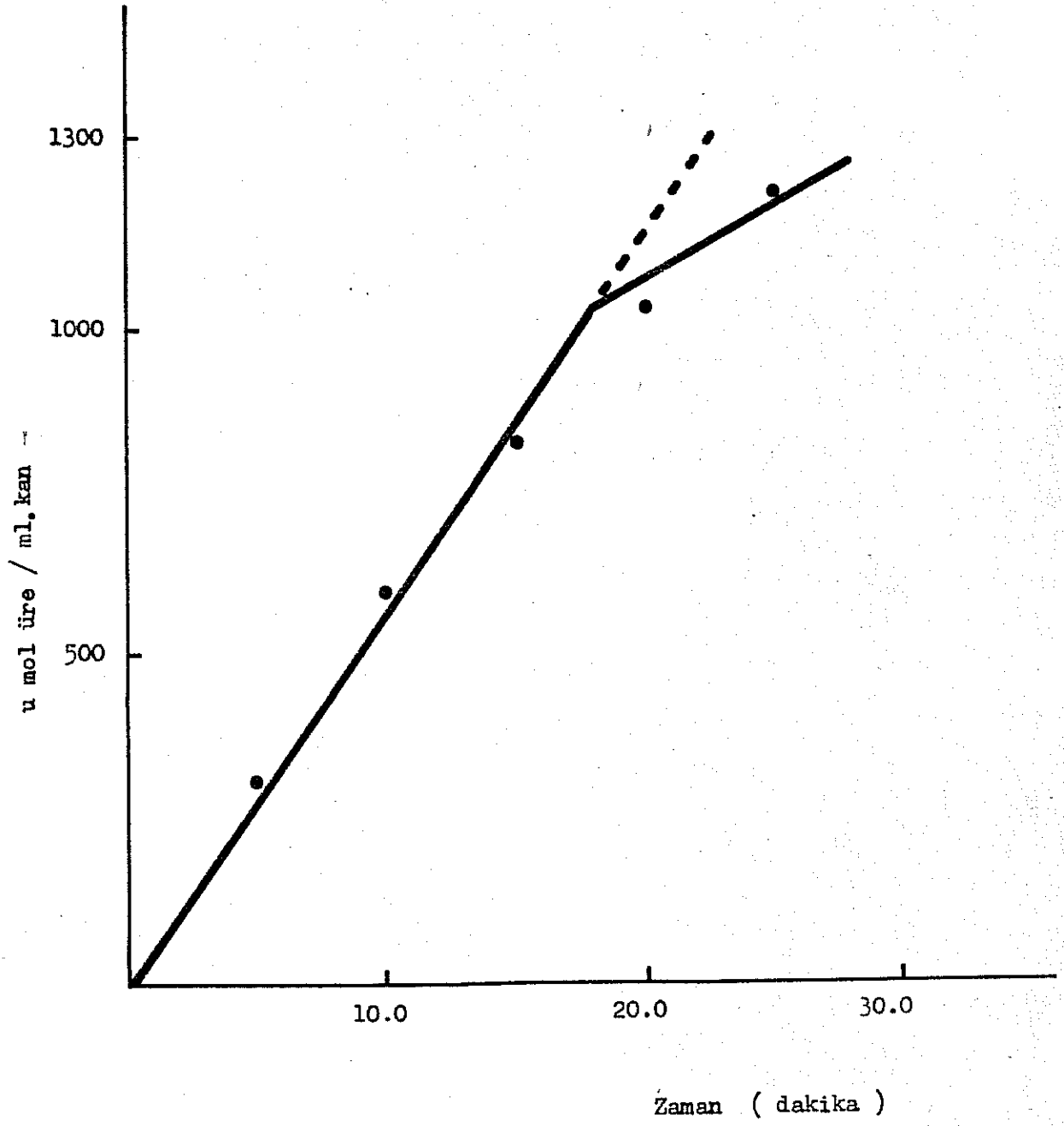
3.7 pH'nin Etkisi:

Arginazın optimal pH'sı enzimin değişik pH'larda gösterdiği aktiviteler sonucu saptandı. Şekil 5'de görüldüğü üzere optimal pH bazik sınırlar içinde olup 10,5'dur. pH eğrisi simetrik olmayıp, asimetric görünüm vermektedir.

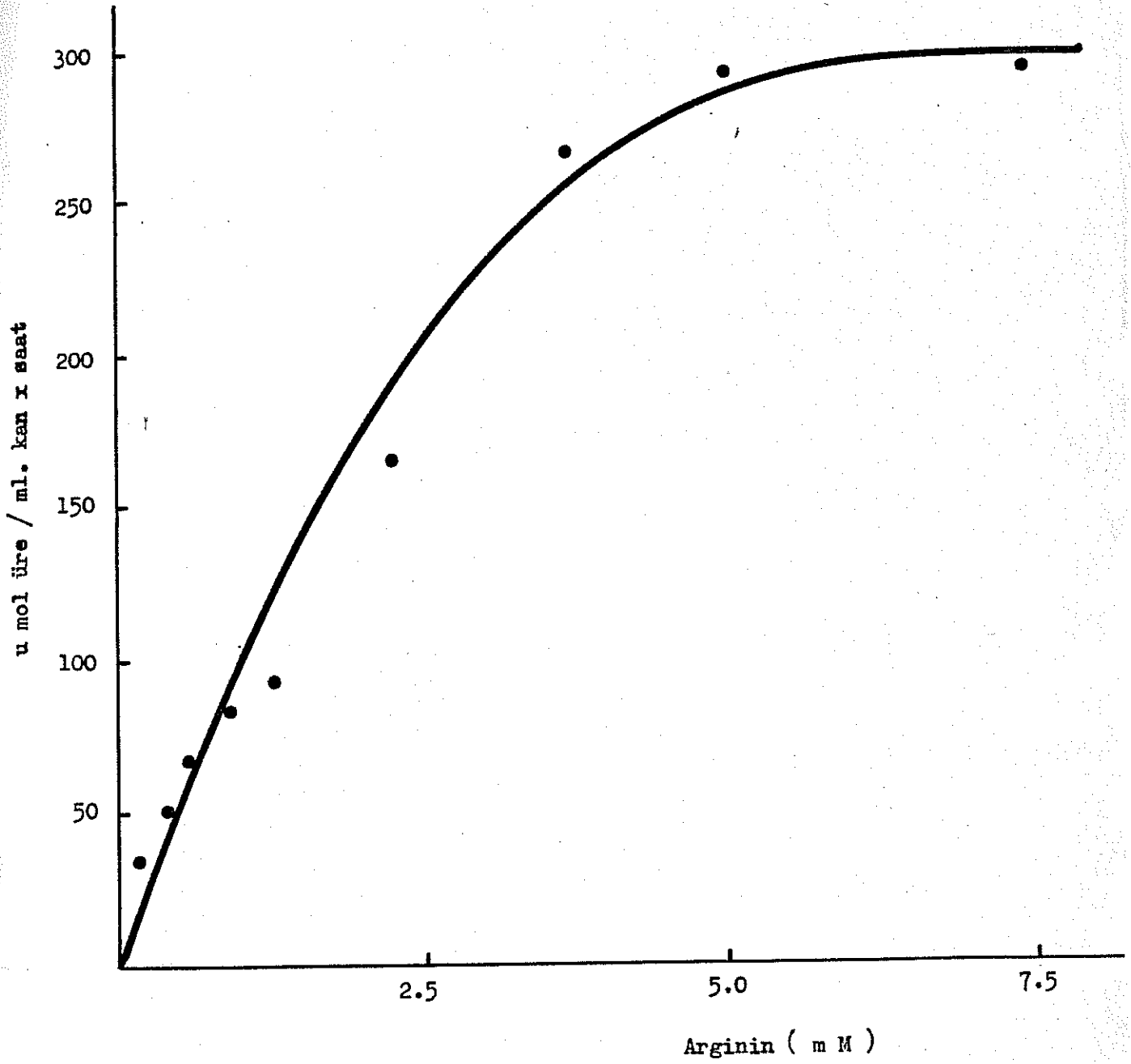
Argininin PK_a 'sı 10.7 olduğundan pH 10.5'da, arginin tampon özelliğine sahiptir. Metodu basitleştirmek amacı ile başka tampon kullanılmasına gerek kalmamaktadır. Tampon kullanılmamasının enzimatik aktiviteyi etkilemediği gözlenmiştir.

3.8 Dağlıc Koyunlarda Yaşın Arginaz Aktivitesine Etkisi:

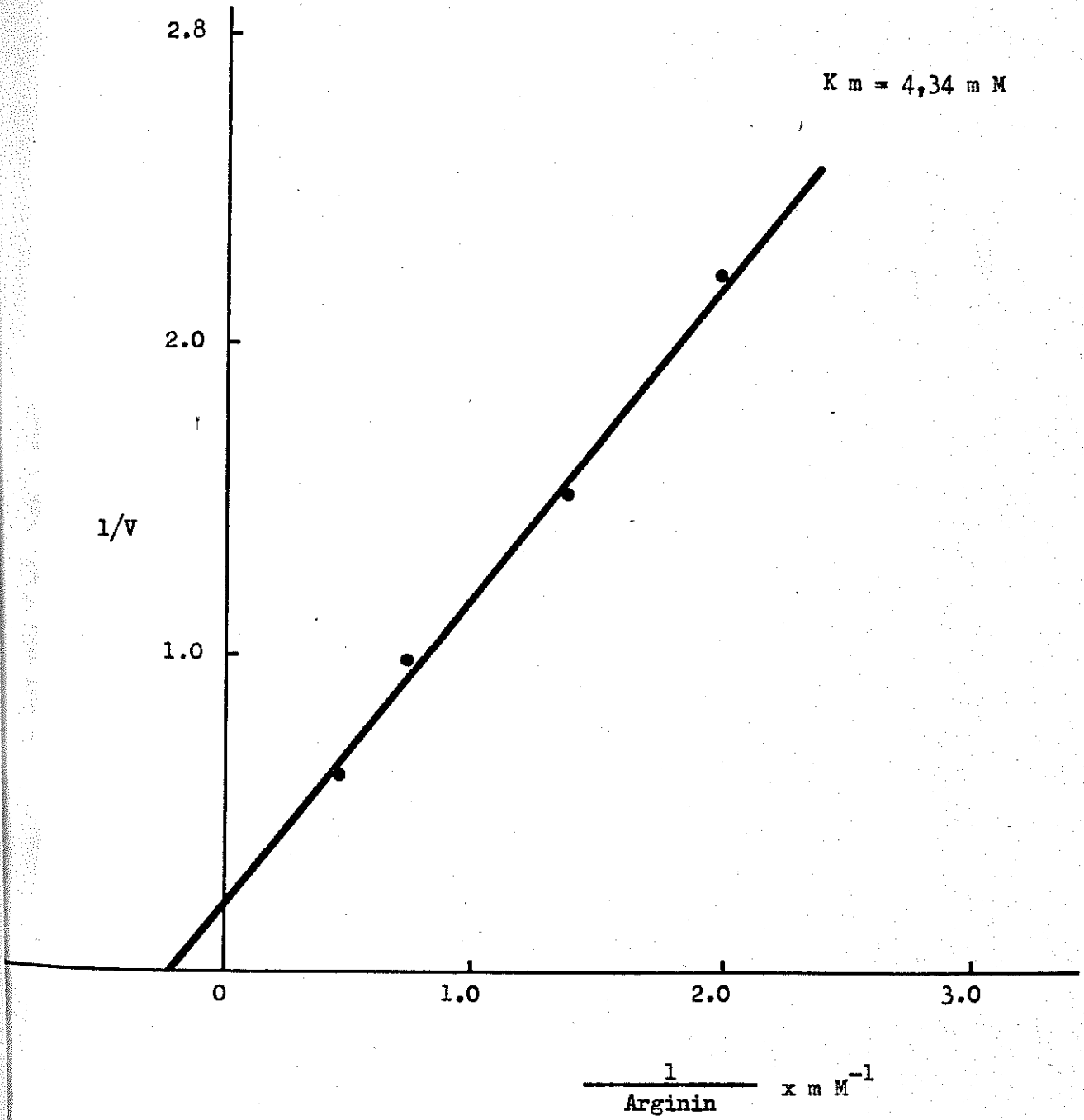
Değişik yaş gruplarındaki dağlıcın kanındaki arginaz aktivitelerine bakılmış ve Tablo 4'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. 2,3, ve 4 yaşlardaki dağlıcın eritrosit arginaz aktivitelerinin farklı olup olmadığı yapılan varyans analizi ile saptanmıştır. Tablo 5'de de görüleceği



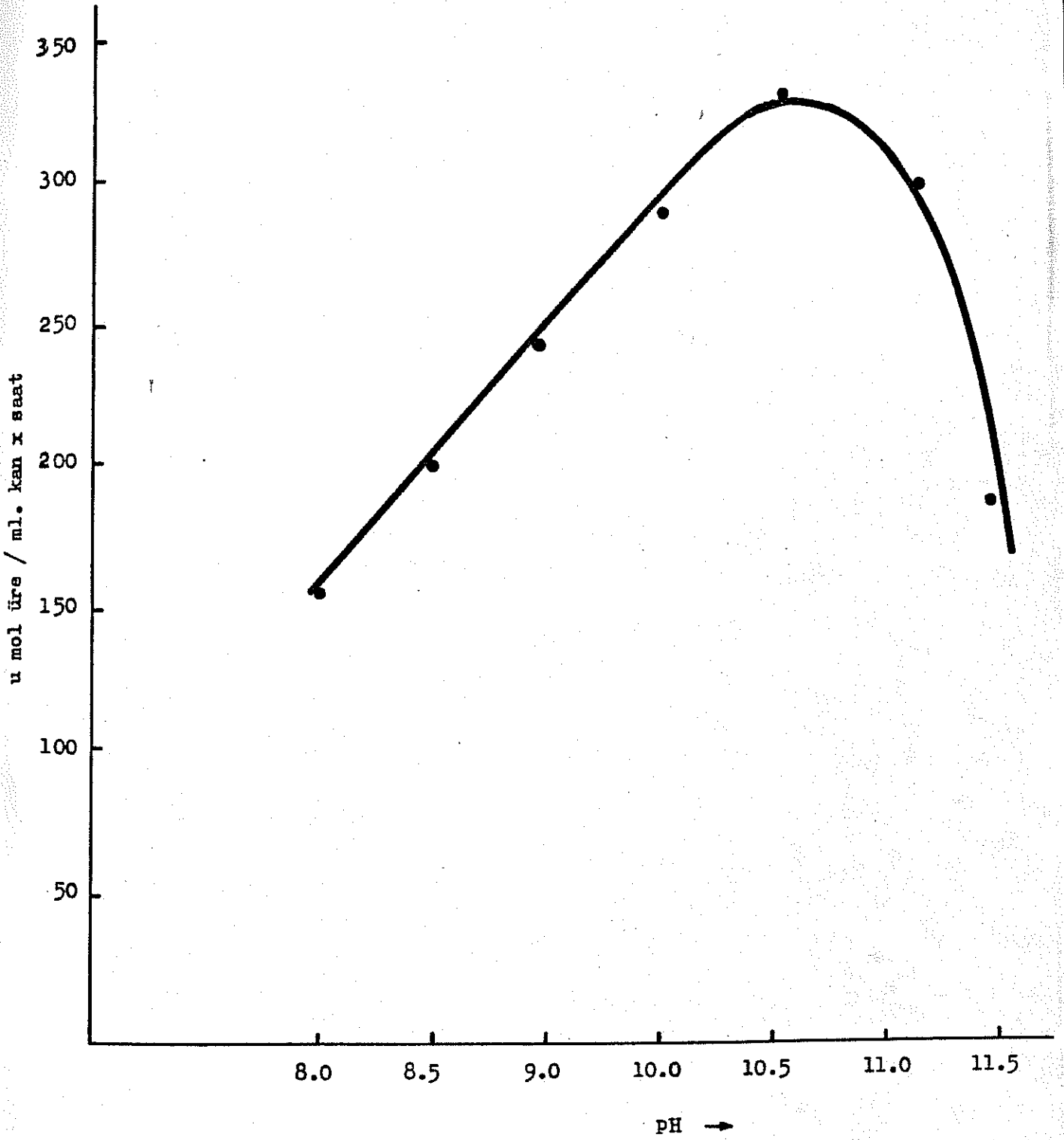
Şekil.2 İnkübasyon süresinin saptanması



Şekil. 3 Arginaz aktivitesinin arginin miktarına bağlı olarak değişimi.



Şekil.4 Arginazın L-arginine özgü K_m 'inin Lineweaver-Burk yöntemi ile bulunması.



Şekil.5 Arginaz aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.

gibi varyans analizi önemlilik taşımaktadır. Buradan sonuç olarak dağlıç koyunlarda yaş'ın bir etken olduğunu söyleyebiliriz.

3.9 Rambouillet Koyunlarda Yaşın Arginaz Aktivitesine Etkisi:

Dört yaş grubunda bakılan aktivitelerde dağlıçların tersine, farklılık görülmemiştir. Tablo 6'daki sonuçların farklılık gösterip göstermediği konusunda ise Tablo 7'deki varyans analizi ile saptanmıştır. Buradanda görüleceği gibi Rambouillet koyunlarda yaşın arginaz aktivitesindeki etkisi önem taşımamaktadır.

3.10 İrk Faktörünün Koyun Eritrosit-Arginaz Aktivitesine Etkisi:

Bu amaç için, dağlıç, rambouillet ve akkaraman ırklarının eritrosit arginaz aktivitesine bakılmış ve Tablo 8'deki sonuçlar elde edilmiştir. Bundan da görüleceği gibi, değişik ırklarda eritrosit arginaz aktivitesi oldukça önem taşımaktadır. Bunun böyle olduğu Tablo 9'daki varyans analizi ile kanıtlanmıştır.

3.11 Dağlıç, Rambouillet, Melez Kuzulardaki Arginaz Dağılımı:

Koyunlardaki eritrosit-arginaz aktivitelerinin dağılımının incelenmesi önemli farklılık göstermesi üzerine (Tablo 8,9) aynı sonucun kuzularda da bulunması gözönüne alınarak ırkların kuzularındaki eritrosit-arginaz aktivitesi ölçüldü. Tablo 10'da da görüleceği gibi ırklar arasında belirgin bir fark sözkonusudur. Bu farkın önemliliği Tablo 11'deki varyans analizi ile vurgulanmıştır.

3.12 Mevsimlerin Arginaz Aktivitesine Etkisi:

Değişik zaman aralıklarında, koşulların elverdiğince, her üç ırktan numuneler alınarak mevsim etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Buna göre dağlıçlarda kış ve yazın alınan

Tablo 4. Dağlıç koyunların eritrositlerindeki arginaz aktivitesinin yaşı göre dağılımı.

Yaş	Örnek sayısı	Arginaz aktivitesi umölüre/ml.kan.saatt
2	35	711.32 ± 26.63
3	33	600.66 ± 36.79
4	31	701.32 ± 43.00

Deney koşulları, Şekil 2'dekinin aynısıdır.

Tablo 5. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri	Ola- sılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	2	349474.202	4.05	p < 0.05
y- \bar{Y}	96	4156866.55		
<u>Toplam</u> y- \bar{Y}	98			

Tablo 6. Rambouillet koyunlarda arginazın yaşı göre dağılımı.

Yaş	Örnek sayısı	Arginaz aktivitesi umölüre/ml.kan.saatt
1	9	290.12 ± 68.37
2	12	219.75 ± 56.28
3	12	216.83 ± 36.54
4	9	297.67 ± 65.53

Deney koşulları Tablo 4'tekinin aynısıdır.

Tablo 7. Varyans Analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	3	44255.11	0.231	Önemsiz
$Y-\bar{Y}$	38	1574825.47		
Toplam $Y-\bar{Y}$	41			

Tablo 8. Dağlıç, Rambuillet, Akkaraman koyunlarının eritrositlerindeki arginaz aktivitesi.

İrk	Numune sayısı	Arginaz aktivitesi umolüre/ml.kan.saatt
Akkaraman	51	966.37 ± 39.56
Dağlıç	99	666.86 ± 21.49
Rambuillet	43	254.86 ± 27.52

Deneş koşulları Tablo 6'dakinin aynisidir.

Tablo 9. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	2	111638759.93	122.02	$p < 0.05$
$Y-\bar{Y}$	190	9013503.97		
Toplam $Y-\bar{Y}$	192			

numunelerdeki eritrosit arginaz aktiviteleri Tablo 12'de görüleceği gibi farklılık göstermektedir. Bu sonuç Tablo 13'teki varyans analizde de kanıtlanmıştır.

Tablo 14'teki sonuçlara bakıldığında ise Rambouilletlerde ilkbahar ve yaz aylarında alınan kan numunelerindeki eritrosit-arginaz aktivitesindeki farklılığın önem taşımadığı Tablo 15'teki varyans analizi ile de doğrulanmaktadır.

Akkaraman'lardan alınan numunelerde ise dağlıçlardakine benzer durum gözlenmiştir. Sonbahar ve kış olmak üzere iki mevsimde alınan örneklerin Tablo 16'daki sonuçlarındaki farklılığın önem taşıdığı, Tablo 17'deki varyans analizinde de görülmektedir.

Tablo 10. Dağlıç, Rambouillet, Melez kuzulardaki eritrosit-arginaz dağılımı.

Cins	Numune sayısı	Arginaz aktivitesi umolüre/ml.kan.saat
Dağlıç	45	697.70 ± 27.21
Rambouillet	17	171.17 ± 16.86
Melez	31	439.57 ± 55.08

Deney koşulları, Tablo 8'dekinin aynidir.

Tablo 11. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	2	368813.13	59.5	$p < 0.001$
$Y-\bar{Y}$	90	2759238.49		
Toplam				
$Y-\bar{Y}$	92			

Tablo 12. Dağlıçlarda mevsimlerin eritrosit-arginaz aktivitesine etkisi.

Mevsim	Numune sayısı	Arginaz aktivitesi
Kış	69	467.06 ± 17.74
Yaz	99	666.86 ± 21.49

Deney koşulları Tablo 10'da söz edildiği gibidir.

Tablo 13. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	1	10529408.37	318.93	p < 0.001
Y- \bar{Y}	166	5593959.13		
Toplam Y- \bar{Y}	167			

Tablo 14. Rambouillet koyunların eritrosit-arginaz aktivitelerine mevsimlerin etkisi.

Mevsim	Numune sayısı	Arginaz aktivitesi
İlkbahar	59	216.13 ± 20.85
Yaz	42	244.00 ± 27.61

Deney koşulları Tablo 12'de söz edildiği gibidir.

Tablo 15. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	1	19049	0.73508	Önemsiz
Y- \bar{Y}	99	2565486		
Toplam Y- \bar{Y}	100			

Tablo 16. Akkaraman koyunların eritrosit-arginaz aktivite-
lerine mevsimlerin etkisi.

Mevsim	Numune sayısı	Arginaz aktivitesi
Sonbahar	51	979.94 ± 55.38
Kış	41	532.73 ± 16.73

Deney koşulları Tablo 14'tekinin aynisidir.

Tablo 17. Varyans analizi.

Değişkenlik kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F değeri	Olasılık
$\bar{Y}-\bar{Y}$	1	4545721.3	112	$p < 0.001$
$y-\bar{Y}$	90	3649790.7		
Toplam				
$Y-\bar{Y}$	91			

3.13 Eritrosit-Arginaz Aktivitesinin Yapağı Verimi İle İlgisinin Saptanması:

Bir populasyon örneğinde bulunan iki değişken arasındaki ilişkinin saptanmasının en uygun yollarından biri de korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır. Bu düşünceden hareket ederek arginaz-aktivitesi ile yapağı verimi arasında ilişkinin olup olmadığı, korelasyon katsayısı hesaplanarak yapılmıştır. Tablo 18'de görüleceği gibi "r" değerlerinin yapılan önemlilik testlerinde, önemsiz çıktıkları görülmektedir. Buradan da nul hipotezi ($H_0: \rho = 0$) kanıtlanmaktadır. Daha doğrusu bu populasyon örneğindeki iki değişkenin, arginaz aktivitesi ve yapağı verimi, arasındaki ilgi sıfır olarak gözükmektedir. Bu sonuçtan, doğrusal bir ilişkinin olmadığını söyleyebiliriz.

Tablo 18. Koyunların arginaz aktivitesinin yapağı verimi ile ilgisi.

Koyun ırkı	Yaşı	Korelasyon katsayısı	Olasılık
Dağlıç	2	0.4793	Önemsiz
Dağlıç	3	-0.1698	Önemsiz
Dağlıç	4	-0.2445	Önemsiz
Rambouillet	2	-0.1507	Önemsiz
Rambouillet	3	-0.2443	Önemsiz
Rambouillet	4	-0.2918	Önemsiz
Akkaraman	-	-0.1980	Önemsiz
Melezler	-	0.0370	Önemsiz
Dağlıç kuzu (erkek)		-0.0546	Önemsiz
Dağlıç kuzu (dişi)		-0.0534	Önemsiz
Rambouillet (kuzu)		-0.2838	Önemsiz

IV- TARTIŞMA

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde en önemli sorun bu konuda başvurulacak kaynak sayısının çok az denecek düzeyde olmasıdır. Sonuçların yorumu genel biyokimya açısından yapıldığı zaman spekülasyona neden olmaktadır. Elde ettiğimiz veriler bundan sonraki araştırmalar için bir başlangıç veya çıkış noktası sayılacaktır.

Daha önceki bölümlerde vurgulandığı gibi eritrositlerde arginaz aktivitesinin ölçümü için deney koşulları çok basite indirgenmiş ve zootekni alanında çalışan uygulayıcıların zorluk çekmeden kullanabilecekleri bir yöntem haline getirilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü üzere enzim tamamen eritrositlerde lokalize olmuş ve serumda belirgin düzeyde bir aktivite saptanamamıştır. Genellikle serumda enzim aktivitesinin görülmesi bir doku tahribatının belirtisi olarak kabul edilmektedir. Örneğin deri yanıklarında serumda arginaz aktivitesinin görüldüğü belirtilmektedir (34).

Bu durumu veteriner klinik hekimliği açısından bir teşhis yöntemi olarak kullanılabilme olanağı ortaya çıkmaktadır. Örneğin Piroplazmoz, gibi eritrosit parçalanmasına neden olan durumlarda, serumda arginaz aktivitesinin varlığının saptanması eritrosit yıkımının bir belirtisi olarak kanıtlanabilir. Bu konuda bir çalışmanın A.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kürsüsü ile müştereken yürütülmesi tarafımızdan planlanmıştır.

Eritrositlerde arginaz aktivitesinin ölçümü için çok iyi donanmış bir laboratuvarada gerek kalmamaktadır. Isısı ayarlanabilen bir su banyosu, küçük bir klinik santrifüjü ve basit bir kolorimetre veya spektrofotometre ile ölçümler gerçekleştirilebilir.

Enzimin karakteri incelenirken göze çarpan en önemli özellik, enzimin substratı olan arginine karşı gösterdiği duyarlılıktır (Şekil 5).

Eritrositler üreotelik hücreler olmamasına rağmen üreotelik tipteki arginazlar düzeyinde düşük, 4.3mM, bir Km'e göstermiştir.

Araştırma süresinde eritrositlerdeki arginaz aktivitesinin yaşa bağlı olarak değişimi incelendiği zaman yaşın etkisinin sadece dağlıçlarda belirgin olduğu (Tablo 4 ve 5), fakat rambouillet'lerdeki farklılığın belirgin olmadığı (Tablo 6 ve 7) saptanmıştır. Her ne kadar varyans analizleri sonuçları; dağlıçlarda yaşın bir etken olduğunu belirtmekte isede, üç yaşlı koyunlarda %18 oranında bir düşmenin görülmesi, fakat dört yaşlılarda tekrar iki yaşlıların düzeyine çıkması, yaşın enzim aktivitesine olan etkisine tam açıklık getirememektedir. Rambouillet'lerdeki farklılığın istatistiksel bakımdan anlamlı olmayışı örnek azlığından ileri gelmiş olabilir. Dağlıçlardaki anlamlı farklılığın nedenlerini araştırmanın bu aşamasında açıklamamız olanağı yoktur.

Her iki tablo (Tablo 4 ve 6) incelenirse görülür ki; eritrositlerde arginaz aktivitesi ırklar arasında farklılık göstermektedir. Irklar arasındaki farklılık bütün bireyler göz önüne alındığı zaman daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Eritrositlerdeki arginaz aktivitelerinin, ırklar arasındaki farklılığı daha genişletilmiş populasyonlarda incelendiği zaman gene aynı sonuçlar alınmıştır (Tablo 8,9). Akkaraman koyunlarının eritrositlerindeki enzim aktivitesi sırası ile dağlıç ve rambouilletlerden daha yüksek bulunmuştur.

Irklar arasındaki çok belirgin farklılık sadece koyunlara özgü değildir ve bu belirgin farklılık kuzularda da saptanmaktadır. Örneğin (Tablo 10,11) Dağlıç ve Rambouillet kuzular karşılaştırıldıklarında dağlıçların eritrositlerindeki enzim aktivitesi Rambouillet'lerden çok daha etkin bulunurken Dağlıç-Rambouillet F₁ melezleri (Ramlıç) iki grup arasında yer almaktadır.

Enzim aktivitesi bütün ırklarda mevsime bağlı olarak

değişmekte ve kış aylarında aktivitenin düzeyi düşmektedir. (Tablo 12, 14, 16). Kış aylarında enzim aktivitesinin azalması yemleme rasyonuna veya gebeliğe bağlanabilir. Koç sayısının azalması nedeni ile mevsimlere bağlı farklılığın rasyon veya gebelik sonucu ortaya çıktığı kesinlikle açıklanamamıştır. Eritrositlerdeki arginaz aktivitesinin bağlı olarak değişiminin önemi ; Araştırmanın başlangıcında ortaya konulan veya cevaplandırılması gereken sorun değişik ırklar oranındaki enzimatik aktivite farklılığının biyokimyasal önemi ve bu önemin zootekni açısından değerlendirilmesi idi.

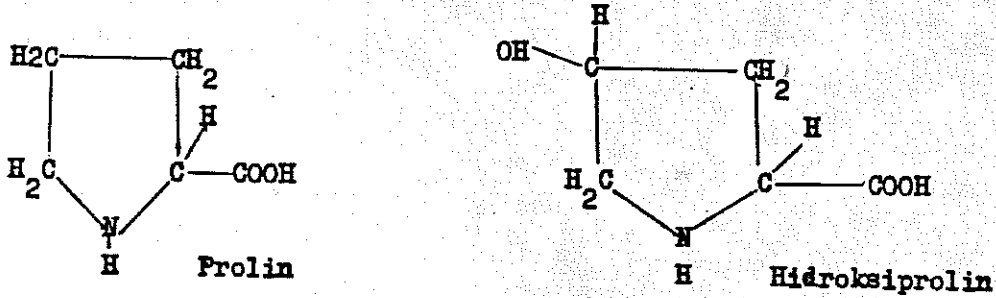
Enzimatik aktivitenin ırklar arasında gösterdiği farklılığın yapağı verimi ile olan ilişkisi incelendiği zaman (Tablo 18), farklılığın yapağı verimini etkileyen bir faktör olduğu kesin olarak ortaya konulamamıştır. Bu savımızı hesaplanan korelasyon katsayılarının testlerinin önemsiz çıkması doğrulamıştır.

Yapağı verimlerinin enzimatik aktivite ile ilişkili veya böyle bir olasılığın önemli olmaması, sonuçların daha değişik açıdan yorumlanmasını gerektirmiştir. Bu yorumlamadan önce bir α -keratin olan yünün moleküler düzeydeki yapısına kısaca değinilmesinin yararlı olacağı kanısındayız. Yün de diğer proteinler gibi 20 tane amino asitin saralanması sonucu meydana gelir. Bu amino asitler evvela helosoni (helix) polipeptid halkaları halinde birleşerek makro moleküllerini teşkil ederler. Makromoleküllerin birleşmesiyle protofibriller ve bunların birleşmesiyle mikrofiloriller, mikrofibrillerde birleşerek fibrilleri oluştururlar. Bu fibrillerde birleşmek suretiyle korteks hücrelerini meydana getirirler.(36). Korteks tabakası, korteks hücrelerinden yapılmıştır ve yapağının esas bünyesini teşkil edip, elyafın önemli fiziksel özelliklerini tayin eder.

Fibriller uzunluklarının iki misli kadar kopmadan uzayabilirler. Bu durum yapağının elastikiyetini izah eder.(37).

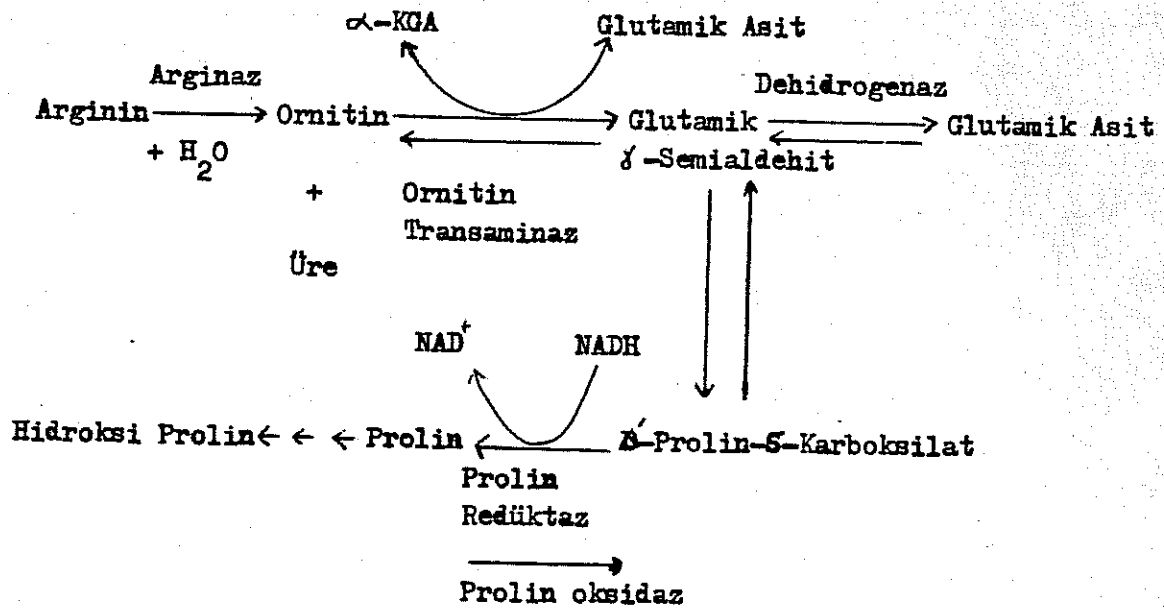
Amino asitlerin meydana getirdiği helosoni peptid halkalarının yapısı peptid halkasını meydana getiren amino asit-

lerin R gruplarının özelliğine bağlıdır. Bu grupların özelliği ile, α -keratin (yapağı) peptid zinciri içinde hidrojen bağları teşkil ederek helezoni yapısını kazanır ve elastikiyet sağlanır.



Prolin ve hidroksiprolin imino asitler olup diğer amino asitlerle birleşip peptid zincirlerini meydana getirdikleri zaman, imino gruplarından dolayı diğer amino asitlerin karboksil veya R grupları ile hidrojen bağları teşkil edemezler ve α -helezon (helix) yapısını önemli düzeyde değiştirirler. (38)

Daha önceki, bölümlerde değinildiği üzere üre sentez edemeyen dokularda veya organizmalarda arginazın prolin ve hidroksiprolin sentezinde rol oynayabileceği belirtilmişti.



Ornitinin Proline Dönüşümü (39)

Yukarıda gösterilen Prolin sentez yolunda ornitin prolin sentez yolunun bazında bulunmaktadır. Araştırma sonuçlarını, eritrositlerin arginaz aktiviteleri ile yapığının kalitesinde rol oynayan esneklik ve mukavemet arasındaki ilişkiyi prolin ve hidroksprolin düzeyi açısından değerlendirmek olanacağı varmıdır ?

Sorunun cevabı, araştırmanın bu aşamasında, ancak spekülasyon olabilir.

Araştırmada kullanılan koyunlar akkaraman, dağlıç, dağlıçxRambouillet melezleri ve Rambouillet ırkları olup, bu ırkların yapığı kaliteleri farklılık göstermektedirler. Bilindiği gibi akkaraman ve dağlıç yapığıdan kaba yapığı sınıfı içinde olup Tekstil sanayi tarafından değerli sayılmaktadır. İnce sınıf yapığı grubunda yer alan Rambouillet yapığıları ise değerli sayılmaktadır.

Yapağıların değerlendirilmesinde, incelik (elyaf çapı), lüle uzunluğu ve dolayısıyla buna bağlı olarak kıvrım (krimp, ondülasyon) önemli rol oynamaktadır (40). Aşağıdaki tablo (Tablo 19) da Çifteler harası koyunlarının yapığı özellikleri belirtilmektedir. Tablodaki görüldüğü üzere Dağlıçlarda elyaf çapı küçülmekte ve lüle uzunluğuda azalmaktadır. Rambouilletler de ise elyaf çapı daha küçük ve aynı şekilde lüle uzunluğuda kısadır. Bu vasıflara göre kıvrım miktarının da paralel olarak artması gerekmektedir. Zira lüle uzunluğunun kısalığına neden olarak kıvrım miktarının arttığı bilinmektedir. Lüle uzunluğu ile kıvrım miktarı arasında ters bir orantının varlığı her zaman söz konusudur (40).

Akkaramanların yapığı kaliteleri hakkında sağlam ve güvenilir kayıtlara rastlanamamıştır.

Kıvrım miktarı ve diğer özelliklerin yapığının amino asit kompozisyonu ile olan ilişkisi hakkında henüz yeterli bilgilere sahip değiliz. Eritrositlerdeki arginaz aktivitesinin yüksek olması nedeni ile argininin daha fazla parçalanıp prolin düzeyinin artması, α -heliks yapısına tesir

Tablo 19 :

Çifteler harasındaki dağlıç, Rambouillet ve Ramlıç koyunlarının yapıları özellikleri

Yıl	Örnek Sayım	Elyaf Çapı (mikron)	Lüle Uzunluğu (cm)	Mutlak Mukavemet (Gr)	Elastikiyet (%)	Genotip Grubu
1975	99	27.34	11.74	26.26	38.08	Dağlıç
1977	80	27.88	15.96	30.02	44.39	Dağlıç
	136	22.24	8.18	8.11	39.01	Ramlıç
	11	21.20	7.31	6.09	41.22	Rambouillet
1978	74	26.00	13.01	14.06	44.09	Dağlıç
	119	21.00	8.35	6.90	41.34	Ramlıç
1979	71	27.56	13.36	13.88	47.13	Dağlıç
	155	20.81	6.08	6.68	42.37	Ramlıç
	8	19.38	6.77	5.27	39.81	Rambouillet
1980	50	27.58	16.22	-	-	Dağlıç
	150	20.66	8.93	-	-	Ramlıç
	15	19.07	7.80	-	-	Rambouillet

Çifteler Harası Koyunculuk Şubesi Şefi Uzm.Vet.Hek.Şükrü Ayabakan'dan sağlanmıştır.

ederek yapağının kompozisyonunun değiştirilme olasılığının araştırılması gerekir. α -heliks teki amino asit kompozisyonu genetik olarak daha önceden tesbit edildiğinden bu genetik özelliğin ortaya çıkarılması için (Gene expression) biyokimyasal ortamın hazır olması gerekir. Bu ortamın hazırlanması için gerekli prolin düzeyinin sağlanmasında eritrosit kökenli arginaz nekadar etkin rol oynayabilir sorusuna bu araştırma bir basamak veya çıkış noktası olmaktadır.

Araştırmanın bu aşamasından sonra varsayımların geçerliliğini saptamak amacı ile;

- a- Araştırmada kullanılan koyun ırklarından elde edilen yapağuların amino asit kompozisyonlarının tesbiti,
- b- Kanda prolin düzeylerinin ölçülmesi
- c- Eritrositlerdeki arginaz aktivitelerine paralel olarak deride arginaz aktivitelerinin belirlenmesinin gerektiği kanısındayız.

Sonuç : Değişik dört koyun ırkının eritrositlerindeki arginaz aktiviteleri yapağuların kaliteleri ile ters orantılı düzeyde bulunmaktadır. Bu farklılık tamamen koyun ırklarına özgü olup, diğer faktörler tarafından (cinsiyet, yaş, rasyon, mevsim) etkilenme, farklılık sınırlarını değiştirememektedir.

Eritrositlerdeki arginaz aktivitelerinde yapağı kaliteleri arasındaki olumsuz ilişkinin biyokimyasal açıdan izahı araştırmanın bu safhasında yapılamamaktadır.

V - KAYNAKLAR

- 1 - Stryer , L. (1981)
Biochemistry 2nd Edition page 412 .
W.H. Freeman and Company . San Fransisco
- 2 - Yip,M.C , and Knox ,W.E. (1972)
Function of arginase in lactating mammary gland.
Biochem. J. 127 , 893
- 3 - Edwards E.M., Rattenburg , J.M., Varnam ,G.C.E.,
Dhand,U.K., Jeacock,M.K., and Sepherd,D.A.L.(1977)
Enzymes activities in the sheep placenta during
the last three months of pregnancy .
Biochim.Biophys.Acta. 497 , 133
- 4 - Stewart,J.A., and Coron,H. (1977)
Arginases of mouse brain and liver .
J.Neurochem. 29 , 657
- 5- Tamir,H. and Ratner,S. (1963)
Enzymes of arginin metabolism in chick .
Arch.Biochim. Biophys. 102 , 249
- 6 - Tamir,H. and Ratner,S. (1963)
A Study of ornithine, citrulline and arginine synthesis
in growing chick .
Arch.Biochim.Biophys. 102 , 259
- 7 - Kadowaki,H., and Mesheim,I.C. (1978)
Purification and properties of chick kidney arginase.
Comp.Biochem.Physiol. 61 , 281
- 8 - Campbell,J.# (1963)
Urea formation and urea cycle enzymes in the cestode :
Hymenolepis diminata .
Comp.Biochem.Physiol. 8 , 13
- 9 - 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

- 10 - Tao, I., and Huang, T.Y. (1965)
Studies on arginase of Schistosoma japonicum
Scientia Sin. 14 , 417
- 11- Gülen, Ş. (1979)
The Properties and the regulation of arginase in
Fasciola hepatica
FEBS Special Meeting on Enzymes .
Dubrownik , Cavtat S - 4 , 23 Yugoslavia
- 12 - Frigueiredo , E.N., Yoshida, N. , Roitman, C. and
Camargo, E.P. (1978)
Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of
Trypanosomatids of the Genus Crithidia .
J. Protozool. 25 , 546
- 13 - Yoshida, N., Jankevicius, J.V., Roitman, I.,
and Camargo, E.P. (1978)
Enzymes of the ornithine-arginine cycle of Trypanosomatids
of the genus Herpetomonas
J. Protozool. 25 , 550
- 14 - Messenguy, F., Pennick, M., and Wiame, J.M. (1971)
Interaction between arginase and ornithine carbamoyl-
transferase in Saccharomyces cerevisiae
Europe. J. Biochem. 22 , 277
- 15 - Bowman, B.J. and Davis, R.H. (1977)
Arginine catabolism in Neurospora : Cycling of ornithine
J. Bacteriol. 130 , 285
- 16 - Gülen, Ş. (1981)
Koyun karaciğeri arginazının arıtılması ve enzimin
özellikleri .
Doçentlik Tezi , O.D.T.Ü. - Ankara Sayfa 72
- 17 - Remeser, Y., Arola, L.L. , Palon, A. and Alemany, M. (1980)
Arginase activity in the organs of fed and 24-hour fasted
rats .
Hor. Metab. Res. 12 , 281
- 18 - Herzfeld, A., and Raper, S.M. (1976)
The heterogeneity of arginase in rat tissues.
Biochem. J. 155 , 469

- 19 - Owzarczyk, B. and Barej, W. (1975)
The Different activities of arginase, arginine synthetase, ornithine transcarbamoylase and ornithine transaminase in the livers and blood cells of some farm animals .
Comp. Biochem. Physiol. 50 , 555
- 20 - Campbell, J.W. (1965)
Arginine and urea biosynthesis in the land planarian :
Its significance in biochemical evolution .
Nature 208 , 1299
- 21 - Kurelec, B. (1975)
Molecular biology of helminth parasites .
The Int. J. Biochem. 6 , 375
- 22 - Cederbaum, S.D., Shaw, K.N.F., Spector, E.B.,
Verity, M.A., Snodgrass, P.I., and Sugarman, G.I. (1979)
Hyperarginemia with arginase deficiency
Ped. Res. 13 , 827
- 23 - Spector, E.B., Kiernan, M., Bernard, B., and
Cederbaum, S.D. (1980)
Properties of fetal and adult red blood cell arginase :
A possible prenatal diagnostic test for arginase
deficiency .
Am. J. Hum. Genet. 32 , 79
- 24 - Synderman, S.E., Sansaricq, C., Chen, W.J., Morton, P., and
Phansalkar, S.V. (1977)
Arginemia
J. Pediat. 90 , 563
- 25 - Michels, V.U., and Beaudet, N. (1978)
Arginase deficiency in multiple tissues and in arginemia.
Clin. Genet. 13 , 61
- 26 - Terheggen, H.G., Lavinha, F., Colombo, J.P., Van Sande, H.,
and Loventhal, A. (1972)
Familial Hyperarginemia
J. Génét. Hum. 20 , 69
- 27 - Frimpter, G.W. (1973)
Aminoacidurias due to inherited disorders of metabolism.
New. Engl. J. Med. 289 , 835
- 28 - Wright, P.C., Young, J.D., Mangan, J.L., and Tucker, E.M.
(1977) , An Inherited arginase deficiency in sheep

- erythrocytes .
J. Agric.Scienc. 88 , 765
- 29 - Erskine,A.G. (1973)
The Principles and practice of blood grouping
The C.V.Mosby Co. St.Louis. page : 199
- 30 - Schimke,R.T. (1970)
Methods in enzymology . Vol 17-A , page: 313
Edited by Tabor,H. and Tabor C.W.
Academic Press New York .
- 31 - Sokol,R.R. and Rohlf,F.J. (1969)
Biometry .
W.H.Freeman . San Fransisco .
- 32 - Gülen, Ş. (1981)
Koyun karaciğeri arginazının arıtılması ve enzimin özellikleri .
Doçentlik tezi . O.D.T.Ü. Sayfa : 46
- 33 - Lehninger,A.L. (1975)
Biochemistry
Worth Publishers Inc. New York . Page : 195
- 34) Farooqui,J.Z. , and Sexama,K.C. (1978)
Purification and properties of guinea pig liver arginase.
Ind.J.Biochem.Biophys. 15 , 200
- 35 - Colombo,J.P., Bürgi,W., Richterich,R., and Rossi,E. (1967)
Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication : A Defect in L-Lysine dehydrogenase .
Metabolism . 16 , 910
- 36 - İmeryüz,F. ve Sandıkçioğlu, M. (1968)
Koyun yetiştiriciliğinde yapağı , Sayfa : 16
Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Yayınları No. 22,Ankara
- 37 - Aynı kaynak . Sayfa 20
- 38 - Lehninger, A.L. (1982)
Principles of Biochemistry . Page : 153
Worth Publishers Inc. New York
- 39 - Ertel,J., and Isserof,H. (1974)
Proline in fasciolosis : I. Comparative activities of ornithine-5-transaminase and proline oxidase in F. hepatica and in mammalian liver .
J.Parasit. 60 , 574

- 40 - İmeryüz,F., ve Sandıkçioğlu,M. (1968)
Koyun yetiştiriciliğinde yapağı . Sayfa : 22
Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü .
Yayın No : 22 Ankara .

Adres :

Doç.Dr. Şendoğan Gülen ,
Celalettin Türkoğlu M.S.
Biyolojik Bilimler Bölümü,
Orta Doğu Teknik Üniversitesi ,
Ankara

Uzm.Vet.Hek. Şükrü Ayabakan
Çifteler Harası , Koyunculuk Şubesi Şefi ,
Mahmudiye , Eskişehir .