

## İNSAN SERUM ARGİNAZ ENZİMİNİN ÖZELLİKLERİ VE AKTİVİTE ÖLÇÜMÜNDE DUYARLI BİR YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ

### The properties of human serum arginase enzyme and development of a sensitive method for measuring its activity

Sibel AHI<sup>1</sup>, İclal MERAM<sup>2</sup>, Yüksel ÖZDEMİR<sup>3</sup>

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada sağlıklı kişilerin serumunda çok düşük düzeylerde bulunan (eritrosit enzim aktivitesinin 1/200 ü), arginaz aktivitesinin, duyarlı bir biçimde ölçülebilmesinin koşulları araştırılmış ve arginaz aktivitesi ölçümünde kullanılan TDMU (tiyosemikarbazid diasetil monoksim üre) yöntemi modifiye edilmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Arginaz aktivite ölçümü için sağlıklı bireylerden elde edilen serum kullanılmıştır. Arginaz aktivitesi ölçümü TDMU yöntemiyle yapılmıştır.

**Bulgular:** Ölçüm yöntemiyle maksimum aktivite elde edebilmek için ortama öninkübasyon aşamasında eklenen Mn ++ derişiminin, 5 mmol/l; öninkübasyon süresinin, 55 ° C'da 8 dakika; inkübasyon süresinin ise 37 ° C da bir saat olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Inkübasyon ortamında (1 ml final hacimde) 25 mmol/l L- arginin, 40 mmol/l karbonat tamponu (pH 9.7) ve öninkübasyona tabi tutulmuş serum bulunmaktadır. Inkübasyonun ardından serum proteinlerinin çöktürülmesi ve enzimatik tepkimenin durdurulması amacıyla ortama 1 N HClO4 ilave edilerek, süpernatantta üre düzeyi saptanmıştır. Enzimin etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), iyodo aset amit (IAA) ve bazı amino asitler ile inhibe edildiği ve inhibisyon derecesinin, inhibitör maddelerin ortama eklendiği aşamaya bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca serum arginaz aktivitesi için, L-arginine karşı çizilen Michaelis - Menten eğrisinden enzimin Km değeri saptanmıştır.

**Sonuç:** İnsan serum arginaz enziminin kinetik özellikleri ve optimum deney koşulları saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Arginaz, Aktivatör, Enzim inhibitörleri, Serum

Arginaz (L- arginin amidino hidrolaz, E C 3.5.3.1.) üre döngüsünün bir enzimi olup L-arginini üre ve ornitine hidroliz etmektedir (1,2). İlk kez 1904

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi GAZİANTEP Biyokimya. MS.1, Y.Doç.Dr.2, Doç.Dr.3.

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

#### Summary

**Purpose:** In this study, we aimed at developing a sensitive method to determine serum arginase activity which presents at low levels (1/200 of erythrocyte arginase activity) in healthy subjects. We also aimed at modifying Tiosemicarbazide diacetyl monoxime-urea (TDMU) method used for measuring arginase activity.

**Materials and Methods:** Human serum obtained from healthy subjects was used for arginase activity measurement. TDMU method was used for arginase activity determination.

**Results:** To obtain maximum activity by the method used, we added 5 mmol/l Mn++ to preincubation media. Preincubation time was 8 min at 55 °C and incubation time was 60 min at 37 °C. The incubation medium contains (in 1 ml final volume) 25 mmol/l L- arginine, 40 mmol/l carbonate buffer (pH:9.7) and preincubated serum. After incubation, 1N HClO4 was added to stop enzymatic reaction and precipitate serum proteins. The level of urea produced by serum arginase was measured in supernatant. We also showed the inhibitor effects of etilen diamine tetra acetic acid (EDTA), iodo acet amide (IAA) and some amino acids on the serum arginase activity. The inhibitor effects of these compounds varied according to the stages at which these inhibitors were added into medium. In addition, the Michaelis - Menten curve of serum arginase against L-arginine was drawn and the Km value of enzyme for arginine obtained.

**Conclusion:** The kinetic properties of human serum arginase and optimal assay conditions were determined.

**Key Words:** Activator, Arginase, Enzyme inhibitors, Serum

yılında tanımlanan bu enzimin Krebs- Henseleit tarafından 1932 yılında üre döngüsüne ait olduğu kanıtlanmıştır (1-3). Üre döngüsü, amino asitlerin yıkılmasıyla oluşan, yüksek toksisiteye sahip amonyum iyonlarının organizmadan uzaklaşmasını sağlayan önemli bir metabolik yoldur (4-6). Karaciğer, en yüksek arginaz aktivitesine sahiptir. Eritrosit, lökosit, böbrek,

tiroid ve tükürük bezleri, plasenta, deri ve testisler gibi ekstra hepatik dokulardaki aktivite karaciğerden belirgin olarak daha düşük olarak elde edilmektedir. İnsan serumunda ise arginaz aktivitesi eritrosit değerlerinden 200 kat daha düşük olarak tayin edilmiştir (5,6). Genel olarak tüm memelilerde elde edilen arginaz izoenzimleri benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olup molekül ağırlıkları 120 000±5 000 dalton arasında değişmektedir (4,7). Arginaz için optimum pH 9.4-9.8 arasında olup pH'nin düşmesi (pH 9.0 in altında) enzim aktivitesinde % 50 oranında kayba neden olmaktadır (8-11). Aktivite için gerekli  $Mn^{++}$  yokluğunda enzimatik aktivite de azalmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda hayvanlardaki  $Mn^{++}$  eksikliğinin arginaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir.  $Mn^{++}$  varlığı arginazın termal stabilitesini arttırdığı gibi proteolize karşı dirençli de yapmaktadır (8-10). Diğer bir çalışmada erişkin ve fetal karaciğer ve böbrek arginazının 68°C'de  $Mn^{++}$  yokken iki dakikada aktivite kaybının % 40 civarında olduğu,  $Mn^{++}$  varlığında ise 81°C'de bu kaybın % 50 civarında olduğu görülmüştür (2). Diğer bir çalışmada araştırmacılar EDTA ve sitrat gibi çelatörlerin arginaz enzimini inhibe etmediğini göstermişlerdir (6).  $CCl_4$  gibi toksik maddelerle oluşan hepatik hasarda, karaciğer arginaz aktivitesinin yükseldiği ve aynı sonucun alkolik hepatit ve viral hepatitte de meydana geldiği görülmektedir (2,12,13). Ayrıca epileptik nöbetlerin tanısında da, serum arginaz aktivite ölçümünün, kriter olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (2,14-16).

Bu çalışmada daha önce serum dışında diğer kaynaklar, özellikle de doku homojenatlarında arginaz aktivite ölçümünde kullanılan TDMU yöntemiyle (17) serumda arginaz aktivitesi ölçme koşullarının optimize edilmesi düşünülmüştür. Bu amaçla inkübasyon öncesi koşullar (öninkübasyon sıcaklığı, süresi ve  $Mn^{++}$  derişimi) incelenmiştir.  $Mn^{++}$  yerine diğer iyonlar da ( $Zn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ve  $Hg^{++}$ ) denenmiştir. Buna ek olarak serum proteinlerini saf dışı bırakacak, protein çöktürme işleminin eklenmesi planlanmıştır. İnkübasyon koşulları (tampon iyonik gücü, substrat derişimi, pH, inkübasyon süresi) da optimize edilmeye çalışılarak arginazın  $K_m$  değeri hesaplanmaya

çalışılmıştır. Arginaz üzerine EDTA, İAA ve amino asitlerin genel etkileri de gösterilmek istenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlıklı kişilerden alınan venöz kan, oda ısısında 30 dakika bekletilip pıhtılaşması sağlandıktan sonra, 2000 rpm de beş dakika santrifüj edildi. Birçok sağlıklı kişiden elde edilen serum havuzu hazırlandıktan sonra çalışmalarda kullanıldı. Yapılan ön çalışmalarda, -20 °C' de saklanan serum havuzunda, arginaz aktivitesinin 3 ay boyunca değişmediği belirlendi. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Germany) ve Sigma (St. Louis, USA) firmalarından sağlandı. Orijinal TDMU (17) yönteminde enzim  $Mn^{++}$  ile öninkübasyona tabi tutulmuyordu. Ayrıca inkübasyon süresi 10 dakika olup kullanılan arginin derişimi 285 mmol/l idi. TDMU yönteminde kullanılan pH 9.5 olup tampon kullanılmayıp inkübasyondan sonra proteinler çöktürülmeden üre ölçümüne geçiliyordu. Bizim çalışmamızda serum 5 mmol /l  $Mn^{++}$  çözeltisiyle 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra, 55°C'da 8 dakika öninkübasyona tabi tutuldu. Öninkübasyonun ardından 37°C'da 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamında (1 ml son hacimde) 25 mmol/l L-arginin, 40 mmol/l karbonat tamponu (pH:9.7) ve  $Mn^{++}$  ile öninkübe edilmiş serum bulunmaktadır. İnkübasyon süresinin sonunda tepkimeyi durdurmak ve serum proteinlerini çöktürmek amacıyla 1.0 ml lik inkübasyon ortamına 0.5 ml 1 N  $HClO_4$  eklendi. Tüpler beş dakika 5000 rpm'de santrifüj edilerek, elde edilen süpernatantlarda üre düzeyi spektrofotometrik (son nokta) tiyosemikarbazid-diasetil monoksim-üre (TDMU) yöntemiyle ölçüldü (17). TDMU yönteminde üre, diasetil monoksim ile oluşturduğu rengin 520 nm'de ölçülmesi ilkesiyle saptanmaktadır. Deney sırasında sıfır zaman körü (inkübasyona tabi tutulmayan ve içeriği enzim aktivitesinin ölçüldüğü deney tüpü ile aynı olan deney körü) kullanıldı. 1 ünite serum arginaz dakikada 1 umol üreyi oluşturan enzim aktivitesi olarak tanımlandı (umol/dk/ml). Ayrıca serum örneklerinde Biüret yöntemi ile protein tayini yapıldı (18). Enzim aktivitesi serumda çok düşük olduğu için 1 ml

serumdaki aktivite saat türünden hesaplanıp yine 1ml serumdaki protein miktarına oranlanarak, spesifik aktivite Ü/g protein olarak ifade edildi.

Öninkübasyon aşamasında aktivatör olarak  $Mn^{++}$  yerine aynı derişimde  $Zn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ve  $Hg^{++}$  eklenerek bu iyonların aktivatör etkileri ve ortama eklenen EDTA'nın (5 mmol/l)  $Mn^{++}$  üzerine etkisi, yukarıda verilen deney sistemine göre araştırıldı. Serum arginaz enziminin aktif merkezinde -SH grubu olup olmadığı da İAA ile yapılan inhibisyon deneyleriyle gösterildi.

## BULGULAR

Serum arginaz aktivitesi üzerine  $Mn^{++}$  iyonlarının etkisi Tablo I' de görülmektedir. Öninkübasyon ortamına,  $Mn^{++}$  eklenmeden serum örnekleri saf su veya serum fizyolojik ile sulandırılıp öninkübasyon yapıldığında, serum arginaz aktivitesinin çok düşük olduğu, buna karşılık öninkübasyon aşamasında  $Mn^{++}$  eklenmesi ile aktivitenin yedi kat arttığı gözlemlendi (Saf su ve serum fizyolojik ile aktivite 2 Ü/g prot,  $Mn^{++}$  ile ise 14 Ü/g prot bulundu). Öninkübasyon sırasında eklenen  $Mn^{++}$  iyonlarının da en etkili derişiminin 5 mmol/l de olduğu, 1-10 mmol/l derişimleri denenerak ortaya kondu. Bu kez  $Mn^{++}$  iyonları öninkübasyon aşamasında değil de daha sonra inkübasyon ortamına eklendiğinde elde edilen aktivite saf su veya serum fizyolojik eklendiğinde elde edilen aktiviteye yakın bulundu.

Öninkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisi Şekil 1'de görülmektedir.

En yüksek enzim aktivitesi 8 dakikada elde edildi.

37°C' da uygulanan inkübasyon süresinin serum arginaz aktivitesine etkisi Şekil 2'de görülmektedir.

Şekil 2'den de görülebildiği gibi, serum arginaz aktivitesi 12 dakika boyunca, inkübasyon zamanı ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Yirmi-100 mmol/l aralığında eklenen karbonat tampon derişimlerinde en yüksek enzim aktivitesi 40 mmol/l konsantrasyondaki tampon ile elde edildi.İnkübasyon ortamının pH'sı ile serum arginaz aktivitesi arasındaki ilişki Şekil 3'te görülmektedir. En yüksek aktivite için optimum pH'nın 9.7 olduğu belirlendi.

Serum arginazının L- arginin derişimlerine bağlı olarak elde edilen aktivite düzeyleri Şekil 4'de görülmektedir. Serum arginazının Michaelis-Menten eğrisinden L-arginin için elde edilen Km değeri 7.3 mmol/l olarak tespit edildi.

$Mn^{++}$  iyonları yerine,  $Zn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ve  $Hg^{++}$  iyonları aynı derişimde (5 mmol/l) preinkübasyon ortamına eklendiğinde; bu katyonların, enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkilerinin olmadığı gözlemlendi.

Divalent katyon çelat yapıcı madde olarak bilinen EDTA'nın ve ortama eklenme aşamasının serum arginaz enzim aktivitesi üzerine etkisi Tablo II'de verilmiştir. EDTA'nın maksimum inhibitör etkisini gösterebilmesi için  $Mn^{++}$  a eş derişimde olması (5 mmol/l) ve öninkübasyon ortamına eklenmesi gerekmektedir.

Serum arginaz enziminin İAA ile etkileşimi Tablo III' de görülmektedir. İAA'nin inhibitör etkisi substrat ile aynı anda eklendiğinde (inkübasyon) daha fazla olup İAA'nin ortamdaki derişimi arttıkça inhibisyon da artmaktadır.

Bazı amino asitlerin serum arginaz aktivitesine etkileri Tablo IV' de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, en yüksek inhibisyon L- ornitin ile elde edildi.

**Tablo I.** Serum arginaz aktivitesine  $Mn^{++}$  etkisi

$Mn^{++}$ Derişimi mmol/l	Serum arginaz aktivitesi Ü/g protein	
	Öninkübasyon	İnkübasyon
0 (Saf su veya serum fizyolojik)	2	2
1	4.1	2
2	6.4	2
3	8.3	2
4	10.7	2
5	14	2
6	12.5	2
7	10.8	2
8	8.6	2
9	7.9	2
10	6.3	2

**Tablo II.** EDTA'nın serum arginaz aktivitesine etkisi

EDTA Derişimi (mmol/l)	Eklenme Zamanı	Serum arginaz aktivitesi	
		Ünite/g Prot.	%
0 (kontrol)	---	30.5	100
2.5	Öninkübasyon	5.1	16.7
5.0	"	1.5	4.9
7.5	"	2.2	7.2
2.5	İnkübasyon	29.5	96.7
5.0	"	30.3	99.3
7.5	"	30.5	100

**Tablo III.** Serum arginaz enzimine İAA'in etkisi

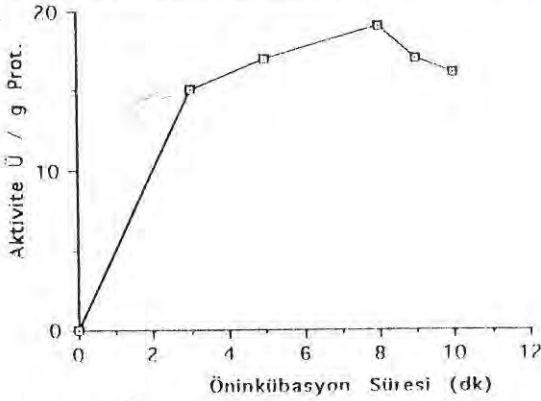
İAA Derişimi (mmol/l)	Öninkübasyon		Serum arginaz aktivitesi İnkübasyon	
	Ü/g Prot.	%	Ü/gProt.	%
0 (kontrol)	32.2	100	32.2	100
25	27.0	83.4	11.2	34.7
35	21.6	67.0	9.3	28.9
45	17.5	54.3	6.8	21.1
55	14.2	44.1	4.0	12.4

\* Tüm deneylerde preinkübasyon ortamında 5 mmol/l  $Mn^{++}$  bulunmaktadır

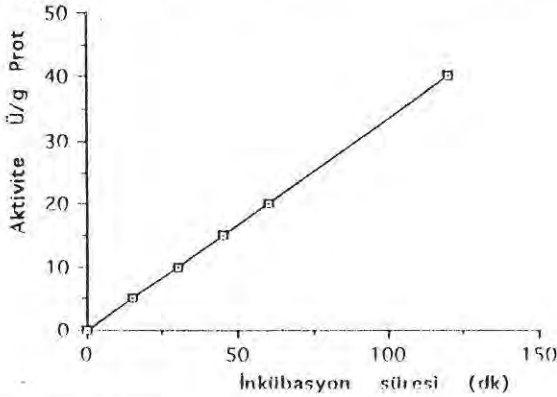
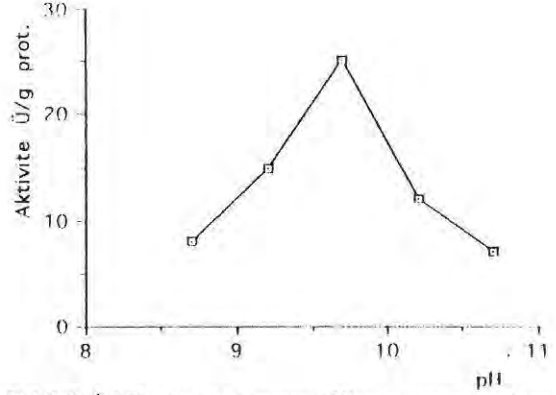
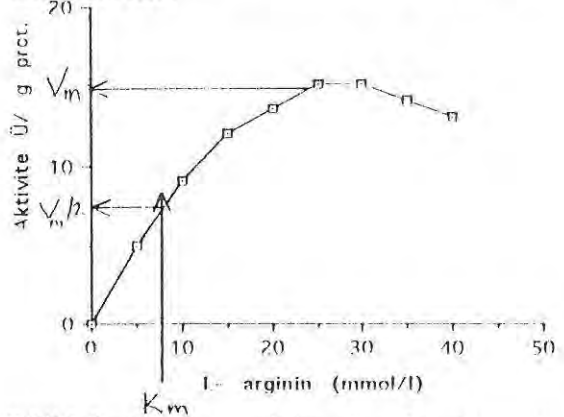
**Tablo IV.** Bazı amino asitlerin serum arginaz aktivitesine etkileri

L- amino asit	Arginaz Aktivitesi Kontrolün % si
Kontrol (L- arginin)	100
Aspartik asit	92.4
Prolin	54.5
Sistein	28.0
Ornitin	13.6

\*Amino asitlerin tümü substrat ile birlikte ve eş derişimde eklenmiştir (25 mmol/l).

**Şekil 1.** 55 °C'da önkübasyon süresinin arginaz aktivitesine etkisi

\*Önkübasyon ortamında 5 mmol/IMn<sup>++</sup> bulunmaktadır.

**Şekil 2.** İnkübasyon süresinin serum arginaz aktivitesine etkisi**Şekil 3.** İnkübasyon ortamının pH'sının serum arginaz aktivitesine etkisi**Şekil 4.** Serum arginaz enzimi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak insan serumu kullanıldı. Kaynak taramada saptayabildiğimiz kadarıyla bu çalışma kapsamındaki deneyler bugüne dek başka araştırmacılar tarafından yapılmamıştı ve bu bakımdan araştırmamızın orijinal bir çalışma olduğunu söyleyebiliriz. Arginaz aktivitesi için Mn<sup>++</sup> iyonlarına gereksinim olduğu birçok çalışmalarla ortaya konmuştur. Mn<sup>++</sup>'nin 55°C'lık önkübasyon ortamına eklenmesinin enzim altbirimlerinin birleştirilmesinde ve enzim aktivasyonunda çok önemli olduğu gösterilmiştir (8-10). Biz de Mn<sup>++</sup> varlığında yedi kat yüksek aktivite elde ettik. 5 mmol/l Mn<sup>++</sup> önkübasyon ortamına

eklendiğinde en yüksek aktivitenin elde edildiğini gözlemledik. Bu sonuç da bize  $Mn^{++}$  nın mutlaka öninkübasyon aşamasında eklenmesi gerektiğini göstermektedir. Beş mmol/l  $Mn^{++}$  ile  $55^{\circ}C$ 'deki öninkübasyonun sekiz dakikada en yüksek aktiviteyi verdiği, daha uzun süreli öninkübasyonda aktivitenin azaldığı görüldü. Orijinal TDMU (17) yönteminde ise  $Mn^{++}$  ve öninkübasyon kullanılmamıştı. İnkübasyon süresi ile serum arginaz aktivitesi ilişkisinin 120 dakikaya kadar (120 dk sonrası incelenmemiştir) doğrusal olduğu saptandıktan sonra inkübasyon süresi 60 dakika olarak kullanıldı, zira serum arginaz aktivitesi düşük olduğundan, doğrusal aktivite- zaman bağlantısı gösterildikten sonra uygun bir inkübasyon zamanı saptandı. Daha az süreli inkübasyonlarda ise elde edilen absorbanlar düşük değerlerde olduğu için sıfır zaman körleri ile aralarında anlamlı bir farklılık elde edilmesi güçleşmektedir. TDMU yönteminde inkübasyon süresi 10 dakikaydı. Ancak enzim kaynağı olarak serum değil doku homojenatları kullanılmıştı. Serum arginaz için L- arginin'e karşı çizilen Michaelis- Menten eğrisiyle  $K_m$  7.3 olarak bulunarak inkübasyon ortamına 25 mmol/l L- arginin (pH:9.7) (final derişim) eklendiği zaman en yüksek aktivitenin elde edildiği gözlemlendi. Serum arginaz aktivitesinin düşük olmasından dolayı bu konsantrasyon, eğrinin doğrusal bölümünde bulunmamasına karşın kullanıldı. TDMU yönteminde arginin derişimi 285 mmol/l olarak kullanılmıştı. TDMU yöntemiyle serum arginaz aktivitesi ölçümünde en büyük sorun serum proteinlerinin TDMU yönteminde oluşan renkte bulanıklık oluşturdıklarından dolayı bu renkle elde edilen absorbanların sağlıklı olarak ölçülemeyişi idi. Bu şakıncayı da serum proteinlerini 1 N  $HClO_4$  kullanıp çöktürerek giderdik. TDMU yönteminde proteinleri çöktürmeden üre miktarı ölçülmüştü. Bu çöktürme inkübasyon aşamasının ardından yapıldığı için enzim aktivitesi üzerine zararlı bir etki yapmamaktadır.  $Mn^{++}$  yerine diğer divalent katyonlar denendiğinde aktivitede bir artışa neden olmadıkları gözlemlendi. Bu sonuç da arginaz enziminin  $Mn^{++}$  gerektiren bir enzim olduğunun göstergesidir.  $Mn^{++}$  varlığının enzim aktivitesinde ne denli önemli olduğu, bu kez de  $Mn^{++}$  ile çelat oluşturan EDTA kullanılarak gösterildi.  $Mn^{++}$

derişimine eş derişimde ve  $Mn^{++}$  ile aynı aşamada ortama eklenen EDTA serum arginaz aktivitesini kontrolün % 4.9 una kadar düşürdü.  $Mn^{++}$ 'den daha sonra inkübasyon ortamına EDTA eklenmesi ise hiçbir etkinin gözlenmemesine neden oldu. Bu sonuç da  $Mn^{++}$  nın enzimin altbirimlerini  $55^{\circ}C$ 'de birleştirip enzimi bir kez aktive ettikten sonra katılan inhibitörlerin etkisi olmadığını göstergesidir. Enzimlerin aktif merkezlerinde -SH gruplarının varlığını göstermek amacıyla kullanılan İAA ile yapılan deneylerde, serum arginazın aktif merkezinde -SH grubu bulunduğunu belirlendi. Bu etki İAA ortama substrat ile aynı aşamada eklendiği zaman daha fazladır. EDTA, İAA ve amino asitlerin etkileri orijinal yöntemde denenmemiştir. Bazı amino asitlerin inhibitör etkisi belirli derecelerde olmaktadır. Arginaz enzimiyle L-arginin'den oluşan L- ornitin ile en yüksek inhibisyonun oluşması da son ürün inhibisyonunu çağrıştırmaktadır.

Bu çalışma sonucunda aynı enzim (arginaz) aktivitesinin farklı kaynaklarda ölçülmesi sırasında maksimum aktivitenin elde edilebilmesi için optimum koşulların saptanması gereği ortaya konmuş, bunun yanısıra serum arginaz enziminin bazı inhibitörler karşısındaki davranışları gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. Worth Publ, New York 1993;pp 517-519.
2. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. *Comparative properties of arginases*. *Comp Biochem Physiol* 1996;114 B : 107-132.
3. King J. *Practical Clinical Enzymology*. D.van Nostrand, London 1965; pp 220-223.
4. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S et al. *Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues*. *Biochem Med* 1982;28 : 65-175.
5. Colombo JP, Konarska L. *Methods of Enzymatic Analysis* (3 rd ed ), Mannheim, Verlag 1984; pp 285-291.

6. Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: Kinetic mechanism, alternate substrates and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312 :31-37.
7. Zamecka E, Porembaska Z. Five forms of arginase in human tissues. *Biochem Med Met Biol* 1988; 39: 258-266.
8. Diez AM, Campo ML, Soler G. Trypsin digestion of arginase: evidence for a stable conformation manganese directed. *Int J Biochem* 1992; 24 :1925-1932.
9. Maggine S, Stoecklin-Tschan FB, Mörikafer Z, et al. New kinetic parameters for rat liver arginase measured at near physiological steady- state concentrations of arginine and Mn<sup>2+</sup>. *Biochemistry* 1992; 283: 653-660.
10. Brock AA, Chapman SA, Ulman EA, et al. Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity. *J Nutr* 1994; 124: 340-344.
11. Bond JS, Failla ML, Unger DF. Elevated manganese concentration and arginase activity in liver of streptozocin induced diabetic rats. *J Biol Chem* 1993; 258 : 8004-8009.
12. Ikemato M, Ishida A, Tsunekawa S, et al . Enzyme immunoassay of liver type arginase and its potential clinical application. *Clin Chem* 1993; 39 :794-799.
13. Dala E, Szajani B. Immobilization, characterization and laboratory- scale application of bovine liver arginase. *App Biochem Biotech* 1994; 49: 203-215.
14. Carl GF, Blackwell LK, Barnett FC, et al . Manganese and epilepsy, brain glutamine synthetase and liver arginase activities in genetically epilepsy prone and chronically seized rats. *Epilepsia* 1993; 34 : 441-446.
15. Scheuerle AE, Mcvie R. Arginase deficiency presenting as cerebral palsy. *Pediatrics* 1993; 91: 995-996.
16. Garganta CL, Bond JS. Assay and kinetics of arginase. *Annal Biochem* 1986; 154: 388-394.
17. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem* 1971; 39: 412-417.
18. Silverman LM, Christenson RH. Amino Acid and Proteins In: Burtis CA, Ashwood ER (Eds). *Textbook of Clinical Chemistry* (2nd ed.). WB Saunders, Philadelphia 1994, pp 695-697.