



Sağlıklı ve Piyometralı İneklerde Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Plazma Nitrik Oksit Düzeyi

Fatih Mehmet KANDEMİR¹, Murat YÜKSEL², Fulya BENZER³, Necmi ÖZDEMİR¹

1. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ELAZIĞ
2. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ
3. Tarım ve Köylüleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ELAZIĞ

ÖZET: Bu çalışma sağlıklı ve piyometralı ineklerde eritrosit arginaz aktivitesi ile plazma nitrik oksit düzeylerini saptamak amacı ile yapıldı. Araştırma materyalini Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine getirilen 10 sağlıklı ve 10 klinik olarak piyometra teşhisi konulan, değişik ırklardan, 4-8 yaşlarında toplam 20 inek oluşturdu. İneklerin V. Jugularisten heparinli tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra plazmasında nitrik oksit düzeyi, geriye kalan kısmın 3 defa serum fizyolojik ile yıkanmasından sonra elde edilen eritrositlerde de arginaz aktivitesine bakıldı. Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Hemoglobün miktarını tespit etmede Drabkin metodu, nitrik oksit düzeyi ölçmede ise enzimatik Griess yöntemi kullanıldı. Sonuç olarak sağlıklı ineklerin eritrosit arginaz aktivitelerinin piyometralı ineklere göre belirgin derecede fazla olduğu ($p<0,001$), buna karşın sağlıklı ineklerin nitrik oksit düzeylerinin piyometralı ineklerin nitrik oksit düzeylerinden daha düşük olduğu saptanmış ($p<0,01$) ve bu parametrelerin piyometranın teşhisine yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Arginaz, İnek, Nitrik Oksit, Piyometra.

Erythrocyte Arginase Activity and Plasma Nitric Oxide Level in Healthy Cows and Cows with Pyometra

ABSTRACT: This study was conducted to establish the erythrocyte arginase activity and plasma nitric oxide levels in healthy cows and cows with pyometra. The study material consisted of a total of 20 cows, aged between 4 and 8 years old and in various breeds, admitted to the Obstetrics and Gynaecology Clinic, Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Fırat University. Half of the animals were diagnosed as clinically healthy, while the others were diagnosed with pyometra. Following the centrifugation of blood samples collected from V. Jugularis into heparin-filled tubes, the plasma nitric oxide levels were measured. Arginase activity was measured in erythrocytes after washing up of the remaining portion 3 times with serum physiologic. The activity was measured spectrophotometrically with the Thiosemicarbazide-Diacetyl Monoxime Urea (TDMU) method. Drabkin method was used to measure the haemoglobin amount, while enzymatic Griess method was used to measure the nitric oxide levels. As a result, it was found that; i) the erythrocyte arginase activities of healthy cows were markedly higher ($P<0.001$) than those cows with pyometra, ii) the nitric oxide levels of healthy cows were lower ($P<0.01$) in healthy cows, and iii) these parameters given could assist for diagnosis of pyometra.

Key words: Arginase, Cow, Nitric Oxide, Pyometra.

Sorumlu yazar / Corresponding author;

04242370000

fmkandemir@firat.edu.tr

GİRİŞ

İnfertilite evcil hayvanlarda döl verimini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür. İnfertiliteye, dişilerde genital organlarda meydana gelen çeşitli lezyonların yol açtığı vurgulanmış ve daha çok uterus, serviks ve vajina lezyonları üzerinde durulmuştur (Karadaş ve Timurkan, 2001). Postpartum döneminde uterus enfeksiyonlarının genellikle doğum sırasında uterusun bakterilerle kontaminasyonu sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Azawi, 2008).

Uterus enfeksiyonları klinik belirtilerine ve şiddet derecelerine göre sınıflandırılmaktadır (Thurmond ve ark., 1993). Endometritis genellikle doğumdan sonra görülen ve uterus enfeksiyonları arasındaki en hafif seyreden endometriyumun yangısıdır. Metritis endometritise göre uterus duvarının tüm katmanlarının daha şiddetli seyreden bir yangısıdır. Piyometra ise kalıcı korpus luteumun varlığında ve serviksin kapalı olduğu durumlarda uterus lümeninde purulent akıntı birikmesi olarak tanımlanır. Endometritis, metritis ve piyometra ilişkili olup, metritis-piyometra kompleksi ya da metritis kompleks olarak adlandırılırlar (Bartlett ve ark., 1986; Lowder, 1993).

Uterus enfeksiyonlarının teşhisinde sırasıyla rektal palpasyon ve ultrasonografik muayene, vajinal muayene, bakteriyolojik muayene, endometriyumun sitolojik muayenesi, endometriyal biyopsi gibi tanısal yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (Polat, 2008).

Arginaz (E.C. 3.5.3.1, L- arginin amidinohidrolaz) üre döngüsünün son enzimidir (Colombo ve Konarska , 1984). L-argininin, ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden arginazın iki izoformu vardır. Arginaz I sitoplazmada lokalize olurken arginaz II mitokondriada bulunmaktadır (Kepka-Lenhart ve ark., 2008).

Arginaz bakımından en zengin organ üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (Spector ve ark., 1983; Moreno-Vivian ve ark., 1992). Ancak böbrek, beyin, tiroid bezi, tükürük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, dalak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi üre döngüsünün görülmediği ekstrahepatik dokularda da arginaz enziminin olduğu belirtilmiştir (Kandemir, 2009). Arginazın üre döngüsünün olmadığı bu dokulardaki görevinin prolin, glutamat, ve poliamin biyosentezi için gerekli olan ornitin kaynağını sağlamak olduğu bilinmektedir (Ash, 2004).

Poliamin biyosentezinde arginaz enzimi başlangıç enzimi olup oluşan ornitin, ornitin dekarboksilaz enzimi ile putressine dönüşmekte, putressin de daha sonra spermin ve spermidin sentezine katılmaktadır. Poliaminler (putressin, spermin, spermidin) hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan biyomoleküllerdir (Pegg ve Mccann, 1982; Pegg ve Mccann, 1988).

Normal fiyolojik koşullar ile bir çok patofiyolojik durumda homeostazın sağlanmasında önemli bir etken olan nitrik oksit (NO) otokrin ve parakrin bir hücrel ajandır (Davies,1995). Nitrik oksit, L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür. Bu reaksiyon nitrik oksit sentaz enzimi tarafından katalizlenir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yapısal NOS vasküler endotelde, nöronlarda ve plateletlerde bulunur. Nöronlarda bulunan, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel hücrelerinde bulunan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) adını alır (Kuyumcu ve ark., 2004).

Endotel hücreler, düz kas hücreleri, epitel hücreleri, fibroblastlar, kardiyak miyositler, hepatositler ve makrofajlar gibi birçok farklı

hücrelerde üretilen NO, küçük, nispeten kararsız ve iki atomlu serbest radikaldır (Howe ve Boothe, 2001). Aynı zamanda NO, suda ve yağda çözünebilir, solüsyon içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan, nitrit ve nitrata okside olabilen renksiz ve stabil bir gaz olarak ta tanımlanabilir (Kuyumcu ve ark., 2004).

NO üretimi kritik olarak argininin teminine bağlıdır. Azalmış arginin NO sentezini azaltabilir. NO için arginin temini yeniden arginin sentezi, hücresel arginin transportu ve arginaz aktivitesine bağlıdır (Wu ve Morris , 1998). Mevcut çalışmalar NOS aktivitesinin arginin tüketimi yoluyla kontrol edildiğini göstermektedir (Hallemeesch ve ark., 2002). Öte yandan arginazın NO'nun son ürünü olan nitrit tarafından inhibe edildiği de bildirilmiştir (Hrabak ve ark., 1996).

Bu çalışmanın amacı piyometralı ineklerde eritrosit arginaz aktivitesi ve plazma nitrik oksit düzeyleri ile bunlar arasındaki korelasyonu ortaya koymaktır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Doğum ve Jinekoloji kliniğine getirilen yaşları 4-8 arasında değişen, farklı ırklardan, toplam 20 adet inek oluşturdu. Ultrason muayenesi sonucu uterusunda sıvı varlığı tespit edilen ve spekulumla yapılan vaginal muayene neticesinde uterus kaynaklı purulent akıntısı bulunan hayvanlar piyometralı grubu (n=10), herhangi bir akıntı ve yangı olmayan, jinekolojik olarak sağlıklı hayvanlar ise kontrol grubunu (n=10) oluşturdu. Her iki gruptaki hayvanlardan da heparinli tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek NO ölçümü için plazmaları ayrıldı. Geriye kalan kısmın 3 defa serum fizyolojik ile yıkanmasından sonra elde edilen eritrositlerde de arginaz aktivitesi ölçüldü. Plazma NO düzeyinin

ölçümü enzimatik Griess yöntemine (Lyll et al,1995) göre yapıldı. Arginaz aktivitesi Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) metodu (Geyer ve Dabich, 1971) ile spektrofotometrik olarak, hemoglobin miktarı ise Drabkin metodu (Fairbanks ve Klee; 1986) kullanılarak ölçüldü.

Çalışmada, 1 ünite enzim: 1 saatte, 37 °C' de L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim miktarı olup, spesifik aktivite µmol üre/saat/g hemoglobin olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arası farkın kullanılmasında bağımsız T testinden yararlanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi

BULGULAR

Piyometralı inekler ile sağlıklı (kontrol grubu) ineklere ait nitrik oksit ve arginaz değerleri tablo 1'de verildi. Buna göre kontrol grubundaki eritrosit arginaz aktivitesinin piyometralı grubun eritrosit arginaz aktivitesinden daha fazla olduğu (p<0,001), nitrik oksit düzeyinin de piyometralı gruptan daha düşük olduğu (p<0,01) tespit edildi.

TARTIŞMA

Üre döngüsünün son enzimi olan arginazın bir çok metabolik özelliklere sahip olduğu, akciğer (Gökmen ve ark., 1999), meme (Erbaş ve ark., 2006) ve mide kanseri (Wu ve ark., 1989) gibi hastalıkların etiyolojisinde rol oynadığı, paraziter enfeksiyonlarda da (Cuervo ve ark., 2008; Mohamed ve ark., 2005) görev aldığı yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır.

L-argininin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından nitrik okside, arginaz tarafından ise üre ve ornitine hidrolize edildiği bildirilmiş ve yangısal

olaylarda bu iki yolun yarışma halinde olduğu belirtilmiştir (Cook ve ark., 1994). Bu bildirimle uyumlu olarak mevcut çalışmada da bu iki parametre arasında negatif bir ilişkinin olduğu, eritrosit arginaz aktivitesinin kontrol grubunda $181,25 \pm 5,71$ (U/g hemoglobin) seviyesinde iken piyometra grubunda $130,88 \pm 5,06$ (U/g hemoglobin) seviyelerine düştüğü, bunun aksine plazma nitrik oksit düzeyinin de kontrol grubunda düşük iken ($51,31 \pm 0,32 \mu\text{mol/L}$) piyometralı grupta yüksek ($55,88 \pm 1,28 \mu\text{mol/L}$) olduğu tespit edilmiştir.

Nitrik oksit, uterusun da içinde bulunduğu farklı organlarda düz kasların gevşemesi için gerekli olan ana mediatördür. Yangı sonucunda PGF_{2a} ve NO gibi farklı mediatör maddeler üretilir. Nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) nitrik oksit sentaz tarafından az miktarlarda NO üretilmekte ve üretilen NO' in yarılanma ömrü çok kısa olmaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ise genellikle yangı bölgesinden salınır ve yarılanma ömrü daha uzun olan, daha çok miktarda NO üretimini sağlar (Frea ve ark., 1997; Ekerhovd, 2000).

Tablo 1: Piyometra ve kontrol grubunda eritrosit arginaz aktivitesi ve plazma nitrik oksit düzeyi. Sonuçlar standart hata olarak açıklandı.

Table 1: Plasma nitric oxide levels and erythrocyte arginase activity in pyometra group and control group. Results are expressed as mean + standard error.

	n	Kontrol grubu	Piyometralı grup	p
Plazma Nitrik Oksit Düzeyi ($\mu\text{mol/L}$)	10	$51,31 \pm 0,32$	$55,88 \pm 1,28$	<0,01
Eritrosit Arginaz Aktivitesi (U/g hemoglobin)	10	$181,25 \pm 5,71$	$130,88 \pm 5,06$	<0,001

Nitrik oksit yangının gelişim sürecinde önemli bir üründür. Çalışmalar yangı mediatörlerinin iNOS' ı artırdığını ve bunun da NO oluşumunu hızlandığını göstermiştir (Alghamdi ve Troedsson, 2002). Lokal anjiojenik ve vazoaaktif faktör olan NO korpus luteum oluşumu ve gerilemesi (Miyamoto ve ark., 2009), fütusa karşı maternal tolerans gibi bir seri reproduktif olaylara katılır (Chang ve Zhang, 2008). Uterusta aşırı NO birikimi myometriyumun aktivitesini azaltır ve bu da yangı ürünlerinin uterusun hemen uzaklaşmasını engeller. Böylece uterusun biriken yangı ürünleri ve yangının şiddeti artarak uterusu zarar verir (Li ve ark., 2010).

Alghamdi ve ark. (2005), kısıraklarda yaptıkları çalışmada suni tohumlamadan 13 saat sonra biopsi ile aldıkları uterus dokusunda ve uterus akıntısında NO düzeyini araştırmışlar,

endometritise duyarlı kısıraklardaki total NO miktarının endometritise dirençli kısıraklardaki total NO miktarından çok daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2010), klinik ve subklinik endometritisli ineklerin plazmasında ve uterus akıntısında NO konsantrasyonunu araştırmışlar, klinik ve subklinik endometritisli ineklerin hem plazma hemde uterus akıntısındaki NO konsantrasyonunun sağlıklı inekler ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu, en yüksek NO konsantrasyonunun klinik endometritisli hayvanlarda tespit edildiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, NO konsantrasyonunun endometritisin derecesi ile ilişkili olduğunu ve endometritisin teşhisinde bu parametrenin kullanılmasının yararlı olacağını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada da benzer

sonuçlar elde edilmiş, piyometralı ineklerde arginaz aktivitesi düşük çıkarken NO konsantrasyonunda kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir. Piyometralı grupta görülen NO konsantrasyonundaki artışın uterustaki yangı mediatörlerinin NOS aracılığı ile NO oluşumunu hızlandırması, artan NO konsantrasyonunun da uterus kaslarında gevşemeye neden olarak uterustaki yangısal ürünlerin atılımını azaltması ve böylece hastalığın şiddetini artırmasından kaynaklandığı, daha fazla yangısal ürün birikmesinin de bu duruma katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Aynı grupta, L-arginini ortak substrat olarak kullanan arginaz enziminin aktivitesindeki azalmanın ise NOS tarafından arginazın substrat kullanımının baskılanması ve dengenin NOS lehine kayması sonucu olduğu ve bu nedenle NO üretiminde artış olduğu, yangısal sürecin de bu durumu hızlandırdığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak piyometralı grupta NO konsantrasyonunda artış, arginaz aktivitesinde de azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar göz önüne alınarak, piyometranın başlangıç aşamalarında NOS inhibitörü maddeler ile arginin kullanımını arginazın lehine çevirerek NO oluşumu azaltabilecek ve NOS inhibitörlerinin piyometranın seyri üzerine etkilerinin araştırılabileceği yeni çalışmalar yapılmasının yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alghamdi AS., Foster DN., Carlson CS., Troedsson MHT., 2005. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *AJRI* ., 53,230–237.
- Alghamdi AS., Troedsson MHT., 2002. Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. *Theriogenology*, 58, 445–448.
- Ash DE., 2004. Structure and Function of Arginase. *ASN.*, 22, 2760-2764.
- Azawi OI., 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 105, 187–208.
- Bartlett PC., Kirk JH., Wilke MA., Kaneene JB., Mather EC., 1986. Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Prev. Vet. Med.*, 4, 235-248.
- Chang K., Zhang L., 2008. Steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy. *Reprod. Sci.*, 15, 336–348.
- Cook HT., Jansen A., Lewis S., Largen P., O'Donnell M., Reaveley D., Cattel V., 1994. Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: Interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 267, 646-653.
- Cuervo H., Pineda MA., Aoki MP., Gea S., Fresno M., Girones N., 2008. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute trypanosoma cruzi infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. *J. Infect. Dis.*, 197, 1772-1782.
- Davies MG., Fulton GJ., Hagen PO., 1995. Clinical biology of nitric oxide. *Br. J. Surg.*, 82, 1598-610.
- Ekerhovd E., Brannstrom M., Weijdegard B., Norstrom A., 2000. Nitric oxide synthases in the human cervix at term pregnancy and effects of nitric oxide on cervical smooth muscle contractility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 183, 610–616.
- Erbaş H., Erten O., Dağlar A., İrfanoğlu ME., 2006. Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. *Turk J. Bioch.*, 31, 129-134.
- Fairbanks VF., Klee GG., 1986. Biochemical aspects of hematology. In: Tietz NW (Ed.): *Textbook of clinical chemistry*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Frean SP., Bryant CE., Froling IL., Elliott J., Lees P., 1997. Nitric oxide production by equine

- articular cells in vitro. *Equine Vet. J.*, 29, 98–102.
- Geyer JW., Dabich D., 1971. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 39, 412-417.
- Gökmen SS., Yörük Y., Çakır E., Yorulmaz F., Gülen Ş., 1999. Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem. Biophys.*, 17, 125-131.
- Hallemeesch MM., Lamers WH., Deutz NE., 2002. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin. Nutr.*, 21, 273-279.
- Howe LM., Boothe HW., 2001. Nitric oxide a review for veterinary surgeons. *Vet. Surg.*, 30, 44-57.
- Hrabak A., Bajor T., Temesi A., Meszaros G., 1996. The inhibitory effect of nitrite, a stable product of nitric oxide (NO) formation, on arginase. *FEBS Letters*, 390, 203-206.
- Kandemir FM., 2009. Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri. Doktora tezi, Fırat Üniv. Sađ. Bil. Ens., Elazığ.
- Karadaş E., Timurkan N., 2001. Koyunlarda diři genital sistemde patomorfolojik arařtırmalar II. Uterus, Serviks ve Vagina. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 25, 27-37.
- Kepka-Lenhart D., Ash DE., Morris SM., 2008. Determination of mammalian arginase activity. *Method. Enzymol.*, 440, 221-30.
- Kuyumcu A., Polat Düzgün A., Özmen MM., Besler HT., 2004. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus. Travma. Derg.*, 10, 149-159.
- Li DJ., Liu YF., Li YF., Lv Y., Pei XY., Guo DZ., 2010. Significance of nitric oxide concentration in plasma and uterine secretes with puerperal endometritis in dairy cows. *Vet. Res. Commun.*, 34, 315–321.
- Lowder MQ., 1993. Diagnosing and treating bovine postpartum endometritis. *Vet. Med.*, 88, 474-479.
- Lyll F., Young A., Greer IA., 1995. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 173, 714-718.
- Miyamoto A., Shirasuna K., Sasahara K., 2009. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 37, 159–169.
- Mohamed SA., Fahmy AS., Mohamed TM., Hamdy SM., 2005. Urea cycle of *Fasciola gigantica*: Purification and characterization of arginase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 142, 308-316.
- Moreno-Vivian C., Soler G., Castillo F., 1992. Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobactercapsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem.*, 204, 531-537.
- Pegg AE., Mccann P., 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 243, 212-221.
- Pegg AE., Mccann P., 1988. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas Sci. Biochem.*, 1, 11-18.
- Polat B., 2008. İneklerde postpartum uterus enfeksiyonları. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 3, 56–63.
- Spector EB., Rice SCH., Cederbaum SD., 1983. Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficients patients. *Pediatr. Res.*, 17, 941-944.
- Thurmond MC., Jameson CM., Picanso JP., 1993. Effect of intrauterine antimicrobial treatment in reducing calving to conception interval in cow with endometritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 203, 1576-1578.
- Wu CW., Wang SR., Chang TJ., Lin EC., Chang KL., Huang MH., Lui WY., P'eng FK., Chi CW., 1989. Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. *Cancer.*, 64, 2552-2556.
- Wu G., Morris SM., 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 336, 1-7.