

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN *GAMMARUS PULEX*' DEKİ Se-  
BAĞIMLI VE Se-BAĞIMSIZ GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM  
AKTİVİTELERİNE OLAN ETKİLERİ VE ENZİMİN BAZI  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

MEHMET ERDEM  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MAYIS-2002

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN *GAMMARUS PULEX*' DEKİ Se-  
BAĞIMLI VE Se-BAĞIMSIZ GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM  
AKTİVİTELERİNE OLAN ETKİLERİ VE ENZİMİN BAZI  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

MEHMET ERDEM  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MAYIS-2002

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet ERDEM'in Çeşitli Çevresel Kirlenmelerin *Gammarus pulex*'deki Selenyum-Bağımlı ve Selenyum-Bağımsız Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitelerine Olan Etkileri ve Enzimlerin Bazı Biyokimyasal Özellikleri başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek lisans tezi 13.03.2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. AHMET ÖZATA.	
Üye	: Doç. Dr. H.MEHTAP KUTLU	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. AYŞE MERCANGÖZ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
13.03.2002..... tarih ve ...9/3..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Orhan ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
M ü d ü r ü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN *Gammarus pulex*'DEKİ Se-BAĞIMLI VE Se-BAĞIMSIZ GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE OLAN ETKİLERİ VE ENZİMLERİN BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

MEHMET ERDEM

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim DalıDanışman: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA  
2002, 37 sayfa

Glutasyon peroksidaz (EC1.11.1.9) redükte glutasyon'un okside glutasyon'a hidrojen peroksit etkisi altında oksidasyonunu katalizler. Selenyum bağımlılığı açısından Glutasyon peroksidaz iki forma ayrılır: Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz.

Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz hem sitozolde hem mitokondride bulunan tetramer yapıda, 84000 D molekül ağırlığında hem hidrojen peroksitle hem de organik hidroperoksitlerle yüksek aktivite gösteren bir enzimdir.

Enzim hücreyi, hücre membranında organik hasara karşı korur. Se-bağımsız glutasyon peroksidazlar Glutasyon S-transferazlardır: GST (EC 2.5.1.18). Bunlar merkapturik asit oluşumunun ilk basamağının katalizinde gözlenmiştir. Enzim dimer yapıdadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 50000 D, yedi farklı formda alt üniteden meydana gelmiş ve sekiz izozimi vardır.

Bu çalışmada, omurgasız canlılardan *Gammarus spp.*'de enzimin kurşun ile olan inhibisyonu ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.  $EC_{50}$  değeri *Gammarus spp.*'lara uygulanarak, kurşunun *in vivo*'da Glutasyon peroksidazlar üzerine olan geciktirici etkisi saptanmış ve zamana göre değişimi incelenmiştir. Glutasyon peroksidaz geciktirmesinin zamana ve kurşun miktarına bağlı olarak arttığı bulunmuştur.

Bu çalışmada, *Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz'ın optimum aktivitesinin 7.2-8.5 arasında, Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz'ın optimum aktivitesinin ise 7-8 arasında olduğu bulunmuştur.

*Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesinin  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonları ile azaldığı gözlenmiştir. Buna ilave olarak *Gammarus spp.* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz aktivitesinin  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonları ile azaldığı gözlenmiştir.

Kinetik analizler sonucu Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz için  $K_m=4$ ,  $V_{max}=0,016$  olarak bulunurken Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz için bu değerler  $K_m=0,56$ ,  $V_{max}=0,009$  olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Gammarus pulex*, Se-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz, Se-Bağımsız Glutasyon peroksidaz, Kurşun

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE EFFECTS OF VARIOUS ENVIROMENTAL CONTAMINANTS AT THE ACTIVITY OF Se-DEPENDENT AND Se-INDEPENDENT GLUTATHION PEROXIDASE ENZYMES IN *GAMMARUS pulex* AND SOME BIOCHEMICAL FEATURES OF THIS ENZYMES

MEHMET ERDEM

Anadolu University  
Graduate School of Naturel and Sciences  
Biology Program

Supervisor: Prof. Ahmet ÖZATA  
2002, 37 pages

Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) catalyses the oxidation of GSH to GSSG at the expense of  $H_2O_2$ . According to selenium dependency, GSH-Px can be divided into two forms: Se-dependent and Se-independent GSH-Px.

Se-GSH-Px is a tetramer of Mw 84000 with high activity towards both  $H_2O_2$  and organic hydroperoxides, found in both cytosol and mitochondria.

The enzyme protects the cells against organic damage of the cell membrane. Se-independent GSH-Pxs are the GSH-S transferases: GST (EC 2.5.1.18). They were observed in the catalysis of the first step formation of mercapturic acide. The enzymes are dimerous and their Mws number approximately 50000 with at least seven different forms of domain and eight isoenzymes.

In this study, inhibition of GSH-Px enzymes with lead and biochemical features of the enzyme in one of invertebrates, namely in *Gammarus spp.*, has been determined.

Inhibitory effect of lead on in vivo GSH-Px's and its variation with time has been analysed by applying  $EC_{50}$  value to *Gammarus spp.* It has been found that GSH-Px inhibition has increased with time and the amount of lead in *Gammarus spp.*

In the study, optimum activity of *Gammarus spp.* Se-dependent GSH-Px has been found to be around 7.2-8.5 and optimum activity of Se-independent GSH-Px has been found to be 7-8.

The activity of *Gammarus spp.* Se-dependent GSH-Px decreased with  $Cu^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  ions.

In addition, the activity of *Gammarus spp.* Se-dependent GSH-Px decreased with the  $Cu^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  ions.

As a result of the kinetic analyses  $K_m = 4$ ,  $V_{max} = 0,016$  were determined for the Se-dependent enzymes. Where as  $K_m = 0,56$ ,  $V_{max} = 0,009$  were found for the Se-independent enzymes.

Keywords: *Gammarus pulex*, Se-dependent Glutathione peroksidase, Se- independent Glutathione peroksidase, Lead

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bana önderlik eden ve her aşamasında ilgi ve desteklerini gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Ahmet ÖZATA ve Doç. Dr. H. Mehtap KUTLU'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yine literatür sağlamamda her türlü kaynak desteğini benden esirgemeyen hocam Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a teşekkür ederim.

Ayrıca Teknoloji ve Araştırma Parkı Biyoloji laboratuvarı sorumlusu Uzman Biyolog İsmail POYRAZ ve yüksek lisans öğrencisi Ayla DÜZEN'e ve öğretim görevlisi Filiz SUSUZ'a çalışmalarım süresince bana yaptıkları gerek teorik gerekse pratik yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Benden çalışmalarım süresince manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşim Arş. Gör. Barış ERDEM'e ve Emre ERDEM'e, değerli arkadaşım Derya ÇİMEN'e, çevirilerde benden yardımlarını esirgemeyen Zeliha DOĞANAY'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	x

### **1. GİRİŞ.....1**

### **2. GENEL BİLGİLER.....4**

2.1. Ağır Metallerden Kurşunun Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı.....	4
2.2. Ağır Metallerin ve Diğer Bazı Çevresel Kirleticilerin Sucul Organizmalar Üzerindeki Toksik Etkileri.....	5
2.3. Kurşun Kirliliğinin Canlı Organizmalar Üzerindeki Enzimler Üzerine Etkileri.....	6
2.4. Tatlısu Amfipodlarının Toksikolojik Çalışmalarındaki Önemi.....	7
2.5. Kurşunun Canlılardaki Diğer Biyokimyasal Etkileri.....	7
2.6. Glutatyon Peroksidaz Enzimi.....	9
2.6.1. Glutatyon Peroksidaz Enziminin Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	9

2.6.2. Glutatyon Peroksidaz Enziminin Metabolik Fonksiyonları ve Canlılardaki Önemi.....	11
2.7. Glutatyon.....	12
2.7.1. Glutatyonun Kimyasal Yapısı.....	12
2.7.2. Glutatyonun Klinikteki Önemi.....	13
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>15</b>
3.1. Deneyde Kullanılan Canlıların Sağlanması ve Labaratuvar Koşullarında Yetiştirilmesi.....	15
3.2. Deneyde Kullanılan Metal Çözeltiler.....	15
3.3. Se-bağımlı Glutatyon Peroksidaz ve Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini.....	16
3.3.1. Homojenatın Hazırlanması.....	16
3.3.2. Aktivite Tayini.....	16
3.4. Se-bağımlı Glutatyon Peroksidaz- Kurşun Etkileşimi.....	17
3.4.1. Kurşun İle Muamele Edilmiş <i>Gammarus pulex</i> 'de Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin incelenmesi.....	17
3.5. Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz- Kurşun Etkileşimi.....	17
3.5.1. Kurşun İle Muamele Edilmiş <i>Gammarus pulex</i> 'de Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin İncelenmesi.....	17
3.6. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutatyon Peroksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	18
3.6.1. Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine Ph'nın Etkisi.....	18
3.6.2. Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz Aktivitesinin Kinetik Analizi.....	18



3.6.3. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz	
Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	18
3.6.4. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz	
Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	19
3.7. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz	
Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	19
3.7.1. Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz Aktivitesi	
Üzerine Ph'nın Etkisi.....	19
3.7.2. Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz Aktivitesinin	
Kinetik Analizi.....	19
3.7.3. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz	
Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	19
3.7.4. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz	
Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	20
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>21</b>
4.1. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz	
Enziminin Kurşun Asetat'ın ( $EC_{50}$ ) Konsantrasyonuna	
Karşı Değişen Zaman aralığına Bağlı Aktivite Değişimi.....	21
4.2. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz	
Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	22
4.2.1. Se-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	
Üzerine pH'nın Etkisi.....	22
4.2.2. Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz Enzim	
Aktivitesinin Kinetik Analizi ve $K_m$ Değerinin Bulunması.....	23
4.2.3. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz- Line Weaver Burke	
Hız Grafiği.....	24
4.2.4. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz	
Enzim Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	25

4.2.5. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutatyon Peroksidaz	
Enzim Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	26
4.3. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz	
Enziminin Kurşun asetat'ın ( $EC_{50}$ ) Konsantrasyonuna	
Karşı Değişen Zaman aralığına Bağlı Aktivite Değişimi.....	27
4.4. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz	
Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	28
4.4.1. Se-Bağımsız Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi	
Üzerine pH'nın Etkisi.....	28
4.4.2. Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz Enzim	
Aktivitesinin Kinetik Analizi ve $K_m$ Değerinin Bulunması.....	29
4.4.3. Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz- Line Weaver Burke	
Hız Grafiği.....	30
4.4.4. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz	
Enzim Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	31
4.4.5. <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz	
Enzim Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi.....	32
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>33</b>
<b>6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>35</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
4.1. <i>Gammarus pulex</i> ' deki Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesinin kurşunasetatın (EC <sub>50</sub> ) konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği.....	21
4.2. Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	22
4.3. Se- bağımlı Glutatyon peroksidaz enziminin Michaelis-Menten hız grafiği.....	23
4.4. Line Weaver-Burke'e göre hız grafiği.....	24
4.5. Cu <sup>+2</sup> iyonu için <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	25
4.6. Zn <sup>+2</sup> iyonu için <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	26
4.7. <i>Gammarus pulex</i> ' deki Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesinin kurşun asetatın (EC <sub>50</sub> ) konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği.....	27
4.8. Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	28
4.9. Se- bağımsız Glutatyon peroksidaz enziminin Michaelis-Menten hız grafiği.....	29

4.10. Line Weaver-Burke'e göre hız grafiği.....	30
4.11. Cu <sup>+2</sup> iyonu için <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	31
4.12. Zn <sup>+2</sup> iyonu için <i>Gammarus pulex</i> Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi.....	32

**KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
TEK	:Tetraetil kurşun
TMK	:Tetrametil kurşun
$\mu\text{g}$	:Mikrogram
mg	:Miligram
l	:Litre
Zn	:Çinko
Pb	:Kurşun
Cu	:Bakır
Se	:Selenyum
Kg	:Kilogram
ALA-D	:Aminolevulinik Asit Dehidrataz
GSH-Px	:Glutatyon peroksidaz
D	:Dalton
$\text{H}_2\text{O}_2$	:Hidrojen peroksit
GSH	:Redükte Glutatyon
GSSG	:Okside Glutatyon
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
$M_r$	:Molekül Ağırlığı
İn Vitro	:Hücre Dışı
RNA	:Ribonükleik Asit

## 1.GİRİŞ

Ağır bir metal olan kurşun, sucul çevrede sık karşılaşılan bir kirleticidir; kurşunun yaygın olarak çok çeşitli alanlarda kullanılması, başta insanlar olmak üzere birçok canlıyı olumsuz yönde etkilemektedir; boya, akümülatör, seramik, porselen, metal alaşımları, matbaa dizgisi, lehim ve bronz ile çalışılan işyerleri, aynı zamanda kurşuna maruz kalma kaynaklarının da temelini oluşturmaktadır [1].

Hızlı nüfus artışı, düzensiz kentleşme ve hergeçen gün gelişen sanayileşme çevre kirliliğine neden olmaktadır. Günümüzde büyük boyutlara ulaşan kirlilik deniz ve iç suları, atmosfer ve karasal ortamdan daha fazla etkilemektedir. Suların kirlenmesine neden olan kirletici maddeler çeşitli yollarla akarsulara, akarsularla birlikte göl ve denizlere ulaşmaktadır. Sucul ortama gelen kirletici maddeler doğal dengeyi bozarak buradaki canlı yaşamını etkilemekte, besin zincirini oluşturan canlılar aracılığı ile insan sağlığını tehdit etmektedir [2].

Kurşun oldukça geniş bir şekilde endüstride kullanılmaktadır. Doğal su ortamlarında çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte, miktarındaki artış patlayıcı madde üretimine, fotoğrafçılık ve boya sanayinin atıkları ile egzos gazlarına bağlıdır. Bu nedenle de besin, su, toprak ve havada kirlenmeye sebep olmaktadır [3].

Yakın çevrede en önemli kurşun kaynağı benzine katılan tetraetil kurşun (TEK) veya tetrametil kurşun (TMK) olmaktadır. Benzine katılan bu bileşikler, yanma sonucu egsoz gazları ile havaya çeşitli kurşun bileşikleri (kurşun halojenür, kurşun oksit, kurşun oksikarbonat ) şeklinde yayılır. Trafiğin yoğun olduğu şehir havasında bu nedenle kurşun miktarı  $1-10\mu\text{g}/\text{m}^3$  ve hatta daha yüksek düzeyde olabilir [1].

Kurşunun canlı bünyesindeki etkileri ile ilgili ilk çalışmalar 1960' lı yıllarda başlamıştır. Ratlarda, kurşun asetat özellikle kemik dokuda birikerek kurşun zehirlenmesine yol açar [4].

0.30 mg/l - 0.40 mg/l arası kurşun miktarı, çocuklarda ve erişkinlerde genelde normaldir. Bununla beraber 0.50 mg/l üzerindeki konsantrasyonlar toksiktir [5].

Kirleticilerin en önemlileri ortamda uzun süre kalan ve toksik etki yaratan kimyasal maddelerdir. Bu kimyasal maddelerden ağır metaller ortamda belirli sınırlar içinde bulduklarında organizmaların yaşamsal aktivitelerini olumlu yönde etkilemekte, ancak bu sınırların dışına çıktığında ekosistem elemanlarının biyolojik aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir [2].

Uzun yıllardan beri, tatlı su amfipodları, sucul toksikolojide test organizması olarak kullanıla gelmektedir. *Gammarus spp.* ise, tatlı su amfipodları içinde toksikolojik çalışmalarda kullanılan en popüler canlı gruplarından biridir. Dünyanın birçok bölgesinde yaygın olarak bulunması, elde edilebilme ve toplama kolaylığı, laboratuvar koşullarında yaşatılabilmesi konusunda büyük sorunlar çıkmayışı gibi avantajlarının yanısıra birçok toksik maddeye karşı da duyarlıdır. Bu nedenle biz de yaptığımız çalışmalarda bu canlı grubunu seçtik [6].

Lipid peroksidasyonu hücresel komponentleri zarara uğratar. Lipid peroksidasyonu membran poliansature yağasitlerini serbest radikal etkisi altında oksidasyona uğratan otomatik katalitik bir yoldur. Hayvansal ve biyomedikal araştırmalar, ağır metallerin birçok hastalık ve kimyasal toksisiteden sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Örneğin ratların kadmiyum ile muamelesiyle, böbrek ve testislerde lipid peroksidasyonun arttığı gözlenmiştir. 2 ppm kadmiyum konsantrasyonun, ratların karaciğer ve böbreklerinde glutatyon peroksidaz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Kurşun da özellikle selebrium ve korteks olmak üzere, beyinde lipid peroksidasyonuna neden olan oksidatif bir özelliğe sahiptir [7].

Glutatyon peroksidaz dokuyu oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir; hidrojen peroksiti indirgeyen tepkimeyi, çok çeşitli organik peroksitleri su ve uygun alkollere indirgeyen tepkimeleri katalizler [8].

Eritrositlerde; glutatyon peroksidaz oksidan strese karşı, en etkili antioksidandır. Glutatyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır [9].

Bu çalışmanın ilk bölümünde; sucul bir omurgasız olan ve besin zincirinde balıkların besinini teşkil eden *Gammarus pulex*'deki Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz enzimi üzerine kurşun asetat'ın biyokimyasal

etkileri incelenmiş ve kinetik analizleri ile kurşun asetat muamelesi sonucundaki enzim aktivitesindeki değişiklikler tespit edilerek, bu enzimin antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Ayrıca  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  gibi metal iyonlarının Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Ağır Metallerden Kurşunun Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı

Kurşun mavi grimsi renkte bir metaldir. Erime noktası 327°C, kaynama noktası 1744°C'dir. Organik kurşun bileşiklerinden alkil kurşun bileşikleri lipofil özellikte olup, toksikolojik açıdan önem taşırlar. Erime derecesi düşük, yumuşak ve işlenmesi kolay bir metal olan kurşun, eski çağlardan beri kullanıldığı için kurşun zehirlenmelerinin de geçmişi çok eskilere dayanmaktadır. Doğadaki kurşun genellikle sarı, parlak, sülfürlü formlarda maden yatağı oluşturmakta ve kolayca elde edilebilmektedir [1]. Kurşun uygarlıkların gelişiminde ,en önemli toksik zehirlerden biri olarak tanımlanmıştır. Kurşun en önemli ağır metaldir ve temel olmayan bir elementtir. Kandaki kurşunun yarı ömrü 18 gündür, bununla beraber beyindeki yarı ömrü çok daha uzundur [11].

Ağır metallerin, litosfer, atmosfer ve hidrosfer arasında doğal döngüleri vardır. Sucul sistemlerde, bu ağır metaller, su sütunlarında, sedimentlerde ve canlı dokularda çözünebilir ve çözünemeyen formlarda bulunabilirler. Eğer alıcı organizma, ağır metalle yeterli miktar ve sürede temas ederse, ağır metal toksisitesi meydana gelir. Sucul organizmalarda ağır metal toksisitesinin kapasitesi, su ve sedimentlerin kimyasal ve fiziksel karakteristiklerini, suda bulunan biyolojik topluluğun bileşimini ve canlılığını içeren çeşitli faktörlere bağlıdır [12].

Metal toksisite mekanizması üç genel katagoriye ayrılır. Protein ve enzim gibi biyomoleküllerin temel fonksiyonel gruplarını bloke etme, biyomoleküllerde temel metal iyonlarının yerine geçme, biyomoleküllerin aktif konformasyonunu değiştirme gibi fonksiyonları vardır [12].

Katı ve sıvı yakıtlar, cinslerine bağlı olarak, havaya kurşun verebilir. Ancak egzoz gazları yanında bu ikinci derecede kalır [13].

İçme sularının kurşun kaplı depolarda bekletilmesi sırasında; su dağıtımında bulunan kurşun borulardan, sulara fazla miktarda kurşun geçebilir. Çeşitli besin maddeleri değişen miktarlarda kurşun içerir. Bitkisel kaynaklı besinlerde yetiştiği

toprağa bağılı olarak, kurşun miktarı ortalama 0-2.5 mg/kg; balık ve deniz ürünlerinde 0.2- 2.5 mg/ kg; et ve yumurtada 0- 3.7 mg/ kg arasında değişmektedir [1].

Günümüzdeki artan endüstri ve genellikle yoğun trafik sayesinde yaşanan çevre ağır metallere kontamine olmuştur. Kurşunun çevreye yayılması kurşunlu benzinler, kurşun üreten fabrikalar ve aküler sayesinde artmıştır. Bazı metropol bölgeler gibi benzine maruz kalan bölgelerde atmosferin kurşun içeriği yüksek çıkmıştır [10].

Ana kaynakları genelde toprakta bulunan kurşun, çeşitli yollarla sulara bulaşmaktadır. Tatlı sularda 3 mg/l kurşun hidratin 12 saat içinde balıklar için öldürücü olduğu saptanmıştır [14].

## **2.2. Ağır Metallerin ve Diğer Çevresel Kirleticilerin Sucul Organizmalar Üzerindeki Toksik Etkileri**

Sulara karışan kurşunun önemli bir kısmı, sularda bulunan karbonat, bikarbonat ve organik maddelerle birleşerek dibe çöker. Böylece büyük oranda sedimentlerde biriken kurşun, sedimentten fauna ve flora geçerek birikmektedir. Yapılan analizlerde, dilbalıkları gibi sedimentlerle beslenen balıklarda önemli miktarda kurşun miktarına rastlanmıştır [6].

Sularda meydana gelen kirlenme hiç şüphesiz insanların önemli besin kaynağını oluşturan su ürünlerinin etkilenmesine neden olmaktadır. Su ürünlerini teşkil eden balıklarda ve diğer canlılarda ağır metaller doğrudan su ile alındığı gibi onların besinlerini teşkil eden algleri yemeleri suretiyle de olmaktadır. Birçok alg türü bu ağır metalleri bünyesinde toplama yeteneğine sahiptir ve bu bitkilerin balıklar ve diğer canlılar tarafından alınması bu canlıların zarar görmesine neden olmaktadır [15].

Suyun insan hayatı için önemi hiç şüphesiz çok büyüktür. Bu önemli rezervin niteliği çeşitli kirleticilerle giderek bozulmaktadır. İnsanlar hava ve besin maddeleri ile ve içme suyu ile günde 0.3- 0.6 mg kurşunu bünyelerine almaktadır [15].

Deniz kirliliği çalışmaları, deniz ekosistemi için temel bilgilerin bulunmasıyla birlikte 1970' lerde başlamıştır. Evsel atıklar, endüstriyel atıklar, tarım ilaçları, böcek zehirleri, radyoaktif atıklar ve ağır metaller, deniz ve tatlısu kirliliğine neden olmaktadır. Demir, bakır, kobalt ve çinko gibi bazı metaller çoğu organizma için gerekliyken kadmiyum, kurşun, civa gibi ağır metaller yarar sağlamadıkları gibi genelde zararlı ve toksiktir [3].

### 2.3. Kurşun Kirliliğinin Canlı Organizmalar Üzerindeki Enzimler Üzerine Etkileri

Lipid peroksidasyonu, hücresel komponentleri zarara uğratar. Lipid peroksidasyonu otomatik katalitik bir yoldur ve membran poliansatüre yağasitlerini serbest radikal etkisi altında oksidasyona uğratar. Hayvansal ve biyomedikal çalışmalar, ağır metallerin birçok hastalık ve kimyasal toksisiteden sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır [7].

Ratların kadmiyum ile muamelesiyle böbrek ve testislerde lipid peroksidasyonu artmaktadır. 2 ppm kadmiyum konsantrasyonu ratların karaciğer ve böbreklerinde Glutasyon peroksidaz aktivitesini inhibe eder. Kurşun da özellikle korteks ve selebriumda olmak üzere beyinde lipid peroksidasyonuna neden olarak oksidatif bir role sahiptir [7].

Kurşun, proteinlere kovalet olarak bağlanarak, proteinlerin sülfidril gruplarının aktivitelerini inhibe etmektedir. İn vivo çalışmalar, kurşunun globin sentezini de inhibe ettiğini göstermiştir. Kurşun genellikle kemiklerde, kaslarda ve karaciğerde birikmektedir [5]. Kurşun düzenli kronik muamele sonucu, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonuna neden olan önemli bir toksikanttır. Bu sonuçlar ağır metallerin *G. polyedra* kloroplastlarında oksidatif stresi indüklediğini gösterdi [16].

Akut metalle muamele edilen hücrelerde, akut metal ve oksidatif stres arasındaki ilişki, yüksek oksijen oluşumundan dolayı, düşen redükte glutasyon miktarıdır [16].

Buna ilave olarak, stres altında birçok hücrede protein ve lipidlerde oksidatif hasarın arttığı görülmektedir. Kurşun kronik muamele sırasında protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli toksik maddedir.

Hidrojen peroksitin redükte metal iyonlarıyla reaksiyonu hidroksil radikali oluşturmasıdır. Kadmiyum, kurşun ve civa gibi redoks kapasitesi olmayan metaller, kalsiyuma bağlı sistemle aktive olan bir antioksidan olan glutasyon havuzunu azaltarak hücrede pro- oksidan durumu arttırabilir [16].

Kurşunun enzimleri inhibe ettiği ve lipid peroksitleri oluşumlarına bağlanarak biyolojik membranların yapısını değiştirdiği gözlenmiştir [17].

*Spirogyra fluviatilis* Hilse ve *Zygnema pectinatum* (Vauch) yapılan bir çalışmada 0.2, 20, 50, 100, 500, 1000 ppm.'lik kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve klorofildeki protein ve karbohidrat miktarında yüksek konsantrasyonlarda önemli azalmalar olmuştur [15].

#### **2.4. Tatlısu Amfipodlarının Toksikolojik Çalışmalardaki Önemi**

Akut toksisite testlerinde, toksik maddeler için genellikle amfipodlar en duyarlı organizmalar olarak kullanılmaktadır. Bu grup kimyasal kirlilikten ve ağır metal birikiminden de en fazla etkilenen grup olarak tespit edilmiştir. *Gammarus spp.*'lar sulara karışan çevresel kirleticilere balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çok çeşitli kirleticilere olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilibilmelerinden, çok sayıda toplanabilmesinden dolayı bu cinsin toksikolojik çalışmalardaki kullanımı giderek artmaktadır [6].

#### **2.5. Kurşunun Canlılardaki Diğer Biyokimyasal Etkileri**

Kurşunun vücut tarafından absorpsiyonu yavaş olmaktadır ve semptomlar geç ortaya çıkmaktadır. Genellikle kemiklerde, kaslarda ve karaciğerde birikir ve ürün ve feçesle atılır. Vücuttaki kurşunun %97'si eritrositlerde bulunmaktadır [5].

Kurşunun en önemli etkisi 'Hematopoetik sistem' üzerinedir. Kurşun eritrositlere ekstraselüler sıvı arasındaki su-elektrolit alışverişini bozarak, eritrositlerin su ve potasyum kaybetmesine neden olur. Eritrositlerin zar bütünlüğü bozulur, parçalanması kolaylaşır ve anemi oluşur. Kurşunun hematopoetik sistem üzerine etkisi ayrıca bazofil granülasyonlu eritrositlerin oluşumuna neden olur [1].

Kurşunun perifer sinir sistemindeki gangliotik sinaps, akson ve nöromusküler kavşaktaki iletimi etkilediği düşünülmektedir.

Kurşun böbrekler üzerini etkileyerek proksimal tubulustaki kurşun- protein kompleksini oluşturur. Glukoz, aminoasitler ve fosfatların emilimini azaltarak, idrarla atılımını artırır. Kurşun ayrıca hemoglobinin sentezinde gerekli enzimleri inhibe eder.

Kurşunla indüklenen anemi, hem sentezinde gerekli ALA-D enziminin kurşunla inhibe edilmesiyle başlar. Kurşun proteinlerin sülfidril ve ditiol gruplarına bağlanır, buda kurşunun dokulardaki toksisitesini açıklar. Bu dokular kurşunun toksik etkisi sayesinde özel hem proteinlerini içermez [1].

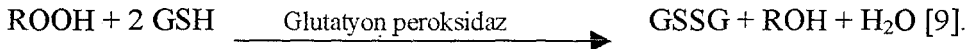
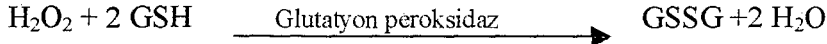
Kurşun özellikle membranların reseptör bölgesinde kalsiyumu taklit eder. Kalsiyumun yerine geçer ve nöromusküler ve sinaptik iletime zarar verir. Kurşunun en önemli etkisi nörotoksin olarak ortaya çıkmasıdır. Kurşun D vitamininin aktivasyonunu da inhibe etmektedir [18].

## 2.6. GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİMİ

### 2.6.1. Glutatyon Peroksidaz Enziminin Özellikleri ve Sınıflandırılması

Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. GSH-Px (glutatyon: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9)' in molekül ağırlığı yaklaşık olarak 85000 D'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolük bir enzimdir.

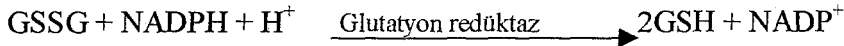
GSH-Px aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



R, alifatik yada aromatik organik bir grup olabilir. Ürünler su, bir alkol (veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat olarak görev yararsa ikincil bir su) ve glutatyon disülfid' dir [19].

GSH-Px' in selenolat formu (E-Se-) peroksit substratlarını alkole indirgerken, kendisi okside selenik aside dönüşür. Glutatyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfid'i (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyon'un selenosülfid'e bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken glutatyon okside hale dönüşür [9].

Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, Glutatyon redüktaz' ın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür [19].



GSH-Px dokuyu oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir; Hidrojen peroksit'i indirgeyen tepkimeyi, çok çeşitli organik peroksitleri su ve uygun alkollere indirgeyen tepkimeleri katalizler. Bu indirgenme tepkimesinde glutatyonun rolü

vardır. Glutasyonun sülfidril grupları reaksiyon sırasında elektron donörü olarak görev yapar ve bu esnada disülfid forma (GSSG) okside olur [8]. GSH-Px hem sitozolde hem de mitokondride bulunur. Enzim, hücreyi hücre membranında organik hasara karşı korur[20].

Glutasyon peroksidaz'ın iki ana tipi bulunmuştur: Birinci tip form selenyum içermesiyle ayırt edilir ki bu selenyum enzim proteinin aktif bölgesine selenosistin olarak kovalent bağlanır. Bu selenyum bağımlı enzim hem organik hidroperoksitlerle hem de hidrojen peroksit ile aktiftir. Sığır eritrositlerindeki bu enzim 80000 D ağırlığında tetramerik bir proteindir [19]. İkinci tip form selenyum içermez ve selenyum bağımsız Glutasyon peroksidaz olarak adlandırılır. Bu enzimin molekül ağırlığı 40000 D' dur. Dimer yapıda, yedi farklı formda altünite taşıyan ve sekiz izozimi bulunan bir proteindir. Se- bağımsız glutasyon peroksidaz substrat olarak organik hidroperoksitleri örneğin kümene hidroperoksiti kullanır. Se- bağımsız Glutasyon peroksidazlar Glutasyon-S-Transferazlardır. Bunlar, merkapturik asit oluşumunun ilk basamağında gözlenmiştir.

Aerobik hücrelerdeki çok sayıda kimyasal yol aktive edilmiş oksijen formlarıyla, peroksit oluşumuna neden olur. Peroksitler biyolojik dokularda oksidatif hasara neden olmaktadır. Tekil hidroperoksitler ve hidrojen peroksit Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz tarafından detoksifiye edilirler.

Linoleik asit, linolenik asit veya çeşitli prostoglandinler gibi poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen hidroperoksitler in vivo'da meydana gelebilir. Timin hidroperoksit, peroksit olmuş DNA gibi hidroperoksitlerin Glutasyon peroksidaz etkisi ile glutasyon tarafından indirgendiği kaydedilmiştir.

Lipid peroksidasyonu biyolojik yapılarda çok kompleks kimyasal bir yoldur. Bu proseste lipid peroksidasyonu glutasyonun varlığında bazı Glutasyon peroksidazlar tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [20].

## 2.6.2. Glutasyon Peroksidaz Enziminin Metabolik Fonksiyonları ve Canlılardaki Önemi

Glutasyon ve glutasyon enzimleri, lipid peroksiasyonunda düzenleyici ve antioksidan rollere sahiptir. Glutasyon peroksidaz, dokuları serbest radikal hasarına karşı korur [21].

Glutasyon peroksidaz'ın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte Glutasyon peroksidaz, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Glutasyon peroksidaz aktivitesi düşük olan makrofajlarda, solunum patlamasını takiben,  $H_2O_2$  salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de Glutasyon peroksidaz oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. Glutasyon peroksidaz aktivitesindeki azalma,  $H_2O_2$  artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar [9].

Eritrosit glutasyon peroksidaz aktivitesi, yaşlılarda ve Down sendromlularda yüksek bulunmuştur [9].

Göz merceği gibi birçok dokuda glutasyon peroksidaz hidroperoksitlere karşı en önemli savunma sistemidir. Araştırmalar hidrojen peroksidin katarakt oluşumunda etkili bir zarar verici ajan olduğu görülmüştür [22].

Yapılan bir çalışmada *Cutaneous leishmaniasis*'li hastalarda glutasyon peroksidaz aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Glutasyon peroksidaz aktivitesi CL'lu hastalarda %22 oranında düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Leishmania donovani*'li hastalarda glutasyon peroksidaz aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür [23]. Yapılan diğer bir çalışmada glutasyon peroksidaz'ın spesifik aktivitesi beynin çeşitli bölümlerinde Dopamin (3,4 – dihidroksifenilettilamin) ile beraber yüksek çıkmıştır. Dopamin oksidasyona maruz kalarak toksik intermediyetlere dönüştüğü gözlenmiştir [24]. Yine yapılan bir çalışmada yaşlanmış karaciğer ve böbrekte, glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutas aktivitesinde kayda değer bir düşüş görülmüştür. Sonuçlar yaşlanmayla beraber karaciğer ve böbreklerde antioksidatif savunmanın düştüğünü gösterilmiştir [25].



Glutasyon peroksit ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etki gösterir. Enzim teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller [9].

Glutasyon peroksidaz, antioksidan kapasitesinden ve kanseri engellemesindeki muhtemel rolünden dolayı, uzun zamandan beri ökaryot biyokimyasında önemlidir. Bununla beraber benzer enzimler prokaryotik sistemlerde az çalışılmıştır. Sadece üç tane prokaryotik glutasyon peroksidaz homolog genleri (*Neisseria meningitis*, *E. Coli*, *Bacillus subtilis*) bulunmuştur. *N. meningitis*'de gpx- A adında, bir gen bulundu. Bildiğimiz kadarıyla bu enzim henüz izole edilmedi. Çoğu bilinen glutasyon peroksidaz proteinleri selenyum bağımlıdır fakat gpx-A geninin ürünü GPX-H selenyum bağımlı değildir çünkü bu enzimde selenosistini kodlayan TGA kodonu yoktur. Şimdiye kadar bu enzimin aminoasitlerinin %35'i biliniyor ve %55'i ökaryotik Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz enzim proteinlerine benzerlik gösterir [26].

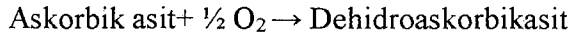
## 2.7. GLUTATYON

### 2.7.1. Glutasyon'un Kimyasal Yapısı

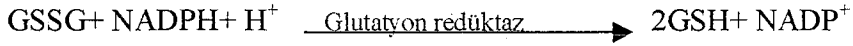
Tabiatta çok yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. İlk olarak glutamil-sistein'den ibaret bir dipeptid olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929 yılında kristal halde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmıştır. 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından  $\delta$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentez edilmiştir.

Pekçok proteolitik enzimler glutasyonu etkilemez. Yalnız pankreatik karboksipeptidaz glisini koparır., fakat glutamik asidi etkilemez.

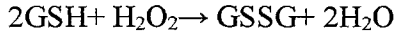
Kısaca redükte glutasyon GSH olarak gösterilmektedir. Bitkiler tarafından oksijen alınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Oksijen askorbik asitle birleşir ve dehidroaskorbik asit (DHA) meydana gelir. Sonra bu DHA glutasyon ile redüklenerek askorbik asit meydana gelmektedir.



İki glutatyon disülfid bağı ile birleşir ve okside glutatyon (GSSG) meydana gelir. Daha sonra bu molekül pentoz fosfat yolunda sentezlenen NADPH+ H<sup>+</sup> ile glutatyon redüktaz ile redükte hale geçer.



Glutatyon her hücrede bulunmaktadır ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruduğu kabul edilmektedir. Özellikle eritrositleri peroksitlere karşı korur. Glutatyon peroksidaz bu reaksiyonda rol oynar.

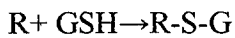


Tekrar bu okside bileşik glutatyon redüktaz ile redüklenmektedir[8].

### 2.7.2. Glutatyon'un Klinikteki Önemi

Glutatyon birçok enzim için gereklidir. Glutatyon ve glutatyon redüktaz enzimi, birçok proteinlerin ve polipeptid hormonların doğru disülfid bağlarının oluşumuna iştirak ederler.

Potansiyel olarak bazı zehirli elektrofilik ksenobiyotikler aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.



Burada R elektrofilik ksenobiyotiklerdir.

Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalar; DNA, RNA veya hücre proteinleri ile kovalent olarak birleşmekte serbest olacaklar ve sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi. Bundan dolayı GSH, bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı bir savunma mekanizmasıdır. Karaciğer gibi dokularda GSH düzeyi düşürülürse o zaman böyle dokuların normalde GSH ile konjuge olması gereken, mutelif kimyasal maddelerin yol açacağı hasara daha yatkın oldukları gösterilebilir.

İnsan hücrelerinde glutatyonun ksenobiyotik mekanizmasındaki rolü birtarafa, diğer bazı önemli fonksiyonları da vardır:

1. Glutatyon peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksidin dekompozisyonuna katılır.
2. Enzimlerin çok önemli grupları olan -SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmasına yardım eden önemli bir intraselüler redüktördür. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan -SH okside olur ve glutatyonun diğer bir molekülüyle bir disülfid köprüsü oluşur.



GSSG ürünü okside glutatyondur. Gerektiğinde GSSG' de NADPH'ı kullanan bir reaksiyon ile glutatyon redüktaz tarafından GSH' a redüklenebilir[27].

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Deneyde Kullanılan Canlıların Sağlanması ve Laboratuvar Koşullarında Yetiştirilmesi

Deneyde kullandığımız *Gammarus spp.*'lar Porsuk nehrinden (Eskişehir regülatör bölgesi) toplanmıştır ve Anadolu Üniversitesi Teknoloji ve Araştırma Parkı, biyoloji araştırma laboratuvarına getirilmiştir.

Doğal ortamlarından alınan *Gammarus spp.*'lar su ve toprakla hazırlanmış akvaryumlarda (15 lt) uygun sıcaklık(10-12 °C) ve hava akımı verilerek laboratuvar şartlarına alışmaları sağlanmıştır. Canlılar ortamlarından alınan topraktan ve verilen organik besinlerle beslenmişlerdir. Canlılara 20-25 günde bir organik besin verilmiştir.

Deneylerde 5-8 mm arası organizmalar kullanılmıştır ve deney için ayrılan bir litrelik akvaryumlarda deney koşullarına tabi tutulmuştur. Canlılara deneyden önce besin verilmemiştir. Deney süresince hergün organizmaların hareketli olanları gözlenmiş, hareketsiz olanlar deneye alınmamıştır.

#### 3.2. Deneyde Kullanılan Metal Çözeltileri

Kurşun çözeltisi, kurşun asetat şeklinde saf suda çözülerek kullanılmıştır. Stok çözelti; 10 mg kurşun asetat, 100 ml distile suda çözündürülerek hazırlanmış ve canlıların bulunduğu akvaryumlara (1 lt'lik) (EC<sub>50</sub>) olarak verilmiştir. Çinko, bakır ve magnezyum içeren çözeltiler ise çinko klorür, bakır klorür ve magnezyum klorür şeklinde deiyonize suda çözülerek hazırlanmış ve deneylerde kullanılmıştır.

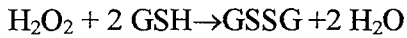
### 3.3. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz Enzim Aktivite Tayini

#### 3.3.1. Homojenatın Hazırlanması

Deney için uygun görülen (5-8 mm arası) *Gammarus spp.*lardan 1 tanesi 500µl potasyum fosfat tamponunda (5 mM EDTA Ph: 7), buz içinde Janke&Kunkel Ultra Turrax T25 homojenizatörde 8000 devir/dakika'da homojenize edildi. Elde edilen homojenat Herraus Sepatec Biofuge 20 RS soğutmalı santrüfujde 20000 rpm'de 0°C'de 15 dakika santrüfuj edildi. Se- bağımlı ve Se- bağımsız Glutasyon peroksidaz aktivitesi için enzim kaynağı olarak elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır.

#### 3.3.2. Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. GSH-Px dokuyu oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir; Hidrojen peroksit'i indirgeyen tepkimeyi, çok çeşitli organik peroksitleri su ve uygun alkollere indirgeyen tepkimeleri katalizler.



Bu reaksiyonda Se-bağımlı Glutasyon peroksit için azalan hidrojen peroksit miktarına, Se-bağımsız Glutasyon peroksit için azalan kümene hidroperoksit miktarına bakılır. Bu maddeler Glutasyon peroksidaz enzimleri için substrat durumundadır.

### Çözeltiler:

1. Tampon: Potasyum fosfat 50 mM, PH:7, EDTA 5 mM
2. Na Azide (NaN<sub>3</sub>) 1 Mm
3. Redükte Glutasyon (GSH) 2 mM
4. GSSG redüktaz 1 ünite/ ml
5. a. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.25 mM  
b. Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz için kümene hidroperoksit 1.5 mM
6. NADPH 0.2 mM

Spektrofotometrede 340 nm'de, hazırlanan reaksiyon tüplerindeki absorbands değerleri okunmuştur.

### **3.4. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz- Kurşun Etkileşimi**

#### **3.4.1. Kurşun İle Muamele Edilmiş *Gammarus pulex*' de Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin İncelenmesi**

Kutlu [6]' ya göre kurşunun (EC<sub>50</sub>) konsantrasyonu 4, 8, 16, 32, 64, 96 saatlik deney grupları şeklinde uygulanmıştır. Her deney grubuna 10' ar canlı kullanılmıştır. Uygulanan zaman periyotları sonucunda sağ kalan canlılar ve ölenler tespit edilmiştir. Canlı kalanlar deneyde kullanılarak Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesinin zamana göre değişimi incelenmiştir.

### **3.5. Se-bağımsız Glutasyon Peroksidaz- Kurşun Etkileşimi**

#### **3.5.1. Kurşun İle Muamele Edilmiş *Gammarus pulex*' de Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin İncelenmesi**

Kutlu [6]' ya göre kurşunun (EC<sub>50</sub>) konsantrasyonu 4, 8, 16, 32, 64, 96 saatlik deney grupları şeklinde uygulanmıştır. Her deney grubuna 10' ar canlı kullanılmıştır.

Uygulanan zaman periyotları sonucunda sağ kalan canlılar ve ölenler tespit edilmiştir. Canlı kalanlar deneyde kullanılarak Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz aktivitesinin zamana göre değişimi incelenmiştir.

### **3.6. *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması**

#### **3.6.1. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine PH'nın Etkisi**

Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivite tayininde kullanılan potasyum fosfat tamponları , 1 M NaOH ve 1 M HCl eklenerek PH' ları 5, 6.5, 7, 7.2, 8, 9'a ayarlanarak deneyde kullanılmış ve enzimin optimum PH' sı belirlenmiştir.

#### **3.6.2. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz Aktivitesinin Kinetik Analizi**

*Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz'ının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirtmek amacıyla, farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis- Menten grafiği ile Line Weaver- Burke grafiğinde gösterilmiştir.

#### **3.6.3. *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi**

Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine  $Cu^{+2}$  iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz' ının  $Cu^{+2}$  ye duyarlılığı saptanmıştır.  $CuCl_2$  1 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

### 3.6.4. *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi

Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine  $Zn^{+2}$  iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz'ının  $Zn^{+2}$  ye duyarlılığı saptanmıştır.  $ZnCl_2$  1 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

### 3.7. *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

#### 3.7.1. Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine PH'nın Etkisi

Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivite tayininde kullanılan potasyum fosfat tamponları , 1 M NaOH ve 1 M HCl eklenerek PH' ları 5, 6.5, 7, 7.2, 8, 8.5, 9'a ayarlanarak deneyde kullanılmış ve enzimin optimum PH' sı belirlenmiştir.

#### 3.7.2. Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz Aktivitesinin kinetik Analizi

*Gammarus spp.* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz'ının  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirtmek amacıyla, farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis- Menten grafiği ile Line Weaver- Burke grafiğinde gösterilmiştir.

#### 3.7.3. *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine $Cu^{+2}$ İyonlarının Etkisi

Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine  $Cu^{+2}$  iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon



peroksidaz' ının  $\text{Cu}^{+2}$  ye duyarlılığı saptanmıştır.  $\text{CuCl}_2$   $1\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

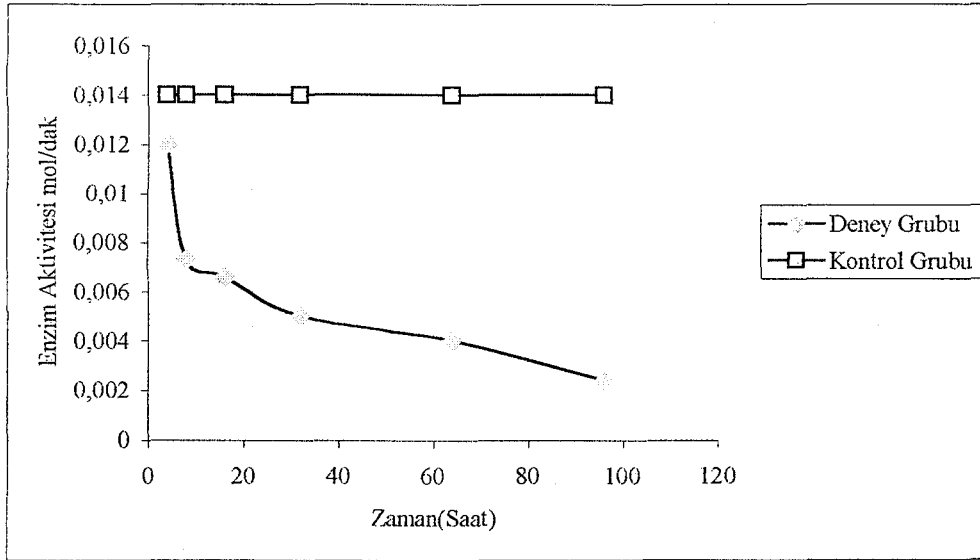
#### **3.7.4. *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz Aktivitesi Üzerine $\text{Zn}^{+2}$ İyonlarının Etkisi**

Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine  $\text{Zn}^{+2}$  iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz' ının  $\text{Zn}^{+2}$  ye duyarlılığı saptanmıştır.  $\text{CuCl}_2$   $1\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz Enziminin Kurşun asetat'ın ( $EC_{50}$ ) Konsantrasyonuna Karşı Değişen Zaman aralığına Bağlı Aktivite Değişimi

Kurşun asetat'ın ( $EC_{50}$ ) değeri uygulanmış *Gammarus pulex*'lerde Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesi, uygulamadan itibaren 4., 8., 16., 32., 64., 96 saatlerde ölçülmüş ve bütün saatlerde kontrol grubuna göre aktivitenin düştüğü görülmüştür (Şekil 4.1.).

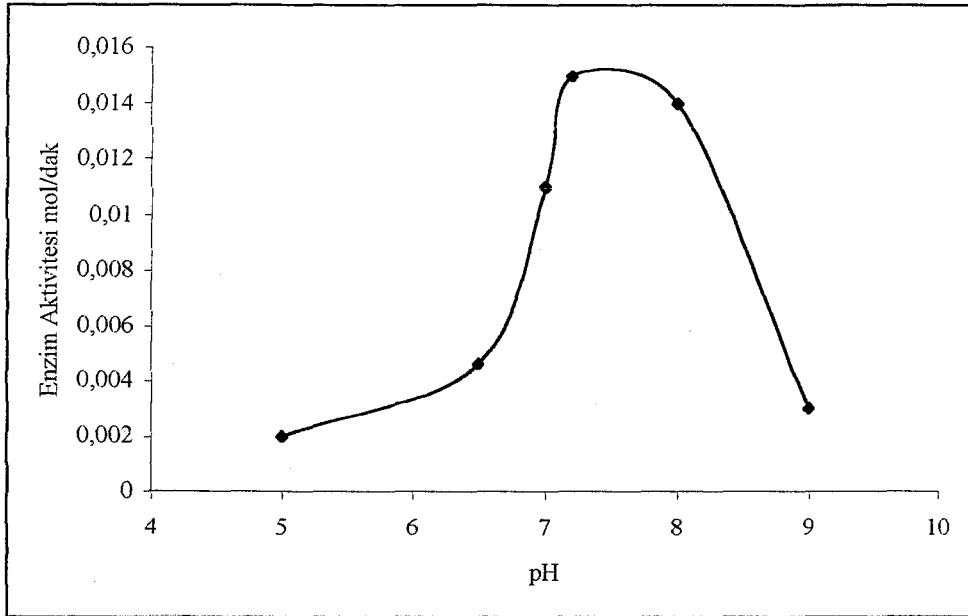


**Şekil 4.1.** *Gammarus pulex*'deki Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesinin kurşun asetatın ( $EC_{50}$ ) konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği

## 4.2 *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

### 4.2.1 Se-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

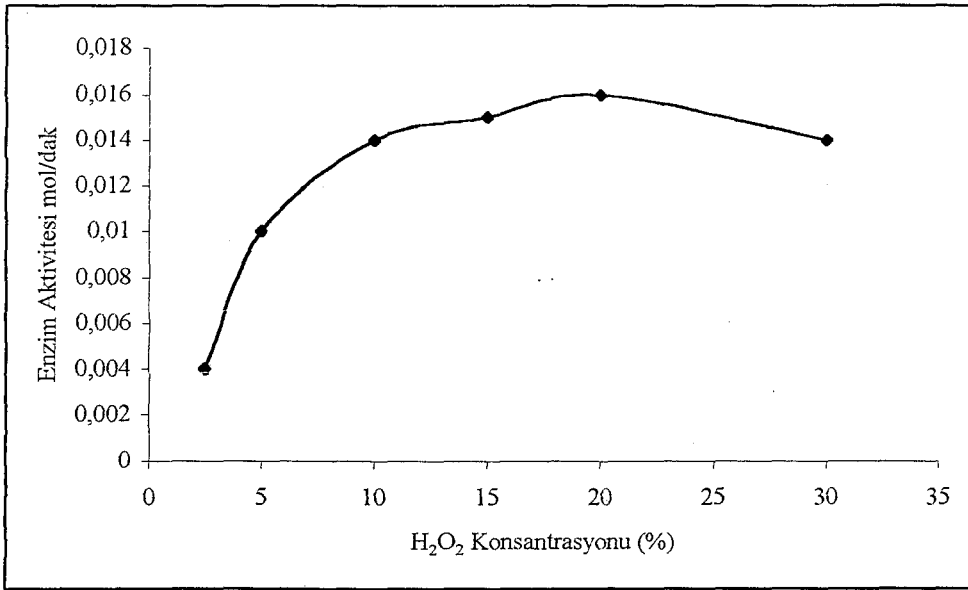
Farklı pH'ların *Gammarus pulex* enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için pH'ları 5.0, 6.5, 7.0, 8.0, ve 9.0 olan potasyum fosfat tamponları kullanılmıştır. Denenen bu pH'larda en yüksek aktiviteye pH 7.2-8.5 arasında rastlanmıştır (Şekil 4.2.1.).



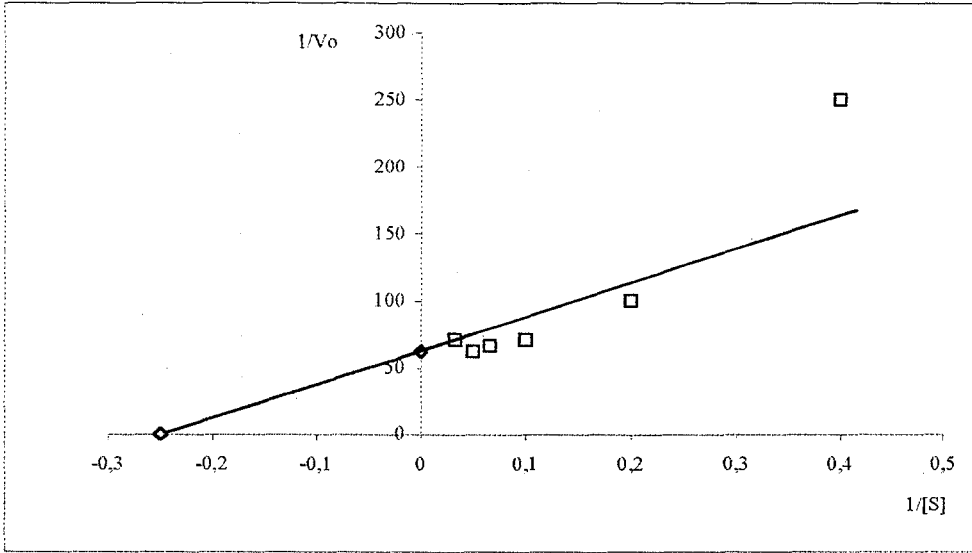
Şekil 4.2.1. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

#### 4.2.2 Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Kinetik Analizi ve $K_m$ Değerinin Bulunması

*Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz'ının  $K_m$  değerini saptamak amacı ile değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzimin Michaelis-Menten hız grafiği ve Line-Weaver Burke grafiği çizilmiş ve  $K_m$  değeri 4,  $V_{max}$  değeri 0,016 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.2) ve (Şekil 4.2.3).



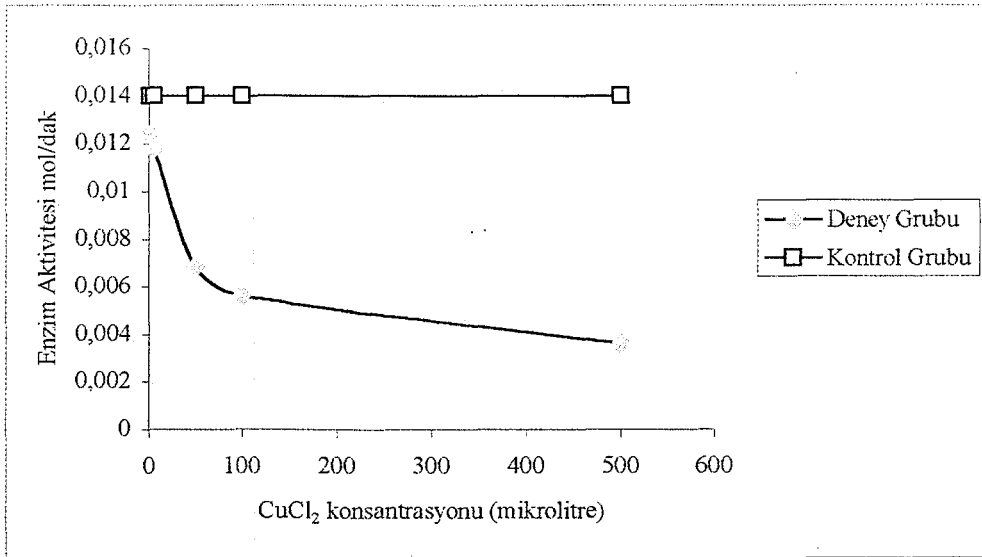
Şekil 4.2.2. Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz enziminin Michaelis-Menten hız grafiği



**Şekil 4.2.3.** Artan substrat konsantrasyonlarına karşı Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz enziminin Line-Weaver Burke hız grafiği

#### 4.2.4 *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine $\text{Cu}^{+2}$ İyonlarının Etkisi

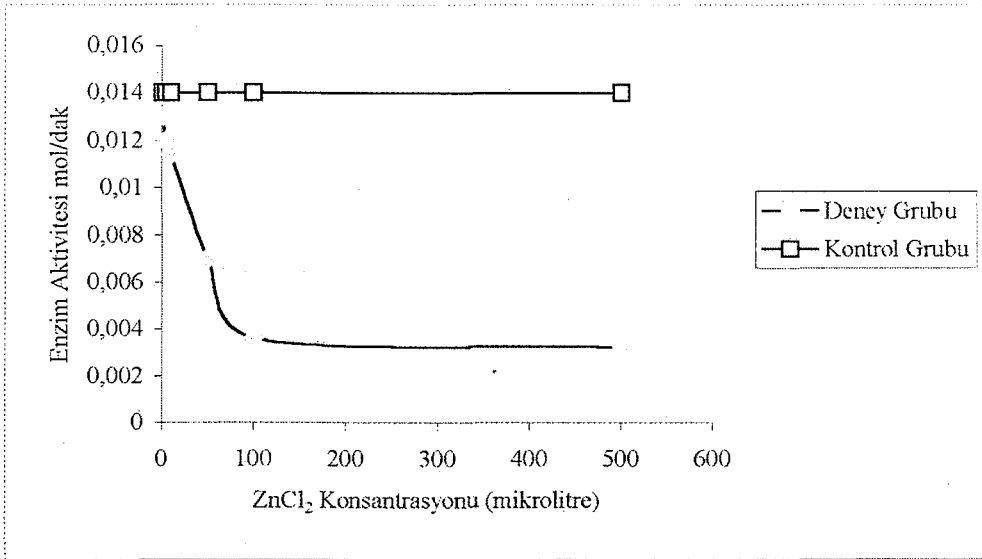
*Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının etkisini araştırmak amacı ile farklı  $\text{CuCl}_2$  konsantrasyonlarında ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  ve  $500\mu\text{M}$ ) aktiviteye bakılmıştır.  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre aktivitede azalma gözlenmiştir (Şekil 4.2.4)



Şekil 4.2.4.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu için *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesi

#### 4.2.5 *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi

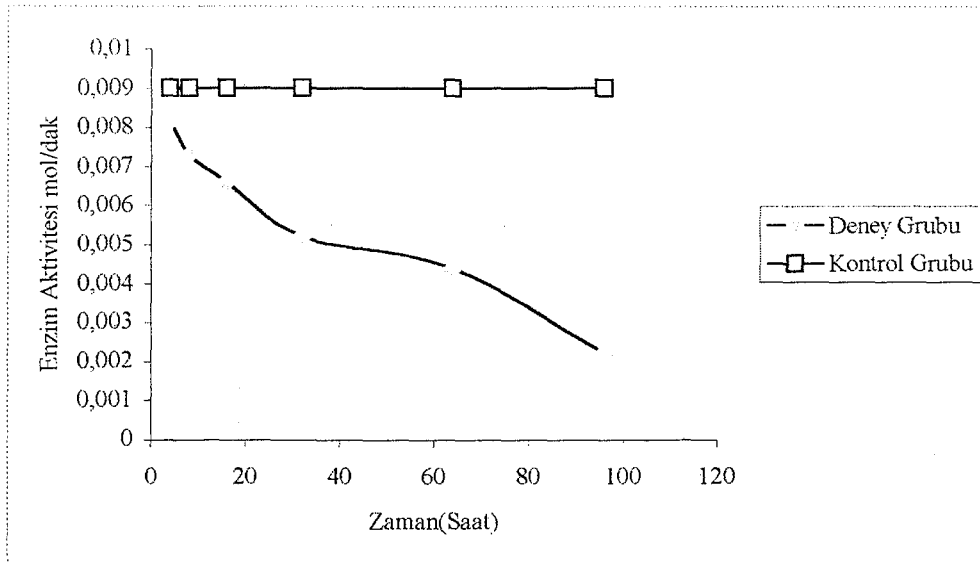
*Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine  $Zn^{+2}$  iyonlarının etkisini araştırmak amacı ile farklı  $ZnCl_2$  konsantrasyonlarında ( $1\mu M$ ,  $10\mu M$ ,  $50\mu M$ ,  $100\mu M$  ve  $500\mu M$ ) aktiviteye bakılmıştır.  $Zn^{+2}$ 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre aktivitede azalma gözlenmiştir (Şekil 4.2.5.).



Şekil 4.2.5  $Zn^{+2}$  iyonu için *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesi

### 4.3 *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz Enziminin Kurşun asetat'ın ( $EC_{50}$ ) Konsantrasyonuna Karşı Değişen Zaman Aralığına Bağlı Aktivite Değişimi

Kurşun asetat'ın ( $EC_{50}$ ) değeri uygulanmış *Gammarus pulex*'lerde Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesi, uygulamadan itibaren 4., 8., 16., 32., 64., 96 saatlerde ölçülmüş ve bütün saatlerde kontrol grubuna göre düşen aktivite görülmüştür (Şekil 4.3).



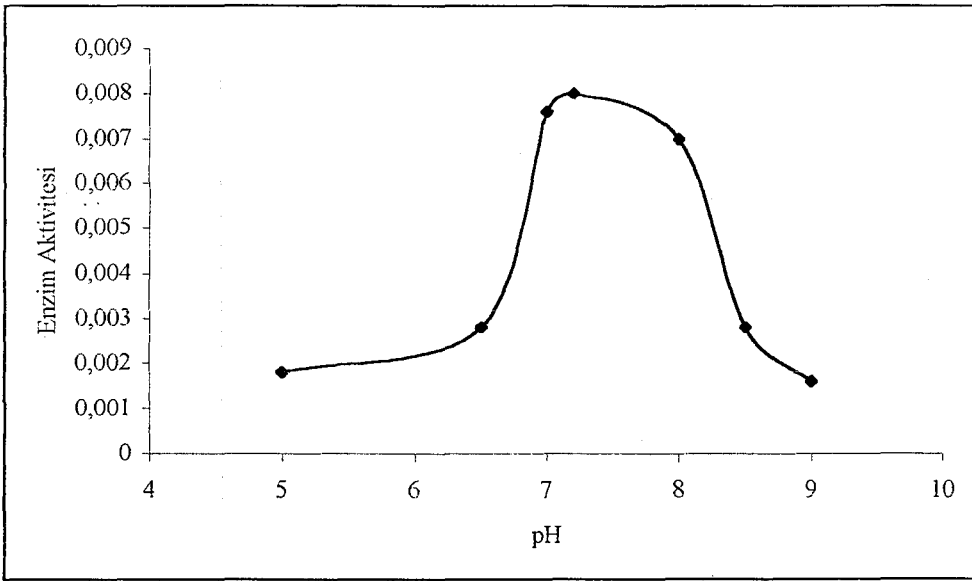
Şekil 4.3. *Gammarus pulex*' deki Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesinin kurşun asetatın ( $EC_{50}$ ) konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği



#### 4.4 *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon Peroksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

##### 4.4.1 Se-Bağımsız Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

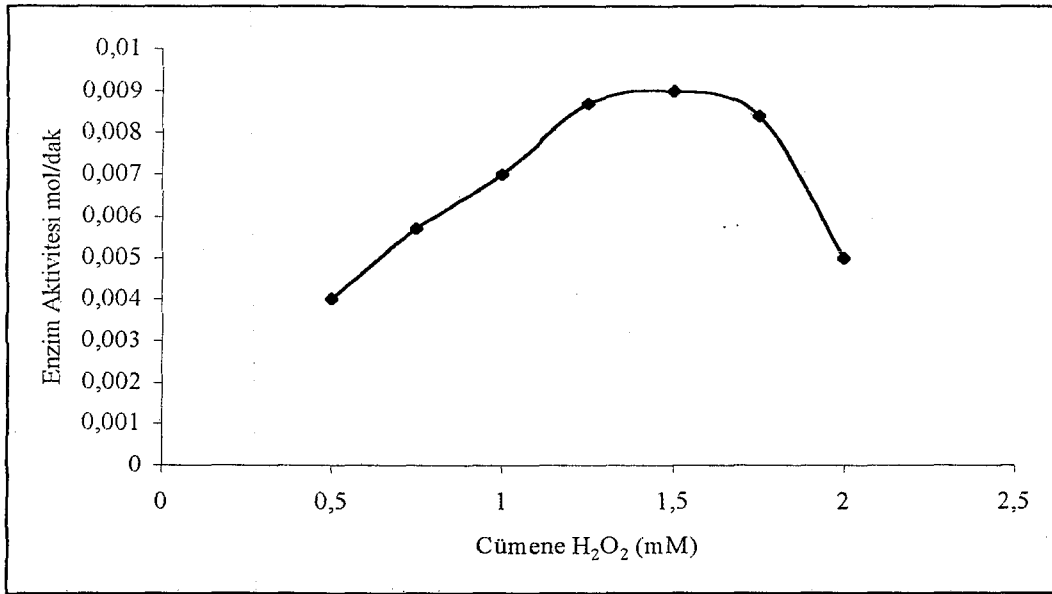
Farklı pH'ların *Gammarus pulex* enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için pH'ları 5.0, 6.5, 7.0, 8.0, ve 9.0 olan potasyum fosfat tamponları kullanılmıştır. Denenen bu pH'larda en yüksek aktiviteye pH 7.0-8.0 arasında rastlanmıştır (Şekil 4.4.1).



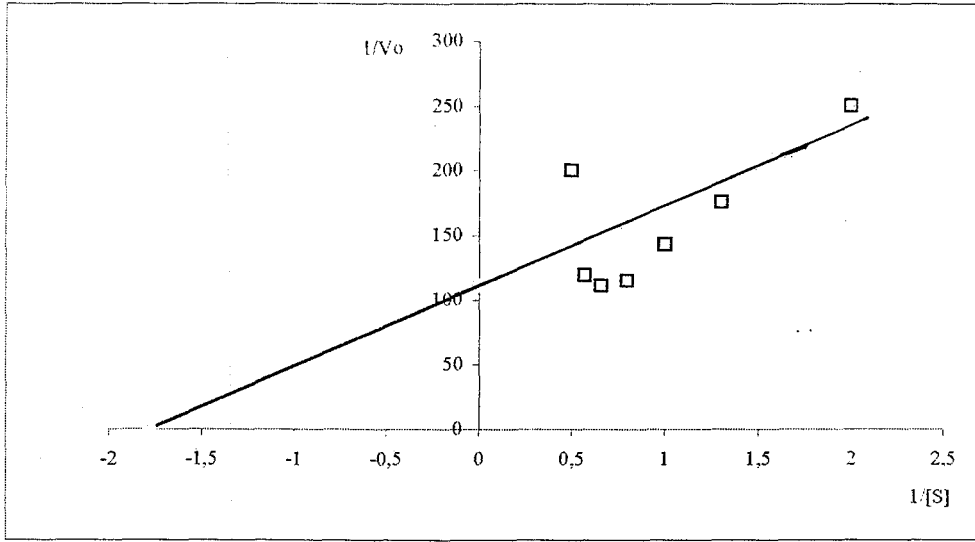
Şekil 4.4.1. Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

#### 4.4.2 Se-bağımsız Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Kinetik Analizi ve $K_m$ Değerinin Bulunması

*Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz'ının  $K_m$  değerini saptamak amacı ile değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzimin Michaelis-Menten hız grafiği ve Line-Weaver Burke grafiği çizilmiş ve  $K_m$  değeri 0,56 ve  $V_{max}$  değeri 0,009 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4.2) ve (Şekil4.4.3).



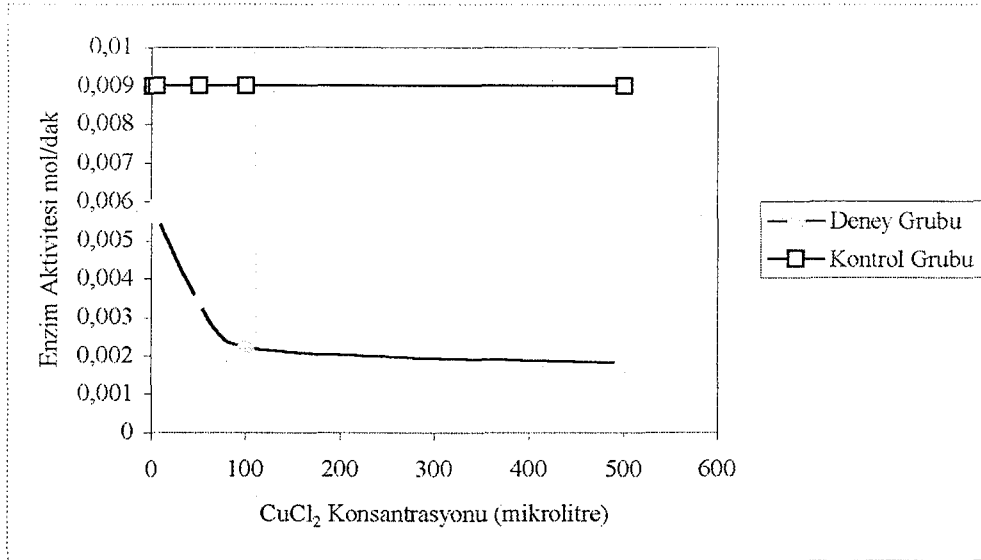
Şekil 4.4.2. Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz enziminin Michaelis-Menten hız grafiği



**Şekil 4.4.3.** Artan substrat konsantrasyonlarına karşı Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz enziminin Line-Weaver Burke hız grafiği

#### 4.4.4 *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine $\text{Cu}^{+2}$ İyonlarının Etkisi

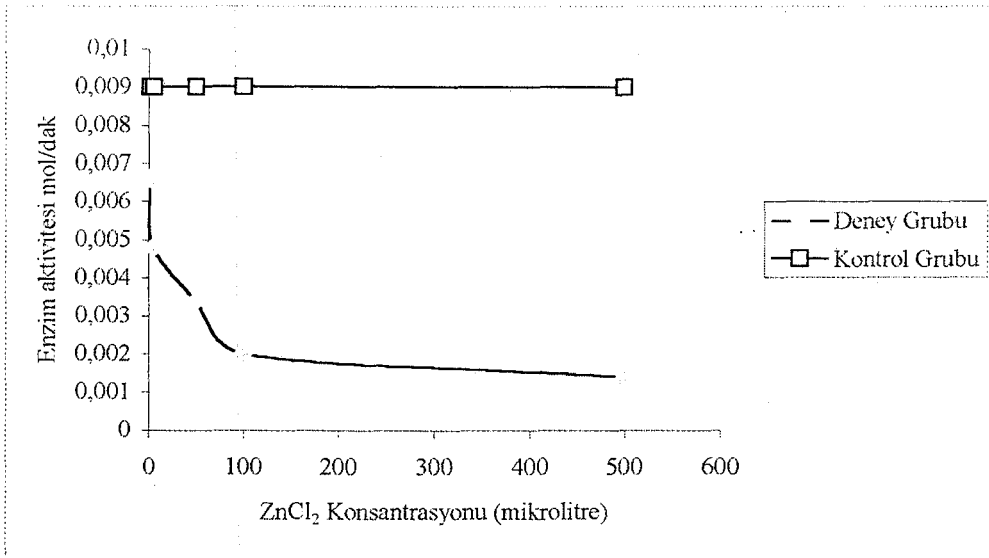
*Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının etkisini araştırmak amacı ile farklı  $\text{CuCl}_2$  konsantrasyonlarında ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  ve  $500\mu\text{M}$ ) aktiviteye bakılmıştır.  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre aktivitede azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4.4).



Şekil 4.4.4.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu için *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesi

#### 4.4.5 *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine $Zn^{+2}$ İyonlarının Etkisi

*Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine  $Zn^{+2}$  iyonlarının etkisini araştırmak amacı ile farklı  $ZnCl_2$  konsantrasyonlarında ( $1\mu M$ ,  $10\mu M$ ,  $50\mu M$ ,  $100\mu M$  ve  $500\mu M$ ) aktiviteye bakılmıştır.  $Zn^{+2}$ 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre aktivitede azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4.5).



Şekil 4.4.5.  $Zn^{+2}$  iyonu için *Gammarus pulex* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz aktivitesi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sucul ortamdaki kirleticilerin omurgasız canlılar üzerindeki etkilerini inceleyerek akut toksisiteleri hakkında bilgi edinmek çok önemlidir. Amphipoda grubu toksik kimyasallara karşı akut toksisite testlerinde kullanılan en hassas canlı gruplarından biridir. *Gammarus*'ların su ortamlarında bol bulunması ve kolaylıkla toplanarak yaşatılabilmeleri büyük avantaj sağlamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki; tatlı su Gammaridleri çok çeşitli kimyasallara karşı duyarlıdır [28]. Aynı zamanda US EPA kaynaklarına göre de bu genus kadmiyum, bakır ve kurşun gibi ağır metal kirliliğine karşı da hassasiyet göstermektedir[29]. Bizde çalışmamızda bu ağır metallere karşı olan kurşun asetat'ın, hücrede radikal formasyonuna karşı hücresel ajan olarak rol oynayan bir enzim olan Glutasyon peroksidaz'ın biyokimyasal özelliklerini ortaya çıkarmaya çalıştık.

Bu çalışmada öncelikle, çevre kirliliğinde indikatör olarak kullanılabilen omurgasız canlılardan *Gammarus spp.* 'da Glutasyon peroksidaz enziminin Pb ile olan inhibisyonu gösterilmiş ve kurşun kirliliğinde *Gammarus spp.* Glutasyon peroksidaz'ının bir biyolojik indikatör olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Kutlu'ya göre doz tarama çalışmaları sonucu bulduğumuz  $EC_{50}$  değeri *Gammarus spp.*'lara uygulanarak, kurşunun *in vivo*'da Glutasyon peroksidaz enzimi üzerine olan inhibe edici etkisi saptanmış ve inhibisyonunun zamana göre değişimi incelenmiştir. Kurşun ile muamele edilen *Gammarus spp.*'larda Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz inhibisyonunun zaman ile doğru orantılı olarak artışı, kurşun uygulanmasının 4., 8., 16., 32. ve 64. saatler sonundaki enzim aktiviteleri ölçülerek saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda *Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutasyon peroksidaz'ın optimum aktivitesi 7.2-8.5 arasında ve Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz'ın optimum aktivitesi 7-8 civarında bulunmuştur.

Kinetik çalışmalar sonucu çizilen Michaelis-Menten grafiğinde, enzimin sigmoidal bir eğri izlediği saptanmıştır. Böyle bir eğri, enzimin allosterik olduğunu göstermektedir. Allosterik enzimlerde V reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna (S)

göre grafiklenecek olursa sigmoid şekilde bir eğri elde edilir. Bu sonuç bize allosterik enzimlerde birden fazla bağlanma bölgesi olduğunu göstermektedir. Birinci substratın enzime bağlanmasından sonra ikinci substratın enzime bağlanması hızlanmaktadır [30].

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu durum Glutasyon peroksidaz enziminin önemini açıklaması açısından oldukça önemlidir [9].

Yaptığımız çalışmada  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonlarının Se-bağımlı ve Se-bağımsız Glutasyon peroksidaz enzim aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Adı geçen bu iyonların efektif bir inhibitör olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *Gammarus spp.*'deki Glutasyon peroksidaz enziminin biyokimyasal özellikleri genel olarak araştırılmıştır. Çalışmanın özünde tür ayırımına gidilmemiştir. Bu çalışmanın ileride yapılacak ve farklı *Gammarus* türlerinin test organizması olarak kullanılacağı çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

## 6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1]. Vural, N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye, 315-323 (1984).
- [2]. Öztürk, M., 'Sinop'un koy ve limanlarında yayılım gösteren *Patella coerulea* L. ve *Enteromorpha linza* L. J. Agardh türlerindeki ağır metal düzeyleri, Tr. J. of Biology, **18**, 195-211 (1994).
- [3]. Poyraz, İ., 'Çeşitli çevresel kirleticilerin *Gammarus pulex*'deki Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin incelenmesi', Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü., Eskişehir, Türkiye, (2001).
- [4]. Uysal, H. ve Bahçeli, Z., 'Kurşun nitrat'ın *Drosophila melanogaster*'in gelişimi üzerine etkileri' Tr. J. of Biology, **21**, 1-10 (1997).
- [5]. Güler, A.H., Müreva, R. ve Özkan, K., 'The determination of blood lead in province of Bursa' Trace 89, 603-607 (1987).
- [6]. Kutlu, M., 'Gammarus spp. Gama-aminolevulinik asit dehidrataz enziminin kurşun ile olan inhibisyonu ve bazı biyokimyasal özellikleri' Doktora tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, (1996).
- [7]. Gabor, S., 'Trace elemets and lipid peroxidation' Trace 89, 273-277 (1986).
- [8]. Dawn, B., Marks, A. D., ve Colleen, M. S., Basic Medical Biochemistry, **1**, 337 (1995).



- [9]. Akkuş, İ., '*Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*', 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fak., Mimoza Yayınları, Samsun, Türkiye, (1995).
- [10]. Güvendik, G., Vural, N., ve Kumbur, H., '*The comperason of blood lead levels of the population living in Mersin (İçel) and Ankara*', Trace 89, 323-325 (1985).
- [11]. Manser, W. W. T., Haider, S., Laloni, R., Khan, M. A., ve Zubari, S., '*Blood lead levels in Karachi population*', Trace 89, 247-251 (1988).
- [12]. Michael, D. La Grega., Phillip L., ve Buckingham, J.C. Evans., '*Hazardous waste management*', 1, 294-296 (1993).
- [13]. Yakupoğlu, D., '*Alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile Cichorium intybus L. bitkisinde hayvansal kaynaklı kurşun kirliliği analizi*', Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D., Ankara, Türkiye, (1998).
- [14]. Kutlu, H. M., '*Çeşitli çevresel kirleticilerin Gammarus pulex'de neden olduğu toksik etkilerin enzimatik ve elektron mikroskopik açıdan değerlendirilmesi*', Proje Ana: 97/ 11, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye, (2001).
- [15]. Saygıdeğer, S., '*Yeşil alglerden Spirogyra fluviatilis Hilse ve Zygnema pectinatum'da kurşun biyoakümülyasyonu ve toksisitesi*', Tr. J. of Biology 21, 343-352 (1997).
- [16]. Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorre, L.R., Bechara, E.J.H., ve Colepicalo, P., '*Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal cloroplasts*', Arch. Environ. Contam. Toxicol., 40 , 18-24 (2001).

- [17]. İlio, D. C., '*Glutathione peroxidase, glutathione S-peroxidase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue*', *Cancer letters*, **29**, 37-42 (1985).
- [18]. Tatcher, R.W., Lester, M.L., McAlaster, R., ve Horst R., '*The adverse effect of lead*' *Arch. Environ. Health*, **37**, 159-66 (1982).
- [19]. Meister, A., *Methods In Enzymology*, **113**, 490-493 (1985).
- [20]. Fışkın, K., '*The effects of sodium selenit on the antioxidative defence mechanism of human hepatoma G<sub>2</sub> cells*', *Türk, J. Med. Sci.*, **30**, 203-207 (2000).
- [21]. Atroshi, F., ve Westermarck T., '*Trace elements and glutathione enzymes in inflammation*', *Trace* **98**, 575-578 (1989).
- [22]. Spector, A., Wilson, S.R., ve Zucker, P.A., '*Compounds having GSH-Px activity and use there of*', *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 1-23 (1991).
- [23]. Koçyiğit, A., Erel, Ö., Gürel, M. S., Seyrek, A., Aktepe, N., Gür, S., ve Avcı, S., '*Decreasing selenium levels and GSH-Px activity in patients with Cutaneous leishmaniasis*', *Tr. J. of Medical Sciences*, **29**, 291-295 (1999).
- [24]. Yashikuni, M., ve Keiko, O., '*Effects of ascorbic acide on cronic lead toxicity to young rats*', *Journal of Neurochemistry*, **46**, 1344-1352, (1986).
- [25]. Cond, F., ve Verdeti, J., '*SOD, GSH-Px, CAT and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats*', *Free radical biology, Medicine*, **7**, 59-63 (1989).

- [26]. Moore, T.D., ve P.F. Sparling., '*Proposal for further study of the homolog of GSH-Px found in Neisseria meningitidis*', *Infect Immun.*, **63**, 1603-1607 (1995).
- [27]. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., ve Radwell, V.W., *Harper's Biochemistry*, 706-707 (1993).
- [28]. Arthur, J.W., '*Review of freshwater bioassay procedure for selected amphipodas*', *ASTM, STP 715, A.L.*, 98-108 (1980).
- [29]. Diamond, J.W., Graney, L.R., ve Haslam, S.M., '*Use of an integrated monitoring approach to determine site specific effluent metal limits*', *Water Environ*, **36**, 119-133, (1994).
- [30]. Gözükara, M.E., *Biyokimya*, **1**, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Evin Matbaası, Malatya, Türkiye, (1994).