

Palaemonetes turcorum (Holthuis,1961) (Decapoda)'da
 **δ -AMİNOLEVULİNİK ASİT DEHİDRATAZ ENZİMİNİN
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık – 2005

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İbrahim Hakkı CİĞERCİ' nin "*Palaemonetes turcorum* (Holthuis,1961) (Decapoda)'da δ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz Enziminin Biyokimyasal Karakterizasyonu" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. H. Mehtap KUTLU

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye : Prof. Dr. Muhsin KONUK

Üye : Yard. Doç. Dr. Hüseyin BERBER

Üye : Yard. Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Palaemonetes turcorum (Holthuis,1961) (Decapoda)'da δ -AMİNOLEVULİNİK ASİT DEHİDRATAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. H. Mehtap KUTLU
2005, 61 sayfa

Bu tezde yurdumuz için endemik olan *Palaemonetes turcorum*'da δ -Amino Levulinik Asit Dehidrataz (ALAD; Porfobilinojen sentaz; E.C.4.2.1.24) enziminin kurşun ile etkileşimi ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Palaemonetes turcorum'da, kurşun asetat için LD₅₀ değeri 0.135 mM olarak bulunmuştur. Bu değer *Palaemonetes turcorum*'lara uygulanarak, kurşun asetatın *in vivoda* ALAD üzerine olan inhibe edici etkisi saptanmış ve zamana göre değişimi incelenmiştir. Zamana bağlı olarak enzim inhibisyonunun ve karaciğerdeki kurşun miktarının arttığı saptanmıştır.

Palaemonetes turcorum ALAD'ının optimum pH'sı 7 civarında ve enzimin ısıya dayanıklı olduğu (55°C) bulunmuştur. Kinetik analizler sonucu V_{max} değeri 22.83 nmol/PBG/saat/mg protein ve K_m değeri 0.06 mmol/reaksiyon karışımı olarak bulunmuştur. Mg⁺² ve Mn⁺² enzim aktivitesini artırırken Zn⁺²'nin aktiviteyi etkilemediği, EDTA'nın ise aktiviteyi azalttığı saptanmıştır.

Amonyum sülfat ve Sephadex G-200 jel ortamı ile yapılan işlemlerden sonra enzim 51 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAJE ile yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının moleküler ağırlığı 237.6 kDa ve bir alt ünitesinin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Enzim, *Palaemonetes turcorum*, ALAD, kurşun asetat, SDS-PAJE

ABSTRACT

PhD Thesis

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION of δ -AMINOLEVULINIC ACID DEHYDRATASE in *Palaemonetes turcorum* (Holthuis, 1961) (Decapoda)**İbrahim Hakki CİĞERCİ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Department****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
2005, 61 pages**

In this thesis, it has been aimed to determine the inhibition of δ -Aminolevulinic acid dehydratase enzyme (ALAD; Porphobilinogen synthase; E.C.4.2.1.24) in *Palaemonetes turcorum*, endemic for Turkey, with lead and the enzyme's biochemical features.

LD₅₀ value for lead acetate was found 0.135 mM at *Palaemonetes turcorum*. The inhibition effect of lead acetate on ALAD was determined *in vivo* by the application of the value to *Palaemonetes turcorum* and the change of the effect was examined according to time. It was also observed that the inhibition of the enzyme and the amount of the lead in liver increased.

It was found out that the optimum pH of *Palaemonetes turcorum* ALAD was about 7 and the enzyme was resistant to heat (55⁰C). As a result of kinetic analyses, the V_{max} value and K_m value were found out to be 22.83 nmol/h/mg protein and 0.06 mmol/reaction mixture, respectively. It was determined that while Mg⁺² and Mn⁺² increased the enzyme activation, Zn⁺² did not affect the activity, but EDTA decreased the activity.

The enzyme was purified 51 fold with ammonium sulphate and Sephadex G-200 gel medium. As a result of the study held with SDS-PAGE, the molecular weight of the purified *Palaemonetes turcorum* ALAD and its subunit molecular weight were found to be 237.6 kDa, 35.6 kDa, respectively.

Keywords: Enzyme, *Palaemonetes turcorum*, ALAD, lead acetate, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca yardımını, bilgisini, güler yüzünü ve ilgisini esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Doç.Dr. H. Mehtap KUTLU'ya,

Çalışmamın her aşamasında engin bilgisinden faydalandığım, yardımını ve ilgisini benden esirgemeyen, bana çok şey kattığına inandığım ve pek çok konuda örnek aldığım sayın hocam Prof.Dr. Musin KONUK'a,

Güler yüzlerini ve ilgilerini esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr. Ahmet ÖZATA ve sayın Yrd.Doç.Dr. Filiz SUSUZ'a,

Laboratuvar çalışmalarında ve yazım aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. S.Elif KORCAN ve arkadaşlarım Arş.Grv.Volkan KILIÇ, Recep LİMAN, Engin TAŞ ve Yasin EREN'e

Maddi ve manevi her konuda destek olan, varlıkları ile bana güç veren aileme, eşime ve kızım Ceylin'e teşekkür ederim.

İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Aralık 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağır Metallerden Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı.....	3
2.2. Kurşunun Sucul Canlılar Üzerindeki Toksik Etkileri	4
2.2.1. Akvatik bitkiler üzerine toksisitesi	5
2.2.2. Akvatik omurgasızlar üzerine toksisitesi	5
2.2.3. Balıklar üzerine toksisitesi	8
2.2.4. Amfibiler üzerine toksisitesi	10
2.3. Kurşunun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	11
2.4. <i>Palaemonetes turcorum</i> ' un Sistematiği ve Çevresel Önemi	12
2.5. Karideslerin Ekolojik ve Biyolojik Özellikleri	14
2.6. ALAD Enzimi	16
2.6.1. ALAD'ın metabolizmadaki rolü	16
2.6.2. ALAD' ların sınıflandırılmaları	18
2.6.3. ALAD'ın kurşun ile etkileşimi ve kimyasal kirlilik indikatörü olarak önemi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Deneylerde kullanılan canlıların sağlanması ve laboratuarda yetiştirilmesi	24
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. ALAD aktivitesinin tayini.....	24

3.2.1.1. Diseksiyon	24
3.2.1.2. Homojenatın hazırlanması.....	25
3.2.1.3. Aktivite tayini.....	25
3.2.1.4. Protein miktar tayinleri.....	26
3.2.2. ALAD-kurşun etkileşimi (<i>in vivo</i>).....	26
3.2.2.1. Kurşun asetatın <i>Palaemonetes turcorum</i> için LC ₅₀ değerinin saptanması	26
3.2.2.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş <i>Palaemonetes turcorum</i> 'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi... 26	
3.2.2.3. <i>Palaemonetes turcorum</i> 'un Pb içeriğinin ICP-OES yöntemi ile belirlenmesi	27
3.2.2.4. İstatistikî analizler	27
3.2.3. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD'nın biyokimyasal özelliklerinin saptanması	27
3.2.3.1. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi....	27
3.2.3.2. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi	28
3.2.3.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	28
3.2.3.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi	28
3.2.3.5. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Zn ⁺² ,nin etkisi	28
3.2.3.6. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mg ⁺² ,nin etkisi	28
3.2.3.7. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mn ⁺² ,nin etkisi	29
3.2.3.8. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD' ının EDTA'ya duyarlılığı	29
3.2.4. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması.....	29
3.2.4.1. Ham ekstrenin hazırlanması	29
3.2.4.2. Amonyum sülfatla çöktürme	29
3.2.4.3. Amonyum sülfat ve düşük molekül ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması	30
3.2.4.4. Jel geçirgenlik kromatografisi.....	30

3.2.4.5. Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi	31
4. BULGULAR	35
4.1. ALAD-Kurşun Etkileşimi (<i>in vivo</i>).....	35
4.1.1. Kurşun asetatın <i>Palaemonetes turcorum</i> için LC ₅₀ değeri.....	35
4.1.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş <i>Palaemonetes turcorum</i> 'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi	36
4.1.3. <i>Palaemonetes turcorum</i> 'un Pb içeriğinin ICP-OES yöntemi ile belirlenmesi	37
4.2. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD'ının Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması	38
4.2.1. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	38
4.2.2. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi	39
4.2.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	40
4.2.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi.....	41
4.2.5. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Zn ⁺² 'nin etkisi ..	42
4.2.6. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mg ⁺² 'nin etkisi .	43
4.2.7. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mn ⁺² 'nin etkisi .	44
4.2.8. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD'ının EDTA'ya duyarlılığı	45
4.3. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması.....	46
4.3.1. Ham ekstrenin hazırlanması.....	46
4.3.2. Amonyum sülfatla çöktürme.....	46
4.3.3. Jel geçirgenlik kromatografisi	46
4.3.4. SDS-PAJE ve molekül ağırlığının tespiti	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Palaemonetes turcorum</i> (A: Erkek, B: Dişi).....	13
Şekil 2.2. ALA'nın sentezi.....	16
Şekil 2.3. ALA'dan porfobilinojen oluşumu.....	17
Şekil 2.4. Hem biyosentezinde ALAD'ın yeri	18
Şekil 2.5. Kurşunun bloke ettiği hemoglobin sentezi kademeleri.....	23
Şekil 3.1. Karideste karaciğer (hepatopankreas) diseksiyonu.....	25
Şekil 4.1. <i>Palaemonetes turcorum</i> 'da PbAsetat için LC ₅₀ değerinin saptanması ile ilgili doz tarama sonuçları	35
Şekil 4.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş <i>Palaemonetes turcorum</i> 'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi.....	36
Şekil 4.3. <i>Palaemonetes turcorum</i> 'un zamana bağlı olarak Pb içeriği	37
Şekil 4.4. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi	38
Şekil 4.5. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi	39
Şekil 4.6. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	40
Şekil 4.7. Artan substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin Michaelis-Menten hız grafiği.....	41
Şekil 4.8. Enzimin Line-Weaver Burke hız grafiği.....	41
Şekil 4.9. ALAD enziminin SDS-PAJE görüntüsü.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Kurşun asetat ile muamele edilmiş <i>Palaemonetes turcorum</i> 'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.2. <i>Palaemonetes turcorum</i> 'un zamana bağlı olarak Pb içeriğinin kontrol grubu ile karşılaştırılması	37
Çizelge 4.3. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Zn ⁺² 'nin etkisi ...	42
Çizelge 4.4. Farklı çinko konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması	42
Çizelge 4.5. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mg ⁺² 'nin etkisi ..	43
Çizelge 4.6. Farklı magnezyum konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması	43
Çizelge 4.7. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD aktivitesi üzerine Mn ⁺² 'nin etkisi ..	44
Çizelge 4.8. Farklı mangan konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması	45
Çizelge 4.9. <i>Palaemonetes turcorum</i> ALAD'ının EDTA'ya duyarlılığı	45
Çizelge 4.10. Farklı EDTA konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması	46
Çizelge 4.11. Enzimin saflaştırma basamakları ve bulunan değerler	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALAD	: δ-Aminolevulinik Asit Dehidrataz
°C	: Santigrad derece
µg	: Mikrogram
g	: Gram
lt	: Litre
m³	: Metreküp
mg	: Miligram
EEC	: European Economic Community
mol	: Molekül
LC₅₀	: Letal Konsantrasyon 50
Cd⁺²	: Kadmiyum iyonu
Pb⁺²	: Kurşun iyonu
mm	: Milimetre
LT₅₀	: Letal Zaman
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
kg	: Kilogram
SH	: Sülfidril
SSS	: Santral Sinir Sistemi
Na⁺	: Sodyum iyonu
K⁺	: Potasyum iyonu
ATP'az	: Adenozin Tri Fosfataz
dL	: Desilitre
cm	: Santimetre
m	: Metre
CoA	: Koenzim A
α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
PBGS	: Porfobilinojen Sentaz
PBG	: Porfobilinojen
EC	: Enzim Classification
ALA	: Amino Levulinik Asit
mM	: Milimolar
Zn⁺²	: Çinko iyonu
Mg⁺²	: Magnezyum iyonu
Mn⁺²	: Mangan iyonu
ml	: Mililitre
IC₅₀	: İnhibe edici konsantrasyon 50
µM	: Mikromolar
HgCl₂	: Civa klorür
CdCl₂	: Kadmiyum klorür
DDT	: DL-dithiothreitol
DMSA	: 2,3-dimercaptosuksinik asit
GSH	: Glutatyon
ZPP	: Çinko protoporfirin

(PhTe)₂	: Difenil ditellurit
km	: Kilometre
Pb(C₂H₃O₂)	: Kurşun asetat
KCl	: Potasyum klorür
µl	: Mikrolitre
nmol	: Nanomol
TCA	: Trikloro asetik asit
nm	: Nanometre
BSA	: Bovin Serum Albumin
EPA	: European Productivity Agency
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MnCl₂	: Mangan klorür
ZnCl₂	: Çinko klorür
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
SDS-PAJE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
H₂O	: Su molekülü
TEMED	: Tetra Metil Etilen Diamin
APS	: Amonyum persülfat
AgNO₃	: Gümüş nitrat
ng	: Nanogram
kDa	: Kilodalton
K-fosfat	: Potasyum fosfat

1. GİRİŞ

Kimya endüstrisinin hızla gelişimi sonucunda, gerek günlük yaşantımızda gerekse tarım ve endüstride birçok kimyasal madde kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler, bugünkü çağdaş yaşamın vazgeçilmez gereksinimleridir. Çeşitli nedenlerle gerek doğrudan maruz kalma veya kullanılmaları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosistemlere zararlı olabilen bu kimyasal maddelerin, pek çoğunun biyolojik etkileri bugün bile hala tam olarak bilinmemektedir. Kullanıma yeni sunulan maddelerin ayrıntılı olarak tek tek ele alınıp, toksik etkilerinin araştırılarak kanserojenik ve mutajenik potansiyellerinin belirlenmesi, insan sağlığı açısından son derece önem taşımaktadır.

Kimyasallarla yüz yüze gelmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan birincisi; diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi; endüstriyel kimyasallar, pestisitler, saç boyaları, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi bileşiklerle karşılaşmamızdır [1].

Doğal sular normal koşullarda, toksik etki yapmayacak düzeyde ağır metal içermektedirler. Ancak günümüzde endüstriyel gelişme, kentleşme ve modern tarımın yaygınlaşması doğadaki ağır metal yükünü önemli oranda arttırmaktadır [2].

Ağır metal ve metal bileşiklerinin önemli çevre kirleticileri olmaları nedeniyle insan ve hayvan sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması son yıllarda giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Organizmaya çeşitli yollarla alınan kurşun, kanda belirli bir düzeye ulaştıktan sonra çeşitli organ ve dokularda birikmeye daha sonra da atılmaya başlar. Kan dolaşımına giren kurşunun %85 ile %90'ı eritrositlere bağlı halde, geri kalanı da kan plazmasındaki proteinlerle birleşmiş olarak bulunur [3].

Kurşun, biyolojik sistemlerin her ortamda karşılaşılabildikleri, metabolik işlevi olmayan eser bir elementtir. Bu metal kablo, lehim ve boya üretiminin yanı sıra akü imalatı ile çini ve seramik yapımında da yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

Doğada yaygın olarak bulunan ve endüstride fazlaca tüketilen kurşun, insan ve hayvanlarda zehirlenmeye neden olan ağır metallerin başında yer almaktadır. Genellikle kolay çözünen kurşun bileşiklerinin toksisitesi daha yüksektir. Buna göre kurşun nitrat, kurşun klorür, kurşun asetat, kurşun oksit, kurşun sülfür ve kurşun fosfat bileşiklerinin toksik etkileri çoktan aza doğru sıralanabilir. Bir defada verilince akut kurşun zehirlenmesi doğuran dozlar, küçük dozlara bölünerek verildiğinde de aynı hayvan türünde kronik zehirlenmelere neden olabilmektedir [3].

Hem su hem de sediment toksisite testleri için standart biyoindikatör organizmalar olarak bazı tatlı su canlıları tavsiye edilmiş ve kullanılmıştır. Genellikle biyolojik deneyler laboratuvar koşullarında bir ya da birkaç kimyasalın bir kez veya kronik uygulanması yöntemiyle yapılır. Bu deneylerin en yaygın sonuçları kurtulma, biyoakümülyasyon, gelişme ve üremedir.

Son 20 yıldır kirliliğin işareti olarak görülen biyokimyasal tepkilerle bağlantılı olan diğer ölümcül sonuçları araştırmak için gittikçe artan bir ilgi vardır. Bunlar arasında ALAD'ın (δ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz) seçici olarak inhibisyonu, hem insan hem de diğer canlı türlerinde kurşuna maruz kalmanın önemli bir göstergesidir [4].

Kurşun asetatın insan ve çevre sağlığı açısından önemi giderek artmaktadır. Bu çalışmada endemik olmasından dolayı ayrı bir öneme sahip bir tatlı su karidesi olan *Palaemonetes turcorum*' un karaciğeri (hepatopankreatik seka) üzerine kurşun asetatın etkisi araştırıldı. İlk olarak hepatik ALAD'ın kurşun tarafından inhibisyona gösterdiği duyarlılığı ortaya çıkarmak amacıyla söz konusu enzimin kurşun ile olan *in vivo* etkileşimi araştırılmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise *Palaemonetes turcorum* hepatik ALAD'ının biyokimyasal özellikleri araştırılarak, enzimin biyokimyasal karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metallerden Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı

Kurşun, mavi grimsi renkte ağır bir metaldir. Erime noktası 327 °C, kaynama noktası 1744 °C'dir. Kurşun bileşikleri organik ve anorganik kurşun bileşikleri şeklindedir. Organik kurşun bileşiklerinden tetra etil kurşun, lipofilik özellikte olup toksikolojik açıdan önem taşır. Anorganik kurşun tuzları ise kurşun kromat, kurşun asetat, kurşun karbonat, kurşun klorür ve kurşun nitrattır. Anorganik kurşun tuzlarından kurşun asetat ve kurşun nitrat suda çözüldüğü halde kurşun sülfat suda çözünmez. Kurşun klorür soğuk suda az, sıcak suda çok çözünür. Bütün kurşun tuzları sodyum hidroksitte tamamen çözünürler. Anorganik kurşun tuzlarından biri olan kurşun asetat aynı zamanda insektisit yapımında da kullanılmaktadır. Sudaki çözünürlükleri az, örtme kabiliyetleri fazla ve çeşitli renklere sahip olan kurşun bileşikleri yağlı boya endüstrisinde pigment olarak kullanılır. Kurşun akümülatörlerin, çelik ve demirlerin korozyona karşı korunması için yapılan yağlı boyaların, patlayıcı maddelerin, saç boyalarının yapımında ve ipeğe ağırlık vermede kullanılırken, bazı formları da zirai mücadelede ve fotoğrafçılıkta oldukça önemlidir. 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 [5].

Biyolojik sistemlerde kurşunun zararlı etkileri, global dağılımı ile birlikte incelendiğinde bunun en tehlikeli çevresel toksikant olduğunu göstermiştir. Kurşunun yerküre kabuğundaki konsantrasyonu 16 µg/g'dır. Fakat endüstriyel aktiviteler sonucunda toprak zemindeki miktarı 5000 µg/g, suda 10 µg/l ve havadaki miktarı 10 µg/m³ ün üzerine çıkmıştır. Kurşun ile ilgili ekotoksikolojik çalışmalar zararlı etkiler, internal dozlar ve ara yollardaki etkileşimi açıklama ve sağlık açısından etkileri üzerine odaklanmıştır [6].

Kurşunun biyolojik varlığı ile ilgili sorular ve inorganikten organik şekillere biyolojik geçişi uzun zamandır önemli olarak görülmesine rağmen, ekosistemlerde kurşunun dağılımı ve potansiyelini etkileyen bu faktörler hakkında bilgi eksikliği vardır [7].

Okyanuslar gerek suyu ve çözünmüş gazları buharlaştırmak suretiyle, gerekse atmosferin bileşenlerini çözerek bunlardan yağmur ve toz şeklinde birikimlere yer vermek suretiyle sürekli olarak atmosferle alış veriş halinde olan bir rezerve sahiptir. Sanayi kaynaklı kurşundan ve özellikle benzindeki kurşundan ortaya çıkan kirlilik bütün atmosfere ve oradan da okyanusa kadar uzanmaktadır. Bugün büyük şehirlerde vücuda alınan kurşunun esas kaynağını motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Kurşun egzoz gazları ile inorganik aerosol şeklinde, çok ince partiküller halinde havaya dağılmaktadır. Böylece günde ortalama 0,5 mg kurşun vücuda alınmaktadır [8].

Hellawell [9]'in sınıflandırmasına göre kurşun EEC (European Economic Community)'nin gri listesine alınarak, çevre ve su kirliliğinde çok önemli bir toksik madde olduğu bildirilmiştir.

2.2. Kurşunun Sucul Canlılar Üzerindeki Toksik Etkileri

Sulara karışan kurşunun önemli bir kısmı, sulara bulunan karbonat, bikarbonat ve organik maddelerle birleşerek dibe çöker. Böylece büyük oranda sedimentlerde biriken kurşun, sedimentten biotaya (fauna ve flora) geçerek birikmektedir. Kurşun, besin zinciri yolu ile canlıdan canlıya daha yoğun derişimler halinde aktarılmaktadır. Akuatik canlılarda kurşun birikim düzeyinin ortam derişimi ve etkide kalma süresi ile birlikte suyun sıcaklık, pH, alkalinite, sertlik gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak değiştigi belirlenmiştir [1].

2.2.1. Akuatik bitkiler üzerine toksisitesi

Kurşun sucul bitkiler üzerinde genel çevrede bulunan miktarlarda bulunur ve nadiren etkiler.

Van der Werff ve Pruyt [10] dört sucul bitkiyi (*Elodea nuttallii*, *Callitriche platycarpa*, *Spirodela polyriza* ve *Lemna gibba*) kurşun nitratın 10^{-5} mol kurşun/lit konsantrasyonuna 70–73 gün maruz bırakmışlar fakat toksisitenin olmadığını ve büyüme oranının değişmediğini göstermişlerdir.

Brown ve Rattigan [11] *Elodea canadensis* bitkisini 28 gün, *Lemna minor* bitkisini ise 14 gün boyunca kurşun asetatın çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakarak LC_{50} dozunu sırasıyla 136 mg/lit ve 16.3 mg/lit olarak ölçmüşlerdir. Başka bir çalışmada ise *Elodea* bitkisini 24 saat karanlıkta kurşunla muamele etmişler ve daha sonra ışıktaki oksijen miktarını ölçmüşlerdir. Karanlıkta ölçülen değer 47.6 mg/lit kurşun olup oksijen oluşumunu %50 oranında azaltmışken, aydınlıkta ölçülen değer 99 mg/lit kurşun olup oksijen oluşumu %90 oranında azaltmıştır.

Kay ve ark. [12] deniz sümbülü olan *Eichhornia crassipes* bitkisini kurşun nitratın 0.5-5 mg/lit arasındaki konsantrasyonlarını 6 hafta boyunca uyguladıkları zaman, bu değerler arasındaki konsantrasyonların kök gelişimine, yaprak rengine, yeni bitki oluşumuna, çiçeklenmeye ve toplam bitki büyümesi üzerine bir etki gözlemlenmemişlerdir.

Lemna üzerinde yapılan toksisite çalışmasında Cd^{+2} ve Pb^{+2} kullanılmış ve Cd^{+2} 'nin ve Pb^{+2} 'ye göre daha toksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu ağır metallerin varlığında katalaz ve proteaz aktivitesinde belirli oranda azalma görülürken, peroksidaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir [13].

2.2.2. Akuatik omurgasızlar üzerine toksisitesi

Sucul omurgasızlar üzerindeki kurşun tuzlarıyla yapılan toksisite çalışmalarının sonuçlarını deneysel koşulların çeşitliliği ve sudaki kurşun konsantrasyonu belirlemek için kullanılan metotların yetersizliği yüzünden yorumlamak oldukça zordur. Birçok çalışmada sudaki kurşunun konsantrasyonu

nominaldir. Çünkü toksisiteyi etkileyen faktörler (örneğin pH, su sertliği, anyonlar ve kompleks ajanlar) tamamen değerlendirilememektedir.

Kurşun basit formdaki tuzlarına dönüşerek, tatlı su omurgasızları üzerinde 0.1->40 mg/lt konsantrasyonları arasında, deniz omurgasızları üzerinde ise 2.5->500 mg/lt konsantrasyonları arasında akut toksik etki göstermektedir.

Topluluklarda, organizmaların bazı popülasyonları kurşuna karşı diğerlerinden daha duyarlıdır ve toplum yapısı kurşun kontaminasyonu ile kötü olarak etkilenebilir. Bununla birlikte, kirlenmiş alanlardaki popülasyonlar kurşuna karşı kirlenmemiş alanlarda bulunanlardan daha çok atolerans gösterebilirler. Diğer organizmalarda, hipoksik koşullara adaptasyon yüksek kurşun konsantrasyonu tarafından engellenebilmektedir.

Watling [14] bir istiridye olan *Crassostera gigas* larvalarına kurşun nitratin sudaki konsantrasyonu 0.01 veya 0.02 mg/lt olacak şekilde 14 günlük uygulama sonucunda larvalarının ortalama uzunluğunu ölçmüştür. 0.01 mg/lt konsantrasyonunda larvaların uzunluğu 5.0 mm iken 0.02 mg/lt konsantrasyonunda 5.3 mm olarak ölçmüş ve kontrol grubundaki ortalama uzunluk olan 6.3 mm uzunlukta karşılaştırmıştır. Kurşun uygulamasından daha sonraki 14 gün boyunca temiz suyla yapılan muamele sonucunda büyüme azalmasındaki değişikliklerin iyileştiğini göstermiştir. Kontrol grubunda ortalama uzunluğu 8.2 mm olarak belirlerken 0.01 mg/lt konsantrasyonunda 8.0 mm, 0.02 mg/lt konsantrasyonunda ise 7.8 mm olarak ölçmüştür.

Freedman ve ark. [15] bir karides olan *Hyallela azteca* üzerinde kurşun dağılımının toksisite etkilerini kurşunu test ortamına yapay olarak vererek araştırmışlardır. Ortama kurşun fosfatın 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} mol/lt olmak üzere dört farklı konsantrasyonunu, pH 6 ve 8 olmak üzere iki farklı pH değerinde ilave etmişlerdir. Teorik hesaplamaları solüsyon içerisindeki bulunan serbest kurşundan hesaplamışlardır. pH 6 değerinde yüksek fosfat konsantrasyonlarında toplam kurşun konsantrasyonlarına bakmaksızın çok az serbest kurşun bulunduğunu belirtmişlerdir. pH 8'de de benzer durum olduğunu söylemişlerdir. Ölüm oranları çeşitli solüsyonlarda hesaplanan serbest kurşun değerleri için ilgili bulunmuştur. pH 6, toplam kurşun konsantrasyonu 5 mg/lt ve fosfat konsantrasyonu 10^{-6} mol/lt değerleri karidese 48 saat uygulandığı zaman %100 ölümün gerçekleştiğini

belirtmişlerdir. Fosfat molaritesi 10^{-5} ve 10^{-4} mol/lit olduğu zaman toksisetinin ilerleyen bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. En yüksek fosfat konsantrasyonunda ölüm oranı 120 saat sonra ancak %25'e yaklaştığını belirtmişlerdir. Aynı üç fosfat konsantrasyonları için tahmin edilen serbest kurşun değerlerini sırasıyla 2.76, 2.24 ve 0.11 mg/lit olarak hesaplamışlardır.

Chinnayya [16] taze sudaki 10^{-3} mol/lit kurşun nitratın *Caridina rajadhari* karidesinin oksijen tüketimini gram yaş ağırlık başına 0.49 ml/saat olan değeri 0.38 olarak bulmuşlardır. Kurşun nitratın bu konsantrasyon değerinin 10 gün boyunca bir ölüme yol açmadığını söylemişlerdir. Bu türler için ölüme yol açan kurşun nitrat konsantrasyonunu 5×10^{-3} mol/lit olarak belirtmişlerdir.

Brown ve Ahsanullah [17] *Ophryotrocha labronica* solucanında ve *Artemia salina* deniz karidesinde kurşun nitratın ölüm oranına ve büyüme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kurşunu 1 mg/lit olarak uyguladıkları zaman LT_{50} değerini *Ophryotrocha* için >600 saat olarak bulurken *Artemia* için 576 saat olarak bulmuşlardır. Solucana 10 mg/litre kurşun konsantrasyonunu 8 gün ya da 1 mg/lit kurşun konsantrasyonunu 10 gün uyguladıkları zaman büyüme oranında anlamlı bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir. Fakat 48 saatlik deniz karideslerinin büyümesini, kurşun nitratın 6 gün boyunca uygulanan 5 ve 10 mg/lit konsantrasyonlarının büyüme oranını azalttığını belirtmişlerdir.

Bir karides türü olan *Penaeus indicus* postlarvaları 48 saatlik periyotlarla kurşun asetatın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve 96 saatlik LC_{50} değeri 7.223 mg/lit bulunmuştur [18].

Yine aynı organizmayla yapılan bir başka çalışmada kurşun asetatın biyokimyasal içerik ve büyümeye yönelik etkisine bakılmış ve 30 gün boyunca örnekler 1.44 mg/lit'lik subletal kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Gelişim, örneklerin uzunluk ve ağırlıkları ölçülerek belirlenmiştir. Sonuç olarak 10. gün ve daha sonraki günlerde önemli ölçüde boy ve ağırlıkta azalma görülmüştür [19].

Bat ve ark. [20], Amfipod *Echinogammarus olivii*, Isopod *Sphaeroma serratum* ve Dekapod *Palaemon elegans* türleriyle yaptıkları çalışmada çinko, bakır ve kurşunun 96 saatlik LC_{50} değerlerini tespit etmişlerdir. *E. olivii*, *S.*

serratum ve *P.elegans* türleri için kurşun LC₅₀ değerlerini sırasıyla 0.62, 4.61 ve 5.88 mg/lit olarak bulmuşlardır.

2.2.3. Balıklar üzerine toksisitesi

Balıklara kurşunun toksitesi başlıca kurşun iyonlarının bulunmasına ve alınmasına bağlıdır. Kurşun iyonlarının bulunmasını sağlayan faktörler su sertliği (divalent anyonların varlığı), pH, tuzluluk ve organik maddelerdir. Alınımı etkileyen faktörler ise diğer pozitif yüklü iyonların bulunması ve suyun oksijen miktarıdır. Organik kurşun inorganik kurşundan daha fazla alınmaktadır. Duyarlı türlerde inorganik kurşun için 96 saatlik uygulamanın LC₅₀ değeri 1mg çözülmüş kurşun/litre değerinden daha düşük olabilmektedir. Nominal konsantrasyonlar sert suda 100 kat daha fazladır. Yapılan çalışmalarda organik kurşun toksisitesinin inorganik kurşun toksisitesinden 10–100 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. İnorganik kurşuna uzun dönem maruz kalmış yetişkin balıklarda 10–100 mg/lit kurşun konsantrasyonları morfoloji üzerinde subletal etkiler, aminolevulinik asit dehidrataz (delta ALAD) ve diğer enzimler üzerinde ve ayrıca davranışlar üzerinde değişikliklere yol açmaktadır. Genç evreler genel olarak yetişkinlerden daha duyarlıdır fakat yumurtalarda kurşun yumurta dış yüzeyinde tutulup embriyoya geçmediğinden dolayı yumurtalar kurşuna karşı daha az duyarlıdır.

Tilapia zilli balığı ile yapılan çalışmada farklı kurşun konsantrasyonlarının ve etkide kalma süresinin çeşitli dokulardaki kurşun birikimine etkileri incelenmiştir. 1, 7, 15 ve 30 günlük süreler ile 1.0, 2.5 ve 5 mg/lit'lik kurşun konsantrasyonlarının maruz bırakılarak solungaç, karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki kurşun birikim düzeylerine bakılmıştır. İncelenen dokularda biriken toplam kurşunun solungaç, karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki dağılımı sırasıyla %15.47, %6.10, %52.87 ve %25.56 olarak belirlenmiştir (böbrek>beyin>solungaç>karaciğer). Böbrek dokusunda kurşun birikim düzeyinin yüksek olması, bu dokunun kurşun bağlayıcı proteinler içermesi ve metal atılımının önemli düzeyde bu doku üzerinden olması gibi nedenlerle açıklanmıştır [2].

Hodson [21] akarsudaki 13 µg /lt kurşun nitratin gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 4 haftalık bir uygulamadan sonra kırmızı kan hücresi delta-ALAD aktivitesini anlamlı bir derecede azalttığını bulmuştur.

Daha sonraki bir çalışmada delta-ALAD üzerine kurşunun 2 haftalık uygulamalarının gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), dere alabalığında (*Salmo turutta*), kırmızı (havuz) balığında (*Carassius auratus*) ve güneş balığında (*Lepomis gibbosus*) sırasıyla 10, 90, 470 ve 900 µg/lt konsantrasyonlarının önemli etkiler yaptığı gösterilmiştir [22].

Jackim [23] *Fundulus heteroclitus* ve kış dilbalığı (*Pseudopleuronectes americanus*) üzerine kurşun nitratin deniz suyunda statik 10 mg/lt konsantrasyonunu uygulayarak delta-ALAD enzimi üzerine etkilerini araştırmıştır. *Fundulus heteroclitus*' da 96 saatlik ve 2 haftalık uygulamadan sonra karaciğer delta-ALAD aktivitesinde sırasıyla %22 ve %18.5 azalmanın olduğunu; kış dilbalığında ise 1 haftalık bir uygulamadan sonra karaciğer delta-ALAD aktivitesinde %66 böbrek delta-ALAD aktivitesinde ise %58 azalmanın olduğunu belirtmiştir.

Sastry ve Gupta [24] önceki çalışmalarda subletal olarak bildirilen 3.8 mg/lt konsantrasyonundaki kurşun nitrati bir kedi balığı olan *Channa punctata*'ya 15 ya da 30 gün maruz bıraktıktan sonra öldürerek enzim aktivitelerini ölçmek için mide, bağırsak, pilorik çeka ve karaciğerlerinden preparasyonlar hazırlamışlardır. 15 günlük uygulamada karaciğer ya da mide alkalin fosfataz aktivitesinde hiçbir değişikliğin olmadığını buna karşın pilorik çeka ve bağırsak enzim aktivitelerinde inhibisyonun olduğunu belirtmişlerdir. 30 günlük uygulamadan sonra alkalin fosfataz aktivitesinin sadece pilorik çekada arttığını diğerlerinde ise değişmediğini belirtmişlerdir. Alkalin fosfataz enziminin aktivitesi genellikle hücre hasarıyla birlikte artmaktadır. Hem 15 günlük hem de 30 günlük uygulamadan sonra bütün dokularda alkalin fosfataz enziminin arttığını söylemişlerdir. Üç karbonhidrat enziminin başlangıçta arttığını fakat daha sonra zamanla azaldığını, proteaz aktivitelerinin deney süresi boyunca arttığını belirlemişlerdir.

Aynı araştırmacılar [25] daha sonraki yapmış oldukları çalışmada *in vitro* olarak kurşun nitratin sindirim enzimleri üzerine olan etkilerini araştırdıklarında

kurşunun 0.4, 0.8 ve 1.6 $\mu\text{mol/l}$ konsantrasyonlarında alkale fosfataz, lipaz, tripeptid aminopeptidaz ve glisilglisin dipeptidaz enzim aktiviteleri üzerinde doza bağılı olarak bir etki yaptığını fakat etkinin EDTA ilave edilmesiyle bu etkinin ortadan kalktığını belirtmişlerdir.

Ellgaard ve Rudner [26] mavi solungaçlı güneş balığında (*Lepomis macrochirus*) kurşun asetatın LC_{50} değerini 400 mg/l olarak hesaplamışlardır.

Heteropneustes fossilis'le yapılan bir çalışmada, kurşun nitratin su içerisindeki sublethal konsantrasyonu 35 günlük kısa ve 120 günlük uzun periyotlarda değerlendirilmiş ve her iki periyotta da karaciğer ve vücut ağırlığında protein, RNA ve glikojen içeriğinde azalma, buna karşın kolesterol içeriğinde artış görülmüştür [27].

Farklı balık türlerinde kurşunun farklı konsantrasyonları deneyerek balıkların serumlarındaki glikoz ve laktat seviyelerine etkileri incelenmiştir. Bunun yanında balıkların böbrek, beyin, kas ve karaciğerlerinde kurşunun etkilerine bakılmıştır. Kurşun konsantrasyonlarıyla balıkların serumlarındaki glikoz ve laktat seviyeleri arasında doğrudan bir ilişki gözlemlenmiştir [28].

2.2.4. Amfibiler üzerine toksisitesi

Kurbağa ve kara kurbağalarının durgun sularda 1.0 mg/l akarsularda ise 0.04 mg/l olan nominal kurşun konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlara duyarlıdırlar ve bu değerlerin gelişimi durduğu ve yumurta oluşumunu geciktirdiği bilinmektedir. Yetişkin kurbağalarda sulu çözelti içerisindeki 5 mg/l'nin altındaki kurşun konsantrasyonları anlamlı bir etki yapmazken besin yoluyla alınan 10 mg/kg kurşunun bazı biyokimyasal etkilere yol açtığı bilinmektedir.

Khangarot ve ark. [29] *Rana hexadactyla* iribaş kurbağası için 13–16°C'de ve pH 6.2–6.7 aralığında 24, 48, 72 ve 96 saatlik uygulama sonuçlarında kurşun için LC_{50} değerlerini sırasıyla 100, 66.7, 41.3 ve 33.3 mg/l olarak bulmuşlardır.

2.3. Kurşunun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Kurşunun istenmeyen etkileri biyokimyasal, subklinik (belirtisiz hastalık) ve klinik olmak üzere üç ayrı biçimde görülebilir. Kurşun, hücrelerde iyonik formda olup önemli bir enzim inhibitörüdür, proteinlerin sülfidril (SH), amidler ve oksit moleküllerine bağlanarak etki gösterir. Kurşun, hem biyosentezindeki enzimlerin sülfidril gruplarıyla yarışır ve bu enzimleri inhibe ederek biyokimyasal değişikliklere yol açar. Delta aminolevulinik dehidratazi inhibe ederek plazma ve idrarda delta-aminolevulinik asitin, hem sentetazi inhibe ederek eritrositlerde protoporfirin, koproporfirinojen dekarboksilazi inhibe ederek de idrarda koproporfirinojen III'ün artışına neden olur [30].

Kandaki hemen hemen tüm kurşun eritrositlere bağlı olarak bulunur. Kurşun fosfatın düşük çözünürlükte olması kalsifiye dokularda birikimine neden olur. Erişkinde kurşunun %95'i iskelette depolanır. Bununla birlikte çocuklarda kemikteki kurşun oldukça mobildir. Büyük miktar kurşun yumuşak dokularda bulunur ve yarılanma ömrü 2 aydır. Beyin bir istisna teşkil eder, kurşun kan-beyin bariyerini yavaş geçer ve biyolojik yarı ömrü 1 yıldan fazladır. Plasenta kurşun geçişinde bir bariyer değildir ve fetus anneden geçen kurşuna maruz kalır [31].

Kurşun, santral ve periferik sinir sistemini etkiler. Çocuklar, santral sinir sistemi (SSS) etkilerine oldukça hassastır ve şiddetli ensefalopati vakaları felç ile sonuçlanabilir [31].

Kurşun eritrositlerde Na^+/K^+ ATP'az pompası ve eritrosit membran yapısını bozarak eritrosit ömrünü kısaltır, ekstrasellüler sıvı ile eritrosit arasındaki su elektrolit alışverişinin bozulması sonucu hemolize neden olur. Ayrıca hemoglobin sentezinin bozulması ile eritrosit yapımının azalması anemiye ortaya çıkarır [31].

Kurşunun büyümeye olan olumsuz etkileri intrauterin dönemde başlar. Birçok çalışmada, gebelerdeki kan kurşun düzeyi ile orantılı olarak bebeklerde düşük doğum ağırlığı ve intrauterin gelişme geriliği bildirilmiştir. Büyümenin olumsuz etkilenmesi prenatal 8 $\mu\text{g}/\text{dL}$, postnatal 4 $\mu\text{g}/\text{dL}$ gibi düşük kan kurşun düzeylerinde bile başlamaktadır. Kan kurşun düzeyi 4–35 $\mu\text{g}/\text{dL}$ arasında olan çocukların ulaşması gereken boylarından %1.5 oranında kısa kaldıkları

belirlenmiştir. Ancak bu kısılalığın kalıcı olmadığı, kurşunla olan temas engellendiğinde hızla büyümeye başlayıp beklenen erişkin boylarını yakalayabildikleri de bildirilmiştir [32].

Kurşunun kadın ve erkek üreme sisteminde toksik etkileri olduğunu gösteren kalitatif çalışmalar vardır. Spontan abortus ve ölü doğumlarda artış olarak kurşunla çalışan kadın işçilerde bildirilmiştir [33].

Erkeklerde mesleki kurşuna maruziyete bağlı hiperspermi, teratospermi, asthenospermi ve hipogonadizm olabilmektedir. Sperm ve testisler üzerine toksik etki, kan kurşun düzeyi 40–50 µg/dL de görülmektedir [34].

Karsinogenez hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Diyetlerinde yüksek dozda kurşun asetat bulunan sıçanlarda renal kanserlerde artış saptanmıştır [33].

Kemik, kurşunun toksik etkisi için hedef organdır. Kemik kurşunu yıkılarak kan kurşun düzeyini artırır. Kemik hem hedef, hem de kaynaktır. Çocuklukta alınan kurşun düzeyi yaşla artar ve orta yaşta orta femurda ve pelviste birikir. Yüksek kurşun düzeyi çocukların iskelet gelişimini etkiler [35].

Akut kurşun maruziyeti karaciğer fonksiyonlarını bozar fakat bu etki reversibldir. Kronik maruziyette hiperürisemi ve kreatinin klirensinde azalma görülebilir ve hipertansiyon ve gut ile bir ilişki belirlenmiştir [31].

Kurşun temasının ilk göstergeleri iştahsızlık, epigastrik ağrı, hazımsızlık, bulantı, kusma, kabızlık, ishal, ağızda metalik tat gibi bulgulardır. Artan kurşun teması ile iştahsızlık ve konstipasyon belirginleşir ve kurşun koliği diye adlandırılan şiddetli karın ağrısı oluşur. Kurşun koliğinde karın kasları sert ve göbek bölgesi hassaslaşmıştır. Kurşunun oluşturduğu vasküler spazm ile birlikte artan asidite kurşun zehirlenmesinde sık görülen gastrik ve duodenal ülserlerin de nedenidir [36].

Karsinogenez hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Diyetlerinde yüksek dozda kurşun asetat bulunan sıçanlarda renal kanserlerde artış saptanmıştır [33].

2.4. *Palaemonetes turcorum*'un Sistematığı ve Çevresel Önemi

Karidesler Krustase klasisinin Dekapoda ordosuna dahil olan Natantia grubunu oluştururlar. Natantia grubu kendi içinde Penaedea, Karidea ve

Stenopodidea olmak üzere üç alt ordoya ayrılır. Türlerin önemli bir bölümü Penaeidea ve Karidea alt ordolarına dahildir. Esas ticari öneme sahip olan türler Penaeidea familyası içinde yer alır ve genel olarak “Karides” adıyla bilinirler. Karidea türlerinin ancak bazıları ticari öneme sahip olup, bunlardan özellikle Palaemonidae türleri başta olmak üzere genel olarak “Deniz Tekesi” olarak adlandırılmışlardır [37].

Filum: ARTHROPODA

Klassis: CRUSTACEA

Subklassis: MALACOSTRACA

Seri: EUMALACOSTRACA

Superordo: EUCARIDA

Ordo: DECAPODA

Seksiyo: NATANTIA

Subordo: PENAEIDEA

Familya: PALAEMONİDAE

Tür: *Palaemonetes turcorum* (Holthius, 1961) (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. *Palaemonetes turcorum* (A: Erkek, B: Dişi)

Bugüne kadar dünyada sınıflandırılmış 2500 civarında karides türü bulunmaktadır. Türkiye’de sınıflandırılan 61 tür vardır. Sınıflandırılan türlerin geneli deniz kökenli olmasına rağmen tatlı suda yaşama uyum sağlamış birkaç tür

bulunmaktadır. *Palaemonetes turcorum* türü ise denizel kökenli olmasına rağmen tatlı suda yaşama uyum sağlamış ender türlerden biridir. Ayrıca bu tür yurdumuz için endemiktir. Bu özellikleri *Palaemonetes turcorum*'a ayrı bir önem kazandırmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda tercih edilmiştir.

2.5. Karideslerin Ekolojik ve Biyolojik Özellikleri

Karidesler ekvatorlardan kutuplara kadar çok geniş bir yayılım alanına sahiptirler. Tatlı su, acı su ve denizlerde yaygın olarak bulunurlar. Boyları çok değişken olup, birkaç mm'den 35 cm'ye kadar olabilen formları vardır. Türkçede küçük boylu türler genelde 'Teke', büyük boylu türler ise 'Karides' olarak adlandırılırlar. 2500 türü bilinmesine karşın, bunlardan sadece 300 kadarı ticari öneme sahiptir [38].

Denizel türler sahilden 5700 m. derinliğe kadar dağılım gösterirse de ticari öneme sahip karides türlerinin büyük bir bölümü kıta sahanlığı üzerinde 100 m derinliğine kadar olan bölgelerde yaygınlaşmışlardır. Pelajik bölgedeki az sayıdaki temsilcilerine karşın bentik bölgede ve özellikle çamurlu, kumlu-çamurlu veya kayalık bölgelerde yaşarlar. Bazıları süngerler gibi omurgasızların içinde veya mercan resifleri arasında yaşantılarını sürdürebilirler.

Türkiye denizleri karides türleri yönünden zengin olmasına karşın bu grup üzerinde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur [38].

Karideslerin lüks bir besin maddesini oluşturmaları ve dolayısıyla ticari değerlerinin yüksek olması nedeniyle yoğun olarak avlanmakta ve bu yoğun avcılık sonucu, tüm dünya denizlerinde olduğu gibi Türkiye denizlerinde de hızla sayıları azalmaktadır. Bu nedenle, başta uzak doğu ülkeleri olmak üzere birçok ülkede yoğun olarak yetiştirme yapılmaktadır.

Genel karides üretiminde en önemli çevresel faktör sıcaklıktır. Karidesler su sıcaklığının 23–28 °C olduğu Temmuz-Eylül ayları arasında en hızlı gelişmeyi gösterirler. Büyüme için ortalama sıcaklık 25 °C'dir. 10 °C'nin altında karides besin alamaz ve büyüme durur. Bu nedenle de yetiştirme havuzlarında gerektiği takdirde sıcaklık kontrol altına alınır. Bunun için, suyun ısıtılması gerektiğinde

enerji kaynağı olarak doğal sıcak su kaynakları ve güneş enerjisinin kullanımı en ekonomik yoldur [38].

Sudaki çözülmüş oksijen miktarı da karidesler için önemli bir faktördür. Özellikle kıyılmış ve öğütülmüş besinler kullanıldığında su önemli ölçüde kirlenir ve oksijen miktarında büyük düşmeler gözlenir. Bunu önlemek için suyun yenilenmesi, yetmediği halde ise çözülmüş oksijeni arttırmak için mekanik karıştırıcılar kullanılır. Bunların dışında suyun diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri de kontrol altında bulundurulmalıdır [38].

Karideslerin çoğunda eşeyler ayrılmış olmasına rağmen, bazı türler (Ör: *Pandalina borealis*) önce bir erkeklik safhası geçirir ve daha sonra dişiye dönüşür.

Üreme delikleri genellikle dişilerde üçüncü pereopodun, erkeklerde ise beşinci pereopodun basal parçası (koksa) üzerine açılır. Ancak bu delikleri görmek çok zordur. Bununla birlikte, ergin Penaeidae türlerinde bariz bir erkek dişi farklılığı vardır. Dişiler beşinci çift pereopodlar arasında “Thelycum” adı verilen ve I. çift pleopodların endopoditlerinden oluşmuş bir kopulasyon organına sahiptirler. Caridea ve Stenopodidea türleri yumurtalarını abdomen altında taşıdıkları halde, Panaeidea türleri doğrudan suya bırakırlar. Yumurta sayısı larval evre sayısına bağlı olduğu için türlere göre 10–1 000 000 arasında değişir [38].

Caridea ve Stenopodidea gruplarında yumurtalarını taşımaları nedeniyle yumurta sayısı oldukça azdır. Bu grubun türlerinde yumurtadan çıkan larvalar genç bir birey olarak oldukça ilerlemiş evrededirler. Buna karşın Panaeidea türlerinde larvalar önemli metamorfoz evreleri geçirirler. Örneğin; *Panaeus* türleri 10–80 m. derinlikteki açık sularda yumurtlarlar; suya bırakılan yumurtalar birkaç saat içinde açılarak çok küçük olan larvalar serbest hale geçerler. Bu larvalar beş nauplius, üç protozoe ve üç mysis olmak üzere toplam 11 evre geçirirler. Larvalar planktonik olup, akıntılarla kıyıya sürüklenirler. Kıyıya ulaştıklarında post larva evresinde olurlar. Post larvaya ulaşmak yaklaşık üç hafta sürer. Bu evredeki larvalar kıyıda acı sulara girer ve burada pelajik yaşamı terk ederek bentik yaşama geçerler. Burada hızla büyüyerek genç karidesler haline gelirler ve daha sonra hızlı gelişimlerine devam ederek tekrar denize dönerler. Sonuç olarak açığa ulaşan erginler tekrar yumurtlar ve böylece üreme devrini yeniden başlatırlar [38].

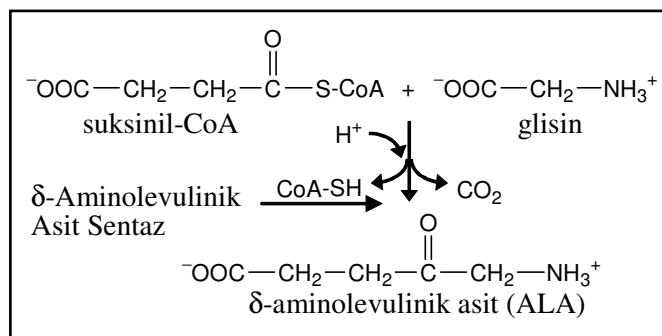
Panaeid'ler başta olmak üzere pek çok karides türü omnivor olup, genel olarak Foraminifer, Poliket, Krustase, Alg ve Detritusu besin olarak alabilirler. Ancak omnivorluğun derecesi türden türe değişebileceği gibi, gelişme evrelerine bağlı olarak ta değişim gösterir [38].

Beslenme ile ilgili göçler gece-gündüz periyoduna bağlı olarak yapılır. Diğer bir değişle, gündüz süresince dipte yaşayan ve buradaki organizmalarla beslenen karidesler, geceleyin besin bulmak için suda vertikal ve horizontal olarak göç yaparlar. Karideslerde izlenen mevsimsel ve günlük göçler av miktarını etkilediğinden, avcılarının ve araştırmacılarının bu göçleri iyi bilmesi gerekmektedir.

2.6. ALAD Enzimi

2.6.1. ALAD'ın metabolizmadaki rolü

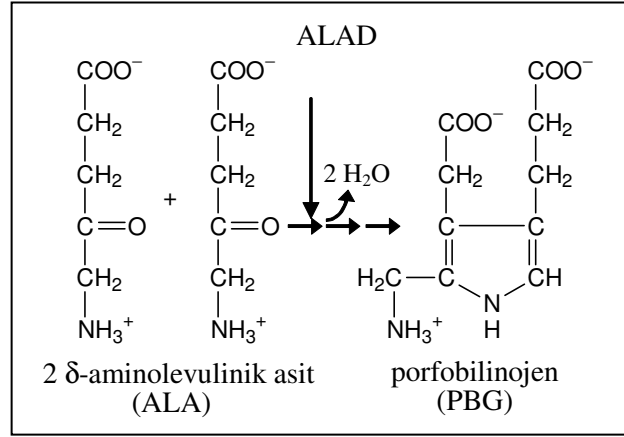
Canlı hücre içinde klorofillerin ve demir porfirinlerin nasıl sentez edildiği kesin olarak gösterilememiştir. Fakat yapılan pek çok araştırmalardan elde edilen kaniya göre bir aminoasit olan glisin ile Krebs çemberinin ara ürünlerinden olan suksinil CoA birleşerek α -amino- β -ketoadipik asiti verir. Sonra bir kofaktör olan piridoksal fosfat, δ -aminolevulinik asit sentetaz enzimi ve ışık ile δ -aminolevulinik asit meydana gelir (Şekil 2.2) [39].



Şekil 2.2. ALA'nın sentezi

Diğer bir ismi de porfobilinojen sentaz (PBGS) olan ALAD (EC 4.2.1.24), monoprol porfobilinojeni (PBG) oluşturmak için 2 molekül aminolevulinik asidin

(ALA) asimetrik bir kondensasyonunu gerçekleştiren tüm modifiye tetrapirollerin biyosentezinde ilk adımı katalize eder (Şekil 2.3) [40].



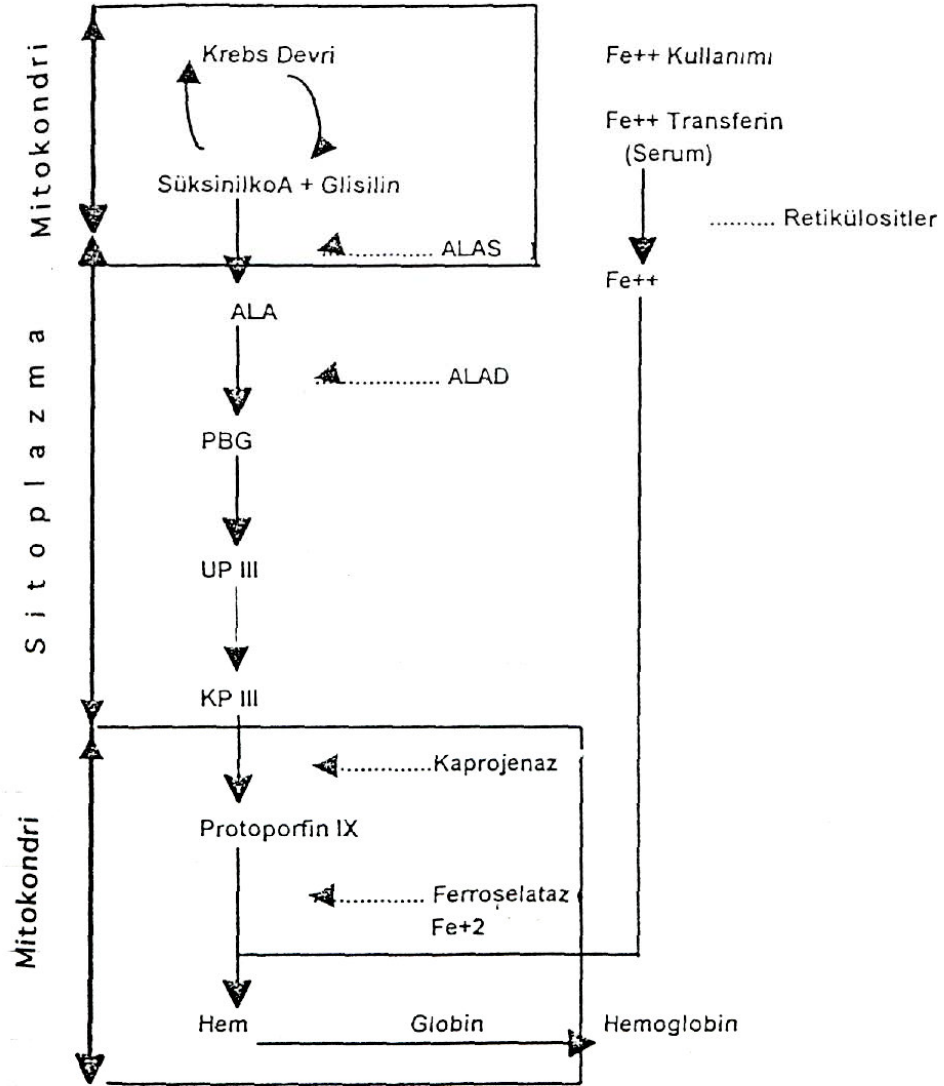
Şekil 2.3. ALA'dan porfobilinojen oluşumu

ALAD'lar, sığır karaciğeri [41], insan eritrositleri [42], *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* [43,44], *Escherichia coli* [45,46], *Spinacia oleracea* [47] ve *Pisum sativum*, *Saccharomyces cerevisiae* [40], gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir.

Tüm ALAD' ların temel katalitik özellikleri birbirine benzer olmasına rağmen enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve tiol hassaslığı ile farklı organizmalardan saflaştırılmış enzimler arasında farklılıklar gözlenmiştir [40].

Porfobilinojen tüm porfirinlerin ön maddesidir. Hem bitkilerin fotosentez yapıcı pigmenti olan klorofil ve hem de hayvanlarda hemoglobinin bir demir protoporfirini olan "heme" canlı hücreler içinde ortak bir yol aracılığı ile sentez edilmektedir. İnsektisidler, karsinojenler ve ağır metaller gibi birçok bileşik ALAD'ı inhibe ederek porfobilinojenin dolayısıyla hemoglobinin ve diğer hemoproteinlerin oluşumunu engellemektedir (Şekil 2.4). Tetrapirel yolunun bu son ürünleri, elektron transportundan fotosenteze kadar metabolizmanın birçok noktasında karmaşık şekilde yer alır.

40 yılı aşkın çalışmalar tetrapirel türevli bileşiklerin sentezine neden olan biyokimyasal olayların karakterizasyonu ile sonuçlanmıştır. Bugün reaksiyon mekanizması ve biyosentetik vasıtaların bilinmeyen çok az aşamaları kalmıştır [40].



Şekil 2.4. Hem biyosentezinde ALAD'ın yeri

2.6.2. ALAD'ların sınıflandırılmaları

Değişik kaynaklardan elde edilen bu enzim moleküler ağırlığı, optimum pH'sı, metal gereksinimi ve EDTA'ya olan hassasiyetleri bakımından iki sınıfta gruplandırılmıştır [48].

ALAD'ların I. Sınıfı, memeli ve kuşlardakini içeren sınıftır ve moleküler ağırlığı 260.000–285.000 kDa arasında olup, sekiz benzer alt birimden oluşmuştur [49]. Bu sınıf enzimin optimum pH' sı, 6.3–7.1 arasındadır. K_m değeri de ALA için 0.1–0.4 mM arasındadır. Maksimal aktivite için sülfidril bileşiklerine (SH) ve Zn^{+2} ye ihtiyaç göstermektedir [48,49].

Memeli ALAD aktivitesinin hem *in vitro* hem de *in vivo*'da, kurşun tarafından çeşitli dokularda (kan, karaciğer, böbrek, beyin ve kemik iliği) inhibe edildiği gösterilmiştir [50-53].

Farklı hayvan türlerinden saflaştırılan enzimin, benzer fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra benzer immünolojik özgüllüğünün de olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bu sonuçlardan, memeli enziminin evrimsel süreç içinde yüksek oranda korunduğu anlaşılmaktadır [54,55].

II. sınıf ALAD'lar ise temel olarak bakteriyel ve mayalarda bulunan tiptir. Bakteriyel enzimin optimum pH' sı 8–8.5 [40], arasında olup, maksimum aktivite için Mg^{+2} , Mn^{+2} ve K^{+2} gibi katyonlara ihtiyaç göstermektedir [43,44,48,56-58]. Zn^{+2} ile aktivasyon göstermemektedir. *Rhodopseudomonas capsulata*'dan elde edilen enzim diğer bakteriyel ALAD'larla benzer olmasına rağmen aktivasyon için metalik katyonlara ihtiyaç duymazlar ve EDTA tarafından inhibe edilmezler [43]. Mayalardan izole edilen enzim, çinko metallo enzimine benzerlik gösterir, EDTA' ya duyarlıdır ve optimum pH aralığı 9.5–9.7'dir. Bu pH memelilerde belirtilenden biraz daha yüksektir [59]. Ispanak ve diğer bitkilerdeki enzim ise Mg^{+2} ile aktive olup, EDTA'ya duyarlıdır. Daha az yüksek optimum pH' ya ihtiyaç duyarlar [60].

2.6.3. ALAD'ın kurşun ile etkileşimi ve kimyasal kirlilik indikatörü olarak önemi

δ -Aminolevulinik asit dehidratazın kurşun ile seçici inhibisyonu, kimyasal kirliliğin önemli bir biyolojik belirleyicisidir. Kurşuna ve çeşitli kimyasallara maruz kalmada ALAD aktivitesinin belirlenmesi bu enzimin kullanışlı bir biomarkör olabileceğini göstermiştir.

Hodson (1976) akarsudaki 13 µg/lt kurşun nitratin gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 4 haftalık bir uygulamadan sonra kırmızı kan hücresi delta-ALAD aktivitesini anlamlı bir derecede azalttığını bulmuştur [21].

Daha sonraki bir çalışmada delta-ALAD üzerine kurşunun 2 haftalık uygulamalarının gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), dere alabalığında (*Salmo turutta*), kırmızı (havuz) balığında (*Carassius auratus*) ve güneş balığında (*Lepomis gibbosus*) sırasıyla 10, 90, 470 ve 90 µg/lt konsantrasyonlarının önemli etkiler yaptığı gösterilmiştir [22].

Jackim [23] *Fundulus heteroclitus* ve kış dilbalığı (*Pseudopleuronectes americanus*) üzerine kurşun nitratin deniz suyunda statik 10 mg/lt konsantrasyonunu uygulayarak delta-ALAD enzimi üzerine etkilerini araştırmıştır. *Fundulus heteroclitus*' da 96 saatlik ve 2 haftalık uygulamadan sonra karaciğer delta-ALAD aktivitesinde sırasıyla %22 ve %18.5 azalmanın olduğunu; kış dilbalığında ise 1 haftalık bir uygulamadan sonra karaciğer delta-ALAD aktivitesinde %66 böbrek delta-ALAD aktivitesinde ise %58 azalmanın olduğunu belirtmiştir.

Kutlu ve Sümer [61] *Gammarus pulex* için kurşun asetatın 96 saatlik uygulaması sonucunda LC₅₀ değerini 0.394 mg/lt olarak bulmuşlardır. Bu değer uygulanarak ALAD inhibisyonunun zamana bağlı olarak arttığını ve paralel olarak organizmada kurşun miktarının arttığını tespit etmişlerdir. *Gammarus pulex* ALAD'ının optimum aktivitesi pH 8 civarında, sıcaklık 37°C olarak bulunmuş ve enzimin ısıya duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Kinetik analizler sonucu K_m değerini 0.043–0.058 mM ALA ve V_{max} değerini 17.6 PBG/saat/mg protein olarak bulmuşlardır.

Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) karaciğer ALAD aktivitesinin Pb⁺² inhibisyonu için IC₅₀ değeri 17.3 µM olarak bulunmuştur. Enzimin kinetik analizleri sonucunda K_m değeri 0.042 mM ALA ve V_{max} değeri 2.57 PBG/saat/mg protein olarak tespit edilmiştir. Yine enzimin çinko ile aktivasyon göstermediği ve EDTA'nın inhibe etkisi özelliğinin yumuşatıldığı gösterilmiştir [62].

Yavru gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) 29 gün boyunca 0, 29, 48, 121 ve 201 µg/lt kurşun nitrata maruz bırakılmış ve tüm vücut ALAD aktivitesi ölçülmüştür. 0, 29, 48 µg/lt kurşuna maruz bırakılmış balıklarda önemli

oranda ALAD aktivitesi düşüŖü gözlenmemiŖtir. Bu karŖılık 121 ve 201 µg/lt kurŖuna maruz bırakılmıŖ balıklarda ALAD aktivitesi önemli oranda düŖtüğü gözlemlenmiŖtir [63].

Campana ve ark. [64] *Halobatrachus didactylus*'da kurŖunun ALAD aktivitesi, metallothionein seviyeleri ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini araŖtırmıŖlardır. Böbrek ve karaciğer ALAD aktivitesinde önemli deęiŖlik olmamasına karŖın kan ALAD aktivitesinde düŖüŖ olduğunu tespit etmiŖlerdir.

YetiŖkin kara kurbağalarına (*Bufo arenarum*) vücut ağırlığına bağlı olarak 10, 25, 50 ve 100 mg/kg kurŖun asetat enjekte edilmiŖ ve 7 gün sonra kan parametrelerine bakılmıŖtır. Kan kurŖun konsantrasyonunun artıŖına bağlı olarak ALAD aktivitesinde düŖüŖ olduğu gözlemlenmiŖtir [65].

Gastropodlardan pigmentli ve pigmentsiz *Biomphalaria glabrata* ve Oligoketlerden *Lumbricus variegatus* türlerinin yumuŖak dokularında ALAD aktivitesi ölçülmüŖtür. Organizmalara 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kurŖun nitrat verilmiŖtir. Enzim aktivitesinde %50'lik inhibisyon oluŖturan kurŖun konsantrasyon değerleri pigmentli ve pigmentsiz *Biomphalaria glabrata* için sırasıyla 0.023 ve 0.029 mg/lt kurŖun, *Lumbricus variegatus* için 0.703 mg/lt kurŖun olarak bulunmuŖtur. IC₅₀ değerleri, *Lumbricus variegatus* türünün *Biomphalaria glabrata* türüne göre enzim inhibisyonuna karŖı daha toleranslı olduğunu göstermiŖtir [4].

Peixoto ve ark. [66] genç ratların yetiŖkinlere göre ağır metallere karŖı daha duyarlı olduklarını göstermiŖlerdir. 1–6, 8–13, 17–21 günlük ratların beyin, böbrek ve karaciğer ALAD aktiviteleri IC₅₀ değerleri, CdCl₂ için 0–200 µM, HgCl₂ için 0–600 µM, Pb asetat için 0–50 µM arasındaki metal konsantrasyonları kullanarak belirlemiŖlerdir. Sonuçlar serebral ALAD aktivitesinin Cd ve Hg'ye göre kurŖun asetata karŖı daha duyarlı olduğunu gözlemlenmiŖlerdir. Yine hepatik dokudaki ALAD en çok HgCl₂'ye karŖı koymuŖtur. KurŖun ve kadmiyum civaya göre renal enzim aktivitesini daha da düŖürmüŖtür.

Ratlarda kurŖun ve çinkonun doğum sonrası beyin gelişiminde, beyin, böbrek ve kan ALAD aktivitesi DDT'li (DL-dithiothreitol) ve DDT'siz saptanmıŖtır. DDT'li reaktivasyon indeksinin kurŖun ve çinko uygulamalarında kontrol grubundakilere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiŖtir [67].

Pseudomonas putida ve *P. aeruginosa* türleriyle yapılan bir çalışmada kurşun konsantrasyonunun artışına paralel olarak ALAD aktivitesinde bir inhibisyonun olduğu bulunmuştur. Yine bu çalışma bu türlerdeki ALAD aktivitesinin, Pb^{+2} 'ye maruz kalmanın bir biyomarkörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir [68].

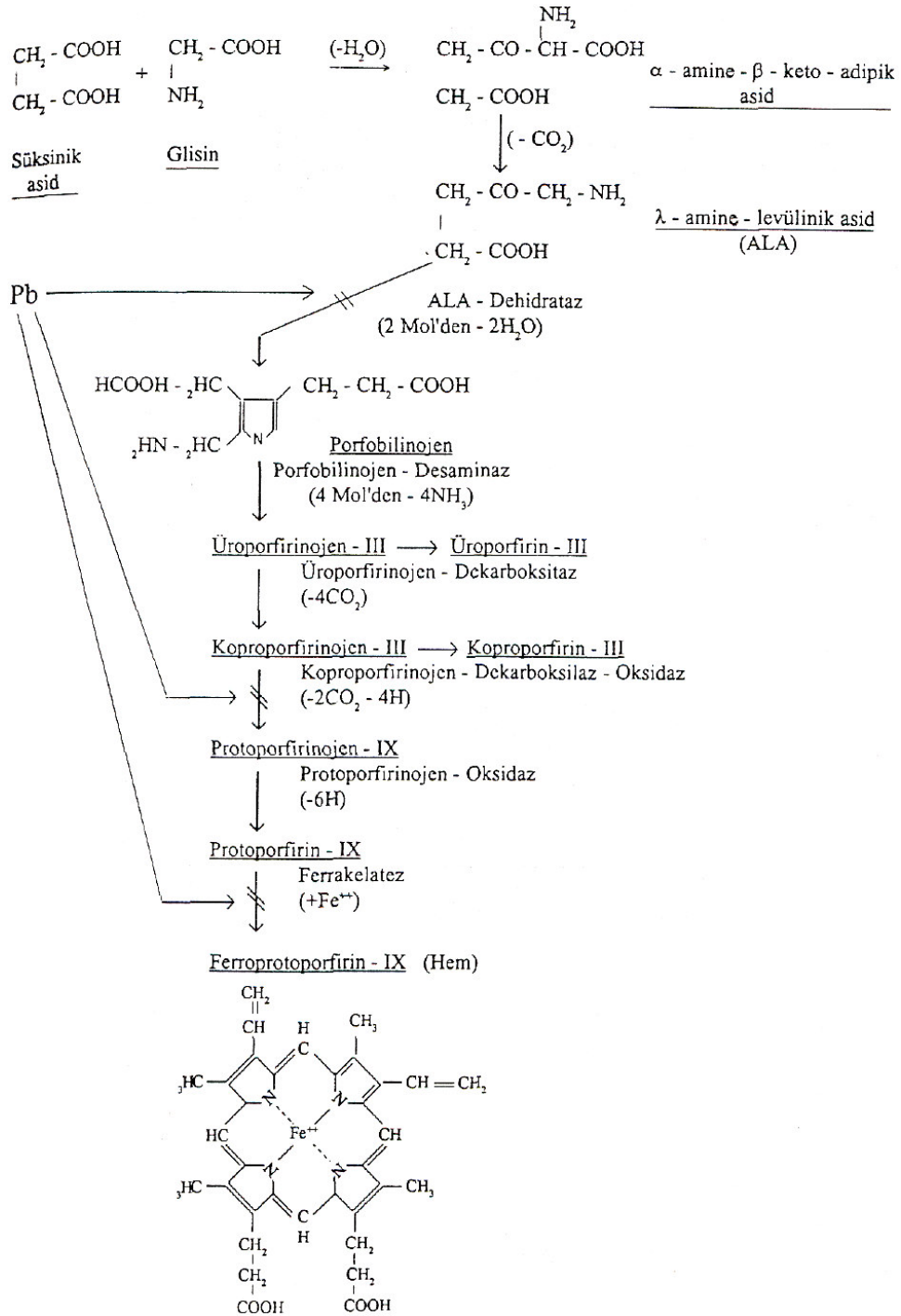
Erkek ratlarda subkronik kurşun intoksikasyonunun tedavisinde aminoasit ve antioksidan olan taurine ve DMSA (2,3-dimercaptosüksinik asit) ile birlikte etkileri gösterilmiştir. Kurşuna maruz kalma kan ALAD aktivitesinde önemli bir inhibisyona, GSH'da azalmaya ve ZPP'de (çinko protoporfirini) artmaya neden olmuştur. Sadece DMSA, ALAD aktivitesini artırabilmiş ve hem taurine hem de DMSA, GSH seviyesini normal seviyeye çıkarabilmiştir [69].

Yine yetişkin ratlarda organik selenyum bileşiklerinin ve difenil ditellürit ($PhTe$)₂'in değişik bileşiklerinin karaciğer, böbrek ve beyin ALAD'ı üzerine inhibe edici etkileri incelenmiştir. Organik selenyum bileşikleri diphenyl ditelluride bileşiklerine göre daha fazla enzim inhibisyonuna yol açmıştır [70].

Jain ve Gadre [71] yeşillenme esnasında mısır yapraklarına verilen *in vivo* sodyum arsenatın ALAD aktivitesi üzerinde inhibe edici etki olduğunu göstermişlerdir.

Ağır metallerin kırmızıturp yapraklarında ALAD aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan elementler içerisinde Cd^{+2} 'nin bu bitki için en yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. ALAD aktivitesindeki %50 inhibisyon için *in vitro* değerler Cd^{+2} 0.39 mM, Zn^{+2} 0.39 mM, Hg^{+2} 2.29 mM, Pb^{+2} 1.38 olarak bulunmuştur. *In vivo*da Cd^{+2} %40, Zn^{+2} %26, Hg^{+2} %34, Pb^{+2} %15 oranında ALAD'ı inhibe etmiştir [72].

In vitro çalışmalar, hemoglobin sentezi yolundaki bazı enzimlerin kurşunla inhibe olduğunu göstermiştir (Şekil 2.5) [73].



Şekil 2.5. Kurşunun bloke ettiği hemoglobin sentezi kademeleri

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneyleerde kullanılan canlıların sağlanması ve laboratuarda yetiştirilmesi

Sakarya Nehri havzasında yayılış gösteren *Palaemonetes turcorum*'lar; Eskişehir- Ankara yolunun 30. km'sinde, Yeşilhan Mevkiinde, Sakarya Nehri havzasının uzantısından kepçe ve elekler yardımıyla toplanmıştır.

Toplanan örnekler kendi suları ile doldurulan plastik kaplar yardımıyla Eskişehir Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Enzimoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Morfolojik olarak eş büyüklükte olanlar belirlenmiş ve deneyler için ayrılmıştır. Örnekler en az 7 gün süre ile laboratuvar koşullarına alıştırmıştır. Akvaryumlarda (10 lt) hava akımı sağlanarak, suyun sıcaklığı $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve pH'ı 7.5-8.2 arasında ayarlanmıştır. Sağlıklı olan örnekler deneye alınmıştır. Deneylerin başlangıcından itibaren canlıların hareketli kısımları her gün izlenerek, aktif olmayanlar ayrılıp deneye alınmamıştır. Akvaryumda haftada bir kez organik materyalle beslenen canlılar 4-6 hafta yaşayabilmektedirler.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar Sigma, Merck ve Fluka firmalarından temin edilmiştir.

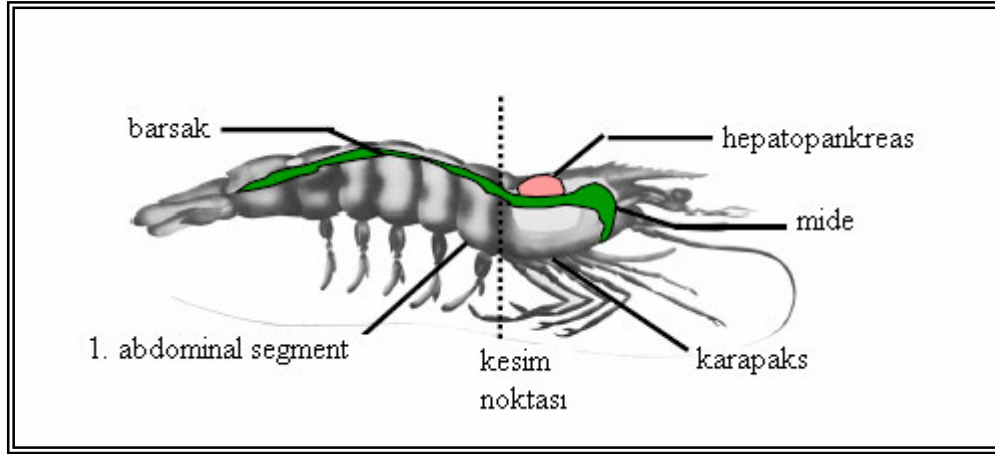
3.2. Yöntem

3.2.1. ALAD aktivitesinin tayini

3.2.1.1. Diseksiyon

Diseksiyon aşamasının başında 96 saat boyunca Kurşun asetat [$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$] ile muamele edilmiş karideslerde ve kontrol grubunda bulunan karideslerde stres proteinlerinin salgılanmasını önlemek için sularından çıkarılan

karideslerin ölmesi beklenmeden ilk aşamada başları kesilmiştir. Daha sonra karidesler binoküler mikroskop altında ventrallerinden kesilerek karaciğerleri (hepatopankreatik sekalar) çıkarılmış (Şekil 3.1) ve KCl tamponuna alınmıştır.



Şekil 3.1. Karideste karaciğer (hepatopankreas) diseksiyonu

3.2.1.2. Homojenatın hazırlanması

Diseksiyon sonrası çıkarılan her bir karaciğer, 150 µl KCl (pH: 6.8) ile buz içerisinde Teflon Potter- Elvehjen cam homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra Herraus Sepatech Biofuge 17 RS soğutmalı santrifüjde 8000g'de 10 dakika santrifüje edilmiştir. ALAD aktivitesi için enzim kaynağı olarak süpernatantlar kullanılmıştır [61].

Bir enzim birimi, yukarıda belirlenmiş koşullar altında bir saatte bir nanomol PBG oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgül aktivite ise nmol PBG/ saat/ mg/ml protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.3. Aktivite tayini

Reaksiyon karışımında 0.1 M fosfat tamponu (pH: 6.8) içinde 3.3 mM ALA, 8000g süpernatant (0.15 ml) ve 0.3 M redükte glutatyon bulunmaktadır. Karışım 37°C'de ve azot gazı altında 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 0.75 ml 0.1 M HgCl₂'lü %10'luk TCA (trikloro asetik asit) ile durdurulduktan sonra, 8000g'de santrifüje edilerek 0.5 ml süpernatana 1 ml %5'lik TCA ve 1.5 ml

modifiye Ehrlich Ayıracı ilave edilerek 5 dakika sonra 555 nm’de Hitachi–160 spektrofotometrede absorbans okunmuştur. Tüm solüsyonlar günlük olarak hazırlanmıştır [61].

3.2.1.4. Protein miktar tayinleri

Örneklerin protein miktarları Lowry’e [74] göre bovin serum albumin (BSA) standart alınarak Sigma (PO 5656) protein tayin kiti ile mikro protein analizi yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.2. ALAD-kurşun etkileşimi (*in vivo*)

3.2.2.1. Kurşun asetatın *Palaemonetes turcorum* için LC₅₀ değerinin saptanması

LC₅₀ değerinin saptanabilmesi için kontrol grubunun yanı sıra, farklı kurşun asetat [Pb(C₂H₃O₂)] konsantrasyonlarının uygulandığı 11 adet deney grubu oluşturulmuştur. Kurşun asetatın stok solüsyonu deiyonize suda 1g/lt olarak hazırlanmış ve 0.5–200 mg/lt konsantrasyon dağılım aralığındaki dozlar uygulanmıştır. Her grup için 5’er canlı kullanılmıştır. Kurşun asetat uygulamasından 96 saat sonra canlılar ve ölenler sayılmış ve EPA Probit Analiz Programı kullanılarak LC₅₀ değeri saptanmıştır [20]. Doz taraması deneyi üç tekrarlı yapılmıştır.

3.2.2.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş *Palaemonetes turcorum*’da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi

LC₅₀ dozu uygulanmış denek grubunun ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kurşun asetat (LC₅₀ dozu) uygulanmasından itibaren 4., 16., 32. ve 64. saatler sonunda canlılar disekte edilmiş, karaciğerler çıkarılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra enzimatik çalışmalara geçilmiştir. Enzimatik çalışmalar 0-4°C’de yapılmış ve her deney üçer kez tekrarlanarak ortalama değerler alınmıştır.

3.2.2.3. *Palaemonetes turcorum*'un Pb içeriğinin ICP-OES yöntemi ile belirlenmesi

Kurşun asetat alımını izleyen farklı zaman periyotları içinde (4.-16.-32. ve 64. saatler sonunda), *Palaemonetes turcorum* karaciğer dokularındaki Pb miktarları, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Karaciğer dokuları petri kaplarına konularak 105°C sıcaklığa ayarlı etüvde kurutulmuş sabit tartıma getirilmişlerdir. Daha sonra kuru ağırlıkları saptanan doku örnekleri yakma tüplerine aktarılmışlardır. Yakma tüplerindeki doku örnekleri üzerine 2 ml nitrik asit ve 1 ml perklorik asit eklendikten sonra geri soğutma sistemli ocakta yaş yakma yapılarak berrak çözeltileri elde edilmiştir [2]. Yakma işlemi tamamlanan örnekler soğuduktan sonra polietilen tüplere aktarılıp çift distile su ile 5 ml'ye tamamlanmışlardır.

Analize hazırlanan karaciğer dokularındaki Pb miktarları, ICP-OES Perkin Elmer 4300DV cihazı ile saptanmıştır.

3.2.2.4. İstatistikî analizler

One-Way ANOVA, tek yönlü varyans analizi uygulanarak; grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edildi. Veriler SPSS (versiyon 10.0) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklılık olduğu durumda farklılığı yaratan grupların hangisi olduğunu bulmak için ($P < 0.05$) varyanslar homojen ise Dunnet-C, homojen değilse Dunnet-t (2-yönlü) testi kullanılmıştır.

3.2.3. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının biyokimyasal özelliklerinin saptanması

3.2.3.1. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için başlangıç sıcaklık derecesi 5°C olarak belirlenip 15°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C'lerde aktiviteye bakılmış ve sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3.2.3.2. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi

ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimini belirlemek için 0. dakikadan başlayarak, 15. dakika, 30. dakika, 45. dakika, 60. dakika, 75. dakika ve 90. dakikalarda aktivite ölçülmüştür.

3.2.3.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için asetat, fosfat ve tris tamponları kullanılarak enzimin optimum pH aralığı belirlenmiştir. pH değerleri 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 arasında taranmıştır.

3.2.3.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi

Palaemonetes turcorum ALAD'ının V_{max} ve K_m değerlerini belirlemek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş ve sonuçlar Michaelis-Menten grafiği ile Line Weaver-Burke grafiğinde gösterilmiştir.

3.2.3.5. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Zn^{+2} iyonlarının etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Zn^{+2} 'ya duyarlılığı karşılaştırmalı olarak saptanmıştır. $ZnCl_2$ stok çözeltisinden, 1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 500 μM konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.2.3.6. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Mg^{+2} iyonlarının etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Mg^{+2} 'ya duyarlılığı karşılaştırmalı olarak saptanmıştır. $MgCl_2$ stok çözeltisinden, 1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 500 μM konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.2.3.7. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Mn^{+2} iyonlarının etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Mn^{+2} 'ya duyarlılığı karşılaştırmalı olarak saptanmıştır. $MnCl_2$ stok çözeltisinden, 1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 500 μM konsantrasyonlarında homojenata eklenerek, aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.2.3.8. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının EDTA'ya duyarlılığı

EDTA'ya duyarlılık açısından, enzim aktivitesi belirlenirken 100 μM , 200 μM ve 300 μM arası EDTA konsantrasyonları taranmış, aktivite üzerine etkisi denek grupları ile kontrol gruplarına karşı belirlenmiştir.

3.2.4. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması

3.2.4.1. Ham ekstrenin hazırlanması

Diseksiyon sonrası çıkarılan her bir karaciğer, ağırlıkları tartıldıktan sonra 0.1 M K-fosfat tamponu (pH 6.8) ile buz içerisinde homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat 8000g'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ham enzim preparasyonu olarak kullanılmıştır [61].

3.2.4.2. Amonyum sülfatla çöktürme

Tuzla çöktürme ("salting-out") proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denaturasyona yol açmadan, proteinlerin bir araya gelmelerine ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve

etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla da bilinmektedir.

ALAD enziminin saflaştırılmasında bu teknik kullanılmıştır. Ham enzim preparasyonuna %25 doyum için katı amonyum sülfat ilave edilmiştir. 60 dakika 4°C 'de karıştırıldıktan sonra 15.000g'de 4°C 'de, 10 dakika santrifüje edildikten sonra çöken proteinler toplanmıştır. Supernatant amonyum sülfatla %50 doyuma getirildikten sonra tekrar 60 dakika 4°C 'de karıştırılmıştır. 15.000g'de 4°C 'de, 10 dakika santrifüje edildikten sonra çöken proteinler toplanmıştır. Aynı prosedür %75 ve %100 doyum için tekrarlanmıştır. Proteinler 0.1 M K-fosfat tamponu (pH 6.8) içerisinde çözdürülmüştür [75].

3.2.4.3. Amonyum sülfat ve düşük molekül ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması

Proteinlerden amonyum sülfat ve düşük molekül ağırlıklı yapıların uzaklaştırılması için diyaliz yöntemi uygulanmıştır. Dializ membrana alınan her bir protein fraksiyonu bir gece 0.1 M K-fosfat tamponunda (pH 6.8) bekletilmiştir. Membrandan difüze olmayan materyal jel filtrasyonunda kullanılmıştır [75].

3.2.4.4. Jel geçirgenlik kromatografisi

Dekstran esaslı materyalleri kullanarak makromolekülleri molekül büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktır. İşlem temel olarak, proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde ve protein çözeltilerinin tuz derişimlerinin düşürülmesinde kullanılır. Çalışma prensibi oldukça basittir. Kolon küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip jel parçacıklarında oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek kolondan hızla ilerlerler; küçük moleküller ise gözenek içerisine difüzlenir ve molekül küçüldükçe artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar.

Bu çalışmada moleküler ağırlığı ayırım aralığı 5000–300.000 olan Sephadex G–200 jel ortamı kullanılmıştır. Jel 4°C 'de 30 mM, pH 6.8 K-fosfat tamponunda 2 gece bekletilerek şişirilmiştir. Yine 4°C 'de kolona (1.6x31.5 cm)

yüklenmiştir. Kolon akış hızı 10 ml/saat olarak ayarlandı. Aynı tampon ve akış hızıyla örnek uygulanmış ve fraksiyonlar (3 ml) toplanmıştır [76].

3.2.4.5. Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAJE), polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır. Ayrıca moleküller negatif bir yük de kazandırmaktadır. SDS-PAJE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine imkân vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir. Ayrıca bu tip bir ayrışımın sonuçlarını matematiksel olarak değerlendirerek molekül ağırlığını belirlemek de mümkündür. Bu çalışmada kesikli SDS jel elektroforezi tekniklerinden biri olan Laemmli [77] tanımladığı yöntem kullanılmıştır.

Çözeltiler

- A) Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30T, %2.7 C_{bis})
- B) Ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris, pH 8.8)
- C) Yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris, pH 6.8)
- D) %10 SDS
- E) %10 amonyum persülfat
- F) Ayırma jeli yüzey çözeltisi (0.375 M Tris, %0.1 SDS, pH 8.8)
- G) Örnek uygulama tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10, 2-merkaptotanol, %0.2 bromofenol mavisi pH 6.8)
- H) Tank tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)

%10'luk ayırma jeli

Monomer (A)	9.975 ml
Tampon (B)	7.5 ml

%10 SDS (D)	0.3 ml
H ₂ O	11.925 ml
TEMED	15 µl
APS (E)	300 µl

Karışım jel kasetine dökülerek tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon bittikten sonra, tarak bir taraftan başlayarak ve kuyucuklar bozulmadan yavaşça kaldırılmıştır. Eşit hacimde protein örnek ile örnek uygulama tamponu bir eppendorf tüpte karıştırılmıştır. Referans olarak kullanılacak standart protein karışımı (Sigma M4038, Wide molecular weight range) üretici firmanın önerdiği şekilde uygulama tamponunda hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm tüpler 2-10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Jel kaseti içi tank tamponuyla dolu elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Örnekler ve standart protein karışımı (15µl) jeldeki ceplere yüklenmiştir.

Elektroforez, Apelex PS 9008 TX cihazıyla yapıldı. Sistem güç kaynağına bağlanarak proteinler 200 voltta 5 saat yürütülmüştür.

Proteinlerin Boyanması

Jellerin gümüş boyaması Blum ve ark.[78]'a göre yapılmıştır:

a) Fiksasyon (Sabitleme): Fiksasyon çözeltisi metanol (%50), glasiyal asetik asit (%12) ve 0.5 ml formaldehit (%37) ile hazırlanmıştır. Ayırıştırılmış proteinlerin difüzyonunu önlemek, yabancı maddeleri uzaklaştırmak ve boyanan jelde temiz bir zemin hazırlamak için bu aşama oldukça önemlidir. Jeller en az 1 saat veya 1 gece fikse edilmiş; ancak birkaç gün sabitleme çözeltisinde tutulduğunda da gümüş boyamanın kalitesi olumsuz etkilenmemiştir.

b) Yıkama: Yıkama çözeltisi %50'lik etil alkoldür. Ön-uygulama basamağında, sodyum tiyosülfatın asit kararsızlığı nedeniyle asetik asidin uzaklaştırılması için önemlidir. Yıkama işlemi, 3 kez 20'şer dakika uygulanmıştır. 1 mm kalınlıktaki jelin deformasyonunu önlemek için son 20 dakikada %30'luk etanol kullanılabilir. Ayrıca, jeller birkaç saat için %50'lik etanolde bekletilebilir.

c) Ön-uygulama: Çözeltisi, sodyum tiyosülfat pentahidrat (0.2 g/lit)'dir. Boyama zeminindeki artışı engellemek için uygulama fazla uzun sürmemiş, tam 1 dakika bekletilmiştir. Jeldeki tiyosülfatın kalıntıları duyarlılığı teşvik eder ve yüksek zıtlık oluşturur.

d) Durulama: Jel yüzeyindeki fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak ve AgNO_3 ile yüzey boyamasını sağlamak için 3 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanmıştır.

e) Sabitleme: Sabitleme çözeltisi AgNO_3 (2 g/l) ve 0.75 ml formaldehit (%37) olup; 20 dakika uygulanmıştır. Bu çözeltide var olan formaldehit (HCOH), yüksek hassasiyet ve gümüş boyamada iyi bir zıtlık için zorunludur; fakat boyanan zeminde artış sağlamaz. Gümüş nitrat (AgNO_3) sabitlendikten sonra sodyum tiyosülfat ile yapılan ön uygulamadan dolayı bazen jellerde az da olsa sarımtıraklık görülür. Sonuçta bu durum, hassaslığı veya zeminin boyanmasını engellemez.

f) Durulama: AgNO_3 ile sabitlenen jelin yüzeyindeki fazla AgNO_3 'ü ve sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak için 2 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanmıştır.

g) Geliştirme: Geliştirme çözeltisi, sodyum karbonat (60 g/l), 0.5 ml formaldehit (%37) ve sodyum tiyosülfat pentahidrat (4 mg/l) içerir. Protein benekleri yaklaşık 10 dakikada gelişir. Bu süreç, sarımtırak zeminin oluşması ile yavaşlamaktadır. Yüksek kalitede gümüş boyamaya neden olur. Geliştirme çözeltisi, jel ile temas eder etmez silik kahverengi benekler görülür. Bu, çabuk ve etkin sallama ile gerçekleştirilir. Çözeltinin rengi, serbest tiyosülfatın kaybolmasından dolayı birkaç dakika sonra kahverengiye dönüşür. Bu durumda çözelti hemen eski yerini alır. Protein beneklerinin gelişim hızı bantlardaki protein çeşidine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Örneğin, geliştirme çözeltisi uygulandıktan yaklaşık 30 saniye sonra 500 ng protein bandı, yaklaşık iki dakika sonra 50 ng protein bandı ortaya çıkmaktadır.

g) Yıkama: Uygulama, 2 kez 2'şer dakika distile su ile gerçekleştirilmiştir. Fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırır ve durdurma çözeltisinde ayrıştırmayı gerçekleştirecek zemin boyanmasını sağlar.

h) Durdurma: Durdurma çözeltisi metanol (%50) ve glasiyal asetik asit (%12) ile hazırlanmış 10 dakika uygulanmıştır. Çözeltinin sıcaklığını 25°C 'nin aşağısında tutmak, yoğunluk ve bandların rengindeki değişimleri en aza indirmek için önemlidir.

i) Yıkama: Yıkama çözeltisi %50'lik metanoldür ve 10 dakikadan fazla uygulanmıştır. Glasiyal asetik asidi uzaklaştırmak için gereklidir. Bir taraftan

gelişimdeki azalmayı yarıda keser, diğer taraftan koyu kahverengi veya siyah renkli protein beneklerinin gelişimini hızlandırır.

Proteinleri boyama aşamalarının tamamı, oda sıcaklığında ve sallayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Boyamanın her aşamasında şeffaf eldivenler kullanılmış ve her bir aşamada değiştirilmiştir. Boyama bitiminde jeller +4°C'de saklanmıştır.

Jellerin Fotoğraflanması

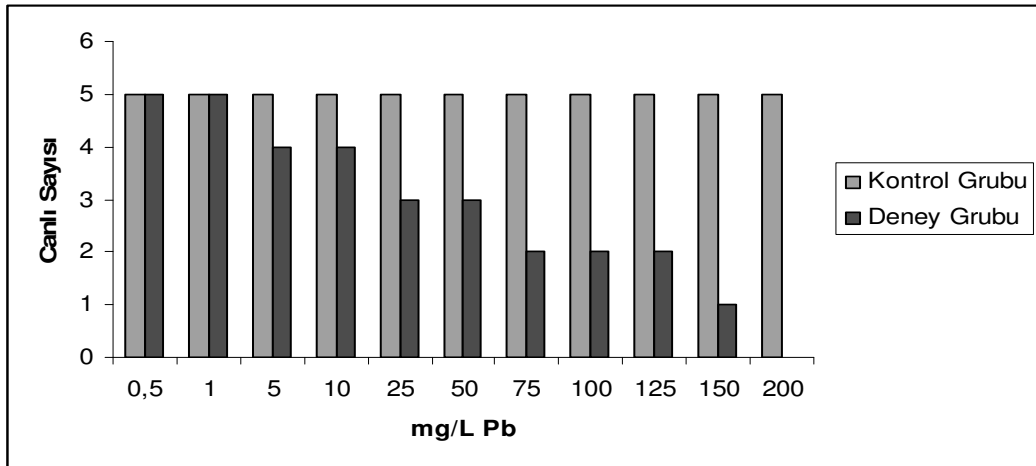
Jeller boyandıktan hemen sonra, Fujitsu S7000 FinePix 19x (6x Optical 3.2x Dijital) fotoğraf makinesi takılmış Uvitec-UV illüminatör sisteminde fotoğraflanmıştır. Jeller, çekim sırasında UV-illüminatörün aydınlatma kısmına konulan özel filtre üzerine yerleştirilmiştir. Enzimin molekül ağırlığı UVI.PHOTO programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. ALAD-Kurşun Etkileşimi (*in vivo*)

4.1.1. Kurşun asetatın *Palaemonetes turcorum* için LC₅₀ değeri

LC₅₀ değerinin saptanması için kurşun asetatın 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 mg/lt'lik konsantrasyonlarda, 96 saat sonunda canlı kalan *Palaemonetes turcorum* sayılarının uygulanan dozlara göre dağılımı, Şekil 4.1'de verilmiştir. EPA Probit Analiz Programının uygulanması sonucu *Palaemonetes turcorum* için kurşun asetatın LC₅₀ değeri 0.135 mM olarak bulunmuştur. Uygulama süresince kurşun asetatın 0.5 ve 1 mg/lt'lik konsantrasyonlarında tüm örnekler canlı kalırken, 200 mg/lt'lik konsantrasyonda örneklerin tümü ölmüştür.

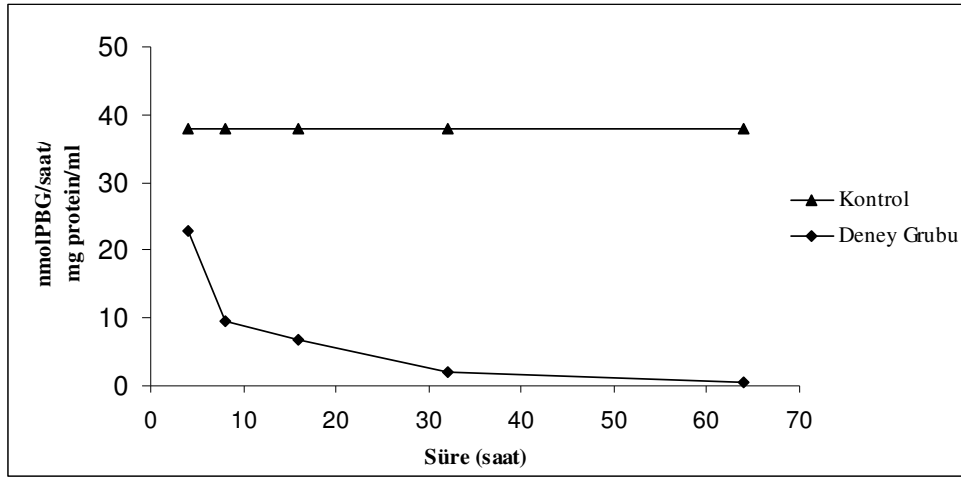


Şekil 4.1. *Palaemonetes turcorum*'da PbAsetat için LC₅₀ değerinin saptanması ile ilgili doz tarama sonuçları

LC₅₀ değerinin saptanması sırasında kullanılan musluk suyunun kimyasal parametreleri pH 7.5-8.2, çözünmüş oksijen 5.6 ±0.2 mg/lt., sertlik 260 mg/lt, alkalinite 45.08 mg/lt ve sıcaklık 23 ± 1°C olarak ölçülmüştür.

4.1.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş *Palaemonetes turcorum*'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi

LC₅₀ dozu uygulanmış deney grubunda ALAD aktivitesi, uygulamadan itibaren 4., 16., 32. ve 64. saatlerde ölçülmüş ve aktivitenin zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Son ölçüm saati olan 64. saatte %100'e yakın bir inhibisyonun varlığı saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kurşun asetat ile muamele edilmiş *Palaemonetes turcorum*'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi

Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir. $p < \alpha$ olduğundan grupların homojen olmadığı bulunmuştur. Dunnett-t (2-yönlü) testi uygulanarak kontrol grubu ile 4, 8, 16, 32 ve 64. saatlerdeki uygulamada gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kurşun asetat ile muamele edilmiş *Palaemonetes turcorum*'da ALAD aktivitesinin zamana göre değişimi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

Grup 1 N=6	Grup 2 N=6	X±Sh	p
Kontrol	4 saat	11,7333	<0.04
	8 saat	27,7000	<0.01
	16 saat	29,6517	<0.01
	32 saat	35,5267	<0.01
	64 saat	37,2567	<0.01

X= Ortalama

p=Significant

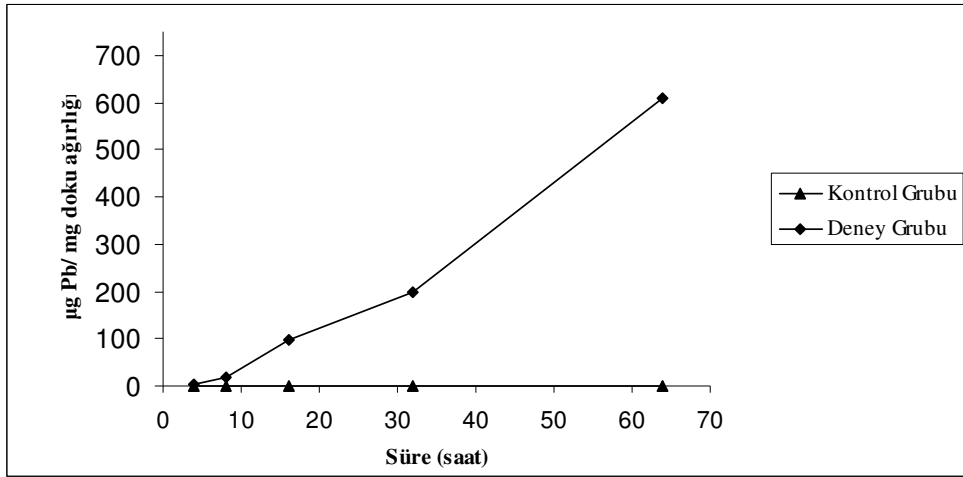
NS=Non Significant

$p < 0.05$ gruplar arası anlam farkı

Sh, grup 1 ve grup 2 için ± 4.2139

4.1.3. *Palaemonetes turcorum*'un Pb içeriğinin ICP-OES yöntemi ile belirlenmesi

LC₅₀ dozu uygulanmış deney grubunda, uygulamadan itibaren 4., 16., 32. ve 64. saatlerde karaciğer dokularındaki Pb miktarları, ICP-OES Perkin Elmer 4300DV cihazı ile saptanmıştır. Zamana bağlı olarak *Palaemonetes turcorum*'da Pb miktarının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Palaemonetes turcorum*'un zamana bağlı olarak Pb içeriği

Çizelge 4.2. *Palaemonetes turcorum*'un zamana bağlı olarak Pb içeriğinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

Grup 1 N=6	Grup 2 N=6	X±Sh	p
Kontrol	4 saat	1.0417	NS
	8 saat	17.1667	NS
	16 saat	96.3333*	<0.02
	32 saat	253.0000*	<0.01
	64 saat	607.1667*	<0.01

X= Ortalama p=Significant NS=Non Significant
 p<0.05 gruplar arası anlam farkı
 Sh, grup 1 ve grup 2 için ±31.1583

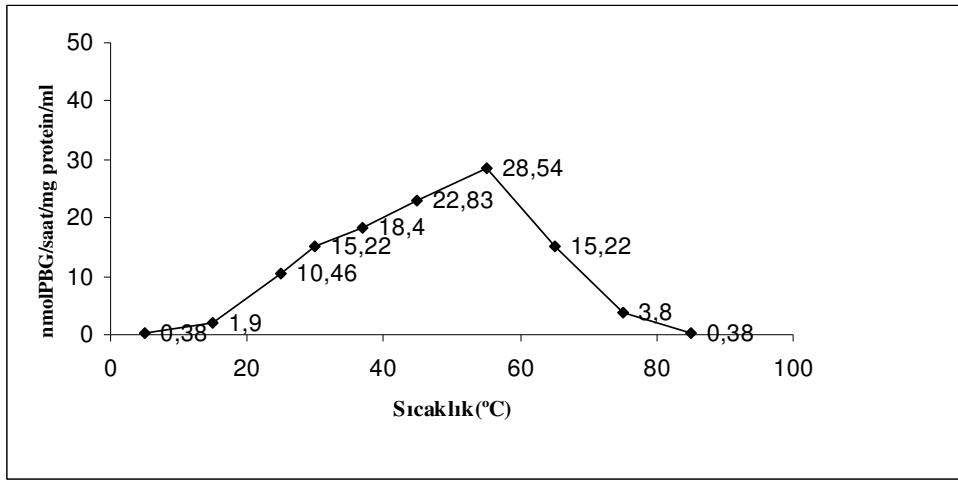
Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir (Çizelge 4.2). $p < \alpha$ olduğundan grupların homojen olmadığı bulunmuştur. Dunnett-t (2-yönlü) testi uygulanarak kontrol grubu ile 16, 32, 64. saatlerdeki uygulamada gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu %95

güvenilirlikle söylenebilir. 4 ve 8 saatlik uygulamalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış bulunmamıştır.

4.2. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

4.2.1. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

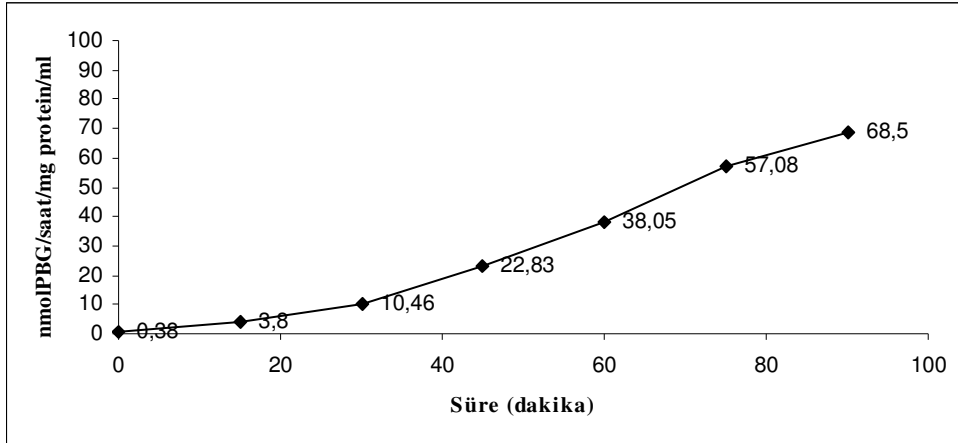
ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisini belirlemek için başlangıç sıcaklık derecesi 5°C olarak belirlenip 15°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C'lerde enzim aktivitesi ölçülmüştür. 5°C'den itibaren enzim aktivitesinin arttığı, 55°C'de maksimuma ulaştığı ve bu sıcaklık derecesinden sonra gittikçe düşerek 85°C'de enzim aktivitesinin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. ALAD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi

4.2.2. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi

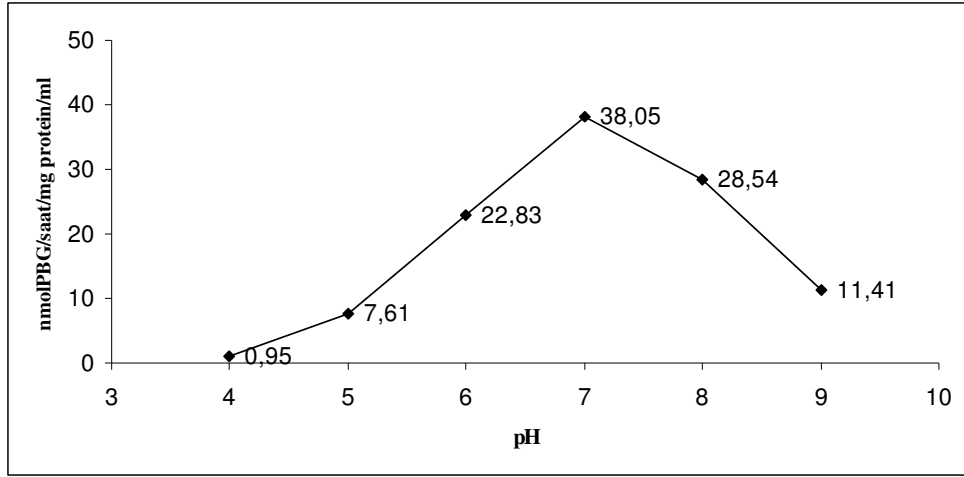
ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimini belirlemek için 0. dakikadan başlayarak, 15. dakika, 30. dakika, 45. dakika, 60. dakika, 75. dakika ve 90. dakikalarda aktivite ölçülmüştür. İnkübasyon süresinin artışına paralel olarak enzim aktivitesinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi

4.2.3. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

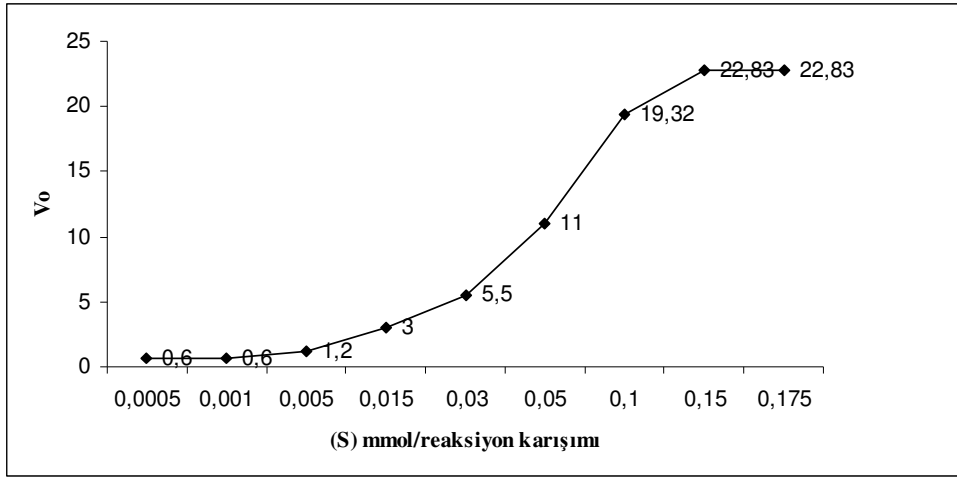
ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için asetat, fosfat ve tris tamponları kullanılarak enzimin optimum pH aralığı belirlenmiştir. pH değerleri 4, 5, 6, 7, 8, ve 9 arasında taranmıştır. En yüksek aktiviteye pH 7'de rastlanmıştır (Şekil 4.6).



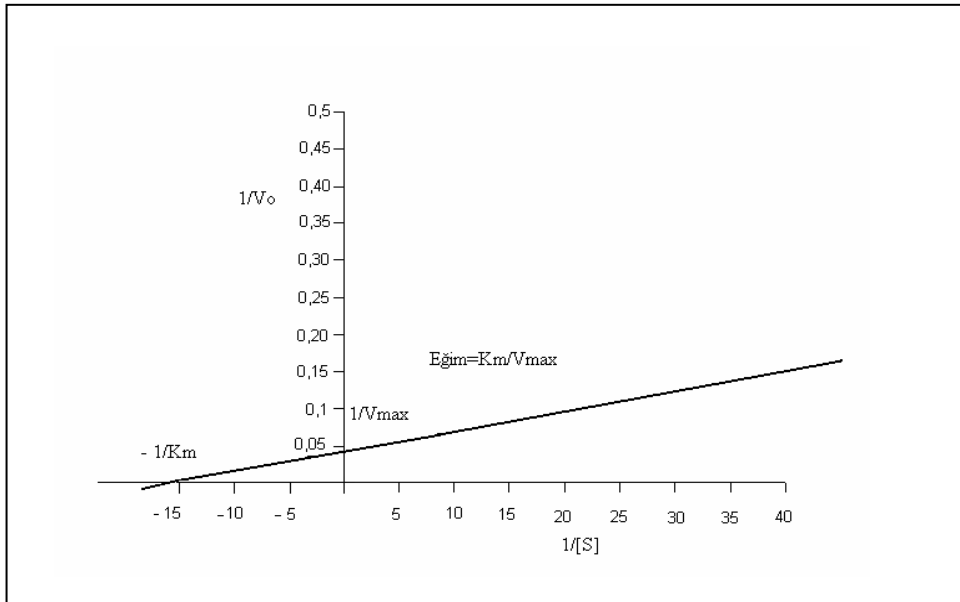
Şekil 4.6. ALAD aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.2.4. ALAD aktivitesinin kinetik analizi

Palaemonetes turcorum ALAD'ının V_{max} ve K_m değerlerini belirlemek amacıyla değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesine bakılmıştır. Michaelis-Menten hız grafiği çizildiğinde, allosterik enzimlere özgü sigmoidal bir eğri gözlenmiştir (Şekil 4.7). Aynı veriler ile Line Weaver-Burke grafiği de çizilerek V_{max} değeri 22.83 nmol/PBG/saat/mg protein ve K_m değeri 0.06 mmol/reaksiyon karışımı olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Artan substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin Michaelis-Menten hız grafiği



Şekil 4.8. Enzimin Line-Weaver Burke hız grafiği

4.2.5. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ın Zn^{+2} 'ye duyarlılığı karşılaştırmalı olarak saptanmıştır. Bunun için her bir değer için 3 örnek kullanılmış ve bu değerlerin ortalamaları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Zn^{+2} 'nin artan konsantrasyonlarının *Palaemonetes turcorum* ALAD'ı üzerine etkili olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Zn^{+2} 'nin etkisi

Koşul	ALAD aktivitesi (nmol PBG/saat/mg protein/ml)
Kontrol	9.50
1 μ M	8.90
10 μ M	9.90
50 μ M	9.50
100 μ M	10.00
500 μ M	8.00

Çizelge 4.4. Farklı çinko konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması

Grup 1 N=3	Grup 2 N=3	$X \pm Sh$	p
Kontrol	1mM	,6167	NS
	10mM	-,3833	NS
	50mM	1,667E-02	NS
	100mM	-,4833	NS
	500mM	1,5167	NS

X= Ortalama p=Significant NS=Non Significant
 p<0.05 gruplar arası anlam farkı
 Sh, grup 1 ve grup 2 için ± 0.2485

Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir. $p > \alpha$ olduğundan grupların homojen olduğu bulunmuştur. Dunnett-C testi uygulanarak kontrol grubu ile 1, 10, 50, 100 ve 500 mM'lık çinko konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4).

4.2.6. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Mg^{+2} 'ya duyarlılığı her grup için 3 örnek kullanılarak ortalama değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Çizelge 4.5). Mg^{+2} 'nin artan konsantrasyonlarının *Palaemonetes turcorum* ALAD'ını aktive ettiği saptanmıştır.

Çizelge 4.5. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mg^{+2} 'nin etkisi

Koşul	ALAD aktivitesi (nmol PBG/saat/mg protein/ml)
Kontrol	11.40
1 μ M	13.90
10 μ M	16.02
50 μ M	16.75
100 μ M	17.90
500 μ M	18.00

Çizelge 4.6. Farklı magnezyum konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması

Grup 1 N=3	Grup 2 N=3	$X \pm Sh$	p
Kontrol	1mM	2,5000	<0.01
	10mM	4,6200	<0.01
	50mM	5,3500	<0.01
	100mM	6,5000	<0.01
	500mM	6,6000	<0.01

X= Ortalama p=Significant NS=Non Significant
 p<0.05 gruplar arası anlam farkı
 Sh, grup 1 ve grup 2 için ± 0.2008

Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir (Çizelge 4.6). $p < \alpha$ olduğundan grupların homojen olmadığı bulunmuştur. Dunnett-t (2 yönlü) testi uygulanarak kontrol grubu ile 1,

10, 50, 100 ve 500 mM'lık magnezyum konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

4.2.7. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

ALAD enzim aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi belirlenirken, kontrol grubuna karşı *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Mn^{+2} 'ya duyarlılığı karşılaştırmalı olarak saptanmıştır. Her bir değer için üç örnek kullanılarak ortalama değerler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Mn^{+2} 'nin artan konsantrasyonlarının *Palaemonetes turcorum* ALAD'ını aktive ettiği saptanmıştır.

Çizelge 4.7. *Palaemonetes turcorum* ALAD aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

Koşul	ALAD aktivitesi (nmol PBG/saat/mg protein/ml)
Kontrol	9.70
1 μ M	10.60
10 μ M	11.50
50 μ M	12.40
100 μ M	13.80
500 μ M	13.90

Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir. $p < \alpha$ olduğundan grupların homojen olmadığı bulunmuştur. Dunnett-t (2 yönlü) testi uygulanarak kontrol grubu ile 1, 10, 50, 100 ve 500 mM'lık mangan konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Farklı mangan konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması

Grup 1 N=3	Grup 2 N=3	X±Sh	p
Kontrol	1mM	,9000	<0.02
	10mM	1,8000	<0.01
	50mM	2,7000	<0.01
	100mM	4,1000	<0.01
	500mM	3,4000	<0.01

X= Ortalama p=Significant NS=Non Significant
 p<0.05 gruplar arası anlam farkı
 Sh, grup 1 ve grup 2 için ±0.2380

4.2.8. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının EDTA'ya duyarlılığı

Kelatlayıcı bir ajan olan EDTA'ya duyarlılık açısından *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının verdiği cevabı belirlemek amacıyla, 100 µM, 200 µM ve 300 µM arası EDTA konsantrasyonları kullanılarak aktivite üzerine etkisi kontrol grubuna karşı belirlenmiştir. Her grup 3 örnekle çalışılmış ve bunların ortalama değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının aktivitesinin EDTA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. EDTA'nın 300 µM konsantrasyonunda *Palaemonetes turcorum* ALAD'ını %58 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.

Çizelge 4.9. *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının EDTA'ya duyarlılığı

Koşul	ALAD aktivitesi (nmol PBG/saat/mg protein/ml)
Kontrol	16.17
100 µM	11.41
200 µM	8.56
300 µM	6.85

Tek yönlü varyans analizi uygulanarak grup varyanslarının homojen olup olmadığı test edilmiştir. $p < \alpha$ olduğundan grupların homojen olmadığı bulunmuştur. Dunnett-t (2 yönlü) testi uygulanarak kontrol grubu ile 100, 200 ve

300 mM'lık EDTA konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Farklı EDTA konsantrasyonları ile kontrol grubunda ALAD aktivitesinin karşılaştırılması

Grup 1 N=3	Grup 2 N=3	X±Sh	p
Kontrol	100mM	4,8000	<0.02
	200mM	7,7000	<0.01
	300mM	9,3500	<0.01

X= Ortalama

p=Significant

NS=Non Significant

p<0.05 gruplar arası anlam farkı

Sh, grup 1 ve grup 2 için ± 0.3942

4.3. ALAD enziminin preparasyonu ve saflaştırılması

4.3.1. Ham ekstrenin hazırlanması

Diseksiyon sonrası çıkarılan her bir karaciğer, ağırlıkları tartıldıktan sonra 0.1 M K-fosfat tamponu (pH 6.8) ile buz içerisinde homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat 8000g'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatantlar ham enzim preparasyonu olarak kullanılmıştır.

4.3.2. Amonyum sülfatla çöktürme

Her bir fraksiyonda enzim aktivitelere bakıldı. ALAD enzimi için spesifik aktivite, %30-40'lık amonyum sülfat çöktürmesindeki fraksiyonda tespit edilmiştir. Bu supernatantın spesifik aktivitesine göre enzim 11.84 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.11).

4.3.3. Jel geçirgenlik kromatografisi

Bu çalışmada moleküler ağırlığı ayırım aralığı 5000–300.000 olan Sephadex G–200 jel ortamı kullanılmıştır. Jel 4°C'de 30 mM, pH 6.8 K-fosfat tamponunda 2 gece bekletilerek şişirilmiştir. Yine 4°C'de kolona (1.6x31.5 cm) paketlenmiştir. Kolon akış hızı 10 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Aynı tampon ve akış hızıyla örnek uygulanmış ve fraksiyonlar (3 ml) toplanmıştır.

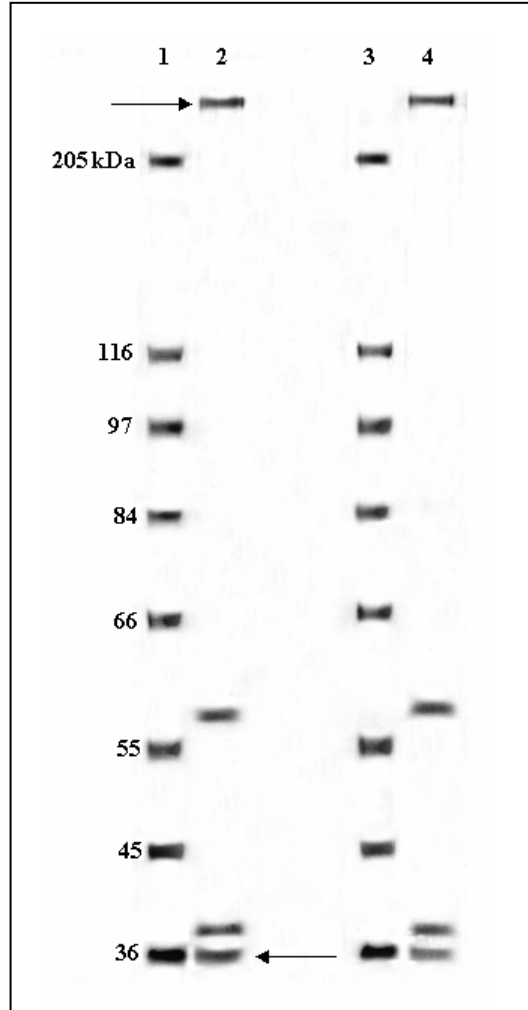
1-9. fraksiyon aralıklarında protein pikleri tespit edilmiş ve en büyük pik 5 numaralı fraksiyonda gözlenmiştir. Bu fraksiyonlarda ALAD enzimi için spesifik aktiviteye bakılmış. 5 numaralı fraksiyonun spesifik aktivitesine göre enzimin 51.64 kat saflaştırıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Enzimin saflaştırma basamakları ve bulunan değerler

Adım	Total Protein (mg)	Total Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	İyileştirme (%)	Saflaştırma Derecesi
Homojenat	0.214	0.6631	3.09	100	1
%30-40 [(NH ₄) ₂ SO ₄] supernatant	0.0151	0.5526	36.60	83.33	11.84
Kolon Sephadex G-200	0.00277	0.442	159.57	66.65	51.64

4.3.4. SDS-PAJE ve molekül ağırlığının tespiti

SDS jel elektroforezi tekniklerinden biri olan Laemmli [77]'nin tanımladığı yöntem kullanılmış olup %10'luk ayırma jeli ile örnek ayrıştırılmıştır. SDS-PAJE ile yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının moleküler ağırlığı 237.6 kDa ve bir alt ünitesinin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. ALAD enziminin SDS-PAJE görüntüsü, (1,3). Markör, (2,4). ALAD enzimi alt üniteleri,

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kurşunun canlılardaki “heme” biyosentezi yolundaki etkileri iyi bilinmektedir. Farklı dokularda ALAD’ın kurşun tarafından inhibisyonu, kurşunun intraselüler toksisitesi için hassas ve kısmen gerekli bir bitiş noktası olarak görülmüştür. Bu çalışmada öncelikle, çevre kirliliğinde indikatör olarak kullanılabilen omurgasız canlılardan *Palaemonetes turcorum*’da, ALAD enziminin kurşun ile olan *in vivo* inhibisyonu gösterilmiş ve kurşun kirliliğinde *Palaemonetes turcorum* ALAD’ının bir biyolojik indikatör olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Palaemonetes turcorum ALAD’ının biyokimyasal özellikleri araştırılarak, enzimin biyokimyasal karakterizasyonu belirlenmiş ve enzim saflaştırılmıştır.

Biyokimyasal karakterizasyonu belirleme için yapılan deney koşulları altında, *Palaemonetes turcorum* için kurşun asetatın LC₅₀ değeri 0.135 mM olarak bulunmuştur. Bu değer *Gammarus pulex* için bulunan değerden (0.394 mg Pb/l) oldukça yüksektir [61].

13 µg /lt kurşun nitratın gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 4 haftalık bir uygulamadan sonra kırmızı kan hücresi delta-ALAD aktivitesini anlamlı bir derecede azalttığını bulmuştur [21].

Kurşunun 2 haftalık uygulamalarının gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), dere alabalığında (*Salmo turutta*), kırmızı (havuz) balığında (*Carassius auratus*) ve güneş balığında (*Lepomis gibbosus*) sırasıyla 10, 90, 470 ve 90 µg/lt konsantrasyonlarının ALAD aktivitesi üzerine önemli etkiler yaptığı gösterilmiştir [22].

Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) karaciğer ALAD aktivitesinin Pb inhibisyonu için IC₅₀ değeri 17.3 µM olarak bulunmuştur [62].

Ratlar için IC₅₀ değeri 0.31–0.4 µM Pb olarak tespit edilmiştir [79].

Yetişkin kara kurbağalarına (*Bufo arenarum*) uygulanan 10, 25, 50 ve 100 mg/kg kurşun asetatın, kan kurşun konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ALAD aktivitesini düşürdüğü gözlemlenmiştir [65].

Enzim aktivitesinde %50’lik inhibisyon oluşturan kurşun konsantrasyon değerleri pigmentli ve pigmentli *Biomphalaria glabrata* için sırasıyla 0.023 ve

0.029 mg/lt kurşun, *Lumbricus variegatus* için 0.703 mg/lt kurşun olarak bulunmuştur [4].

Doz tarama çalışmaları sonunda bulduğumuz LC₅₀ değeri *Palaemonetes turcorum*'a uygulanarak, kurşunun *in vivo*'da ALAD üzerine olan inhibe edici etkisi saptanmış ve inhibisyonun zamana göre değişimi incelenmiştir. ALAD inhibisyonunun zaman ile doğru orantılı olarak artışı, kurşun uygulanmasının 4., 8., 16., 32. ve 64. saatler sonundaki enzim aktiviteleri ölçülerek saptanmıştır. Enzim aktivitesindeki inhibisyona paralel olarak *Palaemonetes turcorum* karaciğerinde kurşun miktarının da arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, ALAD enziminin kurşun ile olan *in vivo* inhibisyonunu gösteren diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Palaemonetes turcorum ALAD'ının maksimum aktivite gösterdiği inkubasyon sıcaklığı 55°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). Bu değer ratlar için bulunan değerle aynıdır ve enzimin ısıya dayanıklı olduğunu göstermektedir [55]. Balık enziminin de ısıya dayanıklı olduğu ve aktivitenin 65°C'de maksimuma ulaştığı kaydedilmiştir [62]. *Gammarus pulex* ALAD'ının ısıya duyarlı olduğu ve aktivitenin 37°C'de maksimuma ulaştığı kaydedilmiştir [61].

Palaemonetes turcorum'daki ALAD aktivitesinin inkübasyon periyoduna bağlı değişimi incelendiğinde, inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak enzim aktivitesinin de arttığı saptanmıştır (Şekil 4.5). *Ictalurus punctatus* ve *Gammarus pulex* ALAD'ının da benzer sonuçlar verdiği gösterilmiştir [61,62].

Palaemonetes turcorum ALAD'ının optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6). Bu değere göre *Palaemonetes turcorum* ALAD'ı memeli enzimine benzemektedir. Çünkü memeli ve kuşlardan elde edilen enzimin optimum pH' sı, 6.3–7.1 arasındadır. Buna karşılık maya, *E. coli* ve bitkilerden elde edilen enzimler daha fazla alkali optimum pH'ya sahiptirler. Maya enzimi için pH 9.8, *E. coli* için pH 8.5 ve bitkiler için pH 8'dir [80].

Çalışmamızda *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının ALA için kinetik analizlerine göre K_m değeri 0.06 mmol/reaksiyon karışımı, V_{max} değeri 22.83 nmol PBG/saat/mg/ml protein olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler farklı organizma enzimleriyle ilgili daha önce yapılmış kinetik analizlerden farklılıklar göstermektedir. *Gammarus pulex* için K_m değeri 0.043-0.058 mmol/reaksiyon

karışımı, V_{max} değeri 17.6 nmol PBG/saat/mg/ml protein olarak bulunmuştur [61]. *Ictalurus punctatus* için K_m değeri 0.043 mmol/reaksiyon karışımı, V_{max} değeri 2.57 nmol PBG/saat/mg/ml protein olarak bulunmuştur [62]. Fare karaciğer ALAD'ı için K_m değeri 4×10^{-4} M [76], insan eritrositi ALAD'ının K_m değeri 0.27 mM [42], sığır karaciğer ALAD'ının K_m değeri 0.46 mM [81] olarak bulunmuştur.

Kinetik çalışmalar sonucu çizilen Michaelis-Menten grafiğinde, enzimin sigmoidal bir eğri izlediği saptanmıştır. Böyle bir eğri, enzimin allosterik olduğunu göstermektedir. Enzimin allosterik olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da ifade edilmiştir [61,62].

Memeli ALAD'ı üzerine Pb^{+2} 'nin inhibe edici etkisini açıklayan iki farklı görüş vardır. Birinci görüşe göre Pb^{+2} 'nin yol açtığı inhibisyon, Pb^{+2} ve Zn^{+2} 'nin enzim üzerindeki bağlanma bölgelerine bağlanmalarındaki rekabetten kaynaklanmaktadır. Diğer bir görüşe göre Zn^{+2} 'ye bir kofaktör olarak gereksinim duymayan ALAD'larda da Pb^{+2} inhibisyon mekanizması benzer olabilir, ancak gözlenen nicel farklılıklar Zn^{+2} ya da diğer metal kofaktörlerin aktif bölgeye daha sıkı bağlanmalarının sonucu olabilir [49]. Yapılan birçok çalışmada, yüksek konsantrasyondaki çinko iyonlarının aktiviteyi artırdığı gözlenmiştir [48,79,82]. Ancak aşırı yüksek çinko konsantrasyonlarının da aktiviteyi düşürdüğü kaydedilmiştir [81]. Yaptığımız çalışmada, *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının Zn^{+2} 'den etkilenmediği bulunmuştur (Çizelge 4.3). *Palaemonetes turcorum* ALAD'ı üzerine Zn^{+2} 'nin etkili olmaması daha önceleri çeşitli balık türleriyle [62,83,84] çeşitli bakteri, prokaryotlar ve *Gammarus pulex*'le yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir [61]. Memeli ALAD'ında gözlenen aktivite artışı, iki değerlikli katyonların Schiff bazı ya da enzimin dördüncül yapısını kararlı hale getirerek, allosterik bir efektör gibi davranışına bağlı olabilir [60]. Elde edilen veriler ışığında, bu tip enzimler ya kendilerine sıkıca bağlı olan Zn^{+2} ile doymuş durumdadırlar ya da Zn^{+2} enzime bağlanmamaktadır.

Palaemonetes turcorum ALAD'ı aktivitesi üzerine Mg^{+2} ve Mn^{+2} aktiviteyi artırıcı bir etkide bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.7). Mg^{+2} ve Mn^{+2} 'nin, aktiviteyi artırıcı etkisi, *Gammarus pulex*'te [61], bakterilerde [57,85], maya da [59], buğday ve bezelyede [86,87], *Plasmodium falciparum*'da [88]

yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. Bunların yanı sıra balık karaciğer ALAD'ı için bu iyonların efektif bir aktivatör olmadığı bulunmuştur [62].

Palaemonetes turcorum ALAD'ının EDTA tarafından önemli ölçüde inhibe olduğu bulunmuştur. *Palaemonetes turcorum*'daki inhibisyon %58 olup (Çizelge 4.9), *Gammarus*'daki inhibisyondan (%52) biraz daha yüksek, rat karaciğerindeki inhibisyondan (%94) daha düşüktür [61].

Tüm bu verilere göre *Palaemonetes turcorum* ALAD'ı optimum pH, inkübasyon sıcaklığı gibi özelliklerinden dolayı memeli ALAD'ına, Zn^{+2} iyonlarından etkilenmemesi ve Mg^{+2} ve Mn^{+2} iyonları gibi katyonların aktiviteyi artırıcı gibi özelliklerinden dolayı da bakteri, prokaryot ve bitki ALAD'ına benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Tüm ALAD'ların temel katalitik özellikleri birbirine benzer olmasına rağmen enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve sülfidril hassasiyetindeki farklılıklardan dolayı değişik organizmalardan saflaştırılmış enzimler arasında farklılıklar gözlenmiştir (13).

Saflaştırma çalışmalarımız sonucunda *Palaemonetes turcorum* ALAD'ının moleküler ağırlığı 237.6 kDa ve bir alt ünitesinin moleküler ağırlığı 35.6 kDa olarak bulunmuştur.

ALAD'ların molekül ağırlığı 250-340 kDa arasında dağılım gösterir. Memelilerden ve mayadan izole edilen enzimler, her biri yaklaşık 37 kDa olan benzer 8 alt ünitelerden oluşur. Fakat yüksek yapılı bitkiler ve bakterilerden izole edilen ALAD'lar sırasıyla 50 ve 40 kDa olan 6 benzer alt ünitelerden oluşan heksamerik proteinlerdir [87].

Coleman [76] fare karaciğerinden izole ettiği enzimin moleküler ağırlığını 270.000 olarak bulmuştur.

Rhodopseudomonas spheroides ALAD'ı 300-400 kat saflaştırma sonucunda moleküler ağırlığı yaklaşık 250 kDa olarak bulunmuştur [44].

Anderson ve ark. [42] insan eritrositlerinden enzimi 38.000 kat saflaştırarak, tek bir alt ünitesinin ağırlığını 31 kDa, moleküler ağırlığını 252 kDa olarak bulmuşlardır. İnsan eritrositleriyle yapılan diğer bir çalışmada enzimin moleküler ağırlığı 285 kDa olarak bulunmuştur. Bir alt ünitesinin ağırlığı 35 kDa ve 35.000 kat oranında saflaştırılmıştır.

Rekombinant *Plasmodium falciparum* ALAD'ı moleküler ağırlığı 46 kDa olan 8 alt üniteden oluşmaktadır ve enzimin moleküler ağırlığı 345 kDa olarak bulunmuştur [88].

Rhodobacter capsulatus'la yapılan çalışmada enzimin hegzamer yapıda olduğu, bir alt ünitesinin ağırlığının 35.856 dalton ve enzimin moleküler ağırlığı 220 kDa olarak bulunmuştur [89].

Sonuç olarak kurşuna maruz kalmada ALAD, biyolojik bir indikatör olarak kullanılırsa, enzimin kurşun inhibisyonuna hassaslığı konusunda temel bilimsel bilgilerin dikkate alınması gerekmektedir. Türe özgü ALAD'lardaki farklılıklar, kurşun ve enzim inhibisyonu arasındaki ilişkiyi değiştirebilir.

Gelecekteki deneyler, farklı ALAD'lar için gözlemlenen farklılık ve benzerlikleri açıklamak için enzimin farklı organizmalarda karakterizasyonu ve saflaştırılması gerekmektedir. Bu çalışma Crustaceae örnekleriyle yapılan ilk çalışma olup, yine bu gruba ait diğer test organizmaları ile çalışılarak desteklenmesi gerekir.

KAYNAKLAR

- [1] CHADZYNSKI L., *Manual for The Identification and Abatement of Environmental Lead Hazards. Division of Maternal and Child Health, US Public Health Service, USA, (1986).*
- [2] KARATAŞ, S., KALAY M., *Tilapia zilli'nin Solungaç, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Kurşun Birikimi, Türk J. Vet.Anim.Sci., 26, 471-477 (2002).*
- [3] ÖZÇELİK D., TOPLAN S., DARIYERLİ, N., GÜLYAŞAR T., DURSUN Ş. *The Effect of Lead Concentration on Blood Viscosity and Erythrocyte Osmotic Resistance, Cerrahpaşa J Med, 31 (3): 129-133 (2000).*
- [4] AISEMBERG J., NAHABEDIAN D.E., WIDER E.A., GUERRERO V., *Comparative Study on Two Freshwater Invertebrates for Monitoring Environmental Lead Exposure, Toxicology, 210, 45-53 (2005).*
- [5] VURAL, N., *Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 315-323, Ankara, (1984).*
- [6] PANG, D.J., *Lead in the Environment, Handbook of Ecotoxicology, 356-391, (1995).*
- [7] WONG, P.T.S., CHAU, Y.K., LUXON, P.L., *Methylation of Lead in the Environment, Nature, 253-263 (1975).*
- [8] İMRE, Z., *Toksikoloji, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 224-267, İstanbul, (1988).*
- [9] HELLAWELL, J., *Biological indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management, Elsevier Science, 186-195, (1986).*
- [10] VAN DER WERFF, M. & PRUYT, M.J. *Long-term effects of heavy metals on aquatic plants, Chemosphere, 11, 727-739 (1982).*
- [11] BROWN, B.T. & RATTIGAN, B.M., *Toxicity of soluble copper and other metal ions to Elodea canadensis, Environ. Pollut., 20,303-314 (1979).*
- [12] KAY, S.H., HALLER, W.T., & GARRARD, L.A., *Effects of heavy metals on water hyacinths (Eichhornia crassipes (Mart.) Solms). Aquat. Toxicol., 5, 117-128 (1984).*

- [13] MOHAN, B. S. and HOSETTÌ, B. B., *Potential Phytotoxicity of Lead and Cadmium to Lemna minor Grown in Sewage Stabilization Ponds*, Environmental Pollution, **98**, 233-238 (1997).
- [14] WATLING, H.R., *Comparative study of the effects of metals on the settlement of Crassostrea gigas*, Bull. environ. Contam. Toxicol., **31**, 344-51 (1983).
- [15] FREEDMAN, M.L., CUNNINGHAM, P.M., SCHINDLER, J.E., & ZIMMERMAN, M.J., *Effect of lead speciation on toxicity*, Bull. environ. Contam. Toxicol., **25**, 389-393 (1980).
- [16] CHINNAYYA, B., *Effect of heavy metals on the oxygen consumption by the shrimp Caridina rajadhari* Bouvier. Indian J. exp. Biol., **9**, 277-278 (1971).
- [17] BROWN, B. & AHSANULLAH, M., *Effects of heavy metals on mortality and growth*, Mar. Pollut. Bull., **2**, 182-187 (1971).
- [18] CHINNI S., KHAN R. N., and YALLPRAGADA P. R., *Acute Toxicity of Lead on Tolerance, Oxygen Consumption, Ammonia-N Excretion, and Metal Accumulation in Penaeus indicus Postlarvae*, Ecotoxicology and Environmental Safety, **51**, 79-84 (2002).
- [19] CHINNÌ S. and YALLPRAGADA P. R., *Lead toxicity on growth and biochemical constituents in postlarvae of Penaeus indicus*, Marine Environmental Research, 103-104 (2000).
- [20] BAT, L., GÜNDOĞDU, A., SEZGİN, M., ÇULHA, M., GÖNLÜGÜR, G., AKBULUT, M., *Acute toxicity of zinc, copper and lead to three species of marine organisms from the Sinop Peninsula, Black Sea*, Tr.J. of Biology, **23**, 537-544 (1999).
- [21] HODSON, P.V., *Delta-Amino levulinic acid dehydratase activity of fish blood as an indicator of a harmful exposure to lead*, J. Fish.Res.Board Can., **33**, 268-271 (1976).
- [22] HODSON, P.V., BLUNT, B.R., SPRY, D.J., & AUSTIN, K., *Evaluation of erythrocyte delta-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead*, J. Fish. Res. Board Can., **34**, 501-508 (1977).

- [23] JACKIM, E., *Influence of lead and other metals on fish delta-aminolevulinic dehydrase activity*, J. Fish. Res. Board Can., **30**, 560-562 (1973).
- [24] SASTRY, K.V. & GUPTA, P.K., *Alterations in the activity of some digestive enzymes of Channa punctatus exposed to lead nitrate*, Bull. environ. Contam. Toxicol., **19**, 549-555 (1978a).
- [25] SASTRY, K.V. & GUPTA, P.K., *In vitro inhibition of digestive enzymes by heavy metals and their reversal by a chelating agent. Lead nitrate intoxication*, Bull. environ. Contam. Toxicol., **20**, 736-742 (1978b).
- [26] ELLGAARD, E.G. & RUDNER, T.W., *Lead acetate: toxicity without effects on the locomotor activity of the bluegill sunfish, Lepomis macrochirus Rafinesque*. J. Fish Biol., **21**, 411-415 (1982).
- [27] SUBODH, K. J., *Protective Role of Zeolite on Short- and Long-Term Lead Toxicity in The Teleost Fish Heteropneustes fossilis*, Chemosphere, **39**, 247-251 (1999).
- [28] SHAFFI, S. A., *Lead toxicity: Biochemical and physiological imbalance in nine freshwater teleosts*, Toxicology Letters, **4**, 155-161, (1979).
- [29] KHANGAROT, B.S., SEHGAL, A., & BHASIN, M.K., *"Man and biosphere" – Studies on the Sikkim Himalayas. Part 5: Acute toxicity of selected heavy metals on the tadpoles of Rana hexadactyla*. Acta hydrochim. hydrobiol., **13**, 259-263 (1985).
- [30] NEEDLEMAN, H., *Lead poisoning*, Annu Rev Med. **55**, 209–22 2004.
- [31] GRANDJEAN, P., *Health significance of metals- lead. Maxcy-Rosenau-Last Public Health and Preventive Medicine*. Ed. Last JM, Wallace RB. 13.baskı, 389–391 1992.
- [32] *World Health Organization. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 165. Inorganic Lead*, World Health Organization, 1995.
- [33] YÜKSEL, L., *Kurşun ve çocuk*, İst Çocuk Klin Derg, **31**, 218–227 (1996).
- [34] WHO. *Environmental Health Criteria 165- Inorganic Lead*, Geneva. (1995).
- [35] BELLINGER, DC., *Lead. Pediatrics*, **113** (4): 1016–22 2004.

- [36] PIOMELLI, S., *Childhood lead poisoning*, *Pediatr Clin North Am.*, **49**, 1285–304. (2002).
- [37] HOLTHIUS, L.B., *Report On a Collection of Crustacea Decapoda and Stomotopoda from Turkey and Balkons*, 14-20, (1961).
- [38] KOCATAŞ, A., KATAĞAN, T., UÇAL, O., BENLİ, H.A., *Türkiye Karidesleri ve Karides Yetiştiriciliği*, T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Seri: A, Yayın No:4, 1-144, BODRUM, (1991).
- [39] GIBSON, K.D., LAVER, W.G., NEUBERGER, A., *Initial Stages in the biosynthesis of Porphyrins*, *Biochem. J.*, 70:71, (1958).
- [40] JORDAN, P.M., *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, 55-121, New York, (1989).
- [41] GIBSON, K., NEUBERGER, A., SCOTT, J.J., *The Purification and Properties of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase*, *Bioche. J.*, **61**, 618-629, (1955).
- [42] ANDERSON, P.M., DESNICK, R.J., *Purification and Properties of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase from Human Erythrocytes*, *J. Biol. Chem.*, **254**, 6924-6930 (1979).
- [43] NANDI, D.L.; SHEMIN, D., ALAD of *Rhodopseudomonas capsulatus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 305-311, (1973).
- [44] NANDI, D.L.; SHEMIN, D., ALAD of *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Biol. Chem.*, **243**, 1224-1230, (1968).
- [45] SPENCER, P., JORDAN, P.M., *Biochem. J.*, **290**, 279-287, (1993).
- [46] MILCHEL, L.W., JAFFE, E.K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 169-177, (1993).
- [47] SCHNEIDER, H.A.W., LIEDGENS, W., *z. Naturforsch.*, **36**, 44-50, (1981).
- [48] CHEH, A. and J. B. NEILANDS., *The aminolevulinate dehydratase: Molecular and environmental properties*, *Struct. Bond.*, **29**, 123–170 (1976).
- [49] GIBBS, P.N.B., A.G. CHAUDHRY and P.M. JORDAN, *Purification and properties 5-Aminolevulinate dehydratase from human erythrocytes*, *Biochem. J.*, **230**, 25–34 (1985).

- [50] DOYLE, D., SCHIMKE, T.R., *The genetic and developmental regulation of hepatic ALAD in mice*, The Journal of Biological Chemistry, **20**, 5449-5459 (1969).
- [51] BUCHET, J.P., *Effect of some parameters of the heme biosynthetic pathway in rat tissue in vivo*, Toxicology, **6**, 21-34 (1976).
- [52] GRANICK, J.L., *Studies in lead poisoning*, Biochem. Med., **8**, 149-159 (1973).
- [53] SILBERGELD, E.K., *Neurotoxic aspects of porphyriinopathies lead and succinylacetone*, Environ. Res., **29**, 459-471 (1982).
- [54] CHANG, S.C., *An immunological study of ALAD specificity consistent with phylogeny of species*, Biochem. Biophys. Acta, **797**, 297-301 (1984).
- [55] SASSA, S., *Delta aminolevulinic acid dehydratase assay*, Enzymes, **28**, 133-145 (1982).
- [56] SHEMIN, D., *Aminolevulinic acid dehydratase*, Enzymes, **7**, 323-337 (1972).
- [57] HO, K.Y. et.al, *Aminolevulinic acid dehydratase os Spirillum itersonii and the regulation of tetrapyrrole synthesis*, Arch.of Biochem. And Biophys., **144**, 734-740 (1971).
- [58] VAN HEYNINGEN, S., *Quaternary structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from Rhodobacter spheroides*, Biochemistry, **10**, 4676-4682 (1971).
- [59] CLARA De BARREIRO, O.L., *5-Aminolevulinate hydro-lyase from yeast isolation and purification*, Biochem. Biophys. Acta, **139**, 479-486 (1967).
- [60] LEIDGENS, W. C., *Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from Spinacia oleracea*, J. Biochem., **135**, 75-79 (1983).
- [61] KUTLU, M., and SÜMER, S., *Effects of Lead on the Activity of aminolevulinic acid dehydratase in Gammarus pulex*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **60**, 816-821, (1998).
- [62] CONNER, E.A., FOWLER, B.A., *Biochemical and immunological properties of hepatic aminolevulinic acid dehydratase in channel catfish*, Aquatic Toxicology, **28**, 37-52, (1994).

- [63] BURDEN, V.M., SANDHEINRICH, M.B., CALDWELL, C.A., *Effects of lead on the growth and aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout*, Environmental Pollution, **101**, 285-289 (1998).
- [64] CAMPANA, O., SARASQUETE, C., BLASCO, J., *Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels and lipid peroxidation in blood, kidney and liver of the toadfish Halobatrachus didactylus*, Ecotoxicology and Environmental Safety, **55**, 116-125 (2003).
- [65] ARRIETA, M.A., PERI, S.I., APARTIN, C., ROSENBERG, C.E., FINK, N.E., *Blood lead concentration and aminolevulinic acid dehydratase activity in adult Bufo arenarum*, Archives of Physiology and Biochemistry, **108**, 275-280, (2000).
- [66] PEIXOTO, N.C., ROZA, T., PEREIRA, M.E., *Sensitivity of ALAD of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue*, Toxicology in Vitro, **18**, 805-809 (2004).
- [67] GOULART, E.C., PEREIRA, C.A.T., GARCIA, R.C., GIACOMELLI, M.B.O., RODRIGUES, A.L.S., *Effect of lead and/or zinc exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinate dehydratase and negative geotaxis of suckling rats*, Brazilian Journal of Medical Biological Research, **34**, 785-790 (2001).
- [68] OGUNSEITAN, O.A., YANG, S., ERICSON, J., *Microbial aminolevulinic acid dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments*, Soil Biology & Biochemistry, **32**, 1899-1906 (2000).
- [69] FLORA, S.J.S., PANDE, M., BHADAURINA, S., KANNAN, G.M., *Combined administration of taurine and DMSA in the treatment of chronic lead intoxication in rats*, Human & Experimental Toxicology, **23**, 157-166 (2004).
- [70] BARBOSA, N.B.V., ROCHA, J.B.T., ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M.C., BRAGA, A.L., *Effect of organic forms of selenium on aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats*, Toxicology and Applied Pharmacology, **149**, 243-253 (1998).

- [71] JAIN, M., GADRE, R., *Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity by arsenic in excised etiolated maize leaf segments during greening*, Journal of Plant Physiology, **161**, 251-255, (2004).
- [72] MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C., MARTINS, A.F., ROCHA, J.B.T., *Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves*, Biologia Plantarum, **45**, 85-89 (2002).
- [73] ROSSI, E., *Effect of occupational lead exposure on lymphocyte enzymes involved in heme biosynthesis*, Clin. Chem., **36**, 1980-1983 (1990).
- [74] LOWRY, O. H., *Protein measurement with the folin phenol reagent*, J. Biol. Chem., **193**, 2265-275 (1951).
- [75] KONUK, M., *Studies of the biosynthesis and properties of nebularine*, Doktora Tezi, University College of Swansea, UK, (1993).
- [76] COLEMAN, D. L., *Purification and properties of aminolevulinic acid dehydratase from tissues of two strains of mice*, J. Bio. Chem., **23**, 5511-5517 (1966).
- [77] LAEMMLI, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, **227**, 680-685 (1970).
- [78] BLUM, H., BEIER, H. and GROSS, H.J., *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*, Electrophoresis, **8**, 93-99 (1987).
- [79] GOERING, P. L. And FOWLER, B. A., *Kidney zinc thionein regulation of aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead*. Arch. Biochem. Biophys., **253**, 48-55 (1987).
- [80] SENIOR M. N., et al. *Comparative studies on the 5-aminolevulinic acid dehydratases from Pisum sativum, Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae*. J. Biochem., **320**, 401-412 (1996).
- [81] WILSON, L., *Beef liver aminolevulinic acid dehydratase*, J. Biochem., **29**, 563-571
- [82] DAWIS, M. J., *Correlation of the physicochemical properties of metal ions with their activation and inhibition of human erythrocyte ALAD in vitro*, Tox. Appl. Pharma., **55**, 281-290 (1980).

- [83] GONZALES, O. J., *Inhibition of trout Salmo gairdneri PBG synthase by some metal ions*, Comp. Biochem. Physiol., **86**, 163-167 (1987).
- [84] RODRIGUES, A. L., *Effect of some metal ions on blood and liver delta aminolevulinate dehydratase of Pimelodus maculatus*, Com. Biochem. Physiol., **94**, 65-69 (1989).
- [85] YAMASKI, H., *ALAD of Mycobacterium phlei*, Biochem. B.ophys. Acta., **227**, 698-705 (1971).
- [86] NANDI, D. L., *Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves*, Can. J. Biochem., **45**, 327-336 (1967).
- [87] BOESE, Q. F. et al. *Aminolevulinic acid dehydratase in pea*, Journal of Biological Chem., **26**, 17060-17066 (1991).
- [88] DHANASEKARAN, S., et al. *Aminolevulinic acid dehydratase from Plasmodium falciparum*, Journal of Biological Chem. 279, **8**, 6934-6942 (2004).
- [89] BOLLIVAR, D. W., et al. *Rhodobacter capsulatus porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer*, BMC Biochemistry, 5-17 (2004).