

**ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN
GAMMARUS PULEX GLUTATYON
REDÜKTAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ
BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

İsmail POYRAZ
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Haziran - 2001

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İsmail POYRAZ'ın "Çeşitli Çevresel Kirleticilerin *Gammarus pulex* Glutasyon Redüktaz Enzimi Üzerindeki Biyokimyasal Etkileri" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki yüksek lisans tezi 09.07.2001 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. Rahmi BİLALOĞLU

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
11.07.2001. tarih ve 23/5. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ ÇEVRESEL KİRLİTİCİLERİN *GAMMARUS PULEX* GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

İSMAİL POYRAZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. H.Mehtap KUTLU

2001, 58 sayfa

Bu tezde ağır bir metal olan kurşunun sucul bir Amphipod olan *Gammarus pulex*'deki glutatyon redüktaz enzimi üzerine etkileri incelenmiş, enzimin biyokimyasal ve kinetiksel analizleri yapılarak sucul kirliliğin ölçülmesinde bir biomarker olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Enzimin farklı NADPH konsantrasyonlarına göre K_m değeri 129,03 μ M bulunmuştur. Ayrıca bazı metal iyonları (Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2}) ve EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş ve bu iyonların enzim aktivitesini düşürme etkisi $Zn^{+2} > Mg^{+2} > Cu^{+2}$ olarak bulunmuştur. EDTA'nın enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği saptanmıştır. *Gammarus pulex* glutatyon redüktazı saflaştırılarak SDS-PAGE analiz yöntemiyle molekül ağırlığı 54-56 kda. olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon redüktaz, *Gammarus pulex*, Kurşun, Metal iyonları,
EDTA

ABSTRACT**Master of Science Thesis****BIOCHEMICAL EFFECTS OF VARIOUS ENVIRONMENTAL
POLLUTIONS ON GLUTATHIONE REDUCTASE
ENZYME IN *GAMMARUS PULEX*****İSMAIL POYRAZ****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology Program****Supervisor: Assoc. Prof. H.Mehtap KUTLU****2001, 58 pages**

In this thesis, the effects of lead, a heavy metal, on glutathione reductase in *Gammarus pulex*, an aquatic organism, have been investigated and also, glutathione reductase enzyme was studied as a biomarker for aquatic pollution by biochemical and kinetical methods. K_m of enzyme according to different NADPH concentrations has been found as 129,03 μ M. Besides, the effects of some metal ions (Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2}) and EDTA on enzyme activity have been studied and decreasing effect of this ions on enzyme activity has been found as $\text{Zn}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Cu}^{+2}$. Glutathione reductase of *Gammarus pulex* has been purified and their molecular weight has been determined as 54-56 kda. by SDS-PAGE analysing method.

Key Words: Glutathione reductase, *Gammarus pulex*, Lead, Metal Ions, EDTA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, her türlü imkan ve ortamın sağlanmasında yardımlarını ve engin bilgilerini esirgemeyen değerli hocam Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. Ahmet ÖZATA'ya, değerli bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, üzerimdeki emeklerini ödeyemeyeceğim danışman hocam Doç.Dr. H.Mehtap KUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen Öğr.Gör. Filiz SUSUZ ve Biyolog Ayla DÜZEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Varlıklarıyla her zaman bana güç veren, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda bildiğim sevgili aileme ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimle.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

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.....	4
2.1 Ağır Metallerden Kurşunun Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı.....	4
2.2 Ağır Metallerin ve Diğer Çevresel Kirleticilerin Sucul Organizmalar Üzerindeki Toksik Etkileri.....	4
2.3 Kurşun Kirliliğinin Sucul Organizmalardaki Enzimler Üzerindeki Etkileri.....	5
2.4 Tatlısu Amphipodlarının Toksikolojik Çalışmalardaki Önemi.....	6
2.5 Glutasyon Redüktaz Enzimi.....	7
2.5.1 Glutasyon Redüktaz Enziminin Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	7
2.5.2 Glutasyon Redüktaz Enziminin Biyokimyasal Yapısı.....	11
2.5.3 Glutasyon Redüktaz Enziminin Metabolik Fonksiyonları.....	13
2.5.4 Glutasyon Redüktaz Enziminin Canlılardaki Önemi.....	16
2.5.5 Glutasyon Redüktaz Enziminin Diğer Maddelerle Etkileşimi.....	17
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1 Deneyleerde Kullanılan Canlıların Sağlanması ve Laboratuvarında Yetiştirilmesi.....	19
3.2 Deneyleerde Kullanılan Metal Çözeltileri.....	19

3.3	Glutasyon Redüktaz Enzimi Aktivite Tayini.....	20
3.3.1	Homojenatın Hazırlanması.....	20
3.3.2	Aktivite Tayini.....	20
3.3.3	Protein Miktarının Tayinleri.....	21
3.4	Glutasyon Redüktaz-Kurşun Etkileşimi (in vivo).....	21
3.4.1	Kurşun ile Muamele Edilmiş <i>Gammarus pulex</i> 'de Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin İncelenmesi.....	21
3.5	<i>Gammarus pulex</i> Glutasyon Redüktazının Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	22
3.5.1	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	22
3.5.2	GSSGr Aktivitesinin Kinetik Analizi.....	22
3.5.3	<i>Gammarus pulex</i> GSSGr Aktivitesi Üzerine Cu^{+2} İyonlarının Etkisi....	22
3.5.4	<i>Gammarus pulex</i> GSSGr Aktivitesi Üzerine Mg^{+2} İyonlarının Etkisi....	22
3.5.5	<i>Gammarus pulex</i> GSSGr Aktivitesi Üzerine Zn^{+2} İyonlarının Etkisi....	23
3.5.6	EDTA'ya Duyarlılık Açısından <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enzim Aktivitesinin İncelenmesi.....	23
3.6	GSSGr Enzim Pürifikasyonu.....	23
3.6.1	Jel Filtrasyon Yöntemiyle GSSGr Enziminin Pürifikasyonu.....	23
3.6.2	Fiber Polimerlerle <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enziminin Affinite Etkileşimleri.....	25
3.7	<i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enziminin SDS-PAGE Kullanılarak Moleküler Ağırlığının Saptanması.....	25
3.7.1	Elektroforez İçin Gerekli Malzemelerin Hazırlanması.....	25
3.7.2	Elektroforez Jelinin Hazırlanması.....	27
3.7.3	Jel'de Yürütmek Üzere Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	29
3.7.4	Elektroforez Aşamaları.....	29
3.7.5	Jel'in Boyanması.....	29

4. BULGULAR.....	30
4.1 <i>Gammarus pulex</i> Glutasyon Redüktaz Enziminin Kurşun Asetat'ın [EC ₅₀] Konsantrasyonuna Karşı Değişen Zaman Aralıklarına Bağlı Aktivite değişimi.....	30
4.2 <i>Gammarus pulex</i> Glutasyon Redüktaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması.....	32
4.2.1 Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	32
4.2.2 GSSGr Enzim Aktivitesinin Kinetik Analizi ve K _m Değerinin Bulunması.....	32
4.2.3 <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Cu ⁺² İyonlarının Etkisi.....	34
4.2.4 <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Mg ⁺² İyonlarının Etkisi.....	35
4.2.5 <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Zn ⁺² İyonlarının Etkisi.....	37
4.2.6 EDTA'ya Duyarlılık Açısından <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enzim Aktivitesi.....	39
4.3 Fiber Polimerlerle <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enziminin Affinite Etkileşimleri.....	41
4.4 Jel Filtrasyon Sonrası GSSGr Enzim Aktivitesi.....	42
4.5 <i>Gammarus pulex</i> GSSGr Enziminin SDS-PAGE Kullanılarak Molekül Ağırlığının Hesaplanması.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
6. KAYNAKLAR.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. <i>Gammarus spp</i>	6
2.2. Okside glutasyonun moleküler yapısı	8
2.3. Redükte glutasyonun moleküler yapısı	8
2.4. Glutasyon redüktaz enziminin mekanizması	9
2.5. İnsan glutasyon redüktaz enziminin 2 katlanma eksenine birlikte gösterilmiş molekül yapısı	12
4.1. <i>Gammarus pulex</i> 'deki glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin kurşun asetatın [EC ₅₀] konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği	30
4.2. <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktaz enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi	32
4.3. <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktazının Michaelis-Menten hız grafiği	33
4.4. <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktazının Line-Weaver Burke grafiği	33
4.5. Cu ⁺² iyonu için <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktaz aktivitesi	34
4.6. Mg ⁺² iyonu için <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktaz aktivitesi	36
4.7. Zn ⁺² iyonu için <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktaz aktivitesi	38
4.8 Farklı EDTA konsantrasyonlarının <i>Gammarus pulex</i> GSSGr aktivitesi üzerine etkisi	40
4.9. <i>Gammarus pulex</i> glutasyon redüktazının SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1 <i>G.pulex</i> glutatyon redüktazının kurşun asetatın [EC ₅₀] konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı aktivite değişiminin istatistiksel analizi	31
4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Cu ⁺² iyonlarının <i>G.pulex</i> glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi	35
4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Mg ⁺² iyonlarının <i>G.pulex</i> glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi	36
4.4. Farklı konsantrasyonlardaki Zn ⁺² iyonlarının <i>G.pulex</i> glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi	38
4.5. Farklı konsantrasyonlardaki EDTA'nın <i>G.pulex</i> glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi	40
4.6. Fiberlerle muamele edilmeden önce süpernatantlardaki protein miktarları	41
4.7. İki farklı fiber ile muamele edilmiş süpernatantlardaki toplam protein miktarları	42
4.8. Süpernatantlardan ayrılan fiberlerin, resorbsiyondan sonra tuttukları protein miktarları	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	: Mikro litre
μM	: Mikro molar
[EC ₅₀]	: Effektif Konsantrasyon
ad	: Adenin
ADP	: Adenozin mono fosfat
Ag ⁺²	: Gümüş iyonu
AMP	: Amonyum persülfat
BCNU	: 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea
BSA	: Bovine serum albumin
Ba ⁺²	: Baryum iyonu
Cd ⁺²	: Kadmiyum iyonu
cDNA	: Cyclic deoksiribo nükleik asit
CM	: Karboksi metil
Cu ⁺²	: Bakır iyonu
CuCl ₂	: Bakır klorür
Cys	: Sistein
D	: Dalton
DCA	: 3,4-dichloroaniline
DNPH	: Redükte difosfopiridin nükleotid
DTE	: Dithioerythritol
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
Fe ⁺²	: +2 değerlikli demir iyonu
Fe ⁺³	: +3 değerlikli demir iyonu
FMN	: Flavin mononükleotid
g	: Gram
g	: Yer çekimi birimi

Glu	: Glutamin
Gly	: Glisin
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GSSGr	: Glutatyon redüktaz enzimi
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
Hg⁺²	: Civa iyonu
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo dalton
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
LC₅₀	: Letal konsantrasyon
M	: Molar
mg	: Miligram
Mg⁺²	: Mağnezyum iyonu
MgCl₂	: Mağnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Mili molar
mm	: Milimetre
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinikleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
°C	: Santrigrat
pm	: Pikometre
PMSF	: Phenylmethanesulfonyl-fluoride
rad	: Gamma radyasyonu
Residu	: Yan grup
rpm	: Dakika / devir

SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi
Sn⁺²	: Kalay iyonu
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TNPH	: Redükte trifosfopiridin nükleotid
XAN	: 6-hidroksi-3-oxo-3H-ksantin-9-propiyonik asit
Zn⁺²	: Çinko iyonu
ZnCl₂	: Çinko klorür

1. GİRİŞ

Ağır metaller, doğada düşük konsantrasyonlarda bulunan ve bazıları canlı varlıklar için gerekli olan, fakat yüksek konsantrasyonları toksik, mutajenik, kanserojenik veya teratojenik olabilen kimyasal elementlerdir [1].

Ağır bir metal olan kurşun, sucul çevrede sık karşılaşılan bir kirleticidir; kurşunun yaygın olarak çok çeşitli alanlarda kullanılması, başta insanlar olmak üzere bir çok canlıyı olumsuz yönde etkilemektedir; boya, akümülatör, seramik, porselen, metal alaşımları, matbaa dizgisi, lehim ve bronz ile çalışan işyerleri, aynı zamanda kurşuna maruz kalma kaynaklarının da temelini oluşturmaktadır [2,3].

Kentsel ve endüstriyel kaynaklı kimyasal bileşikler (evsel atıkların içerdiği deterjanlar, fabrika atıkları v.b.) nehir sularının su katmanları ve sedimentlerinin kirliliğinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Suda çözünebilen kirleticiler, sucul çevre boyunca taşınarak ve yayılarak fiziksel ve kimyasal özelliklerini sürdürebilmekte ve koruyabilmektedirler. Bu parçalanamayan kirleticiler farklı alanlara yayılabilmekte veya az ya da çok daha başka bileşiklere dönüşebilmektedirler [1].

Günümüzde endüstriyel kullanımda yaygın olan ağır metaller, tüm biyosfer bileşenlerindeki kirleticiler gibi çevrede yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur. Bu nedenle bu maddelerin sadece kısa süredeki toksik etkilerini araştırmayıp, ekosistemin yapısı ve dengesi için ortamda bulunan düşük seviyelerinin uzun süreli birikimlerini de araştırmak gerekmektedir [4]. Toksikite testleri aynı zamanda, akuatik flora ve faunayı temsil eden canlıların yayılma alanlarının belirlenmesine yardım etmektedir [5].

Akarsu sedimentleri kullanılarak sucul ortamlardaki metal kirliliğinin ölçülmesi yönteminin; su katmanları ve sucul biyota kirleticileri arasında önemli bir yeri olan konsantre metal kirliliğinin ölçülmesine yardımcı olduğu saptanmıştır. Akarsu sedimentlerindeki metal kirliliği, genotoksik sonuçların açıklanmasına yardımcı olmaktadır [1].

Çeşitli çevresel kirleticilerin lethal toksisitesi *Gammarus pulex* gibi akarsu makro omurgasızlarında belirlenmiştir. Örneğin Sinop yarımadasında yaşayan bir

Amphipod olan *Echinogammarus olivii*, Isopod'lardan *Sphaeroma serratum* ve Dekapoda'dan *Palaemon elegans* üzerinde Zn^{+2} , Cu^{+2} ve kurşun için akut toksisite testleri yapılmıştır [5]. Kùltürlerinin kolaylığı ve hızlı çoğalmalarından dolayı tercih edilen bu organizmalar akarsu toksikolojisinde tercih edilmektedir [6]. Uzun yıllardan beri, tatlı su amfipodları, sucul toksikolojisinde test organizması olarak kullanıla gelmektedir. *Gammarus spp.* ise, tatlı su amfipodları içinde toksikolojik çalışmalarda kullanılan en popüler canlı gruplarından birisidir. Dünyanın bir çok bölgesinde yaygın olarak bulunması, elde edilebilme ve toplama kolaylığı, laboratuvar koşullarında yaşatılabilmesi konusunda büyük sorunlar çıkmayışı gibi avantajlarının yanı sıra bir çok toksik maddeye karşı da duyarlı bir organizmadır [2].

Glutasyon redüktaz enzimi (GSSGr), hidrojen peroksit ve radyasyona neden olan radikallerin efektif detoksifikasyonunda görevli bir enzimdir [7]. Toksik bileşikler tarafından meydana getirilen GSH (redükte glutasyon)'daki değişimlerin analizleri, toksisite mekanizması hakkında önemli bilgiler vermektedir [8]. Glutasyon fraksiyonları; bir antioksidant gibidir ve askorbit-glutasyon döngüsündeki hidroperoksitler ve toksik serbest radikallerin uzaklaştırılması, hava kirliliği ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadırlar. Glutasyon redüktaz, organizmaların bütün dokularında bulunmaktadır. Bu enzim hayvanlarda doğrudan doğruya glutasyon peroksidaz ile; euglena, yeşil algler ve cyanobacteria dahil yüksek bitkilerde dehidroaskorbit redüktaz aracılığıyla dolaylı olarak askorbit peroksidaz ile eşleşmektedir. Glutasyon redüktaz muhtemelen, redükte formda *in vivo* H_2O_2 (hidrojen peroksit) atık yolunun hızlandırılmasında ve hücrede redükte glutasyon seviyesinin dengede tutulmasında rol oynamaktadır [9].

Redükte glutasyon özgül olmayan bir indirgeyicidir. Prostetik grup yüzeylerinde sülfidril gruplarına bağlı aktivite gösteren enzimlerin sayısı organizmalarda oldukça fazla bulunmaktadır. Bu enzimler oksitlendikleri ya da sülfidril ile birleşebilen ajanlarla karşılaştıklarında inaktive olmakta ve GSH'la tepkimeye girerek yeniden aktivitelerini kazanmaktadırlar. Hücre içi redükte glutasyon iki kaynaktan gelmektedir. Bunlardan birincisi eritrositlerdeki

aminoasitlerden, normal GSH sentezi, diğeri ise glutatyon redüktaz'ın katalizlediği tepkime sonucu indirgenen okside glutatyondur [10].

Glutatyon redüktaz, hücrelerdeki GSH ve GSSG (okside glutatyon) miktarlarının doğru oranlarda bulunmasını sağlamaktadır [7].

Glutatyon redüktaz, organizmaların hücrelerinde okside glutatyonu redükte glutatyonla dönüştürmeden sorumlu bütün dokularda bulunan bir flavoproteindir. Enzimin fonksiyonu, oksidatif stres'e karşı korunmada ve deoksiribonükleotidlerin üretiminde önemlidir [11].

Bu çalışmanın ilk bölümünde; sucul bir omurgasız olan ve besin zincirinde balıkların besinini teşkil eden *Gammarus pulex*'deki glutatyon redüktaz enzimi üzerine kurşun asetatın biyokimyasal etkileri incelenmiş ve kinetik analizleri ile kurşun asetat muamelesi sonucundaki enzim aktivitesindeki değişiklikler tespit edilerek, bu enzimin bir biomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Ayrıca, Cu^{+2} (bakır), Mg^{+2} (mağnezyum) ve Zn^{+2} (çinko) gibi metal iyonlarının ve EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)'in *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış ve enzim pürifiye edilerek SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) analizi yöntemiyle molekül ağırlığı tespit edilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Ağır Metallerden Kurşunun Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı

Kurşun; mavi, grimsi renkte ağır bir metaldir. Erime noktası 327 °C, kaynama noktası 1744 °C'dir. Organik kurşun bileşiklerinden alkil kurşun bileşikleri lipofil özellikte olup, toksikolojik açıdan önem taşımaktadır. 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 [12].

Sulara karışan kurşunun önemli bir kısmı, sularda bulunan karbonat, bikarbonat ve organik maddelerle birleşerek dibe çökmektedir. Böylece büyük oranda sedimentlerde biriken kurşun, sedimentten biotaya (fauna ve flora) geçerek birikmektedir [13].

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

Ağır metaller, kayaların hava alması veya volkanik faaliyetler gibi doğal nedenlerden dolayı sürekli sucul çevreye serbest olarak bırakılmaktadır. Bundan başka endüstriyel yöntemler ve tarımsal kullanımlar (örneğin bakır sülfat akuatik vegetasyonun kontrolünde kullanılır) tatlı sularda bir çok metalin hareketini büyük oranda arttırmaktadır. Bu nedenle günümüzde ağır metal kirliliği üzerine ilgi artmıştır [14].

Ağır metaller aynı zamanda gerekli elementleri (Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} vb.) ve Cd^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} ve Sn^{+2} gibi biyolojik fonksiyonları bilinmeyen metalleri de içine almaktadır. Bu metaller, ortamda ve absorbe haldeki bazı seviyelerde, çoğu organizma için potansiyel tehlike teşkil etmektedirler. Bazı sucul türler, bakır ve çinko gibi gerekli metallerin vücuttaki seviyelerini düzenleyebilirler, fakat bu düzenleme daha yüksek konsantrasyonlu metale maruz kalınma ve metal

birikmesi gibi nedenlerden dolayı bozulmaktadır. Metal düzenlenmesi çoğunlukla metal oranı arttığıında o metalin vücuttan atılımıyla başarılmaktadır [14].

Başlıca demir, bakır, kadmiyum, cıva, vanadium, kurşun, kobalt, nikel veya kalay gibi metallerin memelilerde lipid peroksidasyon oluşumları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır [15].

Deterjanlar ve pestisitler (tarım ilaçları) gibi sentetik kirleticilerin çalışılmasıyla, ağır metal kirleticilerinin çalışılması arasındaki farklılıkların önemli bir yönü; ağır metallerin doğal olarak çevrede, tatlı ve tuzlu sularda, toprakta ve atmosferde iz miktarlarda bulunmasıdır [4].

Deniz kirliliği çalışmaları, deniz ekosistemi için temel bilgilerin bulunmasıyla birlikte 1970 lerde başlamıştır. Evsel atıklar, endüstriyel atıklar, petrol atıkları, pestisitler (tarım ilaçları), insektisitler (böcek zehirleri), radyoaktif atıklar ve ağır metaller, deniz ve tatlı su kirliliğine neden olmaktadır. Belirli sahillerde çevre bu kirleticiler tarafından gittikçe etkilenmektedir. Bunlardan en önemlilerinden birisi de ağır metallerdir. Demir, kobalt, bakır ve çinko gibi bazı metaller çoğu organizma için gerekliyken kadmiyum, kurşun ve cıva gibi ağır metaller yarar sağlamadıkları gibi genelde zararlı ve toksiktirler. Canlı için gerekli olsun veya olmasın bütün metaller ortamda belirli bir konsantrasyonun üzerinde potansiyel olarak tehlike yaratmaktadır [4].

2.3 Kurşun Kirliliğinin Sucul Organizmalardaki Enzimler Üzerindeki Etkileri

Kurşunun da içinde bulunduğu ağır metaller, enzimler gibi membran biomoleküllerine bağlanabilmekte veya biyomoleküllerin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girebilmektedirler.

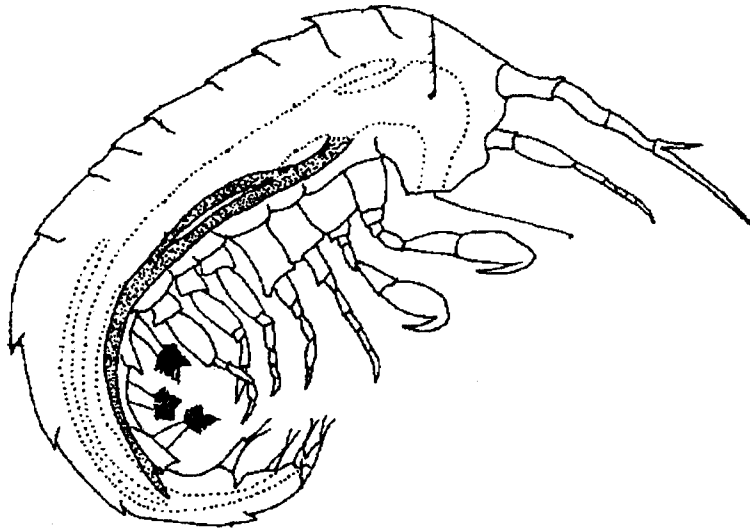
Kurşun, çevrede geniş çapta birikim gösterip hayvanlarda bir dizi olumsuz etkilere neden olan bir ağır metaldir. Kurşunun enzimleri inhibe ettiği ve lipid peroksit oluşumlarına bağlanarak biyolojik membranların yapısını değiştirdiği gözlenmiştir. Bir çok çalışma kuşunun, lipid peroksidasyonundaki bir azalmayla birlikte reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olduğunu göstermektedir [15].

Yapılan analizlerde, dil balıkları gibi sedimentlerle beslenen balıklarda önemli miktarlarda kurşun birikimine rastlanmıştır. Kurşunun ana kaynağı genelde topraktır. Toprakta bulunan kurşun çeşitli yollarla sulara da bulaşmaktadır. Tatlı sularda 3 mg/lt kurşun sitratın 12 saat içinde balıklar için öldürücü olduğu saptanmıştır [13].

2.4 Tatlısu Amphipodlarının Toksikolojik Çalışmalardaki Önemi

Akut toksisite testlerinde, toksik maddeler için genellikle amphipodlar en duyarlı organizmalar olarak kullanılmaktadır. Bu grup, kimyasal kirlilikten ve ağır metal birikiminden de en fazla etkilenen grup olarak tespit edilmiştir. Amphipodların çevresel stres faktörlerine ve toksikantlara cevapları hakkında yapılan çalışmalar da yeterli olmamaktadır [16,17].

Genellikle omurgasız canlıların kirleticilere karşı balık ve alglerden daha duyarlı olduğu bilinmektedir [5]. *Gammarus spp*'lar (şekil 2.1) sulara karışan çevresel kirleticilere balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çok çeşitli kirleticilere olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilibilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cinsin toksikolojik çalışmalardaki kullanımı giderek artmaktadır [17,18].



Şekil 2.1. *Gammarus spp*

Akuatik organizmalar ekolojik ve ekonomik önemlerinden ve morfolojilerinden dolayı çevre kirliliğini saptamada geniş çapta kullanılmaktadır. Toksikite testlerinde bu organizmaların kullanılması, akuatik ekosistemlerin korunmasında da gerekli görülmektedir. Çeşitli akuatik organizmalara ve biyolojik su kalitesini ölçmede kullanılan belirli indikatör organizmalara çevresel kirleticilerin etkileri üzerine pek çok çalışmalar yapılmaktadır. Bir çok toksisite testi akut lethalitynin ölçülmesiyle ilgilidir: Sonuçlar, test organizmalarının belli bir yüzdesinin (örneğin LC₅₀) standart bir zaman periyoduna bağlı olarak ölçülmesiyle, bir toksikant konsantrasyonu veya dozu olarak belirtilmektedir [14].

Toksikantların farmakokinetik bilgilerinin yanı sıra mekanizmalarının da anlaşılması için hangi toksikantların nelere etki ettiklerini bilmek gerekmektedir. Biyokonsantrasyonları göz önüne alındığında, bu toksik bileşiklerin organizmalardaki birikimi, çevreden çok daha fazla oranda bulunmaktadır [19].

Gammarus pulex son derece yaygın bir organizmadır ve balıkların besinini oluşturduğu için akarsularda bol miktarda bulunmaktadır. Birçok toksikanta karşı da özellikle duyarlı bir organizmadır. Amerikada standart toksisite test organizması olarak kullanılmış ve Avrupa'da da kullanımı için tavsiye edilmiştir [14].

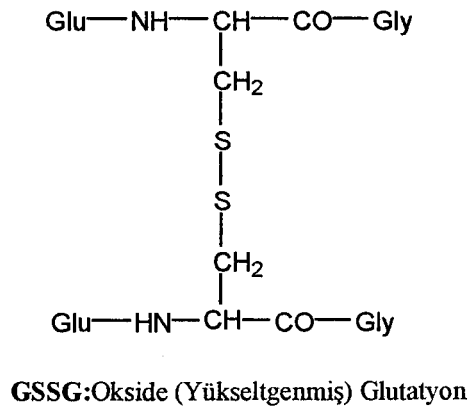
2.5 Glutasyon Redüktaz Enzimi

2.5.1 Glutasyon Redüktaz Enziminin Özellikleri ve Sınıflandırılması

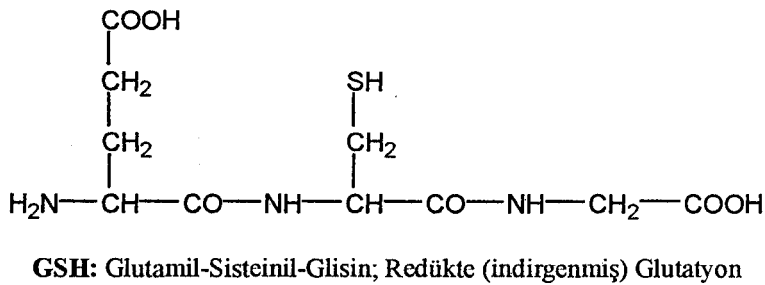
Glutasyon redüktaz; her biri dimerik olan lipoamid dehidrojenaz ve tioredoksin redüktazı içine alan piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesine mensuptur [9,20]. Aslında Piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesi, her alt ünitesi bir FAD ve bir redoks-aktif disülfid içeren dimerik flavoenzimlere bağlı fonksiyonel bir grup olarak tanımlanmaktadır [21]. Enzim, okside glutasyonun NADPH bağımlı redüksiyonunu katalizlemektedir. Glutasyon redüktaz her bir alt ünitesi yaklaşık 50 kDa moleküler ağırlıkta olan ve iki alt ünitesi bulunan homodimerik bir enzimdir. Enzimin her alt ünitesi bir FAD molekülü içermektedir. Flavin kofaktör nonkovalent bağlıdır ve enzimin iki alt ünitesi

arasında sıkı bir bağlanma bölgesini oluşturmaktadır [22]. Deoksiribonükleotidlerin sentezinde de önemli rol oynayan glutatyon redüktazın asıl fonksiyonu, oksidatif strese karşı hücreyi korumaktır [11].

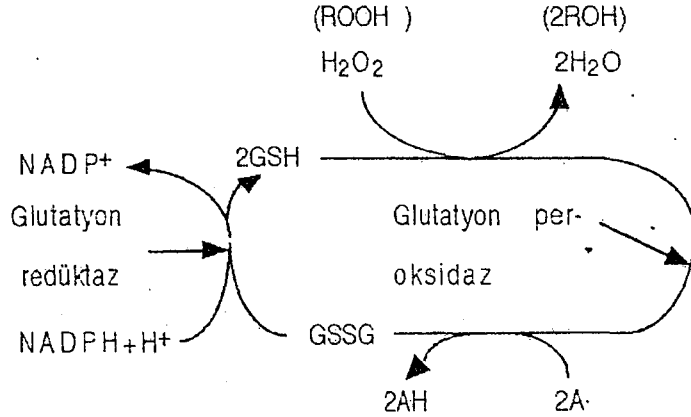
Glutatyon ve glutatyon redüktaz, reaktif oksijen bileşiklerine karşı hücrelerin atık toplama sisteminin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Glutatyon redüktaz okside glutatyonun (şekil 2.2) redükte glutatyon (şekil 2.3) redüksiyonda (şekil 2.4) arabulucu bir rol oynamaktadır [23].



Şekil 2.2. Okside glutatyonun moleküler yapısı

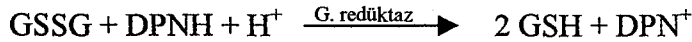
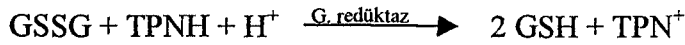


Şekil 2.3. Redükte glutatyonun moleküler yapısı



Şekil 2.4. Glutasyon redüktaz enziminin mekanizması

Glutasyon redüktaz, TPNH (Redükte trifosforidin nükleotid)'e özel glutasyon redüktaz ve DPNH (Redükte difosforidin nükleotid)'e özel glutasyon redüktaz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Glutasyon redüktaz aşağıdaki reaksiyonları katalizlemektedir;



Glutasyon redüktazın katalizlediği TPNH ve DPNH ile GSSG redüklenmesi, reaksiyon tamamlanana kadar sürmekte ve geri dönüşümsüz olmaktadır. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde, TPNH veya DPNH'ın oksidasyonunda beklenen optik yoğunluğun azalma oranına bakılmaktadır [24]

TPNH'a özel glutasyon redüktazın ölçülmesi için gerekli optimum şartların 25 °C'de, pH: 6.4-6.7 ve 340-366 nm (nanometre) dalga boyu olduğu bilinmektedir. DPNH'a özel glutasyon redüktazın ölçülmesi için gerekli optimum şartların ise 25 °C'de, pH: 6.2 ve 340-366 nm dalga boyu olduğu saptanmıştır [24].

NADH peroksidaz enzimi karakterize edildiğinde flavoprotein glutasyon redüktazla yapısal homolog olduğu görülmüştür [25].

Thioredoksin redüktazların da ; glutasyon redüktaz, lipoamid dehidrojenaz ve merkürük iyon redüktazı da içine alan pyridine nükleotid-disülfid oksidoredüktazların flavoprotein ailesine mensup oldukları saptanmıştır [26].

Glutasyon redüktaz enziminin *Chlamydomonas reinhardtii*'de SDS-PAGE ve jel filtrasyonu sonucuna göre yapılan araştırmalarda 54-56 kda. moleküler ağırlıkta bir monomer olduğu saptanmıştır. Enzimin NADPH için spesifik iken NADH için spesifik olmadığı görülmüştür. *C. reinhardtii*'de enzimin pH: 4.8-8.2 aralığında GSH ve NAD(P)⁺ ile geri dönüşüm reaksiyonu gözlenmemiştir. NADPH ve GSSG için K_m değerleri sırasıyla 10.6 µM ve 54.1 µM olarak bulunmuştur [9].

Yapılan çalışmalarda sıçanlarda glutasyon redüktaz enzim aktivitesi; böbrek >karaciğer > dalak > kalp > beyin > iskelet kası > eritrosit > serum şeklinde belirtilen sırayla azaldığı gözlenmiştir. Enzimin hücrenin tüm fraksiyonlarında lokalize olduğu belirtilmiştir. Sıçan (rat) beyni homojenatında; hücre çekirdeğindeki toplam aktivite % 11.9, mitokondride % 35.4, mikrozomlarda % 9.5 ve yüksek hızda santrifügasyondan sonra erimiş süpernatantda ise % 43.9 olarak bulunmuştur [24].

İnsan göğsünde ve fare meme bezlerinin preneoplastik ve neoplastik dokularında glutasyon redüktaz aktivitesi, diğer dokularla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur. Meme kanserinde glutasyon redüktaz aktivitesinin artmasının, GSH tükendiğinde enzimin ortam şartlarına karşı bir yanıtı olduğu tahmin edilmektedir [27].

Sitrat tamponundaki saf enzimin diyalizi, enzim aktivitesinin kaybına neden olmaktadır. Fakat bu aktivitenin 20 ve 50 µM FAD (flavin adenin dinükleotid) ile inkübe edildikten sonraki orjinal seviyesi sırasıyla %22 ve %38 geri kazanıldığını göstermiştir. FMN (flavin mononükleotid)'in enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığı görülmektedir. FAD ile geri kazanılan aktivite ile, non-kovalent bağlı bir kofaktör olan FAD'ın *C.reinhardtii* glutasyon redüktazının katalitik aktivitesi için gerekli olduğu görülmüştür [9].

2.5.2 Glutasyon Redüktaz Enziminin Biyokimyasal Yapısı

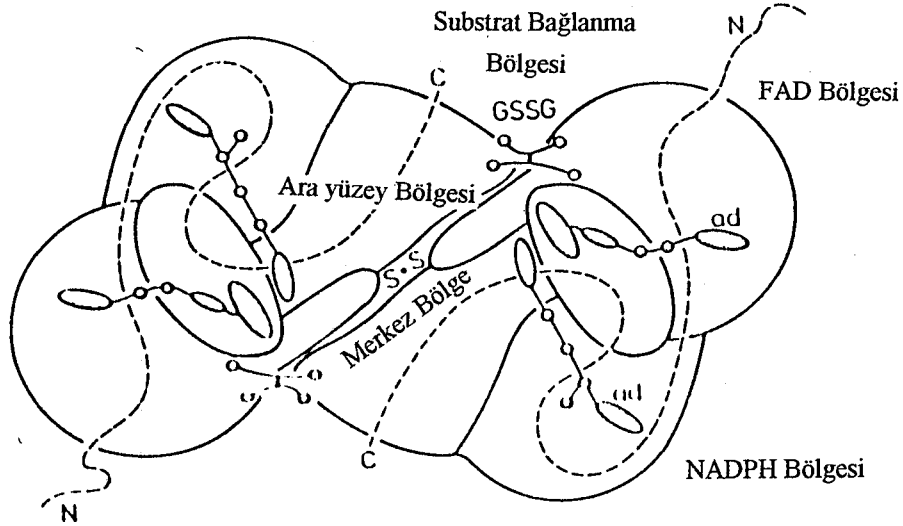
Glutasyon redüktaz geometrisi bilinen bir homodimerik flavoenzimdir. Her bir alt ünitesi, kaynağı bilinen dört bölge içerir ve aktif bölgeye gerekli yan gruplar katılır; bu nedenle monomerin inaktif olması beklenmektedir.

İnsan eritrosit ve *E.coli* glutasyon redüktazının ayrıntılı yapısal özellikleri, yüksek kararlılıktaki kristal yapılarından elde edilmiştir. Bu enzimler %52 oranında benzer olmalarına karşın eritrosit glutasyon redüktazının N terminalindeki 16 yan grubun *E.coli*'deki enzimde kayıp olduğu görülmektedir. Enzimlerin üçüncül yapıları birbirlerinden çok az farklılık göstermektedir [22].

Glutasyon redüktaz, FAD bağlanma, NADPH bağlanma, merkez ve arayüzey adı verilen dört yapıdan meydana gelen iki alt üiteden oluşmuş homodimerik bir enzimdir. İnsan glutasyon redüktazının, substratı olan okside glutasyonla ve farklı glutasyon analoglarıyla oluşturduğu yapıların büyük çapta analizleri yapılmıştır [11].

İnsan glutasyon redüktaz mutantları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, bu enzimin cDNA'sının *E. coli*'de klonlanmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Spesifik mutasyonlarla 154 pm (pikometre) uzunluğunda olduğu bilinen insan eritrosit glutasyon redüktazının geometrik yapısı araştırılmaktadır. Homodimerik enzimin alt üniteleri, Cys90-Cys90' disülfid köprüleriyle çapraz bağlanmaktadır. Her alt ünite, bir esnek N-terminal uç (1-18. yan gruplar); FAD bağlanma bölgesi (19-157), NADPH bölgesi (158-293), merkez bölge (294-264) ve alt ünite ara yüzey bölge gibi kaynağı bilinen dört yapısal bölge içermektedir (şekil 2.5). Her iki alt üiteden yan grupların oluşturduğu substrat (GSSG) bağlanma bölgesi ve katalitik bölge olmadan glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin olanaksız olduğu görülmektedir [28].

E. coli'deki dimerik glutasyon redüktaz enziminin ara yüzey (interface) bölgesi, proteinin her bir alt ünitesinde bulunan diğer üç bölge (NADPH bağlanma bölgesi, FAD bağlanma bölgesi, Merkez bölge) ile çevrelenmektedir. *E. coli*'de ara yüzey bölgesini kodlayan altgenlerin üç formu ifade edilmektedir [29].



Şekil 2.5. İnsan glutatyon redüktaz enziminin 2 katlanma eksenine birlikte gösterilmiş molekül yapısı

Homodimerik bir enzim olan glutatyon redüktaz ilginç bir örnek teşkil etmektedir. İnsan GSSGr ve homologu *E. coli* enzimlerinin kristalografik çalışmaları, dört iyi belirlenmiş bölgeden (bir FAD bağlanma bölgesi ve bir NADPH bağlanma bölgesini takip eden daha küçük merkez bölge ve bir ara yüzey bölgesi) meydana gelen her bir alt üniteyi ortaya çıkarmıştır. İki aynı aktif bölge, iki ara yüzeyin ortasındaki iki katlanma ekseninde lokalize olmakta ve her iki alt bölgenin yardımıyla amino asit yan gruplarından meydana gelmektedir. Alt ünite ara yüzeyi, bir oyuk tarafından ayrılmış ve farklı yapıda olan iki ayrı bölümü kapsamaktadır. İlk (üstteki) kısım; çok katı (bükülmez) ve enzimin en iyi korunan bölgesi olan ara yüzey (bölge) tarafından oluşturulmaktadır. İkinci (alttaki) kısım; daha az korunan ve molekülün daha fazla bükülebilen kısmı olan FAD bağlanma bölgesinin yukarıya genişlemesiyle meydana gelmektedir [29].

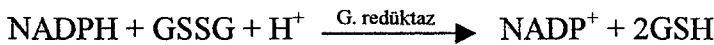
Redükte glutatyonun rejenerasyonu, 50 kDa.'luk alt ünite çiftiyle glutatyon redüktaz tarafından katalizlenmektedir. Elektronlar, NADPH'dan okside glutatyondaki disülfid bağlarına doğrudan transfer olmamaktadır. Daha çok; elektronlar önce NADPH'dan sıkı bağlı flavin adenin dinükleotid (FAD)'e, daha sonra alt ünitedeki iki sistein yan grubu arasındaki disülfid köprüsüne transfer olmakta ve glutatyonun okside olmasıyla sonuçlanmaktadır. Her alt ünite üç

yapısal bölge; bir FAD bağlanma bölgesi, bir NADPH bağlanma bölgesi ve bir ara yüzey bölgesini içermektedir. Birbirlerine benzeyen FAD ve NADP⁺ bölgelerinin diğer dehidrojenazlardaki gibi nükleotid bağlanma bölgeleriyle aynı olduğu görülmektedir. FAD ve NADP⁺, herbiri diğerine yakın çevrelenmiş nikotinamid ve izoalloksazinleriyle, uzayan bir formda bağlanmaktadır. Okside glutasyonun bağlanma bölgesinin, bir alt ünitenin FAD bölgesi ve diğer alt ünitenin ara yüzey bölgesi tarafından oluşturulmasının ilginç olduğu düşünülmektedir [30].

E. coli ve bitkilerdeki glutasyon redüktazlar floavoproteinlerdir. Flavin, mild asit hidroliziyle ayrılabilen ve flavin adenine dinükleotid eklenmesiyle apoenzim tam aktivitesini geri kazanmaktadır. Flavin mononükleotid ve riboflavin inaktiftir ve riboflavin aynı şekilde inhibe olabilmektedir [24].

2.5.3 Glutasyon Redüktaz Enziminin Metabolik Fonksiyonları

Glutasyon redüktaz,



reaksiyonunu katalizlemektedir. Özellikle, deoksiribonükleotidlerin üretilmesi ve oksidatif stresin kontrolünde çok önemli rol oynamaktadır [28,31-36].

Glutasyon redüktazın fonksiyonu, okside glutasyonu redükleyerek GSSG:GSH oranını dengede tutmaktır. GSH'nin normal fizyolojik şartlar altında, GSSG:GSH oranındaki bir azalmayla, sabit (yüksek oranda) tutulması gerekmektedir. Bu glutasyon redüktazın GSH ürettiği reaksiyonla sağlanır [37].

Normal koşullar altında glutasyon, redükte formda bulunmaktadır. GSH'nin oksidasyonu hem non enzimatik olarak hem de glutasyon peroksidazın aktivasyonu ile okside glutasyonu (GSSG) oluşturmaktadır [33,38-40]. Daha sonra bu molekül (GSSG) pentoz fosfat yolunda sentezlenen NADPH'lar kullanılarak glutasyon redüktazla redüklenmekte ve GSSG'nin intrasellüler konsantrasyonunun en düşük düzeyde tutulması sağlanmaktadır. [33]

Glutasyon redüktaz, GSSG'nin NADPH ile hemen hemen geriye dönüşümsüz olan redüksiyonunu katalizlemektedir. Bu nedenle enzimin

metabolik fonksiyonları onun ürünü olan GSH ile eş anlamlı tutulmaktadır. Glutasyon, hücrede daha çok tiol-disülfid halindedir ve normal şartlarda GSH:GSSG oranı 20'ye 1 olarak bulunmaktadır. Redüktaz reaksiyon dengesinde GSH:GSSG oranı çok yüksek olduğu için, enzim seviyesi veya NADPH varlığıyla sınırlı olan GSSG redüksiyonu sona erdirilebilmektedir [41].

GSH iki reaksiyon tipinde kullanılmaktadır. Birincisi; GSH peroksidaz ve transhidrojenaz grubu enzimleri (GSH-homosistin oksidoredüktaz, GSH-protein disülfid oksidoredüktaz, GSH-CoASSG (glutasyon koenzim A) oksidoredüktaz ve GSH-sistin oksidoredüktaz) için substrat olarak kullanılmasıdır. Bu transhidrojenazlardan en çok çalışılanı, GSH-protein disülfid oksidoredüktaz yada daha iyi bilinen adıyla Glutasyon-insülin transhidrojenazdır. Bu enzim ilk basamakta insülinin yıkımını katalizlemektedir. Bu reaksiyonun ürünlerinden biri olan fenil alanin bir glutasyon redüktaz inhibitörüdür. Bu ürünler önemli bir fizyolojik feedback mekanizması olsa bile tam olarak tanımlanamamaktadır. Transhidrojenaz yalnızca onun substratı olan GSH'ın varlığında tiol inhibitörlerine duyarlı olduğu için reaktif bir disülfid veya maskelenmiş bir tiol içermektedir [41].

İkincisi; enzimsel olmayan GSH fonksiyonları, karışık disüflitlere oksitlenmiş olan protein tiollerinin redüksiyonunda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda bu ikinci GSH fonksiyonunda inaktif enzimler aktif enzimlerden birine veya tersi duruma dönüşmekte ve böylece bir metabolik kontrol yolu olarak çalışabilmektedir. Bu önemli durumun örnekleri glikojen sentetaz D ve fruktoz-1,6-difosfatazdır. Glikojen sentetaz'ın D formu, glukoz-6-fosfat'ın varlığı üzerindeki aktiviteye bağlı bulunmaktadır. Glikojen sentetaz'ın D formu GSSG tarafından inaktive, GSH tarafından da aktive edilmektedir. GSSG ve enzim tiolleri arasındaki meydana gelen disülfid oluşumu, glikojen sentetazın enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olmaktadır [41].

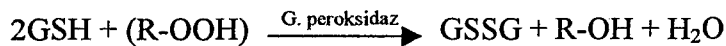
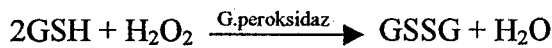
Glutasyon üzerine yeni bir araştırma, bu peptit'in ortaya çıkan birçok fonksiyonunu rapor etmektedir. Birkaç önemli potansiyel etkisi, diamide $[(CH_3)_2NCON=NCON(CH_3)_2]$ adındaki oksitleyici ajan ile bozulan GSH-GSSG dengesinin sonuçlarının gözlenmesiyle anlaşılmıştır. Bunlar; sinir iletimini, membran bütünlüğünü ve protein sentezini içine almaktadır. Başlıca hemolitik

hastalık durumları ve glutatyon redüktaz eksikliği arasındaki olası bir bağlantı ileri sürülmektedir. Buradaki şartlar, düşük bir GSH:GSSG oranıyla veya örneğin ilaç tarafından bir karşı koymadan sonra, normal GSH:GSSG oranının düzenlenmesindeki yetersizlikle tanımlanmaktadır. Hemen hemen tüm bu durumlarda, bir NADPH yokluğuna ek olarak düşük glukoz-6-fosfat dehidrojenaz veya riboflavin eksikliğini GSH eksikliği takip etmektedir [41].

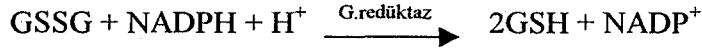
GSH, protein katlanması esnasında yanlış şekillenen disüflitlerin yeniden düzenlenmesinde katalitik bir rol oynamaktadır. Bu reaksiyon bir mikrozomal enzim olan protein disüflit izomeraz tarafından katalizlenmektedir. GSH enzimdeki bir thiol grubunu maskeleyip bu thiol grup isomerizasyonu katalizlemektedir [41].

Disüflit substratlarına karşı Glutatyon redüktaz spesifikliğı üzerinde durulmaktadır. Fakat glutatyon redüktazın diğere piridin nükleotid-disüflit oksidoredüktazların substratlarına karşı aktif olmadığı saptanmıştır. Glutatyon redüktazın karışık disüflitlerden (glutatyon veya γ -glutamil sistein) oluşan bir çeşit redüksiyonu katalizleyebilmesinden dolayı bu enzimin substrat spesifikliğinin fazla olmadığı bazı bilim adamları tarafından belirtilmiştir. Glutatyon redüktaz, bu aktivite ile transhidrojenazlarınkini ayırt etmede önemli rol oynamaktadır. Rat karaciğere supernatantında glutatyon redüktazın G-S-S-CoA'nın NADPH-bağımlı redüksiyonunu katalizlediğı belirgin bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte mayada bu reaksiyonu katalizleyen farklı bir enzimi gösteren bazı deliller de bulunmaktadır [41].

Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksid (H_2O_2) ve yağ asitleri hidroperoksitleri (R-OOH) karşısında indirgenmiş glutatyonu (GSH), okside glutatyon (GSSG) oksitlemekte ve H_2O_2 'yi de suya çevirmektedir [42-44].



Oksitlenmiş glutatyon da tekrar glutatyon redüktaz tarafından indirgenmişe çevrilmiştir.



Bu enzim, eritrositlerde bulunmuştur. Buradaki GSH'in önemi, H₂O₂ ve hidroperoksitlerin glutatyon peroksidaz tarafından oksitlendikleri sırada zararlı lipidlerini ve hücre içi hemoglobini korumasıdır [34-36,42].

Bir flavoprotein yapısında olan glutatyon redüktaz enzimi bu tepkimeyi katalizlerken kofaktör olarak NADPH kullanılmaktadır. Bu tepkime için gerekli olan NADPH, heksoz monofosfat yolunun ilk kademelerini oluşturan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin aktivasyonu ile sağlanmaktadır [33].

2.5.4 Glutatyon Redüktaz Enziminin Canlılardaki Önemi

Glutatyon redüktaz enzimi okside glutatyonu redükte glutatyonla dönüştürerek hücrenin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır [15]. Glutatyon redüktaz; bakterilerde, mayalarda, bezelyede, buğdayda, çeşitli bitkilerde, hemen hemen tüm hayvansal dokularda, eritrositlerde, plateletlerde, insan serumunda ve diğer tüm hayvan türlerinde bulunmaktadır [24].

Glutatyon redüktaz enziminin fonksiyonu, hücre içindeki GSH'ı yüksek düzeyde tutmaktır. Ayrıca, hücre bölünme siklusunda ve hücre içinde oluşacak streslere karşı adaptasyonda olduğu gibi diğer görevleri de bulunmaktadır [33].

Hint hardalı adı verilen *Brassica juncea*'nın sitozol ve plastidlerinde bulunan bir bakteri glutatyon redüktazın ağır metal birikimi ve toleransında enzimin önemi belirtilmiştir [23].

İnsanlarda hücreler arası oksidatif strese karşı savunma merkezi, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerini içine alan glutatyon redoks döngüsüdür. Flavo enzim glutatyon redüktaz, redükte glutatyon seviyesini yüksek tutmak için okside glutatyonun NADPH bağımlı geriye dönüşümünü katalizlemektedir [45,46].

Glutasyon redüktazın artan aktivitesi, böcekler için yararlı olan antioksidant savunma mekanizmasının dayanıklılığını göstermektedir [47]. Glutasyon da antioksidant sistemin önemli bir parçasını teşkil etmektedir [48].

İnsan eritrositinin önemli redükleyici gücünü yenilemesinde glutasyon redüktaz önem kazanmaktadır [49]. Eritrositte, hemoglobinin Fe^{+2} durumunda kalmasını sağlayan, glutasyona bağlı, güçlü bir redüktaz (glutasyon redüktaz) bulunmaktadır. Sülfonamidler ve diğer bazı ilaçlar gibi yükseltgeyici olan çeşitli bileşikler hemoglobinin (Fe^{+2}), methemoglobine (Fe^{+3}) yükseltgenmesini sağlamaktadırlar. Methemoglobin, O_2 'den çok H_2O 'yu bağlamakta ve hücre içindeki bazı indirgeyici ajanlar ile tekrar hemoglobine indirgemektedir. Bu tür bileşiklerden biri glutasyon dur (GSH); GSH, glutasyon redüktazın etkisi ile yeniden ortaya çıkmaktadır [50]. Bu işlem, glukozun pentoz fosfat yolunda yükseltgenmesine bağımlı olmaktadır. Glutasyon, alyuvar zarındaki yağ asitlerinin ve proteinlerin yükseltgenmesini de önlemektedir [50,51].

Radyasyon ve kemoterapotik ilaçları içeren çeşitli ajanların sitotoksitesinden hücrelerin korunmasında redükte glutasyonun (GSH) rolünün önemli olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür. GSH'ın serbest radikallerin direkt olarak inaktivasyonunda ve radyasyon tarafından oluşturulan DNA bozukluğunun giderilmesinde rol oynadığı gösterilmektedir [33,52,53].

GSH'ın karaciğerdeki milimolar düzeydeki varlığı; toksisiteye karşı hücrelerin detoksifikasyonunda ve hepatik ilaç mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermiştir. H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerinin varlığında GSH, glutasyon peroksidaz tarafından GSSG'a oksitlenmekte ve sonuçta oluşan GSSG, ya sonradan ortaya çıkan glutasyon redüktaz tarafından GSH'a redüklenmekte yada hepatositlerden vücut dışına atılabilmektedir [54].

2.5.5 Glutasyon Redüktaz Enziminin Diğer Maddelerle Etkileşimi

Hg^{+2} ve Cu^{+2} gibi belli metal iyonları ve tiol inhibitörleri enzim aktivitesini inhibe edebilmektedir. Diyalizle apoenzim hazırlandığında aktivite kaybolmaktadır, fakat $50 \mu M$ -FAD eklenmesiyle orjinal aktivitenin % 40'ının geri kazanıldığı görülmektedir. Enzim reaksiyonunun ilerlemesi dallanmış bir

mekanizma yoluyla meydana gelmektedir. *C. reinhardtii*'nin glutatyon redüktaz aktivitesinin ıspanak ve euglena glutatyon redüktazlarına karşı oluşturulan antibadilerle sırasıyla % 50 ve % 90 inhibe edildiği görülmüştür. Her iki antibadi immunoblot analizlerinde *C. reinhardtii* glutatyon redüktazı ile çapraz tepkime vermektedir [9].

İnsan glutatyon redüktazının dimerizasyon inhibitörleri olan Antimalarial ajanlar, enzimin 446 ve 447. Yan gruplarını mutasyona uğratabilmektedirler [28].

Glutatyon redüktaz'ın L1210 (murine lökemia hücreleri) hücrelerindeki inhibisyonunun, BCNU (1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea) konsantrasyonuna ve ortaya çıkma zamanına bağlı olduğu görülmektedir. Glutatyon redüktaz aktivitesi $1,6 \pm 0,2$ μM BCNU ile % 50, 10 μM BCNU ile tamamen inhibe edilebilmektedir. 10 μM BCNU eklenmesiyle 7 dakika içinde hücrelerin glutatyon redüktaz ativitesinin % 50'sinin kaybolduğu gözlenmiştir. [7].

Maya glutatyon redüktazı, affinite parmak izi metoduyla proteinlerine ligand bağlanması üzerindeki yeni bir çalışmada, model protein ilaç hedeflerinden biri olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kimyasal ailesinin bir çeşidinde sıkı bağlanan inhibitörlerden biri tanımlanmakta fakat henüz onların hareket modelleri bulunamamaktadır. Çünkü maya glutatyon redüktazı ve insan glutatyon redüktazı %48 homolog dur. İnsan glutatyon redüktazının inhibitörleri olarak maya glutatyon redüktaz inhibitörlerinin bazıları test edilip inhibisyonun farklı modelleri ortaya konulamamıştır [46].

Bir non-kompetitif inhibitör olan XAN (6-hidroksi-3-oxo-3H-ksantin-9-propiyonik asit) ile insan glutatyon redüktazı etkileşimi sırasında aralarında karmaşık kristal bir yapı meydana geldiği belirlenmiştir. Bu yapının, enzimin ara yüzeyinde büyük bir boşlukta XAN bağı olduğu ve enzimin glutatyon bağlanma bölgesini kısmen kaplamadığı anlaşılmaktadır. Bu inhibitör bağlanmanın enzimde büyük çapta lokal yapısal değişimlere neden olduğu gösterilmiştir [46].

3. MATERYAL VE METOD

3.1 DeneYlerde Kullanılan Canlıların Sağlanması ve Laboratuvarda Yetiştirilmesi

DeneYlerde kullandığımız *Gammarus pulex*'ler Porsuk nehrinden (Eskişehir, Regülatör civarı) toplanmış ve Anadolu Üniversitesi Teknoloji Araştırma Parkı Biyoloji Laboratuvarına getirilmiştir. *Gammarus pulex* için su sıcaklığı ($12^{\circ}\text{C} \pm 1$), tüm testler için benzerdir.

Gammarus pulex'ler doğal ortamlarından alınan su ve toprakla hazırlanmış akvaryumlarda, uygun sıcaklık ($10-12^{\circ}\text{C}$) ve hava akımı verilerek laboratuvar şartlarına alışmaları sağlanmıştır. Canlılar, ortamlarından alınan topraktaki ve dışarıdan verilen organik besinlerle beslenmişlerdir. Canlılara 20-25 günde bir defa organik besin (kaynamış yumurta sarısı) verilmiştir.

DeneYlerde 5-8 mm arası canlılar kullanılmış ve deney için ayrılanlar 1lt.'lik akvaryumlarda deney koşullarına tabi tutulmuştur. Canlılara deneyden önce besin verilmemiştir. Deney süresince her gün 15 dakika canlıların hareketli kısımları izlenmiş ve hareketsiz olanlar deneye alınmamıştır.

3.2 DeneYlerde Kullanılan Metal Çözeltileri

Hazırlanan stok kurşun çözeltisi, kurşun asetat şeklinde distile suda çözülerek kullanılmıştır. Stok çözelti; 0,1 mg/ml hazırlanmış ve EC_{50} değerleri uygulanmıştır. Bakır, magnezyum ve çinko içeren çözeltiler ise bakır klorür, magnezyum klorür ve çinko klorür şeklinde deiyonize suda çözülerek hazırlanmış ve deneYlerde kullanılmıştır.

3.3 Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivite Tayini

3.3.1 Homojenatın Hazırlanması

Deney için uygun görülen (5-8 mm arası) *Gammarus pulex*'lerden 1 tanesi 500 µl potasyum fosfat tamponunda (0.2 mM EDTA'lı, pH:7.2), buz içinde Janke&Kunkel Ultra-Turrax T25 homojenizatörde 8000-9500 devir/dakika (rpm)'da homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat Heraeus Sepatec Biofuge 20 RS soğutmalı santrifüjde 20000 rpm 'de 15 dakika 0°C'de santrifüj edilmiştir. Glutasyon redüktaz aktivitesi için enzim kaynağı olarak bu aşamada elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır.

3.3.2 Aktivite Tayini

Glutasyon redüktaz, GSSG (glutasyon disülfid)'in NADPH-bağımlı redüksiyonunu glutasyon (GSH)'a katalizleyen bir flavoproteindir.



Reaksiyon, glutasyon seviyesine bakmak için gerekli olmaktadır. Glutasyon, oksidasyon-redüksiyon proseslerinde, detoksifikasyonda ve diğer bazı önemli hücrel fonksiyonlarda bir redüktant olarak rol oynamaktadır. Glutasyon redüktaz farklı organizmaların bir kısmından da izole edilmiştir [42].

Çözeltiler:

K₂PO₄ (Potasyum fosfat) tamponu 0,2 M pH: 7.0 (2mM EDTA içinde)

NADPH, 2mM (10mM Tris-HCl içinde pH: 7.0)

GSSG (Okside glutasyon), 20mM distile suda

Deiyonize su

2 ml'lik küvete 1 ml fosfat tamponu (30 °C'de), 100µl NADPH, 100µl GSSG ve toplam 2ml olacak şekilde deiyonize su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon, küvete 200 µl enzim eklenmesiyle başlamış ve 30 °C'de 340 nm dalga boylu spektrofotometrede enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzim aktivitesi absorbandsaki azalmaya bağlı olarak

izlenmiştir. NADPH'ın oksidasyonu spektrofotometrede 340 nm'de izlenmektedir [42].

Enzim Ünitesi: 1 ünite glutatyon redüktaz aktivitesi; 1 dakikada 1 mikromol NADPH'ı redükleyen enzim miktarıdır.

<u>Kör Tüpü:</u>	<u>Reaksiyon Tüpü:</u>
1,2 ml Fosfat Tamponu	1 ml Fosfat Tamponu
0,1 ml NADPH	0,1 ml NADPH
0,1 GSSG	0,1 ml GSSG
0,6 ml Deiyonize su	0.6 ml Deiyonize su
	*0,2 ml Enzim

3.3.3 Protein Miktarının Tayinleri

Lowry'e göre (1955), bovin serum albümin (BSA) standart alınarak Sigma (PO 5656) mikro protein tayin kiti ile protein miktarı belirlenmiştir.

3.4 Glutatyon Redüktaz-Kurşun Etkileşimi (in vivo)

3.4.1 Kurşun ile Muamele Edilmiş *Gammarus pulex*'de Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Zamana Göre Değişiminin İncelenmesi

Kutlu (1996)'ya göre kurşunun [EC₅₀] konsantrasyonu 4, 8, 16, 32, 64 ve 96 saatlik deney grupları şeklinde uygulanmıştır. Her deney grubunda 10 'ar canlı kullanılmıştır. Uygulanan zaman periyotları sonucunda sağ kalan canlılar ve ölenler sayılarak tespit edilmiştir. Canlı kalanlar deneyde kullanılarak glutatyon redüktaz aktivitesinin zamana göre değişimi incelenmiştir.

3.5 *Gammarus pulex* Glutasyon Redüktazının Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

3.5.1 Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Glutasyon redüktaz aktivite tayininde kullanılan potasyum fosfat tamponları, 1 M sodyum hidroksit (NaOH) ve 1 M hidroklorik asit eklenerek pH'ları 5.0, 6.5, 7.0, 7.2, 8.0, 9.0 'a ayarlanarak deneylerde kullanılmış ve enzimin optimum pH'sı belirlenmiştir.

3.5.2 GSSGr Aktivitesinin Kinetik Analizi

Gammarus pulex glutasyon redüktazının K_m değerini belirtmek amacıyla farklı substrat konsantrasyonlarına karşı enzimin hızı ölçülmüş Michaelis-Menten ve Line Weaver Burke grafiğinde gösterilerek K_m değeri tespit edilmiştir.

3.5.3 *Gammarus pulex* GSSGr Aktivitesi Üzerine Cu^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex GSSGr enzim aktivitesi üzerine Cu^{+2} iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus pulex* GSSGr'nin Cu^{+2} 'a duyarlılığı karşılaştırılmalı olarak saptanmıştır. $CuCl_2$ 'nin 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 500 μ M konsantrasyonları homojenata eklenerek aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.5.4 *Gammarus pulex* GSSGr Aktivitesi Üzerine Mg^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex GSSGr enzim aktivitesi üzerine Mg^{+2} iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus pulex* GSSGr'nin Mg^{+2} 'a duyarlılığı karşılaştırılmalı olarak saptanmıştır. $MgCl_2$ 'nin 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve

500µM konsantrasyonları homojenata eklenerek aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.5.5 *Gammarus pulex* GSSGr Aktivitesi Üzerine Zn^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex GSSGr enzim aktivitesi üzerine Zn^{+2} iyonlarının etkisi araştırılırken, kontrol grubuna karşı *Gammarus pulex* GSSGr'nin Zn^{+2} 'a duyarlılığı karşılaştırılmalı olarak saptanmıştır. $ZnCl_2$ 'nin 1µM, 10µM, 50 µM, 100µM ve 500µM konsantrasyonları homojenata eklenerek aktivite üzerindeki etkilerine bakılmıştır.

3.5.6 EDTA'ya Duyarlılık Açısından *Gammarus pulex* GSSGr Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

Gammarus pulex GSSGr enziminin EDTA'ya duyarlılık açısından enzim aktivitesi incelenirken 100µM, 200µM ve 300 µM arası EDTA konsantrasyonları uygulanmış, aktivite üzerine etkisi *Gammarus pulex*'de kontrol grubu ile karşılaştırılarak saptanmıştır.

3.6 GSSGr Enzim Pürifikasyonu

3.6.1 Jel Filtrasyon Yöntemiyle GSSGr Enziminin Pürifikasyonu

Tüm tamponlar 1 mM EDTA içermektedir.

- 1. Basamak (Sitozol Fraksiyonlarının Preparasyonu):** *Gammarus pulex*'ler (5g) buz içerisinde 0.25 M sükrözde (6-7 ml/g) homojenize edilmiştir. Homojenat 7000 g'de 60 dakika santrifüjlenir. Süpernatant 0.2 M asetik asit eklenerek 5.3'e ayarlanmış ve 15.000 g'de 40 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant'a 1 M Tris-base eklenerek pH 7.4'e ayarlanır. 0,25 M sükröz'da A %20 (W/w) homojenatı

daha ileride pürifikasyon basamakları için başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. PMSF (phenylmethanesulfonyl-fluoride) veya FAD ilave edilmemiştir.

2. Basamak (CM (carboxymethyl) Selüloz'da Kromotografi): Süpernatant fraksiyonu Sephadex G-25 (1.4 x 8 cm: 10 mM fosfat pH: 6.1)'den geçtikten sonra, aynı tampon içinde CM-selüloz sütununa konmuştur. pH: 6.1 10 mM fosfat içindeki elüsyon, NaCl'ün lineer konsantrasyon gradienti (0,2 M - 0) ile muamele edilmiştir.

3. Basamak (Sephadex G-75'de Kromotografi): 2. Basamakta elde edilen materyal 30 ml'den az olacak şekilde ultrafiltrasyonla konsantre edilmiş ve 10 mM pH: 6.7 sodyum fosfat ile dengelenmiş sephadex G-75 kolonuna (1.4 x 8 cm) konmuştur.

Bu jel filtrasyonu, diğer glutasyon-bağımlı enzimlerden glutasyon redüktaz'ı ayırmaktadır. Bu safhada glutasyon redüktaz dondurulabilmekte ve 7 ay saklanabilmektedir.

4. Basamak (2', 5'-ADP Sepharose'da Kromotografi): 3. Basamakta elde edilen materyal, affinite kolonuna konulmadan önce solid (katı) amonyum sülfat (4gr/10ml) eklenmesiyle konsantre edilmiş, santrifüjlenmiş ve yaklaşık 5 ml pH: 7.5 50mM potasyum fosfat içinde bozulmuştur.

Bu bozulan presipitat; pH: 7.5 50 mM potasyum fosfat (0,1 mM DTE (dithioerythritol) içinde) ile dengelenmiş 2', 5'-ADP Sepharose (1.4 x 8 cm)'a konmuş. Kolon yıkanmıştır ve elue edilmiştir.

5. Basamak (Sephacryl S-200'de Kromotografi): 4. Basamakta (konsantrasyondan sonra) elde edilen fraksiyon 0,1 M KCl içeren pH: 7.5 50mM fosfatta sephacryl S-200 kolonu (1.4 x 8 cm) içinde yürütülmüştür.

6. Basamak (2', 5'-ADP Sepharose II'de Kromotografi): 5. Basamakta elde edilen materyal ikinci bir 2', 5'-ADP Sepharose kolonuna (1.4 x 8 cm) konmuş, tekrar dengelenmiş, yıkanmış ve elue edilmiştir. Bu durumda toplam gradient miktarı 2 ml'dir [42].

Bu aşamada elde edilen protein SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek elde edilen bantlardan molekül ağırlığı hesaplanabilmiştir.

3.6.2 Fiber Polimerlerle *Gammarus pulex* GSSGr Enziminin Affinite Etkileşimleri

- 1) *Gammarus pulex*'lerden 2'şer gram alınıp farklı 3 tüpte 6,64 ml potasyum fosfat tamponu (pH: 7) içinde, 8000 devirde homojenize edilmiştir.
- 2) Elde edilen homojenat 20.000 rpm'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım alınıp farklı 2 tüpteki toplam protein miktarlarına ve GSSGr enzim aktivitesine bakılmıştır.
- 3) 2 farklı süpernatant + 4 °C'de 1 gece çalkama işlemi yapılmak suretiyle 2 farklı tüpte Cibacron Blue F3GA takılı fiber polimer ve Alizarin takılı P(HEMA) mikro kürelerle [55] muamele edilmiştir.
- 4) Daha sonra fiberler tüplerden alınarak potasyum fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Fiberler alındıktan sonra süpernatanttaki protein miktarlarına bakılmıştır.
- 5) Potasyum fosfat tamponuyla yıkanan fiberler farklı tüplerde 6,64 ml 1 M KCl ile + 4 °C'de 1 gece muamele edilmiştir.
- 6) Bu işlemle meydana gelen desorbsiyondan sonraki tüplerde bulunan protein miktarlarına ve GSSGr enzim aktivitesine bakılmıştır.

3.7 *Gammarus pulex* GSSGr Enziminin SDS-PAGE Kullanılarak Moleküler Ağırlığının Saptanması

3.7.1 Elektroforez İçin Gerekli Malzemelerin Hazırlanması

% 30 Akrilamid Mix:

9 g akrilamid, 0,24 g bisakrilamid tartılıp, 30 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

%10 SDS:

10 g SDS (Sodyum Dodesilsülfat) 100 ml' ye distile su ile tamamlanmıştır.

1,5 M Tris (pH: 8.8):

9.075 g tris 50 ml'ye distile suyla tamamlanıp, pH'sı 5 M HCl ile pH: 8.8'e ayarlanmıştır.

1 M Tris (pH:6.8):

6,055 g tris 50'ml'ye distile suyla tamamlanıp, pH'sı 5 M HCl ile pH: 6.8'e ayarlanmıştır.

%10 Amonyum Persülfat:

1 g AMP (Amonyum Persülfat) 10 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

TEMED:

Hazır bulunan TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) kullanılmıştır.

Running Buffer (10x 500 ml için):

72 gr Glycin

% 10'luk SDS'den 25 ml

15,15 gr Tris-base

500 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Bu miktarlar fazla olduğu için 100 ml'lik hazırlanmıştır. Jel yürütülürken elektroforez tankına 1x running buffer konulduğu için 100 ml 10x hazırlanmış ve running buffer'a 900 ml distile su eklenip 1x 1 litre running buffer elde edilmiştir.

pH : yaklaşık 8.4 olmaktadır. İstenilen pH ise 8.3-8.4 arasındır.

Fiksatif Solüsyon:

Methanol 50 ml

Glacial acetic acid 75 ml

Su 530 ml

Boyama Solüsyonu:

1.25 g Brilliant Blue R (Coomassie Brilliant Blue R) tartılmış ve 500 ml fiksatif solüsyonunda çözülmüştür.

Destaining Buffer:

50 ml Methanol, 75 ml Glacial Acetic acid karıştırılıp üzerine 875 ml distile su eklenmiştir. Toplam hacim 1 lt olmaktadır.

Sample Buffer(2x SDS jel loading):

10 ml hazırlamak için:

<u>Stok:</u>	<u>Final:</u>	<u>Alınacak Miktar:</u>
1 M Tris-base (pH: 6.8 $M_A= 121.1$)	100 mM	1 ml
1 M DTT ($M_A= 154.2$)	200 mM	2 ml
%20 SDS	%4 SDS	2 ml
Brilliant Blue	% 0,2	Bir iğne ucu kadar
Glycerol % 100	% 20	2 ml

Hepsi 10 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

3.7.2 Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Yürüme jeli olarak %10'luk ve %12'lik konsantrasyonlarda iki jel tipi denenmiştir.

%10'luk 10 ml Yürüme jelinin hazırlanması;

H ₂ O	4.0 ml
%30 Akrilamid Mix	3.3 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

%12'lik 10 ml Yükleme Jelinin Hazırlanması:

H ₂ O	3.3 ml
%30 Akrilamid Mix	4ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

%5'lik 3 ml Yükleme jelinin hazırlanması:

H ₂ O	2.1 ml
%30 Akrilamid Mix	0.5 ml
1.0 M Tris (pH: 6.8)	0.38 ml
%10 SDS	0.03 ml
%10 Amonyum persülfat	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

Elektroforez Jel'inin Dökülmesi:

Hazırlanan %12 'lik yürütme jel'i 5 ml'lik pipetör ile elektroforez camları arasına yavaşça ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek dökülmüştür. Jel'in yüzeyinin düzgün olmasını sağlamak için pastör pipetiyle suyla doyurulmuş bütanol, jel yüzeyine damlatılmaktadır. Yaklaşık 15-20 dakika sonra jel donmakta ve jel yüzeyindeki bütanol kurutma kağıdı vasıtasıyla çekilmektedir.

%5'lik yükleme jel'i hazırlanmış ve ikinci jel üzerine dökülmüştür. Taraklar konulurken jel'in taşmasını önlemek için yukarıdan gerekli boşluk bırakılmıştır. Taraklar yükleme jel'ine yerleştirilmiştir. Yaklaşık 15-20 dakika sonra donan jel'den taraklar çıkarılmış ve oluşan kuyucuklar Hamilton şırınga yardımıyla 1X running buffer ile yıkanmıştır. Bu işlemden sonra kuyucuklar yüklemeye hazır hale gelmiştir.

3.7.3 Jel'de Yürütmek Üzere Protein Örneklerinin Hazırlanması

Elimizdeki protein örnekleri bire bir sample buffer (örnek tamponu) ile karıştırıldı. Marker'lar (Sığır Albumini; 66 kda., Yumurta Albumini; 45 kda., Pepsin; 34.7 kda., Tripsinojen; 24 kda., Lizozim; 14.3 kda.) prosedürleri gereği 10 µl alınarak kullanıldı. Marker ve örnekler ependorf tüpleri içinde 100 °C'lik su banyosunda 2-2.5 dakika bekletildi (proteinleri denatüre etmek için). Bu işlemden sonra ependorf'larda toplanan su buharını toplamak için 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Jel'deki kuyucuklara her örnekten 10'ar µl konulmuştur.

3.7.4 Elektroforez Aşamaları

Protein örnekleri yüklendikten sonra jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tankın içi yaklaşık 1 litre 1X running buffer ile doldurulmuş ve kapağı kapatılmıştır.

Güç kaynağı, ilk aşamada örnekler yükleme jelini geçene kadar 80 volt'a ayarlanmıştır. Örnekler yükleme jel'ini geçtikten sonra güç 120 volt'a yükseltilmiş ve örnekler jel sonuna gelene kadar bu voltaj uygulanmıştır.

Örnekler jel'in sonuna geldiğinde güç kaynağı kapatılmış ve kapak açılıp jel'in bulunduğu kısım çıkarılmıştır.

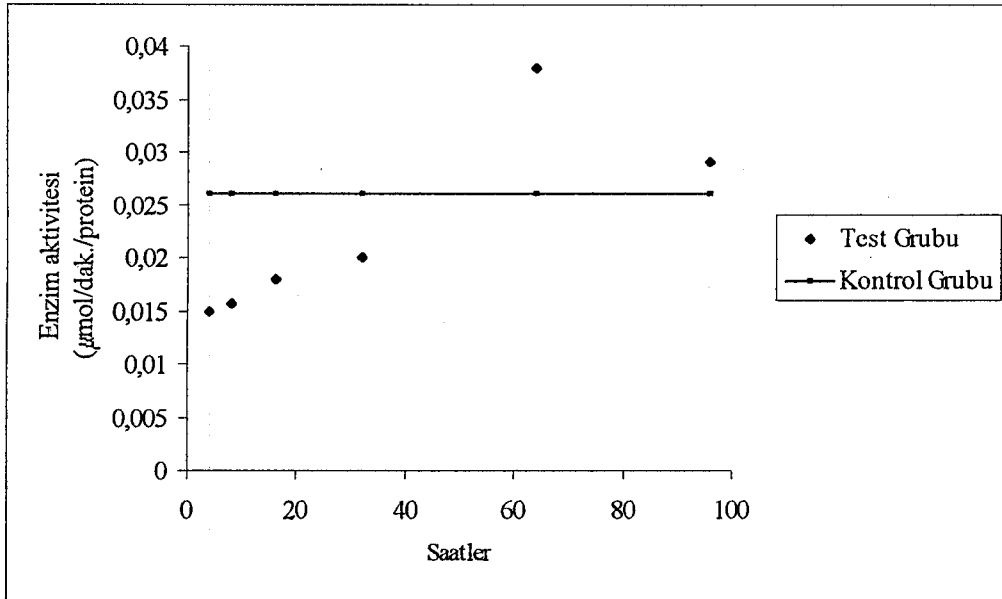
3.7.5 Jel'in Boyanması

Jel, yavaşça iki cam arasından çıkarılmıştır. Bu işlem sırasında eldivenler tank içindeki running buffer ile yıkanmıştır. Jel, dikkatlice boyama kabına yerleştirilmiş ve boya solüsyonu dökülmüştür. Jel yaklaşık 1-1.5 saat boyama solüsyonunda tutulmuştur. Boyama solüsyonu alındıktan sonra jel, destaining solüsyonuna konulmuş ve birkaç kere değiştirilerek bir gece tutulmuştur [56].

4. BULGULAR

4.1 *Gammarus pulex* Glutasyon Redüktaz Enziminin Kurşun Asetat'ın [EC₅₀] Konsantrasyonuna Karşı Değişen Zaman Aralıklarına Bağlı Aktivite Değişimi

Kurşun asetat'ın [EC₅₀] değeri uygulanmış *Gammarus pulex*'lerde glutasyon redüktaz aktivitesi, uygulamadan itibaren 4., 8., 16., 32., 64. ve 96. saatlerde ölçülmüş ve 0.-32. saatler arası kontrol grubuna göre düşük olan aktivitenin 32. ve 64. saatler arası yükseldiği ve 64. saatten sonra 96. saatler arası tekrar düşüş gösterdiği gözlenmiştir (şekil 4.1). Enzim aktivitesindeki değişimler sırasında canlı ölümlerinin 64. saatten sonra arttığı görülmüştür.



Şekil 4.1. *Gammarus pulex*'deki glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin kurşun asetatın [EC₅₀] konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı grafiği

Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örnekli t testinde değerlendirilmiştir (tablo 4.1).

Tablo 4.1 *G.pulex* glutatyon redüktazının kurşun asetatın [EC₅₀] konsantrasyonuna karşı değişen zaman aralıklarına bağlı aktivite değişiminin istatistiksel analizi

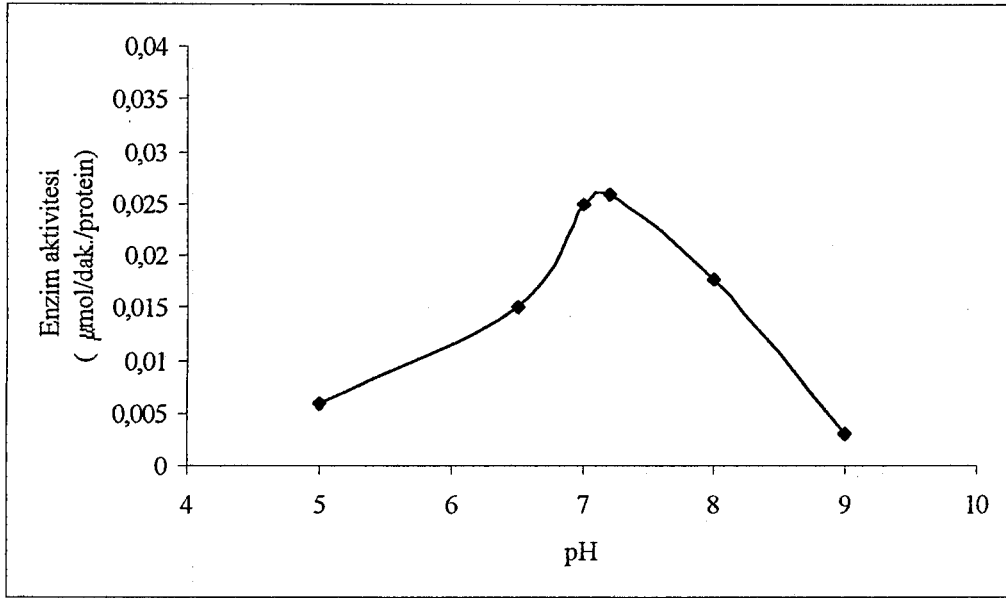
Zaman	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
4. Saat	10	0.02050* ±	0.00778	0.0055
8. Saat	10	0.02080 ±	0.00735	0.0052
16. Saat	10	0.02200 ±	0.00566	0.0040
32. Saat	10	0.02300 ±	0.00424	0.0030
64. Saat	10	0.03200 ±	0.00849	0.0060
96. Saat	10	0.02750 ±	0.00212	0.0015

MINITAB release 11.22 istatistik programında %95 güvenirlikte $P < 0.5$ olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur (* $\mu\text{mol/dak./protein}$).

4.2 *Gammarus pulex* Glutasyon Redüktaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Saptanması

4.2.1 Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

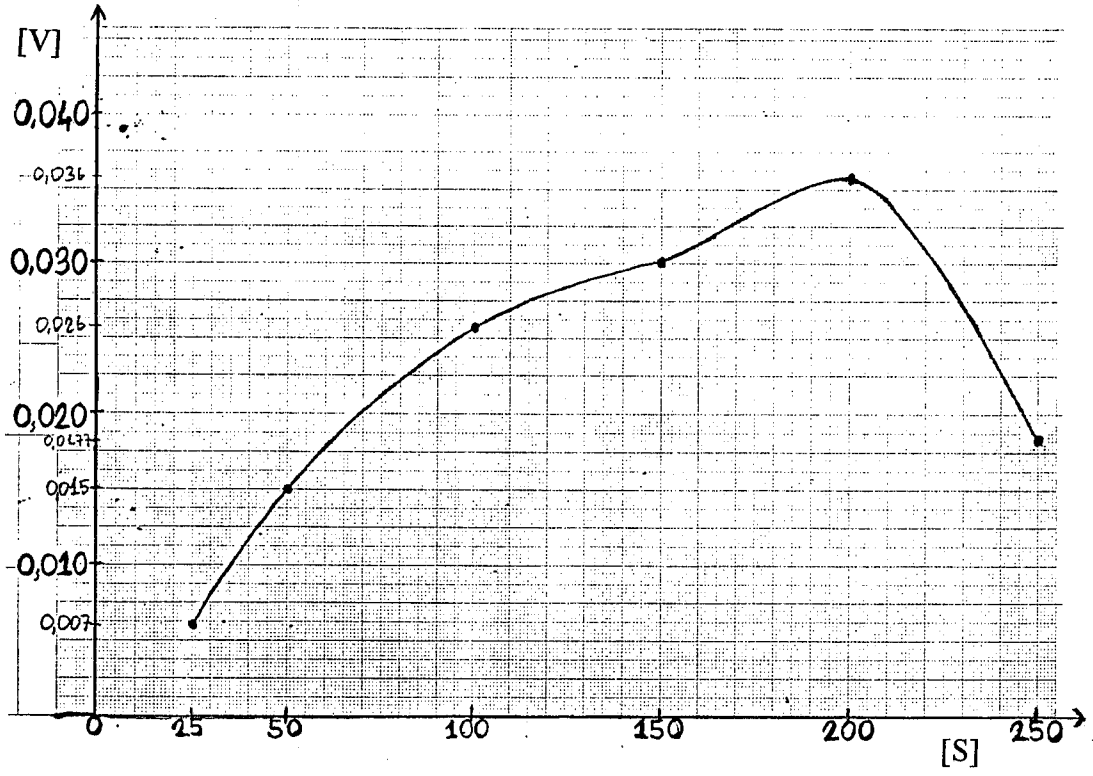
Farklı pH'ların *Gammarus pulex* enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için pH'ları 5.0, 6.5, 7.0, 7.2, 8.0 ve 9.0 olan potasyum fosfat tamponları kullanılmıştır. Denenen bu pH'larda en yüksek aktiviteye pH 7.0-7.2'de rastlanmıştır (şekil 4.2).



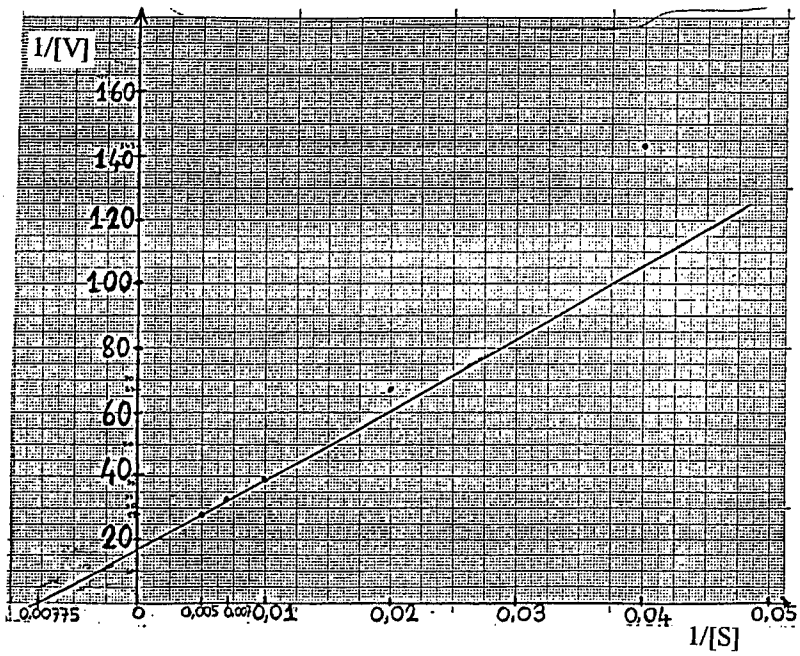
Şekil 4.2. *Gammarus pulex* glutasyon redüktaz enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi

4.2.2 GSSGr Enzim Aktivitesinin Kinetik Analizi ve K_m Değerinin Bulunması

Gammarus pulex glutasyon redüktazının K_m değerini saptamak amacı ile değişen substrat konsantrasyonlarına karşı enzim aktivitesine bakılmıştır. Enzimin Michaelis-Menten hız grafiği (şekil 4.3) ve Line-Weaver Burke (şekil 4.4) grafiği çizilmiş ve K_m değeri 129,03 µM olarak bulunmuştur (şekil 4.4).



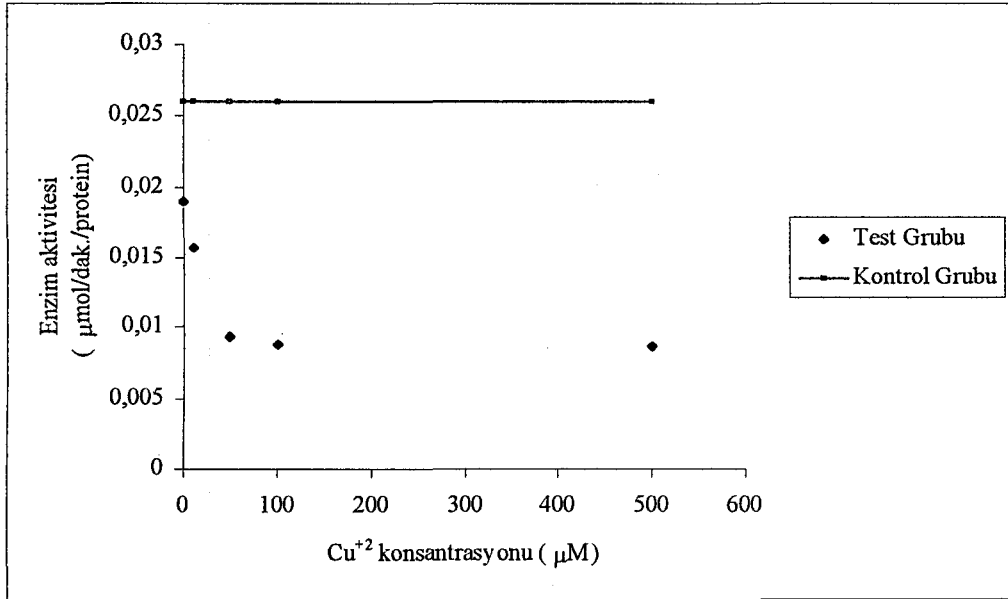
Şekil 4.3. *Gammarus pulex* glutatyon redüktazının Michaelis-Menten hız grafiği



Şekil 4.4. *Gammarus pulex* glutatyon redüktazının Line-Weaver Burke grafiği

4.2.3 *Gammarus pulex* GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Cu^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Cu^{+2} iyonlarının etkisini araştırmak amacıyla farklı CuCl_2 konsantrasyonlarında (1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 500 μM) aktiviteye bakılmıştır. Cu^{+2} 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* GSSGr enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre aktivitede azalma gözlenmiştir (şekil 4.5). Enzim aktivitesinin CuCl_2 'nin 500 μM 'lık konsantrasyonda yaklaşık % 66,9 oranında azaldığı tespit edilmiştir.



şekil 4.5. Cu^{+2} iyonu için *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz aktivitesi

Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örneklı t testinde değerlendirilmiştir (tablo 4.2).

Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Cu^{+2} iyonlarının *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

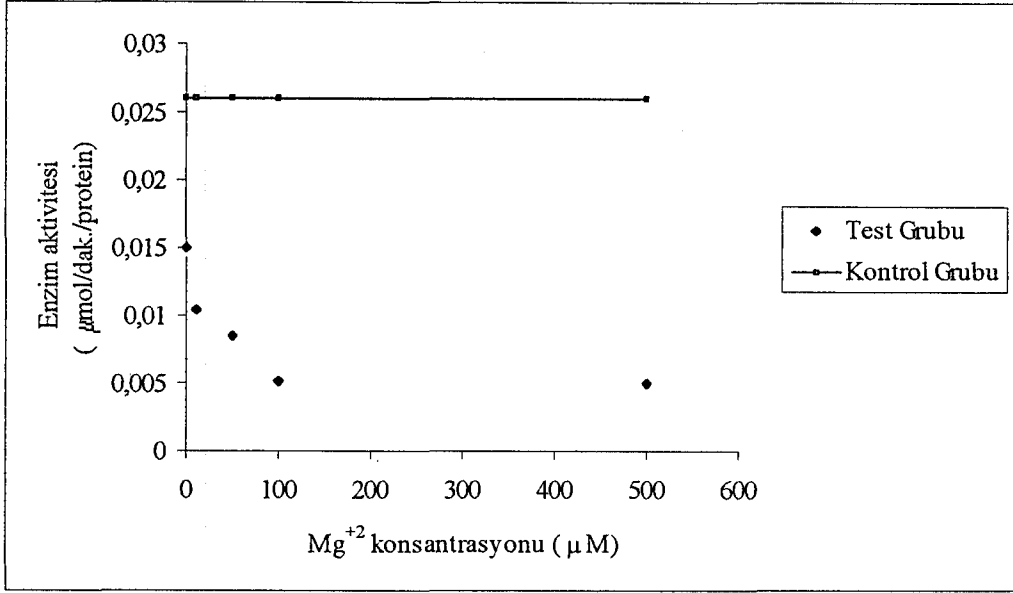
İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
1 μM	5	0.02250* \pm	0.00495	0.0035
10 μM	5	0.02085 \pm	0.00728	0.0052
50 μM	5	0.0177 \pm	0.0118	0.0084
100 μM	5	0.0174 \pm	0.0122	0.0086
500 μM	5	0.0173 \pm	0.0123	0.0087

MINITAB release 11.22 istatistik programında %95 güvenirlilikte $P < 0.5$ olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur (* $\mu\text{mol/dak./protein}$).

4.2.4 *Gammarus pulex* GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Mg^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Mg^{+2} iyonlarının etkisini araştırmak amacıyla farklı MgCl_2 konsantrasyonlarında (1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 500 μM) aktiviteye bakılmıştır. Mg^{+2} 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* GSSGr enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre azalma

gözenmiştir (Şekil 4.6). Enzim aktivitesinin 500 μM 'lık MgCl_2 konsantrasyonunda yaklaşık % 80,8 oranında azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Mg^{+2} iyonu için *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz aktivitesi

Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örnekle t testinde değerlendirilmiştir (tablo 4.3).

Tablo 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Mg^{+2} iyonlarının *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
1 μM	5	0.02050* \pm	0.00778	0.0055

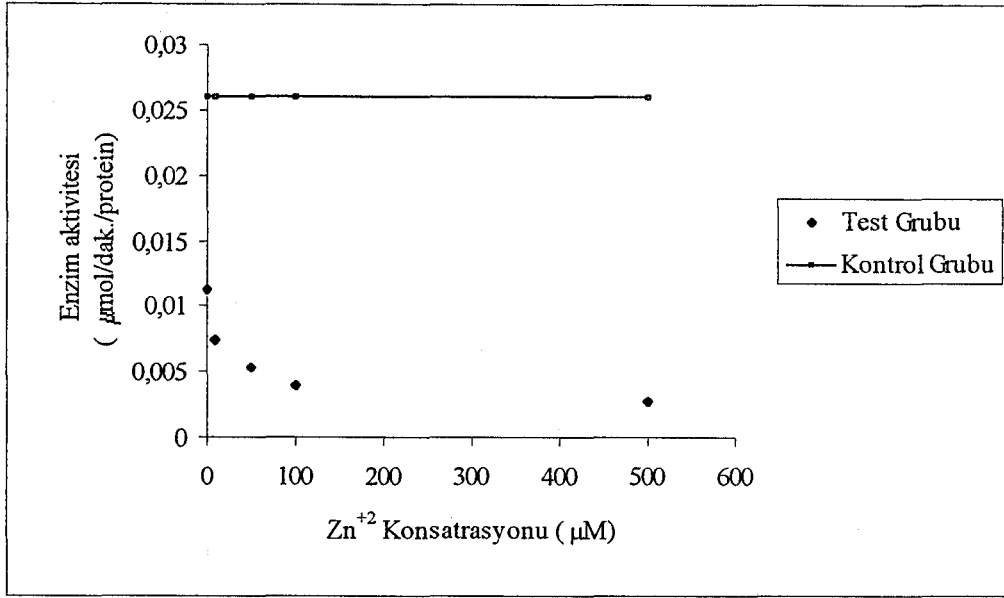
Tablo 4.3. (Devam) Farklı konsantrasyonlardaki Mg^{+2} iyonlarının *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
10 μ M	5	0.0183 \pm	0.0110	0.0078
50 μ M	5	0.0172 \pm	0.0124	0.0087
100 μ M	5	0.0156 \pm	0.0147	0.010
500 μ M	5	0.0155 \pm	0.0148	0.010

MINITAB release 11.22 istatistik programında %95 güvenirlikte $P < 0.5$ olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur (* μ mol/dak./protein).

4.2.5 *Gammarus pulex* GSSGr Enzim Aktivitesi Üzerine Zn^{+2} İyonlarının Etkisi

Gammarus pulex glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine Zn^{+2} iyonlarının etkisini araştırmak amacıyla farklı $ZnCl_2$ konsantrasyonlarında (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 500 μ M) aktiviteye bakılmıştır. Zn^{+2} 'nin konsantrasyonu arttıkça *Gammarus pulex* GSSGr enzim aktivitesinde kontrol gruplarına göre azalma gözlenmiştir (Şekil 4.7). Enzim aktivitesinin 500 μ M'lık $ZnCl_2$ konsantrasyonda yaklaşık %89,2 oranında azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Zn²⁺ iyonu için *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz aktivitesi

Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örnekle t testinde değerlendirilmiştir (tablo 4.4).

Tablo 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki Zn²⁺ iyonlarının *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
1µM	5	0.0186* ±	0.0105	0.0074

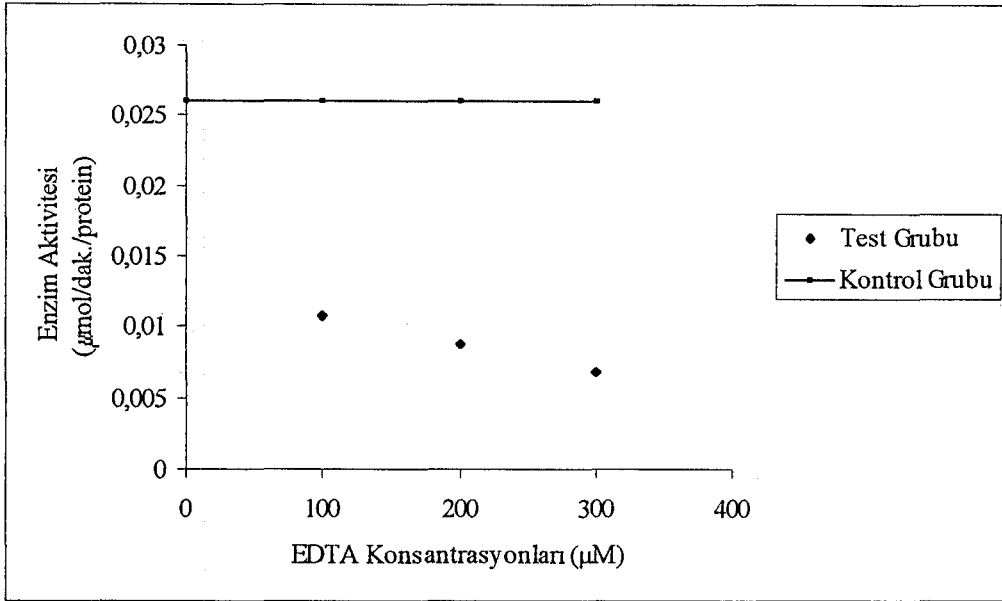
Tablo 4.4. (Devam) Farklı konsantrasyonlardaki Zn^{+2} iyonlarının *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
10 μ M	5	0.0167	\pm 0.0132	0.0093
50 μ M	5	0.0157	\pm 0.0146	0.010
100 μ M	5	0.0150	\pm 0.0156	0.011
500 μ M	5	0.0144	\pm 0.0164	0.012

MINITAB release 11.22 istatistik programında %95 güvenirlkte $P < 0.5$ olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur (* μ mol/dak./protein).

4.2.6 EDTA'ya Duyarlılık Açısından *Gammarus pulex* GSSGr Enzim Aktivitesi

Kelatlayıcı bir ajan olan EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)'ya karşı [2] *Gammarus pulex* GSSGr enzim aktivitesini belirlemek amacıyla farklı EDTA konsantrasyonları (100 μ M, 200 μ M ve 300 μ M) kullanılmıştır. *Gammarus pulex* GSSGr enziminin aktivitesinin; 100 μ M'lık EDTA konsantrasyonunda yaklaşık %59,5 , 200 μ M'lık konsantrasyonda % 66,1 , 300 μ M'lık konsantrasyonda %73,9 oranında azaldığı gözlenmiştir (şekil 4.8).



Şekil 4.8 Farklı EDTA konsantrasyonlarının *Gammarus pulex* GSSGr aktivitesi üzerine etkisi

Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örnekli t testinde değerlendirilmiştir (tablo 4.5).

Tablo 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki EDTA'nın *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
100µM	5	0.0184* ±	0.0107	0.0076

Tablo 4.5. (Devam) Farklı konsantrasyonlardaki EDTA'nın *G.pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel analizi

İyon Konsantrasyonu	Örnek Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın Standart Hatası
200 μ M	5	0.0174 \pm	0.0122	0.0086
300 μ M	5	0.0164 \pm	0.0136	0.0096

MINITAB release 11.22 istatistik programında %95 güvenirlilikte $P < 0.5$ olduğu için sonuçlar anlamlı bulunmuştur (* μ mol/dak./protein).

4.3 Fiber Polimerlerle *Gammarus pulex* GSSGr Enziminin Affinite Etkileşimleri

Gammarus pulex'lerden hazırlanan homojenatlarının santrifüj işleminden sonra süpernatant kısımlarının Sigma Diagnostics Protein Assay Kit (P 5656) kullanılarak total protein miktarına bakılmıştır (tablo 4.6).

Tablo 4.6. Fiberlerle muamele edilmeden önce süpernatantlardaki protein miktarları

Muamele edilmemiş süpernatantların protein miktarı	1. Tüp (Cibacron Blue F3GA)	3. Tüp (Alizarin-P(HEMA))
Proteinin μ g /ml cinsinden değeri	110 μ g /ml	128 μ g /ml

Süpernatantların Cibacron Blue F3GA takılı fiber polimer [55] ve Alizarin takılı P(HEMA) mikrokürelerle muamelesinden sonra süpernatant kısmının toplam protein miktarına bakılmıştır (tablo 4.7).

Tablo 4.7. İki farklı fiber ile muamele edilmiş süpernatantlardaki toplam protein miktarları

Muamele edilmiş süpernatantların protein miktarı	1. Tüp (Cibacron Blue F3GA)	3. Tüp (Alizarin-P(HEMA))
Proteinin $\mu\text{g}/\text{ml}$ cinsinden değeri	104 $\mu\text{g}/\text{ml}$	102 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Süpernatantlardan ayrılan proteini absorblamış fiberlere uygulanan resorbsiyon işleminden sonra farklı 2 fiber'in tuttuğu protein miktarlarına bakılmıştır (tablo 4.8).

Tablo 4.8. Süpernatantlardan ayrılan fiberlerin, resorbsiyondan sonra tuttıkları protein miktarları

Resorbsiyon sonrası protein miktarı	1. Tüp (Cibacron Blue F3GA)	3. Tüp (Alizarin-P(HEMA))
Proteinin $\mu\text{g}/\text{ml}$ cinsinden değeri	18 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

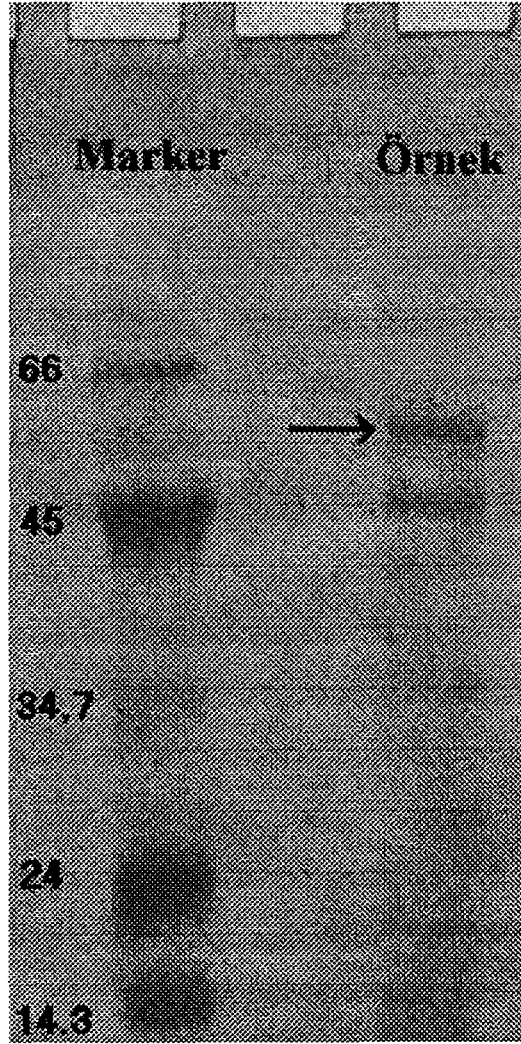
Resorbsiyondan sonra GSSGr enzim aktivitesine bakılmış ve kayda değer bulunmamıştır.

4.4 Jel Filtrasyon Sonrası GSSGr Enzim Aktivitesi

Jel filtrasyonu işleminden sonra *Gammarus pulex* GSSGr enzim aktivitesi ölçülmüş ve aktivitenin % 59,6 oranında arttığı gözlenmiştir.

4.5 *Gammarus pulex* GSSGr Enziminin SDS-PAGE Kullanılarak Molekül Ağırlığının Hesaplanması

Jel filtrasyon işlemi sonucu elde edilen enzim %12'lik SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 56-58 kDa. olarak bulunmuştur (şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Gammarus pulex* glutatyon redüktazının SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada ağır bir metal olan kurşunun sucul canlılar üzerindeki toksisitesi ve glutasyon redüktaz (GSSGr) enzimi aktivitesindeki değişimler incelenmiş; Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} gibi iyonların ve EDTA'nın bu enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca çalışmamızda test organizması olarak seçilen ve su kirliliğinin ölçülmesinde indikatör olarak kullanılan *Gammarus pulex*'deki Glutasyon redüktaz enziminin biyokimyasal özellikleri ve kinetik analizi yapılmış, enzimin molekül ağırlığı SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle saptanmıştır.

Sucul canlıların, ortamlarına bulaşan toksik maddeleri detoksifikasyona uğratarak yaşamlarına devam etmelerini sağlayan detoksifikasyon mekanizmasında glutasyon redüktaz enzimi önemli bir rol oynamaktadır. Toksik madde içeren ortamlarda bu toksik maddeyi detoksifiye eden redükte glutasyonun (GSH), detoksifikasyon reaksiyonundan sonra okside glutatyona (GSSG) dönüştüğü bilinmektedir. Hücredeki toksik maddeleri etkisiz hale getirmek için gerekli GSH, glutasyon redüktaz enzimi tarafından oluşturulmaktadır. Enzim GSSG ile reaksiyona girerek onu GSH'a dönüştürmektedir.

Çalışmamızda, *Gammarus pulex*'lere kurşunun EC_{50} değerleri 4, 8, 16, 32, 64 ve 96 saat'lik periyotlar halinde uygulanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 4-32 saatler arası glutasyon redüktazın ortalama %20 azalan enzim aktivitesinin 64. saate ulaşıldığında %46 oranında artış gösterdiği görülmüş, 96. saat sonunda aktivitenin 64. saate göre %35 oranında düştüğü tespit edilmiştir. 64. saatten sonra görülen canlı ölümlerinin nedeni deney süresince canlılara besin verilmemesi sonucu düşük dirençli bireylere bağlanabilir. Elde edilen veriler MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örneklili t testinde test edilmiş ve anlamlı ($P < 0.5$) bulunmuştur.

Fas çekirgesinde (*Dociostraurus maroccanus*) yapılan bir çalışmada; glutasyon redüktaz enziminin nimfal dönemler arasında büyük bir aktivasyon dalgalanması gösterdiği tespit edilmiştir. Tarım ilaçlarının etkisine karşı, erginlerin redükte

glutasyon ihtiyacından dolayı ergin çekirgelerde bu enzimin aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [31].

Toprak solucanında (*Eisenia fetida andrei*) farklı konsantrasyonlardaki kurşunun etkileri araştırılmış, kurşunun hareket mekanizması üzerine ortaya çıkan yöntemler açıklanmıştır. Kurşunun toprak solucanı glutasyon redüktaz enzimi üzerine etkisi incelenmiş ve enzim aktivitesinde önemli azalma gözlenmiştir [15].

Ağır metallere maruz kalan insan, fare ve balıklarda glutasyon veya glutasyon redüktaz aktivitesinde anlamlı artış saptanmıştır [15].

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı maddelerin örneğin farede, çeşitli dozlarda verilen askorbik asitin antioksidant savunma sistemine etkileri araştırılmış ve karaciğer glutasyon redüktazının kontrol gruplarına göre diğer tüm deney gruplarında artış gösterdiği tespit edilmiştir [57].

Chrysin, quercetin ve genistein gibi flavonoidlerin dişi fare kan hücrelerindeki antioksidant enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve glutasyon redüktaz enziminde önemli bir azalmaya neden oldukları görülmüştür [58].

Eritrositlerde uzun süreli submaximal egzersiz süresince bazı antioksidant enzimlerin aktiviteleri incelenmiş ve glutasyon peroksidaz enziminde aktivite artışı gözlenirken, glutasyon redüktaz ve katalaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir [59].

Bitki ve hayvanlarda, ağır metallerin oluşturduğu toksisitenin başlıca nedeni oksidatif strestir. Bitkilerde Cd'un neden olduğu oksidatif stres hasarı glutasyon redüktaz aracılığıyla redüklenmiş ve glutasyon redüktaz aktivitesinin oksidatif stresi yavaşlattığı görülmüştür [23].

İnsan göğsünde ve fare meme bezlerinin prenoplastik ve neoplastik dokularında glutasyon redüktaz aktivitesi, diğer dokularla karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Meme kanserinde glutasyon redüktazın artmasının nedeninin, GSH tükendiğinde enzimin aktivitesinin artarak bu duruma uyumsal bir yanıt vermesi olduğu düşünülmektedir [27].

Ratlarda yapılan bir çalışmada deney hayvanlarının 300 rad (gamma radyasyonu) ile ışınlanmasından sonra elde edilen glutasyon redüktaz aktivitesi, kontrol değerine göre anlamlı derecede azalma göstermiş, hayvanların 450 rad

radyasyon ile ışınlanması sonucu glutatyon redüktaz aktivitesinin sıfıncı ve beşinci günde kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Glutatyon redüktaz aktivitesinde görülen belirgin azalma, enzimin protein yapısındaki ve aktif merkezindeki sülfidril gruplarının, radyasyonun etkisi ile oluşan süperoksit ve hidroksil radikalleri ile inaktivasyonuna bağlanmaktadır [10].

Hücre içi redükte glutatyonun iki kaynaktan geldiği bilinmektedir. Bunlardan birincisi eritrositlerdeki aminoasitlerden normal GSH sentezi iledir. Diğeri ise glutatyon redüktazın katalizlediği tepkime sonucu indirgenen okside glutatyondur. Glutatyon redüktaz aktivitesinin deneyde kullanılan doz ile büyük oranda azalmasına rağmen, redükte glutatyon (GSH) miktarının anlamlı değişiklik göstermemesinin GSH'ın birinci kaynağını oluşturan GSH sentezi olduğu tahmin edilmektedir [60].

Çalışmamızda *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enziminin optimum pH'sı 7.0-7.2 arasında bulunmuştur. Başka bir çalışmada sıçan glutatyon redüktazı için optimum pH: 7.0 olarak saptanmıştır [42]. *Chlamydomonas reinhardtii*'de glutatyon redüktaz aktivitesi 49 °C'de ve pH: 8,2'de maksimum bulunmuştur. pH: 4,8 - 8,2 aralığında GSH ve NAD(P)⁺ ile geri dönüşüm reaksiyonu gözlenmemiştir [9].

G. pulex'de glutatyon redüktaz'ın farklı substrat konsantrasyonlarına göre K_m değeri 129,03 µM olarak bulunmuştur. Yine *Chlamydomonas reinhardtii*'de yapılan bir çalışmada NADPH ve GSSG için Glutatyon redüktaz enziminin K_m değerleri sırasıyla 10,6 µM ve 54,1 µM olarak tespit edilmiştir [9].

Bakırın *Gammarus* türleri üzerine letal etkileri ve bakırın birikmesiyle ilgili metabolik yol veya mekanizması hakkında bilinenler çok azdır [14]. Çalışmamızda *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin Cu⁺²'nin 500 µM'lık konsantrasyonunda yaklaşık % 66,9 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Takeda'ya [9] göre Cu⁺² gibi belli metal iyonlarının glutatyon redüktaz enzim aktivitesini inhibe ettikleri bilinmektedir [9].

Yine çalışmamızda 500 µM'lık Mg⁺² iyonlarının *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesini yaklaşık % 80,8 oranında azalttığı, 500 µM'lık Zn⁺² iyonlarının da enzim aktivitesini %89,2 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Deneylerimizde elde ettiğimiz sonuçlar MINITAB release 11.22 istatistik

programında bağımsız iki örnekle t testinde test edilmiş ve anlamlı ($P < 0.5$) bulunmuştur. Bu iyonların aktiviteyi düşürme etkisi sırasıyla $Zn^{+2} > Mg^{+2} > Cu^{+2}$ olarak tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada deniz omurgasızlarından *Idotea baltica* (Crustacea, Isopoda) kullanılarak çinko, bakır ve kurşunun akut toksisitesi statik biyolojik deneylerle ölçülmüş ve çinkonun bakır ve kurşundan daha toksik olduğu anlaşılmıştır. Denenen bu metallere en az toksik olanı ise kurşun olarak tespit edilmiştir [4].

Üç metal tuzunun ve N-trityl-morpholine (Triphenmorph)'in etkileri, iki akuatik amfipod türü (*Gammarus pulex* ve *Echinogammarus berilloni*) üzerinde çalışılmıştır. LC_{50} 'nin belirlenmesi için eukalsik ve oligokalsik sularda yapılan deneylerde; eukalsik sularda toksisite durumu her iki tür için benzer bulunmuştur ($Triphenmorph > Cu^{+2} > Zn^{+2} > Ba^{+2}$). Oligokalsik sularda *Gammarus pulex* için $CuCl_2$ 'ün Triphenmorph'tan daha toksik olduğu görülmüştür [61].

Kabuklulardan (Crustacea) *Gammarus pulex*'in gençlik evresi (2. veya 3. kabuk değiştirme) ve böceklerden (Insecta) *Chironomus riparius*'un 2. larval evresi için; dört çevresel kirleticinin (3,4-dichloroaniline (DCA), atrazine, bakır ve lindane) letal toksisitesi belirlenmiştir. Ortalama letal konsantrasyonlar (LC_{50}) 240 saatlik test periyodunda araştırılmıştır. Test kimyasallarının toksisitesinin düzenlenmesi her bir tür için farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *Gammarus pulex* için düzenlenen 96 saatlik çalışmada bakır ve lindane'ın, DCA ve atrazine'den daha fazla toksik olduğu gösterilmiştir [6].

Sinop yarımadasında yaşayan Amphipod *Echinogammarus olivii*, Isopod *Sphaeroma serratum* ve Dekapod *Palaemon elegans* üzerinde Zn^{+2} , Cu^{+2} ve kurşun için akut toksisite testleri yapılmış ve *E. olivii*'nin bu metallere *S. serratum* ve *P. elegans*'lara göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir [5].

Bu farklı canlılar üzerinde yapılan çalışmalarda metal toksisitesi oranlarındaki farklılıklar, canlılardaki glutatyon redüktaz enziminin farklı özelliklerde ve farklı yapılar da olabileceğine dair bize fikir vermektedir.

Çalışmamıza ek olarak kelatlayıcı bir ajan olan EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)'nın *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesine üzerine etkisi incelenmiştir. Kutlu'ya [2] göre gerek *Gammarus spp.* gerekse rat karaciğer ALAD (γ -Aminolevulinik asit dehidrataz)'nın EDTA tarafından önemli ölçüde inhibe olduğu bulunmuştur. *Gammarus spp.*'daki inhibisyon (%52), rat karaciğerindeki inhibisyona (%94) göre daha az olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin 100 μ M'lık EDTA konsantrasyonunda yaklaşık %59,5 , 200 μ M'lık konsantrasyonda % 66,1 , 300 μ M'lık konsantrasyonda %73,9 oranında azaldığı gözlenmiştir. Deney sonuçları MINITAB release 11.22 istatistik programında bağımsız iki örneklili t testinde test edilmiş ve anlamlı ($P < 0.5$) bulunmuştur.

Çalışmamızda *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enziminin pürifikasyonu için iki farklı method denenmiştir. Bu methodlardan ilki, Cibacron Blue F3GA takılı fiber polimer ve Alizarin takılı P(HEMA) mikrokürelerle affinite etkileşimiyle pürifikasyon yöntemidir. Buna benzer bir çalışmada *Methylophilus spp.'de*, hidroksipürivat redüktaz enzimi ile Cibacron blue F3GA-türevli poly (HEMA EGDMA) affinite etkileşimi araştırılmış, enzimin pürifikasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır [55]. Çalışmamız sonucunda elde edilen enzim pürifikasyon metodunun glutatyon redüktaz enzimine uygun olmadığı saptanmıştır. Fakat polimerler ve enzim etkileşimi için daha uygun ortam arayışıyla ileride bu yöntemin kullanılabilmesi sinyalleri alınmıştır. Bu polimerlerden Alizarin takılı P(HEMA)'in Cibacron Blue F3GA takılı fiber polimer'e göre daha duyarlı olduğu ve yaklaşık 2 kat fazla protein absorbe ettiği gözlenmiştir.

Kullandığımız ikinci method jel filtrasyon yöntemi olup, jel filtrasyonu işleminden sonra *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enzim aktivitesi ölçülmüş ve aktivitenin kontrol grubuna göre % 159,6 oranında yaklaşık 2 katı kadar aktivite artışı gözlenmiştir. Jel filtrasyon işlemi sonucu elde edilen enzim %12'lik SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülmüş ve elektroforez sonucunda *Gammarus pulex* glutatyon redüktaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 56-58 kda. olarak bulunmuştur.

Glutasyon redüktaz enziminin *C. reinhardtii*'de jel filtrasyonu ve SDS-PAGE sonucuna göre 54-56 kda. moleküler ağırlıkta bir monomer olduğu saptanmıştır [9]. Nordhoff ve arkadaşlarına göre [28], glutasyon redüktaz geometrisi bilinen bir homodimerik flavoenzimdir. Enzimin her bir alt ünitesinin, kaynağı bilinen dört bölge içerdiği ve aktif bölgeye gerekli yan gruplar (residular) katıldığı görülmektedir. Bu nedenle monomerin inaktif olması beklenmektedir.

Yine Nordhoff ve arkadaşlarına göre[28], homodimerik enzimin alt üniteleri, Cys90-Cys90' disülfid köprüleriyle çapraz bağlanmaktadır. Her alt ünite, bir flexible N-terminal uç (1-18. yan gruplar); FAD bağlanma bölgesi (19-157), NADPH bölgesi (158-293), merkez bölge (294-264) ve alt ünite ara yüzey bölge gibi kaynağı bilinen dört yapısal bölge içermektedir. Her iki alt üniteden yan grupların oluşturduğu substrat (GSSG) bağlanma bölgesi ve katalitik bölge olmadan glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin olanaksız olduğu tespit edilmiştir [28].

Sonuç olarak, sucul kirlenmenin ölçülmesinde indikatör olarak bilinen *Gammarus pulex*'in toksik maddelerin detoksifikasyonunda rol oynayan glutasyon redüktaz enziminin biyokimyasal özellikleri genel olarak araştırılmıştır. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerden kurşunun, bazı metal iyonlarının (Cu^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2}) ve EDTA'nın etkisi araştırılmış ve ayrıca *Gammarus pulex* glutasyon redüktaz enziminin molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaya ilave olarak, ileride farklı sucul ortamların kirliliğinin tespit edilmesinde *Gammarus pulex*'in göz önüne alınması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. VARGAS, V.M.F., MIGLIAVACCA, S.B., DE MELO, A.C., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., SA FERREIRA, I.C.F.D. ve PESTANA, M.H.D., *Genotoxicity Assessment in Aquatic Environments Under the Influence of Heavy Metals and Organic Contaminants*, Mutation Research 490, 141-158, 2001.
2. KUTLU, H.M., *Gammarus spp. γ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz Enziminin Kurşun ile Olan İnhibisyonu ve Bazı Biyokimyasal Özellikleri*, Doktora Tezi, Osmangazi Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1996.
3. KUTLU, H.M. ve SÜMER, S., *Effects of Lead on the Activity of γ -Aminolevulinic Acid Dehydratase in Gammarus pulex*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 816-821, 1998.
4. BAT, L., SEZGİN, M., GÜNDOĞDU, A. ve ÇULHA, M., *Toxicity of Zinc, Copper and Lead to Idotea baltica (Crustacea, Isopoda)*, Tr. J. of Biology, Tübitak, 23., 465-472, 1999-a.
5. BAT, L., GÜNDOĞDU, A., SEZGİN, M., ÇULHA, M., GÖNLÜGÜR, G. ve AKBULUT, M., *Acute Toxicity of Zinc, Copper and Lead to There Species of Marine Organisms from the Sinop Peninsula, Black Sea*, Tr. J. Biology, Tübitak, 23., 537-544, 1999-b.
6. TAYLOR, E. J., MAUND, S. J. ve PASCOE, D., *Toxicity of Four Common Pollutants to the Freshwater Macroinvertebrates Chironomus riparius Meigen (Insecta:Diptera) and Gammarus pulex (L.) (Crustacea:Amphipoda)*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 371-376, 1991.

7. MARVIN, B. ve DUVEL, D. L., *Characterization of the Inhibition of Glutathione Reductase and the Recovery of Enzyme Activity in Exponentially Growing Murine leukemia (L1210) Cells Treated With 1,3-Bis (2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea*, *Biochemical Pharmacology*, 37, 17, 3317-3320, 1988.
8. ADAMS, J. D., BERNHARD, J.R., LAUTERBURG, H. ve MITCHELL J.R., *Plasma Glutathione and Glutathione Disulfide in the Rat: Regulation and Response to Oxidative Stress*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 227, 3, 749-754, 1983.
9. TAKEDA, T., ISHIKAWA, T., SHIGEOKA, S., HIRAYAMA, O. ve MITSUNAGA, T., *Purification and Characterization of Glutathione Reductase from Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of General Microbiology*, 139, 2233-2238, 1993.
10. ERDEN, M., *Radyasyonun Bazı Eritrosit Enzimlerine Etkisi*, *Doğa-Tr. J. of Medical Sciences*, Tübitak, 16, 55-66, 1992.
11. STOLL, V.S., SIMPSON, S.J., KRAUTH-SIEGEL, R.L., WALS, C.T. ve PAI, E.F., *Glutathione Reductase Turned into Trypanothione Reductase: Structural Analysis of an Engineered Change in Substrate Specificity*, *Biochemistry*, American Chemical Society, 36, 6437-6447, 1997.
12. VURAL, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Ecz. Fak., 315-323, 1984.
13. KARAGÜZEL, A., *Kızılkant Sazan Balıklarının Organ ve Dokularında Kurşun 210'unun Dağılımı ve Birkimi*, *Doğa Dergisi* 8., 3-352-356, 1984.
14. GÜVEN, K., ÖZBAY, C., ÜNLÜ, E. ve SATAR, A., *Acute Lethal Toxicity and Accumulation of Copper in Gammarus pulex (L.)(Amphipoda)*, *Tr. J. Biology*, Tübitak, 23., 513-521, 1999.

15. SAINT-DENIS, M., NARBONNE, J.F., ARNAUD, C. ve RIBERA, D., *Biochemical Responses of The Earthworm Eisenia fetida andrei Exposed to Contaminated Artificial Soil: Effects of Lead Acetate*, *Soil Biology & Biochemistry* 33., 395-404, 2001.
16. MALINS, D.C., *Perspectives in Aquatic Toxicology*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 371-399, 1991.
17. ARTHUR, J.W., *Review of Freshwater Bioassay Procedure for Selected Amphipods*, ASTM STP 715, A.L., 98-108, 1980.
18. GRANEY, L.R., *Effects of Long Term Exposure to Pentochlorophenol on the Free Amino Acid Pool and Energy Reserves of the Freshwater Amphipod Gammarus pseudolimnaeus, Bousfield (Crustacea, Amphipoda)*, *Ecotox and Environ Safety* 12, 233-251, 1986.
19. LAWS, A.E., *Aquatic Pollution an Introductory Text*, 1993.
20. CRANE, E.J., VERVOORT, J. ve CLAIBORNE, A., *C NMR Analysis of the Cysteine-Sulfenic Acid Redox Center of Enterococcal NADH Peroxidase*, *Biochemistry*, 36, 8611-8618, 1997.
21. CLAIBORNE, A., YEH, J.I., MALLET, T.C., LUBA, J., CRANE, E.J., CHARRIER, V. ve PARSONAGE, D., *Protein-Sulfenic Acids: Diverse Roles for an Unlikely Player in Enzyme Catalysis and Redox Regulation*, *Biochemistry*, 38, 15407-15416, American Chemical Society, 1999.
22. VAN DEN BERG, P.A.W., HOEK, A.V., WALENTAS, C.D., PERHAM, R.N. ve VISSER, A.J.W.G., *Flavin Fluorescence Dynamics and Photoinduced Electron Transfer in Escherichia coli Glutathione Reductase*, *Biophysical Journal*, 74, 2046-2058, 1998.

23. PILON-SMITS, E.A.H., ZHU, Y.L., SEARS, T. ve TERRY, N., *Overexpression of Glutathione Reductase in Brassica Juncea: Effects on Cadmium Accumulation and Tolerance*, *Physiologia Plantarum*, 110. (4), 455-460, Munksgaard, 2000.
24. HORN, H.D., *Glutathione Reductase*, Measurement of Enzyme Activity, Section C, 875-879, 1962.
25. VISSER, A.J.W.G., VAN DEN BERG, P.A.W., VISSER, N.V., HOEK, A.V., VAN DER BURG, H.A., PARSONAGE, D. ve CLAIBORNE, A., *Time-Resolved Fluorescence of Flavin Adenin Dinucleotide in Wild-Type and Mutant NADH Peroxidase. Elucidation of Quenching Sites and Discovery of a New Fluorescence Depolarization Mechanism*, *J. Phy. Chem. B* , 102., American Chemical Society, 10431-10439, 1998.
26. MUSTACICH, D. ve POWIS, G., *Thioredoxin reductase*, *Biochemical Society*, 346., 1-8, 2000.
27. ILIO, C. D., SACCHETTA, P., BOCCIO, G. D., ROVERE, G. L. ve FEDERICI, G., *Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase and Glutathione Reductase Activities in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., *Cancer Letter*, 29, 37-42, 1985.
28. NORDHOFF, A., BUCHELER, U. S., WERNER, D. ve SCHIRMER, R. H., *Folding of the Four Domeins and Dimerization are Impaired by the Gly446→Glu Exchange in Human Glutathione Reductase. Implications for the Desing of Antiparasitic Drugs*, American Chemical Society, *Biochemistry*, 32, 4060-4066, 1993.

29. LEISTER, B. ve PERHAM, R.N., *Solubilizing Buried Domains of Proteins: A Self-Assembling Interface Domain from Glutathione Reductase*, American Chemical Society, *Biochemistry*, 33, 2773-2781, 1994.
30. STRYER, L., *Biochemistry*, International Student Edition W.H. Freeman and Company, Newyork, 436-438, 1988.
31. ÖZKAN, A., GÜNDÜZ, G., ÇIPLAK, B. ve KIŞKIN, K., *Kimyasal Mücadele Uygulanmış Dociostaurus Maroccanus Epidemik Populasyonundan Alınan Örneklerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri*, Turk J Biol., Tübitak, 24., 141-149, 2000.
32. LEHNINGER, A.L, NELSON, D.L. ve COX, M.M., *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, 724-725, 1993.
33. ÇOLAK, Ö., *Gastrointestinal Sistem Kanserli Hastalarda Normal ve Tümörlü Dokuda Redükte Glutasyon ve Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Anadolu Üniv. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D., 1990.
34. ZUBAY, G., *Biochemistry*, Macmillan Publishing Company, Newyork, Collier Macmillan Publishers, London, 362-364, 1988.
35. YENSON, M., *İnsan Biyokimyası*, Beta Basım Yayın ve Dağıtım A.Ş., 50-51, 1984.
36. GOLDSTEIN, M., *Biochemistry a Functional Approach*, Galu-Shoin / Saunders International Edition, 666-668, 1983.
37. TERBLANCE, S.E., MASONDO, T.C. ve NEL, W., *Effects of Chronic Cold Exposure on the Activities of Cytochrome c oxidase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase in Rat Tissues (Rattus norvegicus)*, Comparative Biochemistry and Physiology Part B 127, 319-324, 2000.

38. HAGEN, T. ve SHIMKETS, L., *Proposal for Further Study of the Homolog of Glutathione Peroxidase Found in Neisseria Meningitidis (gpxA)*, YIn Tian Collage of Pharmacy, 1, 1-6, 1997.
39. AKKUŞ, İ, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım A.Ş., 1995.
40. ARI, Z., UYANIK, B.S., YİĞİTOĞLU, R., KUTLU, N. ve PİRİM, İ., *The Effect of FAD on Erythrocyte Glutathione Reductase Activity in Undialyzed Uremic Patients and Healthy Subjects*, Tr. J. of Medical Sciences, 27, 71-74, 1997.
41. BOYER, *The Enzymes*, Glutathione Reductase Vol XIII., Oxidation-Reduction Part C, 129-142, 1975.
42. CARLBERG, I., ve MANNERVIK; B.; *Glutathione Reductase Methods in Enzymology*, 113, 484 - 510, 1985.
43. KOÇYİĞİT, A., EREL, Ö., GÜREL, M.S., SEYREK, A., AKTEPE, N., GÜR, S. ve AVCI, S., *Decreasing Selenium Levels and Glutathione Peroxidase Activity in Patients with Cutaneous Leishmaniasis*, Tr. J. of Medical Sciences, Tübitak, 29, 291-295, 1999.
44. FIŞKIN, K., *The Effects of Sodium Selenit on the Antioxidative Defence Mechanism of Human Hepatoma G₂ Cells*, Tr. J. of Medical Science, Tübitak, 30, 203-207, 2000.
45. YANG, S.J., HASOKAWA, M., MIZUTA, Y., YUN, J.G., MANO, J. ve YAZAWA, S., *Antioxidant Capacity is Correlated with Susceptibility to Leaf Spot Caused by a Rapid Temperature Drop in Saintpaulia (African Violet)*, Scientia Horticulturae, 88., 59-69, 2001.

46. SAVVIDES, S.N. ve KARPLUS, P.A., *Kinetic and Crystallographic Analysis of Human Glutathione Reductase in Complex with a Xanthene Inhibitor*, The Journal of Biological Chemistry, 271, 14., 8101-8107, 1996.
47. FIŞKIN, K., KANDEMİR S., HAMAMCI D., YEŞİLADA E. ve BOZCUK A.N., *Age-Related Changes in Catalase, Glutathione Reductase Activities, The Amount of Glutathione in Total Body of Oregon and Vestigial*, Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl. 4, 80-85, 1994.
48. ATAMER, Y., KOÇYİĞİT, Y., ATAMER, A., METE, N., CANORUÇ, N. ve TOPRAK, G., *Alterations of Erythrocyte and Plasma Lipid Peroxides As Well As Antioxidant Mechanism in Patients with Type II Diabetes Mellitus (NIDDM)*, Tr. J. of Medical Sciences, Tübitak, 28, 143-148, 1998.
49. MÜFTÜOĞLU, M. ve ÖZER, N., *The In Vitro Effects of The Antimalarial Drug Primaquine, on The Activities of Soem Enzymes in Human Erythrocyte Lyzates*, Tr. J. of Medical Sciences, Tübitak, 29, 409-412, 1999.
50. CİLİV, G., EMERK, K. ve KARAN, A., *İnsan Biyokimyasına Giriş*, Hacettepe Üniv. Yayınları / A-40, 198-199, 1982.
51. ALATAŞ, F., ÖZDEMİR, N., ALATAŞ, Ö., ERGİNEL, S., METİNTAŞ, M. ve IŞIK, R., *The Effects of Smoking on Glutathione Levels, in Bronchoalveolar Lavage Fluid*, Tr. J. of Medical Sciences, Tübitak, 29, 643-647, 1999.
52. MAHFOUZ, M.M. ve KUMMEROW, F.A., *Cholesterol-rich Diets Have Different Effects on Lipid Peroxidation, Cholesterol Oxides, and Antioxidant Enzymes in Rats and Rabbits*, J. Nutr. Biochem. 11., 293-302, 2000.

53. PAŞAOĞLU, H., MUHTAROĞLU, S., GÜNEŞ, M. ve UTAS, C., *The Change of Glutathione Dependent Anti-Oxidant Mechanism in Patients with Chronic Renal Disease by Hemodialysis*, Tr. J. of Medical Sciences, Tübitak, 28, 75-78, 1998.
54. LII, C-K., WANG, S-T. ve CHEN, H-W., *The Detection of S-Glutathionetion of Hepatic Carbonic anhydrase III in Rats Treated with Paraquat or Diquat*, Elsevier Science Ireland Ltd., Toxicology Letters 84, 97-105, 1996.
55. ARICA, M.Y., HALICIGİL, C., ALAEDDİNOĞLU, G. ve DENİZLİ, A., *Affinity interaction of hydroxypyruvate reductase from Methylophilus spp. with Cibacron blue F3GA-derived polyl(HEMA EGDMA) microspheres: partial purification and characterization*, Process Biochemistry 34., 375-381 Elsevier, 1999.
56. SAMBROOK, J., FRISTSCH, E.F. ve MANIATIS, T., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
57. ASHWANI, K., ANJU, M. ve BIMLA N., *Modulation of Oxidative Stress by Ascorbic Acid and/or Alpha-Tocopherol*, Journal of Nutritional & Environmental Medicine, 10., 233-239, 2000.
58. BREINHOLT, V., *Differential Effects of Dietary Flavonoids on Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes in Female Rat*, Xenobiotica, Dec99, 29, 1227-1241, 1999.
59. AGUILO, A., TAULER, P., GIMENO, I., FUENTESPINA, E. ve PONS A., *Changes in Antioxidant Enzymes During Prolonged Submaximal Exercise*, Biofactors, 11, 27-31, 2000.
60. PANIKER, N.V., SERIVASTAVA, S.K. ve BEUTLER, E., *Glutathione Metabolism of the Red Cells Effect of Glutathione Reductase Deficiency on*

the Stimulation of Hexose Monophosphate Shunt Under Oxidative Stress,
Biochim. Biophys. Acta 215, 456, 1970.

61. VINCENT, M., DEBORD, J. ve PENICAUT, B., *Comparative Studies on the Toxicity of Metal Chlorides and of a Synthetic Organic Molluscicide, N-Trityl-Morpholine, Upon Two Aquatic Amphipod Crustaceans, Gammarus pulex and Echinogammarus Berilloni,* Ann. Rech. Vet. 17 (4), 441-446, 1986.