

**BAZI BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN  
ANTIOKSİDATİF SİSTEMİ ÜZERİNE  
KURŞUNUN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sadık SATILMIŞ**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Nisan 2009**

Bu tez çalışması “07.FENED.12” numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN ANTIOKSİDATİF SİSTEMİ**  
**ÜZERİNE KURŞUNUN ETKİSİ**

**Sadık SATILMIŞ**

**Danışman**  
**Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Nisan 2009**

## ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ danışmanlığında, Sadık SATILMIŞ tarafından hazırlanan “Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Antioksidatif Sistemi Üzerine Kurşunun Etkisi” başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 07/04/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

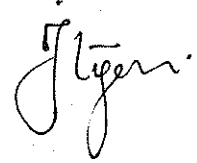
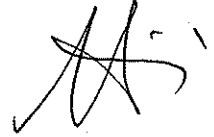
Ünvanı, Adı, SOYADI

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Muhsin KONUK  
(Başkan)

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Hüseyin ENGİNAR

Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ  
(Danışman)

İmza



Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..... tarih ve

.....

sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Zehra BOZKURT

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ağır Metaller .....	4
2.1.1 Ağır Metallerin Genel Özellikleri .....	4
2.1.2 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.2 Kurşun .....	5
2.2.1 Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı .....	5
2.2.2 Kurşun Kirliliği .....	6
2.2.3 Kurşun Çalışmaları .....	7
2.3 Beyaz Çürükçül Funguslar .....	8
2.4.1 Süperoksit Radikali .....	11
2.4.2 Hidroksil Radikali .....	12
2.4.3 Singlet Oksijen .....	12
2.4.4 Hidrojen Peroksit.....	13
2.4.5 Serbest Radikallerin Etkileri.....	13
2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma .....	16
2.6 Antioksidan Enzimler .....	17
2.6.1 Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6).....	17
2.6.2 Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18) .....	18
2.6.3 Glutasyon Redüktaz (GSSGR, EC 1.6.4.2) .....	18
2.6.4 Glutasyon (GSH, $\gamma$ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) .....	19
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>21</b>
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	21
3.2 Çalışmada Kullanılan Ağır Metal.....	21
3.3 Çalışmada Kullanılan Organizmalar .....	21
3.4 Fungusların Ekimi ve Üretimi .....	21
3.5 Fungusların Kurşuna Maruz Bırakılması .....	22
3.6 <i>P. chryso sporium</i> 'ların Uygulama Süresi Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu .....	22
3.7 <i>P. chryso sporium</i> 'da Kurşun Analizleri .....	22
3.8 Enzim Aktivitelerinin Tayini.....	23
3.8.1 CAT Aktivitesinin Tayini.....	23
3.8.2 GR Aktivitesinin Tayini .....	24
3.8.3 GSH Miktar Tayini.....	25
3.8.4 GST Aktivite Tayini .....	26
3.9. Total Protein Miktar Tayini.....	27
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>28</b>
4.1 <i>Pleurotus</i> türlerinin gelişimleri üzerine kurşunun etkisi .....	28

4.2 <i>P. chrysosporium</i> 'ların Kurşun İçerikleri.....	29
4.3 Kurşunun <i>P. chrysosporium</i> 'da Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Glutatyon Miktarı Üzerine Etkileri .....	30
4.3.1 CAT Aktivitesi .....	30
4.3.2 GR Aktivitesi.....	31
4.3.3 GST Aktivitesi.....	31
4.3.4 GSH Miktarı .....	32
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>34</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>38</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>x</b>

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAZI BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARIN ANTIOKSİDATİF SİSTEMİ ÜZERİNE KURŞUNUN ETKİSİ

Sadık SATILMIŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Sucul veya karasal yolla çevreye ağır metal, çevresel kirliliğin önemli bir yönünü oluşturmaktadır. Organizmalar muhtemelen çevrelerinde ksenobiyotik yâda ağır metal gibi toksik kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Canlıların katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerden oluşan antioksidan savunma sistemi bu ksenobiyotik ve toksik maddelerden korunabilmede de işlev görmektedir. Bu enzimler hücrede oluşan oksidatif stresin güçlü belirteçleridir. Bu çalışmada kurşunun farklı konsantrasyonlarının (20 ve 200 ppm) *Phanerochaete chrysosporium*'un antioksidan sistemini farklı zaman aralıklarında (30, 60, 360, 1440. dk) nasıl etkilediği araştırıldı. Bu süreler sonunda indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile yapılan analiz sonuçları, *Phanerochaete chrysosporium*'da biriken kurşun miktarının doza-bağımlı olduğunu göstermiştir. CAT, GST, GR enzimlerinin aktivitelerindeki ve total GSH seviyelerindeki değişiklikler zamana bağlı olarak artış ve azalışlar şeklinde belirlendi. Aynı zamanda beyaz çürükçül funguslar *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus florida*' da kurşunun (0.001-0.1 mM) fungal gelişim üzerine etkileri araştırıldı.

**2009, 46 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Kurşun, Antioksidan Enzimler, Beyaz Çürükçül Funguslar.

## **ABSTRACT**

M. Sc. Thesis

### **EFFECTS of LEAD on ANTIOXIDATIVE SYSTEMS of SOME WHITE ROT FUNGI**

Sadık SATILMIŞ

Afyon Kocatepe University  
Institutes of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Heavy metals input into the environment, either terrestrial or aquatic, is an important aspect of environmental pollution. Organisms are exposed to potentially toxic chemicals such as xenobiotics or heavy metal in environment. Antioxidant protection system, made up of some enzymes of the living organisms as catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), has function for protection from these xenobiotic and toxic materials. These enzymes are the strong biomarkers of oxidative stress formed in cell. In this study the effect of different concentrations of lead (Pb) (20 ppm and 200 ppm) on *Phanerochaete chrysosporium*'s antioxidant system was investigated at different exposure time (30, 60, 360, 1440<sup>th</sup> min). The results of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis indicated that accumulation of lead in *Phanerochaete chrysosporium* was dose-dependent. Changes on CAT, GST, GR enzyme activities and in total level of GSH were determined as increasing and decreasing related on exposure time. At the same time the effect of Pb (0.001-0.1 mM) on fungal growth was investigated in the white rot fungi *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*.

**2009, 46 pages**

**Key Words:** Lead, Antioxidan Enzymes, White Rot Fungi.

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca yardımını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye, bu tezi hazırlarken tecrübesinden yararlandığım ve manevi desteğini her zaman hissettiğim hocalarım Prof. Dr. Muhsin KONUK ve Yrd. Doç. Dr. Elif KORCAN'a ve sevgili eőim, Serap SATILMIŞ'a, teşekkür ederim.

Sadık SATILMIŞ



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### 1. Simgeler

°C	Santigrat derece
atm	Atmosfer
dk	Dakika
gr	Gram
gr/L	Gram/Litre
kg	Kilogram
M	Molarite
mg/mL	Miligram/Mililitre
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali
Pb	Kurşun
rpm	Dakikadaki dönüş (Rotation per minute)
sn	Saniye
µg/g	Mikrogram/Gram
µg/L	Mikrogram/Litre
µg/m <sup>3</sup>	Mikrogram/Metreküp
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
γ	Gama

## 2. Kısaltmalar

BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Katalaz
CDNB	1-choloro, 2-4 dinitrobenzen
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
EEC	European Economic Community
FAD	Filavin Adenin Dinükleotid
GPx	Glutayon Peroksidaz
GSH	Glutayon
GSSG	Okside Glutayon
GST	Glutayon S-Transferaz
IgG	İmmünoglobülin G
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (redükte)
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SH	Sülfidril Grubu
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbutirik Asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 GSH redoks döngüsü.....	19
Şekil 2.2 Redükte Glutatyon (GSH).....	19
Şekil 3.1 GST aktivitesi ve S-Glutatyon oluşumu.....	26
Şekil 4.1 <i>Pleurotus sajor-caju</i> 'da misel gelişimi. ....	28
Şekil 4.2 <i>Pleurotus florida</i> 'da misel gelişimi.....	29
Şekil 4.3 <i>Pleurotus ostreatus</i> 'ta misel gelişimi.....	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 GR enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği .....	24
Çizelge 3.2 GST enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği .....	26
Çizelge 4.1 <i>Pleurotus</i> türlerinin gelişimleri üzerine kurşunun etkisi .....	29
Çizelge 4.2 <i>P. chrysosporium</i> 'ların kurşun içerikleri.....	30
Çizelge 4.3 Kurşunun <i>P. chrysosporium</i> 'da CAT aktivitesine etkisi.....	30
Çizelge 4.4 Kurşunun <i>P. chrysosporium</i> 'da GR aktivitesine etkisi .....	31
Çizelge 4.5 Kurşunun <i>P. chrysosporium</i> 'da GST aktivitesine etkisi .....	32
Çizelge 4.6 Kurşunun <i>P. chrysosporium</i> 'da GSH miktarına etkisi.....	32

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Kimya endüstrisinin çok hızlı gelişiyor olması, tarım alanında, endüstride ve günlük yaşamımızın önemli bir bölümünde kimyasal madde kullanımını arttırmıştır. Doğrudan maruz kalma veya canlılar tarafından kullanılması sonucunda çevreye yayılarak; canlı sistemlere, sucul ve karasal ekosistemlere zarar verebilen kimyasal maddelerin pek çoğunun canlılar üzerindeki etkileri tam olarak açıklanamamıştır. Kimya alanındaki yenilikler, kullanıma yeni maddeler sunmaktadır. Bu maddelerin ayrıntılı olarak toksik etkilerinin, kanserojenik ve mutajenik potansiyellerinin araştırılması, çevre ve insan sağlığı için son derece önemlidir (Chadzynski 1986).

Dünya nüfusunun hızlı artışı, yer darlığı ve besin kıtlığına sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla yeşil alanların yok edilmesi, enerji yetersizliği, düzensiz kentleşme gibi birçok sorun da kaçınılmaz hale gelmiştir. Teknolojinin insanları şaşırtan ilerlemesi ve günlük hayatımızın her alanında yer alması, nüfusa bağlı olarak tüketimin artması çevre kirliliğini daha önemli hale getirmiştir. Ağır metallerin ve metal bileşiklerinin çevre için önemli kirlenici olmaları; ağır metallerin insanlar başta olmak üzere tüm canlıların sağlığı ve biyokimyası üzerindeki etkilerinin araştırılması konusu son yıllarda bilim dünyasında en fazla ilgi çeken konular arasında yerini almıştır.

Pb, Cd, Cu gibi ağır metaller ve pestisitler gibi çevre kirlenicileri oksidatif stresle ilişkili olarak pek çok organizma için toksik etki gösterebilir. Aynı zamanda bu çevresel kirleniciler oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin üretimine de neden olmaktadır. Aerobik organizmalar reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Bu maddelere direkt ya da dolaylı yoldan maruz kalan organizmalarda bu sistemin verdiği antioksidan cevabın tam olarak anlaşılması bu çevre kirlenicilerinin ekosistemde oluşturabilecekleri risklerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Maruz kalma sonucu canlı hücrelerde antioksidan sistem ve protein gibi moleküller çeşitli şekilde etkilenebilmektedir. Normalde hücrede reaktif oksijen türleri

ve antioksidan savunma arasında bir denge söz konusudur. Ancak oksidatif stresin artması sonucu antioksidan sistemdeki enzimlerde indüksiyonlar veya inhibisyonlar meydana gelmektedir (Ott et al. 2002).

Kurşun, biyolojik sistemlerin her ortamda karşılaşabildikleri, metabolik işlevi olmayan eser bir elementtir. Bu metal kablo, lehim ve boya üretiminin yanı sıra akü imalatı ile çini ve seramik yapımında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle kolay çözünen kurşun bileşiklerinin toksisitesi daha yüksektir. Buna göre kurşun nitrat, kurşun klorür, kurşun asetat, kurşun oksit, kurşun sülfür ve kurşun fosfat bileşiklerinin toksik etkileri çoktan aza doğru sıralanabilir (Ciğerci 2005).

Doğada serbest ya da bileşik halde bulunabilen ve günümüz endüstrisinde sıkça kullanılan kurşun, önemli ağır metaller arasında sayılmakta, insan ve hayvanlarda zehirlenmeye neden olmaktadır. (Karataş ve Kalay 2002).

Günümüzde, atık suların ağır metallere arıtımında konvansiyonel fiziksel - kimyasal arıtım yöntemleri yerine; ekonomik, hızlı sonuç verebilen ve uygulaması kolay biyolojik yöntemler de kullanılmaktadır. Bu durum, bilimsel araştırmaların yönünü de belirlemektedir.

Maya ve mantarlarla yapılan biyosorbsiyon çalışmaları, bu mikroorganizmaların ağır metalleri uzaklaştırma ve metal biriktirme yetenekleri dikkate alınarak, daha verimli görülmüştür. Bununla ilgili yapılan son çalışmalar; lignini parçalayarak karbon döngüsüne destek sağlayan, endüstriyel ve tarımsal atıkları canlı sistemler için tekrar kullanılabilir hale getiren *Basidiomycetes* sınıfı mantar türlerinin bu amaç için oldukça uygun olabileceğini göstermiştir (Sağlam ve Cihangir 1995).

Hem çevresel hem de kimyasal ajanlara maruz kalan canlıların hücrelerinde; bu ajanların, radikal oluşumları ve reaksiyonlarını arttırması ile reaktif oksijen türleri oksidatif strese neden olmaktadır. Özellikle reaktif oksijen türleri DNA, RNA,

lipoproteinler gibi biyolojik makromoleküllerle kolaylıkla etkileşebilmektedir (Karataş ve Kalay 2002).

Memelilerde, ksenobiyotiklerin ve serbest radikallerin detoksifikasyonu ile ilgili çalışmalar geniş ölçüde yapılmasına rağmen; prokaryot ve funguslarda bu sistem geniş olarak ele alınmamıştır. Bakteriler ve funguslarda bu enzim sistemleri hakkında bilgi henüz istenilen düzeye ulaşmamıştır. Dolayısıyla bu enzimlerin aktivitelerinin ve glutatyonun (GSH) beyaz çürükçül funguslarda da belirlenmesi, çalışmamızın temel amaçları arasındadır. Bu amaç için, önemli bir çevre kirleticisi olan kurşunun; bazı beyaz çürükçül funguslarda antioksidan enzimleri ve GSH miktarındaki değişimler belirlenmiş ve fungusların antioksidan cevapları araştırılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Ağır Metaller**

#### **2.1.1 Ağır Metallerin Genel Özellikleri**

Metaller fizikokimyasal özelliklerine ve yer kabuğu katmanlarında yerleşmelerine göre hafif metaller, ağır metaller, zor eriyen metaller, nadir toprak metalleri ve radyoaktif metaller olarak gruplandırılırlar (Paşayev 2005).

Atomik yoğunluğu  $7 \text{ gr/cm}^3$ 'den büyük olan metal ve metaloitler için kullanılan genel terim ağır metaldir. Ağır metal terimi genel olarak kadmiyum (Cd), krom (Cr), bakır (Cu), civa (Hg), nikel (Ni), kurşun (Pb) ve çinko (Zn) gibi kirlilik ve toksisite ile ilişkili elementler için kullanılır. Ağır metaller normalde, kayaların ve maden cevherlerinin bünyesinde bulunduğu için, toprak, sular ve sedimentler ile buralarda yaşayan organizmalarda da bulunması doğaldır (Alloway and Ayres 1993).

Bazı ağır metaller bitki beslenmesi için ne kadar önemli de olsa yüksek konsantrasyonlarda fitotoksiktirler. Bunlar bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), çinko (Zn), kobalt (Co) ve nikel (Ni)'dir. Bununla birlikte kurşun (Pb), krom (Cr), civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler. Bunların bitki bünyesinde bulunmaları derişimlerine, çözünebilirliklerine ve bitkinin cinsine bağlıdır (Bergmann 1992).

Çamurlarda ve atık sularda rastlanan ağır metallerin başlıca kaynağı endüstriyel ve ticari çalışmalar olduğu halde evsel atıklarda da önemli miktarda ağır metal bulunur. Pb, Cu, Ni, Zn ve Cd endüstriden gelen önemli metallerdir. Buradaki sorun bu metallerin besin zincirine girme ve kullanma suyuna karışma olasılığıdır (Dinges 1982, Jamil et al. 1987).



## **2.1.2 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri**

Ağır metaller grubundaki bazı elementler canlı organizmaların çoğu için eser miktarda da olsa gereklidir. Şüphesiz gerekli olan bu metallerin eksikliğinde canlılar zarar görür. Hem bitki hem de hayvanlar için çinko, demir, mangan ve bakır gerekli iken bunlara ek olarak yalnız hayvanlar için kobalt, krom selenyum iyot ve yalnız bitkiler için bor ve molibden gereklidir. Biyokimyasal işlevleri bilinmeyen, canlılar için birinci derecede önemli olmayan fakat toksik olan elementler de vardır. Bunlar arsenik, kadmiyum, kurşun, antimon, titanyum ve uranyum'dur. Bunlar organizmaların toleransını aşan konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmaktadır. Biyokimyasal düzeyde bu metallerin aşırı konsantrasyonlarının neden olduğu olumsuz etkiler Adenozin Trifosfat (ATP) ve Adenozin Monofosfat (ADP)'nin fosfat gruplarıyla olan reaksiyonları, hücre membranlarının zarar görmesi, sülfidril gruplarıyla (SH) olan reaksiyonları, esas iyonların yerine geçmesi ve esas metabolitlerle rekabet etmesidir. Organizmalar sahip oldukları homeostatik mekanizmalarıyla çoğu elementin alınmasında ortaya çıkan bu düzensizlikleri tolere edebilirler (Alloway and Ayres 1993).

Toksik etkili ağır metallere dayanıklı olan bir canlı ya hücreye giren ağır metalleri derhal detoksifiye etmeli ya da hücreye alınımını sınırlı tutmalıdır (Cumming and Taylor 1990).

## **2.2 Kurşun**

### **2.2.1 Kurşunun Fiziksel-Kimyasal Özellikleri ve Doğadaki Dağılımı**

Kurşun, periyodik cetvelin 4A gurubunda bulunan, biyolojik sistemlerin her ortamda karşılaşılabildikleri, metabolik işlevi olmayan bir eser elementtir. Düşük erime noktasına (327 °C) sahip olan kurşun, yumuşak ve işlenebilen bir metaldir. Doğada daha çok, kurşun sülfür formunda veya demir, bakır, çinko, antimon ve gümüş metallerinin buldukları cevherler içerisinde bulunur. Kurşun kolayca farklı formlara dönüştürülebilir ve diğer metallerle tepkimeye girebilir (Kitman 2000). Önemli bir ağır metal olan kurşun; çevresel kirlenmeye potansiyelinden dolayı günümüzde büyük bir önem kazanmıştır (Chaney and Ryan 1994).

Kurşun, insanlar tarafından binlerce yıldan beri kullanılmakta, dünyadaki bütün sanayileşmiş ülkelerin ekonomisinde büyük rol oynamaktadır. Kurşun rafinerisi, madencilik ve kurşunun tasfiye edilmesi işlemleri; kurşuna dayalı ürünlerin üretimi ve kullanımı çevreye kurşun salınımını arttırmaktadır. Böylece kurşun öncelikle sucul sistemlere ve hava içine toz şeklinde karışmaktadır (Grandjean 1975).

Kurşunun çevreye verilmesini kısıtlamak için birçok ülkede düzenleyici önlemler alınmış olmasına rağmen, kurşun tüm dünyada çevre ve insanlar için en önemli tehditlerden birisi olmaya devam etmektedir (Chaney and Ryan 1994).

### **2.2.2 Kurşun Kirliliği**

Kurşun; kablo, lehim ve boya üretiminin yanı sıra akü imalatı ile çini ve seramik yapımında; çelik ve demirlerin korozyona karşı korunması için yapılan yağlı boyalarda, patlayıcılarda, saç boyalarının yapımında ve ipeğe ağırlık vermede kullanılırken, kurşunun bazı formları da zirai mücadelede ve fotoğrafçılıkta kullanılmaktadır (Vural 1984).

Kurşunun biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri, global dağılımı incelendiğinde, en tehlikeli çevresel toksikant olduğu görülmüştür. Kurşunun yer kabuğundaki konsantrasyonu 16 µg/g'dır, endüstriyel aktiviteler sonucunda toprak zemindeki miktarı 5000 µg/g, suda 10 µg/L ve havadaki miktarı 10 µg/m<sup>3</sup>'ün üzerine çıkabilmektedir. Kurşun ile ilgili ekotoksikolojik çalışmalar; zararlı etkiler, internal dozlar ve ara yollardaki etkileşimi açıklama ve kurşunun sağlık açısından etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Pang 1995).

Sanayi kaynaklı kurşundan ve özellikle benzindeki kurşundan ortaya çıkan kirlilik bütün atmosfere ve oradan da okyanusa kadar uzanmaktadır. Bugün büyük şehirlerde vücuda alınan kurşunun esas kaynaklarından birisini motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Kurşun egzoz gazları ile inorganik aerosol şeklinde, çok ince partiküller halinde havaya dağılmaktadır. Böylece günde ortalama 0,5 mg kurşun vücuda alınmaktadır (İmre 1988).

Hellawell (1986)'ın sınıflandırmasına göre kurşun EEC (European Economic Community)'nin gri listesine alınarak, çevre ve su kirliliğinde çok önemli bir toksik madde olarak bildirilmiştir (Hellawell 1986).

### **2.2.3 Kurşun Çalışmaları**

Kurşunun biyolojik makromoleküller üzerinde oluşturduğu oksidatif stres araştırılmış, kurşuna maruz kalan dokularda lipit peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan savunma sisteminin azaldığı görülmüştür (Gurer ve Ercal 2000).

Kurşuna maruz bırakılan ratların beyin homojenatlarında antioksidan enzimler azalırken, lipit peroksidasyonunun (TBARS) arttığı tespit edilmiştir (El-Sokkary et al. 2003). Karaciğerde de benzer bir durum Sandhir ve Gill tarafından bulunmuştur (Sandhir and Gill 1995). Somashekaraiah ve ark., tavuk embriyolarının karaciğer, mitokondri ve lizozom membranlarında kurşunun lipit peroksidasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Somashekaraiah et al.1992).

Kurşunun, membran yapısı ve fonksiyonları üzerine olan etkilerinin araştırılması için en çok eritrositler kullanılmıştır. Eritrositler üzerine olan etkileri, kurşuna bu hücrelerin yüksek afinite ile bağlanmaları ve kan dolaşımı esnasında daha fazla maruz kalmaları sonucu oluşmaktadır (Levander 1977).

Eritrositlerin membranlarındaki ozmotik mekanik geçirgenlik, kurşun toksikasyonunu arttırmakta; böylece deformite oranı artmakta ve proteinlerin kompozisyonu ile membrana bağlı enzimlerin aktiviteleri de değişmektedir. Kurşun, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırırken ve oluşturduğu oksidatif stres sonucu membranlar üzerinde direkt bozucu etkileri arttırmaktadır (Ercal ve Güner 2001).

Kurşunun, E vitamini bakımından yetersiz beslenen ratların eritrositlerinin membranlarında peroksidasyon ile şekil bozukluğuna neden olduğu ileri sürülmüştür. Bazı çalışmalarda kurşunun direkt olarak lipit peroksidasyonu oluşturmadığı, dolaylı yolla bunu yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Ağır metaller ve kurşunun eritrositlerde

oksihemoglobin (oksiHb) ile etkileşimleri önemli miktarda süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) ortaya çıkarmakta ve buna bağlı olarak oksidatif hasar oluşmaktadır (Ribarov and Benov 1981).

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarının çimlenmesi, fide büyümesi ve yaş-kuru ağırlık değişimleri üzerine klor tuzu halinde kullanılan kurşunun etkileri araştırılmıştır. Uygulanan kurşunun gerek tohum çimlenmesi, gerekse çimlenme sonrası aşamada kök uzamasını önemli oranlarda engellediği saptanmıştır (Kıran ve Munzuroğlu 2004).

Farklı konsantrasyonlarda  $Pb(NO_3)_2$ 'ın, *Zea mays*, *Brassica pekinensis* Rupr. ve *Brassica juncea* L. tohumlarının çimlenmesi ile kök ve fide gelişimini engelleyip, mitotik indeksi ve normal bölünen hücre sayısını olumsuz etkileyerek, kök ile gövdenin yaş ve kuru ağırlıklarını azaltıp, kloroza neden olduğu belirtilmiştir (Jiang et al. 2000).

Kurşun ve kadmiyum uygulanan *Lemna minor* bitkisinde katalaz (CAT) ile proteaz aktivitesinin azaldığı, peroksidaz aktivitesinin arttığı ve protein miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Chatterjee and Chatterjee 2000). Peroksidaz enzimi aktivitesinin artışının metal etkisiyle fenol, tiol, hidrojen peroksit gibi sekonder metabolitlerin oluşmasıyla (bitki senesensi) ilgili olduğu düşünülmüştür. CAT ve proteaz gibi enzimlerin aktif bölgelerine metal iyonlarının bağlanarak enzimin aktivitesini engellediği görülmüştür. Bu ağır metaller tarafından azot metabolizmasının engellendiği ve protein miktarının azaldığı ileri sürülmüştür (Chatterjee and Chatterjee 2000).

### **2.3 Beyaz Çürükçül Funguslar**

Basidiomycetes sınıfına ait olan beyaz çürükçül mantarlar; lakkaz, Mn peroksidaz, lignin peroksidaz ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH) peroksidaz (NADH oksidaz) gibi ekstrasellüler enzim üretirler. Bu enzimler biyoteknolojik çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Başta boyar maddelerin uzaklaştırılması olmak üzere pek çok biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida* türleri örnek olarak verilebilir. İlk çalışmalarda *Phanerochaete chrysosporium* üzerine yoğunlaşılmasına

rağmen diğer türler de tekstil atık sularının renk giderilmesinde çok geniş kullanım alanı bulmaktadır (Wesenberg and Bouchon 2002).

Beyaz çürükçül mantarların ve bu mantarlardan saflaştırılan enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik çalışmalara pek çok örnek vermek mümkündür. Bunlar;

1. Mikrobiyal protein kaynağı olarak kullanımı (Cardoso and Nicoli 1981).
2. Zeytinyağı fabrikası atık suyunun arıtımında/renginin giderilmesinde kullanımı (Jaouani et al. 2006, Yeşilada ve Bozcuk 1990).
3. Hormon üretiminde kullanımı (Yeşilada ve Bozcuk 1990).
4. Enzim üretiminde kullanımı (Rogalski et al. 1991).
5. Ağır metallerin biyolojik adsorpsiyonunda kullanımı (Dhawale et al.1996, Gabriel et al.1996).
6. Kağıt ve kağıt hamuru üreten endüstrilerde ligninin parçalanmasında kullanımı (Kuhad et al. 1997).
7. Boyar maddelerin ve tekstil fabrikası atık sularının renginin giderilmesinde kullanımı (Nyanhongo et al. 2002, Swamy and Ramsay 1999).
8. Pestisid ve herbisidlerin biyolojik yıkımında kullanımı (Duran and Esposito 2000).
9. Nanobiyoteknoloji alanında biosensor olarak kullanımı (Haghighi et al. 2003).
10. Son zamanlarda kozmetik ve dermatolojik ürünlerin hazırlanmasında kullanımı (Golz-Berner et al. 2004).
11. Kağıt, tekstil ve petrokimya endüstrilerinden alıcı ortama bırakılan endüstriyel atıkların toksisitesinin azaltılmasında kullanımı (Couto and Herrere 2006).
12. Anti-kanser ilaçlarının üretiminde katalizör olarak kullanımı (Couto and Herrere 2006).

#### **2.4 Serbest Oksijen Radikalleri**

Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller serbest radikaller olarak tanımlanır. Genel olarak serbest radikal üretimi, pato-mekanizmanın bir ögesidir ve pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi,

serbest radikal üretimi ile ilişkilendirilebilir. Kurşun ve kadmiyum gibi çevresel kirleticilere uzun süre mesleki maruz kalma sonucunda oksidatif stres oluşabilir ki bu, biyolojik sistemlerdeki istenmeyen etki ve sonuçların altında yatan bir mekanizmadır (Abdollahi et al. 2003, 2004). Basit olarak oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak ifade edilebilir. Serbest radikallerin hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapıları vardır (Cochran 1991). Canlı sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan  $H_2O_2$ , dokularda bulunan CAT, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Matés 2000).

Süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen dietilditiyokarbamat gibi maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırır. Ayrıca CAT'ın etkinliğini engelleyen aminotriazol ve herbisidler gibi maddeler de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (Kaya vd. 1998).

Serbest oksijen radikallerinin pek çok hastalığın patogeneziinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Bu hastalıklara örnek olarak serbest oksijen radikallerinin ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonları, kurşun zehirlenmesi, aminoglikozit nefrotoksitesisi, ağır metal nefrotoksitesisi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, hepatitis B, iskemi ve reperfüzyon, vit E eksikliği, kanser, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis ve romatoid artrit verilebilir (Cross 1987).

### 2.4.1 Süperoksit Radikali

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşabileceği gibi indirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu da süperoksit radikalini meydana getirebilir. Süperoksit radikalinin hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe vardır.

Biyolojik sistemlerde önemli serbest radikallerin çoğu oksijen kökenlidir. Bunlardan süperoksit radikali hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla süperoksit radikallerinin birikmesine bağlıdır. Bu radikaller biriktikten sonra, bir seri zincirleme radikalik tepkimeler sonucu diğer radikaller meydana gelir (Halliwell 1989).

Serbest radikaller potansiyel olarak toksiktirler ve organizmalar serbest radikallerin toksisitesini etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemlerine sahiptirler. Bu ise kısaca “antioksidanlar” şeklinde tanımlanır. Bu işleyişin radikaller lehine bozulması durumunda patolojik durumlar kendini göstermeye başlar (Lohr 1991).

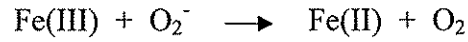
Bu antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD); peroksidazlar ve CAT ile takım halinde çalışırlar. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalini  $H_2O_2$ 'ye dönüştürür; peroksidazlar ve CAT ise hidrojen peroksidin ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene indirgenmesini sağlarlar (Halliwell 1989). CAT ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) enzimleri süperoksit radikali tarafından inaktive edilmektedir (Kılınc 1985).

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini ortadan kaldırarak bu enzimleri korumaktadır. CAT ve GPx de  $H_2O_2$ 'e detoksifiye ederek, SOD'u  $H_2O_2$ 'nin inaktive edici etkisinden kurtarmaktadır (Zhou and Kang 2000). Serbest radikaller ve çeşitli hastalıklarda serbest radikallerin rolü son yıllarda üzerinde durulan önemli çalışma konularından biri haline gelmiştir.

### 2.4.2 Hidroksil Radikali

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz bırakılması sonucunda ve ayrıca hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu neticesinde hidroksil radikali oluşmaktadır. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikal olup yarılanma ömrü oldukça kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyol radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara sebebiyet verirler (Kılınç ve Kılınç 2002).

#### Haber- Weisson Reaksiyonu



### 2.4.3 Singlet Oksijen

Oksijenin paylaşılmamış dış elektronları enerji absorpsiyonu ile bulunduğu düzeyi değiştirebilir. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda dış iki elektron ayrı ayrı veya aynı orbital üzerinde bulunabilirler. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen denir. Singlet oksijenin delta ve sigma formları vardır. Singlet oksijenin delta formunda, iki elektron aynı orbitallerde bulunur, buldukları düzeyler birbirine zıt ve diğer orbital boşken; singlet oksijenin sigma formunda ise iki elektron ayrı orbitallerdedir ve buldukları düzeyler birbirine zıttır. Singlet oksijen başlıca şu mekanizmalarla canlı sistemlerde kendini gösterebilir (Kılınç 1985).

- 1) Pigmentlerin ( Örneğin; flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla,
- 2) Hidroperoksitlerin metal varlığında yıkım tepkimelerinde
- 3) Kendiliğinden dismütasyon tepkimeleri sırasında



4) Prostoglandin endoperoksit sentaz ve bazı sitokrom p450 tepkimelerinde oluşabilir.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya kovalent bağlı bileşikler oluşturur veya içerdiği enerjiyi başka atom ya da moleküle aktarır. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği önemli bağlardır (Kılınç ve Kılınç 2002).

#### **2.4.4 Hidrojen Peroksit**

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması durumunda peroksitin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirirler. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak adlandırılır; ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlenir. Kendiliğinden gerçekleşen dismutasyon pH 4,8'de en hızlı olurken, enzimatik dismutasyon ise kendiliğinden gerçekleşen dismutasyonun nisbeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgin olarak kendini gösterir (Dawn et al.1996).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü demir iyonları veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur (Akkuş 1995).

#### **2.4.5 Serbest Radikallerin Etkileri**

Serbest radikaller, hücrelerde DNA, lipid, protein, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli organik bileşiklere etki ederler. Serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküller lipidlerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin

doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonu "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" olarak tanımlanır.

Hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılması için geçiş metalleri iyon katalizi gerekmektedir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine de mevcut hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle, dolaylı olarak da diğer hücre bileşenlerine zarar verirken doku hasarına ve pek çok hastalığa da neden olmaktadır (Tietz 1995).

Çoklu doymamış yağ asitlerine göre proteinler, serbest radikallere karşı daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal zararlarından etkilenme derecesi amino asit dizilişleri ile ilişkilidir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirlerken; etkilenme sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikalleri meydana getirir. Serbest radikallerin etkileri sonucunda, immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını gerçekleştiremezler. Reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kalan prolin ve lizin aminoasitleri nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobinin de serbest radikallerin etkilerinden önemli oranda zarar görür. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) reaksiyonu methemoglobin oluşumunu gerçekleştirir (Burtis and Ashwood 1999).

Serbest radikallerin DNA üzerinde yaptıkları hasar oldukça önemlidir. Serbest radikaller DNA'nın baz dizileri ile reaksiyona girerek DNA dizisinde hasarlar meydana getirir ve bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadır (Kaynak 2002). Yine serbest radikaller nükleik asitlere etki ederek temel yapıdaki çift sarmalın kırılmasına, sarmala yeni baz ve şeker gruplarının eklenmesine ve moleküller arasında çapraz bağların kurulmasına neden olabilmektedir.

Hidroksil radikali, deoksiriboz şekeri ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek bir seri değişikliklere yol açmaktadır. DNA üzerine atakta bulunan hidroksil radikallerinin bir ürünü olan 8-hidroksi guanozinin varlığı insanda DNA hasarının bir belirtisidir.  $H_2O_2$  ise membrandan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak, burada DNA hasarına, hücre fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne bile neden olabilir.

Karbonhidratlar üzerinde de serbest radikallerin önemli etkileri vardır. Otoksidasyon sonucu monosakkaritlerden; hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitlerin DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliği vardır. Bu özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece yaşlanma olaylarında ve kanserleşmede rol oynarlar (Akkuş 1995).

## 2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında çok hassas bir denge mevcuttur. Bu dengede meydana gelebilecek düzensizlikler veya hücreye zarar veren reaktif oksijen türlerinin birikimi, oksidatif stres olarak ifade edilir.

Hücre içi reaktif oksijen türleri üreten çok sayıda bileşik ve çevresel ajanlar, aktif oksijen konsantrasyonunun hücrenin savunma kapasitesini aşan bir seviyeye ulaşması durumunda oksidatif stres oluşur (Cabiscol et al. 2000).

Normal olarak çalışan bir metabolizmada mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldaki organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda doğal enzimler devreye girmektedir. Enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar ilk olarak hücre membranındaki lipidleri etkileyerek “lipid peroksidasyonu”nu başlatmaktadır. Membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonu lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehitler hücre hasarına neden olmaktadır. Yeterli seviyede vit-E ve vit-C gibi antioksidan vitaminlerin bulunduğu durumlarda lipid peroksidasyonun oluşması halinde bile bu tip hücresel hasarların önüne geçilebilmektedir (Benzer ve Ozan 2003).

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması bulunur. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” adı verilir. Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (superoksit dismutaz, katalaz-, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myogloblin, haptoglobilin) ve mikromoleküller ( $\beta$ -karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, thiol

içerenler, GSH, N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon) sayılabilir (Hilmi 1994).

Antioksidanların, oksidanları etkisiz hale getirmesinin başlıca yolları şunlardır:

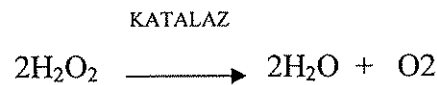
1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanalara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

## 2.6 Antioksidan Enzimler

### 2.6.1 Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

CAT, yapısında dört tane hem gurubu bulunduran bir hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül okside nikotinamid adenin difofat (NADPH) içerir. NADPH molekülü enzimin kararlı olmasında önemli görev üstlenmektedir. CAT, sitokrom sistemi içeren, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde mevcuttur.

CAT esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde bol miktarda bulunur. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksek aktivite gösterir. Görevi; hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Bu enzim peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş 1995).



CAT, indirgeyici aktivitesini hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllerde gösterir. Büyük molekülü lipid peroksitlerine etki edemez (Jenkins and Teng 1981).

### **2.6.2 Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18)**

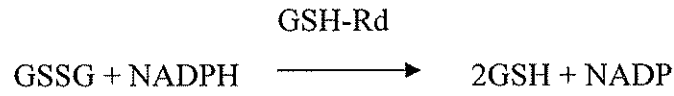
Glutasyon S-transferaz (GST); karsinojenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu ksenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir (Knapen et al. 1999).

GST iki alt üniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu alt ünitelerden her biri GSH bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve buna komşu elektrofilik substrata bağlanan hidrofobik sayılabilecek bölge ihtiva eder. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölgesi de bulunmaktadır. GST; hidroksialkenler, lipit peroksidasyonunun ürünlerinden propenaller ve DNA hidroperoksitleri gibi endojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar. Bu özelliğinden dolayı oksidatif strese karşı savunmaya katılır. Bununla birlikte epoksidler ve kinonlar gibi maddelerin biotransformasyonunda elektrofilik ksenobiotikler veya reaktif ara ürünler de meydana gelebilir (Cnubben et al. 2001).

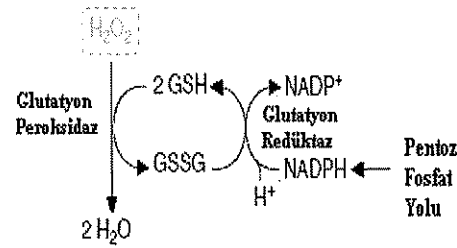
GST enziminin; selenyum bağlı olmayan, GPx aktivitesi gösteren teta ve alfa formları, lipit hidroperoksitleri ve hidroksialkenler, malondialdehitler ve propenalleri inaktive eden pi formu bulunur. GST'nin pi formu ayrıca -SH grubuyla ROS ile direkt reaksiyona girerek disülfüd yapımının inaktif olmasını da sağlar.

### **2.6.3 Glutasyon Redüktaz (GSSGR, EC 1.6.4.2)**

Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağlı flavo enzim olan GR tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir (Young and Woodside 2001).



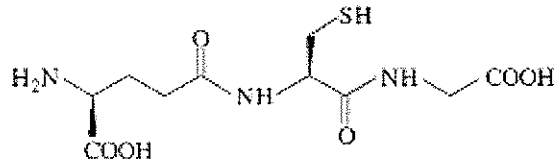
GPX ile benzer doku dağılımı gösterir. GR flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve belirgin kaynağı pentoz fosfat yoludur (Özkan ve Fıfşkın 2004).



Şekil 2.1 GSH redoks döngüsü

#### 2.6.4 Glutatyon (GSH, $\gamma$ -L-glutamyl-L-sisteinil-glisin)

Tripeptid yapıdaki GSH (L- $\gamma$ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar. GSH sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROS'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir.



Şekil 2.2 Redükte Glutatyon (GSH)

Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH, primer olarak redükte formda (GSH) bulunur ancak okside formda disülfüd dimeri (GSSG) olarakta bulunabilir (Sies 1999).

GSH'ın hücresel seviyesi  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz, aminoasit transporterları, glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur (Cnubben et al. 2001).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Malt ekstrakt (Fluka70167) , Pepton (Merck1.07214) ve Agar (Fluka05039) otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra stokların hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### 3.2 Çalışmada Kullanılan Ağır Metal

Çalışmamızda ağır metal olarak kurşun nitrat ( $Pb(NO_3)_2$ ) (Fluka 15335) kullanılmıştır.

#### 3.3 Çalışmada Kullanılan Organizmalar

Çalışmamızda Basidiomycetes sınıfına dahil olan *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus florida* beyaz çürükçül fungusları kullanılmıştır.

#### 3.4 Fungusların Ekimi ve Üretimi

Fungus kültürlerinin devamı malt agara (MA) [Malt ekstrakt (Fluka70167) 30 gr, Pepton (Merck1.07214) 5 gr, Agar (Fluka05039) 15 gr, Distile su 1000 ml.] her 15 günde bir ekim yapılarak sağlandı.

*P. chrysosporium* misellerinin eldesinde, MA’dan alınan taze stok kültürler kullanılmıştır. MA’da üretilmiş fungal miseller 6 mm çapında kesitler alınarak Stok Temel Besiyerine (STB) [ $KH_2PO_4$  0.2 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g,  $(NH_4)_2H_2PO_4$  0.5 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.035 g, Yeast 2 g, Glukoz 1 g, Distile su 1000 ml] transfer edilmiştir. Ekim yapılan kültürler 30 °C’de 150 rpm’de 3 gün inkübe edildikten sonra pelet eldesi sağlanmıştır.

### 3.5 Fungusların Kurşuna Maruz Bırakılması

Taze *Pleurotus sp.* suşlarından 6 mm çapında kesitler alınarak ekimler, plakların tam ortasına gelecek şekilde yapıldı. 27 °C ± 2'de, 7-14 gün Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> içermeyen ve farklı konsantrasyonlarda (0.001-0.1 mM) Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> içeren MA'da inkübasyonun ardından plaklardaki fungal gelişim, koloninin çapı mm olarak ölçülerek belirlendi.

*P. chrysosporium*'lar STB'de üretildikten sonra elde edilen peletler besiyerlerinden süzülüp içerisinde 20 ppm ve 200 ppm konsantrasyonlarda Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bulunan distile sulara eklenmiştir. Eklenen fungus peletleri 30, 60, 360 ve 1440 dakika zaman aralıklarıyla kurşuna maruz kalmaları amacıyla tekrar etüvde inkübasyona bırakılmış ve her bir uygulama süresinin sonunda diğer işlemlere geçilmiştir.

### 3.6 *P. chrysosporium*'ların Uygulama Süresi Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu

Önceki bölümde belirtildiği şekilde üretilen fungus kültürleri 30, 60, 360 ve 1440 dakika kurşuna maruz kalma sürelerinin sonunda filtre kağıdından süzölmüş ve kurşunlu distile sudan ayrılmıştır. Süzölen peletler filtre kağıdından alınıp, tartılmış ve 4 katı fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile (pH 7.4) sulandırılıp homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, sonifikatörle % 80 güçte 30 saniye aralıklarla 3 kez sonifiye edilmiştir. Sonifiye edilen bu örnekler 25000 g'de + 4 °C'de 15 dakika santrifüj (Nüve NF 800 R) edilmiş ve süpernatantlar alınarak çalışmaya geçilene kadar - 80 °C'de saklanmıştır.

### 3.7 *P. chrysosporium*'da Kurşun Analizleri

Belirtilen konsantrasyon ve sürelerde Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> etkisinde bırakılan *P. chrysosporium*'ların yaş ağırlıkları alınmış ve 90 °C'ye ayarlanmış etüvde 24 sa süresince kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan örnekler desikatöre konulmuş ve oda sıcaklığına gelince kuru ağırlıkları ölçölmüştür. Kurutulmuş örnekler temiz bir havan

içerisinde öğütüldükten sonra 50 mg'lık paketler halinde kurşun analizi için saklanmıştır.

Kurşun analizleri, Afyonkarahisar İl Kontrol Laboratuvar'ında yaptırılmıştır. Örnekler, % 65'lik HNO<sub>3</sub> solüsyonunda Berghof mikrodalga yakma sistemi (Berghof Products + Instruments, Germany) kullanılarak yakılmıştır. 50 mg kuru fungus örneği yakma kabına konulduktan sonra üzerine 7,5 ml nitrik asit ilave edilmiştir. Karışım dikkatlice temiz cam bir çubuk ile karıştırılıp, kabın ağzı kapatıldıktan sonra mikrodalga fırına yerleştirilmiştir ve sıcaklık programı ayarlanıp, işlem başlatılmıştır.

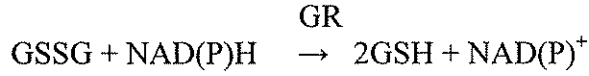
Yakma işlemi sonucunda dipte kalan tortu, başka bir kaba alınıp, bidistile su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan örnekler, kurşun standartları ile karşılaştırmalı olarak Perkin Emler 2100 DV marka ICP-OES cihazında okutulmuştur. Her bir uygulama için en az 3 örnek çalışılmıştır.

### **3.8 Enzim Aktivitelerinin Tayini**

#### **3.8.1 CAT Aktivitesinin Tayini**

Luck 1963 yöntemine göre CAT enziminin aktivite tayini yapılmıştır. CAT aktivite tayini için pH 7'de 1/15 M'lık Sodyum-Potasyum (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tamponu hazırlanmış ve daha sonra tamponun 100 mililitresine 160 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Enzim aktivite tayininde kullanılacak kör için yalnızca hazırlanan tampon-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımı kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin ölçümü için ise daha önce belirtildiği şekilde hazırlanan tampon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisine uygun miktarda süpernatant eklenmiş ve 240 nm'de 1 dakika boyunca absorbans değişimi (TU-1880 Double Beam UV-VIS) kaydedilmiştir. Absorbansın belirlenmesiyle mililitredeki enzim ünite sayısı Luck 1963 yöntemiyle hesaplanmıştır. Elde edilen değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite bulunmuştur (Luck 1963).

### 3.8.2 GR Aktivitesinin Tayini



GR enzim aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa dayanmaktadır. Birincisi; yukarıdaki reaksiyona giren NAD(P)H 340 nm'de maksimum absorbands vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NAD(P)H'ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm'de takip edildi (Carlberg and Mannervik 1985).

Çizelge 3.1 GR enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok aktivite çözeltileri	Kontrol küveti		Numune küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
50 mM Tris-HCL, 1mM EDTA	800	40 mM Tris, 0,8 mM EDTA	800	40 mM Tris, 0,8 mM EDTA
20 mM GSSG	50	1,0 mM	50	1,0 mM
20 mM NADPH	50	0,1 mM	50	0,1 mM
Su	100	-	70	-
3 dakika inkübasyon				
Enzim Numunesi	-	-	30	-

Aktivite ölçüm küvetleri çizelge 3.1'de gösterildiği şekilde önce enzim numunesi katılmaksızın pipetlendi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra numune küvete pipetlenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika boyunca absorbands değerleri kaydedildi (Calberg and Mannervik 1985).

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{EÜ/ml} = \frac{\Delta\text{OD}}{6,22} \times \frac{\text{VT}}{\text{VE}} \times \text{SF}$$

Bu formülde yer alan simgeler;

EÜ/ml: 1 ml'deki enzim ünitesi,

$\Delta$ OD: Bir dakikadaki absorbans değişimi,

6,22: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı),

VT: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi,

VE: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi,

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır).

### 3.8.3 GSH Miktar Tayini

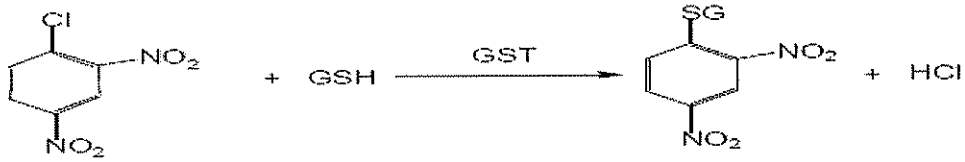
Akerboom ve Sies (1981) yöntemine göre GSH miktarı tayin edilmiştir. GSH miktar tayini için 6,3 mM EDTA içeren 125 mM'lık sodyum difosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) hazırlanmıştır. Tampon GSH tayininden hemen önce mililitresinde 0,248 mg NADPH olarak taze olacak şekilde hazırlanmıştır (pH 7,5). Bunun yanında 11,89 mg DTNB 5 ml tampon içerisinde hazırlanmıştır (Akerboom and Sies 1981).

Deney tüplerine taze olarak hazırlanmış NADPH'lı tampondan 700  $\mu$ l ve DTNB'den de 100  $\mu$ l aktarılmıştır. Kör tüp için 200  $\mu$ l, örnek tüpleri için 175  $\mu$ l distile su deney tüplerine ilave edilmiş ve vortex ile karışması sağlandıktan sonra 30 °C'de 10 dakika boyunca sıcak su banyosunda tutulmuştur.

Kör tüpe 5  $\mu$ l GR eklendikten sonra absorbansı 412 nm'de sıfırlanmıştır. Örneklerin okunuşu şu şekilde sağlanmıştır. Deney tüplerinde hazırlanan karışım 1 ml'lik spektrofotometre küvetine aktarıldıktan sonra küvetin bir kenarına 5  $\mu$ l GR, küvetin diğer tarafına da 10  $\mu$ l süpernatant eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra 412 nm'de absorbansları okunmuş ve GSH tayini yapmak için çizilen standart grafikten süpernatantlardaki toplam glutatyon miktarı  $\text{GSSG}=2\text{GSH}$  eşitliği dikkate alınarak GSH cinsinden hesaplanmıştır. Bulunan değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek GSH miktarı tespit edilmiştir.

### 3.8.4 GST Aktivite Tayini

GST bir glutatyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen S-glutatyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbans gösterir. Böylece bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Bizde bu ölçüm metoduna göre çalışmalarımızda aktivite ölçümünü gerçekleştirdik.



Şekil 3.1 GST aktivitesi ve S-Glutatyon oluşumu.

Aşağıdaki çizelgede verildiği gibi önceden hazırlanan çözeltiler ölçüm yapılan küvetlere belirtilen miktarlarda konulmuştur.

Çizelge 3.2 GST enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok aktivite çözeltileri	Kontrol küveti		Numune küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M pH:7,0	200	0,1 M	200	0,1M
25 mM CDNB (%95 etanol içerisinde)	20	0,5 mM	20	0,5 mM
H <sub>2</sub> O	730	-	680	-
3 dk. inkübasyon				
20 mM GSH	50	1 mM	50	1 mM
Enzim Numunesi	-	-	50	-

GSH'ın yokluğunda, CDNB hızlı bir şekilde GST'yi inaktive eder. Bu sebepten dolayı CDNB ile reaksiyonu başlatmamak gerekir. Aktivite ölçümü için kullanılan küvetler çizelge 3.2'de belirtildiği şekilde, önce GSH ve enzim numunesi katılmadan pipetlendi. Üç dakika inkübasyon yapıldıktan sonra GSH katılarak iyice karıştırıldı ve sonra enzim numunesi hızlı bir şekilde pipetlendi ve küvet spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçüldü ve kaydedildi (Habig et al. 1974).

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EU = \frac{\Delta OD}{9,6} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Bu formülde kullanılan simgeler;

EU/ml: 1 ml'deki enzim ünitesi,

$\Delta OD$ : Bir dakikadaki absorbans değişimi,

9,6: Ekstinksiyon katsayısı (1 mM DNB-SG'nin oluşturduğu absorbans değeri,

$V_T$ : Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi,

$V_E$ : Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi,

$S_F$ : Seyreltilen örnekler için kullanılan seyreltme faktörü.

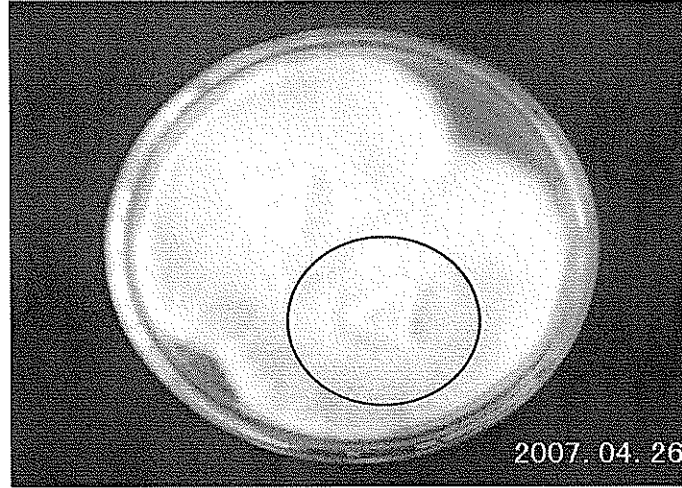
### 3.9. Total Protein Miktar Tayini

Total protein miktarının belirlenmesinde Bradford yöntemi (1976) kullanıldı. Bu yöntemde Bovin Serum Albumin (BSA) standart protein olarak kullanılmıştır. Örnekler adı geçen yöntemle göre hazırlanmış; örneklerin absorbans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen değerler hazırlanan protein standart grafiğinde karşılaştırılıp total protein tayini yapılmıştır (Bradford 1976).

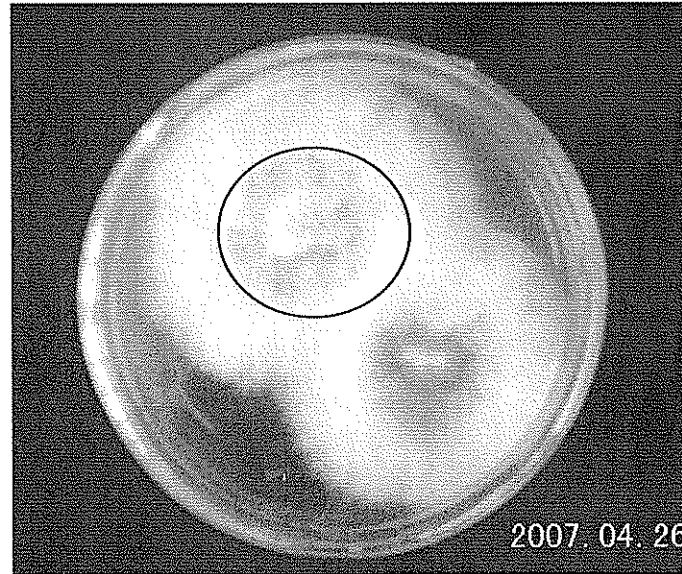
## 4. BULGULAR

### 4.1 *Pleurotus* türlerinin gelişimleri üzerine kurşunun etkisi

*Pleurotus* türlerinde kurşunun gelişimleri üzerine etkisi araştırılmış ve çizelge 4.1'de ki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre; kurşuna karşı en fazla direnç gösteren türün *P. ostreatus*; en hassas türün ise *P. florida* olduğu görülmüştür. *P. sajor-caju*'da 0.1 mM kurşun uygulaması miselyal gelişimi tamamen inhibe etmiştir. *Pleurotus* türlerinin miselyal gelişim şekilleri aşağıda gösterilmiştir.

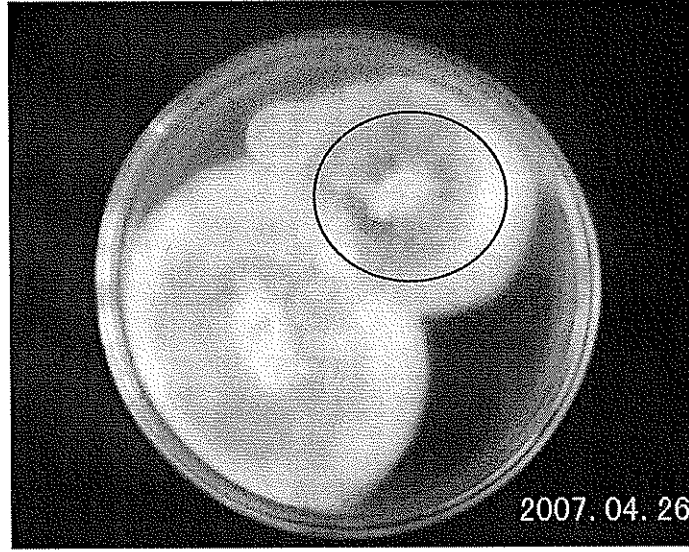


Şekil 4.1 *Pleurotus sajor-caju*'da misel gelişimi.





Şekil 4.2 *Pleurotus florida*'da misel gelişimi.



Şekil 4.3 *Pleurotus ostreatus*'ta misel gelişimi.

Çizelge 4.1 *Pleurotus* türlerinin gelişimleri üzerine kurşunun etkisi

<i>Pleurotus</i> türleri	Pb Konsantrasyonları (mM)					
	Kontrol	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1
<i>Pleurotus sajour-caju</i>	6,23± 0,25	4,6± 0,0	5,1± 0,3	4,43± 0,25	4,5± 0,1	-
<i>Pleurotus florida</i>	6,16± 0,15	3,93± 0,11	4,66± 0,57	4,00± 0,3	3,7± 0,88	3,4± 0,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	6,53± 0,05	6,56± 0,11	6,43± 0,20	6,00± 0,01	5,96± 0,05	4,83± 0,05

#### 4.2 *P. chrysosporium*'ların Kurşun İçerikleri

*P. chrysosporium*'da kurşun içerikleri araştırılmış ve çizelge 4.2'de ki sonuçlar elde edilmiştir. Uygulama süresine bağlı olarak hem kontrol grubunda hem de farklı konsantrasyona sahip uygulama gruplarında (20 ppm ve 200 ppm) Pb miktarının arttığı görülmüştür. 200 ppm Pb uygulama grubunda 30. dakikada ölçülen Pb miktarı, 20 ppm

Pb uygulama grubunun 1440. dakikasında belirlenen Pb miktarının yaklaşık iki katı kadardır.

Çizelge 4.2 *P. chrysosporium*'ların kurşun içerikleri

Uygulama Grupları	Süre (dk)			
	Pb miktarı (mg/kg K.A. ± S.D)			
	30	60	360	1440
<b>Kontrol Grubu</b>	79,39±1,13	233,33±5,65	259,50±8,25	704,84± 12,98
<b>20 ppm kurşun</b>	773,52±12,15	1180,56±15,95	1421,34±16,15	1731,88±21,56
<b>200 ppm kurşun</b>	3595,94±15,25	22574,89±34,85	24.406,69±48,45	70939,85±68,72

#### 4.3 Kurşunun *P. chrysosporium*'da Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Glutasyon Miktarı Üzerine Etkileri

##### 4.3.1 CAT Aktivitesi

*P. chrysosporium*'un CAT aktivitesi kurşuna maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda saptanmış ve sonuçlar çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Kurşunun *P. chrysosporium*'da CAT aktivitesine etkisi

Uygulama Grupları	Süre (dk)			
	Spesifik Aktivite (µmol/dk/mg protein) (Ortalama Değer ± SD)			
	30	60	360	1440
<b>Kontrol Grubu</b>	1.16±0,069	2,64±0,11	2,45±0,12	3,3±0,097
<b>20 ppm kurşun</b>	2,81±0,08	3,69±0,14	4,02±0,14	8,33±0,45
<b>200 ppm kurşun</b>	3,54±0,19	4,47±0,07	4,66±0,3	9,46±0,75

Kontrol grubunda uygulama süresine bağlı olarak CAT enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. 360. dakikada 60. dakikaya göre kısmen enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında artan kurşun konsantrasyonu ve zaman periyoduna bağlı olarak CAT aktivitesinin arttığı saptanmıştır.

#### 4.3.2 GR Aktivitesi

*P. chrysosporium*'un GR aktivitesi kurşuna maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda saptanmış ve sonuçlar çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Kurşunun *P. chrysosporium*'da GR aktivitesine etkisi

Uygulama Grupları	Süre (dk)			
	Spesifik Aktivite ( $\mu\text{mol/dk/mg protein}$ ) (Ortalama Değer $\pm$ SD)			
	30	60	360	1440
<b>Kontrol Grubu</b>	87,73 $\pm$ 2,29	90,43 $\pm$ 1,12	91,16 $\pm$ 1,59	73,13 $\pm$ 2,73
<b>20 ppm kurşun</b>	45,73 $\pm$ 1,84	46,13 $\pm$ 2,16	42,46 $\pm$ 2,9	85,13 $\pm$ 2,22
<b>200 ppm kurşun</b>	39,8 $\pm$ 0,72	42,46 $\pm$ 1,04	47,84 $\pm$ 0,49	71,66 $\pm$ 1,63

Kontrol grubunda GR aktivitesinin 30, 60 ve 360. dakikalarda 1440. dakikaya göre yüksek olduğu gözlenmiştir. 20 ppm kurşun uygulama grubunda GR aktivitesinin 30, 60 ve 360. dakikalarda kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenirken, 1440. dakikada hem kontrol grubundan hem de 200 ppm kurşun uygulama grubundan aktivitenin yüksek olduğu gözlenmiştir. 200 ppm kurşun uygulama grubunda uygulama süresine bağlı olarak GR aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir.

#### 4.3.3 GST Aktivitesi

*P. chrysosporium*'un GST aktivitesi kurşuna maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda saptanmış ve sonuçlar çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Kurşunun *P. chrysosporium*'da GST aktivitesine etkisi

Uygulama Grupları	Süre (dk)			
	Spesifik Aktivite ( $\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{mg}$ protein) (Ortalama Değer $\pm$ SD)			
	30	60	360	1440
<b>Kontrol Grubu</b>	0,065 $\pm$ 0,004	0,076 $\pm$ 0,004	0,080 $\pm$ 0,002	0,048 $\pm$ 0,001
<b>20 ppm kurşun</b>	0,01 $\pm$ 0,001	0,11 $\pm$ 0,014	0,12 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02
<b>200 ppm kurşun</b>	0,077 $\pm$ 0,002	0,086 $\pm$ 0,003	0,096 $\pm$ 0,002	0,089 $\pm$ 0,007

Kontrol grubunda 360. dakikaya kadar GST aktivitesi artarken, 1440. dakikada bir baskılanma tespit edilmiştir. 20 ppm kurşun uygulama grubunda GST aktivitesinin uygulama süresine bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. 200 ppm kurşun uygulama grubunda 360. dakikaya kadar GST aktivitesi artarken, 1440. dakikada aktivitede bir baskılanma tespit edilmiştir.

#### 4.3.4 GSH Miktarı

*P. chrysosporium*'un GSH miktarı, kurşuna maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda saptanmış ve sonuçlar çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Kurşunun *P. chrysosporium*'da GSH miktarına etkisi

Uygulama Grupları	Süre (dk)			
	Total GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) (Ortalama Değer $\pm$ SD)			
	30	60	360	1440
<b>Kontrol Grubu</b>	0,014 $\pm$ 0,005	0,011 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,001	0,016 $\pm$ 0,001
<b>20 ppm kurşun</b>	0,009 $\pm$ 0,0003	0,01 $\pm$ 0,0003	0,012 $\pm$ 0,002	0,014 $\pm$ 0,0003
<b>200 ppm kurşun</b>	0,020 $\pm$ 0,001	0,024 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,001	0,030 $\pm$ 0,001

Kontrol grubunda 360. dakikada GSH miktarı diğer sürelerle göre artmıştır. 20 ppm kurşun uygulama grubunda, GSH miktarının diğer uygulama gruplarına göre azaldığı görülmüştür. 200 ppm kurşun uygulama grubunda GSH miktarı diğer uygulama gruplarına göre artmıştır. Düşük konsantrasyon (20 ppm kurşun) GSH miktarında kontrole göre azalma gösterirken yüksek konsantrasyon (200 ppm kurşun) GSH miktarının artmasına neden olmuştur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmalıdır. Mesela bakır, hayvanlarda ve insanlarda birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır. Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya da bağlıdır. Örneğin nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunması gerekir. (Bigersson and Sterner 1988).

Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması konsantrasyona bağlı olarak değişir. Bu tür organizmalarda metallerin konsantrasyonu dikkate alınmalıdır. Ağır metaller konsantrasyon sınırını aştıkları zaman toksik olarak etki gösterirler. Ağır metalin etkisi canlı türüne, metal iyonunun çözünürlük değerine, kimyasal yapısına, redoks ve kompleks oluşturma yeteneğine, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına, lokal pH değeri vb. yapısına da bağlıdır. Ağır metallerin, fungal gelişim üzerine toksik etkileri bilinmektedir. Ağır metaller arasında Cd ve Hg funguslar için en toksik olanlarıdır. Hg'nin 0,05 mM'lık konsantrasyonu *P. chrysosporium*'un sıvı kültürlerde miselyal gelişime önemli bir inhibisyon etkisi göstermemektedir. Fakat *L.edodes*'i tamamen inhibe etmektedir. *P. sajor-caju* ise 0,03 mM Hg konsantrasyonunda % 85 inhibe olmaktadır. Katı besiyerinde ise *P. ostreatus*'da 0,1 mM Hg konsantrasyonunda miselyel gelişim % 6–75 oranında inhibe olmaktadır (Hatvani and Mecs 2003) .

Çalışmamıza benzer olarak Pointing (2001), Pb, Zn ve Cu'nun 0,2 mM konsantrasyonları *P. chrysosporium*'un miselyal gelişimini kuvvetli bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *P. sanguineus* ve *T. versicolor*'un sıvı kültürlerinin *P. sajor-caju*'nun 0,09 mM Pb konsantrasyonları ile benzer sonuç verdiği ve 0,07 mM Pb'nin *P. sajor-caju*'nun gelişimini % 85 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Benzer olarak çalışmamızda 0.1 mM Pb uygulamasının *P. sajor-caju*'da miselyal gelişimi tamamen

inhibe ettiği saptanmıştır. Çalışmamızda, *Pleurotus ostreatus*'da 0,05 mM Pb ve üstü konsantrasyonlarda % 10'dan daha az gelişimde inhibisyon söz konusu iken Pb'a karşı en hassas suşun *Pleurotus florida* olduğu saptanmıştır.

Beyaz çürükçül funguslar yüksek enzim sentezleme kapasitesine sahiptirler. Lakkaz, Mn-Peroksidaz, ligninaz, glikoz oksidaz ve NADH peroksidaz gibi hücre dışı enzimler çevre biyoteknolojisinde önemli yer tutmaktadır. Toksik maddelerin bulunduğu ortamlarda, bu enzimler üzerine çok fazla oranda araştırma yapılmasına rağmen antioksidatif savunma sisteminde yer alan hücre içi enzimler hakkında ayrıntılı bilgi yoktur. Bu nedenle son yıllarda ciddi çevre problemlerine neden olan boyar maddeler, ksenobiyotikler, serbest radikaller, bunların organizmalara etkileri ve bunlara karşı savunma mekanizmaları hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ağır metallerle maruz kalmaya bağlı olarak, organizmalarda detoksifikasyon enzimlerinin ve proteinlerinin verdiği cevaplar değişmektedir. Normal olarak hücreler SOD, GR, GST, GPX ve CAT gibi antioksidatif ve detoksifikasyon enzimlerini içeren hücrel savunma sistemleri tarafından ksenobiyotik, ağır metal ve oksidan/pro-oksidan toksisitesine karşı korunurlar (Demirci 2006).

*Phanerochaete chrysosporium*'un Pb stresine karşı yanıtı protein analizleriyle araştırılmıştır. Organizmada metal toleransının agar besiyerinde 1300 ppm, sıvı besiyerinde ise 1200 ppm olduğu bulunmuştur. *Phanerochaete chrysosporium*'un Pb'ye karşı biyosorpsiyon kapasitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Özcan 2003). Çalışmamızda benzer özellik göstermiş olup zamana bağlı olarak Pb biyosorpsiyonunun arttığı gözlenmiştir.

*Phanerochaete chrysosporium*'un Pb'li ortamda üretilmesine bağlı olarak oksidatif stres indüklenmiş ve buna bağlı olarak CAT, GR, GST enzimleri ile GSH seviyeleri etkilenmiştir. 20 ppm'lik ve 200 ppm'lik kurşun uygulamalarında CAT aktivitesi zamana bağlı olarak artmıştır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyine sahip reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir

serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.

GR aktivitesi kontrol grubunda 30, 60 ve 360. dakikalarda 1440. dakikaya göre artmıştır. 20 ppm kurşun uygulama grubunda GR aktivitesinin 30, 60 ve 360. dakikalarda kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenirken, 1440. dakikada hem kontrol grubundan hem de 200 ppm kurşun uygulama grubundan aktivitenin yüksek olduğu gözlenmiştir. 200 ppm kurşun uygulama grubunda uygulama süresine bağlı olarak GR aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. GR flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (Özkan ve Fışkın 2004).

Kontrol grubunda 360. dakikaya kadar GST aktivitesi artarken, 1440. dakikada bir baskılanma tespit edilmiştir. 20 ppm kurşun uygulama grubunda GST aktivitesinin uygulama süresine bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. 200 ppm kurşun uygulama grubunda 360. dakikaya kadar GST aktivitesi artarken, 1440. dakikada aktivitede bir baskılanma tespit edilmiştir. GST'nin hücredeki radikalleri temizlemek için tüketilmesine paralel olarak GSH miktarı düşmektedir. GSH radikal süpürücüdür, GSH düzeyindeki değişim hücredeki oksidatif stresin önemli bir göstergesidir.

GSH miktarı kontrol grubu 360. dakikada diğer sürelerle göre artmıştır. 20 ppm kurşun uygulama grubunda, GSH miktarının diğer uygulama gruplarına göre azaldığı görülmüştür. 200 ppm kurşun uygulama grubunda GSH miktarı diğer uygulama gruplarına göre artmıştır. Düşük konsantrasyon (20 ppm kurşun) GSH miktarında kontrole göre azalma gösterirken yüksek konsantrasyon (200 ppm kurşun) GSH miktarının artmasına neden olmuştur. GSH, oksiradikalleri temizleyen önemli bir antioksidan savunma sistemi elemanıdır. Bu yüzden GSH seviyesindeki değişiklik bir organizmanın detoksifikasyon yeteneğinin önemli göstergesidir. Bir organizmanın kirleticilere maruz kalma süresinin artmasıyla oksiradikallerinin artışına paralel olarak GSH seviyesi de indüklenmektedir.



Yıldırım (2004) yaptığı çalışmada, beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*'a farklı konsantrasyonlarda (5 µM, 500 µM) kadmiyum uygulamış ve antioksidan enzim ve GSH seviyesi üzerine etkilerini araştırmıştır. SOD, CAT, GST, aktivitelerinde indüksiyonlar ve GR aktivitesinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda (500 µM) inhibisyon tespit etmiştir. Yüksek kadmiyum uygulanan gruplarda GSH seviyesinde artış olduğunu saptamıştır (Yıldırım 2004).

Asma ve Yeşilada (2002) tarafından yapılan çalışmada paraquatın *Funalia trogii*'nin GSH seviyesi ve hücrel savunma enzimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Paraquatın beyaz çürükçül fungus *Funalia trogii*'nin detoksifikasyon enzimleri ve antioksidan savunma aktiviteleri üzerine etkisi belirlenmiştir. 1 mmol/L Paraquat uygulaması, GR, GST ve SOD aktivitelerini arttırmıştır. 0.1 mmol/L'lik paraquat uygulaması ise GR ve GST'nin aktivitesini etkilememiştir. Paraquat'ın bütün konsantrasyonları GSH miktarını ve CAT aktivitesini baskılamıştır (Asma ve Yeşilada 2002).

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile *Phanerochaete chrysosporium*'un ve tüm canlıların çevredeki ksenobiyotiklere direkt veya dolaylı maruz kalmaları sonucunda verdikleri antioksidan cevabın tam olarak belirlenmesiyle bu çevre kirleticilerinin ekosistemde oluşturabilecekleri risk daha iyi anlaşılacaktır. Yine biyoteknoloji alanında çeşitli amaçlar için kullanılan beyaz çürükçül fungusların stres faktörlerine karşı verdikleri antioksidan cevap belirlenmiş olup literatüre katkılar sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004 "Pesticides and oxidative stress : a review", *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K., 2003, "Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva", *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 135: 331-336.
- Akerboom, T. P. M. and Sies, H., 1981. "Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples", *Met Enzymol.*, 77, 373-382.
- Akkuş, İ., 1995, "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", *Mimoza Yayınları*:38, Sağlık Dizisi:5, ISBN:975-543-038-5, Konya.
- Alloway, B.J. and Ayres, D.C., 1993, "Chemical Principles of Environmental Pollution", Chapman & Hall, U.K., pp. 291.
- Asma, D. ve Yeşilada Ö., 2002, "Effect of paraquat on cellular defence enzymes and glutathione level of *funalia trogii*", *Folia Microbial*, 47:4.
- Benzer, F. ve Ozan S.T., 2003, "Fasciola hepaticae Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri", *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 657-661.
- Bergmann, W., 1992, "Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis", New York, pp. 695.
- Bigersson, O., Sterner, E., 1988, "Eine verständliche Einführung in die Toxikologie", *Chemie und Gesundheit*, VCH Verlagsgesellschaft.

Bradford MM., 1976, " A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", *Ann Biochem*; 72: 248-52.

Burtis, CA. and Ashwood, ER., 1999, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.

Cardoso, M.B. and Nicoli, J.R., 1981, "Single Cell Protein From The Thermotolerant Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Grown in Vinasse", *Nutrition Reports International*, 24(2): 249-255.

Chadzynski 1986, "Manual for The Identification and Abatement of Environmental Lead Hazards. Division of Maternal and Child Health", US Public Health Service, USA.

Chaney, R.L., Ryan, J.A., 1994, "Risk based standards for arsenic lead and cadmium in urban soils", Dechema, Frankfurt, Germany.

Chatterjee, J. and Chatterjee, C., 2000, "Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower", *Environmental Pollution*, 109, 69-74.

Ciğerci, İ. H., 2005, "*Palaemonetes turcorum* (Holthuis,1961) (decapoda)'da  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu", Doktora tezi, Anadolu üniv. Fen Bil. Ens., Eskişehir.

Cnubben N.H.P, Rietjens I.M.C.M, Wortelboer H, Zanden J. and Bladeren P.J., 2001, "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense", *Envorimental Toxicology and Pharmacology*.; 10:141-152.

Cochranc, C.G., 1991, "Cellular injury by oxidants", *Am. J. Med.*, 92: 235-305.

Couto, S.R. and Herrera, J.L.T., 2006, "Industrial and Biotechnological Applications of Laccase: A Review", *Biotechnology Advences*, 24: 500-513.

- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M. ve Harman, D., 1987, "Oxygene radicals and human disease" Ann. Intern. Med., 107: 526-545.
- Cumming, J.R. and Taylor, G.J., 1990, "Mechanism of Metal Tolerances in Plants: Physiological Adaptation for Exclusion of Metal Ions from The Cytoplasm", Wiley-Liss, Inc., 329-359.
- Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S., 1996, "Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins", Baltimore, Maryland.
- Demirci, Ö., 2006, "*Phanerochaete chrysosporium*'un antioksidatif sistemi üzerine astrazon kırmızı fbl tekstil boyasının etkisi", Y.Lisans tezi, İnönü Üniv. Fen Bil. Ens.
- Dhawale, S.S., Lane, A.C. and Dhawale, S.W., 1996, "Effects of Mercury on White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*", Bull. Environ. Contam.Toxicol, 56: 825-832.
- Dinges, R., 1982, "Toxic Materials- Methods of Control" Aquatic Plant Systems. An Unconventional Approach to Removal of Toxic Materials. Presented of The Tenth Water Resource Symposium, University of Texas, Austin, Texas.
- Duran, N. and Esposito, E., 2000, "Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil Treatment", A Review, Appl. Catal B Environ., 28: 83-99.
- El-Sokkary G.H., Kamel E.S. and Reiter R.J., 2003, "Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat", Cell Mol Biol Lett. 8: 461-470.

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001, "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage", *Curr Top Med Chem.* 1: 529-539.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000, "Oxidative Stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species", *Internal Microbiol.* 3:3-8.
- Gabriel, J., Kofronova, O., Rychlovsky, P. and Krenzelok, M., 1996, "Accumulation and Effect of Cadmium in The Wood-Rotting Basidiomycete *Daedalea quercina*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 383-3.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L. and Doucet, O., 2004, "Cosmetic and Dermatological Preparation Containing Copper-Binding Proteins for Skin Lightening", *Int Pat Appl.* WO2004017931.
- Grandjean, P., 1975, Lead in Danes. Historical and Toxicological Studies, *Environmental Quality and Safety, Supply, 2, Lead* (F.COULSTON and F.KORTE eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London, 6-75.
- Gurer, H., Ercal, N., 2000, "Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?", *Free Rad and Biol* 29: 927-945.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., Jakoby, W.B., 1974, "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver", *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct;71(10):3879-3882.
- Haghighii, B., Gorton, L., Ruzgas, T. and Jonsson, L.J., 2003, "Characterization of Graphite Electrodes Modified With Laccase From *Trametes versicolor* and Their Use For Bioelectrochemical Monitoring of Phenolic Compounds in Flow Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta*, 487: 3-14.

- Halliwell B., 1989, "Oxidants and the central nervous system : Some fundamental questions", *Acto Neurol. Scand*,126:23-33.
- Hatvani, N. and Mecs, I., 2003, "Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*", *Ecotoxicology and environmental safety*: 55,199-203.
- Hellawell, J., 1986, "Biological indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management", Elsevier Science, 186-195.
- Hilmi, Ş.,1994, "Oksidanlar ve antioksidanlar", *THT Drg*, 48:1-2,44-49.
- İmre Z., 1988, "Toksikoloji", İstanbul Üniversitesi Yayınları, 224-267, İstanbul.
- Jamil, K., Madhavendra, S.S., Jamil, M. and RAO, P.V.R., 1987, "Studies on Water Hyacinth as a Biological Filtre for Treating Contaminants from Agricultural Waste and Industrial Effluents". *J. Environ. SCL. Health, B.*, 22(1): 103-112.
- Jaouani, A., Tabka, M.G. and Pennickx, M.J., 2006, "Lignin Modifying Enzymes of *Coriolopsis polyzona* and Their Role in Olive Oil Mill Wastewater Decolourisation", *Chemosphere*, 9: 1421-1430.
- Jiang, W., Liu, D. and Hou, W., 2000, "Hyper accumulation of lead by roots, hypocotyls, and shoots of *Brassica juncea*", *Biologia Plantarum*, 43(4), 603-606.
- Jenkins RR and Tengi, 1981, "Catalase activity in skeletal muscle of varying fibre types", *J. Experientia* 37(1):67-8.
- Karataş, S. ve Kalay M., 2002, "*Tilapia zilli*'nin Solungaç, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Kurşun Birikimi", *Türk J. Vet.Anim.Sci.*, 26, 471-477.
- Kaynak, K., 2002, "Akciğer Kanserinde Oksidatif Stresin Rolü", *Solunum*:4:468-473.

- Kılınç, K. ve Kılınç, A., 2002, "Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri", Hacettepe Tıp Dergisi; 33(2): 110-118.
- Kılınç, K., 1985, "Oksijen Radikalleri : Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri", Biyokimya Dergisi, 2:59-89.
- Kıran, Y. ve Munzuroğlu, Ö., 2004, "Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Kurşunun Etkileri", F.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(1), 1-9.
- Kitman J.L., 2000, "The secret history of lead", The Nation, March 20, 11-44.
- Knapen, M.F.C.M, Zusterzeel P.L.M, Peters W.H.M, Steegers E.A.P., 1999, "Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction", European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 82: 171-184.
- Kuhad, R.C., Singh, A. and Eriksson, K., 1997, "Microorganisms and Enzymes Involved in The Degradation of Plant Fiber Cell Wall", Berlin.
- Landis, W.G. and Yu, W.H., 2004, "Environmental Toxicology", CRC Press. LLC, Boca Raton, FL. pp. 483.
- Levander, OA, Morris, VC, Ferretti, RJ., 1977, "Filterability of erythrocytes from vitamin E-deficient lead-poisoned rats", J. Nutr 107: 363-372.
- Livingstone, D.R., Forlin, L., George, S.G., 1994, "Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms", Freshwater Biological Association, 154-171.

- Luck, H., 1963, Catalase. In H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analyses*, Verlag chemie Academic Press, Weingheim, 885-888, New York.
- Lohr, J.B., 1991, "Oxygen Radicals and Neuropsychiatric Illness", *News and Views. Arch Gen Psychiatry*, 48:1097-1106.
- Matés, J.M., 2000, "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology", *Toxicology*, 153: 83-104.
- Nyanhango, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. and Steiner, W., 2002, "Decolorization of Textile Dyes by Laccase From a Newly Isolated Strain of *Trametes modesta*", *Water Res.*, 36: 1449-1465.
- Ott, T., Fritz, E., Polle, A. and Schützendübel, A., 2002, "Charachterisation of antioxidative system in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. And its reaction to cadmium", *FEMS Microbiology Ecology*, 42, 359-366.
- Özcan, S., 2003, "*Proteome analyses of Pb(II), Ni(II) and Cr(III) response in P. chryso sporium*", Doktora Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özkan, A. ve Fışkın, K., 2004, "Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler", *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14:52-60.
- Pang, D.J., 1995, "*Lead in the Environment*", *Handbook of Ecotoxicology*, 356-391.
- Paşayev, A., 2005, "Ağır Metal İyonlarının Etkisiyle Bitkilerde Serbest Radikalli Lipoperoksidasyonun İncelenmesi", Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.



- Pointing, S.B., 2001, "Feasibility of bioremediation by white-rot fungi", *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:20-33.
- Ribarov, S.R. and Benov, LC., 1981, "Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation", *Biochim Biophys Acta* 640: 721-726.
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A. and Hatakka, A., 1991, "Production of Laccase Lignin Peroxidase by Various Strains of *Trametes versicolor* Depending on Culture Condition", *Acta Microbiologica Polonica*, 40: 221-234.
- Sağlam, N. ve Cihangir, N., 1995, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi* 11: 157-161.
- Sandhir, R. and Gill, K. D., 1995, "Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats", *Biol Trace Elem Res* 48: 91-97.
- Sies, H., 1999, "Glutathione and Its Role in Cellular Functions", *Free Radical Biology and Medicine*, 27:916-921.
- Somashekaraiah, B., Padmaja, K. and Prasad, A.R., 1992, "Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos", *Free Radic Biol Med.*,13: 107-114.
- Swamy, J. and Ramsay, J.A., 1999, "The Evaluation of White – Rot Fungi in The Decolorization of Textile Dyes", *Enzyme. Microb. Technol.*, 24: 130-137.
- Tietz, NW., 1995, "Clinical Guide to Laboratory Tests", W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Yeşilada, Ö. ve Bozcuk, A.N., 1990, "Alkol Fabrikası Atığının Renginin Gideriminde Bazı Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı", *Çevre Biyolojisi Sempozyumu*, Ankara.

- Yıldırım, N., 2004, "Farklı konsantrasyonlarda kadmiyumun beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*'un (ME446) antioksidatif enzim aktiviteleri ve glutatyon seviyesi üzerine etkileri " Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Young, I.S. and Woodside J.V., 2001, "Antioxidants in health and disease", J Clin Pathol, 54:176-186.
- Vural, N., 1984, "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 315-323, Ankara.
- Zhou, Z., and Kang, Y., 2000, "Cellular and Subcellular Localization of Catalase in the Heart of Transgenic Mice", Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 48(5):585- 594.
- Wesenberg, D., Bouchon, F. and Agathos, S. N., 2002, "Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula duseinii*", Biotechnol. Lett. 24, 989-993.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** Sadık SATILMIŞ

**Doğum Yeri** Konya

**Doğum Tarihi** 02.04.1977

**Medeni Hali** Evli

**Yabancı Dili** İngilizce

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

**Lise** Ilgın Lisesi, 1993

**Lisans** Selçuk Üniversitesi, 1999