

TC.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Cd(II) VE Cu(II) AĞIR METAL STRESİ UYGULANAN  
*PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*'DA  
ANTİOKSİDAN ENZİMLERDE DEĞİŞEN  
MİKTARLARIN BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Güler TOPRAK**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2007  
KAYSERİ**



TC.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Cd(II) VE Cu(II) AĞIR METAL STRESİ UYGULANAN  
*PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*’DA  
ANTIÖKSİDAN ENZİMLERDE DEĞİŞEN  
MİKTARLARIN BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Güler TOPRAK**

**Tezi Yöneten  
Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
EÜBAP-FBT-06-72 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

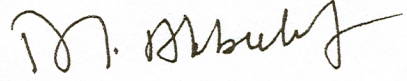
**Temmuz 2007  
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Güler TOPRAK** tarafından hazırlanan “**Cd (II) ve Cu (II) Ağır Metal Stresi Uygulanan *Phanerocahete chrysosporium*'da Antioksidan Enzimlerin Değişen Miktarlarının Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

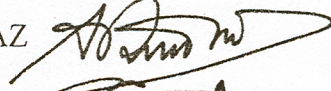
30.07.2007

**JÜRİ:**

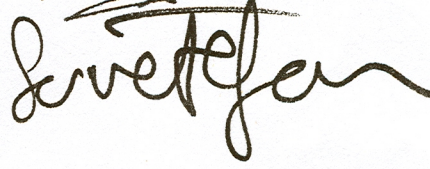
Başkan : Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT



Üye : Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman AYVAZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN



**ONAY:**

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun **07/08/2007** tarih ve **20.07/24-24** sayılı kararı ile onaylanmıştır.



**N. Ayyıldız**  
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana göstermiş olduğu anlayış, yardım ve yönlendirmelerden ve yalnız bilimsel çalışmalarla sınırlı kalmayıp benim kişisel vasıflarıma da yapmış olduğu katkılardan dolayı değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

İhtiyaç duyduğum her an değerli yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT 'a ve Dr. Ebru SAATÇI' ye sonsuz teşekkür ederim. Verdiği sonsuz moral ve destek için değerli hocam sayın Doç. Dr. Coşkun TEZ' e de teşekkürlerimi bildiririm.

Ayrıca hayata dair bana öğrettikleri tüm bilgiler ve kazandırdıkları tüm deneyimler için diğer hocalarıma şükranlarımı sunarım.

En özel teşekkürlerim ise beni hayat yolculuğumun her safhasında olduğu gibi bu safhasında da yalnız bırakmayan aileme. En zor anlarımda yanımda olup beni yüreklendiren, bana tuttuğumu koparmayı öğreten, idealistliği aşıl原因 kıymetli babam Tuncer TOPRAK. Şefkatini, duasını benden esirgemeyen her türlü kahrıma katlanan yüreği tertemiz annem Gülderen TOPRAK. Sıkıntılara katlanan, öfkeme sabreden kardeşlerim Gülsen, Azime, Tuğba ve Murat TOPRAK ve dedem Ömer TOPRAK. Hep yanımda olmanız temennisi ile sizleri çok seviyorum.

Bir özel teşekkür de laboratuvar ortamını uyum içinde paylaştığım çalışma arkadaşlarım Rıdvan TEMİZGÜL, Nuri ERCAN, Ahmet G. YEDİYILDIZ, Selcen ÇAKIR, Kadiriye URUÇ, Mustafa ÇEVRİM ve Ayşegül EKŞİ ve hocam Arş. Gör. Fahriye SÜMER için. Laboratuvar çalışmalarım sırasında benimle olan öğrenci arkadaşlarım Neşe, Canan, Seval, Güzel ve Tuğba ' ya da emekleri için çok teşekkür ediyorum.

Can dostlarım, yakınımda olmasalar da hep yanımda duran arkadaşlarım Binnaz, Gülen, Tülay ve Meryem hep benimle olun. Arkadaşım olduğunuz için teşekkürler.

Ve en büyük minnettarlığım sana. Bana verdiğin her şey için sana sonsuz şükranlar...

**Cd(II) VE Cu(II) AĞIR METAL STRESİ UYGULANAN *PHANEROCHAETE CHRYSO Sporium*'DA ANTiOKSiDAN ENZiMLERDE DEĞiŞEN MİKTARLARIN BELİRLENMESİ**

**Güler TOPRAK**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2007**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN**

**ÖZET**

*Phanerochaete chrysosporium* beyaz çürükçül mantarlar grubunun bir üyesi olup lignin, selüloz ve hemiselülozu metabolize eder. Bu organizma potansiyel olarak ağır metal ve diğer kirleticilerin biyoremediasyonu amacıyla de kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Phanerochaete chrysosporium* hücreleri minimal besi yerinde, zamana bağımlı sabit dozda vejetatif hücreler ve doza bağımlı sabit zaman spor formunda hücreler büyütülerek bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) streslerine maruz bırakılmıştır. Vejetatif hücre ekstraktlarından elde edilen antioksidant enzimlerin aktivitelerine Cu ve Cd ağır metallerinin stres etkisi incelenmiştir. Zamana bağımlı SOD aktivitesi'nin Cu ve Cd muamelelerinden anlamlı olarak etkilenmediği gözlenmiştir. Benzer sonuçlar katalaz ve glutatyon s-transferaz aktiviteleri için de gözlenmiştir. Glutatyon redüktaz ve askorbat peroksidaz aktiviteleri, Cu muamelesi sonucunda önemli ölçüde artmıştır. Diğer taraftan, Cd varlığında glutatyon redüktaz aktivitesi, Cu varlığında gözlenen aktiviteye nazaran daha düşük bulunmuştur. Buna rağmen Cu varlığındaki aktivite de kontrol hücrelerinden elde edilen aktiviteden daha yüksek olmuştur. Cd stresine maruz kalmış vejetatif hücrelerde askorbat peroksidaz aktivitesinde inhibisyon gözlenmiştir. Doza bağımlı sabit zaman spor formundan yetiştirilen hücrelerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde bakır stresi, kadmiyum stresine oranla enzim aktiviteleri üzerine daha etkili olmuştur. Yapılan denemeler sonucunda hücrede antioksidan enzimleri için Cd muamelesinin daha toksik bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ağır metal stresi, katalaz, Süperoksit Dismütaz, Askorbat Peroksidaz, Glutatyon S-Transferaz, Glutatyon Redüktaz, *Phanerochaete chrysosporium*.

**EFFECTS OF Cd(II) and Cu(II) HEAVY METAL STRESSES ON  
ANTIOXIDANT ENZYME SYSTEMS OF *PHANEROCHAETE  
CHRYSOSPORIUM***

**Güler TOPRAK**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**M.Sc. Thesis, July 2007**

**Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

**ABSTRACT**

*Phanerochaete chrysosporium*, a white rot fungus, metabolizes lignin, cellulose, hemicellulose and it is potentially useful organism for biosorption of heavy metals and other pollutants. In this study, antioxidant enzyme activities from the cell extracts were investigated as a function of Cu and Cd heavy metal stress. *P. chrysosporium* cells, grown either vegetatively or from spore forms in glucose minimal medium, were exposed to Cu and Cd heavy metal stresses in either dose-dependent with fixed time or time-dependent fixed dose manner. The results demonstrated that the time dependent SOD activity was not significantly affected from Cu and Cd treatments. The same results were observed for the catalase and glutathione S-transferase activity. In Cu treatments, glutathione reductase and ascorbate peroxidase activities were significantly increased. On the other hand, glutathione reductase activity was found to be lower in the presence of Cd compared to Cu stress. Also, Cu stressed cells glutathione reductase activity was higher than that of the control cells. Vegetatively grown cells that were exposed to Cd demonstrated inhibited ascorbate peroxidase activity. The results show that Cu was more effective than Cd enzyme activities in the spore cells. Overall, in our experimental data suggested that the Cd exposure has more toxic affect on cells in terms of antioxidant enzymes.

**Keywords:** Heavy metal stress, Catalase, Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase, *Phanerochaete chrysosporium*

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
1. BÖLÜM	
GİRİŞ .....	1
1.1. Çevre.....	1
1.2. Çevre Kirliliği ve Doğal Birikim.....	1
1.2. Ağır Metaller.....	2
1.2.1. Kadmiyum.....	3
1.2.2. Bakır.....	4
1.3. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	5
1.4. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ile Yürütülen Çalışmalar.....	5
1.5. Oksijenin Aktivasyonu ve Serbest Radikaller.....	7
1.6. Hücredeki Serbest Radikal Oluşturan Kaynaklar.....	8
1.7. Oksijen Radikallerinin Meydana Getirdiği Hasarlar.....	9
1.7.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar.....	10
1.7.2. DNA' da Meydana Gelen Hasarlar.....	10
1.7.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar.....	10
1.8. Antioksidan Savunma Sistemi.....	11
1.8.1. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi.....	11
1.8.2. Enzimatik Savunma Sistemi.....	11

1.8.2.1. Süperoksit Dismütaz .....	12
1.8.2.2. Katalaz.....	13
1.8.2.3. Askorbat Peroksidaz.....	14
1.8.2.4. Glutasyon Redüktaz.....	15
1.8.2.5. Glutasyon S-Transferaz.....	16
1.9. Çalışmanın Amacı.....	17
<b>2. BÖLÜM</b>	
<b>MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
2.1. Mikroorganizma.....	18
2.2. Biyokütlenin Hazırlanması.....	18
2.3. Kültürlerin Ağır Metal İle İndüklenmesi.....	19
2.4. Protein Ekstraksiyonu.....	20
2.5. Protein Miktarının Tayini.....	20
2.6. Enzim Aktivitelerinin Tayini.....	22
2.6.1. Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.6.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	25
2.6.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
2.6.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
2.6.5. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
2.6.6. İstatistiksel Analiz.....	27

### 3. BÖLÜM

BULGULAR .....	28
3.1. Biyokütle.....	28
3.2. SOD' a Ait Bulgular.....	28
3.3. Katalaz'a Ait Bulgular.....	31
3.4. Askorbat Peroksidaz'a Ait Bulgular.....	34
3.5. Glutasyon Redüktaz'a Ait Bulgular.....	37
3.6. Glutasyon S-Transferaz'a Ait Bulgular.....	40

### 4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	44
4.1. Süperoksit Dismütaz.....	44
4.2. Katalaz.....	46
4.3. Askorbat Peroksidaz.....	47
4.5. Glutasyon Redüktaz.....	49
4.6. Glutasyon S-Transferaz.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

**KISALTMALAR**

Perhidroksil radikali.....	OOH <sup>*</sup>
Singlet oksijen.....	O <sub>2</sub> <sup>1</sup>
Reaktif Oksijen Türleri.....	ROS
Süperoksit Dismütaz.....	SOD
Glutasyon redüktaz.....	GR
İndirgenmiş glutasyon.....	GSH
Okside glutasyon.....	GSSG
Hidrojen peroksit.....	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Süperoksit radikali.....	O <sup>2-</sup>
Hidroksil radikali.....	OH
Distile su.....	dH <sub>2</sub> O
Sabaraud Dekstroz Agar Slant.....	SDAS

**ŞEKİLLER LİSTESİ**

Şekil 1.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve süperoksit ve hidrojen peroksitin enzimatik yollarla uzaklaştırılmaları.....	8
Şekil 2.1. BSA Standartlarından Elde Edilen Grafik Örneği.....	20
Şekil 2.2. SOD Standartlarından Elde Edilen Logaritmik Grafik Örneği.....	23
Şekil 2.3. Doğrusal SOD Standart Grafiği Örneği.....	24
Şekil 3.1. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait SOD aktivite değerleri grafiği.....	29
Şekil 3.2. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait SOD aktivite değerleri grafiği.....	30
Şekil 3.3. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait katalaz aktivite değerleri grafiği.....	32
Şekil 3.4. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait katalaz aktivite değerleri. grafiği.....	33
Şekil 3.5. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait askorbat peroksidaz aktivite değerleri grafiği.....	35
Şekil 3.6. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait askorbat peroksidaz aktivite değerleri grafiği .....	36

Şekil 3.7. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait glutatyon redüktaz aktivite değerleri grafiği .....	37
Şekil 3.8. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait glutatyon redüktaz aktivite değerleri. grafiği .....	39
Şekil 3.9. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait glutatyon s-transferaz aktivite değerleri grafiği .....	40
Şekil 3.10. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait glutatyon s-transferaz aktivite değerleri grafiği .....	42

## 1.BÖLÜM

### GİRİŞ

#### 1.1. Çevre

Çevre sözcüğü son yıllarda konuşma diline girecek kadar güncelleşmiştir. Zira çevre kirliliği, çevre sorunları ya da çevre koruma gibi deyimler günlük konuşma ve yazılarda sıkça kullanılmaktadır. Günümüzde geniş bir kapsama sahip çevre sözcüğü “ortam” ifadesi ile aynı anlamda kullanılırken 1970’li yıllardan itibaren anlamı genişlemiştir. Çevrenin en geniş anlamı ile tanımı “Bir canlının veya canlılar toplumunun yaşamını sağlayan ve onu devamlı etkisi altında bulunduran süreçler, enerjiler ve maddesel varlıkların bütünlüğü “şeklinde tanımlanabilir [1].

#### 1.2. Çevre Kirliliği ve Doğal Birikim

Günümüz dünyasındaki nüfus artışı, hızlı kentleşme ve teknolojik gelişmeler sonucu oluşan ve doğal kaynakları tehdit eden çevre kirlenmesi insanlığın en önemli sorunlarından birini oluşturmaktadır. Başta insan olmak üzere, tüm canlılar çevre kirlenmesinden önemli ölçüde etkilenmekte, bazı durumlarda yaşamları sınırlanmakta, hastalıklara ve hatta ölümlere yol açmaktadır.

İnsanların çevrelerinde meydana getirdikleri ekolojik etkilerin tümü çevre sorunları adı altında somutlaşmaktadır. Bu sorunlar nitelikleri açısından sanayi, tarım, ulaşım ve turizm gibi ekonomik sektörlerden, göç ve kentleşme hareketlerine bağlı alt yapı eksikliklerinden ve doğal kaynakların rasyonel şekilde kullanılmamalarından kaynaklanmaktadır. Çevrede oluşan ve rahatsız edici ve zararlı etkilerin tümü çevre kirlenmesi adı altında toplanmakta ve “İnsanların her türlü aktiviteleri sonucu havada, toprakta ve suda oluşan olumsuz gelişmeleri ile ekolojik dengenin bozulmasına neden olan ve aynı aktiviteler sonucu ortaya çıkan koku, gürültü ve atıkların çevrede oluşturduğu istenmeyen sonuçlar” şeklinde tanımlanmaktadır [1].

İnsanlar tarafından üretilmiş ve doğa için kirletici olan maddelerden bazıları besin zincirindeki organizmalarda birikebilirler. Bu kirleticilerden bazılarının biyolojik açıdan zararsız hale getirilmesi de söz konusu değildir. Bu tip kirleticilerin önemli bir bölümünü ise ağır metaller oluşturmaktadır [1].

### **1.3. Ağır Metaller**

Eser miktarları dahi zararlı olabilen maddeler arasında en önemli gurubu ağır metaller olarak adlandırılan Cu, Cd, Cr, Pb, Mn, Hg, Zn gibi elementler oluşturmaktadır [1]. İster doğal, ister insan aktiviteleri sonucu olsun, ağır metallerin varlığı çevre açısından önemli bir tehlike oluşturmaktadır. Her gün büyük miktarlarda ağır metal, metal işleme yapılan endüstriyel aktiviteler sırasındaki işletme yetersizlikleri sonucu alıcı ortamlara deşarj edilmektedir. Endüstriyel aktivitelerin yanı sıra tarımsal faaliyetlerin yol açtığı metal kirliliği de göz ardı edilemeyecek kadar önemlidir. Ağır metallerin yarattığı en önemli problem, bu metallerin besin zincirinde akümüle olarak insana kadar ulaşmaları ve doğada kalıcı olmalarıdır [2].

Ağır metaller düşük konsantrasyonlarda dahi oldukça toksik olmaları sebebiyle yüksek organizasyonlu canlılarda sinirlere, ciğerlere, kemiklere zarar verebilecekleri gibi moleküler düzeyde de hayati fonksiyonlara sahip enzimleri etkisiz hale getirebilmektedirler.

Bu metallerin buldukları ortamdan uzaklaştırılması amacı ile çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında redüksiyon, kimyasal çöktürme, filtrasyon, elektrokimyasal muamele, havalandırma yer almaktadır. Bu tekniklerin de kullanımı sınırlı olup, sekonder (ikincil) çevre kirliliklerine de yol açabilmektedirler.

Tüm bu sebeplerden dolayı ağır metal içeren endüstriyel atıklardan metallerin uzaklaştırılması amacıyla, çeşitli biyokütle tiplerinin biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyon için kullanılması çalışmaları son yıllarda yoğunlaşmıştır. Biyosorpsiyon ve biyoakümülyasyonda yer alan moleküler mekanizmaların anlaşılması, yeni biyosorbentlerin geliştirilmesine ve metal içeren atıkların tasfiyesinde daha ileri teknolojilere olanak vereceği düşünülmektedir. Bu sebeple bitki ve mikroorganizmaların bazıları giderek yaygınlaşan bir şekilde ağır metal kirliliğinin

uzaklaştırılmasında potansiyel temizleyici olarak görülmektedir ve bu amaçla yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Örneğin *Thlaspi caerulescens* yüksek Cd konsantrasyonlarında hayatta kalabilen ve Cd'a karşı toleransı oldukça yüksek bir organizma olarak tanımlanmıştır [3]. *Brassica napus* bitkisi üzerinde Zn ile kirletilmiş tarım topraklarının fitoremediasyonu ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür [4]. Sulu çamurlarda bulunan filamentli bir mikroorganizma olan *Nocardia amarae*'nin metal bağlama kapasitesi araştırılmıştır [5]. Endüstriyel bir suş olan ve bira fabrikası atıklarından toplanan *Saccharomyces cerevisiae*'nin sulu solüsyonlardan kurşun, kadmium, ve bakırı uzaklaştırma etkinliği üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur [6]. Bir siyanobakteri olan *Oscillatoria anguistissima*'nin sulu solüsyonlardan etkili şekilde  $Zn^{+2}$  biyosorpsiyonu gerçekleştirebildiği literatür bilgileri arasında yer almaktadır [7].

Mikroorganizmaların çeşitli derecelerde ağır metal stresine karşı cevap geliştirdiği bilinmektedir. Bu amaçla yapılmış çalışmalardan bazılarını şu şekilde özetleyebiliriz. Bir siyanobakteri olan *Anabaena sp.* PCC 7120 suşu üzerinde Fe eksikliğinin neden olduğu oksidatif stres üzerine çalışmalar yürütülmüştür [8].  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  ile indüklenmiş alg hücrelerinde metal direnç mekanizmasının anlaşılması için mikroalglerden *Pavlova viridis* organizma olarak kullanılmış ve oksidatif stresi gidermek için antioksidan enzim seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir [9]. Yapılan çalışmada mayalarda da ağır metal uygulamasının oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir. Cd uygulaması yapılmış *Rhizopogon roseolus*'da Mn-SOD aktivitesinin azaldığı, bu durumun aksine Cd uygulanmış *Paxillus involutus* kültürlerinde Mn-SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [10].

### 1.3.1. Kadmiyum

Kadmiyum (Cd(II)), “üç” büyük toksik metalden biri olması sebebiyle toksik atık olarak değerlendirilmekte ve yüzey sularında bulunan kadmium besin zincirinde daha yoğunlaşmakta ve insan sağlığı için çok ciddi tehlike oluşturmaktadır. Kadmiyum yarılanma ömrü 10–30 yıl arasında olan ağır metallere biridir. En yaygın kullanım alanları arasında piller bulunur. Ayrıca, kadmiyum deşarj eden başlıca endüstriler madencilik, maden eritme, metal kaplama, elektronik, alaşım hazırlama endüstrisi, boya maddeleri, fosfat gübreleri, deterjanlar da kadmiyum içeren bileşikler arasındadır.

Kadmiyum potansiyel olarak toksik bir metaldir ve biyolojik fonksiyonlar için hayati gerekliliği yoktur. Bu ağır metal çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etkisini gösterebilir. Yapılan çalışmalar neticesinde 1  $\mu\text{M}$  Cd ile 24 saat muamele edilmiş mısır bitkisinin kök büyümesinde % 30 oranında inhibisyon meydana geldiği bildirilmiştir [11].

Ağır metaller toksik etkilerini enzim gibi önemli işlevsel moleküllerin fonksiyonel guruplarını bloke ederek, gerekli iyonların taşınmasına engel olarak gösterirler. Kadmiyum tiollerle veya reaktif moleküllere karşı korunmada görevli enzimlerle reaksiyona girmelerinin bir sonucu olarak serbest radikallerin oluşumunu tetikler. Kadmiyumun plazma membranındaki sülfidril gurubu gibi organik ligantlara bağlanmak sureti ile membranda yapısal lezyonların oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir [12].

### **1.3.2. Bakır**

Bakır (Cu) ısı ve elektrik iletkenliği sebebi ile sanayi de oldukça fazla kullanılır. Boya, kağıt, petrol, gübre üretimi ve bakır/pirinç kaplama endüstrileri bakır deşarj eden diğer başlıca endüstrilerdir. Ayrıca bakır sülfat depolarda ve su şebekelerinde algisit olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, su ve atık sularda önemli miktarlarda bakır bulunmaktadır. Normal konsantrasyon değerlerinin üstünde de canlılarda toksik etki göstermektedir. Bakırın toksisitesi temel olarak serbest iyonlarla ilişkilidir. Bakır bir redoks metalidir ve hidroksil, peroksi ve alkoksi radikalleri gibi serbest radikallerin oluşmasını katalizler. Bu sebeple, hücrede oksidatif strese neden olur [13]. Bakırın membrandaki proteinlerin sülfidril guruplarına bağlanarak membrana zarar verdiği bilinmektedir. Ayrıca bakırın lipit peroksidasyonunu da tetiklediği bilgiler arasındadır [14].

#### 1.4. *Phanerochaete chrysosporium*

*Phanerochaete chrysosporium*'un taksonomisi:

Alem	:	Fungi
Şube	:	Basidiomycota
Sınıf	:	Hymenomycetes
Alt sınıf	:	Homobasidiomycetes
Takım	:	Aphyllophorales
Familya	:	Corticaceae
Cins	:	Phanerochaete

*P. chrysosporium* Burdsall tarafından 1974 yılında tanımlanmıştır [15]. Beyaz çürükçül mantarlar olarak bilinen gruba ait model bir organizmadır. Bu ismi bitki hücre çeperindeki kahverengi olan lignini parçaladıktan sonra geride beyaz bir selüloz kalıntısı bırakmaları sebebi ile alırlar. Bu mantarlar ligninin depolimerizasyonunu ve mineralizasyonunu etkili şekilde gerçekleştirirler [15]. Ligninolitik sistemin hücre dışına salınan oksidatif enzimlerden olan peroksidazlar tarafından sağlandığı düşünülmektedir [16]. Ligninin yanı sıra bitki hücre çeperinin diğer temel birimleri olan selüloz ve hemiselülozu da parçalama yeteneğine sahiptirler [17]. Ayrıca oksidasyon enzimlerini kullanmak sureti ile organik kirleticilerin parçalanması yönünde de *P. chrysosporium* kullanılarak birçok çalışma yürütülmektedir [18].

*P. chrysosporium* katı ve sıvı ortamlarda yaşayabilir. Ayrıca sınırlı besine de sahip olsalar zenobiyotikleri etkili şekilde parçalama yeteneği sergiler. Bu özelliklerinden dolayı kompleks çevre kirliliğinin bulunduğu ortamlara adapte olabilir ve inoküle (aşılındıkları) edildikleri toprakta diğer mikroorganizmalardan daha etkili şekilde büyür. Bu durum metal ile kirlenmiş toprakların bioremediasyonu (iyileştirme) için bir avantaj teşkil eder [19].

##### 1.4.1. *Phanerochaete chrysosporium* ile Yürütülen Çalışmalar

Beyaz çürükçül bir fungus olan *P. chrysosporium*'un canlı ve/veya inaktive edilmiş formları ağır metal uzaklaştırılmasında biyosorbent model organizma olarak kullanılmıştır [20, 21].

Bu organizmada metal bağlama kinetikleri detaylı bir biçimde incelenmiştir [20, 21, 22]. Kültür ortamında yapılan çalışmalarda Pb, Cd, Ni, Co, Mg, Hg ve Cu'nun yüksek konsantrasyonunun büyüme olumsuz etkilediği misel oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir [23]. Bu çalışmalar göstermektedir ki, ağır metaller hücre içerisine yüksek miktarda transport edilmektedir.

*P. chryso sporium*'un genom projesi büyük oranda tamamlandığı halde [24] proteinlerine ilişkin bilgiler (ORF tanımlamaları hariç) azdır ve moleküler hücre biyolojisi hakkında literatür bilgileri oldukça sınırlıdır. Bu model organizmanın gerek ağır metallerle gerekse doğal ortamını mimik ederek yapılan moleküler çalışmaları şöyle özetleyebiliriz: *P. chryso sporium*'un çözünür proteinlerinin belirlenmesine yönelik 2-DE jel çalışmaları yürütülmüş bu aşamayı takibinde MALDI-TOF-MS analizleri yapılmak sureti ile organizmanın büyüdüğü koşullar altında açığa çıkan protein spotlarının tanımlanması çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bu organizmanın ağır metal (Cu ve Cd) uygulamasına karşı gösterdiği tepki kısmende olsa proteom düzeyinde belirlenmiştir [25]. *P. chryso sporium* hakkında yapılan bir diğer bir moleküler çalışma da sekretomdur. Selüloz içeren ortamda yetiştirilen organizmanın meydana getirdiği gen ürünlerini protein düzeyinde tanımlamaya yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla elde edilen veriler ve veritabanı karşılaştırmaları yapılmıştır [17].

*P. chryso sporium* genetik analiz çalışmalarında da kullanılmıştır. Genomdaki çeşitli tekrarlayan elementlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Ayrıca korunmuş elementlerin sekanslanması ve haritalanması yapılmıştır [26]. Ayrıca *P. chryso sporium* kullanılarak çeşitli hücre dışı uyarılara karşı geliştirdikleri antioksidan enzimler hakkında çalışmalar yürütülmüştür. Besi yerinde düşük ve yüksek azot içeriği oluşturulmak sureti ile yürütülen çalışmada katalaz aktivitesi incelenmiştir [16]. Bu organizma model olması ve kağıt endüstrisinde kullanımı sebebiyle çeşitli enzimlerin (ligninaz/peroksidaz) tanımlanması ve saflaştırılmasına yönelik olarak çeşitli çalışmalar da yürütülmüştür [27].

Çevreyi kirletici bileşiklerin etkisizleştirilmesi ile ilgili olarak yürütülen çalışmaların en yaygın olanı biyosorpsiyon çalışmalarıdır. Konvansiyonel tekniklere potansiyel alternatif olarak ağır metal ve diğer organik kirleticilerin etkili şekilde, maliyeti düşük

ve çevreyle dostu tekniklerle temizlenme arayışlarında *P. chrysosporium* oldukça tercih edilen bir organizma durumundadır. Biyosorpsiyon etkinliği, değişen kirletici kimyasal bileşiklere karşı geliştirilen absorpsiyon kapasitesi çalışmaları yürütülmüştür. Pb ile kirletilmiş topraklarda yürütülen bioremediasyon çalışmalarında da bu fungus tercih edilmiştir [19].

### 1.5. Oksijenin Aktivasyonu Ve Serbest Radikaller

Dünya üzerindeki hayata ait önemli bir gizem de aerobik yaşamı destekleyen oksijen molekülünün yalnız enerji metabolizması ve solunum için önemli olmakla kalmayıp, aynı zamanda canlı için zararlı koşullara ve hastalıklara da zemin hazırlamasıdır [28]. Yaşlanma, kanser vs. gibi birçok durumun temel sebebi oksijenin indirgenmiş formlarıdır.

Temel durumda bulunan atmosferik oksijen, diğer gaz halde bulunan elementlerden farklıdır. Bunun sebebi oksijenin biradikal diğer bir ifade ile iki adet eşleşmemiş elektrona sahip olmasıdır. Bu özelliği sebebi ile oksijen aktive edilmediği sürece organik moleküllerle reaksiyona girmez. Oksijendeki eşleşmemiş elektronlar paralel spinlere sahip olduğunda aktivasyon kazanırlar. Eşleşmemiş elektronlar zıt spinlere sahip olduklarında oksijen molekülü organik maddelere karşı reaktif değildir.

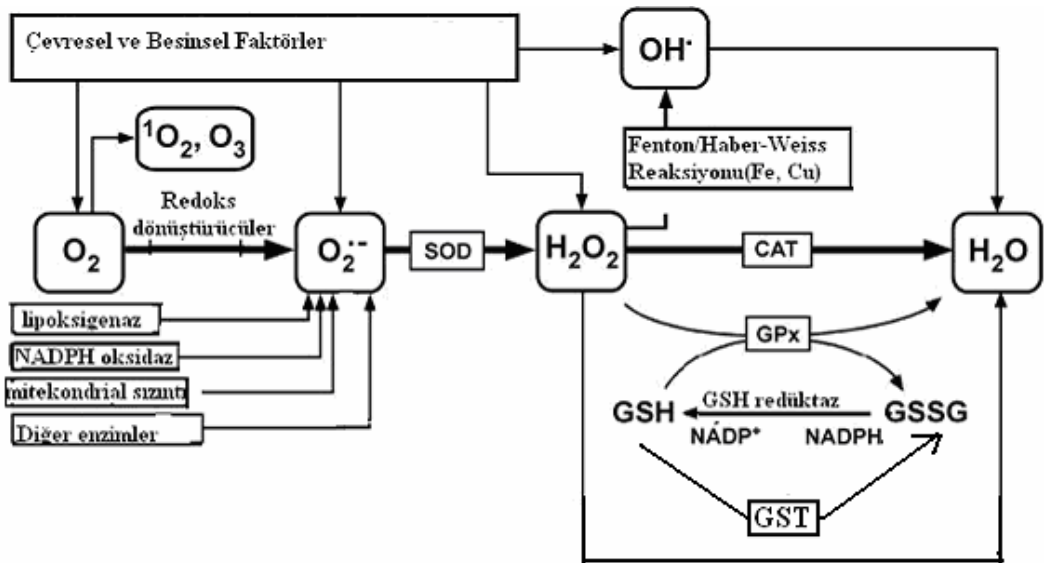
Oksijenin aktivasyonuna ait mekanizmada oksijenin kademeli olarak süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojenperoksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^-$ ) ve son olarak da suya indirgenmesi söz konusudur.

Süperoksit hem oksidant hem de redüktant olarak görev yapabilir; kükürdü, askorbik asidi ve NADPH'ı oksitleyebileceği gibi sitokrom *c* ve metal iyonlarını da indirgeyebilir. Süperoksitin dismütasyonu ile hidrojen peroksit ve oksijen meydana gelir ve bu durum kendiliğinden oluşabileceği gibi süperoksit dismütaz enziminin de katalizlenebilir. Süperoksitin protonlanmış hali ( $pK_a=4.8$ ) olan perhidroksil radikali ( $\cdot O-O:H$ ) daha güçlü oksitleyici özelliğe sahiptir fakat biyolojik mekanizmalarla ilgisi oldukça düşük düzeydedir. Çünkü perhidroksil radikalinin fizyolojik pH'lardaki çözünürlüğü oldukça düşüktür.

Süperoksitin tek değerlikli hale indirgenmesi sonucunda hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit serbest radikal değildir çünkü bütün elektronları eşleşmiş halde bulunur. Fakat uzaklaştırılmadığı takdirde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumuna sebep olur. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçebilir. Bu sebepten ötürü hücrede kompartmanlaşma göstermezler. Peroksidazlar gibi bazı enzimler hidrojen peroksidi oksidasyon reaksiyonlarında substurat olarak kullanırlar [28, 38].

### 1.6. Hücredeki Serbest Radikal Oluşturan Kaynaklar

Oksijenin süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşturmak için indirgenmesi birçok temel biyolojik sistemde oksijenin aktifleştirilmesi için kullanılan mekanizmadır (Şekil 1). Bununla birlikte çoğu fotosentetik organizmada fotosistemlerce singlet oksijenin oluşturulması da önemlidir. Aktif oksijen, metabolizmanın bir parçası olarak kompleks kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesiyle veya kimyasal veya çevresel stres faktörlerine bağlı olarak enzim veya elektron taşıma sistemlerinin fonksiyonunu yitirmesi ile ortaya çıkar. Bitki hücrelerinde kloroplastlar, mitokondriler, endoplazmik retikulum, plazma membranı ve hücre çeperi aktif oksijen üretiminin gerçekleştiği temel noktalardır [28].



Şekil 1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve süperoksit ve hidrojen peroksitin enzimatik yollarla uzaklaştırılmaları.

Kloroplastlarda oksijenin aktifleşmesini sağlayan en az dört bölge bilinmektedir. İlkinde PSI (fotosistem I)'de ve NADP'nin sınırlı olduğu koşullar altında oksijenin indirgenmesi sağlanır. İkinci olarak ışığın etkisi ile aktifleşen klorofilin kazandığı enerji singlet oksijen oluşumuna neden olabilir. Bu durum elektron taşıma sisteminden serbest bırakılan ışık enerjisinin yakalanmasının engellendiği koşullarda gerçekleşir. Üçüncü olarak PSII'nin oksitleyici kısmından moleküler oksijene doğru elektron sızması olduğunda aktif oksijen oluşumu meydana gelir. Son olarak ise fotorespirasyondan ötürü glikolat meydana gelir. Bu ürünün peroksizomlarda gerçekleşen metabolizması sırasında da aktif oksijen meydana gelir.

Mitokondrilerdeki temel süperoksit meydana getiren etkenler ubiquinone radikali ve NADPH dehidrogenazlardır. Süperoksit radikalleri solunum zincirinde indirgenen bileşiklerin oto-oksidasyonu sonucu oluşur. Fe-S proteinleride mitokondride yer alan ve olası süperoksit oluşturan birimlerdir [29].

Granülsüz ER da gerçekleşen çeşitli oksidatif reaksiyonlarda da NAD(P)H'in elektron vericisi olarak kullanıldığı tepkimelerde organik substratlara oksijen transferi olmakta ve ortaya aktif oksijen çıkmaktadır.

Peroksizomlar ve glioksizomlar yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunu sağlayan enzimlerin yanı sıra glikolat oksidaz, katalaz ve çeşitli peroksidazları da içerir. Glikolat oksidaz glikolattan oksijene iki elektron transferini katalizler ve sonuçta  $H_2O_2$  meydana gelir.

Lignin biyosentezi gibi bir takım reaksiyonlarda ve oksidatif enzimlerde hücre çeperinde aktif oksijen oluşumuna neden olurlar. Bu da oksidatif stres sinyali olarak algılanabilir [28].

### **1.7. Oksijen Radikallerinin Meydana Getirdiği Hasarlar**

Aktifleşmiş oksijenin organik substratlarla reaksiyonu *in vitro* solüsyonlarda oldukça komplekstir. Fakat biyolojik sistemlerde membran yüzeyinin özelliği, elektriksel yükler, makromoleküllerin bağlanma özellikleri ve enzim, substrat ve katalistlerin kompartmanlaşması sebebi ile bu reaksiyonlar daha karmaşıktır. Oksidatif hasarlar her

zaman hücre ölümlerine neden olmazlar fakat membran lipitlerine, proteinlere ve nükleik asitlere ciddi hasarlar verebilirler [29, 30, 31].

### **1.7.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar**

Proteinlere yapılan oksidatif saldırılar spesifik amino asit modifikasyonlarına, peptit zincirlerinin parçalara ayrılmasına, çapraz bağ kurmuş ürünlerin kümeleşmesine, elektriksel yük değişimlerine, parçalanmalara duyarlılığın artmasına neden olur. Proteinlerin primer, sekonder ve tersiyer yapısı ve amino asitlerin çeşidi proteinlerin reaktif saldırılara karşı duyarlılığını değiştirir ve peptidin reaktivitesini etkiler. Özellikle kükürt içeren amino asitler ve tiol grupları oldukça duyarlı alanlardır. Proteinlerin oksidatif olarak zarar görmesi durumu Fe gibi redoks dönüşümü yapabilen metal kofaktörlerin varlığında artar. Böyle durumlarda metal, proteinin iki değerlikli kationları bağlayan bölgesine bağlanır ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonunda hidroksil radikali meydana gelir ve bu radikalde amino asit dizilerini oksitler [29].

### **1.7.2. DNA'da Meydana Gelen Hasarlar**

DNA diğer makromoleküllere nazaran oksidatif hasarlara karşı daha az toleransa sahiptir. Aktif oksijen türleri DNA'da mutasyona kadar birçok ölümcül etkinin oluşumunu tetikler. DNA'nın şeker ve bazları oksidasyona karşı oldukça hassastır ve oksidasyon, bazların degradasyonuna, tek zincirde kırılmalara ve proteinlere bağlanmalara sebep olur [29, 30].

### **1.7.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar**

Serbest oksijen radikalleri, hücrel membranlara lipit peroksidasyonu yoluyla zarar verir. Peroksidasyon reaksiyonları yağ asitlerinin açil zincirindeki çift bağlarla serbest oksijen radikalleri arasında gerçekleşir [29].

Lipitlerin peroksidasyonu üç farklı adımda gerçekleşir. Bu aşamalar başlangıç, uzama ve sonlanma basamaklarıdır. Reaksiyonun başlama basamağı doymamış yağ asitleri ve hidroksil radikalleri arasında olur. Uzama basamağında ise ilk basamakta meydana gelen yapı triplet oksijenle reaksiyona girer ve ilerleyen reaksiyon basamaklarında lipit

peroksitler oluşur. Bu reaksiyonlarda hidroksil radikallerinin rolü yangını başlatan kıvılcım gibidir. Lipit sistemlerinde hidroksil radikallerinin sıra dışı reaktivitesinin temelinde çok düşük konsantrasyonlarda bir zincir reaksiyonu başlatabilmesi yatar. Meydana gelen lipit peroksitler metal katalizleyicilerin varlığında oldukça kararsızdır. Membran lipitlerindeki peroksidasyon reaksiyonu radikal olmayan konjuge ürünleri meydana getirmek için karbon veya peroksi radikalleri ile çapraz bağ kurulduğunda sonlanır. Reaksiyon sonunda malondialdehit gibi aldehitler ve etan ve etilen gibi hidrokarbonlar lipit peroksidasyonunun son ürünleri olarak ortaya çıkar [28].

### **1.8. Antioksidan Savunma Sistemi**

İnsanlarında içinde bulunduğu tüm aerobik canlılar oksidatif özellikteki bileşiklerin vereceği hasarlara karşı bir savunma sistemine sahiptir.

#### **1.8.1. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi**

Enzimatik olmayan savunma antioksidan maddeler olarak bilinen glutatyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoidler, lignin, tanin gibi bileşikler tarafından yürütülür. Bir tripeptit olan glutatyon ( $\gamma$ -Glu- Cys-Gly, GSH) düşük moleküler ağırlığa sahip olup bir dokuda, hücrede ve hücrel kompartmanlarda bulunur. GSH en fazla kloroplastlarda bulunur, fakat önemli miktarlarda da sitozolde mevcuttur. GSH'nin antioksidan özelliği sisteinin sülfidril grubundan kaynaklanır. GSH ikinci bir GSH molekülü ile sülfidril grubundan bağlanarak bir disülfid bağı oluşturur ve ortaya okside glutatyon (GSSG) çıkar.

GSH kimyasal olarak singlet oksijen ile süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek serbest radikalleri etkisizleştirmede doğrudan rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonu sırasında açığa çıkan açil peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlılığına katkı sağlar [29, 30].

Askorbik asit (vitamin C) hayvan ve bitki dokularında bulunan önemli antioksidan bileşikler arasında yer alır. Askorbat indirgeyici olarak çalışarak oksidatif hasara karşı koruma sağlar. Ayrıca askorbat birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak da rol oynar [28].

Hidrofobik doğasından ötürü  $\alpha$ -tokoferol membranda yer alır ve iyi bir membran stabilizasyonu sağlar. Serbest yağ asitleri ile kompleks oluşturabilme özelliklerinden dolayı da membranda deterjan gibi davranarak lipit tabakasının dağılmasına ve membran agregasyonuna neden olabilir [28]. Aynı zamanda vitamin E iyi bir singlet oksijen ve alkil peroksit avlayıcısıdır.

## **1.8.2. Enzimatik Savunma Sistemi**

### **1.8.2.1. Süperoksit Dismütaz (EC 1. 15. 1. 1)**

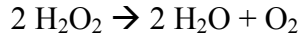
Aktif oksijen türleri yüksek reaktif özelliklerinden dolayı herhangi bir koruma mekanizması olmadığı takdirde hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir [32]. Süperoksit dismütaz (SOD), ilk defa McCord ve Fridovitch tarafından izole edilmiştir ve yüksek derecede reaktif olan aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini ( $O_2^{\cdot-}$ ) katalizleyerek organizmalara oksijen varlığında hayatta kalma imkanını veren bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleşir ve sonucunda moleküler oksijen ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) açığa çıkar. Bu katalitik mekanizma metal iyonunun ardışık oksidasyon ve redüksiyonuna dayanır. SOD prostetik gurup olarak demir, manganez veya bakır + çinkoyu taşıyan bir metalloproteindir. Bu metal iyonları süperoksit radikallerinin enzim aktif bölgesine elektrostatik olarak yönlendirilmesini sağlar. Bu enzim genelde aktif oksijen oluşturan hücre kompartmanlarında bulunur. Cu-Zn içeren SOD birçok ökaryotik canlıdan izole edilmiştir. Ayrıca şaşkırtıcı şekilde birkaç bakteride de rastlanmıştır. Mn-SOD prokaryotlarda ve ökaryotların mitekondrilerinde tespit edilmiştir. Fe-SOD ise birkaç prokaryotik organizmada bulunmuştur [27].

Prokaryotik Mn-SOD ve Fe-SOD ve ökaryotik Cu/Zn-SOD enzimleri dimer yapıdadır. Mitekondrilerdeki Mn-SOD ise tetramerik yapıdadır. SOD'un tüm formları çekirdek tarafından kodlanır ve amino ucunun işaretlenmesi ile de gideceği hücre kompartmanı belirlenir [33].

### 1.8.2.2. Katalaz (EC 1. 11. 1. 6 )

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) reaktif bir oksijen türü olup hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda  $\beta$ -oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması gibi normal aerobik reaksiyonlarda oluşturulur ve farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik büyümeden apoptosise kadar bir çok hücrel cevap mekanizmasında etkinlik gösterir. Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır. Ayrıca patojenlerin öldürülmesinde de savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir. Yüksek konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$  hücrelere zarar verir ve hücrelerde birikimi protein, lipid ve DNA gibi hücrel hedeflerin oksidasyonuna yol açar. Bu durum ise mutasyonların oluşmasına ve/veya hücre ölümüne yol açar. Bu sebeple  $H_2O_2$ 'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir [34] ve bu görevde katalaz tarafından yürütülür.

Hidroperoksidaz olarak da isimlendirilen katalaz bir sitokrom sistemine sahip tüm aerobik canlılarda bulunan ve  $H_2O_2$ 'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir.

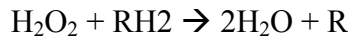


Hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması aerobik ortamda yaşamayı kolaylaştırır.

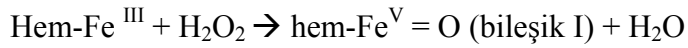
Aktif oksijen türlerine karşı etkili olmasından dolayı, çoğu aerobik organizma üç temel enzim sınıfından birine ait katalaz enzimine sahiptir. Bu enzim sınıflarından en geniş olanına ait katalaz enzimi tipik tek fonksiyonlu özellikte olup hem-gurubu içerir ve 60 kDa veya 80 kDa alt ünitelere sahiptir. İkinci en geniş guruba üye katalazlar ise katalaz-peroksidaz şeklinde iki fonksiyona sahip hem-gurubu içerirler, ancak sekans olarak bitki ve fungus peroksidazlarına benzerlik gösterirler. Üçüncü gurup ise en küçük gurubu oluşturur. Bu gurubun üyesi katalazlar ise hem-gurubu içermezler veya Mn içerirler.

Küçük alt üniteye sahip tek işlevli katalaz enzimi tüm ökaryot ve prokaryotlarda bulunmasına rağmen arkealarda tespit edilememiştir [33]. İnsanlarda katalaza en çok karaciğerde, böbrekte ve eritrositlerde rastlanmıştır. Ökaryotik katalazlar NADPH'a bağlı olarak bulunurlar. Bu durum onların daha kararlı yapıda kalmasını sağlar ve normal katalitik döngü dışında ikinci tip bileşiklerin oluşmasını önler [35]. Büyük alt üniteye sahip katalaza ise fungus ve bakterilerde rastlanmıştır. İki fonksiyonlu katalaz-peroksidaz aktivitesi gösteren guruba ise prokaryotlarda ve arkealarda rastlanmıştır. Hem-gurubu içermeyen katalaza ise yalnızca bakterilerde rastlanmıştır.

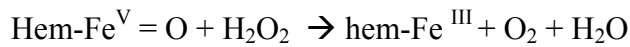
Katalaz ve peroksidaz enzimlerinin her ikisi de  $H_2O_2$ 'i parçalar. Ancak katalaz hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak  $H_2O_2$  kullanırken, peroksidazlar ise  $H_2O_2$ 'i indirgemek için organik bir substurata ( $RH_2$ ) gereksinim duyarlar.



$H_2O_2$ 'in parçalanmasını sağlayan reaksiyon iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada  $H_2O_2$ , suya ve oksiferil türlerine (bileşik I) ayrılır.

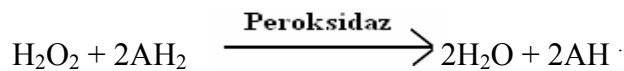


Bileşik I bir diğer  $H_2O_2$  molekülü ile reaksiyona girer ve sonuçta su ve moleküler oksijen meydana gelir [36].



### 1.8.2.3. Askorbat Peroksidaz (EC 1. 11. 1. 11)

Askorbat peroksidaz hem peroksidaz enzim ailesinin bir üyesi olup mayadan insana kadar pek çok canlıda bulunur. Askorbat peroksidaz hidrojen peroksida bağlı olarak farklı substuratları katalizler. Fakat enzimin fizyolojik substuratu askorbattır (vitamin C). Askorbatın dışında bazı aromatik substuratların ( $AH_2$ ) da oksidasyonunu katalizler.



Askorbata bağlı askorbat peroksidaz aktivitesi ilk olarak 1979 yılında bulundu. Bu enzim sınıf I peroksidaz enzim ailesine ait olup bitkilerde, alglerde ve sadece siyanobakterilerde hidrojen peroksida bağlı askorbat oksidasyon reaksiyonunu katalizler [37].

Fizyolojik koşullar altında reaksiyonun ara ürünü monodehidroaskorbat radikali olup başka bir enzimce tekrar askorbata indirgenir. Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur [38]. Bütün askorbat peroksidaz enzimleri elektron vericisi olarak askorbata yüksek özgülük gösterir. Fakat enzimin fizyolojik koşullarda bulunmayan substratları da okside etme yeteneği de vardır [39].

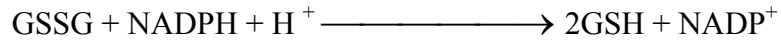
#### **1.8.2.4. Glutatyon Redüktaz (EC 1. 6. 4. 2)**

Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Glutatyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücresele GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. GSH antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır, organik peroksitlerin detoksifiyesinde ve zenobiyotiklerin metabolizmasında görevli glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin substratıdır.

Bu homodimerik enzim flavoprotein disülfid oksidoredüktaz enzim ailesinin bir üyesidir. Her bir alt ünite dört domaine sahiptir. Bunlar N-ucundan başlayarak: FAD bağlanma domaini, NADPH bağlayan domain, merkezi bir domain ve bir ara domain. Enzimin aktif bölgesi dimerik yüzde yer alır. GSSG bağlayan enzim bölgesi her iki alt ünitenin residülerinden oluşsa da sadece dimerik form aktiftir.

Okside glutatyonun indirgenmesi çok aşamalı bir reaksiyondur. Başlangıç olarak enzim NADPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş glutatyon redüktaz GSSG molekülü ile reaksiyona girer ve bu reaksiyon bir disülfid değişimi ile sonuçlanır. Sonuçta GSH molekülü ve  $GR_{red} - SG$  kompleksi ortaya çıkar.  $GR_{red} - SG$  kompleksinde ikinci bir disülfid değişimi ile sonuçlanan bir elektron düzenlemesi gerçekleşir. İkinci GSH molekülünün enzimden ayrılması ile enzim tekrar okside forma dönüşür [40].

## Glutasyon Redüktaz

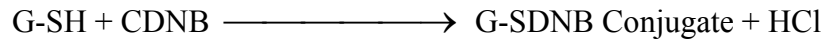


Glutasyon redüktaz hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Bu enzim askorbat-glutasyon reaksiyon yolunda görevli önemli bir enzimdir. Bu sistem sayesinde memeliler hemoglobin ve diğer proteinlerini peroksitlerin verebileceği zarardan korur. Endojen veya ekzojen nitrik oksit uygulaması GSH oluşumunu azalttığı için hücresel dengeyi bozar. Bir stres meydana gelir ve enzimin inhibisyonu gerçekleşir. Glutasyon redüktaz mitekondrilerde ve peroksizomlarda bulunmuştur [41].

**1.8.2.5. Glutasyon S-Transferaz (2. 5. 1. 18)**

Glutasyon S-transferaz bir enzim ailesi olup çeşitli bileşiklerle indirgenmiş glutasyon arasında konjugasyonu sağlar. Bu reaksiyon sonunda aktif olamayan, suda çözünebilen, daha az zararlı ürünler ortaya çıkar.

## GST



Bilinen tüm sitozolik GST enzimleri homodimer veya heterodimer yapıda olup alt ünitelerinin moleküler ağırlığı 23–29 kDa arasında değişir [42].

GST canlılarda geniş bir dağılım gösterir. Aerobik organizmaları oksidatif hasarlardan ve elektrofilik saldırılardan korur. GST mutajenlerin, karsinojenlerin ve diğer toksik maddelerin etkisizleştirilmesinde görevlidir. GST aktivitesinin bitkilerde, böceklerde, mayalarda, bakterilerde ve özellikle karaciğer olmak üzere çoğu memeli dokularında bulunduğu ve detoksifikasyonda anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Memelilerde GST'nin biyofonksiyonelliği ve sekans benzerlikleri dikkate alınarak  $\alpha$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\xi$ ,  $\theta$  sınıflarına ayrılmıştır [43].

Çevresel stres faktörlerince oluşumu tetiklenen reaktif oksijen türlerine karşı GST'ler hücre membranını, DNA'yı ve proteinleri korur. Memelilerde lökosit ve diğer fagositik hücrelerin mikropları yok etme çalışmaları sırasında kullandıkları nitrojen oksit, süperoksit hipoklorit ve hidrojen peroksit gibi kimyasal bileşikler aynı zamanda

DNA'nın oksidatif hasarına sebep olabilir. Benzer bir savunma sistemine bitkilerde de rastlanmıştır. GST ise tüm bu bileşiklerin zararlarına karşı koruma sağlar [42].

### **1.9. Çalışmanın Amacı**

Ağır metallerle stres uygulanan hücrelerdeki antioksidan enzimlere ait bir çalışma, *P. chrysosporium* için henüz yapılmamıştır. Ayrıca, bu konu ile ilgili literatürde diğer Basidiomycetes grubu üyeleri için de literatür bilgisi yok denecek kadar azdır. Yürütülen bu çalışmada, biyoteknolojik model sistem olan *Phanerochaete chrysosporium*'un (ATCC 24725) uygulanan 2 ayrı ağır metale karşı [Cd(II) ve Cu(II)] antioksidan enzimler düzeyinde geliştirdiği yanıtın moleküler (biyokimyasal) seviyede net bir biçimde tarif edilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 2.1. Mikroorganizma

Bu çalışmada beyaz çürükçül fungusların bir üyesi olan *Phanerochaete chrysosporium* (ATTC 24725) kullanıldı. Organizmanın uzun dönemli saklanması için Sabaroud Dextrose Slant Agar (SDSA) hazırlandı. Besi yerinin hazırlanması özetle şu şekilde gerçekleştirildi; İstenilen hacimlere uygun olarak Sabaroud Dekstroz agar miktarı belirlendi ve distile suda çözüldü. Mikrodalga fırın yardımıyla (Beko MD 1500) tamamen çözünmesi sağlanan dextrose agar içeriği cam tüplere 7–8 mL olacak şekilde paylaştırıldı. Tüplerin ağzı kapatılarak 121 °C de 15 dakika 1.5 Atm'de otoklavlandı ve tüpler yatık şekilde konumlandırılarak katılaşması sağlandı. Katılaştıran besiyerlerinin bir kısmı ileri ki kullanımlar için 4 °C' ye kaldırılırken bir kısmı da fungus sporları ile inoküle edildi. İnokülasyonu gerçekleştirilen tüpler inkübatöre (Binder Soğutmalı İnkübatör Model K113) alınarak 4 gün boyunca 35 °C' de sporlanmaya bırakıldı. Bu sürenin dolması ile alınan fungus sporları uzun süreli koruma ve ileride sıvı kültürde kullanılmak amacı ile 4 °C' ye muhafaza edildi. Kültürün sürekliliği için ağar slantların aylık pasajları yapıldı.

#### 2.2. Biyokütlenin Hazırlanması

*P. chrysosporium* (ATTC 24725) sporları yatık SDSA yüzeyinden steril öze yardımı ile 6 mL distile su içerisinde kazındı. Cam teflon el homojenizatörüyle homojenize edilerek spor süspansiyonu elde edildi. Elde edilen spor süspansiyonu  $2 \times 10^6$  spor/mL içerecek şekilde Hitachi U.V/Vis spektrofotometresi kullanılarak 650 nm' de OD 0.5 olacak şekilde distile su ile ayarlandı [15]. Çalışma için fazla hacim gerektiren durumlarda, birden fazla agar slantın kazınması ile elde edilen spor süspansiyonundan erlenmayerler içerisinde bir havuz oluşturuldu. Sporlar bu şekilde 10-15 dakika bekletildi.

Biyokütlenin oluşturulması için, 1.5 mL spor süspansiyonu Prouty (1990) tarafından geliştirilen minimum sıvı glikoz besiyerine (10 g/L glukoz, 2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.12 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve 0.001 g/L tiamin içeren besi yerinin pH değeri ise 4.5 olacak biçimde ayarlanır) 150 mL sıvı glikoz minimum besi ortamı içeren erlenmayerlere aşılanmıştır. Kültürler, 35 °C 'de 200 rpm' de sallamalı olarak 40 saat inkübe edilmiştir. Miselyum çapları 2 ila 4 mm olduğunda organizma biyokütle sıvı ortamdaki filtrasyonla uzaklaştırılıp sıvı azotla şoklanarak dondurulup -20 °C de muhafaza edilmiştir.

### 2.3. Kültürlerin Ağır Metal İle İndüklenmesi

*P. chrysosporium*'da ağır metaller varlığında indüklenme çalışmaları (i) sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi veya (ii) değişik ağır metal konsantrasyon/sabit indüksiyon süresi olmak üzere iki değişik parametreye göre yapıldı. Bunlardan ilkinde, spor ile aşılanan kültürlerin rotary shaker' da 200 rpm' de 35 °C' de 40 saatlik metalsiz büyümelerinin ardından (miselyum çapı yaklaşık 2 ila 4 mm olan biyokütle) ağır metal uygulamalarına geçildi. 5000 mg/L olacak şekilde tartılan ve distile suda çözülerek hazırlanan (5000 ppm' lik)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  stok solüsyonlarından erlenlerdeki son konsantrasyon 10 ppm (stoktan 300 µL alınmak suretiyle) olacak şekilde ağır metal eklenen paralel kültürlerde 1, 2, 4 ve 8 saat zaman noktalarında örneklerin yetiştirilmesi sağlandı. Bu süre sonunda miselyumların büyümesi başlık 2.2. de belirtildiği gibi durduruldu.

İkinci uygulamada ise 150 mL sıvı besi yeri içeren erlenlere spor eklendi ve son konsantrasyonları 5, 10, 15 ve 20 ppm olacak şekilde 5000 ppm' lik stok  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solüsyonlarından ağır metal ilavesi yapıldı. Kültürler yine 200 rpm' de 35 °C' de 40 saatlik büyümeye bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda büyümeye son verildi.

Uygulama süresi dolan ve büyümesine son verilen kültürlerdeki hücreler besi yerinden filtre edilerek uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez  $\text{dH}_2\text{O}$  ile yıkandı. Bu sayede hücrelerin tamamen besi yerinden arındırılması sağlandı. Elde edilen hücreler protein

ekstraksiyonu için  $-80^{\circ}\text{C}$ ' ye kaldırıldı. Her uygulamada ağır metal uygulaması yapılmamış 40 saat süreyle yetiştirilen hücreler kontrol olarak kullanıldı.

#### 2.4. Protein Ekstraksiyonu

Protein ve enzim ekstraksiyonu için fungus hücreleri ön soğutması yapılmış porselen havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot ile parçalandı ve hücreler tamamen toz haline getirildi. Parçalanmış bu hücreler daha sonra kısmen modifiye edilen yöntemle göre hazırlanan 50 mM sodyum fosfat (pH 6.8) tamponu 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, %2 (w/v) polivinylpolypyrrolidone (PVPP), 1 mM Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride (PMSF), 0.284 mM Na-P-Tosyl-L-Phenylalanine ketone (TPCK) içeren tampondan 1.5 mL) kullanılmak sureti ile homojenize edildi [44]. Askorbat peroksidaz enziminin ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan tamponun içeriği ise şu şekilde belirlendi [45]. Ezme ortamında 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.3 M mannitol, 1 mM EDTA, % 0.1 BSA, % 0.05 sistein kullanıldı. Tüm ekstraksiyon işlemleri  $0-4^{\circ}\text{C}$  'de yürütüldü. Daha sonra homojenizatlar  $20\ 000 \times g$  'de 20 dakika  $4^{\circ}\text{C}$  'de soğutmalı santrifüj ile santrifüj edildi (Sigma 3K30). Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar temiz ependorf tüplere aktarıldı. Örnekler hemen çalışılmak üzere buza alındı veya ileriki çalışmalar için  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklandı.

#### 2.5. Protein Miktarının Tayini

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlendi. Protein miktarının belirlenmesinden önce 5X Bradford ayırıcı 1:5 oranında distile su (dH<sub>2</sub>O) ile seyreltildi ve Whatman # 1 numaralı filtre kağıdı ile filtre edildi. Bradford ayırıcı hazırlanışı ise kısaca; 500 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (Amresco), 250 mL % 96 etanol içinde iyice çözüldü, daha sonra 500 mL % 85 orto-fosforik asit ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlanincaya dek dH<sub>2</sub>O eklenerek hazırlandı.

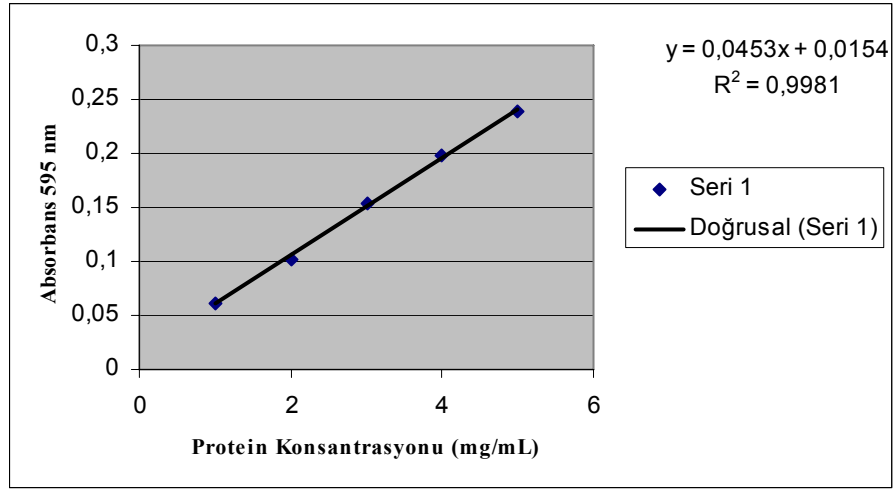
Protein konsantrasyonunun tespiti için sığır serum albümini (BSA) Fraksiyon V (Sigma) kullanılarak standart serisi oluşturuldu. 1 mg/mL BSA stoğundan 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{L}$  alınarak hazırlanan cam tüplere aktarıldı ve son hacimleri 500  $\mu\text{L}$  olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Tüplerin üzerine son hacim 5 mL olacak şekilde 1X Bradford ayırıcı eklendi.

Örneklerin protein konsantrasyonlarının tespiti için 4 °C’ de buzlu suda tutulan her örnekten 5 µL protein ekstraktı alınıp cam tüplere aktarıldı ve yine son hacim 500 µL’ ye distile su ile tamamlanarak seyreltildi (seyreltme katsayısı 100). Bu aşamalardan sonra 1:5 oranında dilüe edilmiş 1X Bradford ayırıcından 5 mL karışıma ilave edildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika bekletildikten sonra 595 nm’ deki absorbans değerleri belirlendi. Absorbans okumalarında cam küvet kullanıldı.

Tablo 2.1. Bradford Standartlarının Hazırlanması

Standartlar	dH <sub>2</sub> O (µL)	1 mg/mL stok BSA (µL)	1X Bradford Ayırıcı (mL)
Kör	500	0	4,95
0,01 mg/mL	495	5	4,95
0,02 mg/mL	490	10	4,95
0,03 mg/mL	485	15	4,95
0,04 mg/mL	480	20	4,95
0,05 mg/mL	475	25	4,95

Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak bir grafik elde edildi (Şekil 2. 1). Grafikten elde edilen denklem yardımı ile de protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları formülden tespit edildi. Denklemde  $x$  eğim,  $y$  ise örneklerin Bradford sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon faktörü olarak 100 katsayısı da dahil edilmiştir.



Şekil 2. 1. BSA standartlarından elde edilen grafik.

Kontrol ve ağır metal uygulama örneklerinde protein konsantrasyonları tespit edildikten sonra tüm örneklerin ortak bir konsantrasyon değerinde olması için ezme tamponuyla gereken seyreltme yapıldı. Ayarlamaları yapılan örnekler yeterli hacimlerde alikatlara (küçük hacimlere) ayrılarak enzim çalışmalarında kullanıldı veya sonraki çalışmalar için  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

## 2.6. Enzim Aktivitelerinin Tayini

Bütün enzim ekstraktları enzim çalışmaları süresince  $0-4^{\circ}\text{C}$ ' de buzlu suda tutuldu. Ayrıca ışığın olumsuz etkisi olabileceği ihtimali de göz önünde tutularak örnekler mümkün olduğunca ışıktan korunmaya çalışıldı.

### 2.6.1. Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismütaz aktivitesi tayininde modifiye yöntem kullanıldı [46]. Reaksiyon karışımı 20 mM sodyum fosfat pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM metionin, 0.1 mM p-Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0.005 mM riboflavin içerecek şekilde hazırlandı. NBT metanol içinde, riboflavin ise 0.1 N NaOH içinde 8 mg/mL olacak şekilde çözülerek stoklar hazırlandı. NBT' nin ve riboflavinin ışıktan olumsuz etkilenebilecekleri ihtimali göz önünde bulundurularak solüsyon amber şişelere hazırlandı ve bu iki kimyasal karışıma en son ilave edildi .

SOD ölçümünde tek dalga boyu kullanıldığı için, hata payını en aza indirmek amacıyla örnekler dublikeler şeklinde çalışıldı. Cam tüplere öncelikle 50 µg/mL olacak şekilde enzim örneklerinden ilave edildi ve son hacim 3 mL olacak şekilde tüplerin üzerine reaksiyon karışımı ilave edildi, vortekslendi. Ağızları bir tıpa yardımı ile kapatılan tüpler 15 dakika süre ile  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışığa maruz bırakıldı. Işıklandırma laboratuvarımızda bulunan Sanyo Gallenkamp (SGC097.CFX) bitki büyütme çemberi kullanılarak yapıldı. Sürenin tamamlanmasının ardından örneklerin absorbans değerleri 560 nm' de spektrofotometrede okundu ve % inhibisyon hesaplaması için kaydedildi. Kör olarak ışık muamelesi yapılmamış reaksiyon karışımı kullanıldı. Örnek uygulamalarına ilaveten enzim ekstraktı içermeyen, yalnız reaksiyon karışımı içeren iki tüpte örneklerle birlikte ışık uyarana maruz bırakıldı.

Örneklerdeki SOD konsantrasyonlarının belirlenmesi için SOD standartları hazırlandı. Standartların hazırlanmasında sığır eritrositlerinden elde edilmiş SOD 4470 U/mg (Sigma) kullanıldı. Bu enzimden 0.01 mg/mL bir ara stok hazırlandı. Standartların hazırlanması Tablo 2.' de belirtildiği gibi yapıldı. Örnek uygulamasında olduğu gibi standartların bulunduğu tüplerde 15 dakika boyunca ışığa tabi tutuldu. Standartlara ait absorbans değerleri yine 560 nm' de spektrofotometrede okundu. Tüm absorbans okumaları cam veya plastik küvette yapıldı. Standartların absorbans değerleri kaydedildi ve % inhibisyon değerlerini hesaplama da kullanıldı. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

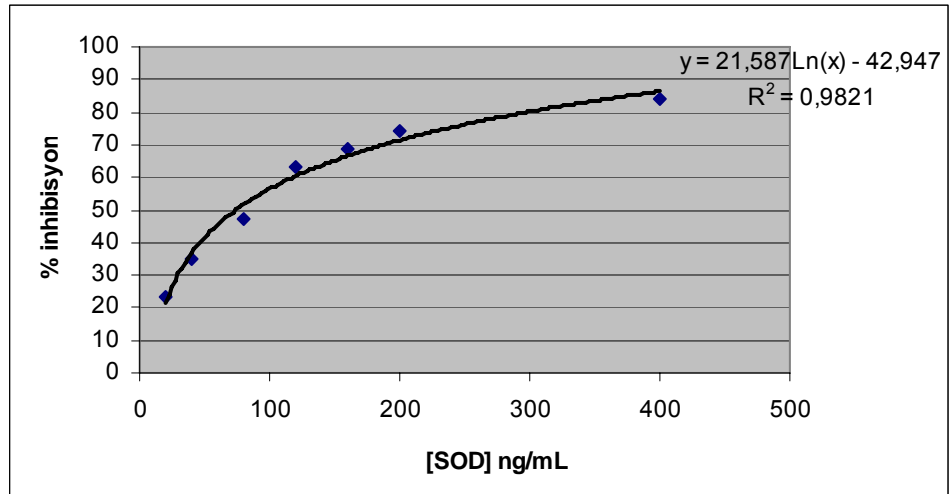
$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Işık Kont. Abs.} - \text{Örneğin Absorbansı}) \times 100 / \text{ışık kont. absorbansı}$$

% inihibisyona karşılık enzim konsantrasyonlarından logaritmik bir grafik elde edildi (Şekil 2. 2 ). Grafikte kullanılan standart SOD enzim konsantrasyonlarının logaritmaları alınarak ve % inhibisyon değerleri ise aynen kullanılarak yeni bir doğrusal denklem çizildi (Şekil 2. 3). Grafikten elde edilen formül kullanılarak SOD konsantrasyonları bilinmeyen uygulamaların enzim konsantrasyonları belirlendi. Formülde  $y$  değeri % inhibisyonu,  $x$  ise SOD konsantrasyonunu ng/mL cinsinden belirtmektedir. Bir SOD ünitesi ise % 50 inhibisyon sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandığı için konsantrasyon değerleri üniteye çevrildi. Bu dönüşümde de % 50 inhibisyona karşılık

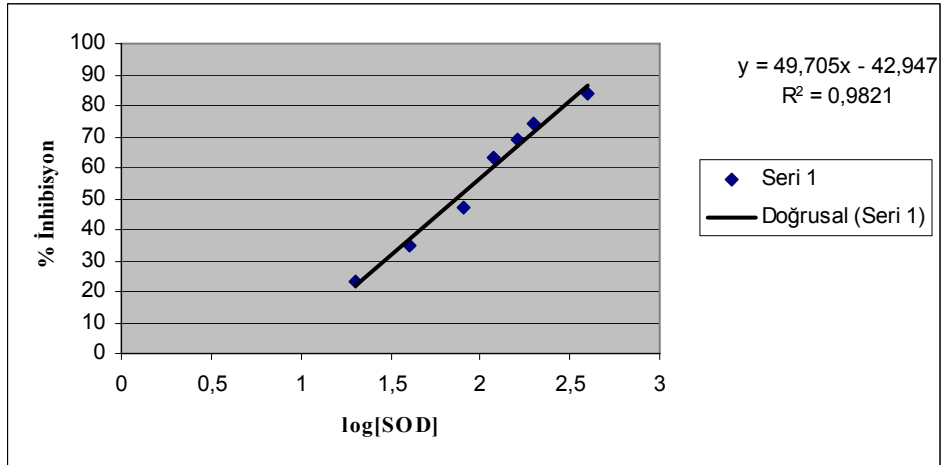
gelen SOD konsantrasyonu doğrusal grafikten elde edilen formül yardımı ile belirlendi ve bu değer örnek konsantrasyonlarının üniteye çevrilmesinde kullanıldı.

Tablo 2. 2. SOD standartlarının hazırlanması

standartlar	10 mM sodyum fosfat pH 7.5 (µL)	0,01 mg/mL SOD stoğu (µL)	Reaksiyon karışımı (mL)
Kör	500	–	2,5
20 ng/mL	499	1	2,5
40 ng/mL	498	2	2,5
80 ng/mL	496	4	2,5
120 ng/mL	494	6	2,5
160 ng/mL	492	8	2,5
200 ng/mL	490	10	2,5
400 ng/mL	482	20	2,5
ışık	500	–	2,5



Şekil 2. 2. SOD Standartlarından elde edilen logaritmik grafik.



Şekil 2. 3. Doğrusal standart SOD grafiği.

### 2.6.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde modifiye edilen yöntem kullanıldı [47]. Aktivite tayin ortamında ise 20 mM sodyum fosfat pH 7.5, 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve 7.5 µg/mL olacak şekilde örnek ekstraktı kullanıldı. Daha konsantre kullanılarak gerekli konsantrasyon ayarlamaları çalışılan uygun küvet içinde yapıldı. Küvet içinde çalışılan reaksiyon hacmi 1 mL olarak belirlendi. Kör olarak da yalnız tampon kullanıldı. Her defasında örnekler küvete yüklenmeden önce iyice vortekslendi. Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilavesi ile başlatıldı ve 240 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca absorbans değerindeki düşüş gözlemlendi. Absorbans okumaları quartz küvette yapıldı. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş anındaki absorbans değerleri kaydedilip aktivite hesaplamalarında kullanıldı. Hesaplama formülü olarak  $\Delta Abs / dk = \epsilon \times c \times l$  kullanıldı. Buradaki l çalışılan küvete ait ışık yolunun uzunluğudur ve 1' e eşittir. c ise küvette çalışılan enzimin konsantrasyonudur.  $\epsilon$  değeri ise parçalanma katsayısı olup katalaz için  $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  'dir. Formülle yapılan hesaplamadan elde edilen değer kullanılarak da katalaza ait spesifik aktivite değerleri elde edildi. Spesifik aktivitenin (SA) birimi µmol/mL/dakika = ünite/mg cinsinden elde edildi. Katalaz için kullanılan formülün son hali ise şu şekilde oldu.

$$SA = \frac{\Delta Abs / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu\text{g} / 7.5 \mu\text{g} / \text{mL}$$

### 2.6.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesinde 50 mM potasyum fosfat pH 6.6, 0.25 mM askorbat ve 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reaksiyon karışımı kullanıldı. Askorbat stoğu 10 mM olarak belirlendi ve tartılan miktar distile suda çözülmek sureti ile stok hazırlandı. Reaksiyonu başlatmak için küvete 100 µg/mL olacak şekilde enzim ekstraktı ilave edildi. Reaksiyon hacmi 1 mL olarak belirlendi. Kör olarak yalnız tampon kullanıldı. Askorbat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ışıktan etkilendikleri için stok hazırlamakta amber şişeler kullanıldı. Reaksiyon 290 nm' de 3 dakika boyunca quartz küvet ile spektrofotometrede okundu. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kaydedildi. Askorbata ait  $\epsilon$  değeri 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dir. SA hesaplamasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$SA = \frac{\Delta Abs / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu g / 100 \mu g / mL$$

### 2.6.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu enzimin aktivite okuması yönteminin modifiye edilmesine göre yapıldı [44]. Aktivite ortamı olarak 100 mM sodyum fosfat pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, 1 mM GSSG içeren tampon kullanıldı. 2.5 mM NADPH stoğu ve 20 mM GSSG stoğunun her ikisi de distile suda çözülerek hazırlandı. Reaksiyon ortamında konsantrasyon ayarlaması yapıldı. Küvetin son hacmi 1 mL olacak şekilde çalışıldı. Fosfat tamponu ve EDTA kör olarak okundu. Okumalarda quartz küvet kullanıldı. Reaksiyon 20 µg/mL enzim örneğinin ilave edilmesi ile başlatıldı ve 5 dakika boyunca 340 nm' de spektrofotometrede okundu. Başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kullanılarak enzime ait SA hesaplamaları yapıldı. GSSG için  $\epsilon$  değeri 6.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, dir. SA hesaplamasında şu formül kullanıldı.

$$SA = \frac{\Delta Abs / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu g / 20 \mu g / mL$$

### 2.6.5. Glutatyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutatyon S-Transferaz aktivite ölçümü fungus için optimize edilen değerlere göre yapıldı [47]. Reaksiyon ortamı olarak 100 mM potasyum fosfat (pH 6.5), 1 mM EDTA, 1 mM CDNB (1-Kloro 2.4-Dinitro Benzen), 2 mM GSH kullanıldı. CDNB ve GSH için 20 mM'lık stoklar hazırlandı. Uygun miktarlarda tartılan GSH stoku distile su yardımı ile çözüldü ve örneklerle birlikte 4 °C' de tutuldu.. CDNB için ise tartılan miktar ilk önce 1.8 mL etanolda iyice çözüldü. Ardından üzerine 1.2 mL distile su ilave edildi ve stok hazırlanması tamamlandı. Tüm absorbans okumaları quartz küvette yapıldı. Kör olarak tampon ve EDTA kullanıldı. 1 mL küvet hacmi ile çalışıldı. GSH'ın enzimatik olmayan parçalanması söz konusu olduğundan ve bu durumun aktivite hesaplamalarını yanıltması ihtimali olduğu için bu etkinin ortadan kaldırılması adına enzim dışında tüm bileşikleri içeren küvet 5 dakika boyunca bekletildi. Enzimsiz beklenen bu zamanın ardından küvete 50 µg/mL protein örnek ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve 340 nm' de 5 dakika boyunca takip edildi. Sürenin başlangıcında ve bitişindeki örneklerin absorbans değerleri kaydedildi ve SA hesaplamalarında kullanıldı. CDNB için  $\epsilon$  değeri  $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dir. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanıldı.

$$SA = \frac{\Delta \text{Abs} / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu\text{g} / 50 \mu\text{g} / \text{mL}$$

### 2.6.6. İstatistiksel Analiz

Tüm uygulamalar birbirinden bağımsız olarak yetiştirilen 3 set üzerinden yürütüldü. Her sete ait çalışmalar kendi içinde 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi %95 güven aralığında tek-yönlü ANOVA testine göre yapıldı.

## 3. BÖLÜM

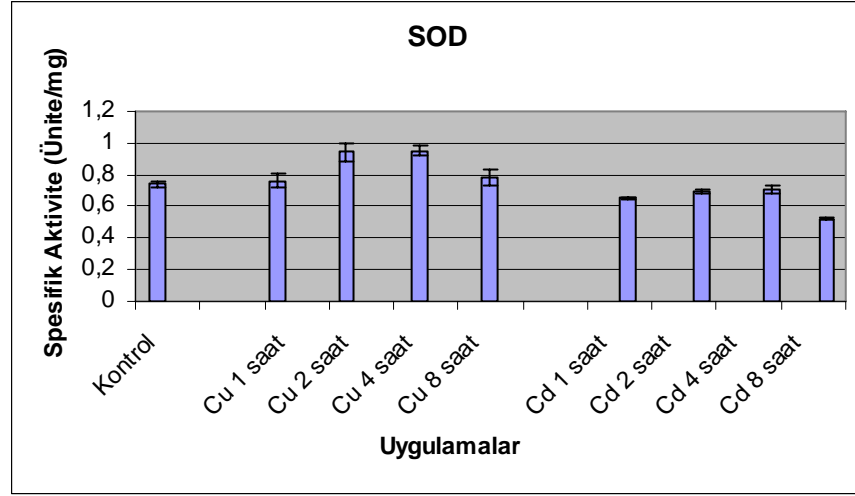
### BULGULAR

#### 3.1. Biyokütle

*Phanerochaete chrysosporium* hücrelerinin Cu ve Cd ağır metallerinin varlığında değişen antioksidan enzim profillileri belirlenmiştir. Ağır metal uygulanmamış hücrelerin biyokütlesinin, ağır metal uygulananlara kıyasla daha fazla oldukları tespit edilmiştir. Birim hacimden elde edilen hücrelerin protein konsantrasyonları da benzer sonuçları desteklemiştir. Bakır uygulamalarında misellerin renklerinde beyazdan sarıya doğru değişiklik olduğu saptanmıştır.

#### 3.2. SOD'a Ait Bulgular

SOD aktivitesinin sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması sonucu ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde tüm Cu uygulamalarından elde edilen aktivite değerlerinin kontrolün aktivitesinden ( $0.07426 \pm 0.01956$ ) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Cu uygulamalarında artan süreye paralel olarak SOD aktivitesinde gözlenen artış 4 saat uygulamasından sonra son bulduğu ve 8 saatte bir düşüş olduğu belirlenmiştir. En yüksek süperoksit dismütaz aktivitesine Cu 4 saat uygulamasında ( $0.9504 \pm 0.02959$ ), en düşük aktiviteye ise Cu 1 saat uygulamasında ( $0.7610 \pm 0.04155$ ) rastlanmıştır.



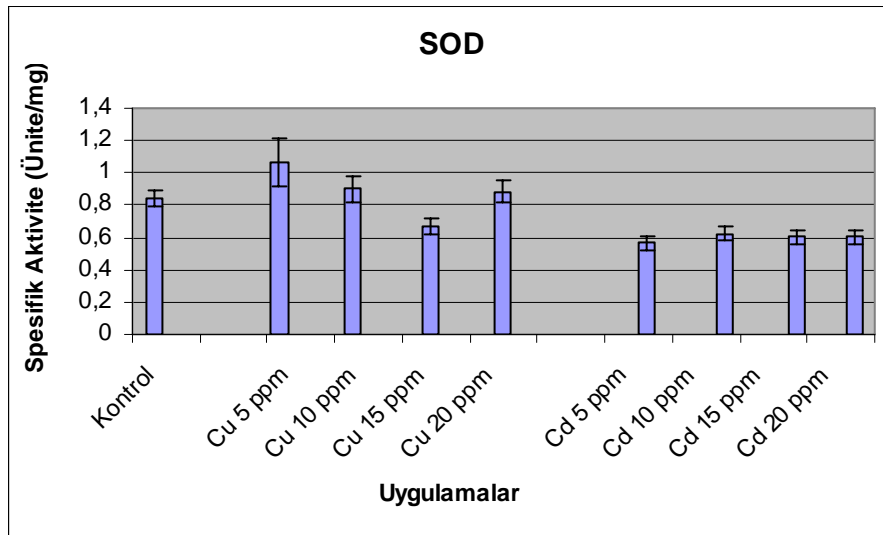
Şekil 3.1. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait SOD aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama ± ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde tüm uygulamaların aktivite değerlerinin kontrolden ( $0.07426 \pm 0.01956$ ) daha düşük çıktığı görülmüştür. Fakat Cd uygulamalarında artan süreye paralel olarak SOD aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Gözlenen artış 4 saat uygulamasından sonra son bulduğu ve 8 saatte bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Cd uygulanan örnekler arasında en yüksek aktiviteye sahip örnek Cd 4 saat ( $0.7050 \pm 0.02238$ ) olurken, en düşük aktivite değeri Cd 8 saatten ( $0.5211 \pm 0.00868$ ) elde edilmiştir. Cu ve Cd uygulamaları kendi aralarında karşılaştırıldığında, Cu 1 saat ( $0.7610 \pm 0.04155$ ) > Cd 1 saat ( $0.6562 \pm 0.00599$ ), Cu 2 saat ( $0.9439 \pm 0.05640$ ) > Cd 2 saat ( $0.6978 \pm 0.01428$ ), Cu 4 saat ( $0.9504 \pm 0.02959$ ) > Cd 4 saat ( $0.7050 \pm 0.02238$ ), Cu 8 saat ( $0.7803 \pm 0.04797$ ) > Cd 8 saat ( $0.5211 \pm 0.00868$ ) sonuçları elde edilmiştir. Tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde en yüksek SOD aktivitesine Cu 4 saat uygulamasında ( $0.9504 \pm 0.02959$ ), en düşük aktiviteye ise Cd 8 saatte rastlanmıştır ( $0.5211 \pm 0.00868$ ).

%95 güven aralığında ANOVA testi uygulandı ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi yapılmıştır. Kontrole kıyaslandığında Cu uygulamalarından Cu 2 ve Cu 4 saatin SOD aktivitesinde önemli fark oluşturduğu tespit edilmiştir. Ancak diğer Cu uygulamaları ile kontrol arasındaki farkın önemli olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan analiz sonucunda Cu uygulanan örneklerden yalnızca Cu 1 saat - Cu 2 saat ve

Cu 1 saat - Cu 4 saat arasında önemli ölçüde fark belirlenmiştir. Diğer Cu uygulamaları arasındaki farkların istatistiksel anlamda önem ifade etmediği tespit edilmiştir. Kontrole kıyaslandığında SOD aktivitesinde yalnızca Cd 8 saat uygulamasının istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir fark oluşturduğu görülmüştür. Cd'un farklı saat uygulamalarının da kendi içinde fark oluşturmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey' e göre).

Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulaması yapılan setten elde edilen sonuçlar ise Şekil 3.2. gösterilmiştir. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu seti içinde en yüksek aktivite değeri Cu 5 ppm uygulamasından ( $1.0662 \pm 0.14421$ ) elde edilmiştir. En düşük aktiviteye ise Cu 15 ppm'de ( $0.6705 \pm 0.05100$ ) rastlanmıştır. Uygulanan Cu konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak SOD aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün Cu 20 ppm'de tekrar artışa geçtiği görülmüştür. Tüm Cu uygulamalarından elde edilen aktivite değerlerinin kontrolden ( $0.8380 \pm 0.05126$ ) yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.2. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait SOD aktivite değerleri. Grafikteki değerler, ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

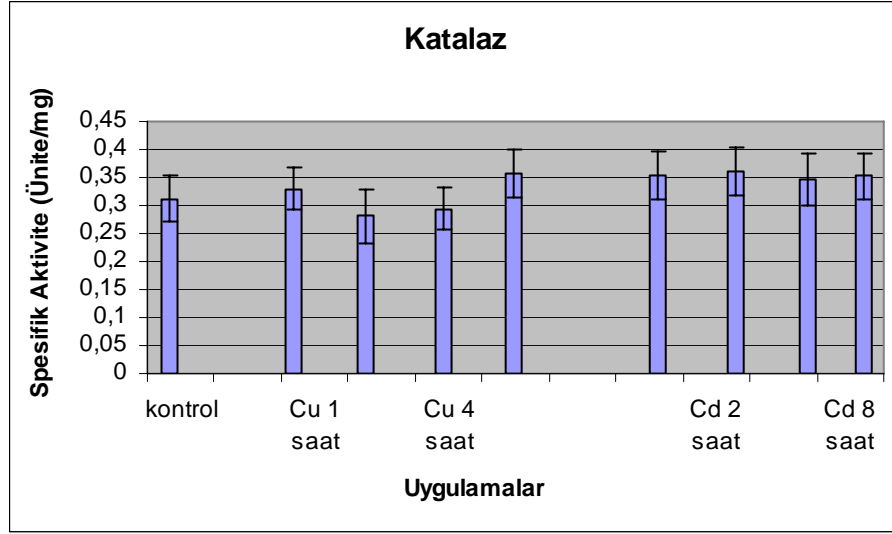
Cd seti kendi içinde değerlendirildiğinde tüm Cd uygulamalarının SOD aktivitelerinin kontrole ( $0.8380 \pm 0.05126$ ) kıyaslandığında daha düşük aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Buna rağmen Cd uygulamaları arasında en yüksek aktiviteye Cd 10

ppm'de ( $0.6242 \pm 0.03996$ ) rastlanmıştır. En düşük aktivite ise Cd 5 ppm'de ( $0.5646 \pm 0.04751$ ) tespit edilmiştir. Tüm uygulamaların genel bir değerlendirilmesi yapıldığında en yüksek aktivite Cu 5 ppm' ( $1.0662 \pm 0.14421$ ) de, en düşük aktivite ise Cd 5 ppm'de ( $0.5646 \pm 0.04751$ ) görülmüştür. Uygulanan ağır metaller birbiri ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm konsantrasyonlarda Cu uygulamalarından elde edilen aktivitelerin Cd uygulamalarından elde edilen değerlerden yüksek olduğu gözlenmiştir ve Cu 5 ppm ( $1.0662 \pm 0.14421$ ) > Cd 5 ppm ( $0.5646 \pm 0.04751$ ), Cu 10 ppm ( $0.8986 \pm 0.08392$ ) > Cd 10 ppm ( $0.6242 \pm 0.03996$ ), Cu 15 ppm ( $0.6705 \pm 0.05100$ ) > Cd 15 ppm ( $0.6009 \pm 0.04231$ ), Cu 20 ppm ( $0.8858 \pm 0.07273$ ) > Cd 20 ppm ( $0.6013 \pm 0.04647$ ) şeklinde bir sıralama yapılmıştır.

Örneklerin istatistiksel analizinde ANOVA testi uygulandı. %95 güven aralığı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçları ise şöyle olmuştur. SOD aktivitesi bakımından kontrolle kıyaslandığında tüm Cu uygulamalarının istatistiksel anlamda önemli bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde de artan Cu konsantrasyonlarının aktivite açısından fark oluşturan bir etkisi olmadığı görülmüştür. Kontrolle kıyaslandığında SOD aktivitesinde Cd uygulamalarının tamamının istatistiksel anlamda önemli bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir. Cd uygulamalarının kendi içinde de fark oluşturmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

### 3.3. Katalaz'a Ait Bulgular

Katalaz enzimi sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması sonuçları Şekil 3.3'de özetlenmiştir. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu 10 ppm uygulamaları sunucunda en yüksek aktiviteye 8. saatte ( $0.3572 \pm 0.03752$ ), en düşük aktiviteye ise 2. saat uygulamasında ( $0.2809 \pm 0.03857$ ) rastlanmıştır. Cu 1 saat ( $0.33020 \pm 0.04935$ ) ve 8 saat uygulamalarında kontrolden ( $0.3120 \pm 0.04224$ ) daha fazla bir aktivite ölçülmüşken, 2 saat ( $0.2809 \pm 0.03857$ ) ve 4 saat ( $0.2933 \pm 0.04925$ ) uygulamalarının aktivite değerleri kontrolden ( $0.3120 \pm 0.04224$ ) daha düşüktür. 1 saat uygulamasında bir düşüş, 2 saatten sonra ise aktivite değerlerinde yükselme gözlenmiştir.



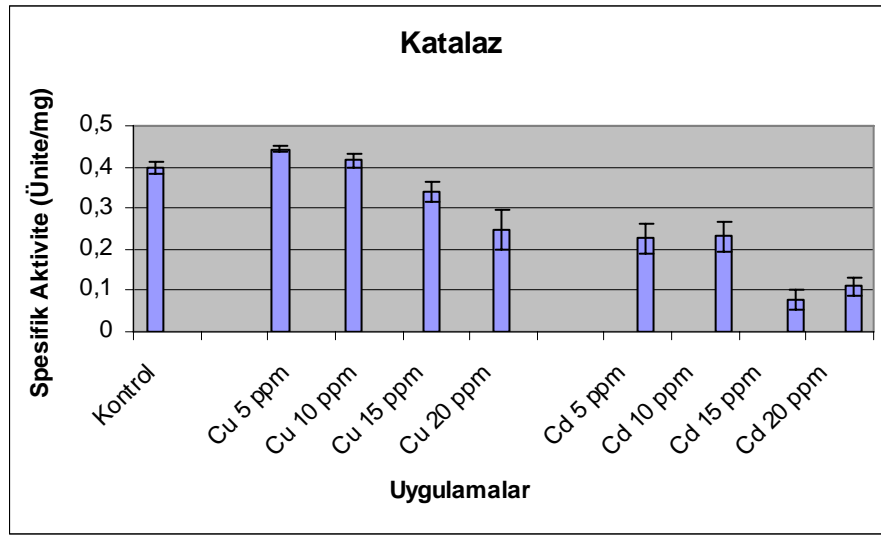
Şekil 3.3. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait katalaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd 10 ppm uygulamalarında ise değişik saatlerden elde edilen aktivite değerleri kontrolden ( $0.3120 \pm 0.04224$ ) yüksek çıktığı görülmüştür. Uygulamaların kendi içinde iniş çıkışlar gösterdiği gözlenmiştir. 4. saatteki aktivite değeri ( $0.3472 \pm 0.04724$ ) en düşük, 2. saatteki aktivite değeri ise en yüksek sonuçlarına ulaşılmıştır. Tüm uygulamaları kapsayan bir değerlendirme yapıldığında ise en yüksek aktivite sonucuna Cd 2 saat uygulamasında ( $0.3622 \pm 0.04291$ ), en düşük aktiviteye ise Cu 2 saat uygulamasında ( $0.2809 \pm 0.03857$ ) rastlanmıştır. Uygulamalar arasında yapılan karşılaştırma da ise Cd 1 saat ( $0.3527 \pm 0.04218$ ) > Cu 1 saat ( $0.3302 \pm 0.04935$ ), Cd 2 saat ( $0.3622 \pm 0.04291$ ), > Cu 2 saat ( $0.2809 \pm 0.03857$ ), Cd 4 saat ( $0.3472 \pm 0.04724$ ) > Cu 4 saat ( $0.2933 \pm 0.04925$ ), Cu 8 saat ( $0.3572 \pm 0.03752$ ) > Cd 8 saat ( $0.3528 \pm 0.04061$ ) sonucuna varılmıştır.

Örneklerin %95 güven aralığı kullanılarak yapılan istatistik analizi sonunda uygulamalar ile kontrole ait katalaz aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p < 0.05$ , Tukey).

Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulaması yapılan setten elde edilen sonuçlar ise Şekil 3.4' te gösterilmiştir. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu seti içinde en yüksek aktivite değeri Cu 5 ppm

uygulamasından ( $0.4426 \pm 0.00681$ ) elde edilmiştir. En düşük aktiviteye ise Cu 20 ppm'de ( $0.2478 \pm 0.04646$ ) rastlanmıştır. Uygulanan Cu konsantrasyonundaki artışla ters orantılı olarak katalaz aktivitesinde de düşüş gözlenmiştir. Cu 5 ppm ( $0.4426 \pm 0.00681$ ) ve 10 ppm'den ( $0.4157 \pm 0.01569$ ) elde edilen değerlerin kontrolden ( $0.3977 \pm 0.01609$ ) yüksek olduğu gözlenmiştir. Cu 15 ppm ( $0.3396 \pm 0.02459$ ) ve Cu 20 ppm uygulamalarında ise ( $0.2478 \pm 0.4646$ ) kontrolden daha düşük aktivite değerleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait katalaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd seti kendi içinde değerlendirildiğinde tüm Cd uygulamalarının katalaz aktiviteleri kontrole ( $0.3977 \pm 0.01609$ ) kıyaslandığında daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Buna rağmen Cd uygulamaları arasında en yüksek aktiviteye Cd 10 ppm'de ( $0.2314 \pm 0.03714$ ) rastlanmıştır. En düşük aktivite ise Cd 15 ppm'de ( $0.0768 \pm 0.02281$ ) tespit edilmiştir. Tüm uygulamaların katalaz enzimi için genel bir değerlendirilmesi yapıldığında en yüksek aktivite Cu 5 ppm'de ( $0.4426 \pm 0.00681$ ), en düşük aktivite ise Cd 15 ppm'de ( $0.0768 \pm 0.02281$ ) görülmüştür. Uygulanan ağır metaller birbiri ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm konsantrasyonlarda Cu uygulamalarından elde edilen aktivitelerin Cd uygulamalarından elde edilen değerlerden yüksek olduğu gözlenmiştir. Cu 5 ppm ( $0.4426 \pm 0.00681$ ) > Cd 5 ppm ( $0.2277 \pm 0.03601$ ), Cu 10 ppm ( $0.4157 \pm 0.01569$ ) > Cd 10 ppm ( $0.2314 \pm 0.03714$ ), Cu 15

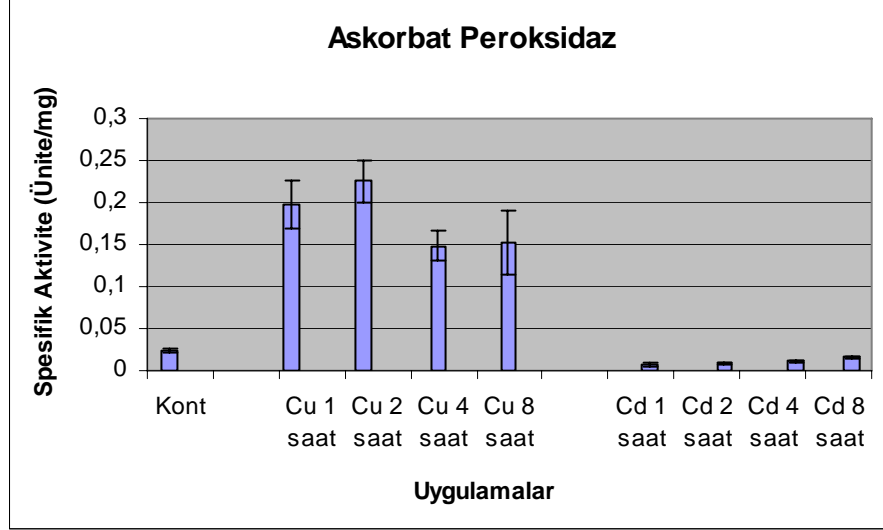
ppm ( $0.3396 \pm 0.02459$ ) > Cd 15 ppm ( $0.0768 \pm 0.02281$ ), Cu 20 ppm ( $0.2478 \pm 0.04646$ ) > Cd 20 ppm ( $0.11 \pm 0.02027$ ) sıralama yapılmıştır.

Örneklerin istatistiksel analizinde %95 güven aralığı kullanılarak ANOVA testi uygulanmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında Cu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm arasında elde edilen farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. Cu 20 ppm uygulamasının ise kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli kabul edilen bir fark meydana getirdiği görülmüştür. Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu 5 ppm ile Cu 10 ppm ve Cu 15 ppm arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür. Cu 5 ppm ile Cu 20 ppm arasındaki fark ise önemli olarak değerlendirilmiştir. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm arasında fark tespit edilmezken, Cu 10 ppm ile Cu 20 ppm arasında fark önemli olarak değerlendirilmiştir. Son olarak Cu 15 ppm ile Cu 20 ppm arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında tüm Cd uygulamalarının önemli kabul edilen değerlerde farklar meydana getirdiği gözlenmiştir. Cd uygulanan örnekler kendi aralarında değerlendirildiğinde ise Cd 5 ppm ile Cd 10 ppm arasında önemli bir farkın olmadığı, bunun dışında diğer tüm uygulamaların arasında önemli farklar olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

#### **3.4. Askorbat Peroksidaz'a Ait Bulgular**

Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması sonuçları Şekil 3.5'de gösterildiği gibi olmuştur. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde tüm Cu uygulamalarında elde edilen aktivite değerlerinin kontrolün aktivitesinden ( $0.0234 \pm 0.00171$ ) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek askorbat peroksidaz aktivitesine Cu 2 saat uygulamasında ( $0.2254 \pm 0.02499$ ), en düşük aktiviteye ise Cu 4 saat uygulamasında ( $0.1482 \pm 0.01734$ ) rastlanmıştır. Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde ise tüm uygulamaların aktivite değerleri kontrolden ( $0.0234 \pm 0.00171$ ) daha düşük çıktığı belirlenmiştir. Fakat Cd uygulamalarında artan süreye paralel olarak askorbat peroksidaz aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Cd uygulanan örnekler arasında en yüksek aktiviteye sahip örnek Cd 8 saat olurken, en düşük aktivite değeri Cd 1 saatten elde edilmiştir. Cu ve Cd uygulamaları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Cu 1 saat ( $0.1980 \pm 0.02867$ ) > Cd 1 saat ( $0.0083 \pm 0.00235$ ), Cu 2 saat ( $0.2254 \pm 0.02499$ ) > Cd 2 saat ( $0.0087 \pm 0.00142$ ), Cu 4 saat ( $0.1482 \pm 0.01734$ ) > Cd 4 saat ( $0.0111 \pm 0.0012$ ), Cu 8 saat ( $0.1524 \pm 0.03740$ ) >

Cd 8 saat ( $0.0159 \pm 0.00088$ ) sonuçları elde edilmiştir. Tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde en yüksek askorbat peroksidaz aktivitesine Cu 2 saat uygulamasında ( $0.2254 \pm 0.02499$ ), en düşük aktiviteye ise Cd 1 saatte ( $0.0083 \pm 0.00235$ ) rastlanmıştır.

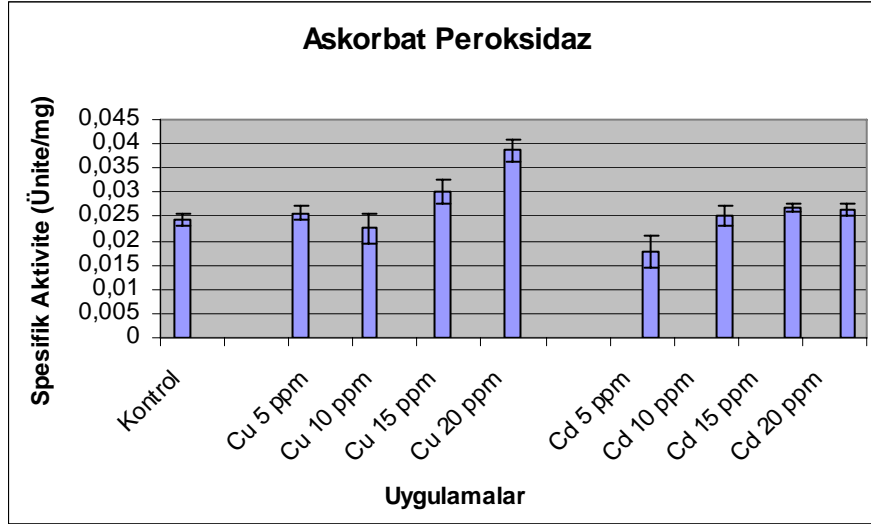


Şekil 3.5. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait askorbat peroksidaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Örneklerin istatistiksel analizinden elde edilen sonuçları ise aşağıdaki gibi özetlenmiştir. Kontrolle kıyaslandığında tüm Cu uygulamalarının önemli farklar oluşturduğu tespit edilmiştir. Cu uygulamaları arasında da bazı önemli farklar görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda Cu 1 saat ve Cu 2 saat arasında önemli ölçüde fark belirlenmiştir. Cu 1 saat, Cu 4 saat ve Cu 8 saat uygulamaları arasındaki farkların istatistiksel anlamda fark ifade etmediği tespit edilmiştir. Kontrolle kıyaslandığında hiçbir Cd uygulamasının istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Cd uygulamalarında kontrolle kıyasla bir fark gözlenmediği gibi uygulamaların kendi içinde de fark oluşturmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasının sonuçları şekil 3.6' da özetlendi. Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu 10 ppm ( $0.0226 \pm 0.00306$ ) dışındaki tüm Cu uygulamalarında elde edilen aktivite değerlerinin kontrolün aktivitesinden ( $0.0242 \pm 0.00119$ ) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En

yüksek askorbat peroksidaz aktivitesine Cu 20 ppm' de ( $0.0387 \pm 0.00236$ ), en düşük aktiviteye ise Cu 10 ppm uygulamasında ( $0.0226 \pm 0.00306$ ) rastlanmıştır.



Şekil 3.6. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait askorbat peroksidaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde ise Cd 5 ppm ( $0.0179 \pm 0.00330$ ) dışındaki tüm uygulamaların aktivite değerleri kontrolden ( $0.0242 \pm 0.00119$ ) daha yüksek çıktı. Cd uygulamalarında artan Cd konsantrasyonuna paralel olarak askorbat peroksidaz aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Cd uygulanan örnekler arasında en yüksek aktiviteye sahip örnek Cd 15 ppm ( $0.0268 \pm 0.00093$ ) olurken, en düşük aktivite değeri Cd 5 ppm' den elde edilmiştir. Cu ve Cd uygulamaları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Cu 5 ppm ( $0.0258 \pm 0.00164$ ) > Cd 5 ppm ( $0.0179 \pm 0.00330$ ), Cu 10 ppm ( $0.0226 \pm 0.00306$ ) < Cd 10 ppm ( $0.0252 \pm 0.00190$ ), Cu 15 ppm ( $0.0302 \pm 0.00250$ ) > Cd 15 ppm ( $0.0268 \pm 0.00093$ ), Cu 20 ppm ( $0.0387 \pm 0.00236$ ) > Cd 20 ppm ( $0.0264 \pm 0.00110$ ) sonuçları elde edilmiştir. Tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde en yüksek askorbat peroksidaz aktivitesine Cu 20 ppm uygulamasında ( $0.0387 \pm 0.00236$ ), en düşük aktiviteye ise Cd 5 ppm'de ( $0.0179 \pm 0.00330$ ) rastlanmıştır.

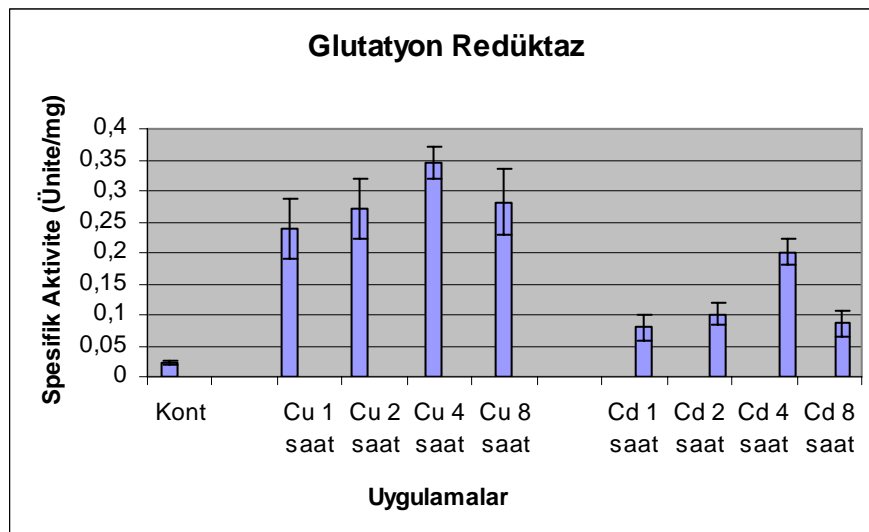
Örneklerin istatistiksel analizi sonucunda yapılan karşılaştırmalarda kontrolle kıyaslandığında Cu uygulamalarından yalnız 20 ppm'in önemli bir fark oluşturduğu

tespit edilmiştir. Cu uygulamaları arasındaki farkın ise önemli olmadığı kanaatine varılmıştır. Tüm metal uygulamaları içinde Cu 20 ppm'in aktivite artışı dikkate değer bulunmuştur.

Kontrolle kıyaslandığında hiçbir Cd uygulamasının istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Cd uygulamalarında kontrole kıyasla bir fark gözlenmediği gibi uygulamaların kendi içinde de fark oluşturmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

### 3.5. Glutasyon Redüktaz'a Ait Bulgular

Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması sonuçları şu şekilde belirlenmiştir (Şekil 3.7). Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu uygulamalarının tamamında tespit edilen glutasyon redüktaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0220 \pm 0.00397$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cu 4 saat uygulamasında ( $0.3441 \pm 0.02621$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cu 1 saatten ( $0.2389 \pm 0.04869$ ) elde edilmiştir. Cu uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak bir artış eğilimi gözlenmiştir. Fakat bu artış Cu 4 saat uygulamasında sonlanıp, Cu 8 saat için aktivite değerinin ( $0.2816 \pm 0.05317$ ) azalma eğilimine girdiği görülmüştür.

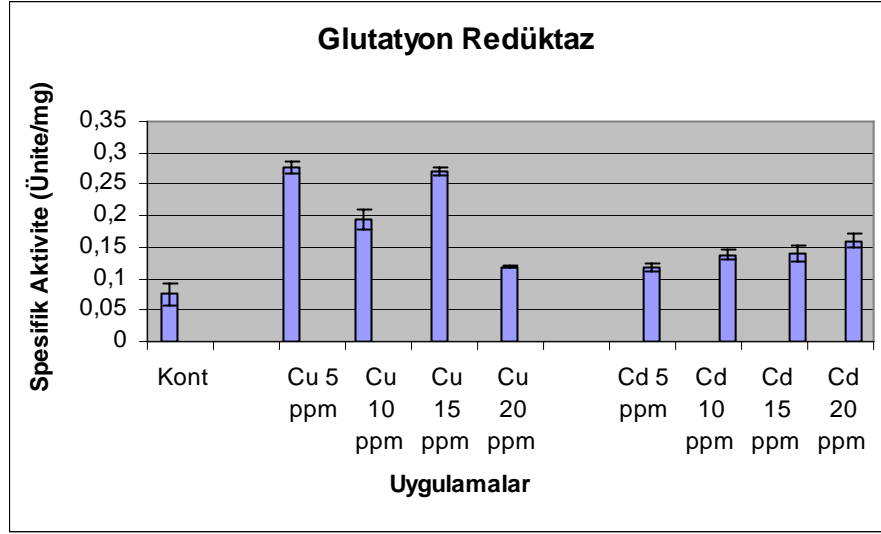


Şekil 3.7. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait glutasyon redüktaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd uygulamalarının tamamında da tespit edilen glutatyon redüktaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0220 \pm 0.00397$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cd 4 saat uygulamasında ( $0.2014 \pm 0.02140$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cd 1 saatten ( $0.0799 \pm 0.02135$ ) elde edilmiştir. Cd uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak bir artış eğilimi gözlenmiştir. Fakat bu artış Cd 4 saat uygulamasında sonlanıp, Cd 8 saat için aktivite değerinin ( $0.0860 \pm 0.02028$ ) azalma eğilimine girdiği görülmüştür. Ağır metal uygulamaları birbiri ile kıyaslandığında Cu 1 saat ( $0.2389 \pm 0.04869$ ) > Cd 1 saat ( $0.0799 \pm 0.02135$ ), Cu 2 saat ( $0.2711 \pm 0.04813$ ) > Cd 2 saat ( $0.1006 \pm 0.01785$ ), Cu 4 saat ( $0.3441 \pm 0.02621$ ) > Cd 4 saat ( $0.2014 \pm 0.02140$ ), Cu 8 saat ( $0.2816 \pm 0.05317$ ) > Cd 8 saat ( $0.0860 \pm 0.02028$ ) sonuçları elde edilmiştir. Tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde en yüksek glutatyon redüktaz aktivitesine Cu 4 saat uygulamasında ( $0.3441 \pm 0.02621$ ), en düşük aktiviteye ise Cd 8 saatte ( $0.0860 \pm 0.02028$ ) rastlanmıştır.

Örneklerin istatistiksel analizinde ANOVA testi uygulandı. %95 güven aralığı kullanıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm Cu uygulamalarının kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde aralarında önemli olan bir fark gözlenmedi. Cd uygulamalarından elde edilen sonuca göre ise Cd 1 saat, Cd 2 saat ve Cd 8 saat enzim aktivitelerinin kontrole kıyaslandığında farkın önemsiz olduğu, ancak Cd 4 saat uygulamasının kontrole oranla farkının olduğu bulunmuştur. Cd uygulamaları kendi içlerinde değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulaması yapılan setten elde edilen sonuçlar ise Şekil 3.8'de gösterildiği gibi olmuştur. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu uygulamalarının tamamında tespit edilen glutatyon redüktaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0753 \pm 0.01742$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cu 5 ppm uygulamasında ( $0.2763 \pm 0.01040$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cu 20 ppm ( $0.1184 \pm 0.00181$ ) elde edilmiştir. Cu uygulanan örnekler arasında bir karşılaştırma yapıldığında Cu 5 ppm ( $0.2763 \pm 0.01040$ ) > Cu 15 ppm ( $0.2700 \pm 0.00595$ ) > Cu 10 ppm ( $0.1953 \pm 0.01595$ ) > Cu 20 ppm ( $0.1184 \pm 0.00181$ ) sonuçlarına ulaşılmıştır.



Şekil 3.8. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait glutasyon redüktaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama ± ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

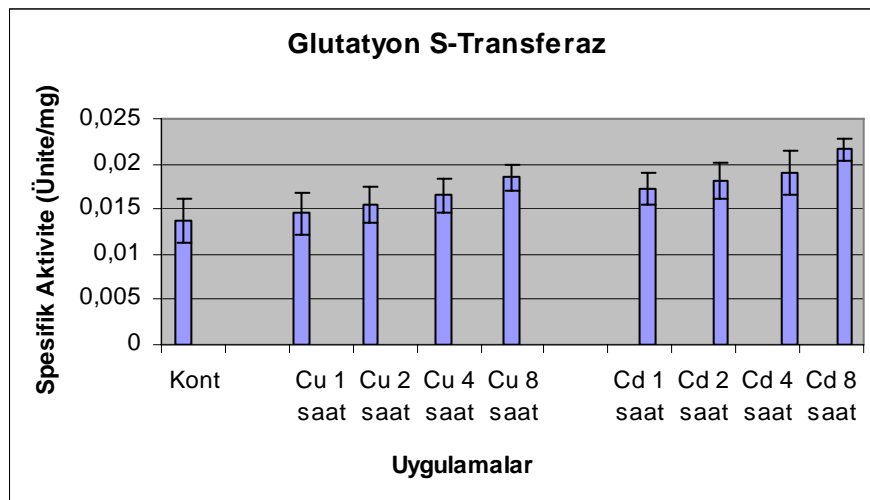
Cd uygulamalarının tamamında tespit edilen glutasyon redüktaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0753 \pm 0.01742$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cd 20 ppm uygulamasında ( $0.1604 \pm 0.00802$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cd 5 ppm' den ( $0.1174 \pm 0.00611$ ) elde edilmiştir. Cd uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan konsantrasyona paralel olarak bir artış eğilimi gözlenmiştir. Cd uygulanan örnekler arasında bir karşılaştırma yapıldığında Cd 5 ppm ( $0.1174 \pm 0.00611$ ) > Cd 10 ppm ( $0.1375 \pm 0.00817$ ) > Cd 15 ppm ( $0.1390 \pm 0.01288$ ) > Cd 20 ppm ( $0.1604 \pm 0.00802$ ) sonuçlarına ulaşılmıştır. Ağır metal uygulamaları birbiri ile kıyaslandığında Cu 5 ppm ( $0.2763 \pm 0.01040$ ) > Cd 5 ppm ( $0.1174 \pm 0.00611$ ), Cu 10 ppm ( $0.1953 \pm 0.01595$ ) > Cd 10 ppm ( $0.1375 \pm 0.00817$ ), Cu 15 ppm ( $0.2700 \pm 0.00595$ ) > Cd 15 ppm ( $0.1390 \pm 0.01288$ ), Cu 20 ppm ( $0.1184 \pm 0.00181$ ) < Cd 20 ppm ( $0.1604 \pm 0.00802$ ) sonuçlarına ulaşılmıştır.

İstatistiksel analizden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi yapıldı. Tüm Cu uygulamalarının kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artışa neden olduğu görülmüştür. Cu 20 ppm dışındaki bütün Cu uygulamalarından elde edilen spesifik aktivite değerlerinin kontrole kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilen farklılıklar ortaya çıkardığı görülmüştür. Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 10 ppm ve Cu 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunurken, Cu 15 ppm ile

kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm, Cu 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Ayrıca Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da ortaya çıkan farkın anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Cd 5 ppm dışında tüm Cd uygulamalarının kontrole kıyasla enzim aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli olan bir artışa neden olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde aralarında önemli olarak değerlendirilecek bir farkın olmadığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

### 3.6. Glutasyon S-Transferaz'a Ait Bulgular

Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasında ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde (Şekil 3.9) Cu uygulamalarının tamamında tespit edilen glutasyon s-transferaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0137 \pm 0.00237$ ) daha yüksek bulunmuştur. En yüksek aktivite değerine Cu 8 saat uygulamasında ( $0.0185 \pm 0.00149$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cu 1 saatten ( $0.0145 \pm 0.00229$ ) elde edilmiştir. Cu uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak bir artış eğilimi gözlenmiştir. Cu 1 saat ( $0.0145 \pm 0.00229$ ) > Cu 2 saat ( $0.0155 \pm 0.00197$ ) > Cu 4 saat ( $0.0165 \pm 0.00190$ ) > Cu 8 saat ( $0.0185 \pm 0.00149$ ) sonuçları elde edilmiştir.

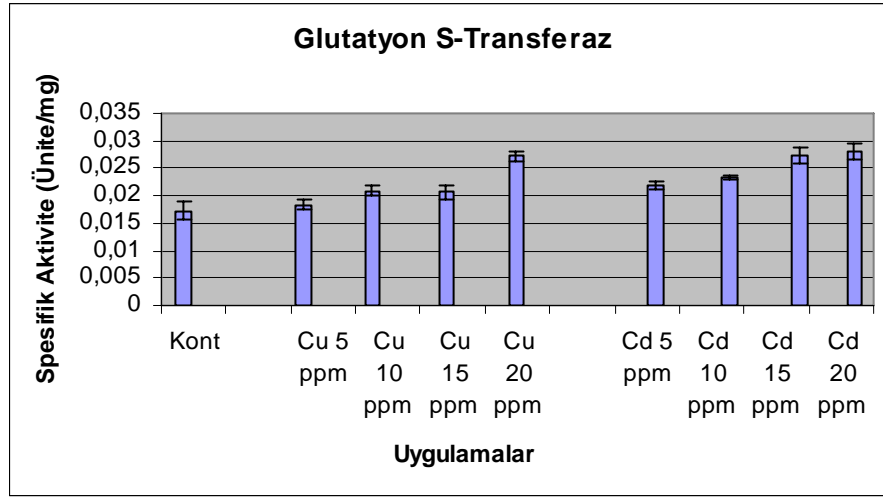


Şekil 3.9. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulamasına ait glutasyon s-transferaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cd uygulamalarının tamamında tespit edilen glutasyon s-transferaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0137\pm 0.00237$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cd 8 saat uygulamasında ( $0.0216\pm 0.00125$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cd 1 saatten ( $0.0172\pm 0.00177$ ) elde edilmiştir. Cd uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak bir artış eğilimi gözlenmiştir. Cd 1 saat ( $0.0172\pm 0.00177$ ) > Cd 2 saat ( $0.0181\pm 0.00199$ ) > Cd 4 saat ( $0.0190\pm 0.00248$ ) > Cd 8 saat ( $0.0216\pm 0.00125$ ) sonuçları elde edilmiştir. Ağır metal uygulamaları birbiri ile kıyaslandığında Cd 1 saat ( $0.0172\pm 0.00177$ ) > Cu 1 saat ( $0.0145\pm 0.00229$ ), Cd 2 saat ( $0.0181\pm 0.00199$ ) > Cu 2 saat ( $0.0155\pm 0.00197$ ), Cd 4 saat ( $0.0190\pm 0.00248$ ) > Cu 4 saat ( $0.0165\pm 0.00190$ ), Cd 8 saat ( $0.0216\pm 0.00125$ ) > Cu 8 saat ( $0.0185\pm 0.00149$ ) sonuçları elde edilmiştir.

İstatistiksel analizde ANOVA testi uygulandı. %95 güven aralığı kullanıldı. Cu ve Cd 10 ppm uygulamasının kontrolle kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilebilecek bir fark belirlenememiştir. Ayrıca uygulamalar kendi içinde değerlendirildiğinde de elde edilen farkların önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulaması sonuçları Şekil 3.10' da özetlenmektedir. Ağır metal uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde Cu uygulamalarının tamamında tespit edilen glutasyon s-transferaz aktivitesi sonuçları kontrolden ( $0.0173\pm 0.00161$ ) daha yüksek olarak belirlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cu 20 ppm ( $0.0272\pm 0.00092$ ) uygulamasında ( $0.0185\pm 0.00149$ ) rastlanırken, en düşük değer ise Cu 5 ppm ( $0.0184\pm 0.00079$ )'den elde edilmiştir. Cu uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak gözlenen aktivite değerleri ise Cu 20 ppm ( $0.0272\pm 0.00092$ ) > Cu 10 ppm ( $0.0209\pm 0.00101$ ) > Cu 15 ppm ( $0.0206\pm 0.00122$ ) > Cu 5 ppm ( $0.0184\pm 0.00079$ ) şeklinde sıralanmıştır.



Şekil 3.10. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulamasına ait glutasyon s-transferaz aktivite değerleri. Grafikteki değerler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde uygulamaların tamamında tespit edilen glutasyon s-transferaz aktivitesi sonuçları kontrolden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Artan metal konsantrasyonuna paralel olarak aktivite değerlerinde de artış gözlenmiştir. En yüksek aktivite değerine Cd 20 ppm ( $0.0281 \pm 0.00149$ ) uygulamasında rastlanırken, en düşük değer ise Cd 5 ppm ( $0.0219 \pm 0.00065$ )'den elde edilmiştir. Cd uygulamaları sonucu elde edilen aktivite değerlerinde artan süreye paralel olarak gözlenen aktivite değerleri ise Cd 20 ppm ( $0.0281 \pm 0.00149$ ) > Cd 15 ppm ( $0.0275 \pm 0.00145$ ) > Cd 10 ppm ( $0.0233 \pm 0.00042$ ) > Cd 5 ppm ( $0.0219 \pm 0.00065$ ) şeklinde sıralanmıştır. Ağır metal uygulamaları birbiri ile kıyaslandığında Cd 5 ppm ( $0.0219 \pm 0.00065$ ) > Cu 5 ppm ( $0.0184 \pm 0.00079$ ), Cd 10 ppm ( $0.0233 \pm 0.00042$ ) > Cu 10 ppm ( $0.0209 \pm 0.00101$ ), Cd 15 ppm ( $0.0275 \pm 0.00145$ ) > Cu 15 ppm ( $0.0206 \pm 0.00122$ ), Cd 20 ppm ( $0.0281 \pm 0.00149$ ) > Cu 20 ppm ( $0.0272 \pm 0.00092$ ) şeklinde sıralama elde edilmiştir.

Örneklerin istatistiksel analizinde ANOVA testi uygulandı. %95 güven aralığı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ise şöyle olmuştur. Cu 5 ppm dışındaki diğer uygulamaların tamamında kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir. Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 10 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli

bulunmazken, Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli olarak değerlendirilmiştir. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Cu 10 ppm ile Cu 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Ayrıca Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da ortaya çıkan farkın anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Cd 5 ppm dışındaki diğer uygulamaların tamamında kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir. Cd 5 ppm uygulaması ile Cd 10 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunmazken, Cd 5 ppm uygulaması ile Cd 15 ppm ve Cd 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli olarak değerlendirilmiştir. Cd 10 ppm ile Cd 15 ppm kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Cd 10 ppm ile Cd 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken, Cd 15 ppm ve Cd 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da fark tespit edilememiştir ( $p < 0.05$ , Tukey).

## 4.BÖLÜM

### TARTIŞMA VE SONUÇLAR

#### 4.1. Süperoksit Dismütaz

SOD, aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini ( $O_2^-$ ) katalizleyerek reaksiyon sonucunda moleküler oksijen ( $O_2$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) açığa çıkaran bir enzimdir. Sabit ağır metal konsantrasyonu (10 ppm Cu ve Cd)/değişik indüksiyon süresi uygulaması (1, 2, 4, 8 saat) yapılan setlerden elde edilen SOD aktivitesi sonuçları kontrolle kıyaslandığında Cu uygulamalarından Cu 2 ve Cu 4 saatte bir artış olduğu ve bu artışın önemli fark oluşturduğu tespit edildi. Ancak diğer Cu uygulamaları ile kontrol arasındaki farkın önemli olmadığı sonucuna varıldı. Yapılan analiz sonucunda Cu uygulanan örneklerden yalnızca Cu 1 saat ve Cu 4 saat arasında önemli ölçüde fark belirlendi. Diğer Cu uygulamalarının birbiri arasındaki farkların istatistiksel anlamda fark ifade etmediği ve tüm Cu uygulamalarının aktivite değerlerinin kontrolden yüksek olduğu tespit edildi. Cu uygulamalarının SOD aktivite değerlerindeki artışın 8. saatte düştüğü görüldü. Kontrolle kıyaslandığında SOD aktivitesinde yalnızca Cd 8 saat uygulamasının istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir azalma oluşturduğu görüldü. Diğer Cd uygulamalarının tamamının SOD aktivite değerleri kontrolden düşük olup, aynı zamanda kendi içinde fark meydana getirmediği gözlemlendi.

Değişik ağır metal konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 ppm )/sabit indüksiyon süresi (40 saat) uygulaması yapılan setten elde edilen SOD aktivitesinde kontrolle kıyaslandığında tüm Cu uygulamalarının istatistiksel anlamda önemli bir farka neden olmadığı tespit edildi. Ayrıca Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde de artan Cu konsantrasyonlarının aktivite açısından fark oluşturan bir etkisi olmadığı görüldü. Kontrolle kıyaslandığında SOD aktivitesinde Cd uygulamalarının tamamının istatistiksel anlamda önemli bir farka neden olmadığı tespit edildi. Cd uygulamalarının

kendi içinde de fark oluşturmadığı belirlendi. Tüm Cd uygulanan örneklerin SOD aktivite değerlerinin kontrolden düşük değerlerde olması dikkate değer bulundu.

Tüm bu verilerden hareketle Cu'ın artan süreye paralel olarak hücre içine alınımının gerçekleştiği ve buna bağlı olarakda SOD aktivitesinin arttığı söylenebilir. Bakır metabolizma için gerekli bir elementtir ve metabolik yollarda görevli birçok enzim ve protein için de önemli bir redoks metaldir [48]. Fakat hücre içerisinde Cu'ın da yüksek konsantrasyon değerlerine ulaştığında serbest radikal oluşumuna neden olduğu söylenmektedir [49]. Zaten bitkilerde Cu uygulanmasının hücrelerde detoksifiye edici sistemleri aktifleştirdiği de bilinen bir durumdur [50]. Enzimde belirli bir uygulama süresinden sonra, aktivitede azalmasının gözlenmesi enzimin inhibisyonu olduğu şeklinde yorumlanabilir. Yapılan çalışmada Cd'un da hücre içine alındığı söylenebilir. Cd uygulamasında kontrole nispeten SOD aktivitesinde azalma olduğu görülmektedir. Bu azalmanın sebebi olarak hücrede meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin enzimi inhibe etmesi gösterilebilir.

Birçok organizmada da değişik streslere karşı SOD aktivitesinde meydana gelen değişim incelenmiştir. Mısır köklerinde yürütülen çalışmada SOD aktivitesinin artan Al<sup>+3</sup> konsantrasyonuna paralel olarak arttığı gözlenmiştir [51]. Ayrıca artan Zn ve Ni konsantrasyonuna paralel olarak güvercin bezelyesinde (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) SOD aktivitesinde kontrole kıyasla artış bildirilmiştir [52]. *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv. CO<sub>4</sub> köklerinde yürütülen çalışmalar neticesinde Cr(III) uygulamasının SOD aktivitesini uygulama süresine paralel olarak arttırdığı bildirilmiştir [53]. Pb uygulanan pirinç bitkisinde yüksek SOD aktivitesi gözlenmiş [54], ayrıca domates fidelerinde 10 µM Hg'nin 10 günlük uygulaması ile birlikte SOD aktivitesinin kök ve yapraklarda arttığı ifade edilmiştir [55]. SOD aktivitesinin artan Co(III) konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı değerlendirilmiştir [56]. Bezelye köklerinde yürütülen Cd uygulamaları sonucunda SOD aktivitesinde azalma olduğu belirtilmiştir [57]. Cd'a duyarlılıkları farklı biber türleri üzerinde yürütülen çalışmalarda SOD aktivitesinin duyarlı olan türde azaldığı bildirilmiştir [58]. Cu ve Cd uygulanan *Phanerochaete chrysosporium*'un proteom değerlendirmeleri neticesinde SOD aktivitesinde bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir [59]. Bu bilgilerde yapılan değerlendirmeleri doğrular niteliktedir.

#### 4.2. Katalaz

Katalaz,  $H_2O_2$ 'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen bir enzimdir ve  $H_2O_2$ 'nin bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Sabit ağır metal konsantrasyonu (10 ppm Cu ve Cd)/değişik indüksiyon süresi uygulaması (1, 2, 4, 8 saat) yapılan setlerden elde edilen katalaz sonuçları ile kontrole ait aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı sonucu bulundu. Fakat Cu uygulamasından elde edilen değerlerde artan süreye paralel olarak katalaz aktivitesinin de (Cu 1 saat uygulaması) dışında artma eğiliminde olduğu tespit edildi. Cd uygulamasında ise katalaz aktivitesinin artan süreye rağmen değişmediği gözlemlendi.

Değişik ağır metal konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 ppm )/sabit indüksiyon süresi (40 saat) uygulaması yapılan setten elde edilen katalaz sonuçlarında ise Cu 20 ppm uygulamasının kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli kabul edilen bir fark meydana getirdiği görüldü. Cu uygulamaları katalaz aktivitesi bakımından kendi içinde değerlendirildiğinde Cu 5 ppm ile Cu 10 ppm ve Cu 15 ppm arasındaki farkın önemli olmadığı görüldü. Cu 5 ppm ile Cu 20 ppm arasındaki fark ise önemli olarak değerlendirildi. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm arasında fark tespit edilmezken, Cu 10 ppm ile Cu 20 ppm arasında fark önemli olarak değerlendirildi. Son olarak Cu 15 ppm ile Cu 20 ppm arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi. Kontrol ile kıyaslandığında tüm Cd uygulamalarının katalaz aktivitesinde önemli kabul edilen değerlerde farklar meydana getirdiği gözlemlendi. Cd uygulanan örnekler kendi aralarında değerlendirildiğinde ise Cd 5 ppm ile Cd 10 ppm arasında önemli bir farkın olmadığı, bunun dışında diğer tüm uygulamaların arasında önemli farklar oluştuğu tespit edildi. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi uygulaması yapılan sette artan Cu ve Cd konsantrasyonuna bağlı olarak katalaz aktivitesinde azalmalar görüldü.

Bezelye kök ve yapraklarında katalaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [57]. Bir mikroalg olan *Pavlova viridis*'e Cu uygulamaları sonunda katalaz aktivitesinin artış gösterdiği bildirilmiştir [48]. Ayçiçeğinde yürütülen bir çalışma sonucunda Cu uygulamasının katalaz aktivitesini artırdığı sonucunun elde edildiği bildirilmiştir [49].

Arpada yapılan bir çalışmada Cd uygulamasının köklerdeki katalaz aktivitesinde bir değişim meydana getirmeği tespit edilmiştir [50]. Soya fasulyesi hücrelerin de yürütülen çalışmada ise Cd uygulamasının katalaz aktivitesini azalttığı belirtilmiştir [60]. Karanlık stresi uygulanan lupin nodüllerinde katalaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [61]. Cd'a duyarlılıkları farklı biber türleri üzerinde yürütülen çalışmalarda katalaz aktivitesinin Cd uygulamasında küçüğe olsa azaldığı bildirilmiştir [58]. Artan Zn ve Ni konsantrasyonuna paralel olarak güvercin bezelyesinde (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) katalaz aktivitesinde artan konsantrasyona rağmen azalma eğilimi tespit edilmiştir [52]. Ayçiçeği köklerinde (*Helianthus annuus* L.) yapılan Cu uygulamasında kontrole kıyasla katalaz aktivitesinde artış tespit edildiği bildirilmiştir [62]. Pirinç kültürlerinde yapılan bir çalışmada artan tuz konsantrasyonunda katalaz aktivitesinde artış bildirilmiştir [63]. *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO<sub>4</sub> köklerinde yapılan çalışmalar neticesinde Cr(III) uygulamasının katalaz aktivitesinde bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir [53]. Pb uygulanan pirinç bitkisinde artan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak katalaz aktivitesinin azaldığı belirli bir değerde ise enzim aktivitesinde inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir [54]. Domates fidelerinde 10 µM Hg'nin 10 günlük uygulamasında katalaz aktivitesinde değişim gözlenmediği bildirilmiştir [55]. Tewari ve ark., (2002) 100 µM Co(III) uygulamasında katalaz aktivitesinin azaldığını, 50 µM uygulandığında ise arttığını bildirmiştir [56]. *P. chrysosporium*'da yapılan proteome çalışmalarında katalaz enziminin ifadesinde bir değişim gözlenmediği belirtilmiştir [59].

### 4.3. Askorbat Peroksidaz

Askorbat peroksidaz, hidrojen peroksida bağlı olarak askorbatı katalizleyen bir enzimdir. Bu sayede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücreden uzaklaştırılır. Askorbat peroksidaz aktivitesi için sabit ağır metal konsantrasyonu (10 ppm Cu ve Cd)/değişik indüksiyon süresi uygulaması (1, 2, 4, 8 saat) yapılan setlerden elde edilen değerler kontrole kıyaslandığında tüm Cu uygulamalarının önemli artışlar oluşturduğu gözlemlendi. Ancak Cu uygulamaları arasında da bazı önemli farklar olduğu görüldü. Şöyle ki; yapılan analiz sonucunda Cu 1 saat ve Cu 2 saat arasında önemli ölçüde fark belirlendi. Cu 1 saat, Cu 4 saat ve Cu 8 saat uygulamaları arasındaki farkların istatistiksel anlamda önem ifade etmediği tespit edildi. Kontrole kıyaslandığında hiçbir Cd uygulamasının askorbat peroksidaz aktivitesi istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir fark

oluşturmadığı görüldü. Cd uygulamalarında kontrolle kıyasla bir fark gözlenmediği gibi, uygulamaların kendi içerisinde de fark oluşturmadığı belirlendi. Ayrıca tüm Cd uygulanan örneklerin askorbat peroksidaz aktivite değerlerinin kontrolden daha düşük çıktığı gözlemlendi.

Değişik ağır metal konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 ppm )/sabit indüksiyon süresi (40 saat) kontrolle kıyaslandığında Cu uygulamalarından yalnız 20 ppm'in askorbat peroksidaz aktivitesinin önemli bir fark oluşturduğu tespit edildi. Cu uygulamaları arasındaki farkın önemli olmadığı kanaatine varıldı. Tüm metal uygulamaları içinde Cu 20 ppm'in aktivite artışı dikkate değer bulundu. Kontrolle kıyaslandığında hiçbir Cd uygulamasının askorbat peroksidaz aktivitesi bakımından istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilecek bir fark oluşturmadığı görüldü. Cd uygulamalarında kontrole kıyasla bir fark gözlenmediği gibi uygulamaların kendi içinde de fark oluşturmadığı belirlendi. Cd'un hiçbir uygulamasında enzim aktivitesinin artmaması Cd'un belkide antioksidan enzimlere zarar verdiği veya inhibe edici olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması çalışması sonucu elde edilen değerlerde katalaz aktivitesinin değişmemesi askorbat peroksidaz aktivitesindeki artışı anlamlı kılmaktadır. Çünkü hücre içinde artan  $H_2O_2$ 'yi uzaklaştırmak için askorbat peroksidazın varlığına gereksinim duyulmaktadır. Cu uygulamasının ilerleyen saatlerinde askorbat peroksidazın aktivitesini olumsuz yönde etkilemesi söz konusu olabilir. Artan süreye paralel olarak enzim aktivitesinin azalması bu düşüncüyü güçlendirmektedir. Bu, uygulanan fazla Cu konsantrasyonunun hücrelerde detoksifiye edici sistemlerin aktifleştiği şeklinde yorumlanabilir. Değişik ağır metal konsantrasyonu/sabit indüksiyon süresi çalışmalarında artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak enzim aktivitesinde de artış eğilimi gözlemlendi. Benzer durum Cd içinde gözlemlendi. Sabit ağır metal konsantrasyonu/değişik indüksiyon süresi uygulaması çalışması sonuçlarından farklı olarak, bu uygulamada Cd'un sebep olduğu askorbat peroksidaz seviyesindeki artış, farklı gelişme seviyelerinde Cd'a karşı geliştirilen tepkinin de farklı seviyelerde olabileceği şeklinde açıklanabilir.

Bezelye köklerinde yürütülen Cd uygulamaları sonucunda askorbat peroksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [57]. Pirinç kültürlerinde yapılan çalışmada artan

tuz konsantrasyonuna bağlı olarak askorbat peroksidaz aktivitesinin köklerde çok az değişirken yapraklarda değişmediği bildirilmiştir [63]. *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO<sub>4</sub> köklerinde yürütülen çalışmalar neticesinde Cr(III) uygulamasının askorbat peroksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [53]. Ozon uygulanan ıspanak yapraklarında askorbat peroksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [64]. Pb uygulanan piriņ bitkisinde askorbat peroksidaz aktivitesinin artan Pb ye bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir [54]. Askorbat peroksidaz aktivitesinin artan Co(III) konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı bildirilmiştir [56]. *Beta maritima* ve *B. vulgaris* cv. *ansa* türlerine NaCl uygunlamış ve sonrasında askorbat peroksidaz aktivitesinde artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış grldği bildirilmiştir [65].

#### 4.4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun (GSSG) glutasyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Glutasyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücresel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. Sabit ağır metal konsantrasyonu (10 ppm Cu ve Cd)/değişik indüksiyon süresi uygulaması (1, 2, 4, 8 saat) yapılan setlerden elde edilen glutasyon redüktaz aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde tüm Cu uygulamalarının kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artışa neden olduğu görüldü. Bunun yanı sıra Cu uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde aralarında önemli olan bir fark gözlenmedi. Fakat 8. saatten sonra düşme eğilimi tespit edildi. Cd uygulamalarından elde edilen sonuca göre ise Cd 1 saat, Cd 2 saat ve Cd 8 saat glutasyon redüktaz enzim aktivitelerinin kontrole kıyaslandığıında farkın önemsiz olduğu, ancak Cd 4 saat uygulamasının kontrole oranla farkının olduğu bulundu. Cd uygulamaları kendi içlerinde değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edildi. Fakat uygulanan süreye paralel olarak enzim aktivitesinde 8. saate kadar artma eğilimi görüldü.

Değişik ağır metal konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 ppm)/sabit indüksiyon süresi (40 saat) kontrole kıyaslandığıında tüm Cu uygulamalarının kontrole kıyasla glutasyon redüktaz aktivitesinde artışa neden olduğu görüldü. Cu 20 ppm dışındaki bütün Cu uygulamalarından elde edilen spesifik aktivite değerlerinin kontrole kıyaslandığıında istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirilen farklılıklar ortaya çıkardığı görüldü.

Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 10 ppm ve Cu 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunurken, Cu 15 ppm ile kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşıldı. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm, Cu 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Ayrıca Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da ortaya çıkan farkın anlamlı olduğu sonucuna varıldı. Cd 5 ppm dışında tüm Cd uygulamalarının kontrole kıyasla glutatyon redüktaz aktivitesinde istatistiksel açıdan önemli olan bir artışa neden olduğu görüldü. Bunun yanı sıra Cd uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde aralarında önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi.

Cu've Cd'un uygulama süresine paralel olarak hücre içi GSSG miktarının arttığı düşünülebilir. Askorbat peroksidaz aktivitesindeki artışta bu tahmini güçlendirmektedir. Çünkü askorbat peroksidaz katalizlemesi sonucu ortaya çıkan dehidroaskorbat ve mevcut GSH kullanılarak GSSG üretilmektedir. Bu reaksiyon dehidroaskorbat redüktaz tarafından katalizlenmektedir. Bu da sonuçta hücre içinde GSSG'yi artırır. Buna bağlı olarak da mevcut GSH/GSSG dengesini koruyabilmek için glutatyon redüktaz aktivitesinin arttığı yorumu yapılabilir [66]. Artan Cu konsantrasyonuna zıt olarak glutatyon redüktaz aktivitesinin azalması yüksek Cu konsantrasyonundan enzimin olumsuz etkilendiği şeklinde yorumlanabilir. Bezelye köklerinde yürütülen Cd uygulamaları sonucunda glutatyon redüktaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [57]. Karanlık stresi uygulanan lupin nodüllerinde GR aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir [61]. Cd'a duyarlılıkları farklı biber türleri üzerinde yürütülen çalışmalarda glutatyon redüktaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [58]. Artan Zn ve Ni konsantrasyonuna paralel olarak güvercin bezelyesinde (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) Glutatyon redüktaz aktivitesinde artan Zn ve Ni konsantrasyonuna paralel olarak artış gözlemlendiği bildirilmiştir [52]. Pirinç kültürlerinde yapılan çalışmada artan tuz konsantrasyonunda glutatyon redüktaz aktivitesinin hem köklerde hem yapraklarda belirgin şekilde düştüğü bildirilmiştir [63]. Ozon uygulanan ıspanak yapraklarında glutatyon redüktaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [64]. Pb uygulanan pirinç bitkisinde 10 günlük uygulama sonucunda glutatyon redüktaz aktivitesinin kök ve yapraklarda arttığı uygulama süresi arttığında ise köklerde aktivitenin düştüğü, uygulanan Pb konsantrasyonu arttığında glutatyon redüktaz aktivitesinin de artış gösterdiği bildirilmiştir [54]. Uygulanan tuz konsantrasyonundaki artışın pamuk bitkisinin Pora

çeşidinde glutatyon redüktaz aktivitesinde artışa neden olduğu, ancak Guazuncho çeşidinde artış görülmediği bildirilmiştir [67]. *Beta maritima* ve *B. vulgaris cv. ansa* türlerine NaCl uygulanmış ve sonrasında glutatyon redüktaz aktivitesinde artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış görüldüğü bildirilmiştir [65]. *P. chrysosporium*'da metal uygulaması sonucunda glutatyon redüktaz aktivitesinde bir değişim meydana gelmediği bildirilmiştir [59].

#### 4.5. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon S-transferaz, çeşitli bileşiklerle indirgenmiş glutatyon arasında konjugasyonu sağlar. Bu reaksiyon sonunda aktif olmayan, suda çözünebilen, daha az zararlı ürünlerin oluşumu sağlanır. Sabit ağır metal konsantrasyonu (10 ppm Cu ve Cd)/değişik indüksiyon süresi uygulaması (1, 2, 4, 8 saat) yapılan setlerden elde edilen glutatyon s-transferaz aktivitesi sonuçları ise şöyle oldu. Cu ve Cd 10 ppm uygulamasının kontrolle kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilebilecek bir fark belirlenemedi. Ayrıca uygulamalar kendi içinde değerlendirildiğinde de elde edilen farkların önemli olmadığı belirlendi. Fakat tüm uygulamalardan elde edilen değerler kontrolden yüksek çıktı ve uygulama süresine paralel olarak da hem Cu hem de Cd uygulamalarında artma eğilimi tespit edildi.

Değişik ağır metal konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 ppm )/sabit indüksiyon süresi (40 saat) uygulamaları sonuçları kontrolle kıyaslandığında Cu 5 ppm dışındaki diğer uygulamaların tamamında kontrole glutatyon s-transferaz aktivitesinde artış olduğu belirlendi ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirildi. Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 10 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunmazken, Cu 5 ppm uygulaması ile Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli olarak değerlendirildi. Cu 10 ppm ile Cu 15 ppm kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşıldı. Cu 10 ppm ile Cu 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Ayrıca Cu 15 ppm ve Cu 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da ortaya çıkan farkın anlamlı olduğu sonucuna varıldı. Cd 5 ppm dışındaki diğer uygulamaların tamamında kontrole kıyasla glutatyon s-transferaz aktivitesinde artış olduğu belirlendi ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli olarak değerlendirildi. Cd 5 ppm uygulaması ile Cd

10 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunmazken, Cd 5 ppm uygulaması ile Cd 15 ppm ve Cd 20 ppm karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli olarak değerlendirildi. Cd 10 ppm ile Cd 15 ppm kıyaslandığında aralarındaki farkın önemli olmadığı sonucuna ulaşıldı. Cd 10 ppm ile Cd 20 ppm örnekleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken, Cd 15 ppm ve Cd 20 ppm uygulamalarından elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında da fark tespit edilemedi.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde Cu ve Cd uygulamalarına enzimatik tepkiler geliştirildiği ve enzimlerin süreye paralel olarak arttığı söylenebilir. Bu durum Cu ve Cd'un artan konsantrasyonları içinde geçerlidir. Enzim miktarındaki artış hücre içi GSH konsantrasyonunun arttığı şeklinde değerlendirilebilir. Glutasyon redüktaz aktivitesindeki artış da bu tahmini destekler nitelikte olabilir. Çünkü glutasyon redüktaz GSSG'yi GSH'a indirgemekle görevlidir ve hücre içi GSH seviyesinin artmasını sağlar. Bezelye köklerine Cd uygulamaları sonucunda glutasyon s-transferaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [57]. *P. chryso sporium*' ile yapılan proteom çalışması ile Glutasyon S-transferaz enziminin ifadesinin bakır uygulamalarında kontrol hücrelerine kıyasla 2.9 kat artırdığı belirtilmiştir [59].

Sonuç olarak aktivite değerlendirmeleri yapıldığında uygulanan ağır metallerin hücre içine alındığı ve strese neden olduğu belirlenmiştir. Uygulanan metale bağlı olarak farklı enzimatik tepkilerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Uygulama süresine ve uygulanan doza bağlı olarak aktivitelerde değişimler gözlenmiştir. Cu'nun antioksidan savunma sisteminin tetiklenmesinde Cd'a nazaran daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ağır metal ile indüklenme zamanının aktivitelere etkisinin çok önemli olmadığı görülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Kocataş, A., Ekoloji, Çevre Biyolojisi, Sekizinci Baskı, s.17, 59, 365, 464, 2003.
2. Gadd, G. M., Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, Curr. Opin. Biotech., 271-279, 2000.
3. Magda, P., et al., Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize, J. Plant Nutr. Soil Sci., 169, 239–246, 2006.
4. Ross, G., et al., Zinc and copper bioaccumulation in *Brassica napus* at flowering and maturation, Eng. Life Sci., 4, No. 3, 2004.
5. Dong, W. K., et al., heavy metal removal by activated sludge: influence of *Nocardia amarae*, Chemosphere, 46, 137-142, 2002.
6. Marques, P. A. S. S., et al., pH effects on the removal Of Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> from aqueous solution by waste brewery biomass, Bioprocess Eng., 23, 135-141, 2003.
7. Prerna, A., et al., Zn<sup>2+</sup> Biosorption by *Oscillatoria angustissima*, Process Biochem., 34, 77–85, 1999.
8. Amel, L., et al., Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena sp.* strain PCC 7120, Journal of Bacteriol., 6596–6598, Sept., 2005.
9. Li, M., et al., Copper And zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), Chemosphere, 62, 565–572, 2006.
10. Schützendübel, A., Polle, A., Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stres and protection by mycorrhization, J. Exp. Bot., (53), 372, 1351-1365, 2002.
11. Magda, P., et al., Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize, J. Plant Nutr. Soil Sci., 169, 239–246, 2006.
12. Anushree, M., Metal Bioremediation through Growing Cell, Environ. İnt., 30, 261-278, 2004.
13. Mazhoudi, S., et al., Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato *Lycopersicon esculentum*, Mill., Plant Sci., 127, 129-137, 1997.
14. Chen, L. M., et al., Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots, Bot. Bull. Acad., Sin. 41, 99-103, 2000.

15. Özcan, S., Proteome Analyses of Pb(II), Ni(II) and Cr(II) Response in *Phanerochaete chrysosporium*, Doktora Tezi, ODTÜ, Ankara. 2003.
16. Kwon, Sun-Il., Anderson, A. J., Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism, catalases from a white-rot fungus, *Curr. Microbiol.*, 42, 8–11, 2001.
17. Wymelenberg, A. V., et al., The *Phanerochaete chrysosporium* Secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium, *J. Biotechnol.*, 118, 17–34, 2005.
18. Kirk et al. Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi, Ed. 9, 2001.
19. Yu, H. Y., et al., Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw, *J. Hazard. Mater.*, 134, 268- 276, 2006.
20. Yetiş, Ü. et al., Heavy metal biosorption by white-rot fungi, *Water Sci. Technol.*, 323-330, 1998
21. Yetiş, Ü. et al., The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Wat. Res.*, 4090-4100, 2000.
22. Falih, A. M., Influence of heavy metal toxicity on growth of *Phanerochaete chrysosporium*, *Biosource Technology*, 87-90, 1997.
23. Sing, C., Yu, J., Copper adsorption and removal from water by living mycelium of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Wat. Res.*, 2746-2752, 1998.
24. [www.genome.jgi-psf.org](http://www.genome.jgi-psf.org)
25. Özcan, S., et al., *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response, *Proteomics*, , 7, 1249–1260, 2007.
26. P. S., et al., A Homokaryotic derivative of a *Phanerochaete chrysosporium* strain and its use in genomic analysis of repetitive elements, *Appl. Environ. Microb.*, 1629–1633, 2000.
27. Öztürk, R., et al., Purification and characterization of superoxide dismutase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 392–399, 1999.
28. McKersie, D. B., Oxidative Stress” Retrieved October 25, 2000 from the World Wide Web: <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm>.

29. Cicerali, N. I., Effect of stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (*Lens culinaris* M), Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 2004.
30. Davies, K. J. A., Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, IUBMB Life 50, 279-289, 2000.
31. Hensley, K., et al., Reactive oxygen species, cell signaling, and injury, Free radical Bio. Med., 28, 1456-1462, 2000.
32. Bennicelli, R.P., et al., The effect of soil aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings, Environ. Exp. Bot., 39, 203–211, 1998.
33. Creighton T E (Ed) Encyclopedia of Molecular Biology, Vols 1-4, Syf. 631-632, Wiley, 1999.
34. Northwest Life Science Specialties NWLSS™ catalase activity assay data sheet E-mail: [sales@nwlifescience.com](mailto:sales@nwlifescience.com)
35. Oxford Biomedical Research USA. spectrophotometric assay for catalase [www.oxfordbiomed.com](http://www.oxfordbiomed.com).
36. Creighton T E (Ed) Encyclopedia of molecular biology, Vols 1-4 Syf. 632-634, Wiley, 1999.
37. Sharp, K. H., Raven, E., Enzyme-substrat interactions in askorbate peroxidase, University of Leicester, Cambridge, UK, NPR, 2003.
38. Arora, A., et al., Oxidative stres and antioxidant systems in plant, Review Article, Curr. Sci. India, vol. 82, 2002.
39. Raven, E. L., Understanding functional diversity and substrate specifity haem peroxidases, University of Leicester, Nat. Prod. Rep., 20, 367-381, 2003.
40. OxisResearch™A Division of OXIS health products, inc. spectrophotometric assay for glutathione reductase for research, [http:// www.oxfordbiomed.com](http://www.oxfordbiomed.com), Catalog Number 21018D data sheete.
41. Hou, W. C., et al., Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, Electrophoresis,. 25, 2926–2931, 2004.
42. Boyoğlu, S., Characterization of glutathione s-transferase activity in red pine (*Pinus brutia*, Ten.) variation in environmentally stressed seedlings, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 2004.

43. Lo, W. J., et al., Enzymatic and nonenzymatic synthesis of glutathione conjugates: application to the understanding of a parasite's defense system and alternative to the discovery of potent glutathione *s*-transferase inhibitors , *Bioconjugate Chem.*, 18, 109-120, 2007.
44. Demiral, T., Türkan, İ., Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environ. Exp. Bot.*, 2004.
45. Tomassi, F., A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea L.* seeds, *J. Exp. Bot.*, Vol. 52, No. 361, 1647-1654.
46. Grannopolitis, N., Ries, K., SOD occurrence in higher plants, *Plant Physiol.* 59, 309-314, 1977.
47. Misra, N., Gupta, A. K., Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings, *J. Plant Physiol.* 163, 11-18, 2006.
48. Mei, L., et al., Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), *Chemosphere*, 565-572, 2006.
49. Jouili, H., Ferjani, E. E., Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower (*Helianthus annuus L.*) stressed with copper excess, *Plant Biology And Pathology*, 639-644, 2003.
50. Hall, J. L., Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J. Exp. Bot.*, 53, 1-11, 2002.
51. Boscolo, R. S. P., et al., Aluminum-induced oxidative stress in maize, *Phytochemistry*, 62, 181-189, 2003.
52. Rao, K. V. M., T. V. S. Sresty., Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan (L.) Millspaugh*) in response to zn and ni stresses, *Plant Sci.*, 157, 113-128, 2000.
53. Shanker, A. K., et al., Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata (L.) R. Wilczek. cv*) roots, *Plant Sci.*, 166, 1035-1043, 2004.

54. Shalini, V., Dubey, R. S., Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Sci.*, 164, 645-654, 2003.
55. Cho, Un-H., Park, O. J., Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings, *Plant Sci.*, 156, 1-9, 2000.
56. Tewari, R. K., et al., Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt, *Plant Sci.*, 162, 381-388, 2002.
57. Vivek, D., et al., Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad), *J. Exp. Bot.*, 52, 1101-1109, 2001.
58. León, A. M., et al., Antioxidative Enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium, *Plant Physiol. Biochem*, 40, 813-820, 2002.
59. Özcan, S., et al., *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response, *Proteomics*, 7, 1249-1260, 2007.
60. Sabkowiak, R., et al., Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells, *Acta Biochimica Polonica*, vol. 51, 219-222, 2004.
61. Hernández, M. J. et al., Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules, *Plant Physiol. Biochem*, 40, 645-657, 2002.
62. Jouili, H., Ferjani, E., Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess, *C. R. Biologies*, 326, 639-644, 2003.
63. Demiral, T., Türkan, I., Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environ. Exp. Bot.*, 2004.
64. Calatayud, A., Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation, *Plant Physiol. Bioch.*, 41, 839-845, 2003.
65. Bor, M., et al., The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., *Plant Sci.*, 164, 77-84, 2003.
66. Arora, A., et al., Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Curr. Sci. India*, 82, No. 10, 2002.

- 67.** Meloni, D. A., et al., Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environ. Exp. Bot.*, 49, 69-76, 2003.

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı: Güler TOPRAK  
Doğum Yeri: BÜNYAN  
Doğum Tarihi: 01.01.1982  
Adresi: Fevzi Çakmak Mahallesi Bozantı Caddesi  
Safa Apt. 132/16  
KAYSERİ / TÜRKİYE

Elektronik posta: gulertoprak38@gmail.com

Eğitimi:

İlkokul Servet Akaydın İlkokulu  
Orta Okul 50. Yıl Dedeman Orta Okulu  
Lise Melikgazi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi  
Lisans Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

