

Kurşuna Maruz Bırakılan *Gammarus pulex*'de Antioksidan Enzim Yanıtları

Osman SERDAR¹, Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM², Şule TATAR^{2*}, Numan YILDIRIM²

¹Munzur University, Faculty of Fisheries, Tunceli, Türkiye.

 <https://orcid.org/0000-0003-1744-8883>

²Munzur University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering, Tunceli, Türkiye.

 <https://orcid.org/0000-0003-3975-6705>, * <https://orcid.org/0000-0001-8962-0107>,  <https://orcid.org/0000-0003-1109-8106>

Received date: 30.05.2019

Accepted date: 18.07.2019

Atf yapmak için: Serdar, O., Cıkıkoğlu Yıldırım, N., Tatar, Ş. & Yıldırım, N. (2019). Kurşuna Maruz Bırakılan *Gammarus pulex*'de Antioksidan Enzim Yanıtları. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 216-220.

How to cite: Serdar, O., Cıkıkoğlu Yıldırım, N., Tatar, Ş. & Yıldırım, N. (2019). Antioxidant Enzyme Responses to Lead Exposure of *Gammarus pulex*. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(2), 216-220.

Öz: Bu çalışmada, kurşuna maruz bırakılan *G. pulex*'de süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan enzimlerinin aktivite yanıtlarının araştırılması amaçlanmaktadır. *G. pulex*, 96 saat boyunca 10, 30, 50 µg/L kurşun içeren sentetik çözeltilere maruz bırakılmıştır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Kurşuna maruz bırakıldıktan sonra tüm uygulama gruplarında katalaz aktiviteleri azalmıştır ($P<0.05$). Glutatyon peroksidaz aktiviteleri kurşun maruziyetine bağlı olarak azalmıştır ($P>0.05$). Bulgularımız, reaktif oksijen türleri üreterek ve sülfhidril bağımlı antioksidan enzim aktivitelerini inhibe ederek kurşunun oksidatif strese neden olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, antioksidan enzimlerdeki değişiklikler, kurşunun çevresel risk değerlendirmesi için potansiyel olarak hassas biyobelirteçler olarak kullanılabilir ve deşarj standartlarının oluşturulmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar sözcükler: *G. pulex*, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, kurşun.

Antioxidant Enzyme Responses to Lead Exposure of *Gammarus pulex*

Abstract: It is aimed to investigate the activity response of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase of *G. pulex* exposed to lead. The *G. pulex* was exposed synthetic solutions containing 10, 30, 50 µg/L lead for 96 h. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase activities were determined by using ELISA kit. The differences in superoxide dismutase activities were statistically insignificant ($P>0.05$). Catalase decreased in all treatment groups after lead exposure ($P<0.05$). The glutathione peroxidase activities were decreased depending on lead exposure ($P>0.05$). Our findings suggest that lead can induce oxidative stress by generating reactive oxygen species and inhibiting sulphhydryl dependent antioxidant enzymes activities. In conclusion, alterations in antioxidant enzymes may potentially be used as sensitive biomarkers for risk assessment of lead in the environment and may contribute to the establishment of discharge regulations.

Keywords: *G. pulex*, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, lead

GİRİŞ

Kurşun (Pb), modern endüstrideki önemli rolü nedeniyle zararlı bir çevresel kirleticidir. Öncelikle güçlü bir mesleki toksin olarak kabul edilir ve toksikolojik belirtileri iyi bilinmektedir. Kurşun, ortamda uzun süre parçalanmadan kalmasından dolayı çevreye zararlıdır. Düşük kurşun seviyelerine kronik maruziyet, fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal işlev bozukluklarına neden olur (Koller, 1990; Feldman & White, 1992; Yokoyama vd., 1997; Gidlow, 2015).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) hücrelerde endojen olarak üretilirler. Normal fizyolojik koşullar altında antioksidan enzim aktivitesi serbest radikalleri temizlemek için yeterlidir. Serbest radikallerin konsantrasyonunda aşırı artış, çevresel stres koşullarında, serbest radikallerle oksidatif strese neden olan antioksidanlar arasında bir dengesizlik yaratabilir (Blokhina vd., 2003; Flora, 2009).

Oksidatif stres, serbest radikaller ile hücreler arasındaki aşırı reaktif ara ürünlerin üretimini detoksifiye etme veya hasarı onarma kabiliyeti arasındaki dengesizliği göstermektedir (Flora vd., 2011). Kurşun tarafından uyarılan oksidatif stres, antioksidan rezervlerin tükenmesi ve bünyenin serbest radikalleri giderme kabiliyetinin engellenmesiyle serbest radikal oluşumunu içeren bir durumdur (Carocci vd., 2016). Son dönem araştırmacılar, olası bir kurşun toksisite mekanizmasının, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle prooksidan ve antioksidan dengenin bozulması olduğunu öne sürmüşlerdir (Gürer & Ercal, 2000; Wang vd., 2001). Kurşun maruziyetinin, antioksidan enzim aktivitelerindeki değişikliklerle doz yanıt ilişkisi içerdiği de gösterilmiştir (Adonaylo & Oteiza, 1999).

Sucul organizmalar, ekolojik ve ekonomik önemleri ve morfolojik, fizyolojik ve ekolojik çeşitlilikleri nedeniyle çevre kirliliğini değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams & Dusenbery, 1990). *Gammarus pulex*, yüksek yoğunluklarda oluşabilen ve birçok balığın beslenmesinde önemli bir bileşeni oluşturan, çok miktarda bulunan bir kabukludur. Birçok toksik maddeye karşı hassastır (Weeks & Rainbow, 1992). Kısa süreli maruziyetlerinin öldürücü olması nedeniyle tatlı su amfipodlarının çeşitli ksenobiyotiklere karşı son derece hassas oldukları ve *G.pulex*'in toksikolojik çalışmalarda model bir organizma olarak kullanılabilirdiği kanıtlanmıştır (Güven vd., 1999).

Bu çalışmada, *G.pulex*'teki kurşun kaynaklı toksisitede antioksidan enzimlerin önemi araştırılmıştır. Bu amaca ulaşmak için 96 saatlik kurşun maruziyetinden sonra SOD, CAT ve GPx antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOT

G. pulex bireyleri, el ağırları yardımıyla Munzur Nehri'nden (39.156820 N, 39.499640 E) toplanmıştır (Şekil

1). Organizmalar plastik şişeler içerisinde hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve deneylerde kullanılmadan önce 15 gün boyunca, 18 °C sıcaklıkta sabit tutulan bir odada, 20 L hacimdeki havalandırılmalı bir akvaryumda, 12:12 saat aydınlık:karanlık döngüsünde söğüt yaprakları ile beslenmiştir. Yaklaşık 10 mm uzunluğunda ve erişkin evredeki benzer organizmalar seçilmiştir. Her birinde 10 birey bulunan 3 akvaryum oluşturulmuştur. Deneyler yapılırken bu süreçte organizmalar beslenmemiştir. Organizmalar 24 saatte bir kontrol edilmiş, ölü bireyler sayılmış ve deney akvaryumundan çıkarılmıştır. Hareketsizlik, ölüm kriteri olarak kabul edilmiştir.



Şekil 1. *G. pulex*'in Munzur Nehri üzerinde toplandığı bölge.

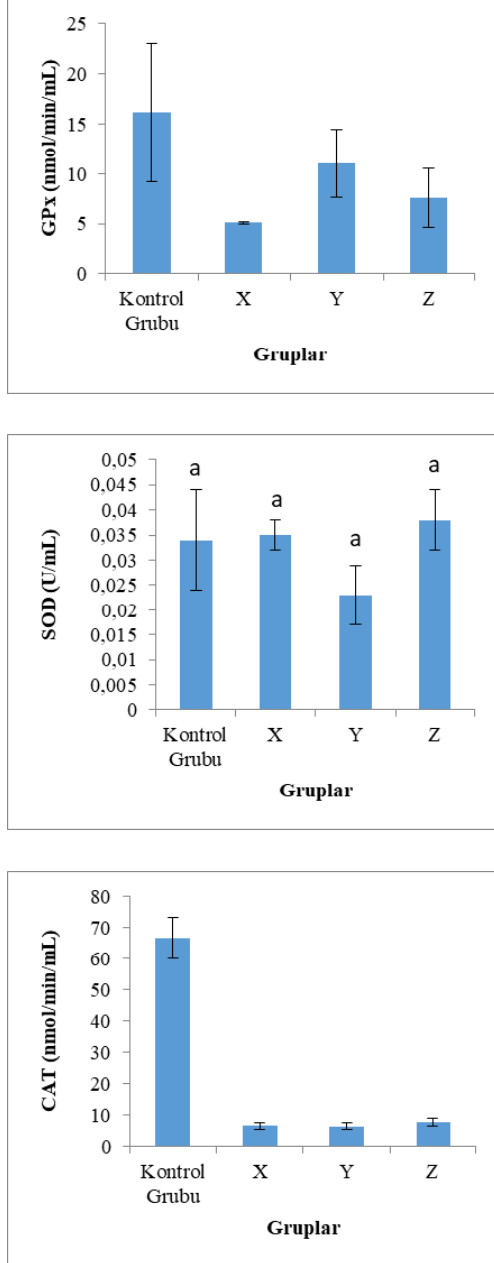
Dört deney grubu aşağıdaki gibi tasarlanmıştır: Kontrol grubu ve X (10 µg/L), Y (30 µg/L), Z (50 µg/L) kurşun uygulama grupları. Bireyler 96 saat boyunca 10, 20, 30 µg/L Pb(NO₃)₂'a maruz bırakılmıştır. Uygulama süresince konsantrasyon yenilenmesi yapılmamıştır. Bu dozlar Pb(NO₃)₂'ın litredeki molekül ağırlığından hesaplanmıştır.

Toplanan örnekler tartılmış ve enzim aktivitelerini analiz etmek üzere 1/5 oranında PBS (fosfat tampon çözeltisi) ilave edilerek buzlu homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Daha sonra numuneler 10000 g'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlenmiştir. SOD, CAT, GPx aktiviteleri, CAYMAN Chemical Company'den (Ann Arbor, MI, ABD) satın alınan ELISA kitleri kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol ve kurşun uygulama grupları arasındaki farkları değerlendirmek için tek yönlü ANOVA ve Duncan'ın çoklu aralık testleri kullanılmıştır (^{abc}P<0.05).

BULGULAR ve TARTIŞMA

96 saat boyunca farklı Pb konsantrasyonlarına maruz bırakılan *G. pulex* bireylerindeki SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

SOD aktiviteleri değişmemiştir. Tüm uygulama grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Kurşun maruziyetinden sonra CAT tüm uygulama gruplarında azalmıştır ($P<0.05$). GPx aktiviteleri de kurşun maruziyetine bağlı olarak azalmıştır ($P>0.05$) (Şekil 2).



Şekil 2. 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Pb çözeltisinde maruz kalmış *G. pulex*'te GPx, SOD ve CAT enzim aktivitesi.

* Farklı harfler (a ve b) kontrol ve tüm uygulama grupları arasında Duncan çoklu sınıf testlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir.

Kurşun, organizmalarda çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik işlev bozukluklarına neden olduğu bilinen yaygın bir çevresel kirlenmedir (Courtois vd., 2003). Suyu deşarj edilen metaller sucul organizmalarda ROS üretimine ve dolayısıyla antioksidatif savunmaların yanıt vermesine neden olabilmektedir (Liebler & Reed, 1997; Schlenk vd., 1999; Ahmad vd., 2000; Ruas vd., 2008; Monteiro vd., 2010).

ROS üretimi temel hücre seviyelerini aştığında ve hücrenin savunma kapasitesini aştığında oksidatif stres meydana gelir (Tagliari vd., 2004). Baskılanmış bir antioksidan sistem ve artan ROS üretiminin bir sonucu olarak oksidatif stres uyarılabilir (Farmand vd., 2005).

Son araştırmalar, kurşunun ROS oluşumunu artırarak, glutasyonu tüketerek, hücrelerin antioksidan savunma sistemini azaltarak, bazı esansiyel metalleri engelleyerek, sülfhidril (SH) bağımlı enzimleri veya antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT ve GPx gibi) inhibe ederek ve/veya membran bütünlüğünün ve yağ asidi bileşiminin değiştirilmesi yoluyla hücrelerin oksidatif saldırıya karşı duyarlılığını indükleyerek oksidatif stres yarattığını göstermiştir (Chiba vd., 1996; Adonaylo & Oteiza, 1999; Güner & Ercal, 2000; Wang vd., 2001; Hsu & Guo, 2002; Patra vd., 2011). SOD, CAT ve GPx enzimleri, prostetik gruplarından dolayı kurşun kaynaklı toksisite için potansiyel hedeflerdir (Michiels vd., 1994; Ercal vd., 2001).

SOD ve CAT, ROS'un doğrudan elimine edilmesinde bilinen birincil enzimlerdir. SOD'un biyolojik rolü, dismutasyon reaksiyonlarını katalize ederek O_2 'nin toksik etkilerine karşı hücreleri korumaktır. Bu reaksiyonda üretilen, katalaz ile giderilir (Gaetani vd., 1994). Katalaz, H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'e dönüşümünde rol oynadığı iyi bilinen bir antioksidan enzimdir (Yung vd., 2006). Çeşitli bulgular kurşunun SOD ve CAT üzerinde inhibe edici etkileri olduğunu göstermiştir (Chaurasia & Kar, 1997a; Chaurasia & Kar, 1997b; Soltanianejad vd., 2003; Vaziri vd., 2003). SOD'daki düşüş, enzimin -SH grubuna metalin doğrudan bloke edilmesiyle açıklanmıştır (Kasperczyk vd., 2004). GPx, CAT ve SOD, kurşun toksisitesi için olası hedeflerdir, çünkü bu antioksidan enzimler, uygun moleküler yapıları ve aktivite için çeşitli temel iz elementlerine dayanır (Patra vd., 2011). CAT azalan aktiviteleri kısmen kurşun ve bakır, çinko ve demir gibi esansiyel metaller arasındaki etkileşimle açıklanabilir (Sharma vd., 2011). GPx ve SOD aktiviteleri konsantrasyon artışına göre önce baskılanmış ancak daha sonra yüksek konsantrasyonda tekrar yükseliş göstermiştir.

GPx, hem hidrojen peroksit hem de lipid peroksitlerin indirgenmesini katalize eder. Sonuçlarımız, *G. pulex*'teki GPx faaliyetlerinin azaldığını göstermiştir. GPx tükenmesi, hücre ve organel membranların işlevsel ve yapısal bütünlüğünü etkileyen bir sonraki etki kademesi ile ROS oluşumunu ve oksidatif stres oluşumunu teşvik eder (Latha & Pari, 2004; Padmini & Rani, 2009).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut araştırmanın sonuçları, kurşunun aşırı maruziyetinin, *G. pulex*'teki enzimatik antioksidanlarda önemli derecede azalmalara neden olduğunu göstermektedir. Enzimlerin inhibisyonu, enzim moleküllerinin aktif bölgelerinde -SH gruplarına metal bağlanması bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. *G. pulex*'teki biyokimyasal biyobelirteçler (CAT, SOD ve GPx aktiviteleri) kurşun

toksitesinin biyobelirteçleri olarak görülmektedir. *G. pulex*, kurşun toksitesinin değerlendirilmesi için hassas bir biyomonitör organizma olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte, kurşunun doğal popülasyonlardaki fizyolojik öneminin daha iyi anlaşılmasını sağlamak ve bu ağır metalin farklı su organizmalarındaki etkilerini değerlendirmek için antioksidan enzimlerin biyobelirteç olarak kullanıldığı daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Adonaylo, V.N. & Oteiza, P.I. (1999).** Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*, **135**, 77-85.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M. & Raisudd, S. (2000).** Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1523**, 37-48.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K.V. (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S. & Genchi, G. (2016).** Lead toxicity, antioxidant defense and environment, P. de Voogt (ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **238**, XVI, 123p.
- Chaurasia, S.S. & Kar, A. (1997a).** Protective effects of vitamin E against lead induced deterioration of membrane associated type-1 iodothyronine 5' monodeiodinase (5'D-I) activity in male mice. *Toxicology*, **124**, 203-209.
- Chaurasia, S.S. & Kar, A. (1997b).** Influence of lead on type I iodothyronine 5' monodeiodinase activity in male Mouse. *Hormone and Metabolic Research*, **29**, 532-533.
- Chiba, M., Shinohara, A.K., Matsushita Watanabe, H. & Inaba, Y. (1996).** Indices of lead exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **178**, 49-62.
- Courtois, E., Marques, M. & Barrientos, A. (2003).** Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journals of the American Society of Nephrology*, **14**, 1464-1470.
- Ercal, N., Gürer-Orhan, H. & Aykin-Burns, N. (2001).** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **6**, 529-539.
- Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C.K. & Sindhu, R.K. (2005).** Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research*, **98**, 33-39.
- Feldman, R.G. & White, R.F. (1992).** Lead Neurotoxicity and Disorders of Learning. *Journal of Child Neurology*, **7**, 354-359.
- Flora, S.J.S. (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**, 191-206.
- Flora, S.J.S., Pachauri, V. & Saxena, G. (2011).** Arsenic, cadmium and lead. *Reproductive and Developmental Toxicology*, **33**, 415-438.
- Gaetani, G.F., Kirkman, H.N., Mangerini, R. & Ferraris, A.M. (1994).** Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, **84**, 325-330.
- Gidlow, D.A. (2015).** Lead toxicity. *Occupational Medicine*, **65**, 348-356.
- Gürer, H. & Ercal, N. (2000).** Can antioxidant be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Biology & Medicine*, **29**, 927-945.
- Güven, K., Özbay, C., Ünlü, E. & Satar, A. (1999).** Acute lethal toxicity and accumulation of copper in *Gammarus pulex* (L.) (amphipoda). *Turkish Journal of Biology*, **23**(4): 513-521.
- Hsu, P.C. & Guo, Y.L. (2002).** Antioxidant Nutrients and Lead Toxicity. *Toxicology*, **180**, 33-44.
- Kasperczyk, S., Birkner, E., Kasperczyk, A. & Zalejska-Fiolka, J. (2004).** Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **11**, 291-296.
- Koller, L.D. (1990).** The immunotoxic effects of lead in lead exposed laboratory animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **587**, 160-167.
- Latha, M. & Pari, L. (2004).** Effect of an aqueous extract of *scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **37**, 577-586.
- Liebler, DC & Reed, DJ. (1997).** Free-radical defense and repair mechanisms. In: *Free Radical Toxicology*, edited by Wallace KB. Washington DC: Taylor & Francis, 141-171p.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. & Remacle, J. (1994).** Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, **17**, 235-248.

- Monteiro, D.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L. (2010).** Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, **19**, 105-123.
- Padmini, E. & Rani, M.U. (2009).** Evaluation of oxidative stress biomarkers in hepatocytes of grey mullet inhabiting natural and polluted estuaries. *Science of the Total Environment*, **407**, 4533-4541.
- Patra, R., Amiya, C., Rautray, K. & Swarup, D. (2011).** Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Veterinary Medicine International*, 9p., doi:10.4061/2011/457327.
- Ruas, C.B.G., Carvalho, C.S., Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G. & Fernandes, M.N. (2008).** Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of three cichlid species from a polluted river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 86-93.
- Schlenk, D., Davis, K.B. & Griffin, B.R. (1999).** Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture*, **177**, 367-379.
- Sharma, S., Sharma, V. & Pracheta, P.R. (2011).** Lead toxicity, oxidative damage and health implications. a review. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, **2**(13), 215-221.
- Soltaniejad, K., Kebriaeezadeh, A. & Minaiee, B. (2003).** Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Human & Experimental Toxicology*, **22**, 417-433.
- Tagliari, K.C., Vargas, V.M.F., Zimiani, K. & Cecchini, R. (2004).** Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **17**, 149-157.
- Vaziri, N.D., Lin, C.Y., Farmand, F. & Sindhu, R.K. (2003).** Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nadph oxidase in lead induced hypertension. *Kidney International*, **63**, 186-194.
- Wang, H.P., Qian, S.Y., Schafer, F.Q., Domann, F.E., Oberley, L.W. & Buettner, G.R. (2001).** Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, **30**, 825-835.
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S. (1992).** The effect of salinity on copper and zinc concentrations in three species of talitrid amphipods (crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **101C**, 399-405.
- Williams, P.L. & Dusenbery, D.B. (1990).** Aquatic toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1285-1290.
- Yokoyama, K., Araki, S., Muraka, M., Morita, Y., Katsuno, N., Tanigawa, T., Mori, N., Yokota, J., Ito, A. & Sakata, E. (1997).** Subclinical vestibulo-cerebellar, anterior cerebellar lobe and spinocerebellar effects in lead workers in relation to current and past exposure. *Neurotoxicology*, **18**(2), 371-380.
- Yung, L.M., Leung, F.P., Yao, X., Chen, Z.Y. & Huang, Y. (2006).** Reactive oxygen species in vascular Wall. *Cardiovascular & Haematological Disorders - Drug Targets*, **6**(1), 1-19.

***Corresponding author's:**

Şule TATAR,

Munzur University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering, Tunceli, Türkiye.

✉E-mail: sytatar@munzur.edu.tr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-0107>