

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN DÜZ KASLARIN
KASILMA KİNETİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Selma KORKUTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Prof. Dr. Necla ÖZTÜRK

MERSİN-2009

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLERİN DÜZ KASLARIN
KASILMA KİNETİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Selma KORKUTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Prof. Dr. Necla ÖZTÜRK

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafında BAP-SBE BB
(SK) 2007-2 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

MERSİN-2009

Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Organik Fosforlu İsektisitlerin Düz Kasların Kasılma Kinetikleri Üzerine Etkileri" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/06/2009

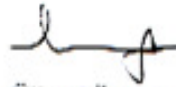


Prof. Dr. Nurten ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

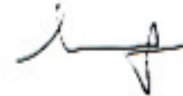


Doç. Dr. Rezan Hatungil
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 7/7/2009 tarih ve 2009/282 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZEGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Organik Fosforlu İnsektisitler	3
2.1.1. Etki Mekanizmaları.....	3
2.1.2. Diklorvos.	4
2.2. Asetilkolin	5
2.2.1. Asetilkolin Sentezi	5
2.2.2. Asetilkolin Hidrolizi.....	6
2.2.3. Asetilkolinesteraz.....	6
2.3. Atropin.....	7
2.4. Kolinerjik Reseptörler	7
2.4.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri.....	7
2.4.2. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri.....	8
2.5. Noromüsküler (sinir-kas kavşağı) Kavşak.....	10
2.6. Düz Kaslar.....	11
2.6.1. Visseral Düz Kasların Elektrik ve Mekanik Etkinliği	12
2.6.2. Kasılmanın Moleküler Temeli.....	13
2.6.3. Üniter Düz Kasta Spontan Aksiyon Potansiyeli ve Yavaş Dalga.....	13
2.6.4. Fallop Tüpleri	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Deney Hayvanları.....	17
3.2. Deney Protokolü.....	17
3.3. Preparat Hazırlanması.....	18
3.4. Organ Banyosu ve Deney Sistemi.....	18
3.5. Çözeltiler.....	19
3.6. İnsektisit Seçimi	19
3.6.1. Uygulanan Dozların Belirlenmesi	20
3.7. Deney Akışı.....	20
3.8. Analizler.....	21
3.8.1. Veri İşlemede Kullanılan Analizler	21
3.8.1.1. Hızlı Fourier Dönüşümü.....	21
3.8.2. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Diklorvosun Spontan Kasılmaların Genliği ve Frekansı Üzerine Etkisi.....	24
4.2. Atropin+Diklorvos Kombinasyonunun Spontan Kasılmaların Genliği ve Frekansı Üzerine Etkisi.....	33
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	40
8. EK 1	44
9. ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Organik fosforlu bileşiklerin genel yapısı	3
Şekil 2.2. Diklorvosun genel formülü	4
Şekil 2.3. Asetilkolinin genel formülü	5
Şekil 2.4. Asetilkolinin sentezi	6
Şekil 2.5. Asetilkolinin hidrolizi	6
Şekil 2.6. Atropinin genel formülü	7
Şekil 2.7. Nikotik asetilkolin reseptörü	8
Şekil 2.8. Muskarinik asetilkolin reseptörü	9
Şekil 2.9. Özelleşmiş sinir kas-kavşağı ve düz kaslara özgü özelleşmemiş sinir-kas kavşağı	10
Şekil 2.10. Düz kaslarda sinir kas kavşağı	11
Şekil 2.11. Üreter tonik kontraktilededyken ve lenfatik sistem düz kasınpreperatına ait hızlı fazik kasılmaların oluşturduğu aksiyon potansiyeli grafikleri	12
Şekil 2.12. Bir dış uyranala meydana gelmiş tipik düz kas aksiyon potansiyeli ve intestinal duvarın düz kasında spontan olarak meydana gelen yavaş ritmik elektriksel dalgalar tarafından oluşturulan, tekrarlanan sivri potansiyeller	14
Şekil 2.13. Uterus düz kasından kaydedilen platolu aksiyon potansiyeli	14
Şekil 2.14. Fallop tüpünde yumurtanın hareketi	16
Şekil 3.1. Bir fallop tüp preparatında altı farklı diklorvos dozunun etkisini gösteren kayıt örneği	17
Şekil 3.2. Sıçan fallop tüpleri izolasyonu	18
Şekil 3.3. Kayıt sisteminin genel görünüşü	19
Şekil 4.1. Diklorvos uygulanmadan önceki spontan aktivitenin zamansal değişimi	24
Şekil 4.2. Kontrol aktivitesinin Fourier analizi	25
Şekil 4.3. Banyo ortamına 1×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi	25
Şekil 4.4. Banyo ortamına 1×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi	26

Şekil 4.5. Banyo ortamına 5×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişim.....	26
Şekil 4.6. Banyo ortamına 5×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi	27
Şekil 4.7. Banyo ortamına 1×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.	27
Şekil 4.8. Banyo ortamına 1×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi	28
Şekil 4.9. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi	28
Şekil 4.10. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi	29
Şekil 4.11. Banyo ortamına 5×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi	29
Şekil 4.12. Banyo ortamına 5×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin Fourier analizi	30
Şekil 4.13. Banyo ortamına 1×10^{-4} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin zamansal değişimi	31
Şekil 4.14. Banyo ortamına 1×10^{-4} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi	31
Şekil 4.15. Ortalama genliğin doza bağlı değişimi.....	32
Şekil 4.16. Ortalama frekansın doza bağlı değişimi	32
Şekil 4.17. Kontrol aktivitesinin zamana göre değişimi	34
Şekil 4.18. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos+ 1×10^{-4} M atropin eklendikten sonraki spontan aktivitenin zamansal değişimi.....	34
Şekil 4.19. Kontrol (mavi) ve 2×10^{-5} M diklorvos+ 1×10^{-4} M atropin kombinasyonunun (kırmızı) Fourier analizleri	34
Şekil 5.1. İnsan fallop tüpü düz kas hücreleri arasında yerleşmiş bulunan ICLC hücreleri	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı dozlardaki diklorvosun fallop tüpüne uygulanmasıyla kaydedilen spontan kontraksiyonların Fourier analizi ile elde edilen genlik ve frekans değerleri...33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	: Angstrom
A	: Asetik asit
A(nω₀)	: Katsayı
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AKoA	: Asetil koenzim A
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
B(nω₀)	: Katsayı
°C	: Santigrat derece
Ca⁺²	: Kalsiyum
ChE	: Kolinesteraz
C₂HO	: Etanol
CO₂	: Karbondioksit
cm	: Santimetre
DC	: Doğru akım
DDVP	: Diklorvos
DFT	: Ayrık zamanlı Fourier dönüşümü
FFT	: Hızlı Fourier dönüşümü
g	: Gram
G1, G2, G4	: Asetilkolinesteraza ait farklı moleküler şekilleri
Hz	: Hertz
ICLC	: Cajal'ın interstisiyel hücre benzeri hücreleri
i. m.	: İntramüsküler
K	: Kolin
K⁺	: Potasyum
L	: Litre
LD50	: Letal doz
M	: Molar

M1, M2, M3, M4, M5	: Nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptörü alt birimleri
mAChR	: Muskarinik asetilkolin reseptörü
MATLAB	: Verilerin görselleştirilmesi, veri analizi ve sayısal hesaplamalar yapan program (Matrix Laboratory)
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
mV	: Milivolt
MgSO₄	: Mağnezyum sülfat
Na⁺	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
ω_0	: Açısal frekans
O₂	: Oksijen molekülü
π	: Pi sayısı
p	: İstatistiksel anlamlılık sabiti
PLA2	: Fosfolipaz A2
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D
T	: Periyot
$\alpha, \beta, \gamma, \theta$: Nikotinik asetilkolin reseptörü alt birimleri
σ_n	: Sabit

ÖZET

Organik Fosforlu İnsektisitlerin Düz Kasların Kasılma Kinetikleri Üzerine Etkileri

Dünyada ve ülkemizde tarım zararlıları ile mücadelede, verimli ve kaliteli ürün elde etmek amacıyla pestisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin hedef organizmaları yok etmelerinin yanı sıra, hedef olmayan canlılarda da hasara yol açması üstesinden gelinmesi gereken bir sorundur.

Bu çalışmada organik fosforlu bir insektisit olan diklorvosun, fallop tüpü düz kası spontan aktivitesine olan etkisi incelenmek üzere Sprague Dawley türü dişi sıçan kullanıldı. Deneylerde diklorvosun 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 6 farklı konsantrasyonuyla çalışıldı. Fallop tüplerinin ritmik spontan kontraksiyonları zaman alanında kaydedildikten sonra, Fourier Dönüşümü kullanılarak frekans alanına dönüştürüldü. Elde edilen Fourier analizi sonucunda diklorvos ve diklorvos+atropinin fallop tüplerinin spontan kontraksiyonları üzerine etkisi genlik ve frekans açısından değerlendirildi. Yapılan istatistiksel analizlere göre, veriler kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında uygulama dozunun 1×10^{-5} M düzeyine çıkmasıyla birlikte spontan aktivitenin genliğinde, 5×10^{-5} M düzeyine çıkmasıyla da spontan aktivitenin frekansında kontrole göre önemli miktarda azalma olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Uygulanan doz serisi sonunda, doz artarken genlik ve frekansdaki inhibisyon miktarı da artarak spontan aktivitenin kaybolduğu gözlemlendi. Diklorvos+atropin uygulamasında ise, spontan aktivite frekans değerleri kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı fark göstermezken ($p > 0.05$), genlik değerlerindeki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Çalışma sonucunda organik fosforlu insektisitlerin fallop tüpü düz kaslarının spontan aktivitesini inhibe ettiği gösterildi ve bu sonucun dölleme ve döllemiş yumurtanın uterusu yerleşmesi süreçlerini olumsuz etkileyebileceği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Organik fosforlu insektisitler, antikolinesteraz etki, ritmik spontan aktivite, düz kas, fallop tüpü.

ABSTRACT

The Effects of Organophosphorous Insecticides on Smooth Muscle Contraction Kinetics

Pesticides are commonly used against agricultural pests in the world and in our country to produce good and quality crops. It is a problem required to be coped with that pesticides which are used against agricultural pests not only eradicate target organisms but also causing to harm in non target organisms. In this study, we used female rats of Sprague Dawley species to investigate the effects of the dichlorvos, an organophosphate insecticide, on the spontaneous activity of fallopian tube smooth muscle. Six different dichlorvos concentrations were used in experiments: 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M. After fallopian tube's rhythmic spontaneous contractions had recorded in time area, they were converted frequency area by using Fast Fourier Transformation. As a result of Fourier analysis, the effects of dichlorvos, both dichlorvos and atropin on spontaneous contractions of fallopian tube were analysed in terms of frequency and amplitudes. According to the statistical analyses, when compared data obtained from Fourier analysis with control values, we observed a considerable decreases in comparison with control in spontaneous activity amplitude by increasing administered dosage gradually to 1×10^{-5} level and in spontaneous activity frequency by increasing administered dosage gradually to 5×10^{-5} level ($p < 0.05$). While dosage was increasing, the inhibition volume in amplitude and frequency also increased and the spontaneous activity was lost at the end of the administered dosage series. In administering dichlorvos and atropin, we found no significant difference between spontaneous activity frequency values and control ($p > 0.05$) but changes in amplitude values were found significant as statistical ($p < 0.05$).

The result of our study is organophosphate insecticides inhibited the spontaneous activity of fallopian tube smooth muscle and it's thought that this result could have negative effects on fertilization and the settling of zygote in uterus.

Key Words: Organophosphorous insecticides, anticholinesterase effect, smooth muscle, rhythmic spontaneous activity, fallopian tube.

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması sonucu ortaya çıkan besin ihtiyacını karşılamak ve birim alandan daha fazla ürün almak amacı ile uygulanan kültürel önlemlerden biri de pestisit kullanımınıdır. Tarımsal ürünlere zarar veren ve ürün kaybına neden olan hastalık, zararlı ve yabancı otları yok etmek için kullanılan kimyasal ilaçlara pestisit denir. Pestisitler böcek öldürücüler (insektisit), zararlı ot öldürücüler (herbisit), kemirici öldürücüler (rodentisit), mantar öldürücüler (fungusit) ve nematod öldürücüler (nematosisit) olarak sınıflandırılırlar.

Dünyada ve ülkemizde tarım alanındaki zararlıları yok etmek ve daha kaliteli ürün elde etmek amacıyla pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Tarımsal savaşında kullanılan pestisitler, hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olabildikleri gibi, hedef olmayan canlılarda da hasara yol açmaktadır. Bu maddeler hedef olmayan organizmaya çeşitli yollarla girmekte ve bu organizmada sinir sistemi, endokrin sistem, immün sistem, karaciğer, kas, kalp, kan, boşaltım ve diğer sistemleri etkileyebilmektedir (1-8). Ayrıca su ve rüzgar bu kimyasalların çevreye dağılımını kolaylaştırmakta ve birçok organizmayı daha kolay etkilemesini sağlamaktadır.

Günümüzde tarım ilaçlarının kullanımı tüm dünyada sıkı denetim ve kontrol altında yapılmaktadır. Ancak ülkemizde tarım ilaçları gereğinden fazla ve hiçbir önlem alınmadan kullanılmaktadır. Avrupa ve Amerika'da daha önce kullanılan fakat çok zehirli olduğu için tamamen yasaklanan ilaçların bir kısmı ülkemizde halen ruhsatlı olarak satılmaktadır. Son yıllarda Avrupa ve Amerika'daki tarım ilacı üreten tesisler çevresel baskılar nedeni ile kapatılmıştır. Bu fabrikalar Çin, Hindistan gibi ülkelerde üretimlerine devam etmektedirler. Burada üretilen ilaçların birçoğu Avrupa ve Amerika'da kullanılmamakta ve gelişmekte olan ülkelere satılmaktadır.

Polikültür tarım yapılmasına bağlı olarak Mersin ve çevresi tarım alanları pestisit tüketimi açısından ülkemizde ilk sıralarda yer almaktadır. Tarım ilaçlarının bu kadar yoğun kullanımı hem uygulayıcı, hem tüketici hem de çevre sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle tarım ilaçlarının hedef olmayan canlılar üzerindeki etkisinin incelenmesi insan ve çevre sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

İnsektisitler organofosforlu bileşikler, metilkarbamatlar, klorlu hidrokarbonlar, piretroidler ve neonikotinoid insektisitler olmak üzere beş gruba ayrılırlar. Diğer insektisit türleri gibi organofosforlu insektisitler de Mersin ve çevresi tarım alanlarında zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Organofosfatlar, etkiledikleri canlılarda akut ve kronik zehirlenmelere neden olurlar. Organofosfatlar etkilerini kolinerjik sinapslarda asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek gösterirler (9). Asetilkolinesteraz inhibitörleri vücutta tüm sinir uçlarında, düz kaslarda merkezi sinir sisteminde asetilkolin birikimine ve sinirlerin aşırı uyarımına neden olur (10, 11).

Organofosforlu insektisitlerin düz kas içeren organlar üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Aortta yapılan çalışmalarda organofosforlu bileşiklerin elastik ve kollajen liflerinde hasara yol açtığı, aortun sertliğini değiştirerek damar duvarının yapısını bozduğu saptanmıştır (12, 13, 14). Solunum yollarında yapılan çalışmalarda bronşial sekresyonda artış, bronkospazm, ödem ve solunum gücüne yol açtığı, gastrointestinal sistemde ise kramplara neden olduğu bildirilmiştir (1). Bu bileşiklerin memelilerin üreme fonksiyonlarında önemli bir role sahip olan uterus düz kası üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

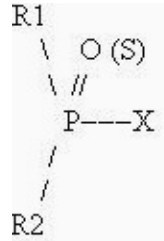
Bu tez çalışmasında ilimizde yaygın olarak kullanılan ve organofosforlu bir insektisit olan diklorvosun uterus fallop tüpü düz kasının spontan aktivitesi üzerine, doza bağlı etkilerinin biyofiziksel yöntemler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Organik Fosforlu İsektisitler

Organik fosforlu insektisitler ilk kez 1937 yılında bir grup Alman kimyacı tarafından sentez edilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Oldukça toksik özelliğe sahip olan bu bileşikler ikinci dünya savaşında Naziler tarafından kimyasal silah olarak kullanılmış ve çok sayıda kişinin ölümüne neden olmuştur (1).

Organik fosforlu insektisitlerin çoğu oda sıcaklığında sıvı formdadır (fazdadır). Suda büyük oranda çözünebilirken, petrol gibi diğer organik çözücülerde suya oranla daha az çözünürler (15). Organik fosforlu insektisitler merkezi bir fosfor atomu ve bu atoma çift bağla bağlanmış oksijen ya da sülfür grubu içerir. R1 ve R2 etil veya metil grubunu temsil ederken, X organik fosforlu insektisit türünü belirleyen gruptur (16), (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Organik fosforlu bileşiklerin genel yapısı (16).

2.1.1. Etki Mekanizmaları

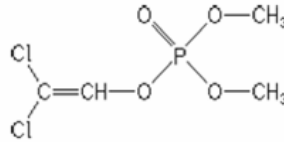
Organofosfat esterleri toksik etkilerini asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek ve nöromüsküler kavşakta asetilkolin birikimine yol açarak gösterirler (17). Asetilkolin esteraz enzimi kolinerjik sinapslarda asetilkolinin hidrolizinden sorumlu olan ve pre-sinaptik terminalde yer alan bir enzimdir. Organik fosforlu insektisitler asetilkolinesteraz üzerindeki bu etkileri nedeniyle, “antikolinesteraz” olarak bilinen kolinesteraz inhibe edici kimyasal gurubundandırlar (18, 19). Diğer antikolinesterazlarda da olduğu gibi vücutta tüm sinir uçlarında, düz kaslarda, merkezi

sinir sisteminde asetilkolin birikimine ve sinirlerin aşırı uyarımına neden olurlar. Artmış kolinerjik aktivite “kolinerjik kriz” olarak bilinir ve salgı bezlerinin aşırı çalışması, salgıda artış, aşırı bronşial salgılama, kasların kasılı kalması gibi belirtiler gösterir (11, 20).

Organofosfor esterleri hedef olmayan organizmaya sindirim, solunum ve deri yoluyla girebilir, tüm vücuda yayılabilir ve yüksek dozları bu nedenle ani ölümlere neden olabilir. Organofosfor ester zehirlenmelerinin değişik sistem ve organlarda oluşturduğu belirtiler, etki yeri ve belirtilerin lokalize veya sistemik olup olmamasına göre değişmekle beraber, lokalize belirtiler; miyozis, görme bozukluğu, bronkospazm, bronşiyal sekresyonda artış, fasikülasyon, sistemik belirtiler ise bronkokonstrüksiyon, kramp, felç, hipotansiyon, bradikardi gibi sıralanabilir (21, 22).

2.1.2. Diklorvos

Diklorvos (DDVP) organik fosforlu bir insektisit olup yaygın kullanım alanına sahiptir. Sentetik bir organik kimyasal olan diklorvos, ilk kez 1954’de üretilmiş, 1961’de kullanılmaya başlanmıştır. 1980’de USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) tarafından yürütülen çalışmalarda mutajenik, onkojenik, nörotoksik olduğu, bunu takip eden araştırmalarda ise hepatoksik ve kolinesteraz (ChE) inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Kimyasal formülü (Şekil 2.2.) $C_4H_7Cl_2O_4P$, kimyasal ismi fosforik asit 2,2 dikloroetenil dimetil ester (Phosphoric acid, 2,2-Dichloroethenyl dimethyl ester), molekül ağırlığı 221 g/mol, LD50 25-80 mg/kg (i.m.), suda çözünürlüğü 18mg/L (25 °C) dir (23, 24, 25).



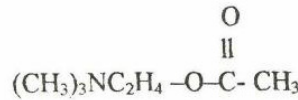
Şekil 2.2. Diklorvosun genel formülü (26).

Diklorvos sindirim (oral), deri (dermal), soluk alıp verme (inhalasyon) yoluyla vücuda girebilir. Yağda eriyebilen (lipofilik) özellikte bir moleküldür. İnsan vücudunda yarılanma ömrü 10 dakikadır. Giriş yaptıktan hemen sonra hızla metabolik reaksiyonlara alınır, kan dolaşımı yoluyla bütün organlara ulaşabilir. Kan ve karaciğerde bir takım indirgenme reaksiyonlarından oluşan sistemik döngülerle metabolize edilir (24).

Diklorvosun düz kaslar üzerine etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ebeigbe ve Campbell tarafından izole sıçan kuyruk arterinde yapılan çalışmada diklorvosun arter düz kaslarında gevşemeye neden olduğu gözlenmiştir (27). Schmidt ve arkadaşları diklorvosun sıçan bronşial düz kaslarında asetilkolinesteraz aktivitesini azalttığını ve bu azalmanın da havayolu direncindeki artıştan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir (28). Güvenç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise diklorvosun aortun mekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiş ve bu insektisit, aortun sertliğini değiştirdiği saptanmıştır (29).

2.2. Asetilkolin

Otonom sinir sisteminde kolinerjik kavşaklarda (sinapslarda), impuls taşınımını sağlayan ve santral sinir sisteminde (SSS) yaygın olarak bulunan bir nörotransmitterdir (Şekil 2.3.). Santral sinir sisteminde bulunduğu sinapslar, başlıca sempatik ve parasempatik gangliyonlardaki sinapslar, adrenal medullada pregangliyonik sempatik sinir lifleriyle kromafin hücreler arasındaki sinapslar ve parasempatik postgangliyonik sinir lifleri ile efektör hücreleri arasındaki sinapslardır (30).



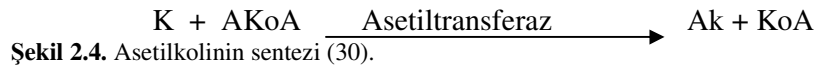
Şekil 2.3. Asetilkolinin genel formülü (18).

2.2.1. Asetilkolin Sentezi

Asetilkolin kolinerjik sinir uçlarında, kolin (K) asetil transferaz enzim katalizörlüğünde gerçekleşen kolinin enzimatik asetilasyon tepkimesi ile sentezlenir (Şekil 2.4.). Asetilasyon tepkimesinde kullanılan asetil, sinir uçlarındaki

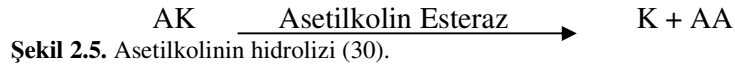
mitokondrilerden sentezlenen bir asetil vericisi olan asetil ko-enzimA (AKoA)'dan sağlanırken, kolin ise sinapslarda yıkılan asetilkolinden, vucutta yıkılan fosfolipidlerden ve diyetle alınan ekzojen kolinden temin edilir (30, 31).

Kolinerjik sinir uçlarında reversible (geri dönüşümlü) bir reaksiyon ile kolin ve asetil ko-enzimA'dan alınan aktif asetil radikalinin kolin asetiltransferaz enziminin katalizi ile asetilkolin sentezlenir (30). Bu enzim kolinerjik sinir uçlarının sitoplazmasında yüksek derişimde bulunur (32).



2.2.2. Asetilkolin Hidrolizi

Asetilkolin inaktivasyonu sinaps aralığında bulunan asetilkolinin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidrolizi ile kolin ve asetik aside (AA) dönüşüm tepkimesiyle gerçekleşir (Şekil 2.5.).



Psödokolinesteraz olarak isimlendirilen bir diğer asetilkolin hidroliz enziminin var olduğu da bilinmektedir ancak bu enzim asetilkolini daha yavaş parçalar ve sinapslarda bulunmadığından burada gerçekleşen asetilkolin hidrolizine bir katkısı yoktur (30).

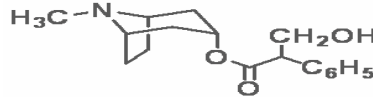
2.2.3. Asetilkolinesteraz (AChE)

Kolinerjik sinapslarda bulunan, kolin esterleri içinde asetilkolini en hızlı hidroliz eden ve “gerçek kolinesteraz” olarak da isimlendirilen bir enzimdir. Kolinerjik nöronlarda sentezlenip aksonal taşınmayla sinapslara taşınır. Sık karşılaştığı yerler olan kolinerjik sinapslar dışında eritrositlerde, trombositlerde, lenfositlerde ve

plasentada da bulunduğu bilinmektedir. G1, G2, G4 olarak gösterilen üç farklı moleküler şekli vardır ve bunlardan G4 genelde beyinde, G1 ve G2 ise nöromüsküler kavşaklarda bulunur. Asetilkolin bazı düz kas lifleri için uyarıcı, bazıları için inhibe edicidir (30).

2.3. Atropin

Düz kas, dış salgı bezi ve kalp kası gibi efektör hücrelerin muskarinik tipteki kolinerjik reseptörlerini (kolinoseptörlerini) bloke eden ilaçlar olarak bilinen “antimuskarinik” ilaç sınıfındandır (Şekil 2.6.). Antimuskarinik etkisini, muskarinik reseptörlerin dört alt-tipine (M₁, M₂, M₃ ve M₄) karşı eşit affiniteyle gösterir. Reseptör blokajından sonra farmakolojik etkisinin oluşması efektör organlar üzerinde var olan parasempatik tonusun azalmasıyla veya ortadan kalkmasıyla gerçekleşir. Klinik organofosfor zehirlenme vakalarında antidot olarak kullanılır (30).



Şekil 2.6. Atropinin genel formülü (31).

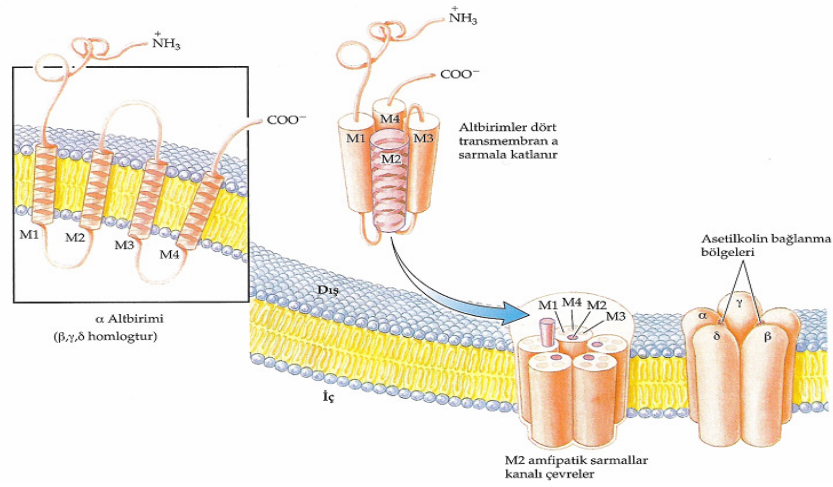
2.4. Kolinerjik Reseptörler

Asetilkolin muskarinik ve nikotinik reseptör olmak üzere iki tip reseptörü aktive eder. Bu iki reseptör, muskarinik reseptörlerin mantar alkaloidi muskarine, nikotinik reseptörlerin ise nikotine olan duyarlılığıyla birbirinden ayrılırlar. Yapısal ve işlevsel olarak birbirlerinden farklıdır (33).

2.4.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

Bir kanal oluşturacak şekilde bir araya gelmiş, M₁-M₂-M₃-M₄-M₅ beş alt birimden oluşan ligand kapılı bir katyon kanalı yapısındadır. Alt birimlerden her biri, dört transmembran bölgesi ve (γ , β , 2α , δ) alt bileşenlerinden oluşmuştur. M₁-M₂-M₃-M₄-M₅ alt birim, M₂ sarmallarıyla kaplanan merkezi bir gözeneği çevreler. Gözenek sitozolik ve hücre dışı yüzeyden çıkıntı yapan kısımlarında yaklaşık 20 Å°

genişliğindedir ancak zarın çift katlı lipid katmanından geçerken daralır. Lipid katmanının merkezine yakın kısmında M2 sarmalda bulunan Leu yan zincirleri kanaldan iyonların geçişini engelleyecek şekilde konumlanarak bir halka oluşturur. Reseptöre ligand (asetilkolin veya nikotin) bağlanmasıyla allosterik yapısal değişiklikler gözlenir ve iyon geçişine izin verilir. ACh'nin α alt birimlerine bağlanması, M2 sarmalının dönmesiyle birlikte indüklenmiş allosterik yapısal değişikliğe neden olur. M2'nin dönmesi kanalı kapatan, beş tane Leu amino asitinin kanaldan uzaklaşmasını sağlar. ACh veya nikotin bağlandığı zaman hem Na^+ hem de K^+ geçişine izin verir (Şekil 2.7.), (33).

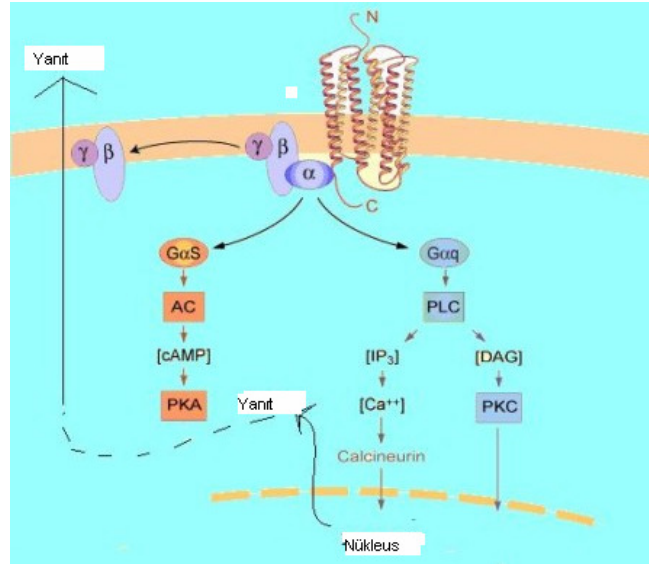


Şekil 2.7. Nikotinik asetilkolin reseptörü (33).

2.4.2. Muskarinik Asetilkolin Reseptörleri

Muskarinik reseptörler, G protein kenetli reseptör ailesinin üyesidirler (Şekil 2.8.). Moleküler klonlama çalışmaları ile beş intronsuz gen tarafından kodlandığı ve beş farklı glikoproteini kodladığı belirlenmiştir. Muskarinik reseptör genleri, türler arasında oldukça benzerlik göstermektedir. Muskarinik reseptörler (M1, M3, M5) ve (M2, M4) olmak üzere iki fonksiyonel kategoriye ayrılmaktadır: M1, M3 ve M5 reseptörleri öncelikle Gq/11 proteinleri aracılığı ile fosfolipaz C'yi aktive ederken M2, M4 reseptörleri Gi/o proteinleri aracılığıyla adenilat siklazı inhibe etmektedir. Muskarinik reseptörler merkezi ve periferal dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. M1 reseptörleri önbeyinde özellikle hipokampus ve serebral korteksde, M2 reseptörleri kalp ve beyin kökünde, M3 reseptörleri düz kas, ekzokrin salgı bezleri ve serebral korteksde, M4 reseptörleri neostriatumda ve M5 reseptörleri substantia nigrada bulunmaktadır.

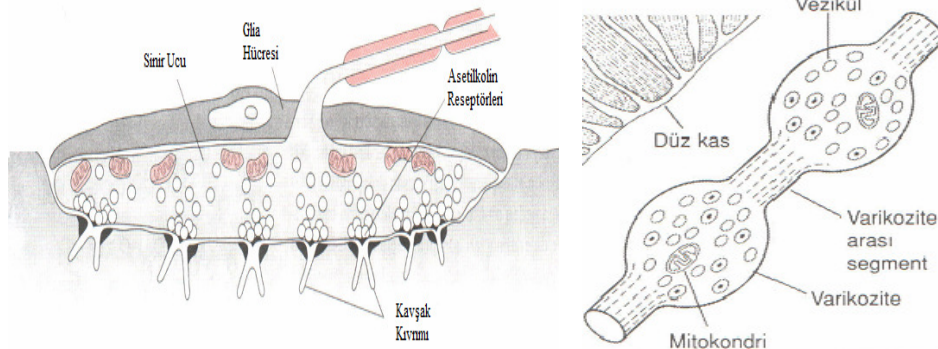
Merkezi sinir sisteminde fazla bulunan M1 reseptörleri, asetilkolinle indüklenen MAP kinaz aktivasyonuna aracılık etmektedir. MAP kinaz hafıza için gereklidir. Beyin M2 reseptörleri antinosiseptif (analjezik) etki için önemli rol oynamaktadır. Ayrıca M2 reseptörleri muskarinik asetilkolin reseptörü bağımlı mide, trake ve mesane düz kaslarının agonistle uyarılması için gereklidir. M3 reseptörleri, kolinerjik etkenlerle uyarıldıklarında kasılma cevabına aracılık etmektedirler. M3 reseptörleri tükürük salgılanması, pupil daralması ve mesane detrüsr kasının kasılmasında fonksiyoneldir. Beyin M4 reseptörleri merkezi dopaminerjik cevapların ve periferal düz kas tonusunun düzenlenmesine katılmaktadır. M5 reseptörlerinin dopamin salınımının düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir, fakat bu düzenlenme mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır (35). Şekil 2.8. muskarinik reseptörlerde sinyal çevirimini göstermektedir. Muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ikinci haberci bağımlı ve bağımsız yolları uyarabilir. İkinci haberci bağımlı yollarda muskarinik reseptörlerin aktivasyonu ile adenilat siklaz, fosfolipaz C (PLC), fosfolipaz A2 (PLA2), fosfolipaz D (PLD) ve hücre içi Ca^{+2} salınmasını da içeren farklı sinyal ileti yollarının uyarıldığı gösterilmiştir. Muskarinik reseptör aracılı sinyal iletiminde, farklı sistemlerde farklı G proteinleri etkili olabilir. Tek bir muskarinik asetilkolin reseptörü (mAChR) bir ya da birden fazla G proteini ile etkileşebileceği gibi, mAChR'lerin farklı alttipleri aynı G proteini ile de kenetlenebilmektedir. Ayrıca reseptör tek sinyal iletici ile kenetlenerek hücre tipine göre farklı yanıtlar da oluşturabilir (33, 36).



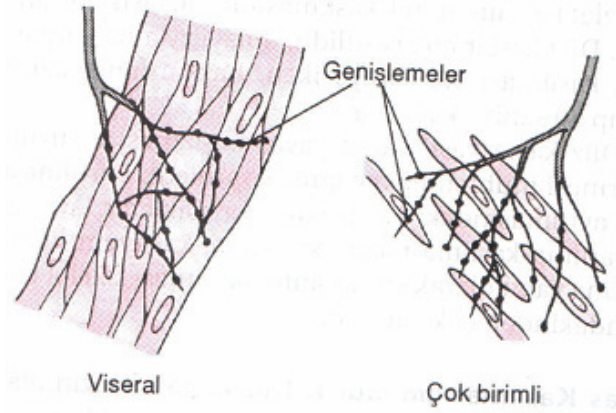
Şekil 2.8. Muskarinik asetilkolin reseptörü (36).

2.5. Nöromusküler Kavşak (sinir-kas kavşağı)

Kavşaklar, presinaptik hücrenin akson veya bazı bölümlerinin, diğer nöronun dendritleri, soması veya aksonu üzerinde veya kas ya da salgı hücresi gibi bir post sinaptik hücre üzerinde sonlandığı noktalarlardır. Presinaptik hücre olarak bir motor sinirinin, postsinaptik hücre olarak da bir kas hücresi üzerinde sonlandığı özelleşmiş alana sinir-kas kavşağı denir. Düz kasta iskelet kası liflerinde bulunan oldukça düzenli sinir-kas kavşakları yoktur (Şekil 2.9.). Düz kası innerve eden otonom sinir lifleri bir kas tabakası üzerine diffüze olarak dallanır. Bu diffüze (yaygın) kavşaklar, transmitter maddeleri kasların belirli bir mesafe uzaklığında matrikse salgılar ve transmitterler hücreye diffüze olur. Bunlarla birlikte sinir sonlanmalarında iskelet kas liflerini uyaran motor sinir liflerinin dallanan ayak sonlanmasına da sahip değildir. Düz kasta bunun yerine ince terminal sonlanmalarında genişlemeler (varikozite) gözlenir (Şekil 2.10.). Varikozitelerde veziküller içerisinde transmitterler bulunur. Ayrıntılı olarak incelenmiş çeşitli düz kaslarda, postgangliyonik nöronlar yoğun bir şekilde dallanır ve kas hücreleriyle sıkı bir şekilde bağlantı kurar. Bu sinir liflerinin bazıları berrak veziküller içeren kolinerjik veziküller iken, diğerleri noradrenalin içerdiği bilinen, karakteristik yoğun çekirdekli veziküllerdir. Nöradrejenik ve kolinerjik nöronların birçok dalı, Schwann hücreleriyle çevrelenmiş ve kavşak vezikülleri içeren, boncuk şeklinde dizilmiş genişlemeler (varikozite) oluşturur. Transmitterler her varikoziteden yani her akson boyunca bir çok noktadan salınır (Şekil 2.10.). Nöronun bu özelliği bir çok efektör hücreyi innerve etmesine izin verir (33, 36).



Şekil 2.9. Özelleşmiş sinir kas kavşağı ve düz kaslara özgü özelleşmemiş sinir kas kavşağı (33, 36).



Şekil 2.10. Düz kaslarda sinir-kas kavşağı (36).

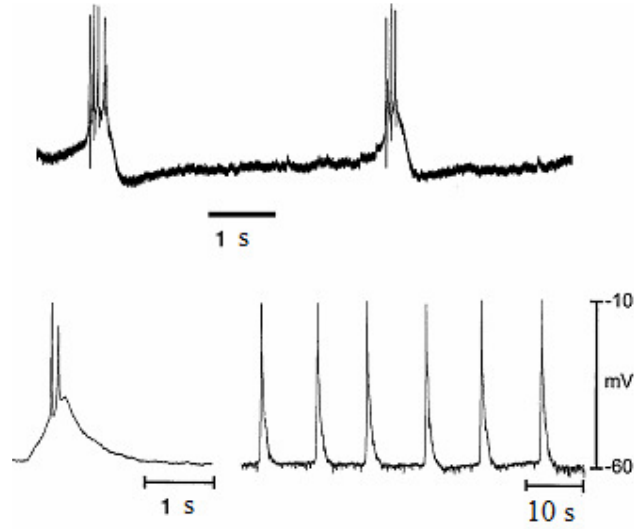
2.6. Düz Kaslar

Düz kas genel olarak, çok birimli düz kas ve üniter (tek birimli) düz kas olarak ikiye ayrılır. Çok birimli düz kas, birbirinden ayrı düz kas hücrelerini içerir. Genelde tek bir sinir sonlanmasıyla uyarılır ve her hücre birbirinden bağımsız olarak aktiflik gösterir. Her lifin diğerinden bağımsız kasılması ve sinir sinyalleri ile kontrol ediliyor olması, çok birimli düz kasları, visseral düz kaslardan ayıran en önemli özelliğidir. Vücutta bulunan çok birimli düz kaslara gözün silyer kas lifleri, tüylerin dikleşmesini sağlayan piloerektör kaslar örnek olarak verilebilir.

Üniter düz kas, tek bir birim gibi birlikte kasılan yüzlerce veya milyonlarca kas lifini içerir. Lifler genellikle demet veya katlar halinde bir arada bulunur. Hücre membranları birçok noktada bitişiktir. Bu membran yakınlığı bir lifte üretilen kas gücünün iletilmesini sağladığı gibi iyonların bir hücreden diğerine kolaylıkla geçmesini sağlayan yarık bağlantıya (gap kavşak) sahiptir. Yarık bağlantı bölgeleri birer köprü gibi iyonların serbest geçişini sağlayarak, aksiyon potansiyeli veya basit iyon akımının lifler arası geçmesiyle liflerin birlikte kasılmasına izin verir. Düşük dirençli bu yarık kavşak köprüleri, tıpkı kalp kasındaki gibi iki komşu hücrenin gap kavşaklar yapmak üzere birleştiği bölgelerdir ve sinsisyel işlev gösterir. Üniter düz kas tipi, lifler arasındaki bu bağlantılar nedeniyle sinsisyel düz kas olarak da isimlendirilir. Vücutta birçok iç organın duvarında bu tip kas bulunduğu için bu grup kaslara visseral düz kaslar da denilmektedir. Visseral düz kas içeren organlara barsak, safra kanalları, kan damarları, uterus örnek olarak verilebilir (33, 36).

2.6.1. Visseral Düz Kasların Elektrik ve Mekanik Etkinliği

Visseral düz kas kararlı olmayan bir membran potansiyeline sahip ve sinirsel uyarımlar olmaksızın sürekli ve düzenli olmayan kasılmalar ile karakterizedir. Membran potansiyelinin, sabit bir dinlenme potansiyel değeri olmayıp hücre aktif iken kısmen düşük, hücre dinlenimdeyken ise kısmen yüksek bir değerde olup yaklaşık 50 mV civarındadır. Dinlenme membran potansiyelini aşan potansiyel değerlerinden sonra oluşan aksiyon potansiyellerinin depolarizasyon evresinden kasılmanın başlamasına kadar geçen süre yaklaşık 10 ms'dir. Bu da visseral düz kaslardaki uyarı-kasılma çiftleniminin iskelet ve kalp kasına kıyasla çok yavaş seyrettiğini gösterir. Viseral düz kas aksiyon potansiyeli sivri potansiyeller ve platolu potansiyeller olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Sivri aksiyon potansiyeller 10-50 ms süreye sahiptir (Şekil 2.11.). Bu tip potansiyeller, hormonların düz kasa etkisi, transmitter madde salınımı, germe etkisi veya kas lifinin spontan aktivite üretimi gibi çeşitli durumlarda ortaya çıkabilir (33, 38).



Şekil 2.11. Üreter tonik kontraktiledyken ve lenfatik sistem düz kas preparatına ait hızlı fazik kasılmaların, aksiyon potansiyel grafikleri (38).

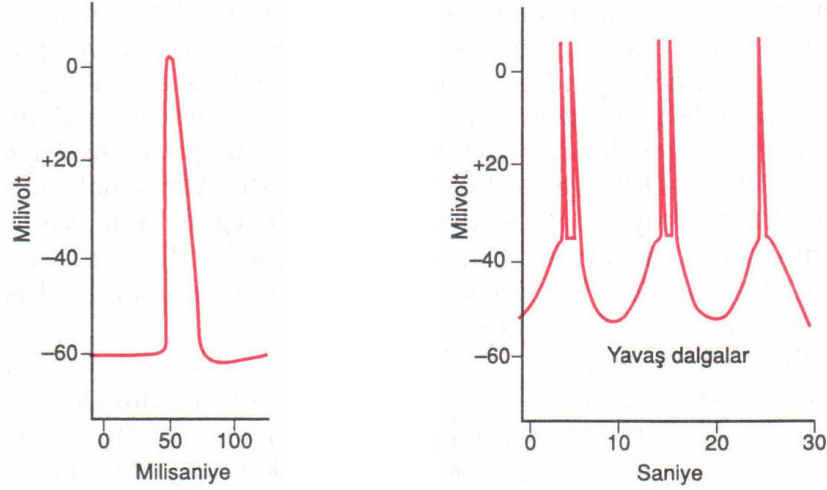
2.6.2. Kasılmanın Moleküler Temeli

Ca^{+2} iskelet kasında olduğu gibi düz kas kasılmasında da önemli rol oynamaktadır. Ancak visseral düz kas genellikle az gelişmiş bir sarkoplazmik retikulum içerir ve kasılmayı başlatan hücre içi Ca^{+2} derişimindeki artış esas olarak voltaj bağımlı kanallar aracılığı ile hücre dışı ortamdaki, hücre içine olan Ca^{+2} iç akışına bağlıdır. Ayrıca miyozin ATPazın etkinleştirilmesi için düz kastaki miyozinin fosforlanması zorunludur. Düz kasta Ca^{+2} kalmodüline bağlanır ve oluşan yapı, kalmodüline bağımlı miyozin kinazı etkinleştirir. Fosforlama, miyozin ATPazın aktifleşmesine izin verir ve aktin, miyozin üzerinden kayarak kasılmayı meydana getirir. Miyozin başının düzenleyici zincir olarak bilinen kısmı miyozin kinaza yanıt olarak fosforile olur. Bu düzenleyici zinciri fosforile değilken miyozin başının aktin ile tutunma-ayrılma döngüsü gerçekleşmez (33, 36).

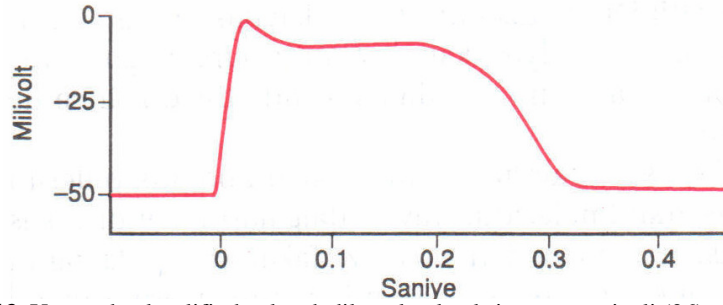
Miyozin hücredeki, miyozin fosfotaz tarafından defosforile edilir. Miyozin çapraz köprülerini, sitoplazmik Ca^{+2} derişimi düştükten sonra bir süre aktine bağlı halde tutan bir kilitlenmiş köprü mekanizması bulunmaktadır. Bu olay özellikle damar düz kası için önem taşıyan az enerji harcamasıyla uzun süren kasılmayı sağlar. Kalpte kasılma yanıtları genelde fazik olup ardışık kasılma gevşeme dönemleri var iken, düz kasta kasılma, kilitli köprü mekanizması nedeniyle çoğunlukla toniktir (33, 36, 38).

2.6.3. Üniter Düz Kasta Spontan Aksiyon Potansiyeli ve Yavaş Dalga

Bazı düz kaslar dışarıdan bir uyarı olmaksızın kendi kendilerini uyrabilirler ve intestinal düz kas duvarlarında olduğu gibi yavaş dalga ritmi ile ilişkilendirilir. Yavaş dalga ritmi membran boyunca yayılan aksiyon potansiyel karakterinde olmayıp, Na^{+} pompasının membrandan dışarıya pozitif yük pompalandıktan sonra, membran potansiyelinin daha negatif hale gelmesi ya da tam tersi süreçleri kapsar. Yavaş dalgaların potansiyelleri -35 mV'un üzerindedir ve bu da birçok düz kasta aksiyon potansiyeli oluşturacak eşik değeri karşılanmaktadır. Pacemaker dalgaları da denen bu yavaş dalgalar düz kas kitlesinde ritmik kasılmalar oluşturabilir (Şekil 2.13., Şekil 2.12.), (33, 38).



Şekil 2.12. Bir dış uyarıyla meydana gelmiş tipik düz kas aksiyon potansiyeli ve intestinal duvarın düz kasında spontan olarak meydana gelen yavaş, ritmik elektriksel dalgalar tarafından oluşturulan, tekrarlanan sivri potansiyeller (36).



Şekil 2.13. Uterus düz kas lifinden kaydedilen platolu aksiyon potansiyeli (36).

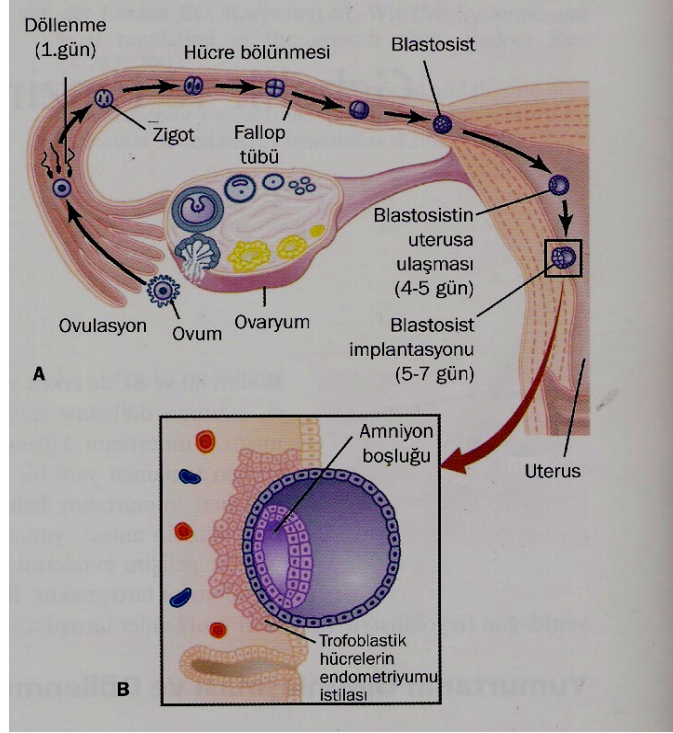
Visseral düz kasların diğer bir özgülüğü de gerildiğinde herhangi bir dış innervasyon yok iken kasılabilmeleridir. Gerilmeyi zar potansiyelinde bir azalma ile tonusta oluşan genel bir artış izler. Visseral düz kasın kasılma-gevşeme aktiflik sırası;

- 1) Asetil kolin müskaridik reseptörlere bağlanması.
- 2) Hücre içine Ca^{+2} akışında artma.
- 3) Kalmodüline bağımlı, miyozin hafif zincir kinaz etkinleşmesi.
- 4) Miyozinin fosforlanması.
- 5) Miyozin ATPaz etkinliğinde artış ve miyozinin aktine bağlanması.

2.6.4. Fallop Tüpleri

Fallop tüpleri yaklaşık 12 cm uzunluğunda, büyük hareketliliğe sahip kaslı bir kanaldır. İfundibulum olarak adlandırılan bir ucu ovaryum yakınında periton boşluğuna açılır ve fimbriya adı verilen çok sayıda parmaklı uzantılardan oluşan bir saçaklanma gösterir, diğer ucu uterus duvarını geçerek iç kısmına açılır. Duvarı üç katmandan oluşur mukoza, kalın düz kas tabakası, seroza ve visseral peritondan oluşur. Düz kas tabakası içte bir spiral katman ve dışta yer alan uzunlamasına yerleşmiş düz kas hücrelerinden oluşur. Mukoza en çok ampullada olmak üzere uzunlamasına kıvrımlar içerir. Enine kesitlerde ampullanın lümeni bir labirente benzer, tubanın uterusu yakın kısımlarında katlanmalar azalarak lümeneye doğru uzanan küçük çıkıntılara dönüşür ve iç yüzeyi neredeyse dümdüz bir hale gelir (39).

Ovülasyondan sonra yumurta, doğrudan periton boşluğuna atılır. Uterus boşluğuna ulaşabilmesi için fallop tüplerinden birine girmesi gerekir (Şekil.2.14.). Fallop tüplerinin fimbria şeklinde açılan uçları overlerin çevresine doğru uzanır. Fimbriyaların iç yüzeyleri silyalı epitel hücreleriyle örtülüdür. Silyumlar overlerden salgılanan östrojenle aktive olur ve fallop tüplerinin ağızlarını açacak şekilde sürekli vurumlarla hareket ederler. Bu hareket ostiyumlara doğru yavaş bir sıvı akımını sağlar ve yumurta fallop tüplerinden birine girer. Ejekülasyondan sonra, 5-10 dakikalık bir süre içinde birkaç sperm fallop tüplerinin ampulla bölgesine taşınır. Spermin taşınması uterus ve fallop kanallarının kasılmasıyla sağlanır. Yumurtanın döllene ampullada gerçekleşir. Döllene sonrasında, yumurtanın fallop tüplerinden uterus boşluğuna taşınmasında, fallop tüplerinde gerçekleşen kasılmanın rolü vardır (36).



Şekil 2.14. Fallop tüpünde yumurtanın hareketi (36).

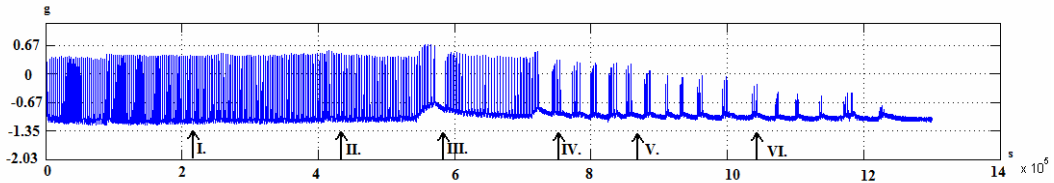
3. GEREÇ YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu tez çalışmasında Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan 18 adet, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen Sprague Dawley türü dişi sıçan kullanıldı. Deney gününe kadar sıçanlar 12 saat gündüz-12 saat gece koşulu sağlanan, sıcaklığı 25 ± 2 °C ve nem oranı %55 olan bir odada, standart pellet yem ve çeşme suları verilerek uygun kafesler içerisinde tutuldu. Sıçanlar üzerinde yürütülen deney protokolü, Mersin Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun kararıyla onaylandı.

3.2. Deney Protokolü

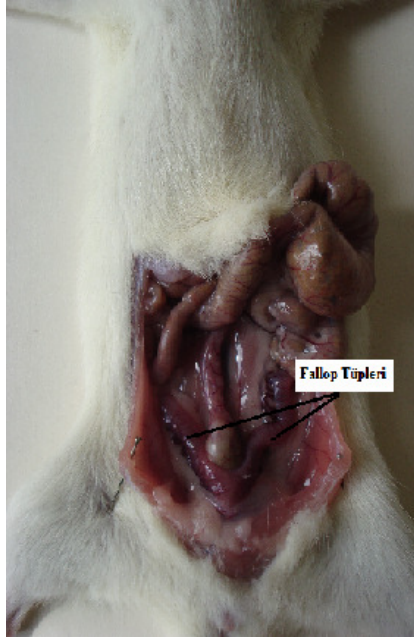
Sıçanlar her grupta dokuz hayvan olacak şekilde rastgele iki gruba ayrıldı. Grup I'den elde edilen izole düz kas preparatları organik fosforlu insektisit diklorvosun etkisini belirlemek, grup II'den elde edilen preparatlar ise diklorvosla+organik fosforlu bileşik antidotu atropin kombinasyonunu uygulamak üzere kullanıldı. Düz kas preparatı olarak fallop tüpleri izole edildi. Diklorvosun çalışmada kullanılan 6 farklı dozunun etkisi aynı preparatta belirlendi. Bu işlem şu şekilde yapıldı: preparatlardan önce normal Krebs çözeltisi içinde iken spontan aktivite kayıtları alındı, bu kayıt kontrol değeri olarak kabul edildi. Daha sonra banyo ortamına belirlenen en düşük dozdaki diklorvos eklendi ve 45 dakika boyunca kayıt alındı. 45. dakika sonunda ortama ikinci dozu sağlayacak miktarda diklorvos eklendi ve yine 45 dakika boyunca kayıt alındı. İşleme son doza ulaşıncaya kadar devam edildi. Böylece Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi aynı preparatta 6 farklı dozun etkisi belirlenmiş oldu.



Şekil 3.1. Bir fallop tüp preparatında sırayla 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M'lık, 6 farklı diklorvos dozunun etkisini gösteren kayıt örneği

3.3. Preparat Hazırlanması

Sıçanlar cam fanus içerisinde yüksek dozda etil alkole (etanol) C_2H_5O 'a maruz bırakıldı. Yaşam faaliyetlerinin sonlandığı görüldükten hemen sonra abdomen bölgesi orta hat boyunca açıldı. Pelvis boşluğunda, vertikal eksen boyunca önünde mesane, arkasında rektum bulunacak şekilde yer alan uterus, fallop tüpleri ile birlikte izole edildi (Şekil 3.2.). Fallop tüplerinin etrafındaki yağ doku temizlenerek 5-8 mm uzunluğunda, yaklaşık 1 mm kalınlığında izole düz kas şeritleri hazırlandı. Şeritler iki ucundan ipek ipliklerle bağlanarak fizyolojik Krebs çözeltisine bırakıldı.



Şekil 3.2. Sıçan fallop tüpleri izolasyonu.

3.4. Organ Banyosu Ve Deney Sistemi

Hazırlanan düz kas şeritlerinin canlılığını uzun süre koruması için izole organ banyosu sistemi kullanıldı. Sisteme preparat takılmadan önce başlamak üzere deney süresince banyo çözeltisinin sıcaklığı $36-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutuldu ve çözelti %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile gazlandı. Organ banyosunun ısısını korumak için Heating Circulator MAY WBC3044-PR ısıtıcısı kullanıldı. 5-8 mm uzunluğunda, 1 mm

kalınlığında hazırlanan izole düz kas şeritleri, içinde Krebs bulunan, 20 mL iç hacimli organ banyosunda horizontal eksen boyunca bir ucu sabit çengele, diğer ucu kuvvet transdüserine bağlandı. Fallop tüp preparatından kuvvet transdüseri (Force Displacement Transducer, MAY FDT 10–A) yardımıyla ölçülen kasılmalara ait sinyaller önce DC amplifikatöründe (2 Channel Bridge 20-200 Internal Adjustable: X1(XS) Hugo Sachs Electronic) büyütüldü. Daha sonra A/D çevirici ünitesi kullanılarak 20 ms örneklem aralığıyla dijital değerlere çevrildi ve bilgisayara kaydedildi. Kayıt sisteminin genel görünüşü Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kayıt sisteminin genel görünüşü.

3.5. Çözeltiler

Krebs çözeltisi (g/L) olarak 6,9 g NaCl, 0,35 g KCl, 0,28 g CaCl₂, 1,2 g NaHCO₃, 0,16 g K₂PO₄, 0,14 g MgSO₄ ve 1g glukoz içermektedir.

3.6. İnsektisit Seçimi

Seracılığın yaygın olarak yapıldığı Akdeniz bölgesi ve Mersin ili çevresinde kullanılan organikfosforlu insektisitlerden, diklorvos hem seracılıkta hem de diğer tarım alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Yaygın kullanıldığı ve akut zehirlenmelerde toksik etkisi yüksek olduğu bilindiği için bu çalışmada diklorvos (DDVP) tercih edildi. Ayrıca

bu insektisit in fallop tüplerindeki etki mekanizmasını açıklayabilmek ve karşılaştırma yapabilmek için antagonist etki gösteren atropin kullanıldı.

3.6.1. Uygulanan Dozların Belirlenmesi

Deney gruplarında kullanılan dozları belirlemek için ön deneyler yapıldı. Yalnız insektisit ile uygulanan ön deneylerde diklorvosun 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, şeklinde 6 farklı konsantrasyonuyla çalışıldı. Elde edilen kayıtlar değerlendirilerek bu konsantrasyonların uygun olduğuna karar verildi. Diklorvos ve atropinin birlikte uygulandığı ön deneylerde ise hangi diklorvos konsantrasyonuna karşılık, hangi atropin dozunun kullanılması gerektiği ve seçilen dozun hangi yöntem kullanılarak, uygulanması gerektiği araştırıldı. Yapılan deneyler sonucunda diklorvos için inhibisyonun belirginleştiği 2×10^{-5} M dozu ile atropin için 1×10^{-4} M dozunun kullanılmasına karar verildi.

3.7. Deneyin Akışı

Kas banyosuna yerleştirilen izole düz kas şeritleri 0.22 g ön gerilim verilerek gerdirildi. 36-37 °C'deki Krebs çözeltisinde ortama uyum sağlaması için 1 saat süre ile bekletildi. Deney süresince banyo solüsyon hacminin 20 mL'de korunmasına dikkat edildi. Düzenli spontan aktivite oluştuğunda kayıtlar alınmaya başlandı. Kontrol değeri olarak kullanılan bu aktiviteden yaklaşık 1 saat süresince kayıt alındı. Daha sonra kas banyosuna 20 mL'lik hacimdeki normal krebs çözeltisinin, diklorvos derişimi 5×10^{-7} M olacak şekilde diklorvos eklendi. Uygulamadan 45 dakika sonra, 20 mL sabit hacimdeki banyo solüsyonuna toplamda 1×10^{-6} M diklorvos derişimi olacak şekilde diklorvos eklendi. Takip eden doz serisi 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 1×10^{-4} M uygulanırken, her bir doz değeri için sırasıyla, sabit hacimdeki banyo solüsyonun toplam derişiminin hedeflenen doz değerlerine karşılık gelmesi için gereken miktarda diklorvos eklendi. Hedeflenen dozlar için banyo solüsyonuna diklorvos eklenerek konsantrasyonun değiştirilmesi 45 dakika aralıklarla tekrarlandı.

Diklorvos ve atropinin birlikte uygulandığı deneylerde, kas banyosuna yerleştirilen izole düz kas şeritleri 0.22 g ön gerilim verilerek gerdirildi. 36-37 °C' deki Krebs çözeltilisinde ortama uyum sağlaması için 1 saat süre ile bekletildi. Düzenli spontan aktivite oluştuğunda kayıtlar alınmaya başlandı. Kontrol değerleri olarak kullanılan bu aktiviteden yaklaşık 1 saat süresince kayıt alındı. Daha sonra kas banyosuna 20 mL'lik hacimdeki normal Krebs çözeltilisinin, diklorvos derişimi 2×10^{-5} M ve atropin sülfat derişimi 1×10^{-4} M olacak şekilde atropin ve diklorvos aynı anda banyo solusyonuna eklendi. Atropin+diklorvos içeren banyo solusyonundaki kayıt bir saatin sonunda durduruldu.

3.8. Analizler

3.8.1. Veri İşlemede Kullanılan Analizler

3.8.1.1. Hızlı Fourier Dönüşümü

Fourier Dönüşümü uzaydaki veya zamandaki bir fonksiyonu, frekans, genlik ve evresi değişen sinüzoidal elemanlara indirgenebileceğini gösteren bir algoritmadır. Jean Baptiste Joseph Fourier'e göre, Fourier dönüşümü ile uzay veya zaman alanındaki bir fonksiyonu, fonksiyonun temel ve çok sayıda değişen frekanslardaki harmoniklerinin aritmetik toplamı şeklinde yazılması mümkündür. Dönüşüm iki matematiksel metotla hesaplanır; birincisi fonksiyonun sürekli olması durumunda uygulanırken, ikincisi fonksiyon kesikli ise uygulanır. Eğer fonksiyon kesikliyse yani fonksiyon kesikli zaman aralıklarına ait değerlerden oluşuyorsa, ayrıık frekanslardaki sinüzoidal fonksiyonların serisi şeklinde gösterilebilir. Bu frekanslar asıl frekansın iki, üç ve daha büyük katlarıdır. Bu şekildeki sinüs fonksiyonlarının toplamına Fourier serisi denir. Eğer fonksiyon sürekliyse yani her gerçek sayı için tanımlı bir değerleri varsa bu fonksiyon, tüm frekanslardaki sinüslerin Fourier integraline indirgenebilir. Fourier dönüşümü, kesikli fonksiyonlarda, Fourier serisini oluşturan evrelerin ayrıık frekanslara bağlı listesidir, sürekli fonksiyonlarda ise Fourier integralinin alınmasından ortaya çıkan frekansa bağlı bir fonksiyondur (40).

Hızlı Fourier dönüşümünün dayandığı Ayrıık Zamanlı Fourier dönüşümü (DFT), olarak bilinen bir Fourier dönüşümü vardır ki mantığı, N nokta sayılı örneğin, N eşit

aralıklı frekanslarla Fourier dönüşümünün alınmasına dayanır. Bir Fourier dönüşümünde, yapılacak aritmetik işlemlerin sayısı ile örnek sayısı arasındaki ilişki, işlem sayısının örnek sayısı ile arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gösterir. Yapılacak toplama işleminin sayısı nokta sayısına, çarpma işleminin sayısı ise nokta sayısının karesine eşittir. 100 düzenli aralıklarla alınmış noktadan oluşan bir dalganın analizi için yaklaşık 100 toplama ve $(100)^2$ kadar çarpma işleminin yapılması gerekir. James W. Cooley ve John W. Tukey Hızlı Fourier dönüşümünde, çarpma işlemlerinin sayısı azaltarak zamandan kazanmışlardır. 1965 yılında, zaman uzayından frekans uzayına dönüşüm yaparken N^2 sayıda işlem yapmak yerine, $N \log_2 N$ işlem sayısı ile daha hızlı dönüşüm yapabilen Hızlı Fourier Dönüşümünü geliştirmişlerdir. T periyotlu, periyot sıfırdan sonsuza giderken, sonsuz sayıda tekrarlanan bir $x(t)$ sinyaline için Fourier serisi (40, 41);

$$x(jnw_0) = \frac{1}{T} \int_0^T x(t) \exp(-jnw_0 t) dt$$

şeklinde yazılabilir. Burda T, kayıt süresi ve $w_0 = 2\pi / T$ dir.

$$x(jnw_0) = \frac{[A(nw_0) - jB(nw_0)]}{2}$$

$A(nw_0)$ ve $B(nw_0)$ Fourier katsayıları olmak üzere, bir frekansa ait Fourier bileşeninin genliği,

$$|x(jnw_0)| = [A^2(nw_0) + B^2(nw_0)]^{\frac{1}{2}}$$

denklemleri kullanılarak hesaplanabilir (40, 41).

Tez çalışmasında, zaman düzleminde kayıt ettiğimiz fallop tüpü düz kaslarına ait ritmik spontan aktivite verilerinin, en yüksek frekans değeri olan temel frekans değerine karşılık gelen, genlik değerini bulmak, frekans ve genlik karakteristiklerini incelemek için MATLAB paket programı ile Hızlı Fourier dönüşümleri alındı. Hızlı Fourier dönüşümünde algoritma mantığı, gerçek zamanlı, kesiksiz sinyal özelliğindeki, uzun

sürekli spontan aktivite kayıtlarının genlik ve frekans değerlerini yansıtan güç spektrumuna ulaşmak için uygun analiz yöntemi olarak seçildi. Aktivitenin kayıtlanması ve MATLAB analizi sırasında kullanılan örneklem aralığı 0,02 s (50 Hz) tezde kullanılmak üzere MATLAB 6.3. paket programında hazırlanan hızlı Fourier dönüşüm yazılımı EK 1.'de sunulmuştur.

3.8.2. İstatistiksel Analiz

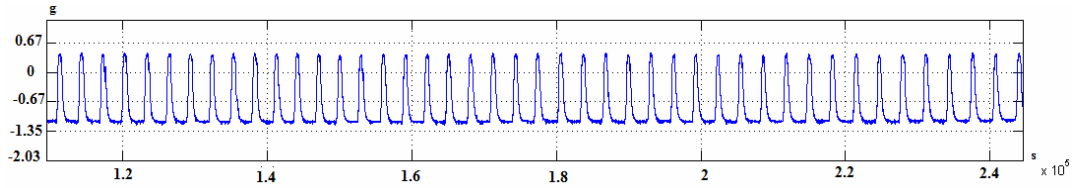
Diklorvosun, fallop tüpü spontan aktivitesi üzerinde oluşturduğu etkiyi istatistiksel olarak analiz etmek için Fourier dönüşümü uygulanarak elde edilen genlik ve frekans değerlerinin normal dağılıma uyup uymadığını test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Bu test sonucunda frekans ve genlik değerleri normal dağılıma sahip olmadığı belirlendi ve analizlerde non parametrik yöntemler kullanıldı. Farklı dozlar uygulanarak kaydedilen spontan aktivite cevaplarında genlik ve frekans değerlerini karşılaştırmak için Freidman testi, çoklu karşılaştırmaları yapmak için ise Willcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Tanıtıcı istatistik olarak, ortalama ve standart sapmalar verildi. İstatistiksel anlamlılığın düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

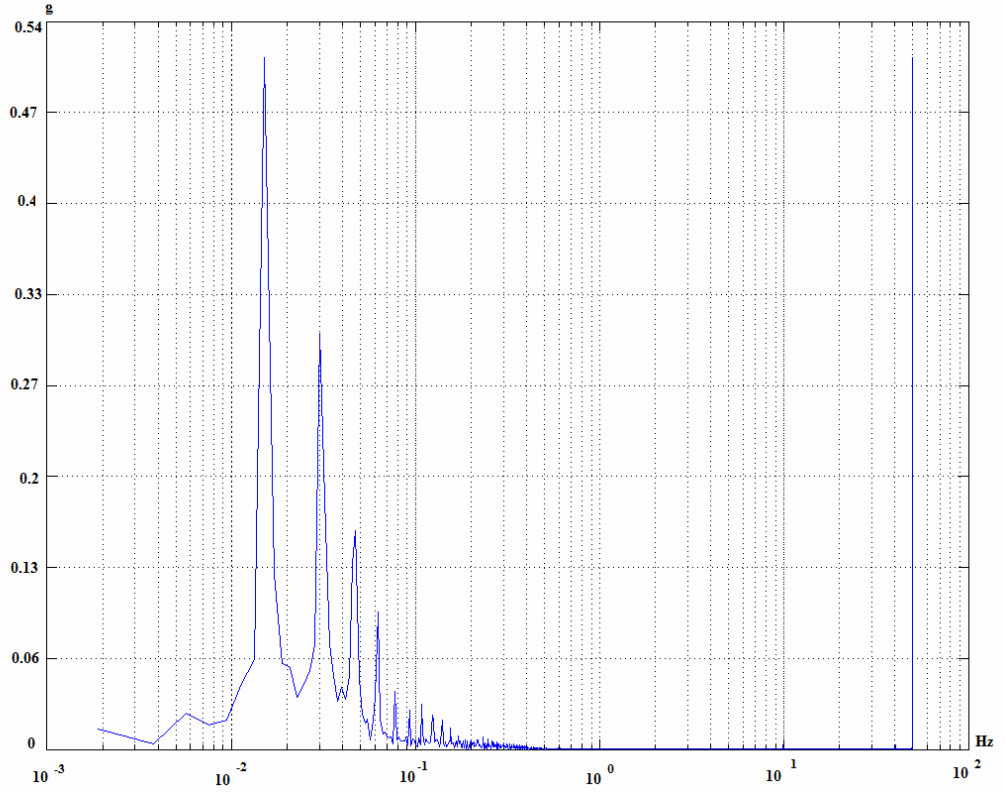
Fallop tüplerinin kontraksiyonları zaman alanında kaydedildi. Zaman alanındaki kayıtlar Fourier Dönüşümü kullanılarak frekans alanına dönüştürüldü. Fourier analizi sonucunda fallop tüplerinin spontan kontraksiyonları, bu kontraksiyonlar üzerine diklorvos ve diklorvos+atropinin etkisi genlik ve frekans açısından değerlendirildi.

4.1. Diklorvosun Spontan Kasılmaların Genliği Ve Frekansı Üzerine Etkisi

Şekil 4.1. fallop tüpünün diklorvos uygulanmadan önceki spontan aktivitesini (kontrol), Şekil 4.2. ise Fourier analizini göstermektedir. Dokuz preparata Fourier analizi uygulanarak bulunan genlik değerlerinin ortalaması $0,72\pm0,26$ g, frekans değerlerinin ortalaması ise $0,013\pm0,003$ Hz olarak bulunmuştur.

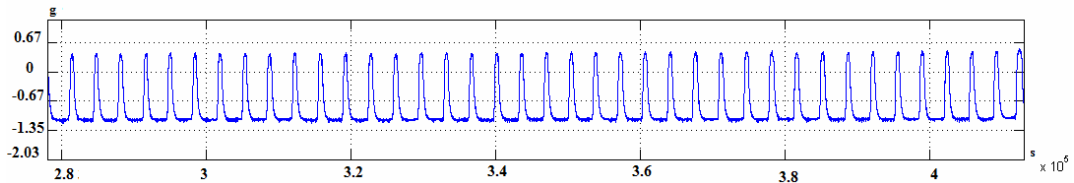


Şekil 4.1. Diklorvos uygulanmadan önceki spontan aktivitenin zamansal değişimi (kontrol).

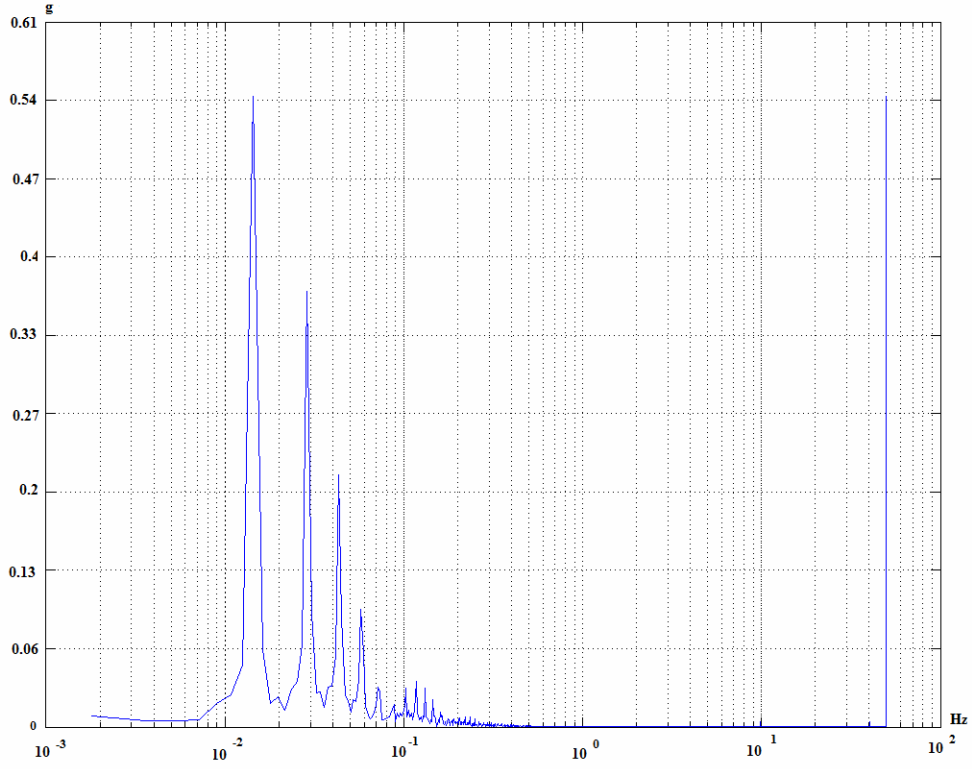


Şekil 4.2. Kontrol aktivitesinin Fourier analizi.

Daha sonra ortama 1×10^{-6} M diklorvos eklenmiş ve spontan aktivite kaydedilmiştir. Şekil 4.3. bu dozdaki spontan aktivite kayıtlarını, Şekil 4.4. ise bunun Fourier dönüşümünü göstermektedir. Bu dozda ortalama genlik $0,75 \pm 0,24$ g ve frekans $0,013 \pm 0,003$ Hz olarak bulunmuştur. Bu değerler, kontrol değeriyle karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$).

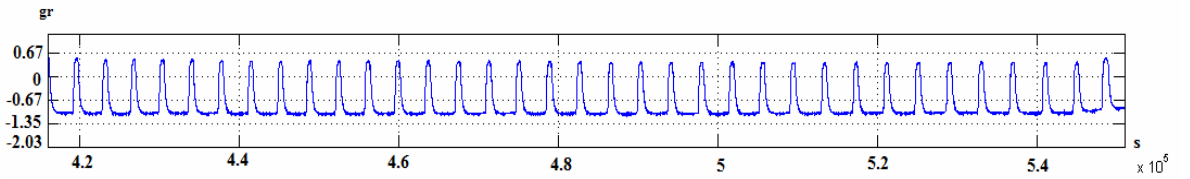


Şekil 4.3. Banyo ortamına 1×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

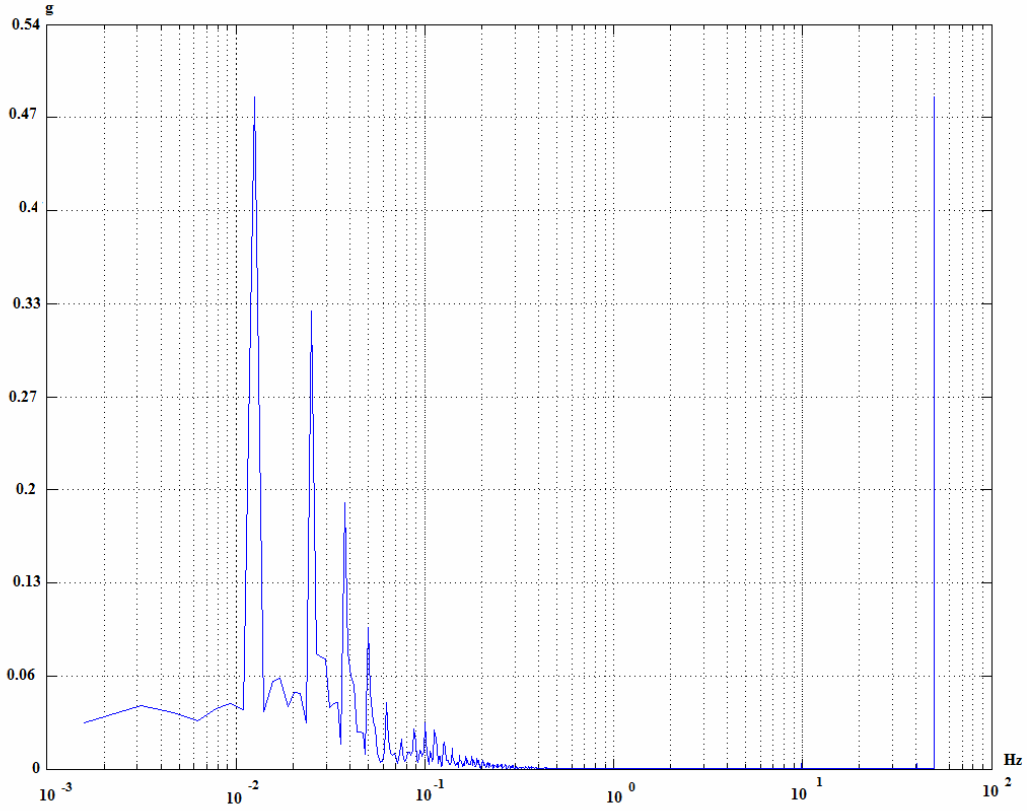


Şekil 4.4. Banyo ortamına 1×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Aynı preparatta kayıtlara devam edilmiş ve banyo ortamında diklorvos dozu 5×10^{-6} M'a ayarlanmıştır. Şekil 4.5. bu dozdaki spontan aktiviteyi, Şekil 4.6. ise Fourier analizini göstermektedir. Bu dozdaki genlik $0,68 \pm 0,23$ g, frekans $0,012 \pm 0,002$ Hz'dir. 5×10^{-6} M deki genlik ve frekans değerleri kontrol değeriyle karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$).

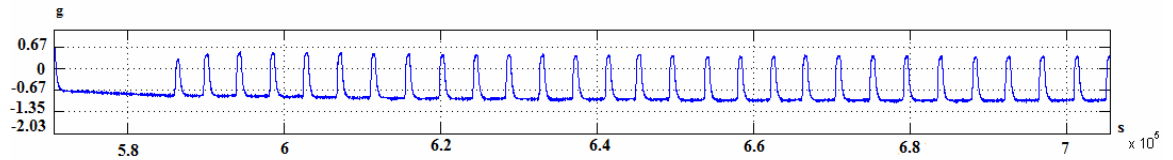


Şekil 4.5. Banyo ortamına 5×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

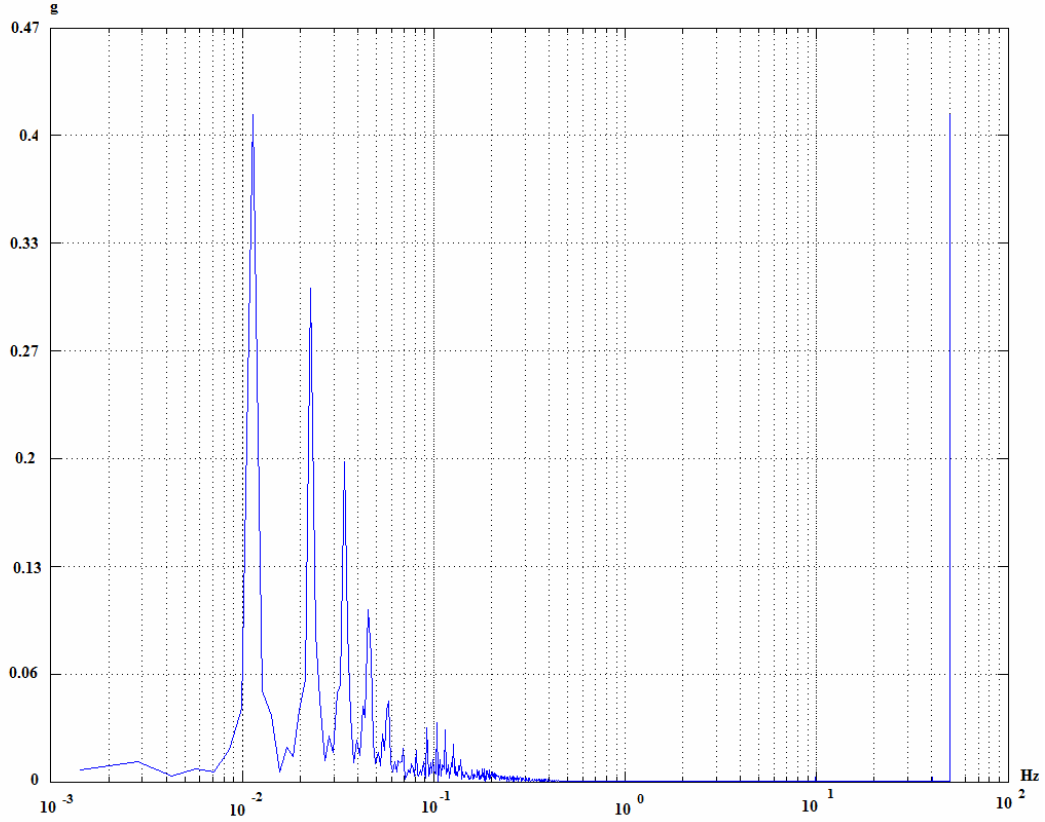


Şekil 4.6. Banyo ortamına 5×10^{-6} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Bir sonraki aşamada doz 1×10^{-5} M düzeyine yükseltilmiştir. Şekil 4.7. bu dozdaki spontan aktiviteyi, Şekil 4.8. ise Fourier analizini göstermektedir. Diklorvosun bu dozunda ortalama genlik değeri $0,57 \pm 0,29$ g, ortalama frekans $0,013 \pm 0,002$ Hz olarak bulunmuştur. Genlik değeri kontrole göre %20 oranında azalmıştır ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Frekans değerinde ise kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

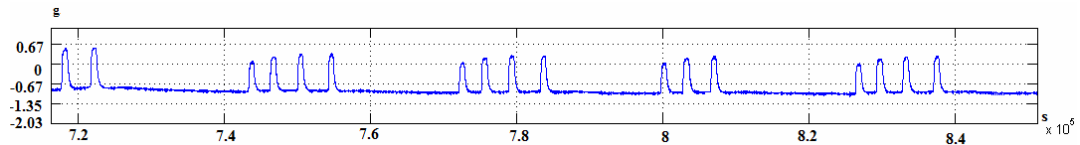


Şekil 4.7. Banyo ortamına 1×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

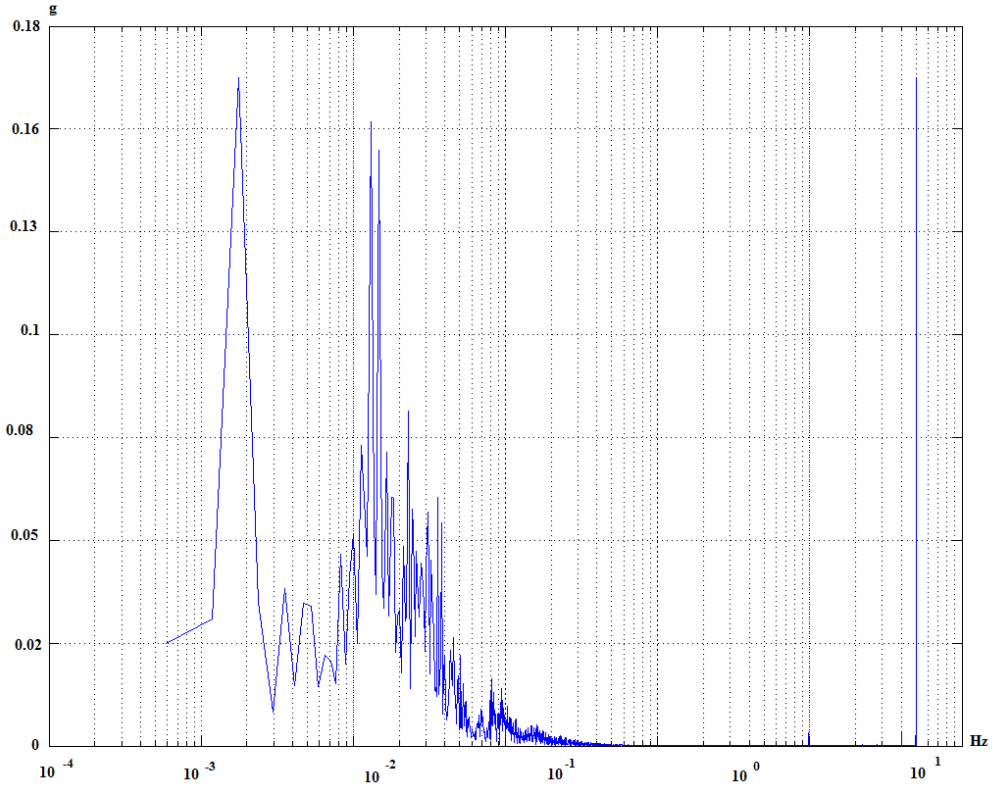


Şekil 4.8. Banyo ortamına 1×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Daha sonra banyo ortamındaki doz 2×10^{-5} M olacak şekilde ayarlanmış ve kayıt alınmaya devam edilmiştir. Şekil 4.9. spontan aktiviteyi, Şekil 4.10. ise bu aktivitenin Fourier analizini göstermektedir. 2×10^{-5} M dozunda genlik değeri $0,51 \pm 0,28$ g, frekans değeri ise $0,012 \pm 0,005$ Hz olarak bulunmuştur. Bu dozda genlik kontrole göre %29 oranında azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Frekans değerindeki azalma ise %7,6 düzeyindedir ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli değildir ($p > 0,05$).

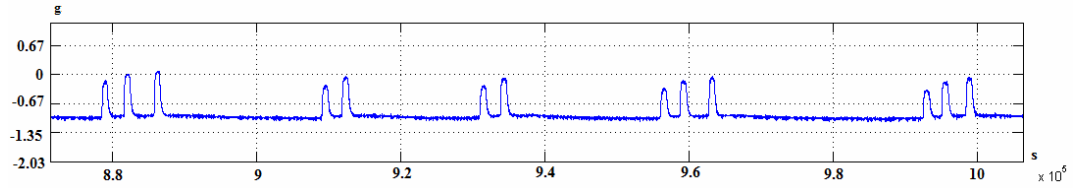


Şekil 4.9. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

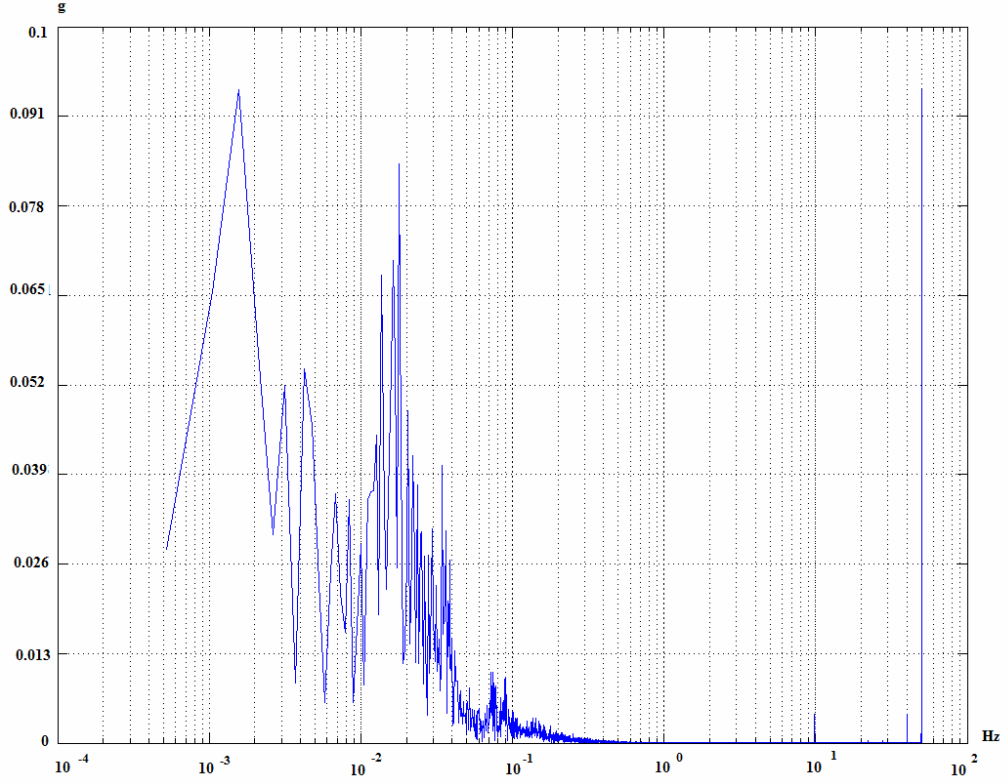


Şekil 4.10. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Diklorvosun 5×10^{-5} M dozunda genlikteki azalma devam etmiştir. Şekil 4.11. bu dozdaki spontan aktiviteyi, Şekil 4.12. ise bunun Fourier analizini göstermektedir. Bu dozda genlik değeri $0,30 \pm 0,11g$ olarak bulunmuştur. Ortalama frekans ise $0,009 \pm 0,003Hz$ olarak hesaplanmıştır. Genlik değeri kontrole göre %58 oranında azalmıştır ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Frekans değeri ise kontrole göre %30 oranında azalmış ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

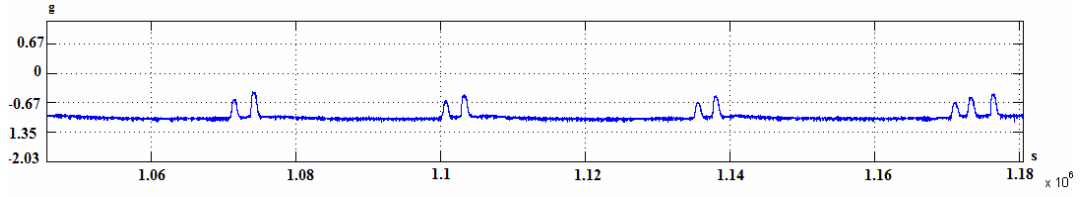


Şekil 4.11. Banyo ortamına 5×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

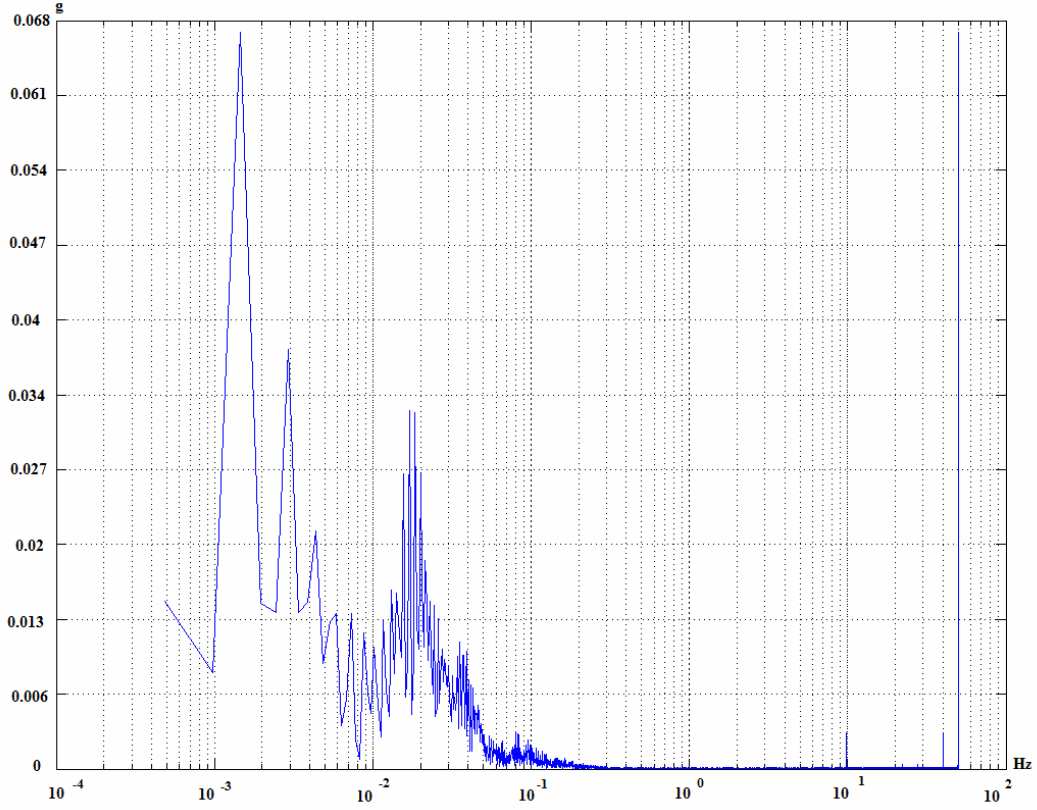


Şekil 4.12. Banyo ortamına 5×10^{-5} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Benzer şekilde diklorvosun 1×10^{-4} M dozunda genlik değeri azalmaya devam etmiş ve genlikteki azalma %80 düzeyine yükselmiştir. Şekil 4.13. bu dozdaki spontan aktiviteyi, Şekil 4.14. ise Fourier analizini göstermektedir. 1×10^{-4} M dozundaki genlik değeri $0,13 \pm 0,09$ g'a düşmüştür. Bu düşüş kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Frekans değeri ise $0,007 \pm 0,002$ Hz olarak bulunmuştur. Ortalama frekans değerindeki azalma kontrole göre %46 oranında azalmıştır ve bu azalmanın kontrole göre önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).

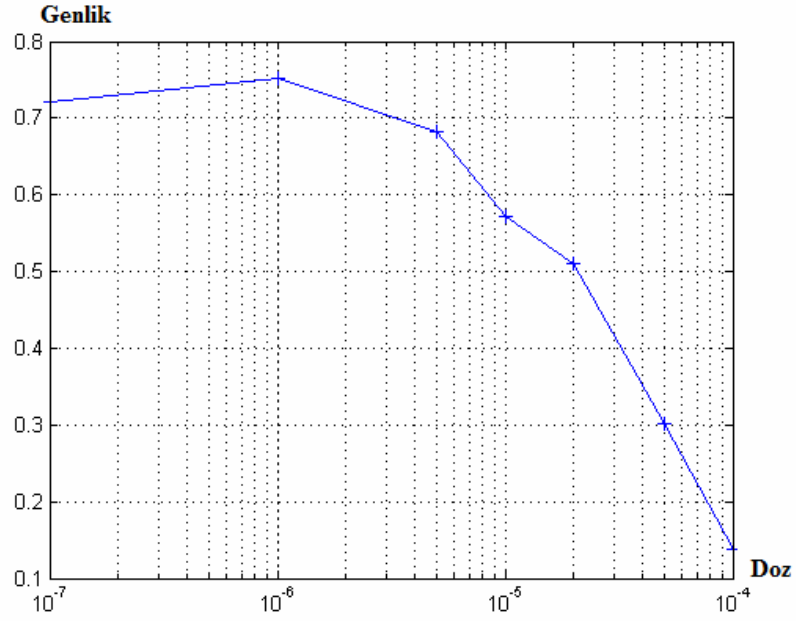


Şekil 4.13. Banyo ortamına 1×10^{-4} M diklorvos eklendikten sonra spontan aktivitenin zamansal değişimi.

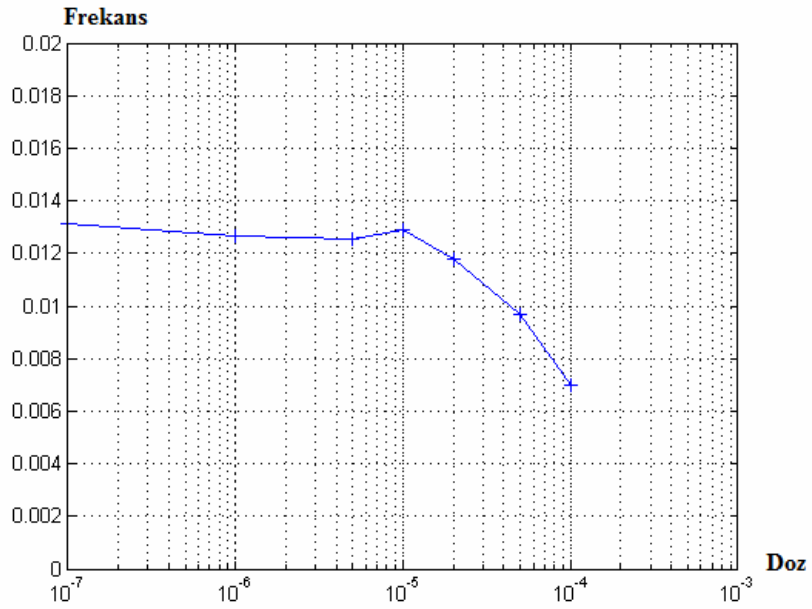


Şekil 4.14. Banyo ortamına 1×10^{-4} M diklorvos eklendikten sonraki spontan aktivitenin Fourier analizi.

Ortalama genlik değerleri doza bağlı olarak Şekil 4.15.'de ve ortalama frekans değerleri doza bağlı olarak Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Ortalama genliğin doza bağlı değişimi.



Şekil 4.16. Ortalama frekansın doza bağlı değişimi.

Kontrol ve doz değerleri için ortalama genlik ve frekans değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Şekillerden ve tablodaki verilerden görüldüğü gibi diklorvos fallop

tüplerinin spontan aktivitesini doza bağılı olarak etkilemiştir. Düşük dozlarda genlik ve frekans açısından herhangi bir değişiklik gözlenmezken, yüksek dozlarda genlik ve frekansta azalmalar olmuştur. Genlikteki azalma frekansa göre daha düşük dozlarda başlamıştır.

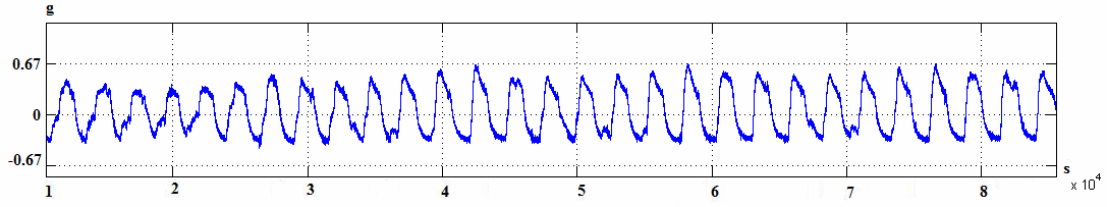
Çizelge 4.1. Farklı dozlardaki diklorvosun fallop tüpüne uygulanmasıyla kaydedilen spontan kontraksiyonların Fourier analizi ile elde edilen genlik ve frekans değerleri.

Değişken	Genlik(g)	Frekans
Kontrol	0,7220±0,26	0,0131±0,003
1x10⁻⁶ M	0,7514±0,24	0,0126±0,003
5x10⁻⁶ M	0,6826±0,23	0,0125±0,002
1x10⁻⁵ M	0,5728±0,29	0,0128±0,002
2x10⁻⁵ M	0,5107±0,28	0,0117±0,002
5x10⁻⁵ M	0,3021±0,31	0,0096±0,005
1x10⁻⁴ M	0,1375±0,19	0,007±0,006

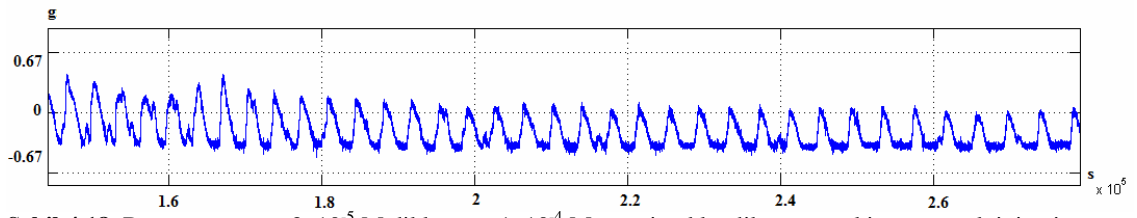
4.2. Atropin+Diklorvos Kombinasyonunun Spontan Kasılmaların Genliği Ve Frekansı Üzerine Etkisi

Diklorvosun fallop tüpü düz kasındaki etki mekanizmasını açıklayabilmek için diklorvosla birlikte organik fosforlu bileşiklerin oluşturduğu toksik etkinin giderilmesinde antidot olarak kullanılan atropin verilmiştir. Diklorvos+atropin kombinasyonu 2x10⁻⁵ M diklorvos+1x10⁻⁴ M atropin olacak şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.17. bu kombinasyon uygulanmadan önce, Şekil 4.18. kombinasyon uygulandıktan sonra düz kasın spontan aktivitesini, Şekil 4.19. ise iki aktivitenin Fourier analizlerini aynı güç spektrogramı üzerinde gösterilmektedir. Bu kombinasyon uygulanmadan önce kaydedilen (kontrol) spontan aktivitelerin Fourier analizlerinde ortalama genlik 0,0124±0,0038 olarak bulunurken, ortalama frekans 0,012±0,003 Hz olarak hesaplanmıştır. Diklorvos+atropin kombinasyonuna ait sonuçları incelediğimizde ise genliğin 0,0113±0,0043 g'a, frekansın ise 0,011±0,002 Hz'e düştüğü gözlenmiştir.

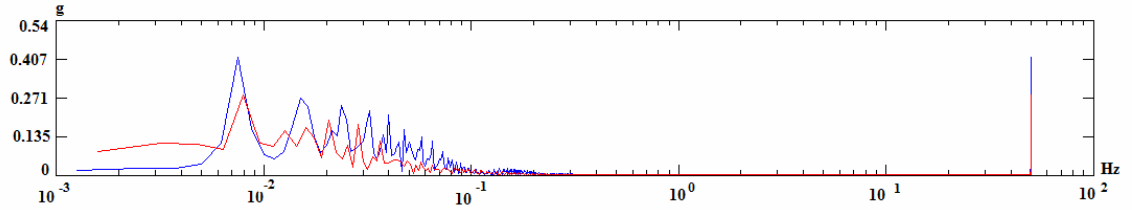
Genlik değerindeki azalma kontrole göre %52 iken ($p < 0,05$) frekanstaki azalma %8 civarında ($p > 0,05$) olmuştur.



şekil 4.17. Kontrol aktivitesinin zamansal değişimi.



şekil 4.18. Banyo ortamına 2×10^{-5} M diklorvos + 1×10^{-4} M atropin eklendikten sonraki spontan aktivitenin zamansal değişimi.



şekil 4.19. Kontrol (mavi) ve 2×10^{-5} M diklorvos + 1×10^{-4} M atropin kombinasyonunun Fourier analizleri.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada organik fosforlu bir insektisit olan diklorvosun, fallop tüpü düz kası spontan aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve bu insektisitın spontan kasılmaların genlik ve frekansını doza bağlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Literatürde organik fosforlu insektisitlerin fallop tüpü düz kası üzerine etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışma bu gruptaki insektisitlerin düz kaslar üzerine etkisi konusunda yeni bilgiler sağlamaktadır.

Diklorvosun fallop tüpü düz kası spontan aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için 5×10^{-7} - 1×10^{-4} M aralığında 6 farklı doz kullanılmıştır. Uygulanan minimum ve maksimum doz arasında 100 katlık bir fark vardır. Bu fark, diklorvosun fallop tüpü düz kası üzerine etkisinin çok geniş bir doz aralığında incelenmesine ve olası etki mekanizmasına ilişkin ipuçları elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Fallop tüplerinin spontan aktivitesi zaman alanında değil frekans alanında analiz edilmiştir. Bunun için hızlı Fourier dönüşümü kullanılmıştır. Hızlı Fourier dönüşümü hesap yükünü azaltan ve işlem hızını arttıran bir algoritmadır ve çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Fourier analizinin kullanılmasıyla ritmik kasılmaların genlik-frekans karakteristikleri elde edilmiştir. Bu karakteristikler diklorvosun altı farklı dozunun fallop tüpü spontan aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde büyük kolaylık sağlamıştır. Genlik-frekans karakteristiklerinden 1×10^{-6} M ve 5×10^{-6} M diklorvosun fallop tüpü spontan aktivitesini değiştirmedeği gözlenmiştir. Bu bulgu insektisitın düşük dozlarının spontan aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dozun 1×10^{-5} düzeyine çıkmasıyla birlikte etki görülmeye başlanmış spontan aktivitenin genliği bu dozda kontrole göre %20 oranında azalmıştır. Ancak bu dozda frekansta bir değişiklik olmamıştır. Doz artarken genlik de azalmaya devam etmiştir. Diklorvos dozu 2×10^{-5} iken genlik kontrole göre %29 oranında azalmıştır. Bu dozda frekansta yine istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Dozun 5×10^{-5} M düzeyine çıkmasıyla spontan aktivitenin frekansında da kontrole göre önemli miktarda azalma olduğu belirlenmiştir. Bu dozda genlikteki azalma kontrole göre %58 iken, frekanstaki azalma %30'dur. Fallop tüpü düz kasına uygulanan en yüksek diklorvos dozu 1×10^{-4} M olup genlikteki azalma %80, frekanstaki azalma ise %46 düzeylerine ulaşmıştır. Elde

edilen bu sonuçlar diklorvosun fallop tüpü düz kaslarının spontan aktivitesi üzerine inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir. Benzer bir sonuç Ebeigbe ve Campbell tarafından sıçan kuyruk arterinde yapılan çalışmada da gözlenmiştir (27). Ebeigbe ve Campbell sıçan izole kuyruk arterlerine 10^{-8} - 10^{-4} M doz aralığında diklorvos uygulamışlar ve doza bağlı olarak kuyruk arterinde gevşeme gözlendiğini bildirmişlerdir. Ancak Schmidt ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçanlara inhalasyon yoluyla 0,8 ve 1,8 µg/L diklorvos verilmiş ve bu dozların bronşial doku asetilkolinesteraz aktivitesinde azalmaya yol açtığı bu azalmanın da havayolu direncinin artmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak bu insektisitlere maruz kalmanın havayolu direncindeki artışla karakterize kronik obstrüktif solunum yolu hastalıklarına yol açabileceği düşünülmüştür (28). Kobayashi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçanlara 5 mg/kg diklorvos uygulanmış ve bu dozda uygulanan diklorvosun jejenum düz kaslarının spontan aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (42).

Fallop tüpü düz kasları kolinerjik sinirler tarafından innerve edilmektedir. Bu sinirler düz kas lifi tabakasının üzerinde difüz olarak dallanır. Çoğu zaman sinir lifleri düz kas hücre zarı ile doğrudan temas etmezler (36). Kolinerjik sinir uçlarından transmitter madde olarak asetilkolin salınır. Asetilkolinin izole fallop tüpü düz kaslarında kontraksiyona yol açtığı bilinmektedir (43). Asetilkolin düz kası çevreleyen matriksten asetilkolinesteraz enzimi aracılığıyla uzaklaştırılır (36). Diklorvos organik fosforlu bir insektisittir ve organik fosforlu insektisitlerin etkilerini sinir-kas kavşaklarında asetilkolinesteraz enzimini bloke ederek gösterdikleri bilinmektedir (1). Bunun sonucunda bu gruptaki insektisitler sinir-kas kavşağında asetilkolin birikimine ve kasların art arda uyarılmasına neden olur. Sinir-kas kavşağında asetilkolin birikimi asetilkolin reseptörlerinin inaktif hale geçmesine neden olabilir. Çalışmamızda diklorvosun yüksek dozlarda oluşturduğu inhibitör etkinin olası mekanizmalarından birinin fazla miktarda asetilkolin birikimine bağlı olarak sinir-kas kavşağındaki asetilkolin reseptörlerinin inaktif hale gelmesiyle ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada diklorvosla birlikte organik fosforlu bileşiklerin güçlü bir antidotu ve muskarinik reseptörlerin seçici olmayan bir blokeri olan atropin, fallop tüpüne kombine uygulanmış ve bu kombinasyonun spontan aktivitenin genliğinde ve frekansında kontrole göre önemli miktarda azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Asetilkolin nikotinik reseptörlere ek olarak muskarinik reseptörleri de aktive eder. M1, M2, M3,

M4 ve M5 olmak üzere 5 tip muskarinik reseptörün varlığı gösterilmiştir. M3 reseptörleri düz kaslarda bulunur ve kolinerjik etkenlerle uyarıldıklarında düz kasların kasılmasına aracılık ederler (35). Atropin bazı düz kaslarda muskarinik reseptör blokeri olarak etki gösterir. İnsan fallop tüpünde Jankoviç ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada atropinin asetilkolinin neden olduğu kontraksiyonları güçlü biçimde inhibe ettiği bulunmuştur (43). Bu tez çalışmasında diklorvos ve atropin kombinasyonu 2×10^{-5} M dozunda diklorvosun tek başına yarattığı inhibisyondan daha fazla inhibisyon oluşturmuştur. İnhibisyondaki bu artış kavşaktaki asetilkolin reseptörlerinin, biri asetilkolin esterase enzim inhibisyonu sonucunda inaktifleşme, diğeri de atropinin blokajı nedeniyle asetilkolinin bağlanamaması olmak üzere iki nedenden kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuç atropinin sıçan fallop tüplerinde insan fallop tüplerine benzer şekilde muskarinik reseptör blokeri olduğuna ilişkin bir kanıt olarak değerlendirilebilir.

Diklorvosun fallop tüpü düz kasları üzerine etkisinin olası bir başka mekanizması, spontan aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen pacemaker hücreleri ile ilişkili olabilir. İmmünohistokimyasal yöntemleri kullanarak yapılan çalışmalarda fallop tüplerinde pacemaker gibi etki eden spesifik hücre tiplerinin varlığına ilişkin kanıtlar elde edilmiştir (44). Bu hücrelerin düz kas hücreleri arasında da yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 5.1.). Düz kaslardaki bu hücreler Cajal'ın interstisyel hücre benzeri hücreleri (ICLC) olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 5.1. İnsan fallop tüpü düz kas hücreleri arasında yerleşmiş bulunan ICLC hücreleri (44).

ICLC hücreleri tarafından oluşturulan pacemaker akımlardaki aktivasyonun büyük oranda inositol trifosfat kaynaklı kalsiyum salınımına bağlı olduğu bildirilmiştir (45). Bizim çalışmamızda diklorvos etkisiyle spontan kasılmaların genlik ve

frekansında gözlenen azalma bu insektisitlerin ICLC hücrelerinin pacemaker aktivitelerini etkilemiş olabileceği şeklinde de yorumlanabilir.

Diklorvosun fallop tüpü spontan kasılmaları üzerine etkisi üreme sağlığı açısından önem taşımaktadır. Döllenmeden önce ovum ve spermin fallop tüplerinde taşınması uterus ve fallop tüplerinin kasılmasıyla gerçekleşir. Döllenme sonrasında, yumurtanın fallop tüplerinden uterus boşluğuna taşınması için fallop tüplerinin kasılmasına gereksinim vardır (36). Bu kasılmaların diklorvosla inhibe olması döllenme ve döllenmiş yumurtanın uterusa yerleşme süreçlerini olumsuz etkileyecektir. Bu sonuç ülkemiz tarım alanlarında ürün artışını sağlamak için yoğun olarak kullanılan insektisitlerin toplumun üreme sağlığı açısından da bir tehdit unsuru olabileceğini düşündürmesi açısından önemlidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Mersin ili ve çevresi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan bir organik fosforlu insektisit olan Diklorvosun (DDVP-Dichlorvos) sıçan utreus fallop tüpü düz kası spontan aktivitesi üzerine olan etkileri, Hızlı Fourier Dönüşümü kullanılarak incelenmiştir.

Çalışma sonucunda:

1. Diklorvosun uterus fallop tüpü düz kasının spontan aktivitesi üzerine inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir.
2. Bu etkiler dozdaki artışa bağlı olarak artmıştır.
3. Organik fosforlu bileşik antidotu olan atropinin diklorvosun düz kaslardaki inhibitör etkisini iyileştirmediği, bu kombinasyonun inhibisyonu daha da arttırdığına ilişkin bulgular elde edilmiştir.

Çalışmamızda organik fosforlu bir insektisit olan diklorvosun fallop tüpü düz kası üzerine etkisi belirlenmiş ve bu etkinin mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar diklorvosun fallop tüpündeki etkisinin asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu ve buna bağlı olarak sinir-kas kavşağında asetilkolin birikimi sonucunda asetilkolin reseptörlerinin inaktifleşmesi olabileceğini düşündürmüştür. Atropin+diklorvos kombinasyonu bu inhibisyonun daha da artması, atropinin fallop tüplerindeki muskarinik reseptörler üzerine bloke edici etkisi nedeniyle asetilkolinin reseptörlere bağlanamadığı ve inhibisyonun bu yolla daha fazla artmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Son yıllarda düz kaslarda ICLC hücrelerinin varlığı ve bu hücrelerin düz kas spontan aktivitelerinin oluşumunda pacemaker gibi görev yaptıklarının gösterilmiş olması, diklorvosun etkisini bu hücreleri de etkileyerek göstermiş olabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu çalışmada diklorvosun fallop tüpleri üzerine etkisi ile ilgili bu yorumlara ait verilerin güçlendirilmesi için özellikle asetilkolin reseptörlerinin agonist ve antagonistleriyle daha kapsamlı çalışmalara ve diklorvosun ICLC hücreleri üzerine etkileriyle ilgili immünohistokimyasal yöntemleri içerecek ek çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. **Amdur, MO, Doull, J, Klassen, CD.** Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons, Pergamon Press, New York 1033, **1991**.
2. **Ami BH, Haim SA.** Direct effect of phosphamidon on isolated working rat heart electrical and mechanical function. *Toxicology Apply Pharmacology*, **1992**;110 (3): 429- 434.
3. **Blasiak J, Walter Z, Bawronska M.** The changes of osmotic fragility of pig erythrocytes induced by organophosphorus insecticides. *Acta Biochim. Pol*, **1991**;38 (1): 75-80.
4. **Blain PG.** Aspect of pesticide toxicology. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev*, **1990**; 9(1) p37-68.
5. **Criswell KA, Loch-Caruso R.** Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus. *Reprod Toxicol*, **1999**; 13(6):481-90.
6. **Datta C, Gupta J, Sarkar A, Sengupta D.** Effects of organophosphorus insecticide phosphamidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian j. Exp. Biol*, **1992**; 30 (1): 65- 67.
7. **Desi I, Dobronyi I, Varga L.** Immuno, neuro and general toxicologic animal studies on a synthetic pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol Environ*, **1986**; 12(3):220-232.
8. **Guest JA, Copley MP, Homernic KL.** Carcinogenic effects of pesticides. *Pathol Pharmacol*, **1991**; 71(3): 387-390.
9. **Aardema H, Meertens JHJM, Ligtenberg JJM, Peters-Polman OM, Tulleken JE, Zijlstra JG.** Organophosphorus Pesticide Poisoning Cases and Developments. *The Journal of Medicine*, **2008**; 66(4): 149-153.
10. **Casida JE.** Esterase Inhibitors as Pesticides. *Science*, **1964**; Nov 20;146:1011-7.
11. **Ecobichon DJ, Davies JE, Doull J, Ehrich M, Joy R, Mc Millan D, MacPhail R, Reiter LW, Slikker W, Tilson H.** Neurotoxic effects of pesticides. In: the effect of pesticides on human health. *Princeton Scientific Publishing*, **1990**;131-199.
12. **Yavuz T, Delibas N, Yildirim B, Altuntas I, Candir O, Cora A, Karahan N, Ibrism E, Kutsal A.** Vascular Wall Damage in Rats Induced by Organophosphorus Insecticide Methidathion. *Toxicol Lett*, **2005**; 15;155(1):59-64.

13. **Antov G, Vasileva L.** Biochemical Changes in the Myocardium in Experimental Chronic Pirazofos Poisoning. *Probl Khig*, **1985**; 10:52-8.
14. **Akimov GA, Kolesnichenko IP.** Morphological Changes in The Nervous System in Acute Peroral Chlorophos Poisoning. *Arkh Patol.* **1985**; 47(1):44-51.
15. **Hertel RF.** Environmental Health Criteria 145, Geneva: World Health Organization. **1993**.
16. **Holmstedt B.** Pharmacology of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors. 567-687:570.
17. **Kamanyire R, Karalliedde L.** Organophosphate Toxicity and Occupational Exposure. *Occupational Medicines*, **2004**; 54:69-75.
18. **Güven A,** Asetilkolinesterazın Önemi ve İnhibitörleri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Der*, **2000**; 6(1-2):145.
19. **Millard CB, Broomfield CA.** Anticholinesterases: Medical Applications of Neurochemical Principles. *Journal of Neurochemistry*, **1995**; 64, 1909-1918.
20. **Bajgar J.** Complex View on Poisoning with Nerv Agents and Organophashates. *Acta Medica*, **2005**; 48(1): 3-21.
21. **Solomon G, Ogunseitan OA, Kirsch J.** Pesticides and Human Health. A Resource for Health Care Professionals. California.
22. **Woods H F,** Organophosphates. Committe on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment: Department of health .
23. Dichlorvos (DDVP): Risk Assessment Issues For The FIFRA Science Advisory Panel, **1998**.
24. Erişim : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc79.htm>: **14.05.2009**.
25. Erişim : <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/ddt-famphur/dichlorvos/index.html>: **02.05.2009**.
26. U.S. EPA: United States Environmental Protection Agency; Prevention Pesticides and Toxic Substances: *EPA 738-R- 06-01*, **2006**; 11.
27. **Ebeigbe AB, Campbell PI.** Inhibitory Effect of Dichlorvos on Arterial Smooth Muscle Contraction. *Pharmacol Res Commun*, **1986**; 18(3):283-91.
28. **Schmidt G, Schmidt M, Nenner M, Vetterlein F.** Effects of dichlorvos (DDVP) inhalation on the activity of acetylcholinesterase in the bronchial tissue of rats. *Arch. Toxicol*, **1997**; 42(3): 191-198.

29. **Güvenç B, Çömelekoğlu Ü, Öztürk N.** Dichlorvos ve Chlorpyrifosun Aortun Pasif Mekanik Özelliklerine Etkisi. XX. Ulusal Biyoizik Kongresi. Mersin, **2008**: 29.
30. **Kayaalp SO.** Kayaalp Rasyonel Tedavi Yöntünden Tıbbi Farmakoloji.10.Baskı. Hacettepe Taş, **2002**
31. Erişim : <http://www.whatischemistry.unina.it/atropin.gif> :**20.07.2009**
32. **Murray KR, Graner DK, Mayers PA, Rodwell VW.** Harper Biyokimya. 2.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, **2004**; 784.
33. **Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji.** 20. Baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri, **2002**; 97 (2), 78,79 81,95.
34. **Cox MM, Nelson LD.** Bölüm 12. Biyolojik Zarlar ve Taşıma. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. 3.Baskı, Palme Yayıncılık, **2005**; 426, 427.
35. **Cabadak H.** Muskarinik Asetilkolin Reseptörlerinin Dağılımı ve İlişkili Sinyal İleti Yolları, *Turk J Biochem*, **2006**; 31 (3); 141–150.
36. **Guyton AC, Hall JE.** Tıbbi Fizyoloji. Onbirinci Basım, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara **2007**.
37. Erişim : <http://www.pharmainfo.net/introduction-autonomic-nervous-system/cholinergic-receptors> **03.05.2009**.
38. **Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inouge R.** Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, With Special Reference to Receptors and Ion Channels. *The American Physiological Society* **1998**; 811-918.
39. **Junqueira L. C, Carneiro J.** Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, **2006**; 456-458.
40. **Bracevell RN.** Fourier Dönüşümü.380. *Elektrik elektronik Müh*, 109-118.
41. **Çömelekoğlu Ü.** Düz Kasların Kasılma Kinetiğinin Küçük ve Büyük Genlikli Uzunluk Uyarılarıyla İncelenmesi. Doktora -**1994**.
42. **Kobayashi H, Sato I, Akatsu Y, Fujii S, Suzuki T, Matsusaka N, Yuyama A.** Effects of single or repeated administration of a carbamate, propoxur, and an organophosphate, DDVP, on jejunal cholinergic activities and contractile responses in rats. *J Appl Toxicol*, **1994**;14(3):185-90.
43. **Jankovic SM, Protic BA, Jankovic SV.** Contractile effect of acetylcholine on isolated ampullar segment of fallopian tubes, *Pharmacological Research* 49 **2004**; 31–35.
44. **Laurentu M, Popescu S, Ciontea M, Cretou D.** Interstitial Cajal-Like Cells in Human Uterus and Fallopian Tube, **2007**; 1101: 139–165.

45. **Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S.** Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*, **2002**; May 24;277(21):19191-7.

EK 1

```
close all
clear all
clc
dt=0.02;
load -ASCII dosya adı.mat
x= dosya adı ;
xmean=mean(x);
x=x-xmean;
figure(1)
subplot(3,1,1)
plot(x);
grid
% analiz edilecek verinin belirlenmesi
S1=N1-N2
S2=N1
dS=S2-S1
N=dS/dt
subplot(3,1,2)
t=1:1:N-1;
%istenmeyen noktaların atılması
x1(t)=x(t+S1/0.02);
plot(t,x1(t))
grid
%FFT nin hesaplanması
T1=N*dt;
df1=1/T1;
X1=fft(x1,N);
f1=0:df1:N*df1-df1;
% genlik frekans karakteristiği
gen=2*abs(X1)/N;
figure(2)
subplot(3,1,3)
semilogx(f1,gen)
grid
i=1:1:80;
f1(i)
gen(i)
```


ÖZGEÇMİŞ

Kahraman Maraş'ın Göksun ilçesine bağlı Taşoluk köyünde 02.04.1981 yılında, doğdu. Orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. Lisans derecesini, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü'nden aldı. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Tıp fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce olup, ilgi alanları, Fizik, Biyofizik, temel tıp bilimleridir. Çalışmalarını halen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi kadrosuyla sürdürmektedir.