

**THIACLOPRİD VE D-TUBOCURARİNE’NİN *Rana
ridibunda* İSKELET KASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ESRA PEKOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
ARALIK – 2015**

**THIACLOPRİD VE D-TUBOCURARİNE’NİN *Rana
ridibunda* İSKELET KASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ESRA PEKOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA**

**MERSİN
ARALIK – 2015**

Esra PEKOĞLU tarafından Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA danışmanlığında hazırlanan “Thiaclopid' ve d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kası üzerine etkilerinin incelenmesi ” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA (Danışman)

Doç. Dr. Yusuf SEVGİLER

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..12../02../2016..tarih ve2016..6...../..213..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

THIACLOPRİD ve D-TUBOCURARINE'NİN *Rana ridibunda* İSKELET KASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esra PEKOĞLU

ÖZ

Thiacloprid, bitki ve hayvanlar üzerindeki zararlı böceklerin kontrolünde kullanılan neonikotinoid bir insektisittir. Bu insektisit nörotoksik etkiye sahip olup, canlıların sinir sisteminde tahribata neden olmaktadır. Bu çalışmada agonist olan thiacloprid ve antagonist olan d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kasında mekanik aktivite parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Deneylerde 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} M derişimlerde thiacloprid ile 10^{-4} M tubocurarin + 10^{-5} M thiacloprid, 10^{-5} M tubocurarin + 10^{-6} M thiacloprid karışımları uygulanmıştır. Tüm deney gruplarında agonist ve antagonistin etkileri eşit sayıda denek üzerinde çalışılmıştır ($N=8$). Ölçümler 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikada alınmış ve 0. dakikada alınan ölçümler kontrol değeri olarak kabul edilmiştir. İskelet kası mekanik aktivitesini kayıtlamak için BIOPAC MP 100 Acqisition sistemi kullanılmıştır ve kasılma kuvveti, kasılma süresi, gevşeme süresi değerleri incelenmiştir. Elde edilen bulgularda thiacloprid, kasılma kuvvetini %35-97 oranında düşürmüş, kasılma süresini %18-75 azaltmış, gevşeme süresinde ise %33-71 oranında azalma meydana getirmiştir. Thiaclopridin pro-oksitatif etkisini incelemek için katalaz (CAT) enzim aktivitesi ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgulara göre CAT enzim aktivitesinde azalma, TBARS düzeylerinde ise artış görülmüştür. Histolojik incelemeler sonucunda yüksek dozlarda thiacloprid uygulanan gruplarda (10^{-3} ve 10^{-4} M thiacloprid) sarkomer bütünlüğünün bozulduğu, miyofibrillerin ayrıldığı, mitokondrilerin şiştiği gözlenmiştir. Bu çalışma; insan sağlığı, veterinerlik ve tarımsal verimliliği koruma gibi alanlarda yaygın kullanılan bu insektisit hedef olmayan organizmalara olumsuz etkilerinin ortaya çıkarılması, bu uygulamaların doğal yaşama olumsuz etkilerini en aza indirecek yeni uygulamaların gerçekleştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Thiacloprid, D-tubocurarine, İskelet kası, Mekanik aktivite, Oksidatif stres

Danışman: Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

ANALYSIS OF EFFECTS OF THIACLOPRID AND D-TUBOCURARINE ON *Rana ridibunda* SKELETAL MUSCLE

ESRA PEKOĞLU

ABSTRACT

Thiacloprid is a neonicotinoid insecticide for controlling insect pests on animals and plants. This insecticide has neurotoxic effect and cause havoc on the nervous system of living beings. In this study, the effects of agonist thiacloprid and antagonist d-tubocurarine on *Rana ridibunda* skeletal muscle mechanical activity parameters were analyzed. 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M concentrations of thiacloprid and 10^{-4} M d-tubocurarine + 10^{-5} M thiacloprid, 10^{-5} M d-tubocurarine + 10^{-6} M thiacloprid mixtures were applied in the experiments. The effects of agonist and antagonist were studied on an equal number of subjects ($N=8$) in the experimental groups. Measurements were taken at 0th, 30th, 60th, 90th and 120th minutes. Measurements taken at 0th minute were regarded as the control value. BIOPAC MP100 Acquisition system was used to record skeletal muscle mechanical activity and contraction strength, contraction duration and relaxation time values were analyzed. Thiacloprid reduced contraction strength with a rate of 35-97%, contraction duration with a rate of 18-75% and relaxation time has a reduction of 33-71% according to findings. Catalase enzyme (CAT) activity and tiobarbituric acid reaktive species (TBARS) levels were measured to analyze pro-oxidative effect of thiacloprid and reduction in CAT enzyme activity and increase in TBARS levels were found. Sarcomere integrity was impaired, myofibrils were split and mitochondria were swollen according to histological analysis of the group treated with high doses of thiacloprid (10^{-3} and 10^{-4} M thiacloprid). This study contributes to revealing the negative effects on non-target organisms of this commonly used insecticide in human health, veterinary and agricultural productivity protection areas and realizing new applications to minimize the negative effects on natural life.

Key Words: Thiacloprid, D-tubocurarine, Skeletal muscle, Mechanical activity, Oxidative stress

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde her konuda bana yardımcı olan Biyofizik Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında sağladığı kolaylıktan ötürü Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Gökhan CORAL' a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkıları olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Necat YILMAZ'a, Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim. Tez çalışmamın istatistiksel analizlerindeki büyük katkılarından dolayı Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Çağatay Han TÜRKSEVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama maddi destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi destekleriyle her türlü yanımda olan annem Emine PEKOĞLU, babam Uğur PEKOĞLU ve abim Volkan PEKOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Esra PEKOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLERİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. NEONİKOTİNOİDLER	4
2.1.1. Neonikotinoidlerin Genel Özellikleri.....	5
2.1.2. Neonikotinoidlerin Etki Yönü ve Toksik Etkileri.....	6
2.1.3. Neonikotinoidlerin Nörotoksik Etki Mekanizması	6
2.1.4. Thiacloprid	7
2.2. D-TUBOCURARINE	8
2.3. NORMAL İSKELET KAS MORFOLOJİSİ	8
2.3.1. İskelet Kasının Elektriksel Özellikleri	13
2.3.2. Kas Sarsısı	14
2.3.3. Gastrokinemius Kası	15
2.4. SERBEST RADİKALLER	15
2.4.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	15
2.5. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ	17
2.5.1. Katalaz (CAT).....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. KULLANILAN ALETLER	19
3.2. DENEY HAYVANLARININ SAĞLANMASI	19
3.2.1. Etik Kurul İzni.....	20
3.3. KİMYASALLARIN HAZIRLANMASI	20

3.3.1. Ringer Çözeltisinin Hazırlanması	20
3.3.2. Thiaclopid Çözeltisinin Hazırlanması	20
3.3.3. D-Tubocurarine Çözeltisinin Hazırlanması	21
3.4. DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI.....	21
3.5. ELEKTROFİZYOLOJİK KAYITLAR	22
3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	22
3.7. BİYOKİMYASAL İNCELEME.....	24
3.7.1. CAT Enzim Aktivitesi Tayini	24
3.7.1.1. Kullanılan reaktifler	25
3.7.1.2. Deneyin yapılışı	25
3.7.1.3. CAT aktivitesinin hesaplanması	25
3.7.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddelerinin (TBARS) Ölçümü	26
3.7.2.1. Kullanılan reaktifler	26
3.7.2.2. Deneyin yapılışı	27
3.7.2.3. TBARS düzeyinin hesaplanması	27
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. BULGULAR	29
4.1.1. Elektrofizyolojik Bulgular	29
4.1.1.1. Thiaclopid ve Thiaclopid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Kasılma Kuvveti Üzerine Etkisi	34
4.1.1.2. Thiaclopid ve Thiaclopid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Kasılma Süresi Üzerine Etkisi	38
4.1.1.3. Thiaclopid ve Thiaclopid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Gevşeme Süresi Üzerine Etkisi	41
4.1.2. Histopatolojik Değerlendirme	44
4.1.3. Thiaclopidin CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi	51
4.1.4. Thiaclopidin TBARS Düzeyi Üzerine Etkileri	52
4.2. TARTIŞMA	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan çözelti miktarları	27
Çizelge 4.1. Thiacloprid ve thiacloprid +d-tubocurarine'nin <i>Rana ridibunda</i> iskelet kası kasılma kuvveti üzerine uygulama süresi ve doza bağlı etkileri	37
Çizelge 4.2. Thiacloprid ve thiacloprid + d-tubocurarine'nin <i>Rana ridibunda</i> iskelet kası kasılma süresi üzerine zamana ve doza bağlı etkileri	40
Çizelge 4.3. Thiacloprid ve thiacloprid + d-tubocurarine'nin <i>Rana ridibunda</i> iskelet kası gevşeme süresi üzerine zamana ve doza bağlı etkileri	43
Çizelge 4.4. Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonunun katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	51
Çizelge 4.5. Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonunun TBARS düzeyi üzerine etkileri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Neonikotinoid insektisitlerin kimyasal formülasyonu	5
Şekil 2.2. Thiaclopridin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.3. D-Tubocurarine'nin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.4. Tipik bir iskelet kas lifi yapısı	9
Şekil 2.5. İskelet kası-sinir kavşağı ve ilgili yapılar	13
Şekil 2.6. İskelet kası kasılma evreleri	14
Şekil 2.7. Poliansatüre yağ asitinden MDA'nın oluşumu	17
Şekil 4.1. 10^{-3} M thiaclopridin <i>Rana ridibunda</i> gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.2. 10^{-4} M thiaclopridin <i>Rana ridibunda</i> gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	30
Şekil 4.3. 10^{-5} M thiaclopridin <i>Rana ridibunda</i> gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	31
Şekil 4.4. 10^{-6} M thiaclopridin <i>Rana ridibunda</i> gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	32
Şekil 4.5. 10^{-5} M thiacloprid ile 10^{-4} M d-tubocurarine karışımının <i>Rana ridibunda</i> gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	33
Şekil 4.6. 10^{-6} M thiacloprid ile 10^{-5} M d-tubocurarine karışımının <i>Rana ridibunda</i> iskelet kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi	34
Şekil 4.7. Kontrol grubu	44
Şekil 4.8. 1×10^{-3} M thiacloprid grubu	45
Şekil 4.9. 1×10^{-4} M thiacloprid grubu	46
Şekil 4.10. 1×10^{-5} M thiacloprid grubu	47
Şekil 4.11. 1×10^{-6} M thiacloprid grubu	48
Şekil 4.12. 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine'nin kombine olarak uygulandığı grup	49
Şekil 4.13. 1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine'nin kombine olarak uygulandığı grup	50

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolin esteraz enzimi
Ag/AgCl	: Gümüş/gümüş klorür
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
°C	:Santigrad derece
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
d	: Yoğunluk
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
KCl	: Potasyum klorür
kg	: Kilogram
L	: Litre
LD ₅₀	: Letal doz 50
M	: Molar
M _A	: Molekül ağırlığı
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
mV	: Milivolt
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
nAChR	: Nikotinik asetilkolin reseptörü
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
PMNI	: 1-(3-piridilmetil)-2-nitrometilen-imidazolidin

PUFA	: Poli ansatüre yağ asiti
ROS	: Reaktif oksijen türü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SER	: Düz yüzlü endoplazmik retikulum
SR	: Endoplazmik retikulum
SS	: Standart sapma
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri



1. GİRİŞ

Pestisitler, çeşitli alanlarda ürün zararlılarını öldüren ya da uzaklaştıran kimyasal maddelerdir [1, 2]. Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturuvcu etkileri saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bir tarım ülkesi olan Türkiye'de insektisitlerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Ancak bu tarım ilaçları suda, toprakta, meyve ve sebzeler üzerinde uzun süre bozulmadan kalarak çevre kirliliğine neden olmakta ve dolayısıyla besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilen çeşitli zararlar oluşturmaktadır [1, 3]. Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitın çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda omurgalı ve omurgasız su organizmalarının etkilenmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesine ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar. Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal degradasyona, bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından adsorlanıp desorplanmakta veya kimyasal degradasyona uğramaktadırlar. Toprakta pestisitın tutulmasıyla hareketi ve biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli şekillerde degradasyonu ile ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine dönüşebilmektedir. Pestisitın kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan yerleri veya organizmaları kontamine etmesi istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır.

Pestisitler kontrol amacıyla kullanıldıkları zararlı tipine göre fungusitler, algisitler, herbisitler, insektisitler, nematositler ve mollusitler olarak sınıflandırılırlar [4].

İnsektisitler, böceklerin kontrolünde kullanılan biyolojik ya da kimyasal orjinli ajanlardır [5]. Bunların birçoğu nörotoksik özelliktedir ve etkilerini özellikle böceklerin sinir sistemini tahrip ederek gösterirler. İnsektisitler; klorlu hidrokarbonlular, organofosforlu bileşikler, metilkarbamatlar, piretroidler ve neonikotinoid insektisitler olmak üzere beş ana gruba ayrılırlar [6, 7]. Neonikotinoid insektisitler, bitki ve hayvanlar üzerindeki zararlı böcekleri kontrol altında tutan, son yıllarda üretilmiş en önemli yeni sentetik insektisit sınıfıdır [8]. Thiacloprid neonikotinoid bileşikler sınıfına ait yeni bir pestisittir. Işığa dayanıklılığının iyi olması [9, 10, 11, 12] ve omurgalılara göre böcekler üzerine yüksek seçici toksisite göstermesi bu insektisit dnyaya çapında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır [13, 14, 15] Neonikotinoid teriminden de anlaşılacağı gibi thiacloprid, nikotine yapısal benzerliği olan ve aynı etkiyi gösteren bir bileşiktir [16].

Amfibiler su ve tarım ekosistemleri içerisinde önemli organizmalardır ve birçok tarım pestisitinin etkisine maruz kalmaktadırlar [17]. Amfibiler, larva yaşamlarını sucul ortamda geçirmeleri nedeniyle habitatlarındaki değişikliklere olan duyarlılıkları sayesinde su ve tarım ekosistemlerin biyoindikatörleri olarak göze çarparlar. Bu nedenle su ve tarım ekosistemleri üzerinde kimyasalların etkilerini ölçmek için tipik test hayvanıdır [18].

Pestisitlerin, hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkisi ve ekosisteme olan etkileri dnyaya çapında ilgilenilen bir konudur [19]. Kullanılan pestisitler gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır ve pestisitlerin hedef olmayan canlılar üzerindeki potansiyel toksik risk değerlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle su ve tarım ekosistemlerindeki hedef olmayan organizmalar üzerine olan etkileri tamamen anlaşılmış değildir [17]. Thiacloprid yeni üretilen bir insektisittir. Bu nedenle hedef olmayan organizmalar üzerine toksik etkisi konusundaki çalışmalar yetersizdir. Çalışma bu alandaki mevcut bilgilere katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı insan sağlığı, veterinerlik ve tarımsal verimliliği koruma gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan neonikotinoid bir insektisit olan thiaclopridin

in vitro koşullarda, farklı derişimlerinin kurbağa iskelet kası üzerine etkilerinin elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal analizler ile belirlenmesidir. Ayrıca thiaploprid ile reseptör antagonistliği etkisine sahip d-tubocurarine karışımının da analiz edilen parametreler üzerine etkisinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi de amaçlanmıştır. Çalışma yeni üretilen bir kimyasal olan thiaplopridin hedef olmayan *Rana ridibunda* iskelet kası üzerine etkilerinin ortaya çıkarılmasına, bu uygulamaların doğal yaşama olumsuz etkilerini en aza indirecek yeni uygulamaların gerçekleştirilmesine katkı sunmaktadır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. NEONİKOTİNOİDLER

Nikotin ile ilişkili insektisitlerin yeni jenerasyonları olan neonikotinoidler, bir nitrometilen, nitroimin ya da siyanoimin grubuna sahiptirler. Nitrometilenler 2-(nitrometil) piridin yapısından elde edilir, zayıf insektisidal etki gösterirler. Yapı-aktivite çalışmalarının erken dönemlerinde bu prototip temel alınarak nithiazin keşfedilmiştir. Nithiazin 2-(nitrometil) piridin ile kıyaslandığında daha güçlü insektisidal etki göstermesine rağmen ışığa dayanıksız olduğu için ticari açıdan gelişmemiştir [20]. 1. pozisyondaki nithiazin yapısı [1-(3-piridilmetil)-2-nitrometilenimidazolidin] (PMNI) geliştirilmesine öncülük etmiş ve daha sonra nitroiminlerle ilişkili, güçlü fotostabilite gösteren thiacloprid, imidacloprid, nitenpiram, acetamiprid gibi ticari öneme sahip neonikotinoidler geliştirilmiştir.

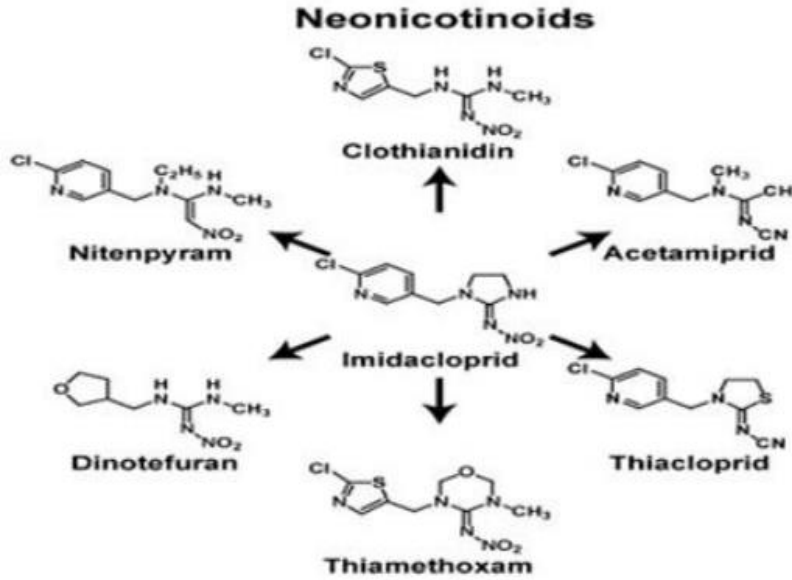
Bu neonikotinoidlerin tamamı bir 6-kloro-3-piridil kısmı taşır, nikotin ve epibatine benzedikleri için nikotinik tip asetilkolin reseptörlerine potansiyel olarak bağlanabilirler [21].

Sinapslar pestisitlerin pek çok çeşidi için hedef oluşturan, transmitter madde olarak işlev gören asetilkolini (ACh) kullanırlar [22]. ACh, omurgalı ve omurgasız türlerinin her ikisinde uyarıcı (eksitatör) bir nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminden çıkan bir uyarının, sinir boyunca ilerledikten sonra geldiği sinir-kas kavşağında sinirden kasa taşınmasını sağlar. ACh iki tip reseptörü aktive eder, bunlara “muskarinik” ve “nikotinik” reseptörler adı verilmektedir. Nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChR), insektisit bileşikler için potansiyel hedef oldukları uzun zamandan beri bilinmektedir ve son 20 yıldan fazla bir süredir bu reseptörleri hedef alan insektisitler, tarımda, veterinerlikte ve zararlı böceklerin kontrolünde etkili biçimde kullanılmaktadır [23]. ACh çizgili kas (iskelet kası) liflerindeki nikotinik reseptöre bağlanarak kas hücresine Na⁺ girmesini ve voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açılması ile depolarize olan kas hücresinin kasılmasını sağlar. ACh belli nöronlarda kolin asetil transferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan

sentezlenir. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra ACh, asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) enzimi yardımıyla kolin ve asetata (asetik asit tuzu) çevrilerek yıkılır. Bazı insektisitler AChE enzimini inhibe ederler. Bunun sonucu olarak merkezi sinir sistemi, kaslar ve bezler sürekli olarak uyarılır, ACh molekülleri kaslara sürekli kasılma emri taşıyıp kısmi veya genel felce yol açabilir [24]. İsektisitlerin çoğu AChE inhibitörüdür ve bu prensiple çalışırlar. İsektisitler ürün zararlılarına karşı kullanıldıkları zaman AChE enzimini inhibe ederek ACh'nin sürekli impuls meydana getirmesine neden olurlar. Böylece böceklerde ölümle sonuçlanan halsizlik, güçsüzlük, tremor (titreme) gibi belirtiler görülmektedir [25].

2.1.1. Neonikotinoidlerin Genel Özellikleri

Neonikotinoidler temel olarak yapılarında nikotin taşırlar. Bazı neonikotinoidlerin yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Neonikotinoid insektisitlerin kimyasal formülasyonu [26].

Neonikotinoidler, tüm dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunumu için kullanılan en yeni insektisit sınıfıdır [27]. Neonikotinoidler çoğunlukla emici böcekleri ve bazı kelebekler ile kın kanatlı zararlıları kontrol etmek için kullanılmaktadır [28].

2.1.2. Neonikotinoidlerin Etki Yönü ve Toksik Etkileri

Neonikotinoidler, hem memelilerde hem de böceklerde postsinaptik membranda nAChR'ye bağlanır ve agonist (agonist: reseptörlere afinite gösteren ve fizyolojik aktivitelerini uyaran madde) olarak etki gösterir [8, 29]. Memelilerdeki nAChR böceklerdekinden çok az yapısal değişiklikler göstermektedir. Memelilerde sinir sistemine ait reseptörlerde bağlanma nAChR'nin $\alpha 4/\beta 2$ yüzeyinde olmaktadır ve muhtemelen böceklerde de buna benzer bir yüzey bulunmaktadır [28]. Neonikotinoidlerin postsinaptik nAChR'ye bağlanması, kolinerjik sinapslarda başlangıçta yanlış sinyallerin artışına, daha sonra sinir uyarılarının tamamen bloke edilmesine neden olur. Böceklerde neonikotinoid zehirlenmesinin belirtileri; düzenli olmayan abdominal titreme, kanatları germe, şiddetli vücut sarsıntısı, halsizlik, felç ve sonunda ölüm şeklinde gözlenir [30].

2.1.3. Neonikotinoidlerin Nörotoksik Etki Mekanizması

Neonikotinoidler, böceklere karşı yüksek toksisiteye fakat memelilere ve sucul organizmalara karşı düşük toksisiteye sahip insektisitlerdir [31]. Çünkü neonikotinoidlerin memelilerdeki nAChR'ye ilgisi böceklerdekinden daha düşüktür [8, 32]. Neonikotinoidlerin nAChR'ye bağlanma bölgelerindeki ve nAChR alt ünitelerindeki yapısal farklılıklar bu farklılıktan sorumludur. Neonikotinoidler, böcek nAChR'lerindeki özel alt ünite tarafından seçici olarak tanınan elektronegatif farmakofora (farmakofor: bir molekülde biyolojik etkiden sorumlu olduğu düşünülen kısımdır. Farmakofor olarak görev yapan nitroguanidine kısım; imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin ve dinotefuran pestisitlerinde; nitrometilen kısım;

nithiazine ve nitenpyram pestisitlerinde; cyanoamidine kısım; thiacloprid ve acetamiprid pestisitlerinde bulunmaktadır) sahiptir [8, 33, 34].

2.1.4. Thiacloprid

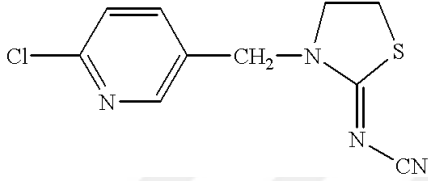
IUPAC adı: 3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide

Kimyasal adı: (Z)-3-(6-kloro-3-piridilmetil)-1,3-tiyazolidin-2-ildensiyanamid

CAS numarası: 111988-49-9

Molekül formülü: C₁₀H₉ClN₄S

Kimyasal yapı:



Şekil 2.2. Thiaclopridin kimyasal yapısı [35].

Moleküler ağırlığı: 252.72 g/mol

Görünüm: sarımsı kristal katı

Erime noktası: 136°C

Çözünürlük: suda 20°C 185 mg/L

Thiacloprid neonikotinoid insektisitlerin kloronikotinil sınıfında yer alır. Yaygın olarak çekirdekli ve yumuşak meyveler, pamuk, sebze, şeker pancarı, patates, pirinç ve süs bitkilerinde kullanılır. Thiacloprid hızlıca absorbe edilir ve hızlı bir şekilde vücuttan atılır, dokularda uzun süre kalmaz. Böylece normal koşullar altında insanlar için zehirlenmeye neden olmaz. En yaygın toksisite belirtileri sıçanlarda vücut ağırlığının azalmasıdır, fare ve köpekler daha az duyarlılık gösterir. Akut LD₅₀ dozu sıçanlarda ağız yolu ile 444 mg/kg, deri yolu ile 2000 mg/kg'dır.

2.2. D-TUBOCURARINE

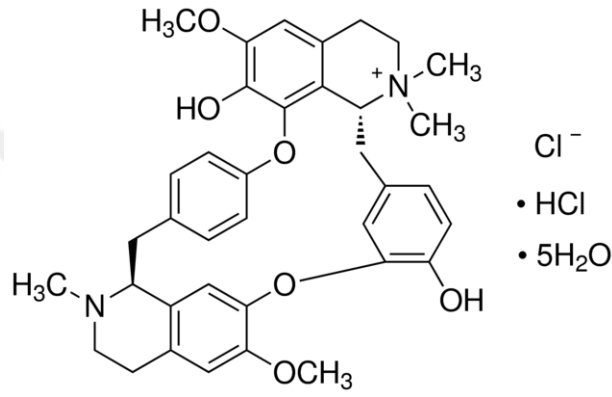
IUPAC adı: 6,6'-dimethoxy-2,2,2',2'-tetramethyltubocuraran-2,2'-dium-7',12'-diol

Kimyasal adı: Tubocurarine hydrochloride pentahydrate

CAS numarası: 6989-98-6

Molekül formülü: $C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6 \cdot 5H_2O$

Kimyasal yapı:



Şekil 2.3. D-Tubocurarine'nin kimyasal yapısı [36].

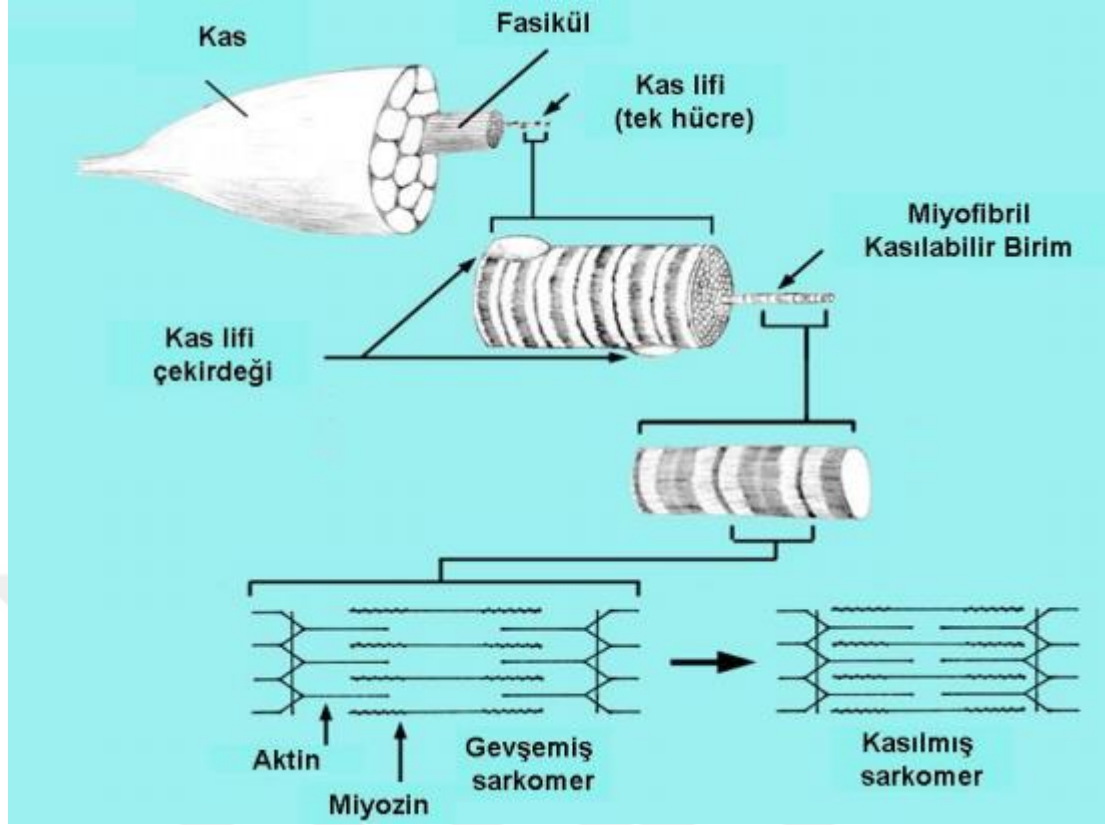
Moleküler ağırlığı: 771.72 g/mol

Erime noktası: 268⁰C

Çözünürlük: suda 50 mg/mL

2.3. NORMAL İSKELET KAS MORFOLOJİSİ

İskelet kasları, konnektif doku (endomisyum) ile ayrılmış kas lifi adını alan çok sayıda hücreden oluşur. Olgunlaşmış kas hücresi olan kas lifi, boyu birkaç santimetreye kadar ulaşabilen, iğ görünümünde ve çok çekirdekli bir yapıdadır. İskelet kası, liflerin birbirine paralel seyrettiği demetler (fasiküller) şeklinde düzenlenir (Şekil 2.4.). Endomisyumda kapillerler ve intramüsküler sinir lifleri bulunur. Fasiküller ise birbirinden perimisyum adı verilen bağ dokusu ile ayrılır. Perimisyal alanda, arteryol ve venüllerle birlikte kas liflerine yönelmiş motor sinir demetleri bulunur.



Şekil 2.4. Tipik bir iskelet kas lifi yapısı [37].

İskelet kas liflerinin uzunlukları ortalama 3 cm olmakla birlikte 1 mm'den kısa ve 4 cm'den uzun lifler de vardır. Liflerin çapı 10-100 (μm) arasındadır. Bir kas lifi, hücre içi jelimsi sıvı içine dalmış 1000-2000 dolayındaki 0.5-2 μm kalınlıkta miyofibrillerden oluşur [38]. Genişlikleri yaşa, cinsiyete, kas lifinin uzunluğuna, kasın yaptığı işin ağırlığına, bireyin beslenme durumuna göre değişebilir. Kas içinde merkezdeki lifler daha geniş çaplıdır. Liflerin fasikül içindeki yerleşimleri; fasikülün bir ucundan diğer ucuna uzananlar, bir ucundan başlayıp fasikül içinde sonlananlar ve iki ucu da fasikül içinde bulunanlar olmak üzere üç şekildedir. Kas hücre zarı sarkolemma olarak adlandırılır. İskelet kas hücresinin sitoplazmasında yani sarkoplazmada organel ve inklüzyonların dışında homojen ve az yoğun bir matriksten oluşur. Matriks, miyoglobin gibi protein yapısında pigmentler ve bir miktar da enzim içerir. Şekli elemanların başlıcaları sarkolemmaya yakın olarak yerleşmiş çok sayıda çekirdek, çok sayıda mitokondri, golgi kompleksi, sarkoplazmik retikulum (SR) gibi organeller ile miyofibriller, glikojen ve lipid damlacıklarıdır. Uzun oval biçimli çekirdekler bir kas lifinde birkaç yüz tanedir ve lifin uzun eksenine paralel olarak

sarkolemanın altında yerleşiktirler. Çekirdekler lif boyunca oldukça düzenli aralıktır, tendona bağlanma yerinde daha fazla sayıda ve düzensizdirler [39].

Sarkoplazma içinde uzun, iplik şeklinde, kas lifinin uzunluğuna bulunan miyofibriller 1-2 µm çapta olup bunların elektron mikroskopunda uzunlamasına düzenlenmiş, ince miyofilamentlerden oluştuğu gözlenir. Büyüklük ve kimyasal yapısı farklı iki tip miyofilament ayırt edilir. Bunlardan biri diğerinden kalın, 10 nm çapta, 1.5 µm uzunlukta olup çoğunluğu miyozinden ibarettir. Daha ince olan filamentler ise 5 nm çapta, 1 µm uzunluktadır. Başlıca aktinden yapılmıştır. Aktin filamentleri aktin, tropomiyozin ve troponin proteinlerinden yapılmıştır. Globuler aktin molekülleri art arda dizilerek fibriler aktini oluşturur. İki fibriler aktin bir sarmal oluşturur. Tropomiyozin de aktine uygun sarmallar yapar. Troponin molekülleri ise düzgün aralıklarla (miyozin başına uyacak şekilde) tropomiyozine bağlanır.

Kalın miyozin filamentleri, orta kısımda, M çizgisi hizasında daha kalındır, uçlara gidildikçe inceler. Orta kısımları düzgün olduğu halde uç kısımları, filament eksenine dik olan, kısa çıkıntılar içerir. Bu çıkıntılar miyozin filamentini çevreleyen 6 aktin filamentine doğru uzanır. Bu uzantılar miyozin filamentlerini meydana getiren moleküllerin düzenlenmesine bağlıdır. Her bir molekül bir baş ve bir kuyruk kısmından oluşur. Moleküllerin kuyruk kısımları birbirine paralel olarak uzanır ve öyle düzenlenir ki orta kısım yalnız kuyruktan oluştuğu için çıkıntı içermez, düzdür. Baş kısımları filamentin incelen kısımları boyunca dik olarak yanlara doğru çıkar. Çıkıntılar birbirinden 6-7 nm aralıklarla ve her 6 çıkıntı 45 nm'de bir heliks tamamlayacak şekilde düzenlenir. Miyozin filamentlerinin baş kısımlarında, kas kasılması için gerekli enerjiyi açığa çıkarmak üzere adenozin trifosfatı (ATP) parçalayan adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimi bulunur.

I bandını sadece aktin filamentleri oluşturmaktadır. I bandının ortasındaki Z çizgisi ise komşu sarkomerlerdeki aktin filamentlerinin tutundukları yerdir. A bandı miyozin filamentlerinin boyu kadardır. A bandında miyozin filamentler içine her iki taraftan aktin filamentleri sokulur. Aktin filamentleri M çizgisine kadar sokulmadıklarından A bandının ortasında açık renkte gözlenen H bandı oluşur. Yani H bandında sadece miyozin filamentleri vardır. H bandının genişliğini aktin filamentlerinin giriş derecesi belirler. Başka bir deyişle kasın kasılma derecesine bağlıdır. Miyozin filamentlerinin kalın olan orta kısmında bulunan M çizgisinde

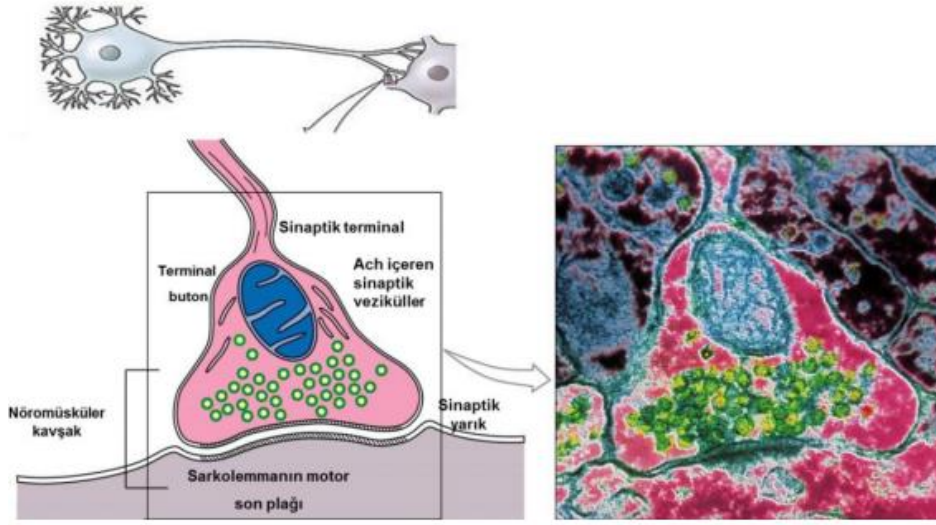
miyozin filamentleri, miyozin yapısında olmayan köprülerle birbirlerine bağlanır. Aktin ve miyozin filamentlerinin düzenlenişini üç boyutlu düşünürsek altıgen prizmalar yapacak biçimdedir. Enine kesitte her kalın miyofilament altı ince miyofilament ile altıgen yapacak şekilde çevrilidir. Üç boyutlu durumda orta eksenini oluşturan miyozin filamentleri çevresinde 6 aktin filamentleri, altıgen prizmanın köşelerini yapacak şekilde düzenlenmiştir. Bunun dışını da yine altıgen prizmanın köşelerini oluşturacak biçimde 6 miyozin filamentleri çevreler. Bu düzenlenmeye çift hegzagonal alan adı verilmiştir. Enine kesitte her aktin filamentinin çevresinde üç miyozin filamentinin bulunduğu gözlenir. Kalın ve ince filamentler arasındaki uzaklık sabit olup 45 nm kadardır ve miyozin moleküllerinin oluşturduğu enine köprücükler tarafından kat edilir.

Kasılma sırasında A bandının uzunluğu değişmez. I ve H bandının her ikisinin uzunluğu azalır. Z çizgisi A bandının sonuna yaklaşır. Aktin filamentleri miyozin filamentleri içinde daha derine girerek filamentlerin boyu değişmediği halde I ve H bantlarını, buna bağlı olarak da sarkomerlerin boyunu kısaltmış olurlar. Bu da miyofibrillerin boyunun kısalması demektir. Kasılma sırasında aktin ve miyozin filamentlerinin boyu değişmez; birbiri içinde kayarak sarkomerin boyunu kısaltırlar. Filamentlerin kayma işlemi, miyozin moleküllerinin baş kısmı ile komşu aktin filamentleri arasındaki bağlantılarının yapılıp bozulmasının tekrarlanmasıyla sağlanır. Miyozinlerin baş kısımları aktin filamentlerine bağlandıktan sonra dik olan açılı M çizgileri tarafında daralır. Böylece aktin filamentleri M çizgisine doğru ilerler. Bağlantılar açıldıktan sonra miyozin tekrar eski durumuna geçer ve sonraki noktada aktinlere bağlanır. Bu iş için gerekli olan enerji sarkoplazmik retikulumdan salınan kalsiyum iyonlarının uyarmasıyla, köprücüklerdeki adenozin ATPaz'ın, ATP'yi parçalamasından açığa çıkar.

T tübüleri, sarkolemanın hücre içine yaptıkları girintilerden oluşur. Miyofibrilleri çevreler ve komşu miyofibrillerde birbirleriyle devam ederler. Bunlar hücre yüzeyinde hücreler arası aralığa açılır. Sarkoplazmik retikulum denen granülsüz endoplazmik retikulum çizgili iskelet kasında oldukça modifiye bir şekil gösterir. Bu dokuda çok gelişmiş olan sarkoplazmik retikulum, T tübüleri gibi miyofibrilleri çevreler ve onların etrafında ağ yapan enine ve boyuna seyirli tüpçüklerden oluşur. Miyofibrilin uzun eksenine dik olarak onları enine saran tübüller A ve I bandı

birleşkesinde bulunan T tübüllerine komşudur; genişçe oldukları için terminal sisterna da denir. T tübüller ve iki yanında bulunan terminal sisternaların oluşturduğu üçlü yapıya iskelet kası triyadı adı verilir. Bir miyofibrilin çevresini saran terminal sisterna T tübüllerinde olduğu gibi komşu miyofibrilinkiyle bağlantılıdır. Boyuna tübüller ise her bantta enine tübüller arasında uzanır ve onlara açılır. Boyuna tübüller A bandında H bandı düzeyinde, I bandında daha az olmak üzere Z çizgisi hizasında birbirleri arasında bağlantılar yapar. T tübüleri sistemi hücre zarına gelen uyarının lifin dışından miyofibrillere hızlı taşınmasını sağlar ve böylece uyumlu bir cevap elde edilir. T tübüleri terminal sisternalarla sıkıca yan yana oldukları için T tübüllerine gelen uyarı kolayca terminal sisternalara ve boyuna tübüllere geçer. Uyarının sarkoplazmik retikuluma geçmesi, kasılmayı sağlayan elemanların çalışmasını başlatacak olan kalsiyum iyonlarının sarkoplazmik retikulumdan salınmasına sebep olur [39].

Her kas bir veya daha fazla sinir sonlanması ile donanmıştır. Tek bir sinir lifinin sonlandığı kas lifi sayısı motor birim olarak adlandırılır. Motor birim aktivitenin tam kontrolünün gerektiği kaslarda küçük yani her kas lifinde ayrı bir sinir lifi sonlanacak şekilde, kaba aktivite gösteren kaslarda ise büyük, yani bir sinir lifinin birçok kas lifinde sonlanması şeklindedir. Büyük ekstremitelerde kaslarında bir sinir 1500-2000 kas lifinde sonlanır. Kas lifindeki motor sinir sonlanmalarına motor plak veya kas-sinir bağlantısı denmektedir. Bağlantı kas lifi üzerinde biraz kabarıklık gibi görülür. Sinir lifi sonlanmaya yaklaşırken önce miyelin kılıfını kaybeder, kas yüzeyinde Schwann hücreleri kılıfı da kaybolur. Kas hücresinde sinir sonlanmasının yerleştiği girintiye primer sinaps oluşu denir. Sinir uzantısında sinaps oluşuna girmeden ve girdikten sonra dallanmalar görülür. Dallanmaların uçları küresimsi küçük kabartılarla sonlanır. Terminal buton denen bu kabartılar primer sinaps oluşunda kendilerine uyan çukurcuklara yerleşmişlerdir. Sinaps oluklarında sarkolemma küçük katlantılar gösterir. Bu bölgede sarkolemma içinde veya çok yakınında AChE enzimi vardır. Kas lifi çevresindeki eksternal lamina sarkolemma ve aksolemma arasında da devam eder. Sinir sonlanması bölgesinde sarkoplazmada fazla sayıda çekirdek, bol mitokondri, ribozomlar ve granülsüz endoplazmik retikulum vardır. Terminal buton içinde de çok sayıda mitokondri ve ACh içeren veziküller (sinaps vezikülleri) bulunur (Şekil 2.5) [40].



Şekil 2.5. İskelet kası-sinir kavşağı ve ilgili yapılar [40].

İskelet kası, miyelinsiz sinirlerin kas lifini sarması şeklinde basit duyu sonlanmaları yanında, kas içcikleri (sinir-kas içcikleri) denen yüksek derecede organize duyu siniri sonlanmalarını fazla sayıda içerir. Kas içciği birkaç ince, değişikliğe uğramış çizgili kas lifi ve bunları saran uzunca oval kapsülden ibarettir. İçcik içindeki kas liflerine intrafüzal lifler denir. Bu liflerin orta kısımlarında çizgilenme kaybolur ve büyük olan tipte genişlemiş olan bu bölgede çekirdek kümesi bulunur. Daha fazla sayıda olan ince tip intrafüzal liflerde ise bu bölgede çekirdekler bir dizi oluşturur. Her intrafüzal lifin orta kısmında lifi spiraller şeklinde saran duyu siniri sonlanmaları vardır.

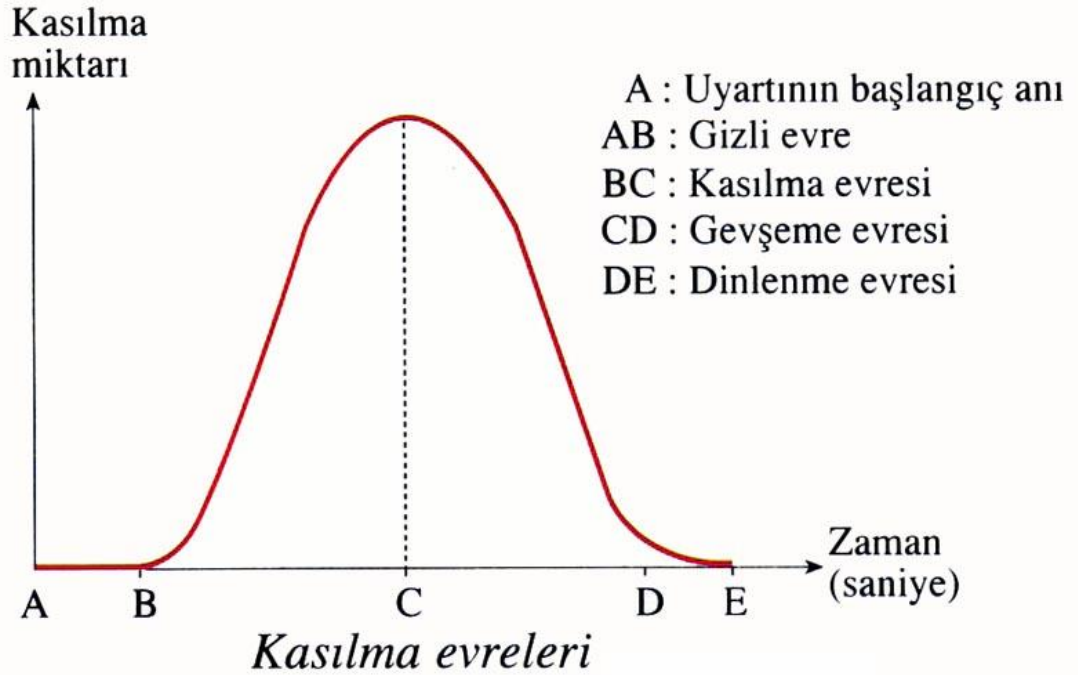
2.3.1. İskelet Kasının Elektriksel Özellikleri

İskelet kasının dinlenme membran potansiyeli -90 mV'dir. Aksiyon potansiyeli 2-4 ms sürer ve kas lifi boyunca 5 m/s hızla yayılır. İyonların dağılımı sinir hücresindekine benzerdir. Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon evresi hücre içine Na^+ girişi, repolarizasyon ise hücre içinden K^+ çıkışı ile karakterizedir.

2.3.2. Kas Sarsısı

Lifte sinir uyarısı ile gelişen tek bir aksiyon potansiyeli sonucu belli sürelerle kasılma ve bunu izleyen gevşemenin tümü kas sarsısı olarak adlandırılır [41]. Belirli bir şiddete sahip uyarı ile uyarılan bir kasın kasılıp gevşemesi 4 evrede gerçekleşir (Şekil 2.6).

- 1- Gizli evre: Kasın uyarılmasıyla kasılmanın başlaması arasında geçen süredir.
- 2- Kasılma evresi: Kasın kasılmaya başladığı an ile gevşemenin başladığı ana kadar geçen süredir.
- 3- Gevşeme evresi: Kasın gevşeyerek kasılmadan önceki halini alıncaya kadar geçen süredir.
- 4- Dinlenme evresi: Kasın bir kasılma gevşemeyi tamamladıktan sonra yeniden uyarılmasına kadar geçen süredir.



Şekil 2.6. İskelet kası kasılma evreleri [42].

2.3.3. Gastrokinemius Kası

Bacağın arka bölgesindeki kaslar yüzeysel ve derin olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Yüzeysel grupta bulunan kaslardan *Musculus gastrocnemius* ve *Musculus soleus* birlikte *Musculus triceps surae* olarak da adlandırılır. *M. gastrocnemius* ve *M. Soleus*'un tendonları birleşerek *Tendo calcaneus*'u (*Achillis*) oluştururlar. Bu tendon *Tuber calcanei*'ye yapışır. *M. gastrocnemius* femurun condylus medialis ile lateralisine ve calcaneus arka yüzünün orta kısmına tutunur. Gastrokinemius kası ayağa plantar fleksiyon, bacağı ise fleksiyon hareketlerini yaptırır.

2.4. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikal üretiminin uyarılması, lipit peroksidasyonun başlatılması, vücudun antioksidant kapasitesinin bozulması çoğu pestisitlerin toksik mekanizmasında yer almaktadır [43]. Pestisitler, reaktif oksijen türlerini üretebilme yeteneğine sahiptirler. Üretilen reaktif oksijen türlerinin miktarı ya da oranı doğal veya sentetik pestisitlerin aşırı kullanımı nedeniyle artış gösterir [44].

Serbest radikaller eşleşmemiş bir ya da daha fazla elektrona sahip, varlığını bağımsız sürdürebilme yeteneğindeki türler olarak tanımlanır. Serbest radikallere süperoksit (O_2^-) ve hidroksil ($\cdot OH$) gibi oksijen merkezli radikaller, tiyil (RS) gibi sülfür merkezli radikaller, triklorometil gibi karbon merkezli radikaller ve nitrik oksit örnek verilebilir. Radikaller çeşitli yollarla diğer moleküller ile reaksiyona girme yeteneğindedirler. Bu yüzden eğer iki radikal karşılaşırsa birleşir ve paylaşılmamış elektronlarını eşleşmiş elektron çifti yapısına dönüştürür [45].

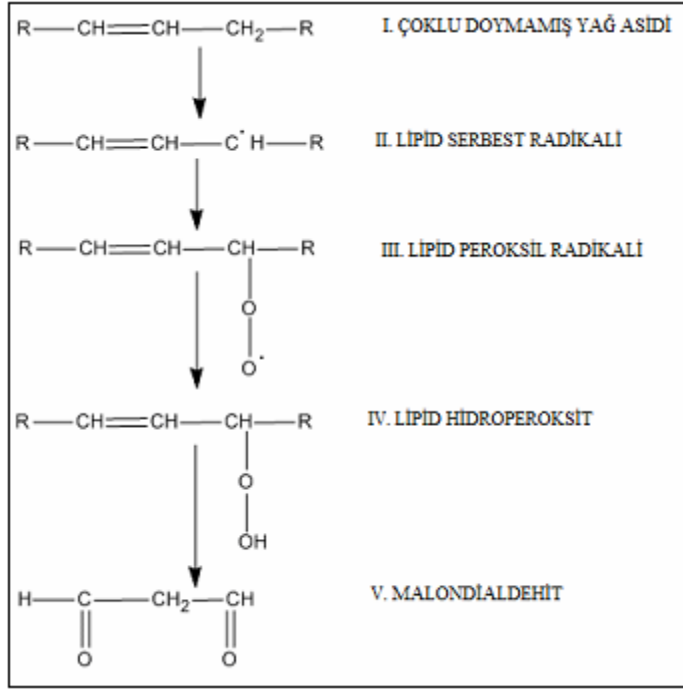
2.4.1. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Serbest radikaller, antioksidan savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğlarında organizmada çeşitli hasarlar meydana getirir. Organizmadaki biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenir, fakat en çok etkilenenler lipidlerdir. Lipid membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir.

Bu reaksiyon sonucu peroksidasyon ürünleri oluşur. Poliansatüre yağ asitlerinin (Poly Unsaturated Fatty Acid-PUFA) oksidatif olarak yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve organizma için oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde devam eder ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı tamir edilemez [46].

Lipid peroksidasyonu, organizma içinde oluşan serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali özelliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Moleküller içindeki çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları oluşur. Daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membranda bulunan diğer PUFA'ları etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açar. Bu sırada kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşür. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipid peroksidasyonu toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır veya otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder [46, 47] (Şekil 2.6.).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece, birçok hastalığa ve doku hasarına yol açmaktadır. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olmasından dolayı, reaksiyonların büyük bir kısmı membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi ciddi bir biçimde etkilenmektedir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklayabilmektedir [46].



Şekil 2.6. Poliansatüre yağ asitinden MDA'nın oluşumu [47].

2.5. ANTIÖKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ

Antioksidan; oksidatif stresin şiddetini daha az aktif radikal oluşumunu sağlayarak veya serbest radikal zincir reaksiyonunun proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve DNA üzerine hasarını azaltmak suretiyle bastırmaya yardımcı olan maddedir [48]. Hücreler, metabolik süreçlerin sonucunda devamlı olarak serbest radikal ve reaktif oksijen türlerini (ROS) üretirler [49].

Fizyolojik koşullarda, hücreler oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur.

2.5.1. Katalaz (CAT)

CAT (EC 1.11.1.6) dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Bütün hücrelerde özellikle peroksizomlarda bulunur. Peroksizomlar toksik maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanan ve sonuçta hidrojen peroksit (H_2O_2) üreten hücre yapılarıdır. Katalaz, H_2O_2 'yi su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürür.

Katalazın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid peroksitlerine karşı etki etmez [46].

Katalaz enziminin reaksiyon hızı oldukça yüksektir. CAT canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında bulunur.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN ALETLER

Analitik terazi (Sartorius)

Biopac MP100 kayıt sistemi

Dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Almanya)

Distile su cihazı (Millipore)

Etüv

Homojenizatör

İzometrik kuvvet transduseri (MAY, FDT-10)

Manyetik karıştırıcı (Biosan, MSH-300)

Otomatik pipet

pH metre (Sartorius)

Santrifüj

Transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM-1011, JEOL Corp., Tokyo, Japonya)

Ultramikrotom (Leica UCT125, Leica GmbH, Almanya)

UV spektrofotometre

Vorteks

3.2. DENEY HAYVANLARININ SAĞLANMASI

Deneyleerde Mersin Müftü Deresi'nden yakalanan ve ağırlıkları 50-60 g arasında değişen 48 adet *Rana ridibunda* türünden kurbağa kullanıldı. Kurbağalar, içerisinde dere suyu bulunan bir akvaryuma yerleştirildi ve bir hafta boyunca adaptasyon sağlamaları amacıyla laboratuvarında bekletildi. Akvaryumdaki su, gün aşırı değiştirildi ve sıcaklığı 25-27⁰C' de tutuldu.

3.2.1. Etik Kurul İzni

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları için Mersin Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 27.03.2014 tarih ve 2014/9 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.3. KİMYASALLARIN HAZIRLANMASI

Deneylerde 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} ve 1×10^{-6} M derişimlerde thiacloprid, 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine, 1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine karışımları uygulandı. Solüsyonlar soğukkanlı canlıların dokularının devamlılığını sürdürmesi için gerekli olan Ringer çözeltisi içinde hazırlandı.

3.3.1. Ringer Çözeltisinin Hazırlanması

500 mL Ringer çözeltisi için;

3.25 g NaCl

0.07 g KCl

0.06 g CaCl₂·2H₂O

0.05 g NaHCO₃ analitik terazide tartıldı ve üzeri distile suyla 500 mL'ye tamamlandı. pH 7.2 olarak ayarlandı.

3.3.2. Thiacloprid Çözeltisinin Hazırlanması

Yoğunluğu (d) 240 g/L, molekül ağırlığı (M_A) 252.72 g/mol, derişimi %23.1 olan sıvı formülasyondaki insektisit stok çözelti molaritesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:

$$M = \frac{\% \times d \times 1000}{MA} = \frac{\left(\frac{23.1}{100}\right) \times 0.24 \times 1000}{252.72} = 0.22 \text{ (stok çözeltinin molaritesi)}$$

10 mL hacimde 10^{-3} M derişimde thiacloprid çözeltisi hazırlamak için;

$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülü kullanıldı.

$0.22 \times V_1 = 10 \times 10^{-3}$ işleminin sonucunda $V_1 = 0.045$ mL olarak hesaplandı.

10^{-3} M çözelti hazırlamak için insektisit çözeltisinden mikropipet ile 0.045 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-4} M çözelti hazırlamak için 10^{-3} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-5} M çözelti hazırlamak için 10^{-4} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-6} M çözelti hazırlamak için 10^{-5} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.3.3. D-Tubocurarine Çözeltisinin Hazırlanması

Molekül ağırlığı 771.72 g/mol olan d-tubocurarine'den 10 mL hacimde 10^{-2} M derişimde çözelti hazırlamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$M = \frac{n}{v} = 10^{-2} = \frac{\left(\frac{m}{771.72}\right)}{10 \times 0.001} = m = 0.077 \text{ g}$$

10 mL 10^{-2} M d-tubocurarine hazırlamak için; 0.077 g d-tubocurarine analitik terazide tartıldı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-3} M çözelti hazırlamak için 10^{-2} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-4} M çözelti hazırlamak için 10^{-3} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

10^{-5} M çözelti hazırlamak için 10^{-4} M çözeltiden 1 mL alındı ve Ringer çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.4. DENEY GRUPLARININ HAZIRLANMASI

1. grup 1×10^{-3} M thiacloprid, 2. grup 1×10^{-4} M thiacloprid, 3. grup 1×10^{-5} M thiacloprid, 4. grup 1×10^{-6} M thiacloprid, 5. grup 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine, 6. grup 1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine uygulanmak

üzere deneyler 6 grup halinde yürütüldü. Deney hayvanları her dozdaki deney için sekizerli gruplara ($N=8$) ayrıldı.

3.5. ELEKTROFİZYOLOJİK KAYITLAR

Kurbağalar kulak arkasından kesilerek spinal hale getirildi ve olası refleksleri önlemek amacıyla iğne ile *Medulla spinalis* tahrip edildi. Daha sonra kurbağaların sağ arka bacağındaki gastrokinemius kası izole edildi. İzole kaslar fizyolojik ortamın sağlanması için kullanılan Ringer çözeltisine alındı. Thiacloprid ve antagonisti d-tubocurarine'nin zamana bağlı etkilerini belirleyebilmek için aynı kasta 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda ölçüm alındı. Sıfırıncı dakika kayıtları, kaslar Ringer çözeltisi içerisindeyken alınan kayıtlar olup, her bir kas preparatının kontrol değerine karşılık gelmektedir. Kontrol ölçümü yapıldıktan sonra 1. gruptaki kaslar 10^{-3} M thiacloprid, 2. gruptaki kaslar 10^{-4} M thiacloprid, 3. gruptaki kaslar 10^{-5} M thiacloprid, 4. gruptaki kaslar 10^{-6} M thiacloprid, 5. gruptaki kaslar 10^{-5} M thiacloprid ile 10^{-4} M d-tubocurarine ve 6. gruptaki kaslar 10^{-6} M thiacloprid ile 10^{-5} M d-tubocurarine içeren çözeltilere alındı. Aynı preparattan 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kasın mekanik aktivitesi kayıtları. Kayıt için Biopac MP100 Kayıt Sistemi kullanıldı. Kasın bir ucu tespit edilip diğer ucu izometrik kuvvet transduserine (MAY, FDT-10) bağlandı. Kasa 2 g ön gerim uygulandı. Daha sonra Biopac stimülatöre bağlı gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrotlar kullanılarak 0.5 ms süreli ve her kas için ayrı ayrı belirlenen şiddetlerde supramaksimal pulsla kas uyarıldı. Kas aktivitesi genel amaçlı diferansiyel amplifikatörle yükseltilerek ve 16 bitlik A/D çevirici kullanılarak daha sonra analiz edilmek üzere bilgisayara aktarıldı. Elde edilen kasılma eğrileri BIOPAC Acknowledge 100 W5.7 analiz programı ile analiz edilerek kasılma kuvveti (g), kasılma süresi (ms) ve gevşeme süresi (ms) ölçüldü.

3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

120 dakika boyunca farklı derişimlerde thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine karışımına maruz bırakılan her gruptaki 8 kas preparatından 5 tanesi, kas aktivitesinin kayıtlanmasından sonra histopatolojik olarak incelendi. Ayrıca hiçbir

kimyasala maruz bırakılmayan 3 kas preparatı kontrol grubu olarak incelendi. Elektron mikroskopik inceleme için alınan iskelet kası dokusu 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 6 saat %2.5'lik gluteraldehit çözeltisinde bekletildi. Fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra elektron mikroskopik incelemeler için doku takip işlemi Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) cihazı kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı:

1. %1'lik osmium tetraoksit 1 saat
2. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi 15 dk
3. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi 15 dk
4. Etil alkol (%50) 15 dk
5. Etil alkol (%60) 15 dk
6. Etil alkol (%70) 15 dk
7. Etil alkol (%80) 15 dk
8. Etil alkol (%90) 15 dk
9. Etil alkol (%100) 15 dk
10. Etil alkol (%100) 15 dk
11. Etil alkol (%100) 15 dk
12. Etil alkol (%100) 15 dk
13. Propilen oksit 15 dk
14. Propilen oksit 15 dk
15. Propilen oksit+rezin (2+1)
16. Propilen oksit+rezin (1+1)
17. Propilen oksit+rezin (1+2)
18. Saf rezin 12 saat

19. Rezin içine gömme işlemi

20. Etüvde (60°C) polimerizasyon 24 saat

İlk 11 basamak +4°C'de daha sonrakiler oda ısısında gerçekleştirildi.

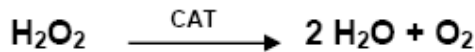
Epoksi resin içine gömülen dokulardan Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile önce 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Bu kesitler incelenerek uygun alanlar saptandı. Daha sonra 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandıktan sonra JEOL JEM-1011 transmisyon elektron mikroskobuna (JEOL Ltd. Tokyo-JAPONYA) eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

3.7. BİYOKİMYASAL İNCELEME

120 dakika boyunca farklı derişimlerde thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine karışımına maruz bırakılan her gruptaki 8 kas preparatından 5 tanesi, kas aktivitesinin kayıtlanmasından sonra ependorf tüplerine alınarak -20°C'ye ayarlanan bir dondurucuda saklandı. Ayrıca hiçbir kimyasala maruz bırakılmayan 5 kas preparatı kontrol grubu olarak incelenmek üzere izole edildikten hemen sonra ependorf tüplerine alınarak -20°C'de bekletildi. Daha sonra biyokimyasal incelemeler yapıldı.

3.7.1. CAT Enzim Aktivitesi Tayini

CAT aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı [50]. Yöntemin esası, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkımının 240 nm'de izlenmesidir.



Kullanılan Maddeler: Potasyum Dihidrojen Fosfat, Disodyum Hidrojen Fosfat, Hidrojen Peroksit

3.7.1.1. Kullanılan reaktifler

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0.681 g KH_2PO_4 bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2.77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ bidistile suda çözülerek 155 mL'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7.0): A/B oranı 1/1.55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksit Çözeltisi (30 mM): 34 μL %30'luk H_2O_2 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

3.7.1.2. Deneyin yapılışı

Kuvarz spektrofotometre küvetlerine 10 μL 10000x g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 μL fosfat tamponu ilave edildi. Örnek küvetine 1 mL 30 mM H_2O_2 , kör küvetine de 1 mL fosfat tamponu ilave edildi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 1 dakika boyunca 240 nm'de izlendi.

3.7.1.3. CAT aktivitesinin hesaplanması

Hidrojen peroksidin enzimatik yıkılması mevcut H_2O_2 derişimi ile orantılı bir hızda, birinci derece reaksiyonla yürütölmektedir. Bu esasa dayanarak ve aşağıdaki formöl kullanılarak katalazın spesifik aktivitesi ünite cinsinden hesaplanmıştır.

$$1 \text{ U/mL} = \Delta_{\text{OD}}/\text{dk} \times 7320 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

3.7.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddelerinin (TBARS) Ölçümü

Lipid peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe kırmızı renkli çözeltinin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır [51].

Kullanılan Maddeler: Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Asetik Asit, Tiyobarbitürik asit (TBA), Tetrametoksipropan, 1-Butanol, Piridin.

3.7.2.1. Kullanılan reaktifler

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0.92 g tetrametoksipropan 1 mL'de çözülür.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltilir.

SDS çözeltisi: 8.1 g SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve çözülür.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve pH 3.5'e ayarlanır.

TBA çözeltisi: 0.8 g TBA tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlanır ve ısıtılarak çözülür.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırılır.

3.7.2.2. Deneyin yapılışı

Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan çözelti miktarları

	Kör	Standart	Örnek
Standart (1/10 dilüe) (µL)		50	
Örnek (µL)			50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
Distile su (µL)	400	350	350

Tüpler 95°C'de 30 dakika süre ile inkübe edilir. Musluk suyunda soğutulur. 500 µL distile su eklenir. 2.5 mL *n*-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak karışımlar beyazlaşmaya kadar vortekslenir. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

3.7.2.3. TBARS düzeyinin hesaplanması

Aşağıdaki formül kullanılarak homojenattaki TBARS düzeyi hesaplanır.

$$\text{Derişim (nmol/g)} = \frac{\text{Örnek absorbanısı} \times 415.89}{\text{Lowry değeri}}$$

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 21 ve Statistica 8.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Normal dağılım gösteren verilerde varyansların homojenliğinin kontrolü Levene testi ile yapıldı. Çalışmada 2'den fazla bağımsız grup olduğundan normal dağılım gösteren verilerde gruplar arası farklılık olup olmadığı Varyans Analizi (One Way ANOVA) ile test edildi. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasını takiben, varyansları

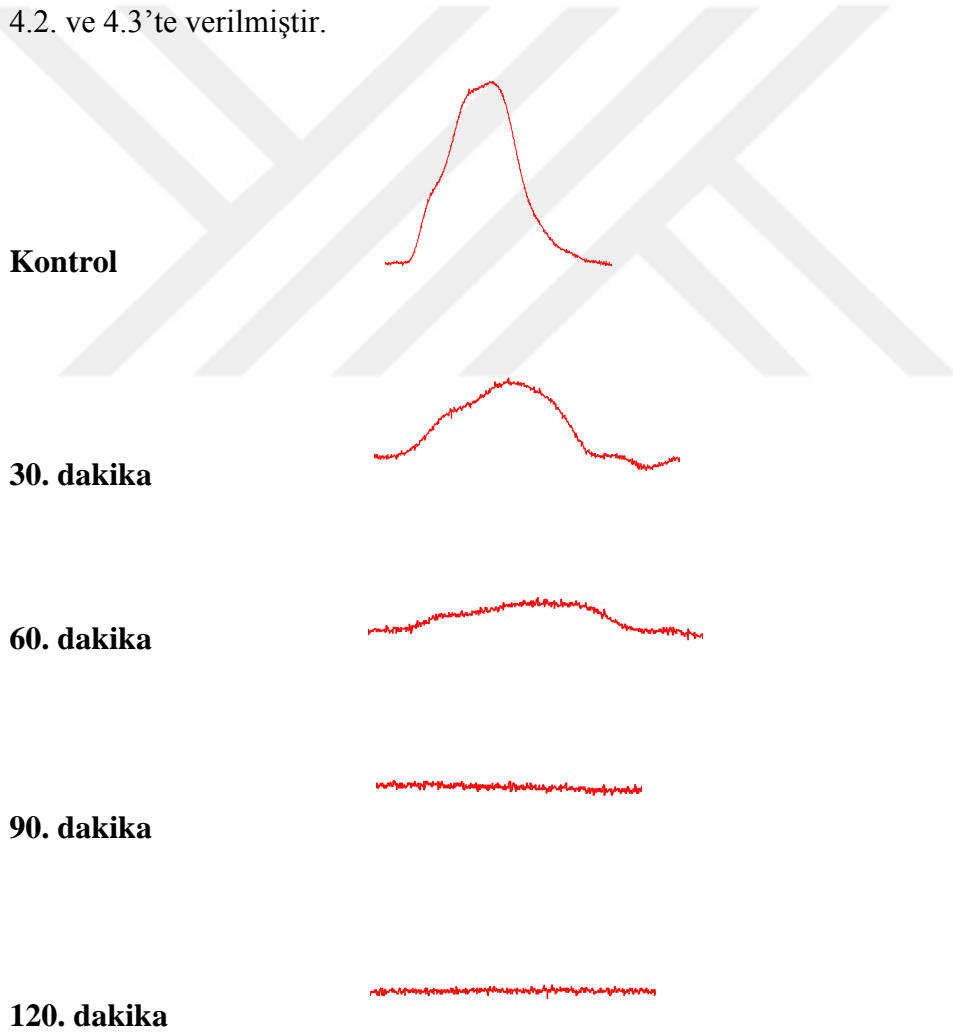
homojen ise bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna Bonferonni *Post Hoc* testi ile fakat varyansları homojen değilse Dunnett's T3 *Post Hoc* testi ile karar verildi. Normal dağılım göstermeyen verilerde ise gruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi kullanılarak saptandı. Kruskal Wallis testi sonucu anlamlı çıkan verilerde, farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna Dunn testi ile karar verildi. Her bir gruba ait doz ve zamana bağlı farklılıklar tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi ile (Repeated measures ANOVA) incelendi. Tanımlayıcı istatistik olarak normal dağılım gösteren verilerin analiz sonuçları ortalama ve standart sapma ($ort \pm ss$) değerleri ile, normal dağılım göstermeyen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ise medyan ve çeyreklikler (Q1-Q3) ile verildi. İstatistiksel anlamlı farklılık olarak $P < 0.05$ alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

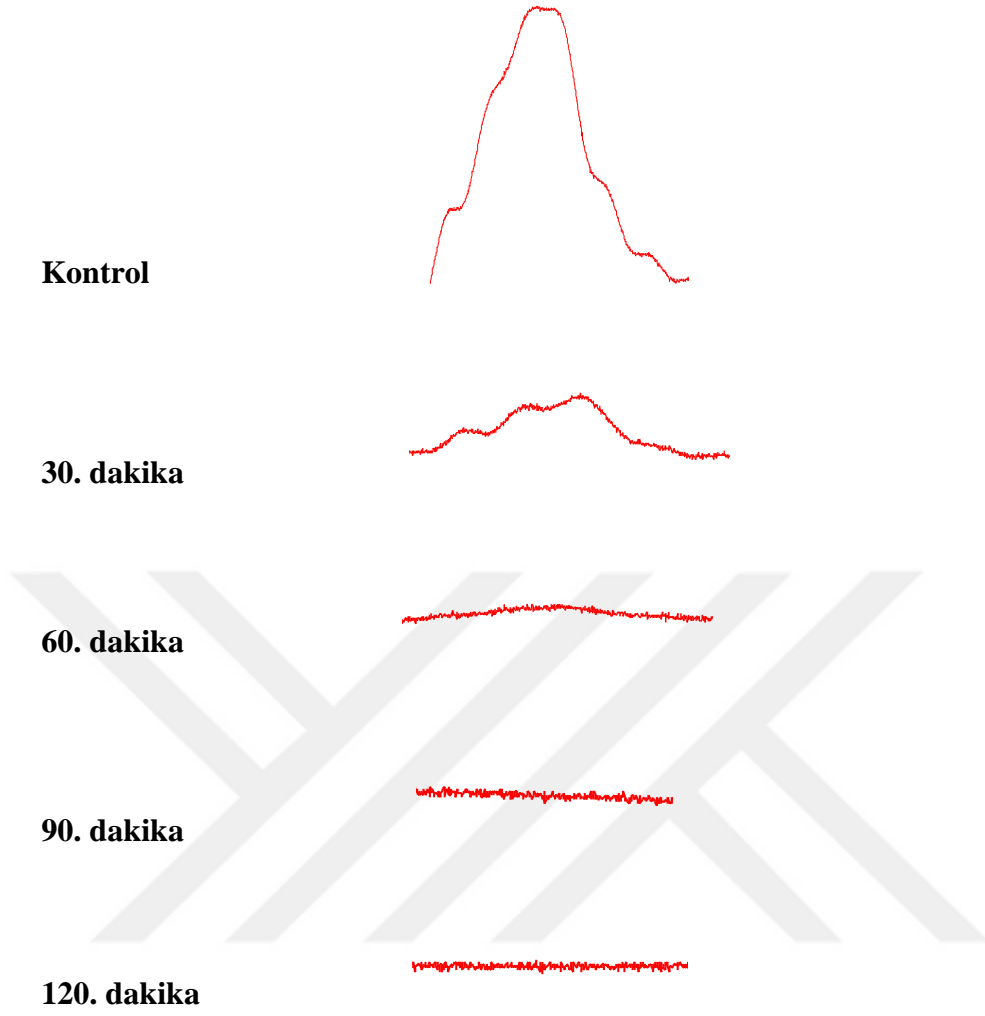
4.1. BULGULAR

4.1.1. Elektrofizyolojik Bulgular

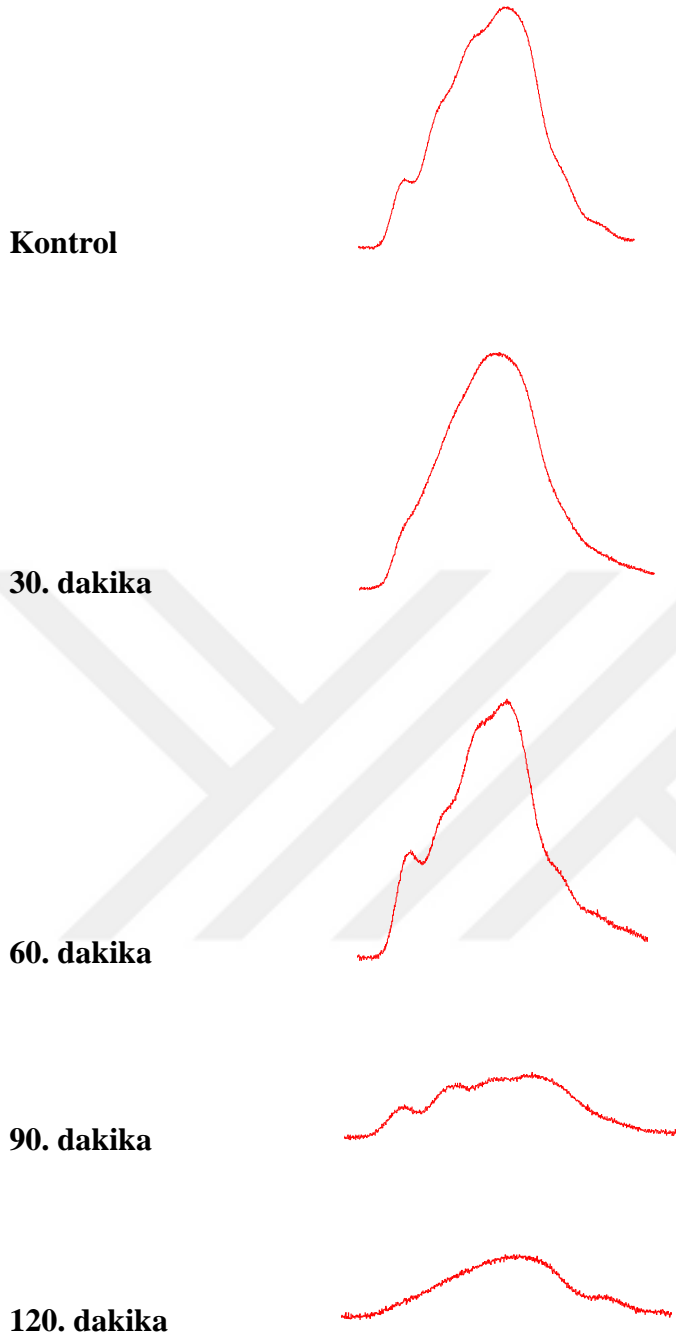
Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 her gruptan elde edilen kasılma eğrilerini göstermektedir. Bu eğrilerin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçlar ise Çizelge 4.1, 4.2. ve 4.3'te verilmiştir.



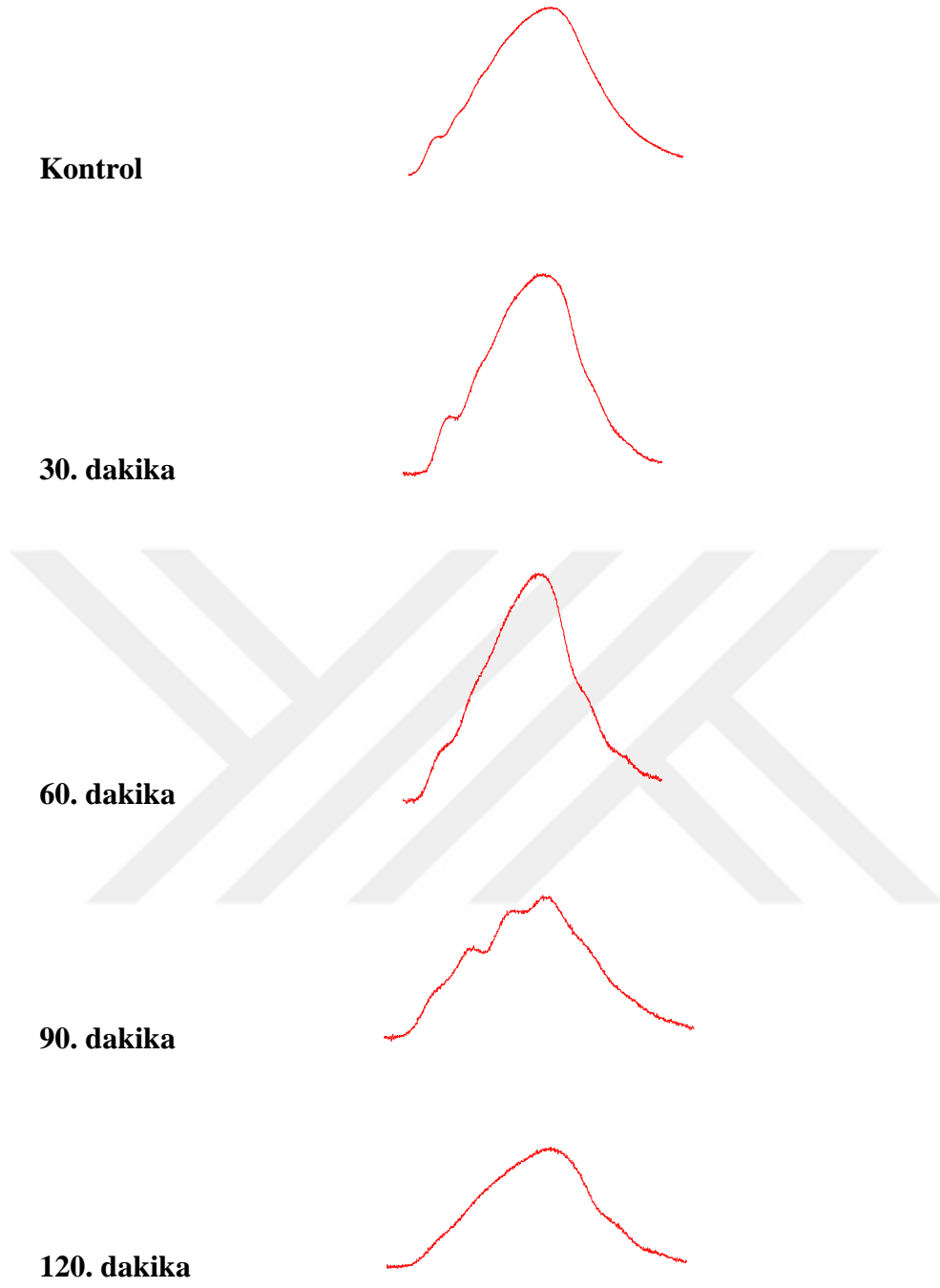
Şekil 4.1. 10^{-3} M thiaclopridin *Rana ridibunda* gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi



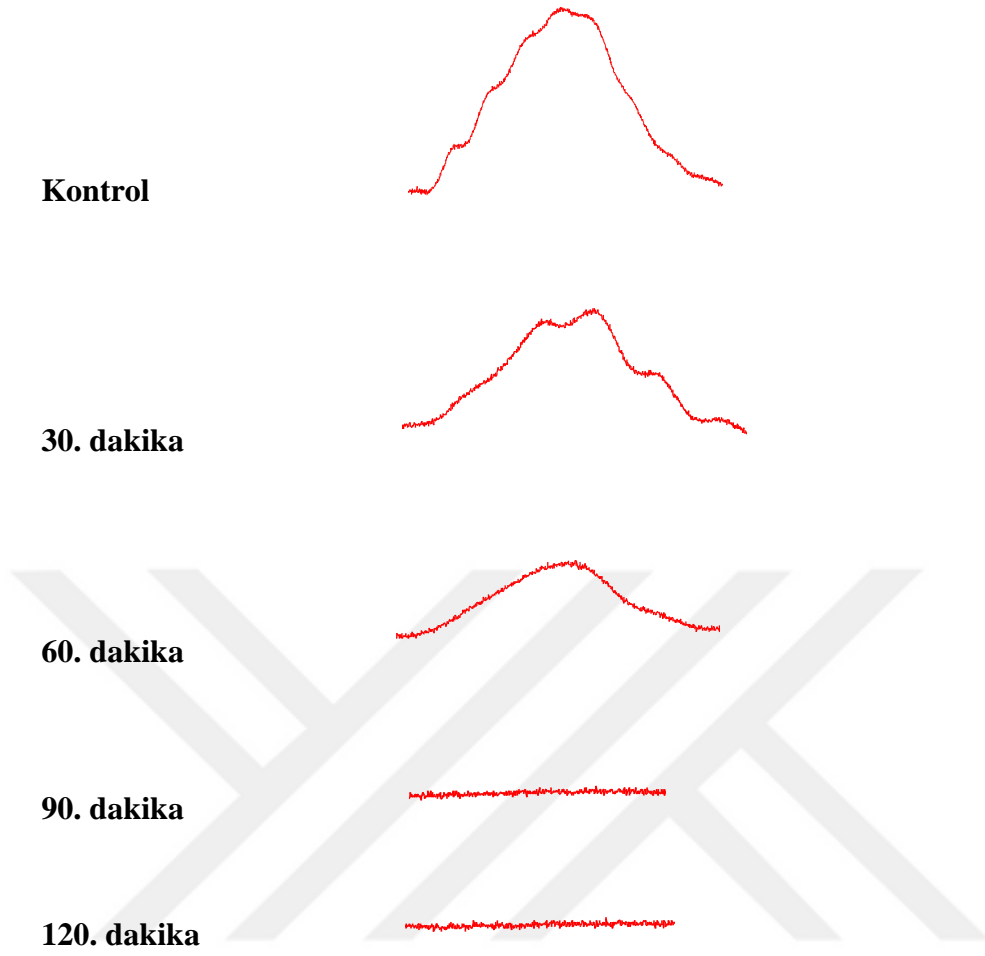
Şekil 4.2. 10^{-4} M thiaclopridin *Rana ridibunda* gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi



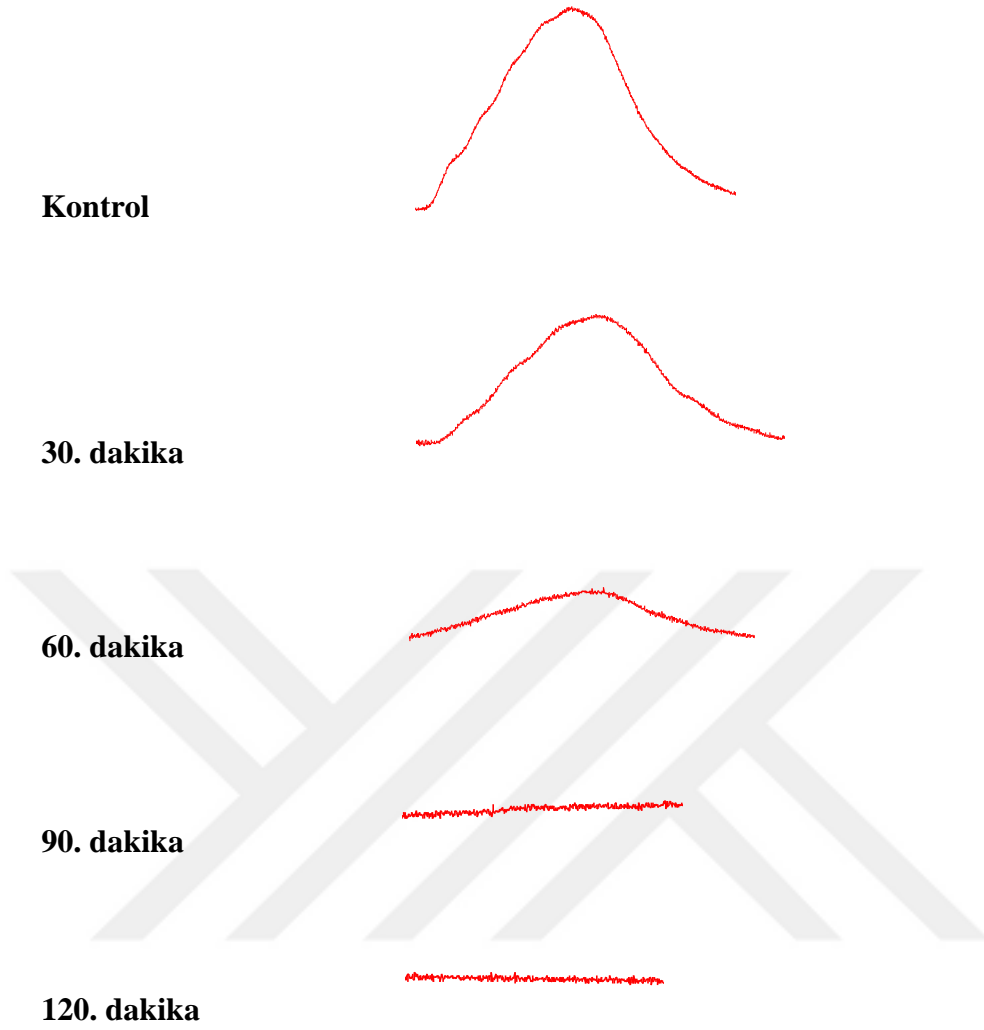
Şekil 4.3. 10^{-5} M thiaclopridin *Rana ridibunda* gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.4. 10^{-6} M thiaclopridin *Rana ridibunda* gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.5. 10^{-5} M thiacloprid ile 10^{-4} M d-tubocurarine karışımının *Rana ridibunda* gastrokinemius kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.6. 10^{-6} M thiacloprid ile 10^{-5} M d-tubocurarine karışımının *Rana ridibunda* iskelet kası mekanik aktivitesi üzerine etkisi

4.1.1.1. Thiacloprid ve Thiacloprid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Kasılma Kuvveti Üzerine Etkisi

Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonlarının kurbağa gastrokinemius kası kasılma kuvveti üzerine uygulama süresi ve doza bağlı etkileri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

1×10^{-3} M thiacloprid *Rana ridibunda* gastrokinemius kası kasılma kuvvetini uygulama süresine bağlı olarak, kontrol değerine (0. dakika) göre 60, 90 ve 120.

dakikalarda anlamlı şekilde azaltmıştır ($P<0.05$). Bu azalma 60. dakikada %95, 90. ve 120. dakikada %97 civarındadır. 1×10^{-4} M thiacloprid grubunda kasılma kuvveti kontrol değeri ve 30. dakika ile karşılaştırıldığında 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). 60. dakikada kasılma kuvveti %86, 90. dakikada %94 ve 120. dakikada %97 oranında azalmıştır. 1×10^{-5} M thiacloprid grubunda kasılma kuvveti kontrol değerine göre 120. dakikada anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). 120. dakikada kasılma kuvvetinin %65 oranında azaldığı görülmüştür. 1×10^{-6} M thiacloprid, kontrol değerine göre kasılma kuvvetini 120. dakikada anlamlı şekilde düşürmüştür ($P<0.05$). Kasılma kuvvetindeki bu azalma %67 civarındadır.

1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma kuvvetinin kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaldığı görülmüştür ($P<0.05$). Ayrıca kasılma kuvveti 60, 90 ve 120. dakikalarda 30. dakikaya göre anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). 120. dakikada gözlenen kasılma kuvveti değerinin 60. dakikaya göre anlamlı şekilde düştüğü de görülmüştür ($P<0.05$). Bu gruptaki kasılma kuvveti 30. dakikada %57, 60. dakikada %75, 90. dakikada %80 ve 120. dakikada %92 oranında azalmıştır.

1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kontrol değerine göre kasılma kuvvetinin 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($P<0.05$). Ayrıca 120. dakikada kasılma kuvvetinde meydana gelen azalma 60 ve 90. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Bu grupta gözlenen kasılma kuvvetindeki azalmalar 30. dakikada %55, 60. dakikada %63, 90. dakikada %80 ve 120. dakikada %94 oranındadır.

Rana ridibunda gastrokinemius kası kasılma kuvveti doza bağlı olarak, 1×10^{-3} M thiacloprid grubunda, 1×10^{-5} M thiacloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.001$). Ayrıca kasılma kuvveti 1×10^{-3} M thiacloprid grubunda, 1×10^{-6} M thiacloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde düşmüştür ($P<0.001$). 1×10^{-4} M thiacloprid, 1×10^{-5} M thiacloprid grubuna göre kasılma kuvvetini 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaltmıştır ($P<0.001$). 1×10^{-4} M thiacloprid, 1×10^{-6} M thiacloprid grubuna göre ise kasılma kuvvetini 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P<0.001$).

1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda kasılma kuvveti, 1×10^{-5} M thiacloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ($P < 0.001$). 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kasılma kuvvetini 1×10^{-6} M thiacloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde azaltmıştır ($P < 0.05$).

1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma kuvvetinin 1×10^{-5} M thiacloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($P < 0.001$). Ayrıca 1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine, 1×10^{-6} M thiacloprid grubuna göre kasılma kuvvetini 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda azaltmıştır ($P < 0.05$).

Çizelge 4.1. Thiacloprid ve thiacloprid +d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kası kasılma kuvveti üzerine uygulama süresi ve doza bağlı etkileri. Thia: thiacloprid; Tubo: d-tubocurarine; M: molar; N: denek sayısı. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Değişken	Zaman (dk)	Thia, 10 ⁻³ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁴ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁵ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁶ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁵ M + Tubo, 10 ⁻⁴ M (N=8)	Thia, 10 ⁻⁶ M + Tubo, 10 ⁻⁵ M (N=8)	P
Kasılma kuvveti (g)	Kontrol	19.11 ± 7.67	18.11 ± 8.62	19.14 ± 6.78	16.29 ± 6.13	13.37 ± 4.24	12.78 ± 2.69	0.184
	30	5.25 ± 3.81 ^{ab}	7.06 ± 4.41 ^a	19.40 ± 7.23	13.03 ± 3.20	5.72 ± 2.75 ^{ac*}	5.68 ± 2.51 ^{ac*}	<0.001
	60	0.85 ± 0.41 ^{ab*}	2.41 ± 2.71 ^{ab*†}	12.17 ± 5.15	10.15 ± 3.42	3.24 ± 2.14 ^{ac*†}	4.72 ± 1.85 ^{ac*}	<0.001
	90	0.42 ± 0.11 ^{ab*}	0.98 ± 0.89 ^{ab*†}	12.30 ± 4.20	8.40 ± 3.53	2.70 ± 3.35 ^{ac*†}	2.57 ± 1.61 ^{ac*}	<0.001
	120	0.48 ± 0.13 ^{ab*}	0.52 ± 0.34 ^{ab*†}	6.66 ± 3.45 ^{*†}	5.36 ± 3.19 ^{*†‡}	1.06 ± 1.47 ^{ac*†‡}	0.74 ± 0.47 ^{ac*†‡}	<0.001
	P	<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001	<0.001	

a: 10⁻⁵M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.001).
b: 10⁻⁶M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.001).
c: 10⁻⁶M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

*: Kontrol değeri ile karşılaştırıldığında (P<0.05).
†: 30. dakika ile karşılaştırıldığında (P<0.05).
‡: 60. dakika ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

4.1.1.2. Thiaplopid ve Thiaplopid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Kasılma Süresi Üzerine Etkisi

Thiaplopid ve thiaplopid ile d-tubocurarine kombinasyonlarının kurbağa gastrokinemius kası kasılma süresi üzerine doza ve zamana bağlı etkileri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

$1 \times 10^{-3}M$ thiaplopid, kurbağa gastrokinemius kası kasılma süresini zamana bağlı olarak, kontrol değerine göre 60, 90 ve 120. dakikalarda azaltmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca 60, 90 ve 120. dakikalarda kasılma süresindeki azalmalar 30. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). $1 \times 10^{-3}M$ thiaplopid kasılma süresini 60. dakikada %56, 90. dakikada %71, 120. dakikada ise %73 oranında azaltmıştır. $1 \times 10^{-4}M$ thiaplopid kasılma süresini kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca 60, 90 ve 120. dakikalarda kasılma süresindeki azalmalar 30. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). $1 \times 10^{-4}M$ thiaplopid kasılma süresini 30. dakikada %20, 60. dakikada %51, 90. dakikada %66, 120. dakikada ise %75 oranında düşürmüştür. $1 \times 10^{-5}M$ thiaplopid grubunda kasılma süresi kontrol değerine göre 60 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ($P < 0.05$). $1 \times 10^{-5}M$ thiaplopid kasılma süresini 60. dakikada %19 oranında azaltırken, 120. dakikada %20 oranında düşürmüştür. $1 \times 10^{-6}M$ thiaplopid grubunda kasılma süresi kontrol değerine göre 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde azalmıştır ($P < 0.05$). $1 \times 10^{-6}M$ thiaplopid kasılma süresini 60. ve 90. dakikada %20, 120. dakikada %19 oranında azaltmıştır.

$1 \times 10^{-5}M$ thiaplopid ile $1 \times 10^{-4}M$ d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma süresinin kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda azaldığı görülmüştür ($P < 0.05$). $1 \times 10^{-5}M$ thiaplopid ile $1 \times 10^{-4}M$ d-tubocurarine kasılma süresini 30. dakikada %23, 60. dakikada %44, 90. dakikada %55, 120. dakikada ise %59 oranında düşürmüştür.

$1 \times 10^{-6}M$ thiaplopid ile $1 \times 10^{-5}M$ d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kontrol değerine göre kasılma süresinin 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($P < 0.05$). Ayrıca 90 ve 120. dakikalarda

kasılma süresindeki azalmalar 30. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). 1×10^{-6} M thiocloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine kasılma süresini 60. dakikada %38, 90. dakikada %52, 120. dakikada ise %53 oranında azaltmıştır.

Rana ridibunda gastrokinemius kası kasılma süresi doza bağlı olarak, 1×10^{-3} M thiocloprid grubunda, 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre 30. dakikada ($P<0.05$), 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.001$). Ayrıca kasılma süresi 1×10^{-3} M thiocloprid grubunda, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde düşmüştür ($P<0.001$). 1×10^{-4} M thiocloprid, 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre kasılma süresini 60. dakikada ($P<0.05$), 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaltmıştır ($P<0.001$). 1×10^{-4} M thiocloprid, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre ise kasılma süresini 60. dakikada ($P<0.05$), 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P<0.001$).

1×10^{-5} M thiocloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda kasılma süresi, 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre 120. dakikada anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). 1×10^{-5} M thiocloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kasılma süresini, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde azaltmıştır ($P<0.05$).

1×10^{-6} M thiocloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma süresinin 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($P<0.05$). Ayrıca 1×10^{-6} M thiocloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre kasılma süresini 60, 90 ve 120. dakikalarda azaltmıştır ($P<0.05$).

Çizelge 4.2. Thiacloprid ve thiacloprid + d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kası kasılma süresi üzerine zamana ve doza bağlı etkileri. Thia: thiacloprid; Tubo: d-tubocurarine. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Değişken	Zaman (dk)	Thia, 10 ⁻³ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁴ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁵ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁶ M, (N=8)	Thia, 10 ⁻⁵ M + Tubo, 10 ⁻⁴ M (N=8)	Thia, 10 ⁻⁶ M + Tubo, 10 ⁻⁵ M (N=8)	P
Kasılma süresi (ms)	Kontrol	34.79 ± 5.36	38.69 ± 5.44	38.41 ± 5.60	41.85 ± 3.63	41.45 ± 5.51	36.07 ± 6.82	0.082
	30	24.83 ± 5.84 ^{ac}	30.97 ± 5.05 [*]	32.54 ± 5.18	36.61 ± 3.70	31.77 ± 5.96 [*]	30.10 ± 2.10	0.001
	60	13.58 ± 3.39 ^{bc*†}	19.03 ± 9.76 ^{ad*†}	31.04 ± 3.45 [*]	33.57 ± 3.51 [*]	23.27 ± 10.47 [*]	22.24 ± 8.65 ^{d*}	<0.001
	90	9.98 ± 3.45 ^{bc*†}	13.13 ± 8.47 ^{bc*†}	29.24 ± 5.80	33.57 ± 2.61 [*]	18.71 ± 12.05 ^{d*}	17.38 ± 4.29 ^{ad*†}	<0.001
	120	9.40 ± 2.73 ^{bc*†}	9.50 ± 3.51 ^{bc*†}	30.55 ± 5.04 [*]	33.99 ± 6.49 [*]	17.08 ± 10.70 ^{ad*}	16.86 ± 4.55 ^{ad*†}	<0.001
	P	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	

a: 10⁻⁵M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.05).
b: 10⁻⁵M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.001).
c: 10⁻⁶M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.001).
d: 10⁻⁶M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

*: Kontrol değeri ile karşılaştırıldığında (P<0.05).
†: 30. dakika ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

4.1.1.3. Thiacloprid ve Thiacloprid ile D-Tubocurarine Kombinasyonlarının Kurbağa Gastrokinemius Kası Gevşeme Süresi Üzerine Etkisi

Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonlarının kurbağa gastrokinemius kası gevşeme süresi üzerine doza ve zamana bağlı etkileri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

1×10^{-3} M thiacloprid, kurbağa gastrokinemius kası gevşeme süresini zamana bağlı olarak, kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca 120. dakikada gevşeme süresindeki azalma 30. dakikaya göre anlamlı bulunurken ($P < 0.05$), 90 ve 120. dakikalarda gevşeme süresinde görülen azalmalar 60. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). 1×10^{-3} M thiacloprid gevşeme süresini 30. dakikada %40, 60. dakikada %62, 90. ve 120. dakikalarda ise %71 oranında azaltmıştır. 1×10^{-4} M thiacloprid gevşeme süresini kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P < 0.05$). Ayrıca 60, 90 ve 120. dakikalarda gevşeme süresindeki azalma 30. dakikaya göre anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). 1×10^{-4} M thiacloprid gevşeme süresini 30. dakikada %19, 60. dakikada %56, 90. dakikada %69, 120. dakikada ise %70 oranında azaltmıştır. 1×10^{-5} M thiacloprid gevşeme süresini kontrol değerine göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P < 0.05$). 1×10^{-5} M thiacloprid gevşeme süresinde 30. dakikada %29, 60. dakikada %39, 90. dakikada %33, 120. dakikada ise %52 oranında düşüş meydana getirmiştir. 1×10^{-6} M thiacloprid gevşeme süresini kontrol değerine göre 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ($P < 0.05$). 1×10^{-6} M thiacloprid gevşeme süresini 60. dakikada %47, 90. dakikada %40, 120. dakikada ise %51 oranında azaltmıştır.

1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, gevşeme süresinin kontrol değerine göre 60, 90 ve 120. dakikalarda azaldığı görülmüştür ($P < 0.05$). 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine kasılma süresini 60. dakikada %49, 90. dakikada %66, 120. dakikada ise %70 oranında düşürmüştür.

1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kontrol değerine göre gevşeme süresinin 30, 60 ve 120. dakikalarda

anlamli bir Şekilde azaldığı görülmüştür ($P<0.05$). Ayrıca 60 ve 120. dakikalarda gevşeme süresinde görülen azalmalar 30. dakikaya göre anlamli bulunmuştur ($P<0.05$). 1×10^{-6} M thiocloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine gevşeme süresini 30. dakikada %34, 60. dakikada %49, 120. dakikada %67 oranında azaltmıştır.

Rana ridibunda gastrokinemius kası gevşeme süresi doza bağlı olarak, 1×10^{-3} M thiocloprid grubunda, 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamli olarak azalmıştır ($P<0.05$). Gevşeme süresi 1×10^{-3} M thiocloprid grubunda, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamli Şekilde düşmüştür ($P<0.05$). 1×10^{-4} M thiocloprid, 1×10^{-5} M thiocloprid grubuna göre gevşeme süresini 90 ve 120. dakikalarda anlamli biçimde azaltmıştır ($P<0.05$). 1×10^{-4} M thiocloprid, 1×10^{-6} M thiocloprid grubuna göre ise gevşeme süresini 90 ve 120. dakikalarda anlamli olarak azaltmıştır ($P<0.05$).

1×10^{-5} M thiocloprid ile 1×10^{-4} M tubokurarin ve 1×10^{-6} M thiocloprid ile 1×10^{-5} M tubokurarin kombinasyonuyla yapılan deney grupları diğer gruplarla karşılaştırıldığında gevşeme sürelerinde istatistiksel olarak anlamli bir fark gözlenmemiŐtir.

Çizelge 4.3. Thiacloprid ve thiacloprid + d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kası gevşeme süresi üzerine zamana ve doza bağlı etkileri. Thia: thiacloprid; Tubo: d-tubocurarine. Veriler medyan ve çeyreklikler (%25-%75) ile verilmiştir.

Değişken	Zaman (dk)	Thia, 10 ⁻³ M, N=8			Thia, 10 ⁻⁴ M, N=8			Thia, 10 ⁻⁵ M, N=8			Thia, 10 ⁻⁶ M, N=8			Thia, 10 ⁻⁵ M + Tubo, 10 ⁻⁴ M, N=8			Thia, 10 ⁻⁶ M + Tubo, 10 ⁻⁵ M, N=8			P
		Medyan	% 25	% 75	Medyan	% 25	% 75	Medyan	% 25	% 75	Medyan	% 25	% 75	Medyan	% 25	% 75	Medyan	% 25	% 75	
Gevşeme süresi (ms)	0. dk	31.62	29.09	35.73	35.00	30.86	40.84	40.72	35.62	42.30	42.98	37.70	46.85	39.65	32.33	45.32	38.21	26.50	39.28	0,056
	30. dk	18.84*	12.95	25.78	28.32*	23.42	36.27	28.75*	25.11	31.97	33.60	20.74	38.18	23.29	18.10	38.18	25.21*	18.06	28.38	0,0619
	60. dk	11.96 ^{ab*}	10.61	13.93	15.37 ^{**†}	10.53	17.85	24.90*	20.47	27.81	22.53*	18.18	31.89	20.20*	15.01	24.86	19.35 ^{**†}	15.19	22.34	0,0005
	90. dk	9.29 ^{ab*‡}	7.69	12.80	10.81 ^{ab*†}	10.33	12.58	27.05*	16.60	31.15	25.80*	15.28	32.24	13.30*	11.85	16.63	17.97	12.98	23.74	<0.001
	120. dk	9.13 ^{ab*‡}	7.16	10.24	10.53 ^{ab*†}	7.88	12.32	19.55*	15.55	28.63	21.11*	15.25	27.23	11.79*	10.27	14.72	12.50 ^{**†}	11.13	17.02	<0.001
P		<0.001			<0.001			<0.001			<0.001			<0.001			0.002			

a: 10⁻⁵M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

b: 10⁻⁶M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

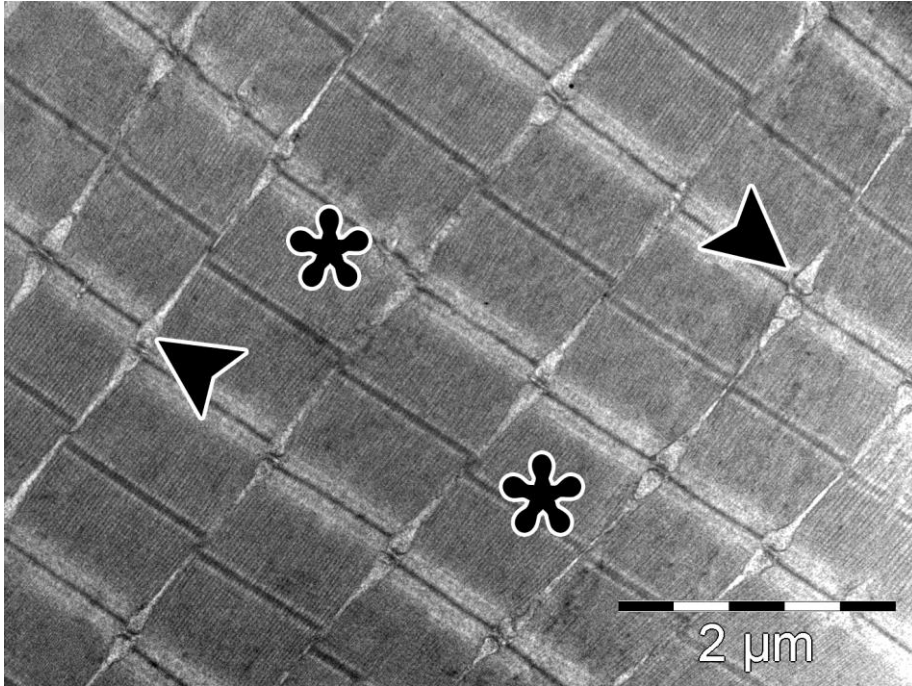
*: Kontrol değeri ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

†: 30. dakika ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

‡: 60. dakika ile karşılaştırıldığında (P<0.05).

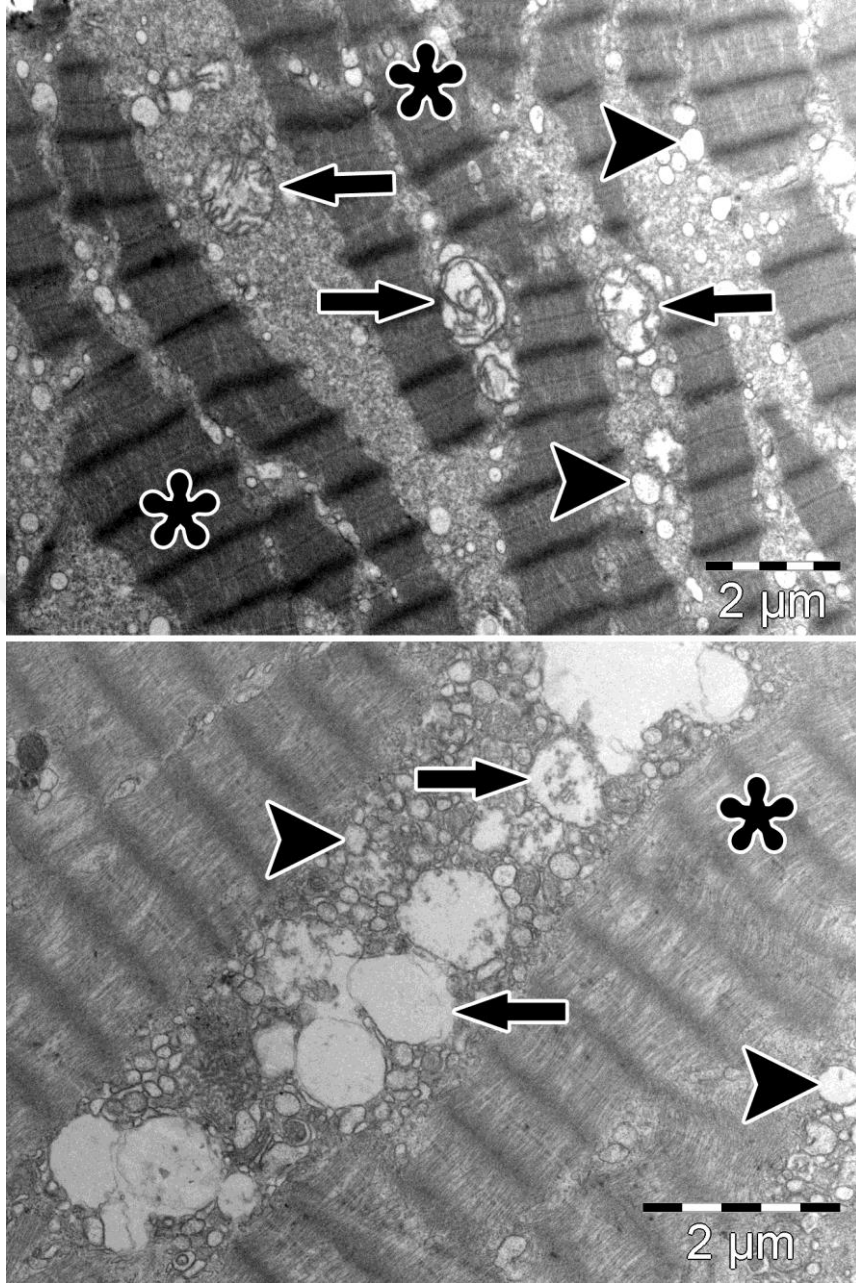
4.1.2. Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol grubunda *Rana ridibunda* gastrokinemius kas hücrelerinin sarkomer yapıları, miyofibril ve miyofilaman organizasyonları normal görünümündedir. Hücrelerdeki mitokondriyon, sarkoplazmik retikulum ve T tübüllerinde herhangi bir hasar bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol grubu. Bütünüyle normal görünüme sahip SER sisternalarını (ok başı), miyofilamanları ve miyofibrilleri (yıldız) içeren kas hücreleri (x20.000).

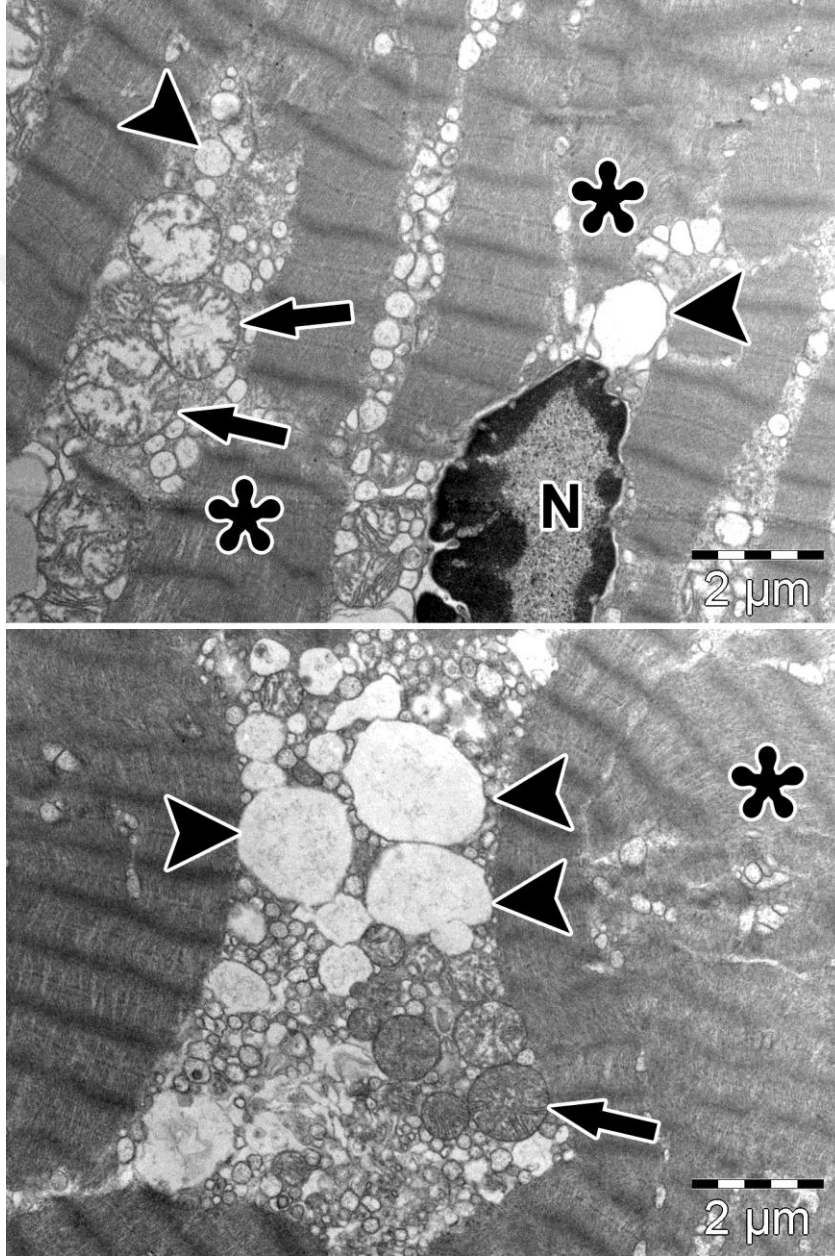
$1 \times 10^{-3} \text{M}$ thiacloprid uygulanan grupta hasar bulguları ağır düzeydedir. Kas hücrelerinin sarkomer bütünlüğü bozulmuş ve dağınık bir görünüme sahiptir. Miyofibriller ve onları oluşturan miyofilamanlar ayrılmış ve düzensiz olarak izlenmiştir. Hücrelerin mitokondriyonlarında şişme, krista ve matrikslerinde dağılma ve parçalanma mevcuttur. Ayrıca, hücrelerin içinde düz yüzlü endoplazmik retikulum (SER) genişlemelerine bağlı olduğu düşünülen çok sayıda vakuol yapısı da bulunmaktadır (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. 1×10^{-3} M thiacloprid grubu. Dağınık ve parçalanmış halde miyofibriller (yıldız), şişmiş ve iç yapısı bozulmuş mitokondriyonlar (ok), genişlemiş SER sisternaları (ok başı).

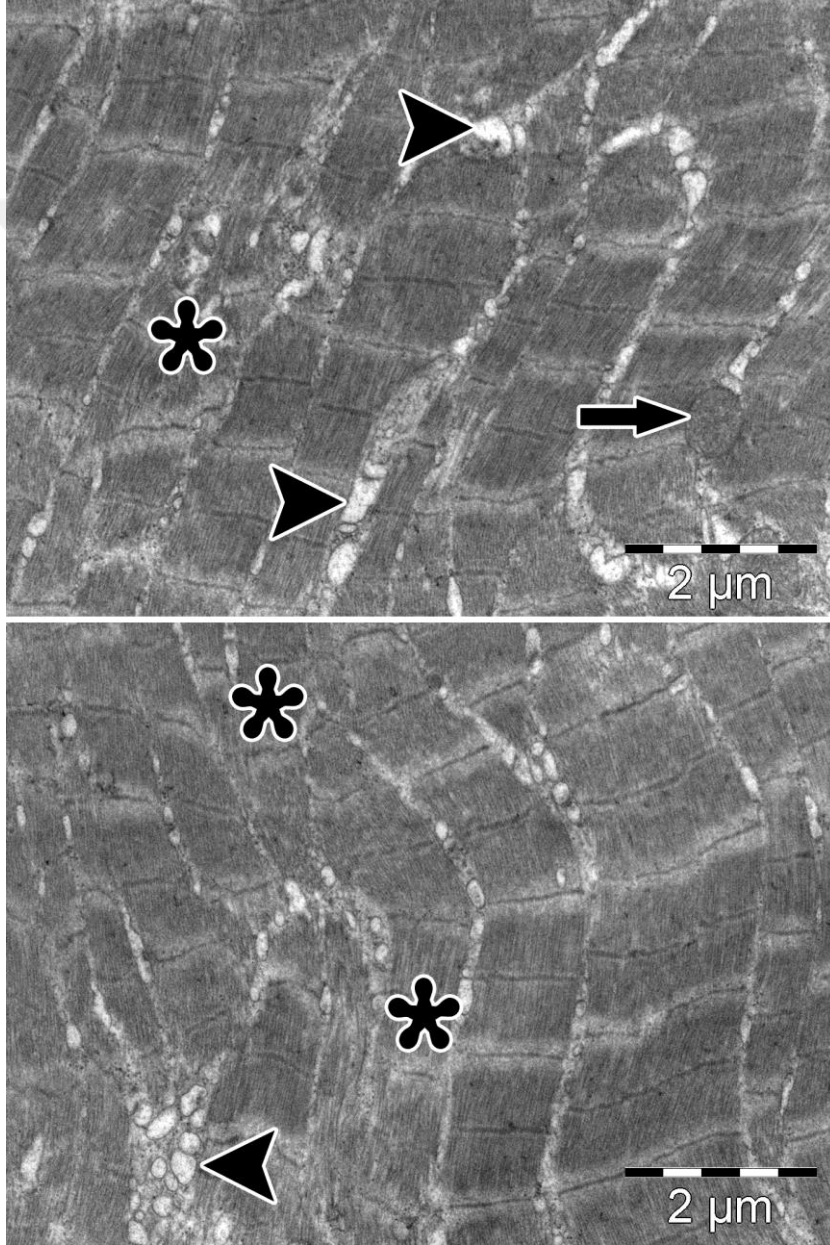
1×10^{-4} M thiacloprid uygulanan grupta da ağır hasar bulguları gözlenmiştir. Mitokondriyonlarda şişme, krista ve matriks yapılarında bozulma ve kayıp görülmüştür. Miyofilamanlar dalgalı ve dağınık, miyofibrillerin düzenlenişi ise bozuk olarak değerlendirilmiştir. Granüler materyal içeren bir sitoplazma içinde SER

genişlemelerine bağlı çok sayıda vakuol izlenmiştir. Sarkomer yapıları kısmen korunmuş fakat, yer yer dağılmıştır. Miyofibrillerde ve miyofilamanlarda ayrılmalar bulunmaktadır. Nükleer membrana çökmüş heterokromatin ile karakterize apoptotik çekirdeklere de rastlanmıştır (Şekil 4.9).



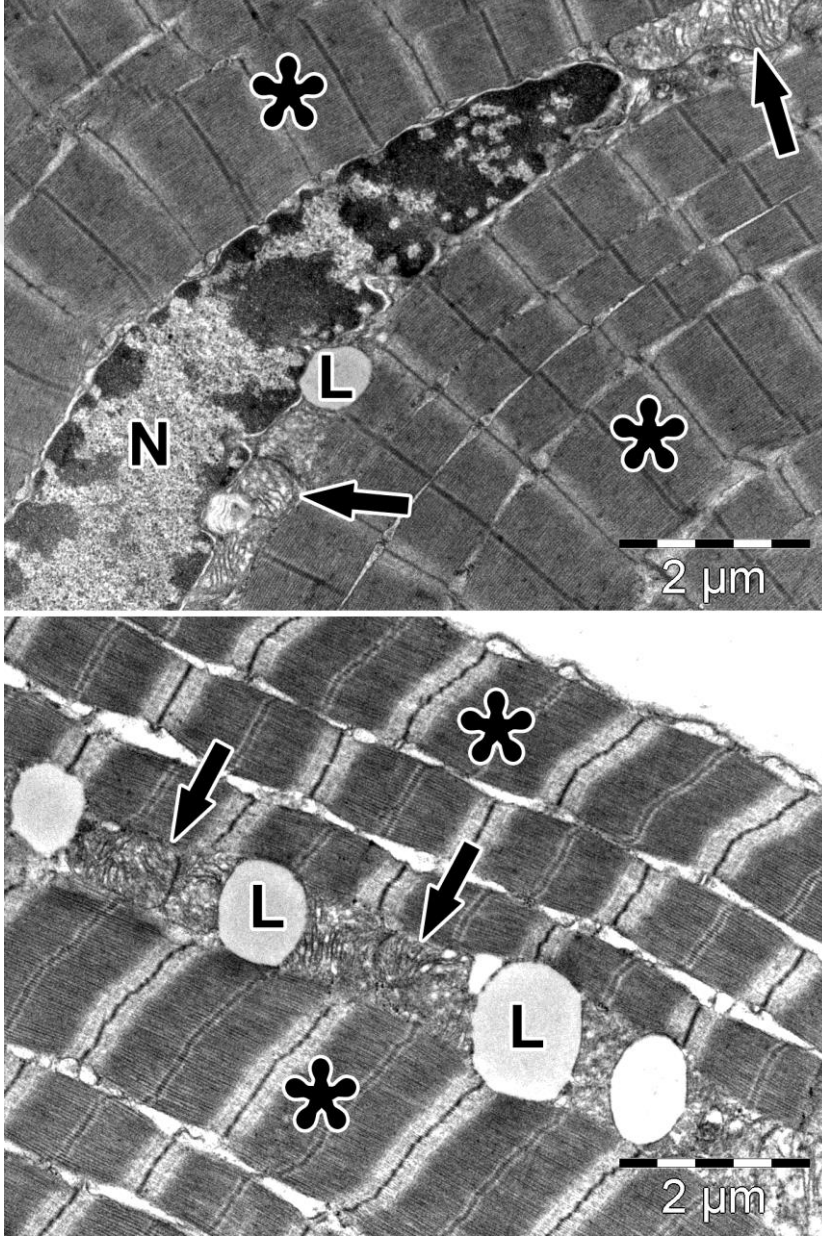
Şekil 4.9. $1 \times 10^{-4}M$ thiacloprid grubu. Dağınık ve parçalanmış halde miyofibriller (yıldız), şişmiş ve iç yapısı bozulmuş mitokondriyonlar (ok), genişlemiş SER sisternaları (ok başı), apoptotik görünümlü nükleus (N).

$1 \times 10^{-5} M$ thiacloprid uygulanan grubun kas hücrelerinde ise, sarkomer yapıları korunmuş görünmekle birlikte miyofilamanlar ve oluşturdukları miyofibrillerde dalgalı ve düzensiz görünümde alanlar mevcuttur. Bazı SER sisternalarında hafif genişleme bulguları görülmüştür. Mitokondriyonlarda belirgin bir hasar bulgusu tespit edilmemiştir (Şekil 4.10).



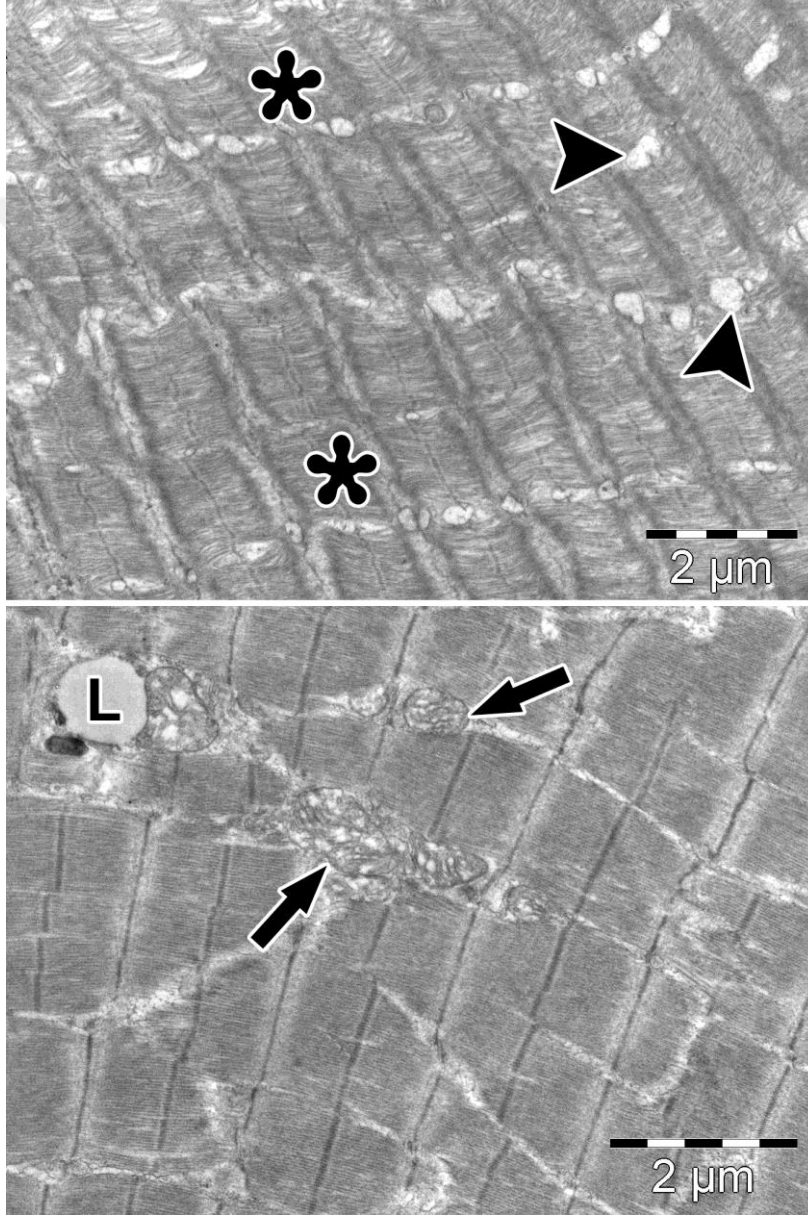
Şekil 4.10. $1 \times 10^{-5} M$ thiacloprid grubu. Düzensiz görümlü miyofibriller (yıldız), genişlemiş SER sisternaları (ok başı) ve normal görümlü mitokondriyon (ok).

$1 \times 10^{-6} \text{M}$ thiacloprid uygulanan grupta hasar bulgusu saptanmamıştır. Sarkomer yapıları, miyofilamanlar ve miyofibriller iyi korunmuş olarak değerlendirilmiştir. Mitokondriyonların görünümü normaldir. Bu grupta bulgu kabul edilebilecek tek değişiklik, mitokondriyonların arasında az sayıda gözlenen lipid damlacıklarıdır (Şekil 4.11).



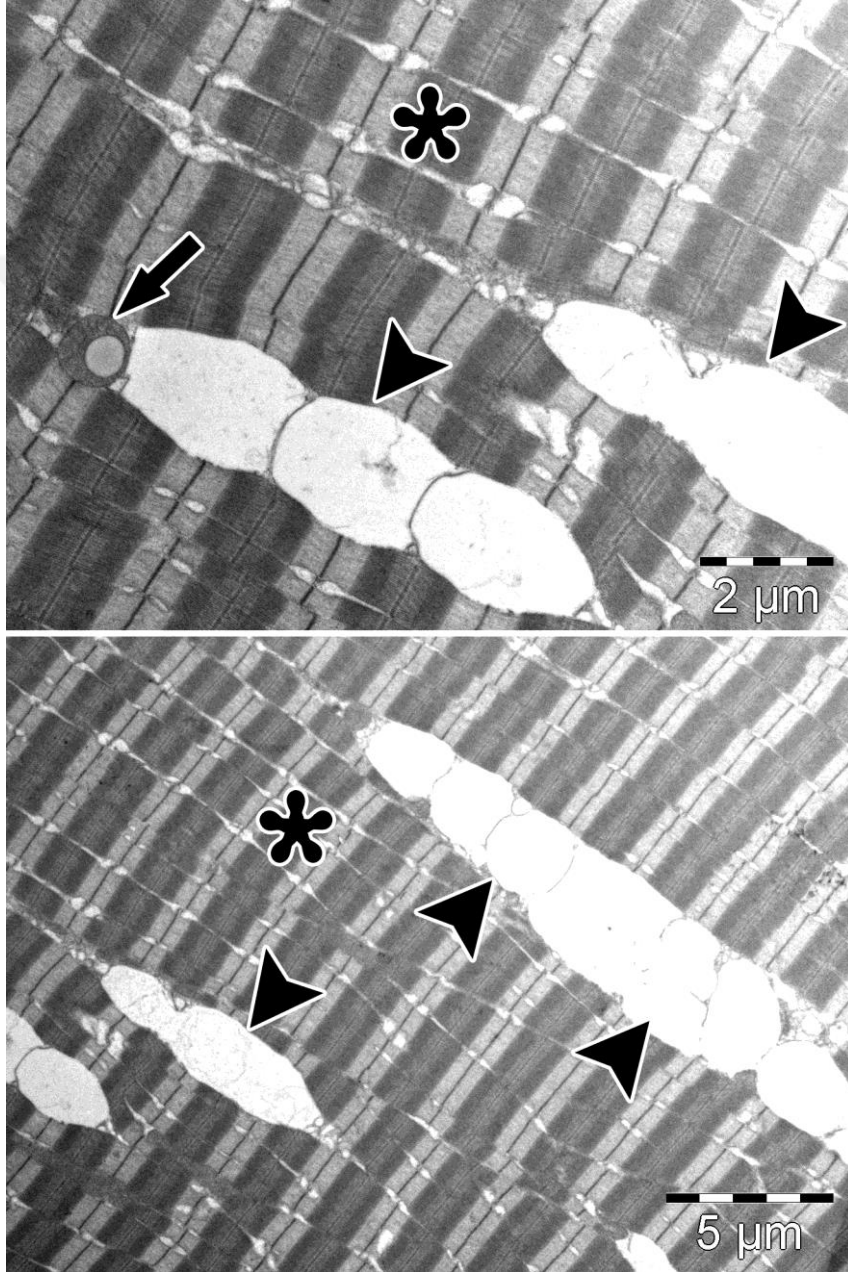
Şekil 4.11. $1 \times 10^{-6} \text{M}$ thiacloprid grubu. Normal görünümlü miyofibriller (yıldız), mitokondriyonlar (ok), nükleus (N) ve lipid damlacıkları (L).

$1 \times 10^{-5}M$ thiacloprid ile $1 \times 10^{-4}M$ d-tubocurarine kombinasyonu uygulanan grubun hücrelerinde hasar bulguları hafif düzeydedir. Bazı mitokondriyonların yanında yerleşmiş az sayıda lipid damlacıkları gözlenirken, bazı alanlarda miyofilamanların birbirinden hafifçe ayrıldığı ve dalgalı bir görünüm kazandığı da belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. $1 \times 10^{-5}M$ thiacloprid ile $1 \times 10^{-4}M$ d-tubocurarine'nin kombine olarak uygulandığı grup. Ayrılmış ve dalgalı görünümde miyofilamanlara sahip miyofibriller (yıldız), SER sisternaları (ok başı), mitokondriyon (ok) ve lipid damlacığı (L).

$1 \times 10^{-6} \text{M}$ thiacloprid ile $1 \times 10^{-5} \text{M}$ d-tubocurarine kombinasyonu uygulanan grupta da bulgular hafif sayılacak düzeydedir. Bazı alanlarda SER genişlemelerine bağlı geniş vakuoller gözlenirken sarkomer yapılarının, miyofibriller ve miyofilamanların normal düzende olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. $1 \times 10^{-6} \text{M}$ thiacloprid ile $1 \times 10^{-5} \text{M}$ d-tubocurarine'nin kombine olarak uygulandığı grup. Genişlemiş SER sistemaları (ok başı), normal görümlü miyofibriller (yıldız) ve mitokondriyon (ok).

4.1.3. Thiaclopridin CAT Aktivitesi Üzerine Etkisi

Thiacloprid, uygulanan tüm gruplarda doza bağlı olarak katalaz enzim aktivitesini azaltıcı etki göstermiştir. 10^{-3} ve 10^{-4} M thiacloprid grubunda katalaz aktivitesinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonunun katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Thia: thiacloprid; Tubo: d-tubocurarine. Veriler medyan ve çeyreklikler (%25-%75) ile verilmiştir.

DOZ	Katalaz enzim aktivitesi (U/mL)		
	Medyan	% 25	% 75
Kontrol grubu	63.10	51.79	64.89
10^{-3}M Thia	1.10 *	0.51	4.39
10^{-4}M Thia	5.05 †	3.03	9.18
10^{-5}M Thia	6.48	3.27	8.75
10^{-6}M Thia	12.59	8.64	32.30
10^{-5}M Thia + 10^{-4}M Tubo	18.19 ‡	12.11	49.46
10^{-6}M Thia + 10^{-5}M Tubo	9.52	5.96	17.75
P	<0.001		

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($P<0.001$).

†: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($P<0.05$).

‡: 10^{-3} M thiacloprid grubu ile karşılaştırıldığında ($P<0.05$).

4.1.4. Thiaclopridin TBARS Düzeyi Üzerine Etkileri

TBARS düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M thiacloprid gruplarında ve 10^{-6} M thiacloprid ile 10^{-5} M d-tubocurarine grubunda anlamlı olarak artmıştır ($P<0.05$).

Çizelge 4.5. Thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonunun TBARS düzeyi üzerine etkileri. Thia: thiacloprid; Tubo: d-tubocurarine. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

DOZ	TBARS miktarı (nmol/g)
Kontrol grubu	452.57 \pm 56.51
10^{-3} M Thia	2419.77 \pm 324.82*
10^{-4} M Thia	2126.43 \pm 170.52*
10^{-5} M Thia	1977.43 \pm 168.37*
10^{-6} M Thia	1567.12 \pm 208.58*
10^{-5} M Thia + 10^{-4} M Tubo	1079.58 \pm 189.56
10^{-6} M Thia + 10^{-5} M Tubo	1461.64 \pm 42.83*
P	<0.001

*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($P<0.05$).

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada neonikotinoid bir insektisit olan thiacloprid ve antagonisti d-tubocurarine'nin *Rana ridibunda* iskelet kası (gastrokinemius kası) mekanik aktivite parametreleri üzerine etkileri doza ve uygulama süresine bağlı olarak araştırılmıştır. Bu kapsamda thiaclopridin etki mekanizmasının kas nAChR'leri üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koyabilmek için nAChR antagonisti olan d-tubocurarine kullanılmıştır. Çalışmada thiaclopridin iskelet kasının mekanik aktivitesi üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve meydana gelebilecek herhangi bir etkinin iskelet kaslarının kasılabilmesi için gerçekleşmesi gereken mekanizmanın hangi basamağında etkili olduğu yorumlanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen verilere göre thiacloprid ve d-tubocurarine kasılma yanıtlarını etkilemiştir. Yüksek doz gruplarında (10^{-3} ve 10^{-4} M thiacloprid) thiacloprid kasılma kuvveti, kasılma süresi ve gevşeme süresi üzerine uygulama süresine bağlı olarak azaltıcı etki göstermiştir. Thiaclopridin düşük doz gruplarında (10^{-5} ve 10^{-6} M thiacloprid) ise yüksek doz gruplarına göre kasılma kuvveti, kasılma süresi ve gevşeme süresinde artış görülmüştür.

D-tubocurarine ile yapılan bir çalışmada bu blokerin kasılma yanıtlarını inhibe ettiği görülmüştür [52].

Thany yaptığı bir çalışmada neonikotinoid bir insektisit olan clothianidin, hamamböceğinin 6. ganglionunda eksprese olan sinaptik ve ekstrasinaptik nAChR üzerindeki agonist etkilerini incelemiştir. Ayrıca clothianidin etkileri nikotink antagonistlerden α -bungarotoksin, mecamlamin ve d-tubocurarine ile birlikte çalışılmıştır. Clothianidin akımlarının d-tubocurarine ile bloke edildiği ve clothianidin nAChR'nin alt tiplerinden olan imidacloprid duyarlı nAChR1 ve imidaclopride duyarsız nAChR2'nin agonisti olduğu görülmüştür [53].

Bizim çalışmamızda da thiacloprid ile birlikte kombinasyon halinde uygulanan d-tubocurarine (10^{-5} M thiacloprid ile 10^{-4} M d-tubocurarine ve 10^{-6} M thiacloprid ile 10^{-5} M d-tubocurarine kombinasyonu) kasılma yanıtlarını, thiaclopridin tek başına uygulandığı gruplara göre (10^{-5} ve 10^{-6} M thiacloprid) inhibe etmiştir. Thiacloprid ile birlikte d-tubocurarine uygulamasının, thiaclopridin tek başına düşük doz gruplarında mekanik aktivite parametreleri (kasılma kuvveti, kasılma ve gevşeme süresi) üzerinde artışa yol açtığı

etkiyi inhibe ettiği gözlenmiştir. D-tubocurarine'nin inhibe edici etkisi ACh'nin yarışmalı inhibitörü olmasından kaynaklanmaktadır [54]. Bu nedenle thiaplopridin etkisinin nAChR'leri üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya çıkarma olanağı olmamıştır. Çalışmada uygulanan d-tubocurarine dozları, thiaplopridin kasılma yanıtları üzerindeki azaltıcı etkilerini düzeltmek için yeterli olmamış olabilir. Bu nedenle thiaplopridin nAChR'leri üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı dozlarda thiaploprid ile d-tubocurarine kombinasyonları uygulanabilir.

Thiaplopridin toksik etkisi, nikotik kolinerjik sinir sisteminde sinaptik iletimde görülmektedir. Thiaploprid, böceklerin merkezi sinir sisteminin $\alpha_4\beta_2$ nAChR için spesifiktir. Thiaploprid böcek ve omurgalıların kas sinir kavşağında nAChR'ye bağlanır. nAChR, uyarıcı ACh nörotransmitterinin endojen agonisti olan bir iyon kanalıdır. Reseptör normalde kapalı durumdadır ancak üzerine ACh bağlanınca kompleksin poru açılır ve kanal katyonlara geçirgen hale gelir. ACh daha sonra hızla AChE enzimi ile yıkılır. nAChR'ye bağlanan thiaploprid ise oldukça yavaş inaktif hale gelir ve böylece thiaploprid nAChR'nin aktivasyon süresini uzatır. nAChR'nin uzun süre aktive olması reseptörün duyarsızlaşması ve bloke olmasına neden olur; sonuçta da paraliz ve ölüm meydana gelir [21, 55].

Çalışmamızda yüksek dozlardaki thiaploprid ($10^{-3}M$ ve $10^{-4}M$) uygulamanın 30. dakikasında kasılma kuvvetinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, 60, 90 ve 120. dakikalarda kasılma kuvvetinde kontrole göre önemli bir azalmaya neden olmuştur. İlk 30. dakikada kasılma kuvvetinde önemli bir azalma olmaması thiaplopridin asetilkolin benzeri etkisi ile kas liflerinde depolarizasyona yol açması ve kasın normal kasılma fonksiyonunu yerine getirmesine neden olmasındandır. Uygulamadan 60, 90 ve 120 dakika sonra yapılan ölçümlerde ise kasılma kuvvetinin azalması, kas lifi membranında bulunan nAChR'lerin inaktif hale gelmesi ya da reseptör yapımının azalmasıyla ilişkili olabilir. Aktif reseptör sayısının azalması, hedef dokunun kimyasal maddeye karşı duyarlılığını azaltır [56]. Kasın kasılma yanıtındaki azalmanın bir başka mekanizması kalsiyum ile ilişkili olabilir. Kasılmada, kalsiyum iyonları önemli bir role sahiptir. Sarkoplazmik retikulumdan salınan Ca iyonları aktin ve miyozin arasındaki etkileşimi başlatır. Thiaplopridin kas liflerinde oluşturduğu sürekli depolarizasyon, SR'den Ca serbestleme mekanizmasını bozmuş ve bu da kasılma kuvvetinde azalmaya yol açmış olabilir. Literatür taraması sonuçlarına göre thiaplopridin, kasların mekanik aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği başka çalışmalara

rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız sonunda elde edilen elektrofizyolojik bulguları doğrudan karşılaştırma imkanı olmamıştır.

Mullin ve ark. [57] thiaclopridin, neonikotinoid sınıfındaki diğer insektisitlerden 150 kat daha fazla toksik etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Vehovszky ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, bir yumuşakça olan *Lymnaea stagnalis*'in merkezi sinir sisteminde bulunan VD4 ve RPeD1 nöronları üzerine neonikotinoid insektisitlerden 0.01 mg/mL thiacloprid ve 0.1 mg/mL thiamethoxam uygulamışlardır. Çalışma sonucunda thiaclopridin eksitatör postsinaptik potansiyelleri %90 bloke ettiği, thiamethoxamın ise sinaptik yanıtları %15 azalttığı görülmüştür [58].

Çalışmamızda thiacloprid ve thiacloprid ile d-tubocurarine kombinasyonuna maruz bırakılan kurbağa gastrokinemius kasında meydana gelebilecek olası ultra yapısal hasar histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Elektron mikroskopik incelemeler sonucunda, yüksek dozlarda (10^{-3} ve 10^{-4} M) uygulanan thiacloprid gruplarında hasar bulgularının ağır olduğu, hücrelerin sarkomer bütünlüğünün bozulduğu, miyofibrillerin ayrıldığı ve düzensiz bir görünüme sahip olduğu gözlenmiştir. Düşük dozlarda (10^{-5} ve 10^{-6} M) uygulanan thiacloprid gruplarında ise hasar bulgusu saptanmamış, miyofilaman ve miyofibrillerin yapısının normal olduğu görülmüştür. 1×10^{-5} M thiacloprid ile 1×10^{-4} M d-tubocurarine ve 1×10^{-6} M thiacloprid ile 1×10^{-5} M d-tubocurarine uygulanan gruplardaki hasar bulgusunun yok denecek kadar hafif düzeyde olduğu gözlenmiştir. Doz azaldıkça hasar bulgularının hafiflemiş olması oluşan hasarın ilaçtan kaynaklı olduğunu göstermektedir. Histolojik bulgulardan elde edilen sonuçlara göre 10^{-3} ve 10^{-4} M thiacloprid gruplarında hücrelerin mitokondriyonlarında şişme, krista ve matrikslerinde dağılma ve parçalanma gözlenirken 10^{-5} ve 10^{-6} M thiacloprid grubunda mitokondriyonların normal görünüme sahip olduğu görülmüştür. Dağılmış haldeki miyofibriller, mitokondride meydana gelen şişme, nukleusta görülen apoptotik çekirdek thiaclopridin kas dokusunda apoptotik bir süreç başlatmış olabileceğini göstermektedir. Çalışmada uyguladığımız histopatolojik yöntemle apoptotik hücre oranını belirlemek sağlıklı olmadığı için apoptoz markerı proteinlerle immünohistokimyasal çalışma yapılarak apoptotik hücre oranı belirlenebilir. Ayrıca düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternalarının genişlediği gözlenmiştir. Bu genişlemeler kalsiyumun SER'den sitozole geçişinin bozulmasıyla ve SER'de iyon birikiminden dolayı oluşmuş olabilir.

Bu sonuçlar da yüksek dozlarda uygulanan thiaclopridin kasılma yanıtları üzerindeki inhibe edici etkisini kısmen de olsa açıklamaktadır. Yüksek doz gruplarında kasılma kuvvetinde görülen önemli ölçüdeki azalmanın; sarkomer bütünlüğünün bozulması, miyofibrillerin ayrılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kas hücrelerinin yapısında meydana gelen hasar, iskelet kası mekanik aktivite parametrelerini inhibe etmiş olabilir.

Goyal ve arkadaşları *Gallus domesticus* ile yaptıkları bir çalışmada 28 gün boyunca oral yolla 10 mg/kg/gün dozlarda uygulanan thiaclopridin karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, bağırsak, beyin ve ovaryum üzerine etkilerini histopatolojik olarak incelemiştir. Çalışmanın sonucunda karaciğerde hepatosit dejenerasyonu ve tıkanıklık, böbreklerde epitel hücre dökülmesi ve tübül hücre dejenerasyonu, akciğerlerde hemoraji ve hafif tıkanma, beyinde glia hücreleri, satellit hücrelerin etrafında nöronal dejenerasyon, kalpte miyokardial hemoraji meydana gelirken ovaryumda herhangi bir etki görülmemiştir [59].

Serbest radikaller pestisit toksisitesinde önemli rol oynar [60]. İnsektisitler serbest radikal oluşumuna yol açarak oksidatif stresi indüklemektedir [61, 62]. Deney hayvanlarıyla yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar [63, 64, 65] antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilişkili enzimlerin aktivitesinin pestisitlerin etkisi altında değiştiğini göstermiştir. Ayrıca oksidatif stres ve DNA hasarının, kanser ve nörolojik hastalıklarda pestisit maruziyetine bağlı mekanizmalar olduğu ileri sürülmektedir. İnsektisitlerin metabolizması boyunca, nitrik oksit gibi reaktif nitrojen türleri ve reaktif oksijen türleri oluşabilir [60, 66].

Neonikotinoid maruziyeti lipit peroksidasyonunu artırabilir. Lipit peroksidasyonu sonucu membranın işlevi değişir, reaktif ve toksik aldehitler özellikle de MDA oluşur [67]. Pestisitlerin oluşturduğu serbest oksijen radikalleri lipit peroksidasyonu ve birçok oksidatif mekanizmayı başlatarak doku hasarına neden olmaktadır [62]. Antioksidan enzim düzeylerindeki azalma, maruziyetten sonra pestisitlerin metabolizması sırasında oluşan oksidatif moleküllere bağlanarak aktivitelerinin indirekt olarak inhibe olması şeklinde yorumlanır [60].

Bu çalışmada thiaclopridin oluşturabileceği oksidatif hasar CAT enzim aktivitesi ve TBARS düzeyleri incelenerek belirlenmeye çalışılmıştır. Thiaclopridin CAT enzim aktivitesini kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10^{-3} ve 10^{-4} M thiacloprid grubunda CAT aktivitesindeki düşüşler

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca thiacloprid TBARS düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artışa yol açmıştır ($P<0.05$).

Biyokimyasal incelemeler sonucunda görülen, yüksek doz thiacloprid gruplarındaki katalaz aktivitesinde azalma ve malondialdehit düzeyindeki artış thiaclopridin kas dokusunda oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir.

Elektrofizyolojik bulgularla birlikte, histolojik ve biyokimyasal incelemeler thiaclopridin kaslar üzerinde toksik etki yarattığını, oksidatif hasara yol açtığını, kasın ultra yapısında ağır hasarlar meydana getirdiğini göstermiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda tüm dünyada yaygın olarak kullanılan thiaclopridin *Rana ridibunda* iskelet kası mekanik aktivite parametreleri üzerine doza ve zamana bağlı etkileri incelenmiştir. Ayrıca thiaclopridin kas dokusunda meydana getirebileceği olası hasarlar histopatolojik çalışma ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal analizlerle thiaclopridin CAT aktivitesi ve TBARS düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda:

1. Thiacloprid iskelet kası mekanik aktivitesi parametrelerini etkilemiştir.
2. Kasılma kuvveti, kasılma ve gevşeme sürelerini doza ve zamana bağlı olarak azaltmıştır.
3. CAT enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuş, TBARS düzeylerinde ise artış meydana getirmiştir.
4. Thiaclopridin yüksek dozları kas hücrelerinin sarkomer bütünlüğünü bozmuş, miyofibrillerin ayrılmasına neden olmuş, mitokondriyonlarında şişme meydana getirmiştir.

Çalışmamızda, neonikotinoid insektisitlerden thiaclopridin hedef olmayan canlıların kas dokusu üzerine etkileri açığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Sonuçlar eksternal olarak uygulanan insektisitin, çizgili kasın mekanik aktivitesi üzerine baskılayıcı etkileri olduğunu göstermektedir. Ancak nAChR'nin bu insektisit varlığındaki moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi için iyon kanallarının patch clamp yöntemiyle çalışılması gerekmektedir. Literatürde thiaclopridin etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu nedenle bu insektisit ile daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılarak hedef olmayan organizmalar üzerindeki zararlı etkileri incelenmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Vural, N., “Toksikoloji”, Ankara, A.Ü. Basımevi, (1984).
- [2] Toros, S., Maden, S., “Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları”, Ankara, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, (1985).
- [3] MacMahon, B. “Pesticide residues and breast cancer”, J Natl Cancer Inst, 86: 572-573, (1994).
- [4] Stenersen, J. “Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology”, CRC Press, Florida, p. 276, (2004).
- [5] Ware, G. W., Whitacre, D. M., “An Introduction to Insecticides”, The Pesticide Book, 6th ed, (2004).
- [6] Lu, F.C., “Basic Toxicology”, Taylor&Francis press, Washington, pp. 358, (1996).
- [7] Vural, N., “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 73, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s: 334-377, (1996).
- [8] Tomizawa, M., Casida, J. E. “Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors”, Annual Review of Entomology., 48: 339-64, (2003).
- [9] Mullins, J. W. “Imidacloprid: a new nitroguanidine insecticide”, American Chemical Society Symposium Series, 524: 183-198, (1993).
- [10] Kagabu, S. “Chloronicotinyll insecticides-discovery, application and future perspective”, Reviews in Toxicology, 1: 75-129, (1997).
- [11] Kagabu, S., Akagi, T. “Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds”, Pesticide Science Society of Japan, 22(2):84-89, (1997).
- [12] Kagabu, S., Medej, S., “Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions and to oxygen”, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 59(6):980-985, (1995).

- [13] Nauen, R. "Behaviour modifying effects of low systemic concentrations of imidacloprid on *Myzus persicae* with special reference to an antifeeding response", *Pesticide Science*, 44(2):145-153, (1995).
- [14] Zwart, R., Oortgiesen, M., Vijverberg, H. P. "The nitromethylene heterocycle 1-(pyridin-3-yl-methyl)-2-nitromethylene-imidazolidine distinguishes mammalian from insect nicotinic reseptor subtypes", *European Journal of Pharmacology*, 228(2-3):165-169, (1992).
- [15] Zwart, R., Oortgiesen, M., Vijverberg, H. P. "Nitromethylene heterocycles: selective agonists of nicotinic receptors in locust neurons compared to mouse N1E-115 and BC3H1 cells", *Pesticide Biochemical Physiology*, 48:202-213, (1994).
- [16] Tomizawa, W., Yamamoto, I. "Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs", *Journal of Pesticide Science*, 18(1): 91-98, (1993).
- [17] Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P. "Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides or amphibian *Rana N. Hallowell*", *Chemosphere*, 56:457-463, (2004).
- [18] Pollet, I., Bendell-Young, L. I. "Amphibians as indicators of wetland quality", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2589-2597, (2000).
- [19] Pimentel, D., Greiner, A., Bashore, T. "Economic and environmental costs of pesticide use", J. Rose (ed), *Environmental Toxicology: Current Developments*, Gordon and Breach Science Publisher, UK, s.121-187, (1998).
- [20] Mullins, J. W. "Imidacloprid- A New Nitroguanidine Insecticide", *American Chemical Society Symposium Series*, 254: 183-198, (1993).
- [21] Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., Sattelle, D.B. "Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors", *Trends in Pharmacological Sciences*, 22:573-580, (2001).
- [22] Stenersen, J., "Chemical pesticides: mode of action and toxicology", CRC Press, Florida, p. 276, (2004).
- [23] Millar, N. S., Denholm, I. "Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides", *Invert Neuroscience*, 7(1): 53-66, (2007).

- [24] Kent, M., “Advanced Biology”, Oxford University Press, (2000).
- [25] Nauen, R., Kintscher, U. E., Salgado, V.L., Kaussmann. M. “Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76: 55-69, (2003).
- [26] Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D. B. “Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights”, *Molecular Pharmacology*, 176: 1-10, (2009).
- [27] Casida, J. E., Quistad, G. B. “Golden age of insecticide research: past, present, or future?”, *Annual Review of Entomology*, 43: 1-16, (1998).
- [28] Casida, J. E., Quistad, G. B. “Why insecticides are more toxic to insect than people: the unique toxicology of insects”, *Journal of Pesticide Science*, 29: 81-86, (2004).
- [29] Tomizawa, W., Casida, J. E. “Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanism of selective action”, *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 45: 247-268, (2005).
- [30] Schroeder, M. E., Flattum, R. F. “The Mode of Action and Neurotoxic Properties of the Nitromethylene Heterocycle Insecticides”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22: 148-160, (1984).
- [31] Kiriya, K., Itazu, Y., Kagabu, S., Nishimura, K. “Insecticidal and Neuroblocking Activities of Acetamiprid and Related Compounds”, *Journal of Pesticide Science*, 28: 8-17, (2003).
- [32] Nishiwaki, H. “Studies on the Structure-Activity Relationship and Mode of Actions of Neonicotinoid Insecticides”, *Journal of Pesticide Science*, 29 (3): 222-223, (2004).
- [33] Tomizawa, M., Lee, D. L., Casida, J. E. “Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6016-6024, (2000).
- [34] Tomizawa, M. “Neonicotinoids and derivatives: effects in mammalian cells and mice”, *Journal of Pesticide Science*, 29 (3): 177-183, (2004).
- [35] Antifouling compositions containing thiacloprid, <https://www.google.com.tr/patents/US6245784> [25.01.2016].

- [36] Tubocurarine chloride pentahydrate, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/93750?lang=en®ion=TR> [25.01.2016].
- [37] Kas ve nöromusküler kavşak hastalıkları, <http://www.itfnoroloji.org/kas/kasindex.htm> [24.01.2016].
- [38] Pehlivan, F., “Biyofizik”, Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık, 2. Baskı, (1997).
- [39] Çağlayan, B, Alican, I, Solakoğlu, Z., “Guyton Tıbbi Fizyoloji”, (2014).
- [40] Elaine, N., Marieb, K., “Anatomy & Physiology”, 5th Edition, Pearson Education, (2013).
- [41] <http://tip.uludag.edu.tr/temel-tip-bilimleri/fizyoloji/ders-notlari/cizgili-kas-kasilma-mekanizmasi.pdf> [26.01.2016].
- [42] [http://www.biyolojisesitesi.net/tum%20uniteler/destek ve hareket/kasin kasilip gevşeme evreleri.html](http://www.biyolojisesitesi.net/tum%20uniteler/destek%20ve%20hareket/kasin%20kasilip%20gevşeme%20evreleri.html) [26.01.2016].
- [43] Mohammad, A., Akram, R., Shahin, S., Sherkoupeh, N., Ali, R. “Pesticides and Oxidative Stress: A Review”, Medical Science Monitor, 10: 141-147, (2004).
- [44] Livingstone, D. R. “Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms”, Marine Pollution Bulletin, 42: 656-666, (2001).
- [45] Halliwell, B., Chirico, S. “Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement, and Significance”, The American Journal of Clinical Nutrition, 57(5): 715S-724S, (1993).
- [46] Akkus, I., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, Mimoza Basım-Yayım ve Dağıtım, Konya, (1995).
- [47] Denise, G, Lucas, S. M., Juliana, V., Clóvis, P., Gabriela S. E., Solange, C. G. “Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde Quantification”, Quim. Nova, Vol. 32, No.1, 169-174, (2009).
- [48] Dekkers, C., Doornen, V. L., Kemper, H. G. “The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage”, Sports Med. 21: 213-238, (1996).
- [49] Urso, M. L, Clarkson, P. M. “Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation”, Toxicology, 189(1-2): 41-54, (2003).
- [50] Aebi, H. “Catalase *in vitro*”, Methods Enzymol, 105: 121–126, (1984).

- [51] Ohkava, H., Ohisini, N., Tagi, K. “Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction”, *Analytical Chemistry*, 95: 351-358, (1979).
- [52] Shima, T., Shiina, T., Naitou, K., Nakamori, H., Sano, Y., Shimizu, Y. “Does the capsaicin-sensitive local neural circuit constitutively regulate vagally evoked esophageal striated muscle contraction in rats?”, *Journal of Physiological Sciences*, (2015).
- [53] Thany, S. H. “Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion”, *NeuroToxicology*, 30: 1045–1052, (2009).
- [54] Jonsson, F. M, Dabrowski, M, Eriksson, L. I “Pharmacological characteristics of the inhibition of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at human adult muscle nicotinic acetylcholine receptor”, *Anesthesiology*, 110:1244-1252, (2009).
- [55] Matsuda, K., Shimomura, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D. B. “Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(8): 1442-1452, (2005).
- [56] Cavusoglu, H., Yegen, B. C. (Çeviri Editörleri), “Tıbbi Fizyoloji”, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, Onbirinci Basım, 87-9, (2007). [Guyton, A. C. and Hall, J. E., “*Medical Physiology 11th ed.*”, (2005).]
- [57] Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D. “High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health”, *Plos One*, 5(3): e9754, (2010).
- [58] Vehovszky, A., Farkas, A., Ács, A., Stoliar, O., Székács, A., Mörtl, M., Györi, J. “Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system”, *Aquatic Toxicology*, 167: 172–179, (2015).
- [59] Goyal, S., Sandhu, H. S., Brar, R. S. “Histopathological alterations induced after oral sub-acute thiacloprid toxicity in *Gallus domesticus*”, *Veterinarski Arhiv*, 80 (5), 673-682, (2010).
- [60] Duzguner, V., Erdogan, S. “Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver and central nervous system of rats”, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 104(1): 58-64, (2012).

- [61] Duzguner, V., Erdogan, S. “Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(1): 13-18, (2010).
- [62] Kanbur, M., Liman, B. C., Eraslan, G., Altinordulu, S. “Effects of cypermethrin, propetamphos, and combination involving cypermethrin and propetamphos on lipid peroxidation in mice”, *Environmental Toxicology*, 23(4): 473-479, (2008).
- [63] John, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D. “Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes”. *Journal Nutrition Biochemistry*, 12(9): 500-504, (2001).
- [64] Thapar, A., Sandhir, R., Kiran, R. “Acephate induced oxidative stress in erythrocytes”, *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(8): 963-966, (2002).
- [65] Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R. “Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides”, *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(7): 580-583, (2006).
- [66] Grisham, M. B., Jourdeuil, D., Wink, D. A. “Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation”, *American Journal of Physiology*, 276(2): G315-G321, (1999).
- [67] Cheeseman, K. H. “Mechanisms and effects of lipid peroxidation”, *Molecular Aspects of Medicine*, 14(3): 191-197, (1993).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Esra PEKOĞLU

Doğum Tarihi: 29/11/1989

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Sayısal Ağırlıklı	Afyon Cumhuriyet Lisesi	2003-2008
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2008-2012
Yüksek Lisans	Biyoloji Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2012-
	Biyofizik Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2014-