

**ACETAMİPRİD VE D-TUBOCURARİNE’NİN *Rana
ridibunda* SİYATİK SİNİRİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

SALİH CÜFER BEDİZ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
ARALIK 2015**

**ACETAMİPRİD VE D-TUBOCURARİNE’NİN *Rana
ridibunda* SİYATİK SINIRI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

SALİH CÜFER BEDİZ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA**

**MERSİN
ARALIK 2015**

Salih Cüfer BEDİZ tarafından Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA danışmanlığında hazırlanan “Acetamiprid ve d-tubocurarine’nin *Rana ridibunda* siyatik siniri üzerine etkilerinin incelenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

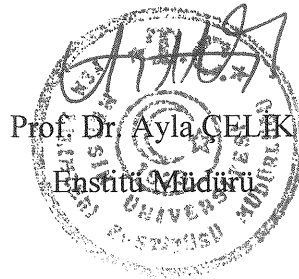
İmza

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 ve 2016...6...../...214..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü

Acetamiprid ve D-Tubocurarine'nin *Rana ridibunda* Siyatik Siniri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

ÖZ

Bu çalışmada, neonikotinoid bir insektisit olan acetamiprid ve antagonisti d-tubocurarinin *Rana ridibunda* siyatik siniri üzerine doza ve uygulama süresine bağlı etkileri elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Acetamiprid ile ilgili literatür araştırması yapılmış ve bu insektisit kurbağa siyatik siniri üzerine etkilerinin daha önce çalışılmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmada, elektrofizyolojik olarak acetamipridin kurbağa siyatik siniri aksiyon potansiyeli parametrelerinden uyarıcı şiddeti, latans, süre, alan üzerine etkileri incelenmiştir. Acetamipridin siyatik sinir aksiyon potansiyeli parametrelerini kontrol grubuna göre değiştirdiği gözlemlenmiştir. Acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden genlik ve alanı düşürürken, latans ve süreyi arttırmıştır. Katalaz ve ACh aktivitesini azaltmış, MDA düzeyini arttırdığını gördük. Histopatolojik incelemeler sonucunda sadece acetamiprid uygulanan doz gruplarında sinirde ağır hasarlar gözlemlenmiş olup, miyelin kılıflarda yoğun ovoid cisim oluşumu ve fragmentasyon oluşumu saptanmıştır. Buna karşılık acetamiprid ve antagonisti ile birlikte uygulanan doz gruplarında bu etkinin azaldığı görülmüştür. Acetamiprid doza ve uygulama süresine bağlı olarak ilk 30.dk'dan itibaren sinir aksiyon potansiyeli süresini, alanını arttırmış, depolarizasyon süresini ise anlamlı biçimde azaltmıştır. Acetamipridin siyatik sinir üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkileri de incelenerek elektrofizyolojik etkiler desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Neonikotinoid insektisitler, Acetamiprid, Nikotonik Asetilkolin Reseptörü,

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

Investigation Effects of Acetamiprid and D-tubocurarine on *Rana ridibunda* Sciatic Nerve

ABSTRACT

In this study, the effects of acetamiprid and d-tubocurarine which are neonicotinoid insecticide on *Rana ridibunda* sciatic nerve dose and application time dependent is researched by using electrophysiological, histological, biochemical methods. Literature about acetamiprid has been researched and it is understood that the effects of this insecticide on frog's sciatic nerve has not yet been studied before. In this study, the effects of acetamiprid on stimulation intensity, latency, period, field which are action potential parameters has been investigated as electrophysiological. It was observed that acetamiprid changed the action potential parameters of sciatic nerve according to control group. Acetamiprid decreases amplitude and field whereas it increases latency and period which are the sciatic nerve action potential parameters. We see that it decreases catalase and ACh activity and increases MDA level. As a result of histopathological researches, heavy damage in nerve was observed just in the dose group which acetamiprid was applied, ovoid corpus formation in myelin tunic and fragmentation formation was determined. On the other hand, it was seen that; this effect decreased in dose group which acetamiprid was applied with antagonist. Acetamiprid increased period and field of the nerve action potential dose and application time dependent from first 30 minutes but decreased depolarization period significantly. Electrophysiological effects was supported by investigating the biochemical and histopathological effects of acetamiprid on sciatic nerve too.

Key words: Neonicotinoid insecticide, Acetamipridin, nicotinic acetylcholine receptor

TEŞEKKÜR

Tez araştırmamı yönlendiren, çalışmalarım süresince desteğini eksik etmeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Yusuf ÇAMLICA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü bilgi, tecrübe, maddi ve manevi destek olan ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Laboratuvarlarını kullanmama izin veren Sayın Hocam Prof. Dr. Ülkü ÖMELEKOğLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embiryoloji Laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Hocam Prof.Dr. Necat YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda sağladığı kolaylıklar için, MEÜ Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana sağladığı maddi manevi desteklerinden ötürü sevgili nişanım Yasemin ER ve ailem başta olmak üzere Metin YILDIRIM ve sayın hocam Pınar ÇEVİK'e teşekkür ederim.

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix

1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	2
2.1. İNSEKTİSİTLER	2
2.1.1. Neonikotinoidler	3
2.1.1.1. Acetamiprid.....	4
2.2. İyon Kanalları	5
2.2.1. Nikotonik Asetilkolin Reseptörleri.....	8
2.3. DeneYlerde Kullanılan Kurbağalar Hakkında Genel Bilgi.....	8
2.3.1. Morfolojik karakterler.....	8
2.3.2. Ekolojik ve Biyolojik Özellikler.....	9
2.3.3. Coğrafi Dağılışı ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. DeneY Hayvanları.....	10
3.1.1. DeneY Hayvanlarının Yakalanması	10
3.1.2. DeneY Hayvanlarının Diseksiyonu.....	10
3.1.3. Etik Kurul İZni.....	10
3.2. ÇöZeltilerin Hazırlanışı.....	11
3.3. DeneYlerin Yapılışı.....	11
3.3.1. Elektrofizyolojik DeneYler.....	11
3.3.2. Biyokimyasal DeneYler.....	12
3.3.2.1. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	12
3.3.2.2. Malondialdehit Ölçümü.....	13
3.3.2.3. Protein Ölçümü (Lowry Metodu).....	14

3.3.2.4. Asetilkolinesteraz Tayini.....	16
3.3.3. Histolojik Deneyler.....	16
3.4. Deneyde Kullanılan Cihazlar.....	17
3.5. İstatiksel Değerlendirmeler.....	19
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	20
4.1. Bulgular.....	20
4.1.1. Acetamidridin genlik üzerine etkileri.....	20
4.1.2. Acetamidridin latans üzerine etkileri.....	23
4.1.3. Acetamidridin alan üzerine etkileri.....	26
4.1.4. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri.....	30
4.1.5. Acetamidridin Katalaz Üzerine Etkileri.....	33
4.1.6. Acetamidridin Malondialdehit Üzerine Etkileri.....	34
4.1.7. Acetamidridin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkileri.....	35
4.1.8. Acetamidridin Siyatik Sinir Üzerine Histolojik Etkileri.....	37
4.2. TARTIŞMA.....	45
4.2.1. Acetamidridin genlik üzerine etkileri.....	45
4.2.2. Acetamidridin latans üzerine etkileri.....	46
4.2.3. Acetamidridin alan üzerine etkileri.....	47
4.2.4. Acetamidridin aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri.....	48
4.2.5. Acetamidridin Katalaz Üzerine Etkileri.....	50
4.2.6. Acetamidridin Malondialdehit Üzerine Etkileri.....	51
4.2.7. Acetamidridin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkileri.....	52
4.2.8. Acetamidridin Siyatik Sinir Üzerine Histolojik Etkileri.....	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
ÖZ GEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsektisitlerin Hedef Bölge Üzerine Etkileri.....	3
Şekil 2.2. Aksiyon potansiyeli depolarizasyonu ve repolarizasyonu.....	7
Şekil 3.1. Kurbağa Diseksiyonu.....	10
Şekil 3.2. BIOPAC MP 100 A elektrofizyolojik kayıt istasyonu.....	18
Şekil 3.3. Sinir-aksiyon potansiyeli kayıt kutusu ve kayıt alınan siyatik sinir preparatı.....	18
Şekil 3.4. Elektrofizyoloji ölçümlerinde değerlendirilen parametreler.	19
Şekil 4.1. Acetamipridin uygulama süresine bağlı genlik üzerine etkileri.....	20
Şekil 4.2. 1×10^{-3} M acetamipridin (1. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.....	21
Şekil 4.3. 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin (7. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.	21
Şekil 4.4. 1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin (5. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.	22
Şekil 4.5. Acetamipridin uygulama süresine bağlı latans üzerine etkileri.....	23
Şekil 4.6. 1×10^{-4} M acetamipridin (2. grup) uygulama süresine bağlı aksiyon potansiyeli üzerine etkileri.....	24
Şekil 4.7. Acetamipridin uygulama süresine bağlı alan üzerine etkileri.....	26
Şekil 4.8. 1×10^{-5} M acetamipridin (3. grup) uygulama süresine bağlı olarak aksiyon potansiyeli üzerine etkileri.....	27
Şekil 4.9. 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin (6. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.	27
Şekil 4.10. 1×10^{-6} M acetamipridin (4. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.....	30
Şekil 4.11. Acetamipridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.....	31
Şekil 4.12. Acetamipridin katalaz aktivitesi üzerine doza bağlı etkileri.....	34
Şekil 4.13. Acetamipridin MDA düzeyi üzerine doza bağlı etkileri.....	35
Şekil 4.14. Acetamipridin asetilkolinesteraz düzeyi üzerine doza bağlı etkileri.....	36
Şekil 4.15. Kontrol grubu. Normal görünümüne sahip sinir lifleri (X5.000).....	37

Şekil 4.16. 1.grup. Sıkışmış aksoplazma (yıldız), fragmante miyelin kılıf ve ovoid cisimler (ok başı) (X6.000).....	38
Şekil 4.17. B grubu. Miyelin ovoid cisim (ok başı), fokal ayrılmalar (ok), vakuoler yapı (yıldız) (X6.000).....	39
Şekil 4.18. 3. grup. Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıfta fokal ayrılmalar (ok) (X5.000).....	40
Şekil 4.19. 4. grup Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıf kaybı (ok) (X5.000)....	41
Şekil 4.20. 5.grup. Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme (ok), endonöryumda makrofaj (yıldız) (X5.000).....	42
Şekil 4.21. 6. grup. Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme (ok) (X5.000).....	43
Şekil 4.22. 7. grup. Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıf ayrılmaları (ok) (X6.000).....	44

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Kullanılan agonist ve antagonistlerin uygulanma süreleri ve dozları.....	11
Tablo 4.1. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkileri.....	22
Tablo 4.2. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli latansı üzerine etkileri.....	25
Tablo 4.3. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli alanı üzerine etkileri.....	29
Tablo 4.4. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri.....	32



SİMGELER ve KISALTMALAR

M	:Molar
mM	:Milimolar
V	:Volt
mV	:Milivolt
nm	:Nanometre
L	:Litre
mL	:Mililitre
μ l	:Mikrolitre
s	:Saniye
ms	:Milisaniye
mg	:Miligram
rpm	:Dakikadaki devir sayısı
Na ⁺	:Sodyum İyonu
K ⁺	:Potasyum İyonu
Ca ⁺⁺	:Kalsiyum İyonu
Cl ⁻	:Klor İyonu
nAChR	:Nikotonik Asetilkolin Reseptörü
AChE	:Asetilkolinesteraz
Ach	:Asetilkolinin

1. GİRİŞ

İnsektisitler bitki veya hayvanlara zarar veren organizmaların öldürülmesi, uzaklaştırılması, ya da kontrol edilmesi amacıyla dünya çapında yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunların tipi, dozu ve çevrede bulunma süresine bağlı olarak kalıntıları, yararlı böcekler gibi hedef olmayan türlerin üreme ve hayatta kalma oranlarında azalmaya neden olabilmektedir. İnsektisitler klorlu hidrokarbonlular, organofosforlu bileşikler, metilkarbamatlar, piretroidler ve neonikotinoid insektisitler olmak üzere beş ana gruba ayrılırlar. Acetamiprid, ürün zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan bir neonikotinoid insektisittir [1].

Acetamiprid'in ve antagonisti olan tubokurarinin kurbağa siyatik siniri üzerine olan etkileri *in vitro* koşullarda, doza ve uygulama süresine bağlı olarak araştırılmıştır. Acetamiprid ile ilgili literatür araştırması yapılmış ve bu insektisit kurbağa siyatik siniri üzerine etkilerinin daha önce çalışılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada acetamipridin kurbağa siyatik siniri aksiyon potansiyeli üzerine etkileri elektrofizyolojik olarak araştırılmıştır. Acetamipridin siyatik sinir üzerine elektrofizyolojik etkilerinin yanı sıra biyokimyasal ve histopatolojik etkileri de incelenmiştir. Histopatolojik incelemelerde siyatik sinirde meydana gelen doku hasarları araştırılmıştır. Biyokimyasal çalışmalarda ise acetamipridin oksidatif stres üzerine etkileri de incelenmiştir. Multidisipliner çalışma sonucu elde edilen verilerin, insan ve çevre sağlığı bakımından farkındalık oluşturması ve bu alanda literatüre katkı yapılması beklenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, neonikotinoid bir insektisit olan acetamiprid ve antagonisti tubokurarinin kurbağa siyatik siniri üzerine etkilerini araştırmaktır. Acetamiprid ve tubokurarinin kurbağa siyatik siniri üzerine *in vitro* koşullarda doza ve uygulama süresine bağlı etkileri elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle multidisipliner olarak incelenmiştir.

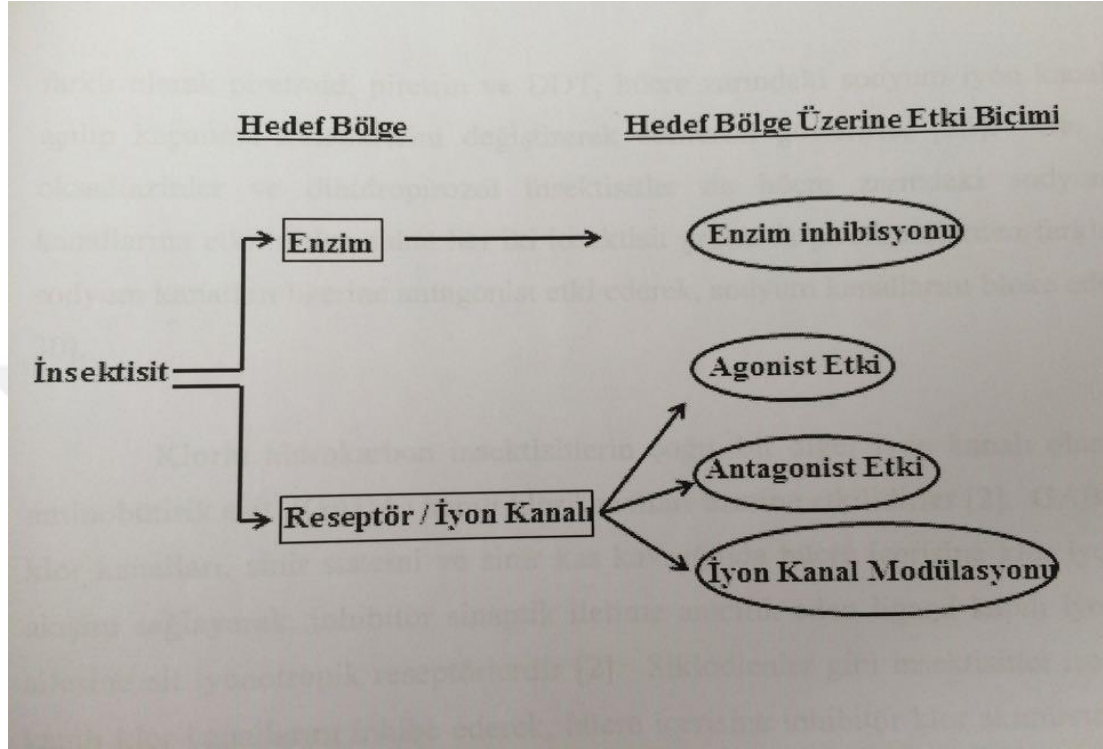
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İNSEKTİSİTLER

İnsektisitler başta tarım bitkilerini tehdit eden ve bulaşıcı hastalıkları taşıyan böceklerin kontrolünde kullanılan biyolojik veya sentetik kökenli maddelerdir [2]. Özellikle tarımda 1930'lu yıllardan itibaren modern sentez kimyasındaki devrim ile birlikte çeşitli sentetik insektisitler üretilmiştir [3]. Her yıl Dünya'da 300.000 kişi kendilerinin kullandığı kırsal pestisit kullanımından zehirlenip ölmektedir. Gelişen dünyada tarım ilaçları yaygın olarak küçük ölçekli tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu zehirlenme sanayileşmiş ülkelerde çok daha az görülmektedir [4]. Zirai ilaç sektörü, çevre ve tüketiciler için güvenli olan yeni bitki koruma faktörlerinin geliştirilmesi için, artan talep ve aynı zamanda ürün zararlılarının ortaya çıkmasıyla ilgili mücadele konusunu da içeren büyük bir gelişimle karşı karşıyadır [5].

Böcek gelişimini etkileyen insektisitlerin dışında kalan insektisitlerin hemen hemen hepsi nörotoksik maddeler olup; başta böcekler olmak üzere canlıların sinir sistemi üzerine etki ederler [3]. Neonikotinoid insektisitler nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerine etki eden bileşiklerdir. Bu insektisitler özellikle yaprak bitleri, ak sinekler ve bitki pireleri gibi hemipteran haşere türlerinin yanı sıra, ticari olarak birçok koleopteran ve bazı lepidopteran haşere türlerinin kontrolünde kullanılmaktadır. Bu insektisit sınıfının en önemli elemanı imidaklopriddir [6]. İnsektisitlerin hedef bölgeleri, canlı organizmada insektisit molekülünün etkileşime girerek toksik etkilerini ortaya çıkarabilecekleri spesifik biyokimyasal veya fizyolojik bölgelerdir. [7] Nörotoksik insektisitlerin hedef bölgeleri, böcek sinir sistemindeki enzimler, iyon kanalları veya reseptörleridir [8]. İnsektisitlerin hedef bölgeleri üzerinde etkileri farklı olup, enzim inhibisyonundan, reseptör üzerine agonist veya antagonist etki ve iyon kanal modülasyonuna kadar çok çeşitlilik gösterir [7]. Organafosforlu bileşikler ve karbamat insektisitler asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe ederek, sinir sistemi sinaplarında asetilkolinin (ACh) postsinaptik reseptöre bağlanma süresini uzatır [7, 9].

Asetilkolinesteraz enzimini, organofosforlu bileşikler geri dönüşümsüz inhibe ederken, karbamatlar geri dönüşümlü inhibe ederler [7]. Sonuç olarak her iki grup insektisit, organizmayı uzayan nöroeksitasyon nedeniyle öldürür.



Şekil 2.1. İnsektisitlerin Hedef Bölge Üzerine Etkileri

2.1.1. Neonikotinoidler

Neonikotinoidler, hem bir nitrometilen ve nitroimin, hem de siyanoimin grubuna sahip yeni sentetik insektisit grubudur [10]. Nitrometilenler ilk olarak 2-pirimidin yapısında olan ve zayıf insektisit etkisine sahip bir bileşikten köken almıştır. Bu prototip üzerindeki ilk yapı-aktivite çalışması, nithiazinin bulunmasını sağlamıştır [11].

Yapısal olarak nikotine benzerlik gösteren neonikotinoidler, etkileri bakımından da nikotine benzerlik gösterir. Nikotin yüzlerce yıl geneleksel tarımda doğal bir insektisit olarak kullanılmıştır. Nikotin ile ilgili yapılan deneylerde, nikotinin böcek nAChR'lerine bağlanarak insektisit etkisi gösterdiği ortaya çıkarılmıştır [12].

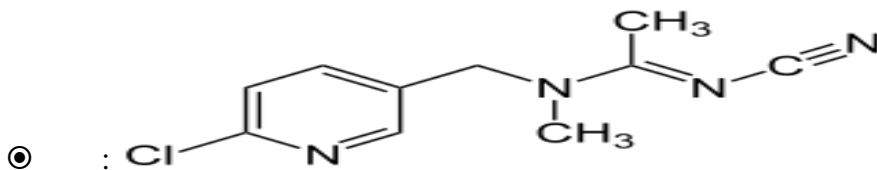
Fakat neonikotinoid gibi sentetik olarak üretilen yeni insektisitlerle karşılaştığında nikotin, hedef olmayan canlılara ve özellikle memelilere yüksek toksisite gösterir.

Nikotinin nAChR'leri üzerinde güçlü etkisine karşın ticari olarak bir biyopestisit olarak kullanılmamasının sebebi; sadece böcek nAChR'lerine değil; aynı zamanda diğer hayvanların nAChR'lerine de etki ederek seçicilik göstermemesinden dolayıdır [13]. Günümüzde neonikotinoidler, piretroidlerden sonra piyasaya sürülen en hızlı büyüyen insektisit sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Neonikotinoidler tarım zararlılarının kontrolü ve hayvan sağlığını koruma çalışmalarında geniş çaplı bir kullanım alanına sahiptirler [14].

2.1.1.1. Acetamiprid

Acetamiprid, ürün zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılan bir neonikotinoid insektisittir. Pamuk, tütün, patates, domates, fındık, turunçgil gibi ürünleri olumsuz etkileyen zararlı böcekleri yok etmek için kullanılmaktadır. Bu insektisit nörotoksik etkiye sahip olup, canlıların sinir sisteminde tahribata neden olmaktadır [15].

- IUPAC Adı : *N*-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-*N'*-cyano-*N*-methyl-acetamidine
- CAS Numarası : 135410-20-7
- Kapalı formülü : C₁₀H₁₁ClN₄
- Molekül ağırlığı : 222.68 g/mol
- Fiziksel görünümü : Beyaz Kristal
- Erime Noktası : 98.9° C
- Açık formülü



2.2. İyon Kanalları

İyon kanalları genellikle, kompleks yapılı çoklu alt ünitelere sahip transmembran proteinlerdir [16]. Bu yapıdaki kanallar, içi su dolu porlar şeklinde olup, uygun büyüklük ve elektrik yüküne sahip iyonların geçişine izin verirler. İyon kanalları, çok kısa süre için açılan ve derhal kapanan özel kapılara sahip olmaları nedeniyle membrandaki diğer protein oluşumlarından ayrılırlar [17]. İyon kanallarından geçen iyon akışı, birçok hücre işlevi için önemlidir. Özellikle sinir ve kas hücreleri, iyon kanallarını kullanabilme konusunda özelleşmişlerdir. Yaşamımızı sürdürecekt bütün fizyolojik oluşumlar büyük oranda bu kanalların işlevlerine bağlıdır. İyon kanalları temel olarak, liganda bağımlı iyon kanalları, voltaja bağımlı iyon kanalları ve mekanik kapılı iyon kanalları olarak sınıflandırılır. Voltaja bağımlı iyon kanalları, uyarılabilir hücrelerde (sinir ve kas hücrelerinde) voltaj değişimiyle aktive olan kanallardır. Voltaja bağımlı iyon kanalları başta aksiyon potansiyelinin oluşumu ve yayılması olmak üzere, eşik şiddetin belirlenmesi, dinlenme membran potansiyelinin kontrolü ve nörotransmitter salınımından doğrudan sorumludur [18].

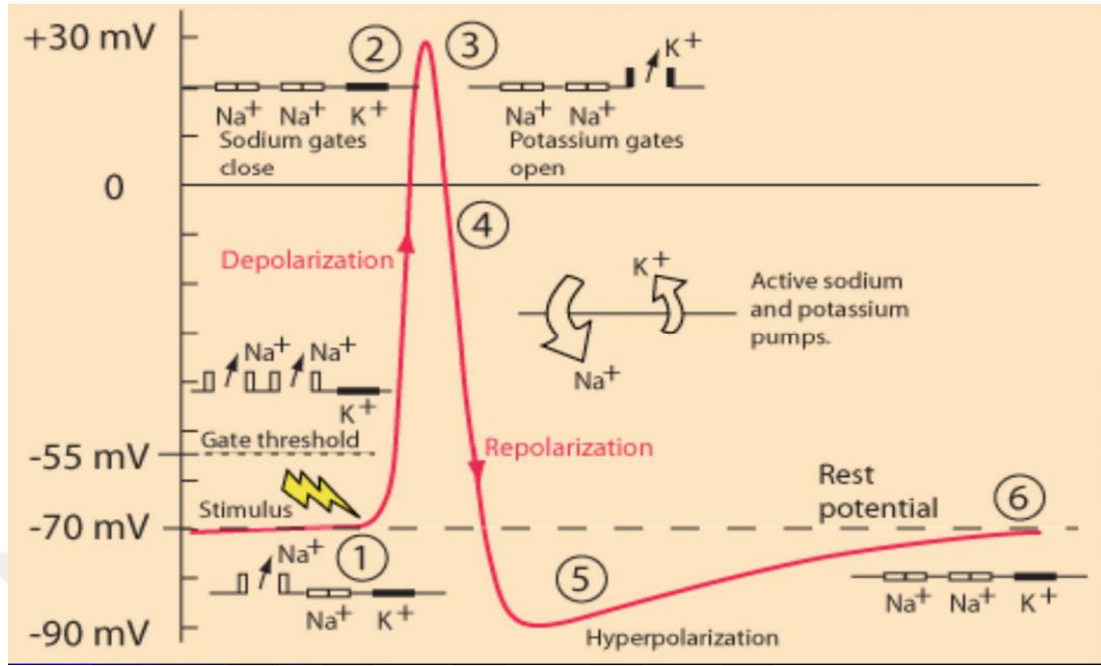
İstirahat membran potansiyeli genel olarak; -10 ila -100 mV arasında değişir. Kalın sinir liflerinin membran potansiyeli, sinir sinyallerinin iletilmediği istirahat durumunda yaklaşık -70 milivolt (mV)'dur. Membranın 2 yüzü arasındaki potansiyel farkı az olan hücreler (örneğin sinir), potansiyel farkı çok olan hücrelere göre (örneğin iskelet kası) daha kolay uyarılır. Bilindiği gibi uyarılabilen hücrelerde membran dinlenme potansiyelinin oluşmasında başlıca sodyum, potasyum, klor ve hücre içinden dışarı çıkamayan protein anyonları rol oynar. İstirahatte intrasellüler ortamda K^+ , hücre dışına nazaran 35 kat fazla olup; konsantrasyon gradientine bağlı olarak sızma kanallarından hücre dışına sızma eğilimindedir. Bu durum hücreye pozitif yük kaybettirir. Na^+ ise, hücre dışında içine nazaran 10 kat fazla olup; elektriksel gradiyente de sahiptir. Ancak, etrafındaki hidrat kılıfından dolayı Na^+ 'un sızma kanallarından hücre içine girmesi K^+ 'a nazaran 100 kat daha zordur. Dolayısı ile Na^+ 'un hücrenin pozitif yük kazanmasına fazla bir katkısı olmaz. Yine intrasellüler ortamda bulunan ve konsantrasyon gradiyentine rağmen zardan geçemeyen protein, fosfat ve sülfat gibi anyonlar da hücrede negatif yüklerin birikmesine yol açar.

İstirahat membran potansiyeline katkıda bulunan bir diğer faktör, Na^+ - K^+ pompası olup; sızma kanalları ile içeri kaçmış her 3 Na^+ 'u dışarı atarken; dışarı kaçmış 2 K^+ 'u içeri alarak; yük dengesini bozar ve içerdeki negatif yüklerin birikmesine yol açar. Cl^- ise hücre dışında daha yüksek konsantrasyonda olup, sızma kanallarından kolayca geçerek, gerekli durumlarda membran dinlenme potansiyelini negatifleştirir. Kısaca, membran istirahat potansiyelini -70 mV olarak belirleyen faktörler şunlardır;

- K^+ difüzyon potansiyeli
- Sinir membranından Na^+ difüzyonu
- Na^+ - K^+ pompası

Na^+ , K^+ giriş çıkışının düzenlenmesinde görevli membrandaki Na^+ - K^+ ATPaz sistemi, hücre dışına Na^+ çıkışını, hücre içine ise K^+ girişini sağlamaktadır ($\text{Na}^+/\text{K}^+= 3/2$). Na^+ kanallarının geçirgenliğinin artırılması sonucunda depolarizasyon, Na^+ kanallarının kapatılması ve K^+ kanallarının açılması ile repolarizasyon sağlanmaktadır. Dinlenme sırasında sinir hücre mebranının K^+ geçirgenliği, uyarı durumunda ise Na^+ geçirgenliği geçici olarak 600 kat artmaktadır.

Uyarılan sinirde, membran potansiyeli (-60 mV), eşik potansiyel değerine (-45mV) azalmakta ve voltaja duyarlı Na^+ girişi ile membran potansiyeli pozitif (+30 mV) olmakta ve aksiyon potansiyeli akson boyunca yayılmaya başlamaktadır. Na^+ hücreye alındığında aksonal mebrandaki komşu bölge depolarize olarak uyarılmakta ve Na^+ kanallarının açılmasını sağlamaktadır. Aksiyon potansiyelinin en önemli özelliği uyarılabilir hücre zarının üzerinde yayılmasıdır. Bir noktadan eşik üstü bir uyarı ile uyarılan bir hücrenin aksiyon potansiyeli, bütün zar yüzeyine yayılır. Akson gövdesinde, dinlenme halinde zar potansiyeli iç tarafta negatif, dış tarafta pozitifdir. Aksiyon potansiyeli hücre gövdesinde başladığında ilk önce açılan kanallar Na^+ kanallarıdır. Sinire bir ucundan uyarı uygulandığında uyarının etrafında zar potansiyeli, iç taraf pozitif dış taraf ise negatif olacak şekilde değişir.



Şekil 2.2. Aksiyon potansiyeli depolarizasyonu ve repolarizasyonu

Sodyum iyonları aniden hücre içine girmeye başlar ve milisaniyeler içinde yeni bir denge kurulur. Hücre zarının iki tarafı arasındaki potansiyel farkı bir anda 100 mV'a kadar değişir. Zar potansiyeli, hücre içinde negatif (yaklaşık -70 mV) olduğu değerden pozitif (yaklaşık +35 mV) olan bir değere değişir (depolarizasyon) (Şekil 2.2.1.). Depolarize olan bölge, depolarize olmamış komşu bölgeleri etkiler ve komşu bölgelerin iç yüzeylerini nötrleştirmeye çalışır. Bu şekilde iç yüzeyde bir iç yüzey akımı başlar. Dış yüzeyde ise bir dış yüzey akımı oluşur. Bu durumda bu bölgede bir dipol meydana gelir. Bu dipol, komşu bölgelerin hücre içi potansiyellerini eşik değerinin üzerine taşıyacak güçte olduğundan komşu bölgeler de depolarize olmuş olur. Bu arada daha önce depolarize olmuş olan bölge eski haline döner yani depolarize olur. Bu durum, aksiyon potansiyeli darbesi aksonun sağ ucunda sonlanana kadar devam eder. Sol uca gelmiş olan darbe buradan aksonun sağ tarafına doğru geri dönemez. Çünkü aksonun sağ tarafında kalan bölge dinlenim (refrakter) halindedir ve bir süre uyarılamaz, uyarılsa da depolarize olamaz. Bu bölgenin tekrar depolarize olabilmesi için belli bir sürenin geçmesi gerekir.

Bu şekilde belli bir darbe sıklığına yani frekansına kadar aksiyon potansiyeli darbeleri iletilmiş olur. Böylece sinir boyunca bilgi iletimi gerçekleşir.

2.2.1. Nikotonik Asetilkolin Reseptörleri

Nikotonik asetilkolin reseptörleri hem omurgalı, hem de omurgasızlarda eksitatör bir nörotransmitter olan ACh'ye duyarlı ligand kapılı iyon kanallarıdır [19]. Normal şartlar altında, sinir kas kavşağında iskelet kas membranlarında bulunan nAChR'lerine ACh'nin bağlanması ile birlikte kanalın açılması ve sodyum iyonları başta olmak üzere çok sayıda pozitif yüklü iyonun hücre içerisine hızlıca girişi gerçekleşir. Bu şekilde hücre membranında oluşan depolarizasyon, kas lifi membranından son plak potansiyeli denilen lokal bir potansiyel değişikliği oluşturur. Son plak potansiyeli daha sonra kas membran boyunca yayılan aksiyon potansiyelini başlatır ve böylece kolinerjik iletim gerçekleşmiş olur [20].

2.3. Deneylerde Kullanılan Kurbağalar Hakkında Genel Bilgi

Diğer *Rana* türleri için karakteristik olan temporal şerit *Rana ridibunda* bireylerinde görünmez. Erkek bireylerinde ağzın hemen arkasında yarıklar halinde dış ses keseleri bulunur. Bu hayvanlar suyu seven canlılar olup su içinde, su kenarında veya su yüzeyindeki cisimler üzerinde bulunurlar. Bu canlılar, deneylerde kullanılmaktadır ayrıca, bu türün but kısımları yenmektedir ve ihraç ürünü olarak satılmaktadır [21, 22].

2.3.1. Morfolojik karakterler

Vomer dişleri enine veya biraz eğik iki sıra halinde ve iç burun delikleri arasında bulunurlar ya da bu deliklerin arka hizasını biraz geçerler. Kulak zarı daima bariz olup temporal şerit yoktur. Arka bacaklar fazla uzun değildir ve tibio - tarsal eklem burun deliğine ulaşmaz. Arka ayaklar tam perdeli olup deri genellikle pürüklüdür. Erkeklerinde dış ses keseleri bulunur. Erkeklerin dişilerden diğer bir farkı da ön bacakların daha kuvvetli olması ve birinci parmakların kaide tarafında şişkinlik bulunmasıdır. Üreme zamanında bu şişkinliğin yüzey kısmında tırtıklar meydana gelir. Renk ve desen yönünden çok farklılıklar gösterebilirler.

Sırt tarafının zemin rengi yeşilimsi gri, açık veya koyu kahverengi ya da bu renklere yakın tonda olabilir. Karın tarafı, çoğunlukla kirliliğe veya sarımsıdır ve genellikle küçük lekeler bulunur.

Türkiye'de bulunan en büyük kuyruksuz kurbağa türüdür. Ergin dişileri 10 cm ve nadir olarak 15 cm kadar olabilirler. Dişiler erkeklere göre daha büyüktürler [21, 22].

2.3.2. Ekolojik ve Biyolojik Özellikler

Genel olarak suyu seven ve sudan çıkmayan bir türdür. Yaşam alanı olarak tercih ettikleri sular genellikle bol vejetasyonlu olan havuz ve göllerdir. Ülkemizde üreme en çok Mayıs ve Haziran aylarında gerçekleşmektedir. Bir dişi yaklaşık 5.000 - 10.000 kadar yumurta bırakabilir. Bunlar birkaç kitle halinde sucul bitkiler arasında veya açık suya bırakılır [21, 22].

2.3.3. Coğrafi Dağılışı ve Ülkemizde Bulunduğu Yerler

Bu tür coğrafi olarak Kuzey Afrika, Orta ve Güney Avrupa ile Batı Asya'da cins olarak ise, Avrupa ve Amerika'da hatta tek bir türle Avustralya'da yayılmıştır. Uygun biyotop olduğu takdirde ülkemizde her yerde bulunur [21, 22].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Deney Hayvanları

3.1.1. Deney Hayvanlarının Yakalanması

Kurbağalar Mersin Mezitli Deresi'nden yakalanmıştır. Kurbağalar yakalandıktan sonra, içerisinde su bulunan akvaryumda laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları amacı ile 5 gün boyunca dinlendirilmiş, sıcaklık ise 25-27° C'ye ayarlanmıştır [21, 22].

3.1.2. Deney Hayvanlarının Diseksiyonu

Kurbağalar kulak arkasından kesilerek spinal hale getirilmişlerdir. Daha sonra herhangi bir uyuşturucu madde kullanmadan ince bir tel yardımı ile vertebral kolona girilerek *medulla spinalis* (omurilik) tahrip edilmiştir. Böylece refleks merkezi ortadan kaldırılmış ve kurbağalar hareketsiz hale getirilmiştir [23].



Şekil 3.1 Kurbağa Diseksiyonu

3.1.3. Etik Kurul İzni

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 27.03.2014 tarih ve 2014/10 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.2 Çözeltilerin Hazırlanışı

Deneyleerde neonikotinoid insektisitlerden acetamiprid ve bir neonikotinoid antagonisti olan tubokurarin kullanılmıştır. Analitik terazi kullanılarak acetamipridin önce Ringer çözeltisi içinde 10^{-3} M'lık stok çözeltileri (1. grup) hazırlanmıştır. Stok çözeltiden seyreltme işlemi yapılmıştır ve 10^{-4} (2. grup), 10^{-5} (3. grup) ve 10^{-6} M'lık (4. grup) acetamiprid ile 10^{-3} M acetamiprid + 10^{-2} M tubokurarin (5. grup), 10^{-5} M acetamiprid + 10^{-4} M tubokurarin (6. grup) ve 10^{-6} M acetamiprid + 10^{-5} M tubokurarin çözeltileri (7. grup) 1mL'lik hacimlerde hazırlanmıştır.

3.3 Deneyleerin Yapılışı

3.3.1. Elektrofizyolojik Deneyleer

Sinir aksiyon potansiyeli deneyleeri, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan agonist ve antagonistlerin uygulanma süreleri ve dozları.

Süre Doz	0. dk (Kontrol)	30. dk	60. dk	90. dk	120. dk
1. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-3} M acetamiprid	1×10^{-3} M acetamiprid	1×10^{-3} M acetamiprid	1×10^{-3} M acetamiprid
2. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-4} M acetamiprid	1×10^{-4} M acetamiprid	1×10^{-4} M acetamiprid	1×10^{-4} M acetamiprid
3. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-5} M acetamiprid	1×10^{-5} M acetamiprid	1×10^{-5} M acetamiprid	1×10^{-5} M acetamiprid
4. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-6} M acetamiprid	1×10^{-6} M acetamiprid	1×10^{-6} M acetamiprid	1×10^{-6} M acetamiprid
5. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-6} M acetamiprid + 1×10^{-5} M tubokurarin	1×10^{-6} M acetamiprid + 1×10^{-5} M tubokurarin	1×10^{-6} M acetamiprid + 1×10^{-5} M tubokurarin	1×10^{-6} M acetamiprid + 1×10^{-5} M tubokurarin
6. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-5} M acetamiprid + 1×10^{-4} M tubokurarin	1×10^{-5} M acetamiprid + 1×10^{-4} M tubokurarin	1×10^{-5} M acetamiprid + 1×10^{-4} M tubokurarin	1×10^{-5} M acetamiprid + 1×10^{-4} M tubokurarin
7. Grup	Ringer çözeltisi	1×10^{-3} M acetamiprid + 1×10^{-2} M tubokurarin	1×10^{-3} M acetamiprid + 1×10^{-2} M tubokurarin	1×10^{-3} M acetamiprid + 1×10^{-2} M tubokurarin	1×10^{-3} M acetamiprid + 1×10^{-2} M tubokurarin

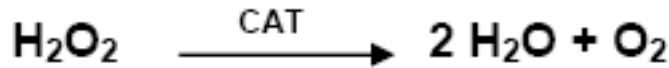
Deney sırasında 56 kurbağadan izole edilen 56 siyatik sinir (*Nervus ischiadicus*) preparatı çalışılmıştır. Deneylerde ekstraselüler elektrofizyolojik kayıt yöntemi kullanılmıştır.

Deneyler 7 farklı grup olarak planlanmıştır. İlk 4 grup acetamidridin 4 farklı dozundan, sonraki 3 grup ise, acetamidrid ile tubokurarin kombinasyonunun farklı dozlarından hazırlanmıştır. Çalışma süresi boyunca Ringer Çözeltisi 26⁰ C'de olup kontrol grubu olarak aldığımız ilk kayıtlar 120 dakika Ringer Çözeltisi içinde bekletilmedi. Bu gruplarda neonikotinoid insektisit olan acetamidrid ve antagonisti tubokurarinin *Rana ridibunda* siyatik siniri aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden genlik, latans, alan ve süre incelenmiştir (N= 8). Doz gruplarıyla siyatik sinirleri muamele etmeden önce her sinirden kontrol kayıtları alınmıştır (0. dakika). Daha sonra doz grupları sinirler üzerine uygulanmış ve her 30 dakikada bir olmak üzere 120 dakika boyunca aksiyon potansiyeli kayıtları alınmıştır. Bütün deneyler eşit şartlar altında ve oda sıcaklığında (26⁰ C) yapılmıştır.

3.3.2. Biyokimyasal Deneyler

3.3.2.1. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi tayini Aebi 1984 tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı. Yöntemin esası, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkımının 240 nm'de izlenmesidir.



Kullanılan Reaktifler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0.681 g KH₂PO₄ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2.77 g Na₂HPO₄.12H₂O bidistile suda çözülerek 155 mL'ye tamamlandı.

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

Hidrojen Peroksid Çözeltisi (30 mM): 34 µL %30 luk H₂O₂ 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Kuvarz spektrofotometre küvetlerine 10 µL 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 µL fosfat tamponu ilave edildi. Örnek küvetine 1 mL 30 mM H₂O₂, kör küvetine de 1 mL fosfat tamponu ilave edildi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 1 dakika boyunca 240 nm'de izlendi.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

Hidrojen peroksidin enzimatik yıkılması mevcut peroksid oranı derişimi ile orantılı bir hızda, birinci derece tepkime yürütülmektedir. Bu esasa dayanarak ve aşağıdaki formül kullanılarak katalazın spesifik aktivitesi ünite cinsinden hesaplanmıştır

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

3.3.2.2. Malondialdehit Ölçümü

Ohkawa ve arkadaşlarının 1979 yılında buldukları yöntem ile lipid peroksidasyon ürünlerinin tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki tepkime sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

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 distile su ile 100 mL'ye tamamlanır pH'sı 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.

Deneyin Yapılışı:

	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 beyazlaşmıncaya kadar vortekslenir. 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenir. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

MDA Düzeyinin Hesaplanması:

Aşağıdaki formül kullanılarak homojenizattaki MDA düzeyi hesaplanır.

$$\text{Derişimi (nmol/mL)} = \frac{\text{Örnek absorbansı} \times 60,5}{1/10 \text{ Standart absorbansı}}$$

3.3.2.3. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)

Deneyin Prensibi: Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein derişimi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan Reaktifler:

A Reaktifi: 0.1 N NaOH çözeltisi kullanılarak %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi hazırlanır.

B₁ Reaktifi: %1'lik CuSO₄.5H₂O çözeltisi hazırlanır.

B₂ Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlanır.

B Reaktifi: B₁ ve B₂ eşit hacimde karıştırılır.

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1 mL A reaktifi eklendi. Reaktif taze hazırlanmalı ve bekletilmeden kullanılmalıdır.

D Reaktifi: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile karıştırılır.

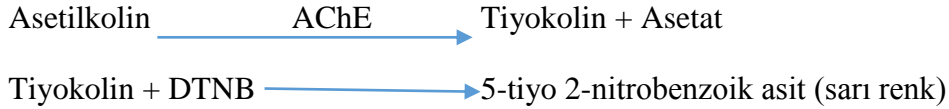
Protein standardı: 250 mg/100 mL bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/mL protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

	Kör tüpü	Numune tüpü	Standart
Numune (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dakika beklendi.			
D reaktifi(µL)	300	300	300

Tüpler vortekslenerek 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okundu.

3.3.2.4. Asetilkolinesteraz Tayini

Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile benzoik asit (5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) – DTNB)'in reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo 2-nitrobenzoik asit oluşur. Tepkime sırasında oluşan rengin şiddeti, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.



3.3.3. Histolojik Deneyler

Elektron mikroskopik inceleme için alınan siyatik sinir dokusu 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 6 saat % 2.5'lik gluteraldehit çözeltisinde bekletilerek tespit edildi. 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 1saat
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. Resin içine gömme işlemi
20. Etüvde (60 °C) polimerizasyon 24 saat

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

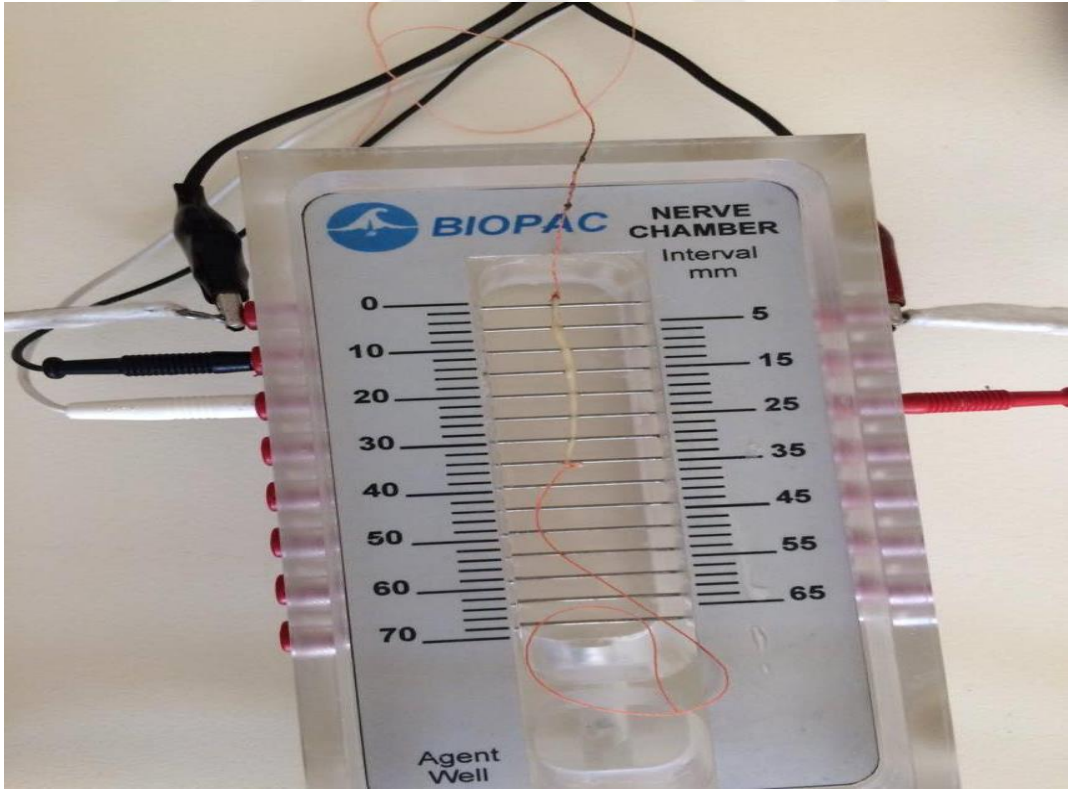
Epoksi resin içine gömülen dokulardan Leica Ultracut UCT 125 ultramikrotom (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) ile önce 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Bu kesitler incelenerek uygun alanlar saptandı. Daha sonra 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridler üzerine alındı. 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.

3.4. Deneyde Kullanılan Cihazlar

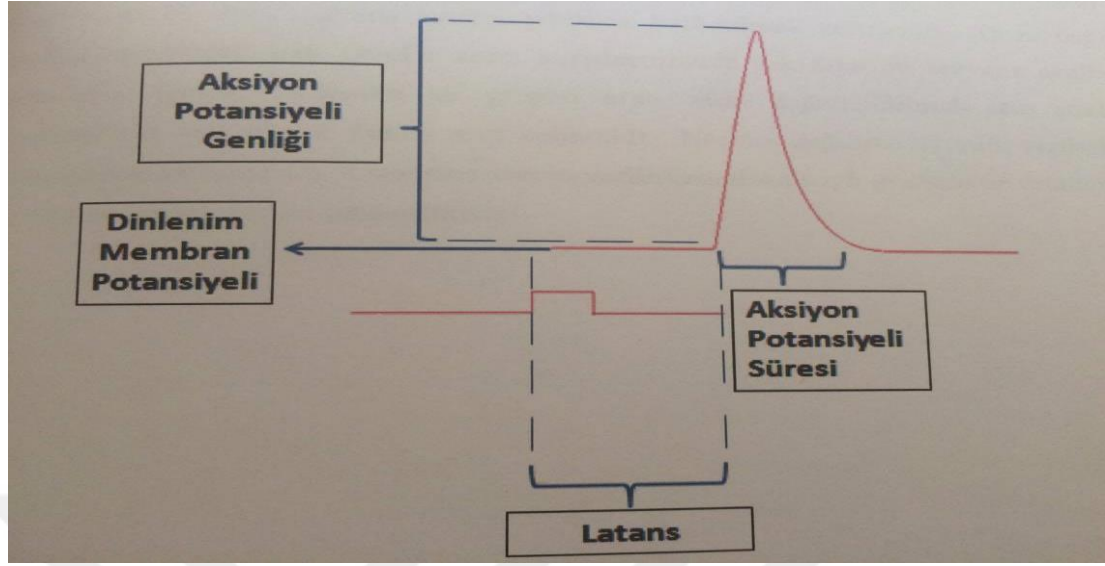
Elektrofizyolojik deneylerde, kayıt ve analiz için bilgisayar donanımlı BIOPAC MP 100 A elektrofizyolojik kayıt istasyonu kullanılmıştır. Bu cihazda bulunan stimülatör ile siyatik sinirler supramaksimal olarak uyarılmıştır. Bu uyarıya yanıt olarak oluşan birleşik sinir-aksiyon potansiyellerini yükseltmek için, ERS 100 B amplifikatör kullanılmıştır. Elde edilen sinyalleri sayısal verilere çevirmek ve bilgisayar ortamına aktarmak içinse A/D çevirici kullanılmıştır. Aksiyon potansiyeli kayıtlarında şeffaf pleksiglas ve % 99 saflıkta gümüş elektrotlardan yapılmış sinir-aksiyon potansiyeli kayıt kutusu kullanılmıştır [23].



Şekil 3.2. BIOPAC MP 100 A elektrofizyolojik kayıt istasyonu



Şekil 3.3. Sinir-aksiyon potansiyeli kayıt kutusu ve kayıt alınan siyatik sinir preparatı.



Şekil 3.4. Elektrofizyoloji ölçümlerinde değerlendirilen parametreler.

3.5 İstatistiksel Değerlendirmeler

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için, bu amaçla hazırlanmış paket programlar (Microsoft Excel ve SPSS 17) kullanılmıştır. Çalışılan bütün parametreler de önemlilik testi SNK (Student Newman Keuls) istatistik programı kullanılmıştır. Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edildi ve verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine bakıldı. Normal dağılım gösteren verilerde gruplar arası farklılık olup olmadığı Varyans Analizi (One Way ANOVA) ile test edildi. Normal dağılım göstermeyen verilerde ise gruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi kullanılarak saptandı. Her bir gruba ait doz ve zamana bağlı farklılıklar tekrarlanan ölçümlü deneme düzenlerinin analizi ile (Repeated measures ANOVA) incelendi. İstatistiksel anlamlı farklılık olarak $p < 0,05$ alındı.

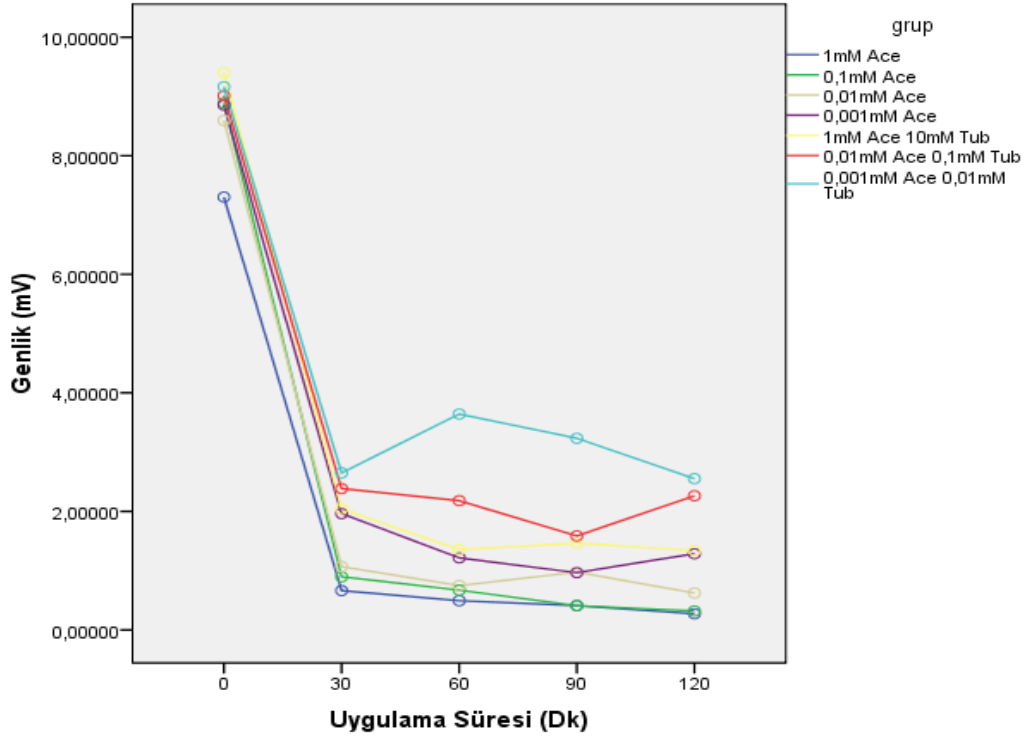
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

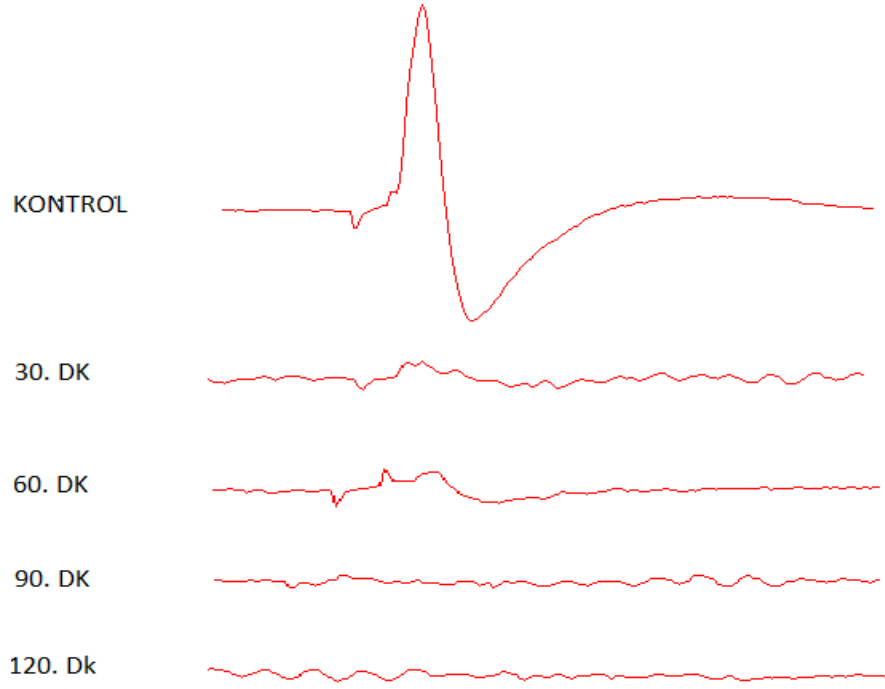
Neonikotinoid bir insektisit olan acetamipridin uygulanan her dört dozu da 30. dakikadan itibaren etkisini göstermiş olup bütün gruplarda genel olarak sinir aksiyon potansiyelini etkilemiştir.

4.1.1. Acetamipridin genlik üzerine etkileri

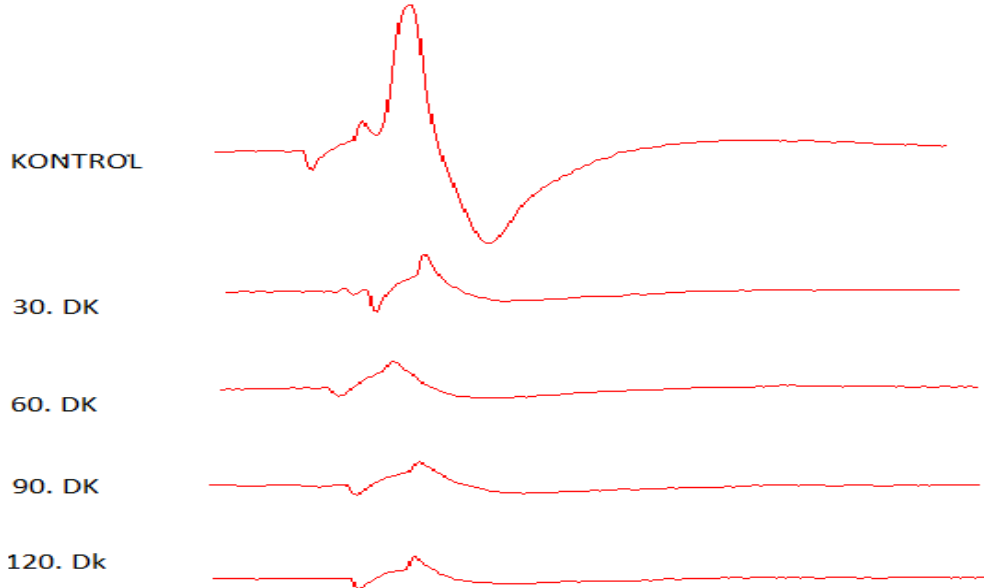
Acetamipridin bütün doz grupları uygulama süresine bağlı olarak *Rana ridibunda* siyatik sinir aksiyon potansiyeli genliğini kontrol grubuna (0. dk) göre anlamlı biçimde düşürmüştür (şekil 4.1.). Buna karşılık doz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman genlik üzerine uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalardaki etkilerinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Acetamiprid ilk 30. dakikada etkisini göstermiş olup 120. dakika sonunda uygulama süreleri karşılaştırıldığı zaman genlikte meydana gelen azalmanın arttığı, fakat bu azalmaların anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($P<0,05$).



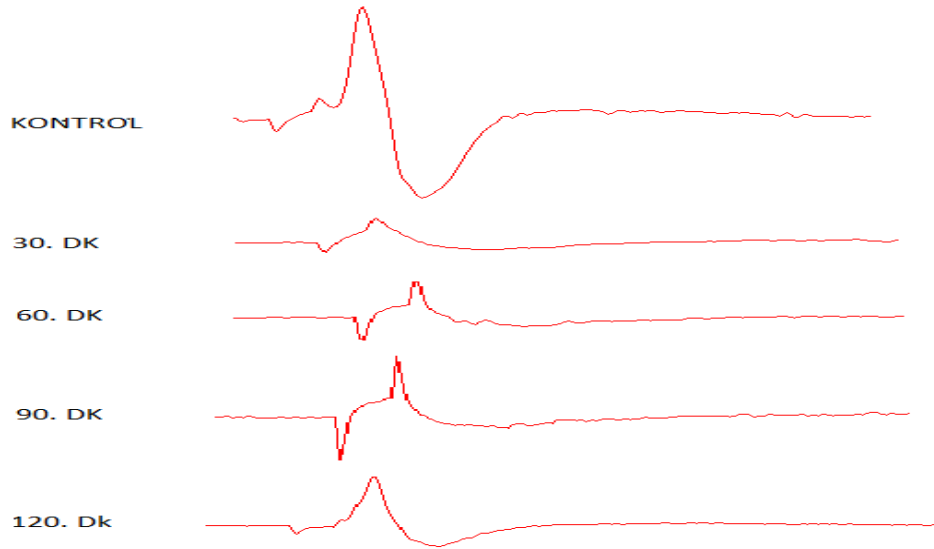
Şekil 4.1. Acetamipridin uygulama süresine bağlı genlik üzerine etkileri



Şekil 4.2. 1×10^{-3} M acetamipridin (1. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri



Şekil 4.3. 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin (7. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.



Şekil 4.4. 1×10^{-6} M acetamidrid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin (5. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.

Tablo 4.1. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkileri

DERİŞİMLER (M)	UYGULAMA SÜRESİ (dakika)				
	Kontrol (0)	30	60	90	120
	$\bar{X} \pm Sx$ *	$\bar{X} \pm Sx$ *	$\bar{X} \pm Sx$ *	$\bar{X} \pm Sx$ *	$\bar{X} \pm Sx$ *
10^{-3} ace	7,30 ± 0,75 ax	0,66 ± 0,14 bx	0,49 ± 0,15 bx	0,41 ± 0,1 bx	0,27 ± 0,11 bx
10^{-4} ace	8,88 ± 0,52 bx	0,89 ± 0,36 bx	0,67 ± 0,25 bx	0,4 ± 0,13 bx	0,32 ± 0,1 bx
10^{-5} ace	8,59 ± 0,64 bx	1,06 ± 0,23 bx	0,74 ± 0,17 bx	0,97 ± 0,21 bx	0,62 ± 0,18 bx
10^{-6} ace	8,85 ± 0,42 bx	1,96 ± 0,73 bx	1,21 ± 0,23 bx	0,96 ± 0,23 bx	1,28 ± 0,31 bx
10^{-6} ace+ 10^{-5} tubo	9,40 ± 0,51 bx	2,04 ± 1,29 bx	1,35 ± 1,56 bx	1,46 ± 0,75 bx	1,33 ± 1,27 bx
10^{-5} ace+ 10^{-4} tubo	9,01 ± 0,46 bx	2,38 ± 1,16 bx	2,18 ± 1,19 bx	1,58 ± 0,58 bx	2,26 ± 1,22 bx
10^{-3} ace+ 10^{-2} tubo	9,16 ± 0,5 bx	2,64 ± 0,3 bx	3,64 ± 1,29 bx	3,23 ± 0,18 bx	2,55 ± 0,11 bx

$\bar{X} \pm s_x$ = Aritmetik ortalama ± Standart hata

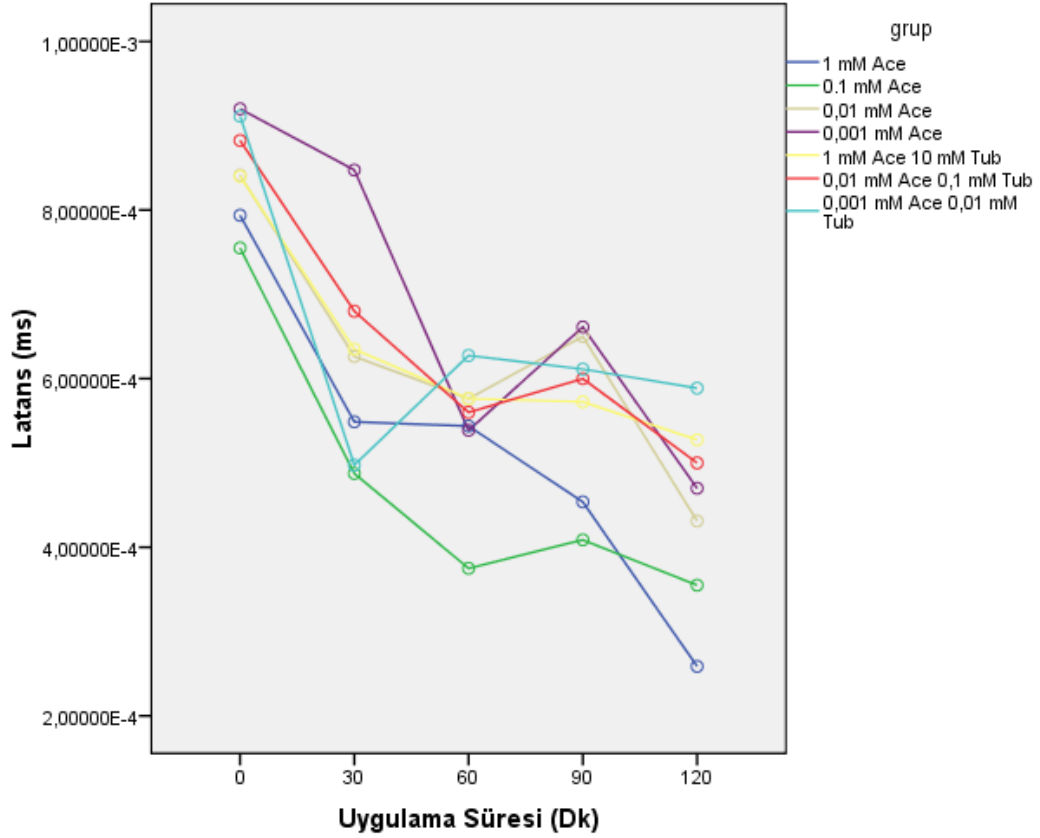
* = SNK (Student Newman Keuls); a ve b derişimler arası; x ve y uygulama süreleri arasındaki ayırımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0,05$ düzeyinde fark vardır.

4.1.2. Acetamidridin latans üzerine etkileri

1×10^{-3} M acetamidridin (1. grup) sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden latansı uygulama süresine bağı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0. dk) grubuna göre önemli biçimde artırırken (şekil 4.5.), uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0,05$).

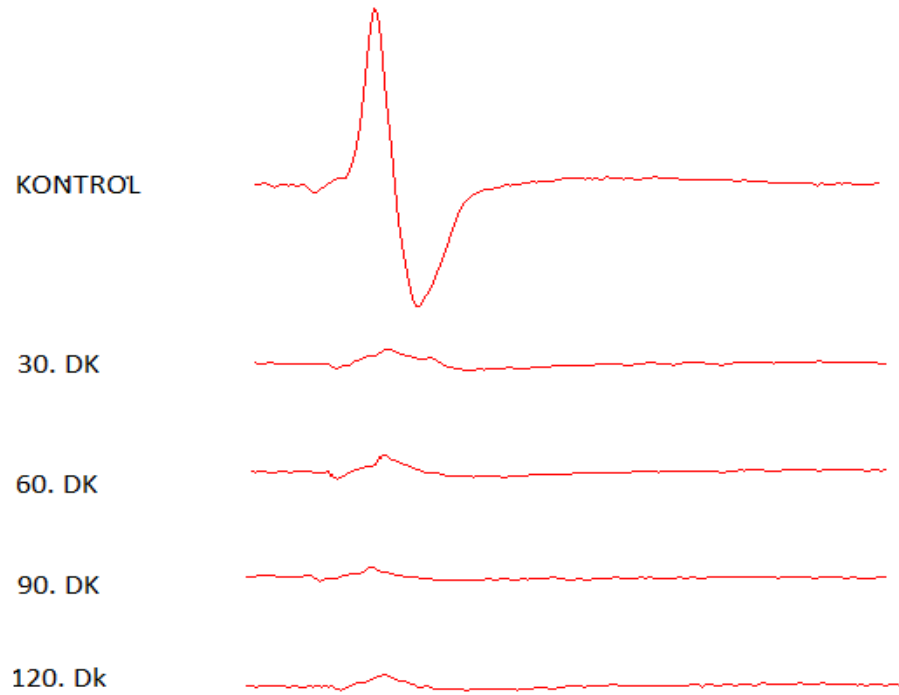
1×10^{-4} M acetamidrid (2. grup) latansı uygulama süresine bağı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artırırken, uygulama süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P > 0,05$).



Şekil 4.5. Acetamidridin uygulama süresine bağı latans üzerine etkileri

1×10^{-5} M acetamiprid (3. grup) latansı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid (4. grup) latansı uygulama süresine bağlı olarak 60 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmış fakat 30.dk ve 90.dk'larda insektisit etkisine bağlı olarak meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman acetamipridin latans üzerine 60 ve 120. dakikalarda meydana getirdiği artış, 30 ve 90. dakikalardaki artıştan fazla olmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. 1×10^{-4} M acetamipridin (2. grup) uygulama süresine bağlı aksiyon potansiyeli üzerine etkileri

Tablo 4.2. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli latansı üzerine etkileri

DERİŞİMLER (M)	UYGULAMA SÜRESİ (dakika)				
	Kontrol (0)	30	60	90	120
	$\bar{X} \pm \bar{sx}^*$	$\bar{X} \pm \bar{sx}^*$	$\bar{X} \pm \bar{sx}^*$	$\bar{X} \pm \bar{sx}^*$	$\bar{X} \pm \bar{sx}^*$
10^{-3} ace	0,000794 ± 0,00003 ax	0,000549 ± 0,00008 bx	0,000544 ± 0,00008 bx	0,000454 ± 0,00007 bx	0,000259 ± 0,00009 bx
10^{-4} ace	0,000755 ± 0,00003 bx	0,000488 ± 0,0001 bx	0,000375 ± 0,0001 bx	0,000409 ± 0,00009 bx	0,000355 ± 0,0001 bx
10^{-5} ace	0,000841 ± 0,00003 bx	0,000626 ± 0,00005 bx	0,000576 ± 0,00006 bx	0,00065 ± 0,00005 bx	0,000431 ± 0,00009 bx
10^{-6} ace	0,00092 ± 0,00002 bx	0,000848 ± 0,00008 ay	0,000539 ± 0,00009 bx	0,000661 ± 0,0001 ay	0,00047 ± 0,00007 bx
10^{-6} ace+ 10^{-5} tubo	0,00084 ± 0,00001 bx	0,000635 ± 0,00007 bx	0,001285 ± 0,00005 bx	0,000573 ± 0,00005 bx	0,000528 ± 0,00003 bx
10^{-5} ace+ 10^{-4} tubo	0,000883 ± 0,00001 bx	0,00068 ± 0,00007 bx	0,00056 ± 0,00009 bx	0,0006 ± 0,0001 bx	0,0005 ± 0,00007 bx
10^{-3} ace+ 10^{-2} tubo	0,000911 ± 0,00001 bx	0,000498 ± 0,0002 bx	0,000628 ± 0,00009 ay	0,000611 ± 0,0001 bx	0,000589 ± 0,00002 bx

$\bar{X} \pm \bar{sx}$ = Aritmetik ortalama ± standart hata

* = SNK (Student Newman Keuls); a ve b derişimler arası; x ve y uygulama süreleri arasındaki ayırımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0,05$ düzeyinde fark vardır.

1×10^{-6} M acetamidrid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grup) uygulama süresine bağlı olarak latansta 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde artış gözlemlenirken, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

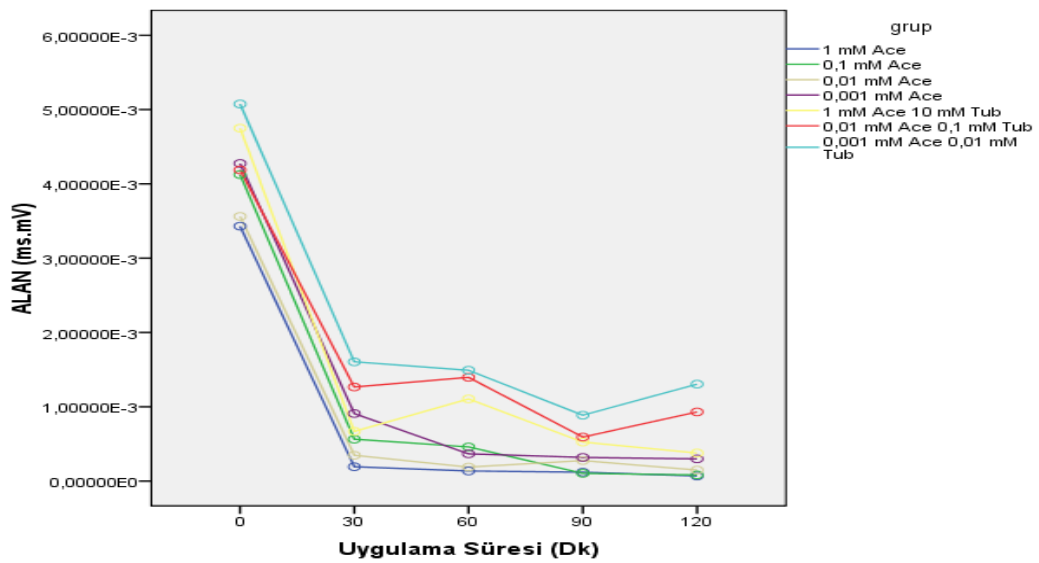
1×10^{-5} M acetamidrid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (6. grup) uygulama süresine bağlı olarak latansta 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde artış meydana gelmiştir fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-3} M acetamidrid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (7. grup), uygulama süresine bağlı olarak latansta 30, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlemlenirken, 60. dakikada meydana gelen artışın anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir.

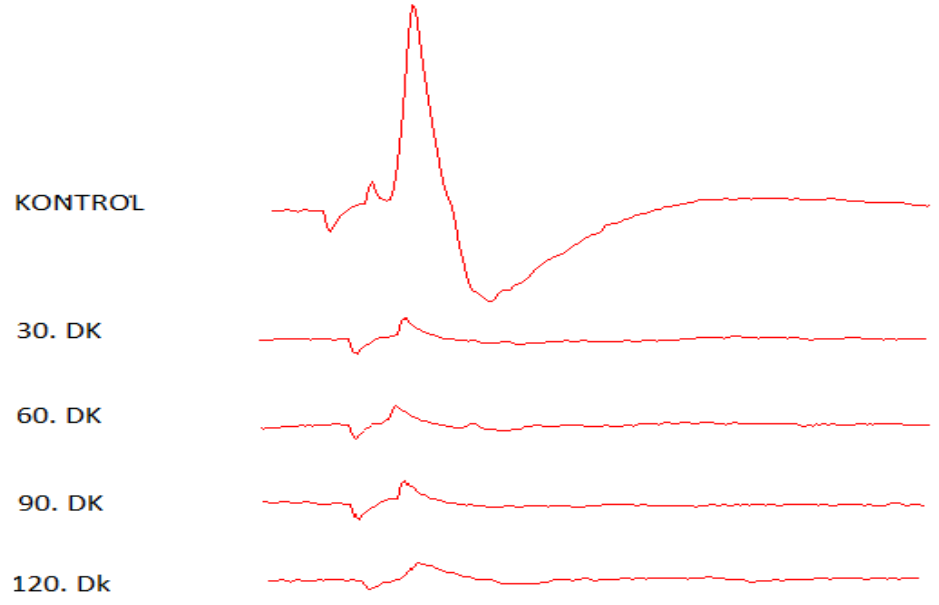
Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 90 ve 120. dakikalarda meydana gelen artış 60. dakikada meydana gelen artıştan fazla olmakla birlikte bu artışın, anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

4.1.3. Acetamidridin alan üzerine etkileri

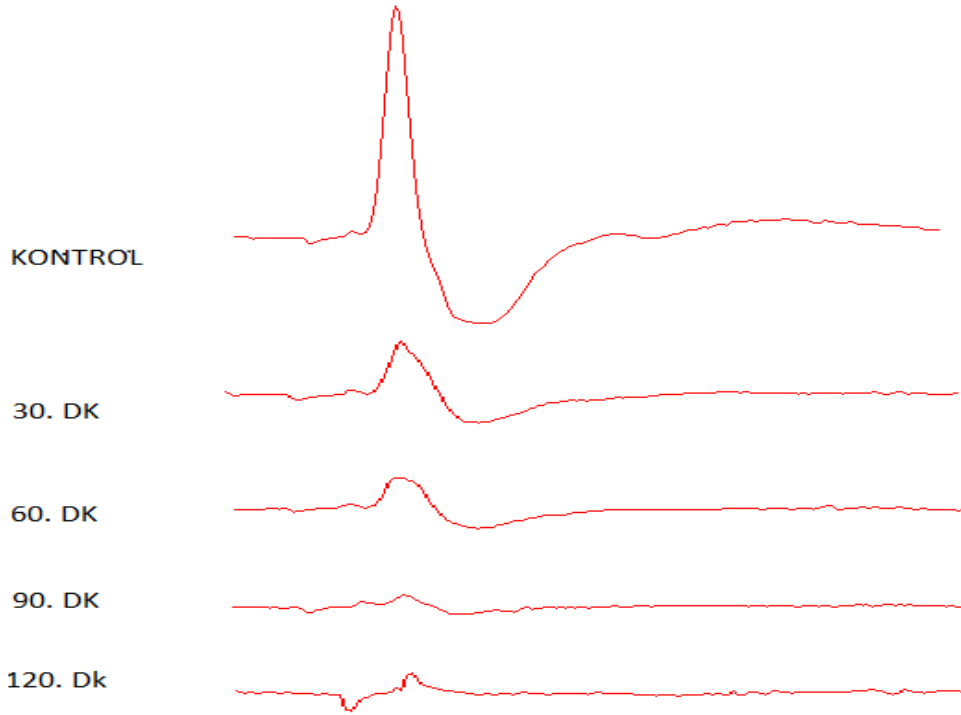
1×10^{-3} M acetamidrid (1. grup) sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden alanı, uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre önemli biçimde azalttığı gözlemlenirken (şekil 4.7.), uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Acetamidridin uygulama süresine bağlı alan üzerine etkileri



Şekil 4.8. 1×10^{-5} M acetamidridin (3. grup) uygulama süresine bağlı olarak aksiyon potansiyeli üzerine etkileri



Şekil 4.9. 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin (6. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.

1×10^{-4} M acetamiprid (2. grup) alanı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azaltmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-5} M acetamiprid (3. grup) alanı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azalttığı tespit edilmiştir fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid (4. grup) alanı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azaltmıştır. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman alanda 30 ve 60. dakikalarda 90 ve 120. dakikalara göre anlamlı biçimde azalma meydana gelmiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grup), alan uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azalmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulanmasında (6. grup), alan uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azalmıştır. Buna karşılık, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (7. grup), alan uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azalmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p < 0,05$).

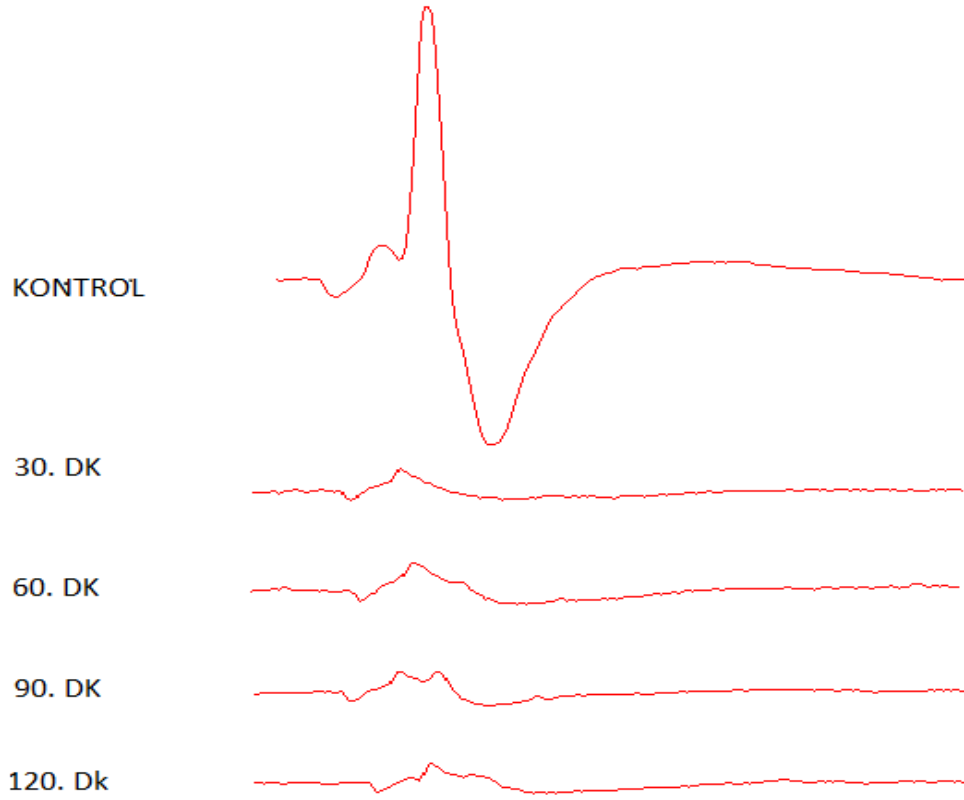
Tablo 4.3 Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli alanı üzerine etkileri

DERİŞİMLER (M)	UYGULAMA SÜRESİ (dakika)				
	Kontrol (0)	30	60	90	120
	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *
10^{-3} ace	0,0034 ± 0,0004 ax	0,0001 ± 0,00003 bx	0,0001 ± 0,00002 bx	0,0001 ± 0,00001 bx	0,00006 ± 0,00002 bx
10^{-4} ace	0,0041 ± 0,0004 bx	0,0005 ± 0,0002 bx	0,0004 ± 0,0002 bx	0,0001 ± 0,00002 bx	0,00008 ± 0,00002 bx
10^{-5} ace	0,0035 ± 0,0003 bx	0,0003 ± 0,0001 bx	0,0001 ± 0,00002 bx	0,0002 ± 0,00008 bx	0,0002 ± 0,00004 bx
10^{-6} ace	0,0042 ± 0,0003 bx	0,0009 ± 0,0002 by	0,0003 ± 0,00006 by	0,0003 ± 0,00007 bx	0,00029 ± 0,00007 bx
10^{-6} ace+ 10^{-5} tubo	0,0047 ± 0,0005 bx	0,0006 ± 0,001 bx	0,0011 ± 0,0009 bx	0,0005 ± 0,0001 bx	0,00037 ± 0,0008 bx
10^{-5} ace+ 10^{-4} tubo	0,0041 ± 0,0002 bx	0,0012 ± 0,0007 bx	0,0013 ± 0,0009 bx	0,0005 ± 0,0002 bx	0,00093 ± 0,0006 bx
10^{-3} ace+ 10^{-2} tubo	0,0050 ± 0,0003 bx	0,0016 ± 0,00008 bx	0,0014 ± 0,0006 bx	0,0008 ± 0,0001 bx	0,0013 ± 0,00004 bx

$\bar{X} \pm s_x$ = Aritmetik ortalama ± standart hata

* = SNK (Student Newman Keuls); a ve b derişimler arası; x ve y uygulama süreleri arasındaki ayırımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde fark vardır.

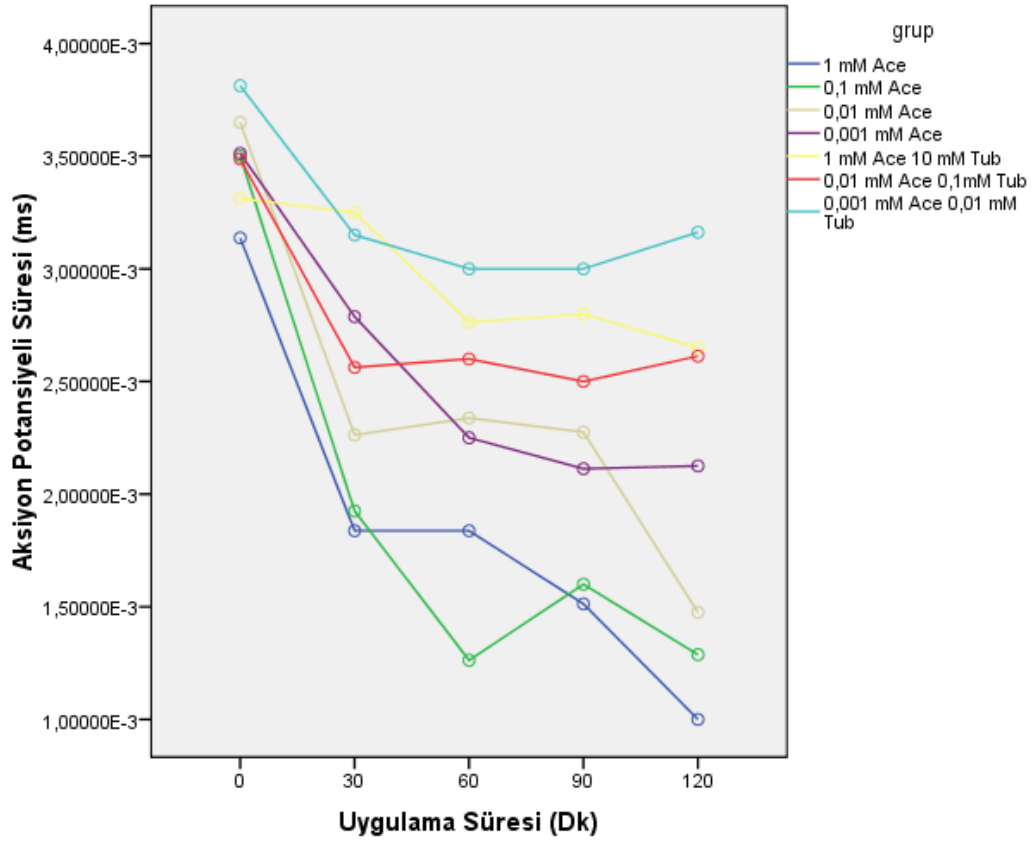


Şekil 4.10. 1×10^{-6} M acetamipridin (4. grup) aksiyon potansiyeli üzerine uygulama süresine bağlı etkileri.

4.1.4. Acetamipridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri

1×10^{-3} M acetamiprid (1. grup) sinir aksiyon potansiyeli süresini, zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır (şekil 4.11). Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 60 ve 90. dakikalarda insektisit in aksiyon potansiyeli süresi üzerine meydana getirdiği artış 120. dakikada meydana getirdiği artıştan anlamlı şekilde fazla bulunmuştur ($p < 0,05$).

1×10^{-4} M acetamiprid (2. grup) sinir aksiyon potansiyeli süresini zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırmakla birlikte, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.11. Acetamipridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine uygulama süresine bağlı etkileri

1×10^{-5} M acetamiprid (3. grup) sinir aksiyon potansiyeli süresini zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 90 ve 120. dakikalarda insektisit'in aksiyon potansiyeli süresi üzerine meydana getirdiği artış 60. dakikada meydana getirdiği artıştan anlamlı şekilde fazla bulunmuştur ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid (4. grup) sinir aksiyon potansiyeli süresini zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Acetamidridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri

DERİŞİMLER (M)	UYGULAMA SÜRESİ (dakika)				
	Kontrol (0)	30	60	90	120
	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *	$\bar{X} \pm s_x$ *
10 ⁻³ ace	0,0031 ± 0,0001 ax	0,0018 ± 0,0002 by	0,00183 ± 0,0002 by	0,0015 ± 0,002 by	0,001 ± 0,0004 bx
10 ⁻⁴ ace	0,0035 ± 0,005 bx	0,0019 ± 0,0004 bx	0,0012 ± 0,0003 bx	0,0016 ± 0,0003 bx	0,0012 ± 0,0003 bx
10 ⁻⁵ ace	0,0036 ± 0,0002 bx	0,0022 ± 0,0002 bx	0,0023 ± 0,0002 by	0,0022 ± 0,0002 bx	0,0014 ± 0,0004 bx
10 ⁻⁶ ace	0,0035 ± 0,0001 bx	0,0027 ± 0,0001 bx	0,0022 ± 0,0003 bx	0,0021 ± 0,0003 bx	0,0021 ± 0,0003 bx
10 ⁻⁶ ace + 10 ⁻⁵ tubo	0,0033 ± 0,0005 bx	0,0032 ± 0,0005 bx	0,0027 ± 0,0003 bx	0,0028 ± 0,0003 bx	0,00265 ± 0,0003 bx
10 ⁻⁵ ace + 10 ⁻⁴ tubo	0,0034 ± 0,0001 bx	0,0025 ± 0,0001 bx	0,0026 ± 0,0004 bx	0,0025 ± 0,0004 bx	0,0026 ± 0,0005 bx
10 ⁻³ ace + 10 ⁻² tubo	0,0038 ± 0,001 bx	0,0031 ± 0,0001 bx	0,003 ± 0,00009 bx	0,003 ± 0,0001 bx	0,0031 ± 0,0001 bx

$\bar{X} \pm s_x$ = Aritmetik ortalama ± standart hata

* = SNK (Student Newman Keuls); a ve b derişimler arası; x ve y uygulama süreleri arasındaki ayırımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde fark vardır.

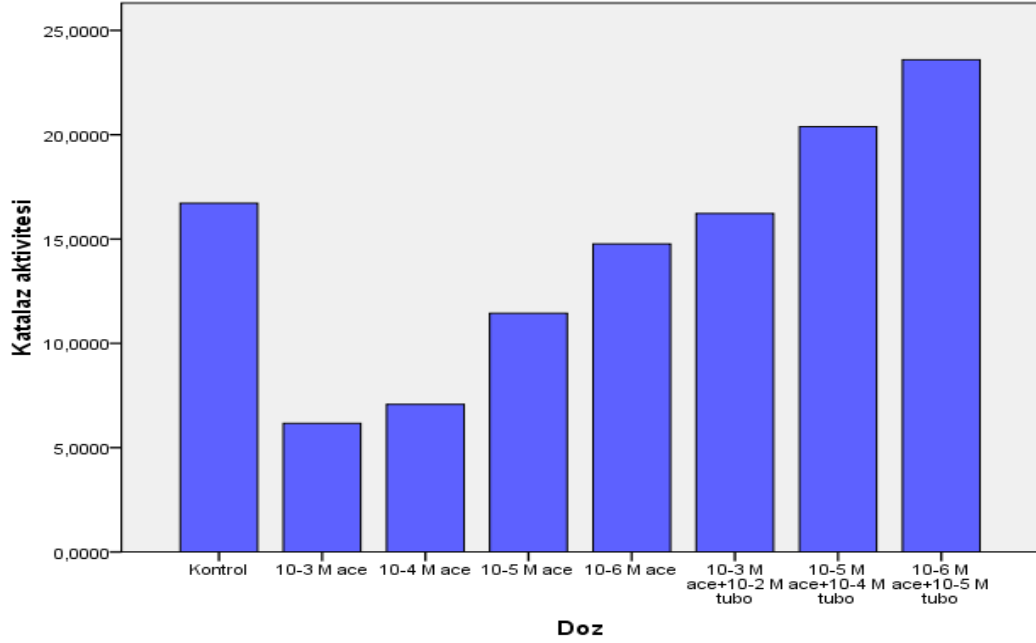
1x10⁻⁶ M acetamidrid ile 1x10⁻⁵ M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grup), sinir aksiyon potansiyeli süresi zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde artmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman, süreler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p<0,05).

1×10^{-5} M Acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (6. grup), sinir aksiyon potansiyeli süresi zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (7. grup), sinir aksiyon potansiyeli süresi zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde artmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

4.1.5. Acetamipridin Katalaz Üzerine Etkileri

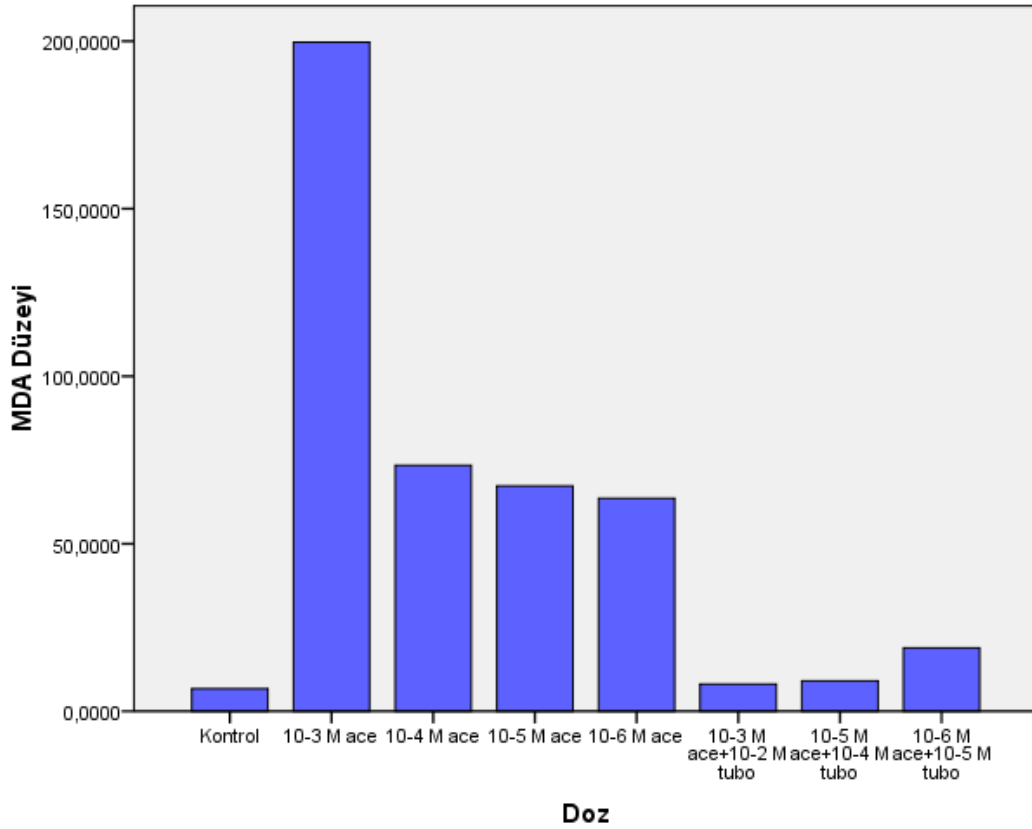
Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamiprid ile muamele edilmesi sonucunda, biyokimyasal parametrelerden katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir (şekil 4.12.). Buna karşılık siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} M acetamiprid ve 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup ile ayrı ayrı muamele edilmesi sonucunda, katalaz aktivitesinin azalmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, 1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup ve 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre azalmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Acetamidridin katalaz aktivitesi üzerine doza bağlı etkileri

4.1.6. Acetamidridin Malondialdehit Üzerine Etkileri

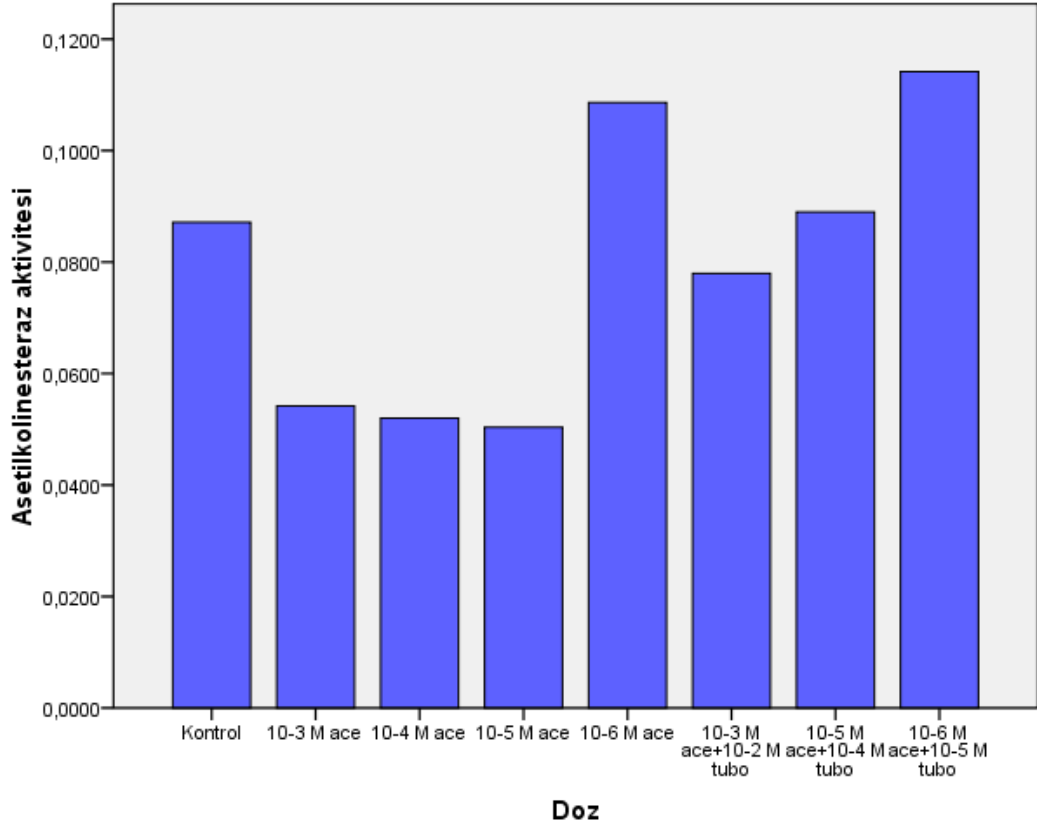
Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamidrid ile muamele edilmesi sonucunda, biyokimyasal parametrelerden TBARS düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde yükseldiği tespit edilmiştir (şekil 4.13). Buna karşılık siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-4} , 1×10^{-5} ve 1×10^{-6} M acetamidrid ile ayrı ayrı muamele edilmesi sonucu değişmediği gözlenmiştir. Diğer taraftan, 1×10^{-6} M acetamidrid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup, 1×10^{-5} M acetamidrid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup ve 1×10^{-3} M acetamidrid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta da değişmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Acetamidridin TBARS düzeyi üzerine doza bağlı etkileri

4.1.7. Acetamidridin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkileri

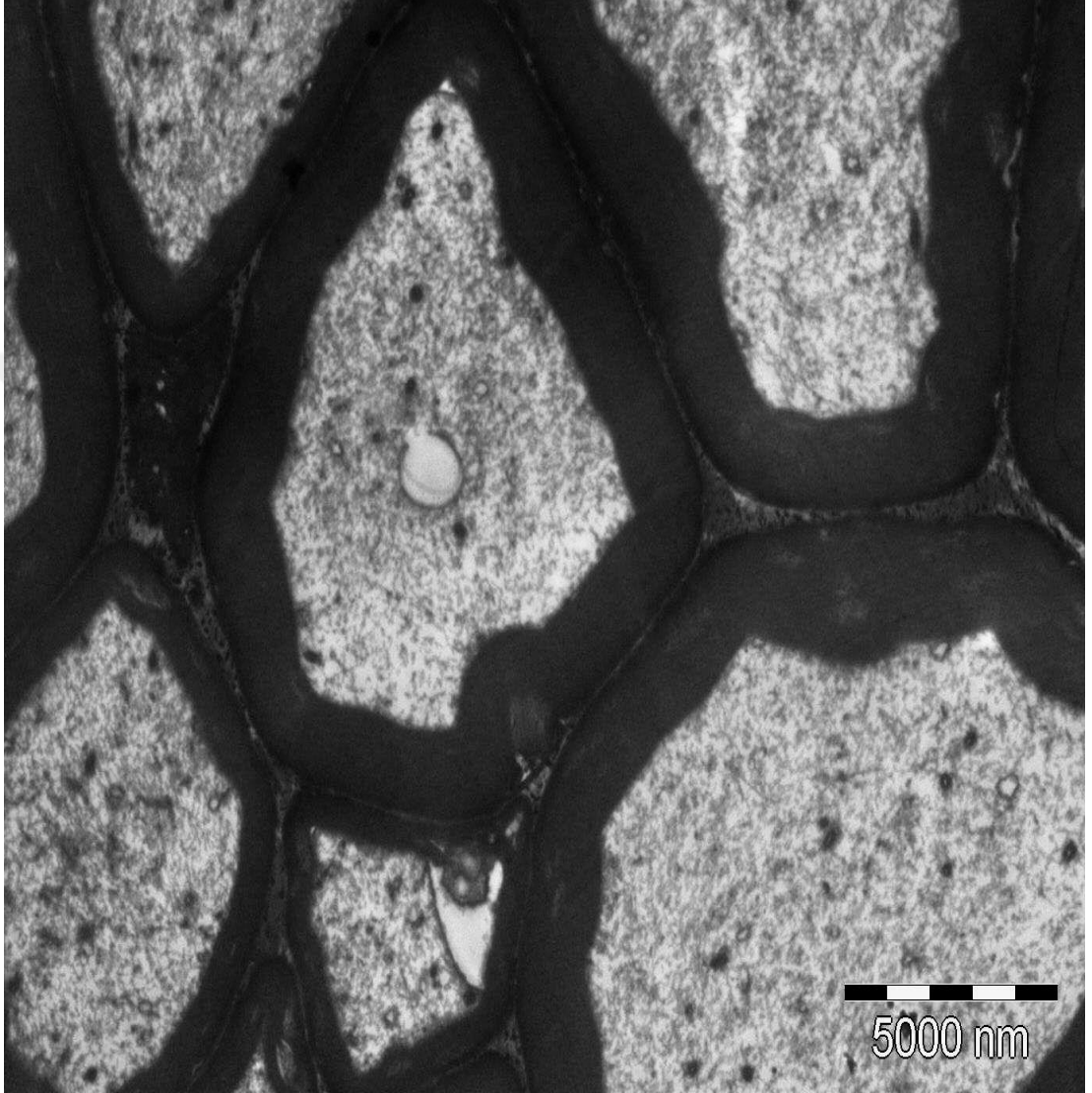
Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamidrid ile muamele edilmesi sonucunda, asetilkolinesteraz enzim düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı tespit edilmiştir (şekil 4.14.). Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-4} , 1×10^{-5} acetamidrid ve 1×10^{-3} M acetamidrid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta, asetilkolinesteraz aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmediği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, 1×10^{-6} M acetamidrid, 1×10^{-6} M acetamidrid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup ve 1×10^{-5} M acetamidrid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta asetilkolinesteraz aktivitesinin kontrol grubuna göre değişmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.14. Acetamipridin asetilkolinesteraz düzeyi üzerine doza bağlı etkileri

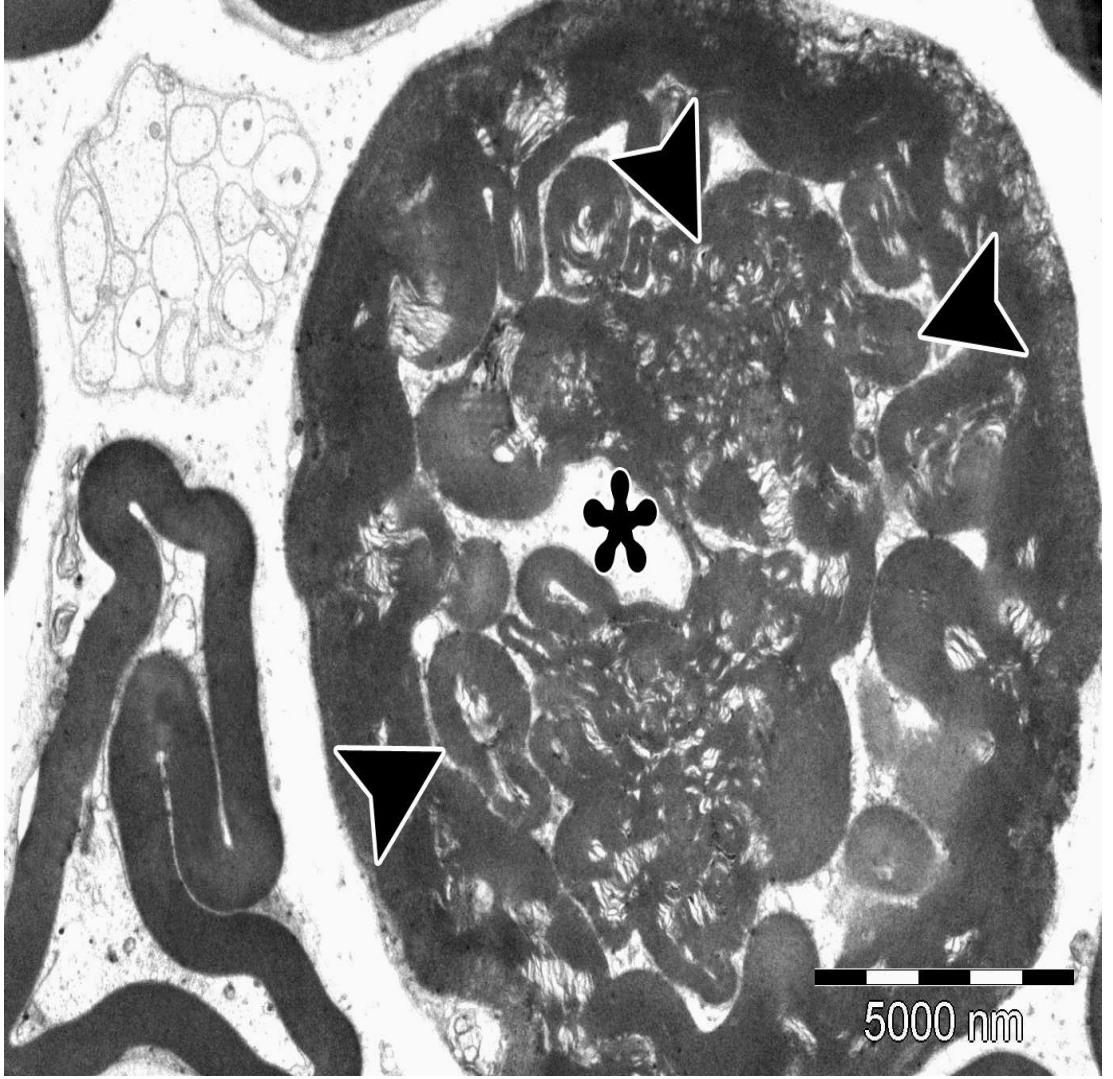
4.1.8. Acetamidridin Siyatik Sinir Üzerine Histolojik Etkileri

Kontrol grubunda siyatik sinir lifleri normal görünümündedir. Miyelin kılıflarda, aksoplazmada herhangi bir hasar bulgusuna rastlanmamıştır. (Şekil 4.16.)



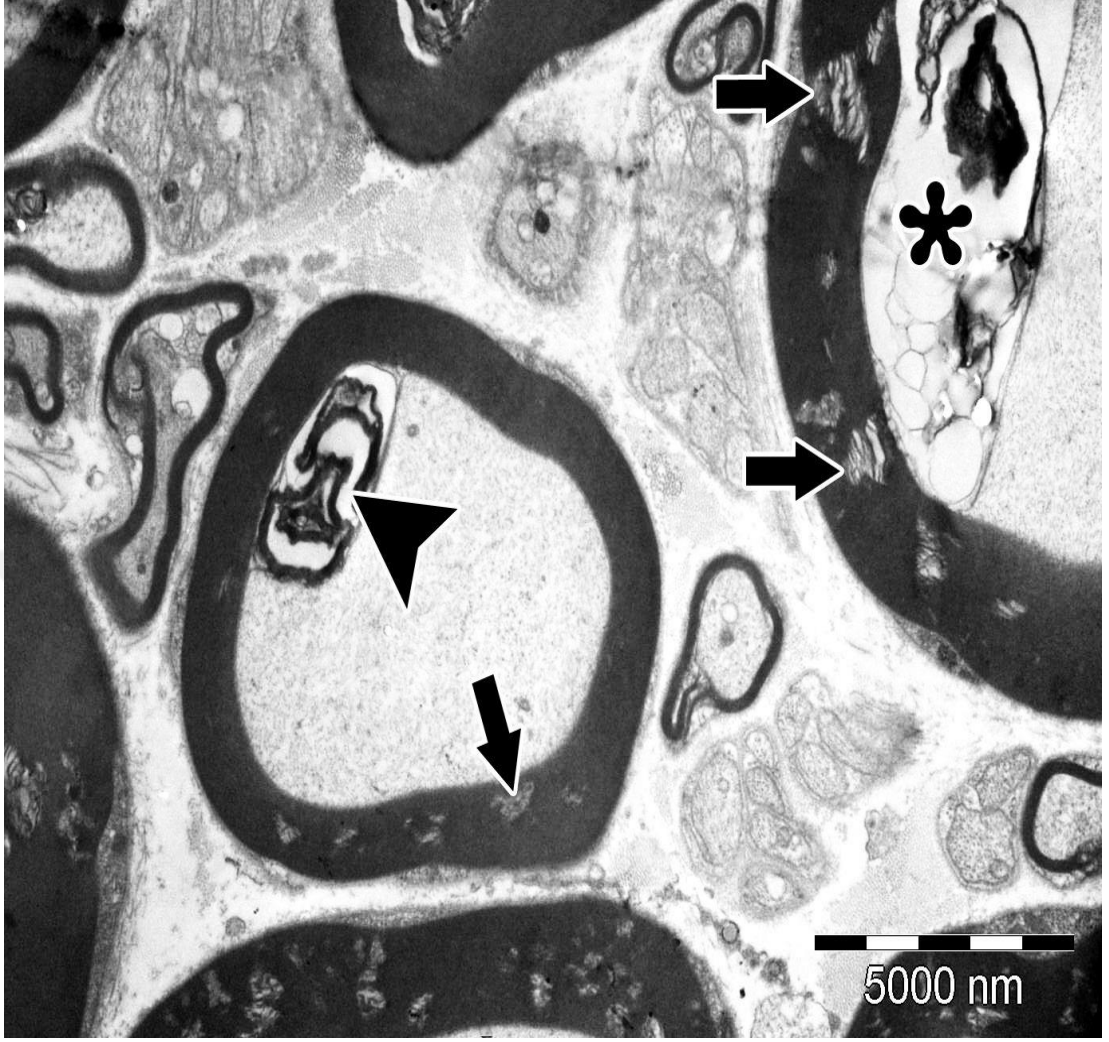
Şekil 4.15. Kontrol grubu. Normal görünümüne sahip sinir lifleri (X5.000)

10^{-3} M acetamidrid (1. grup) uygulanan sinirde ağır hasar bulguları gözlenmiştir. Bu grupta miyelin kılıflarda yoğun ovoid cisim oluşumu ve fragmentasyon mevcuttur. Bazı miyelin kılıflarda düzensizleşme ve kıvrılmalar bulunmuştur. Ağır hasarlı liflerde aksoplazma kaybı tespit edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. 10^{-3} M acetamidrid (1. grup). Sıkışmış aksoplazma (yıldız), fragmante miyelin kılıf ve ovoid cisimler (ok başı) (X6.000).

10^{-4} M acetamidrid (2. grup) uygulanan sinirde, miyelin ovoid cisimler bulunmuş olup ayrıca, miyelin kılıflarda fokal ayrılmalar gözlenmiştir. Bu ayrılmalara bağlı geniş vakuoler yapılar bulunmuştur (Şekil 4.18).



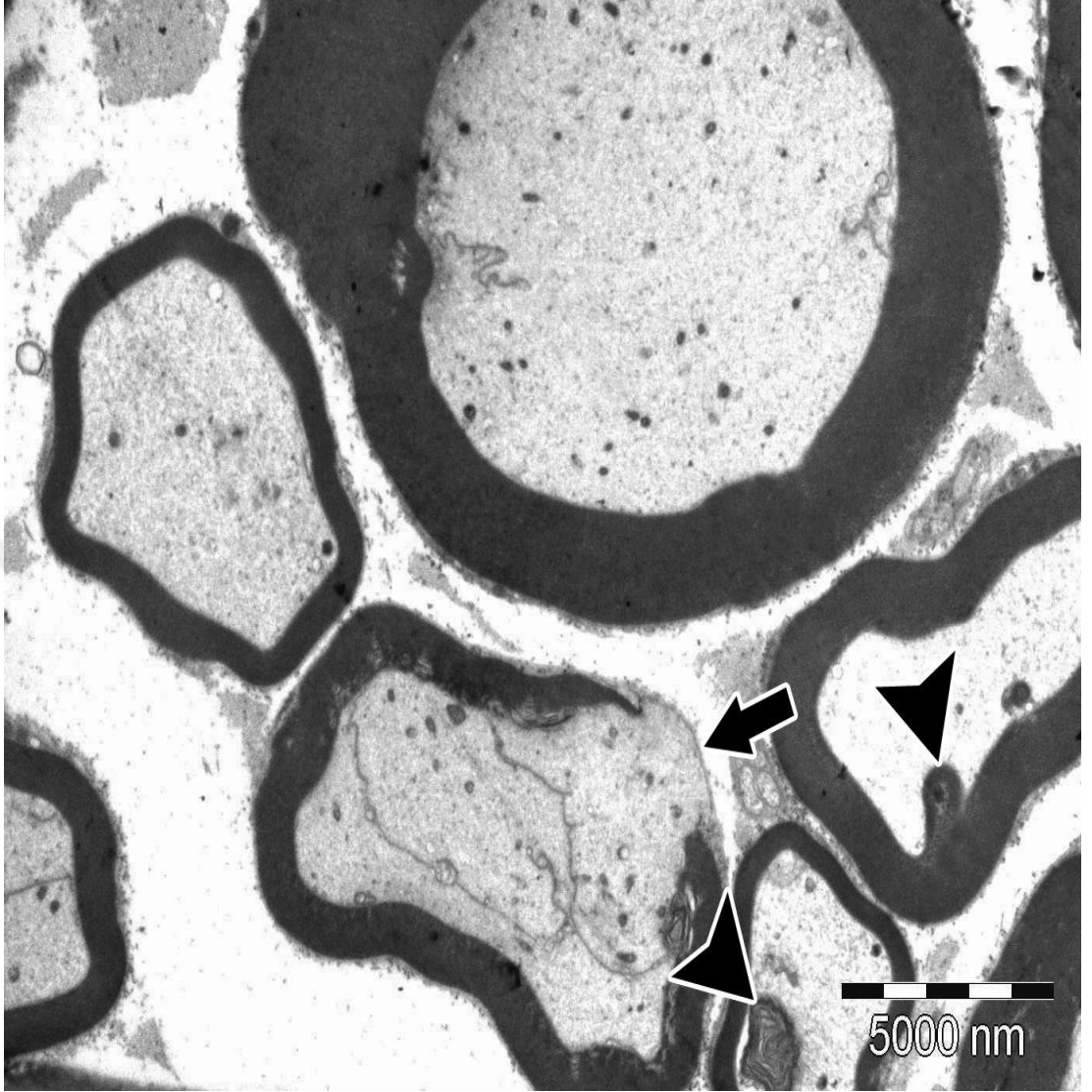
Şekil 4.17. 10^{-4} M acetamiprid (2. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), fokal ayrılmalar (ok), vakuoler yapı (yıldız) (X6.000).

10^{-5} M acetamiprid (3. grup) uygulanan sinirde de miyelin ovoid cisimler izlenmiştir. Ayrıca bu grubun miyelin kılıflarında fokal ayrılmaların arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.19).



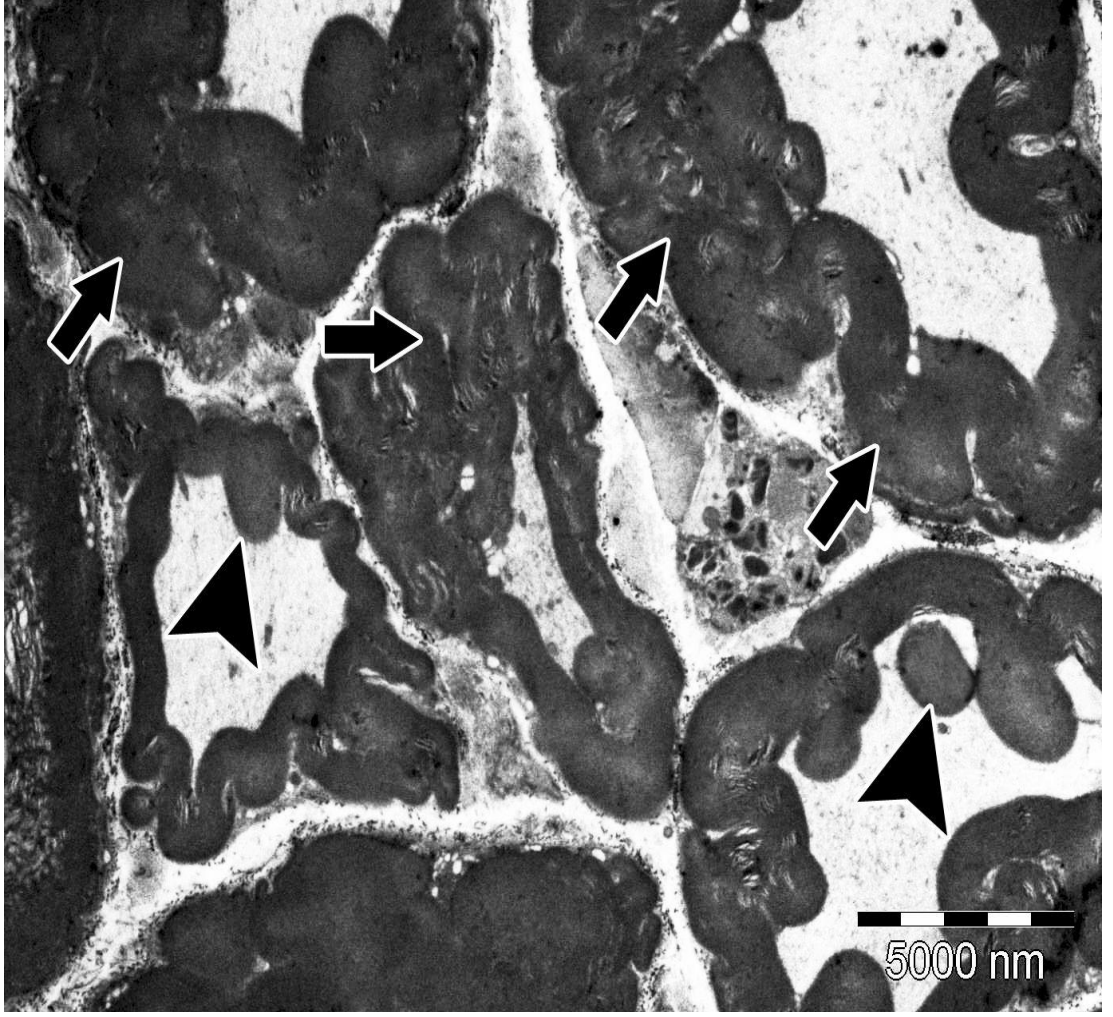
Şekil 4.18. 10^{-5} M acetamiprid (3. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıfta fokal ayrılmalar (ok) (X5.000).

10^{-6} M acetamiprid (4. grup) uygulanan sinirin liflerinde hafif hasar bulguları tespit edilmiştir. Bazı miyelin kılıflarda fokal kayıplar izlenirken seyrek ovoid cisimler de gözlenmiştir (Şekil 4.20)



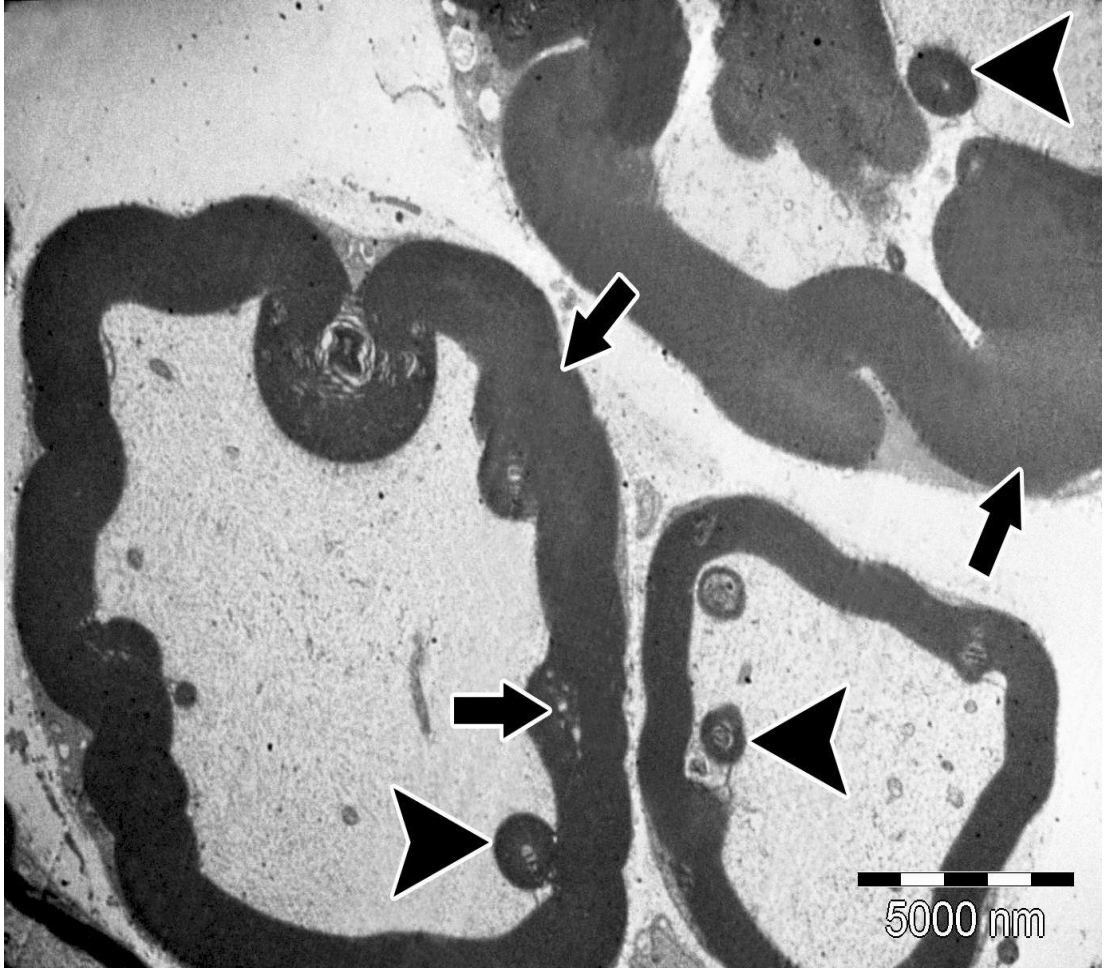
Şekil 4.19. 10^{-6} M acetamidrid (4. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıf kaybı (ok) (X5.000).

10^{-3} M acetamidrid ile 10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grub) miyelin kılıflarda ağır dejeneratif değişiklikler izlenmiştir. Bu kılıflarda kalınlaşma, kıvrılma ve düzensizleşmeyle birlikte kompakt yapının bozulduğu görülmüştür. Ayrıca, aksonlarda ovoid cisimlere rastlanmıştır (Şekil 4.21).



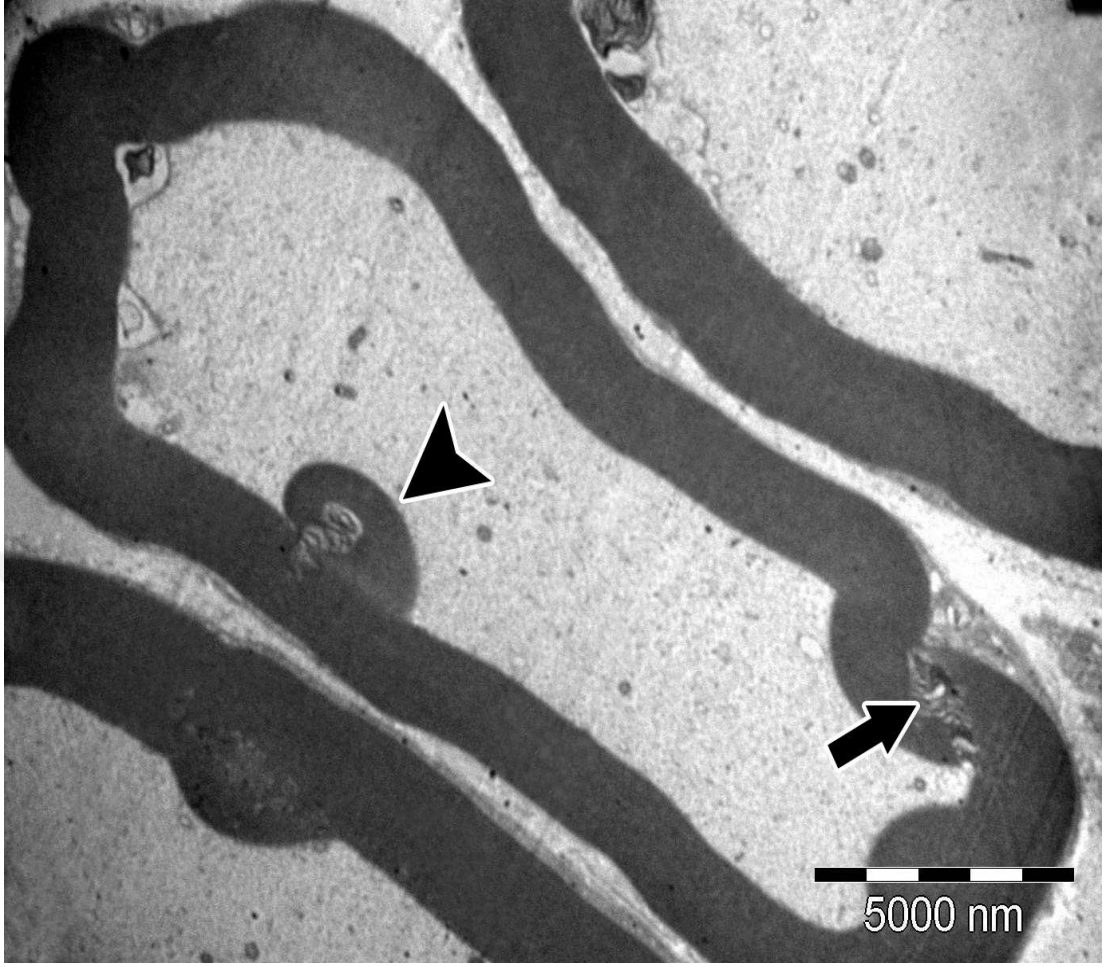
Şekil 4.20. 10^{-3} M acetamidrid + 10^{-2} M tubokurarin (5. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme (ok), endonöryumda makrofaj (yıldız) (X5.000).

10^{-5} M acetamidrid ile 10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (6. grup) ise, miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme gözlenmiştir. Bu grupta da ovoid cisimlere rastlanmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. 10^{-5} M acetamidrid + 10^{-4} M tubokurarin (6. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme (ok) (X5.000).

10^{-6} M acetamidrid ile 10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (7. grup) aksoplazma normal görünümündedir. Bununla birlikte, az sayıda miyelin ovoid cisim ve küçük miyelin kılıf ayrılma alanlarına rastlanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. 10^{-6} M acetamidrid + 10^{-5} M tubokurarin (7. grup). Miyelin ovoid cisim (ok başı), miyelin kılıf ayrılmaları (ok) (X6.000).

4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada neonikotinoid bir insektisit olan acetamiprid ve antagonisti tubakurarinin kurbağa siyatik siniri üzerine etkileri incelenmiştir. Acetamiprid ve tubakurarinin kurbağa siyatik siniri üzerine *in vitro* koşullarda doza ve uygulama süresine bağlı etkileri elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle multidisipliner olarak araştırılmıştır.

4.2.1. Acetamipridin genlik üzerine etkileri

Yapılan çalışmalar sonucunda acetamipridin bütün doz grupları uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda sinir aksiyon potansiyeli genliğini kontrol grubuna (0. dk) göre anlamlı biçimde düşürmüştür. Buna karşılık doz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman genlik üzerine uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalardaki etkilerinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.

Acetamiprid ilk 30. dakikada etkisini göstermiş olup 120. dakika sonunda uygulama süreleri karşılaştırıldığı zaman genlikte meydana gelen azalmanın arttığı, fakat bu azalmaların anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). nAChR hem omurgalı, hem de omurgasızlarda eksitator bir nörotransmitter olan asetilkoline duyarlı ligand kapılı iyon kanallarıdır [19]. Normal şartlar altında, sinir kas kavşağında iskelet kas membranlarında bulunan nAChR'lerine asetilkolinin bağlanması ile birlikte kanalın açılması ve sodyum iyonları başta olmak üzere çok sayıda pozitif yüklü iyonların hücre içerisine hızlıca girişi gerçekleşir. Bu şekilde hücre membranında oluşan depolarizasyon, kas lifi membranından son plak potansiyeli denilen lokal bir potansiyel değişikliği oluşturur. Son plak potansiyeli daha sonra kas membran boyunca yayılan aksiyon potansiyelini başlatır ve böylece kolinerjik iletim gerçekleşmiş olur [20]. Acetamiprid ile tubokurarinin birlikte kullanılması sonucu parametrelerde meydana gelen değişimler, nAChR antagonisti olan tubokurarinin acetamipridin depolarize edici etkisini kısmen baskılamasından kaynaklanmaktadır [24].

Neonikotinoid insektisitlerin Amerikan hamamböceği (*Periplanata americana*) izole torasik gangliyonları üzerine yapılan çalışmada, heterosiklik halkalı nikotin, imidacloprid ve thiaclopridin zayıf agonist etki göstererek maksimum asetilkolin akışını (I_{max}) %20 ile %25 düzeyinde arttırdığı, buna karşılık yapısında açık zincir taşıyan acetamiprid, dinotefuran, nitenpyram ve clothianidin maksimum asetilkolin akışını %60 ile %100 kadar arttırarak çok daha fazla agonist etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [25]. Tek elektrot voltaj klamp kayıt tekniği kullanılan bu çalışmada, neonikotinoid insektisitlerin, nikotinic asetilkolin reseptörlerini etkileyerek sinir aksiyon potansiyeli genliğini önce kısa bir süre yükselttiği, daha sonra düşürdüğü ve sonuç olarak tamamen bloke ettiği tespit edilmiştir. Piretroid bir insektisit olan lambda cyhalothrinin intraperitoneal olarak ratlara 6,12 mg/kg uygulandığı diğer bir çalışmada, siyatik sinir aksiyon potansiyeli genliğinin kontrol grubuna göre önemli biçimde düştüğü tespit edilmiştir [26]. Diğer bir çalışmada, tip I ve tip II piretroid insektisitlerin *Rana ridibunda* siyatik siniri uyarılmış birleşik aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkileri araştırılmıştır [27]. Bu araştırmacılar izole siyatik sinirler üzerine *in vitro* koşullarda uyguladıkları, tip I piretroid insektisitlerden flucythrinate, deltamethrin, fenvalerate, fluvalinate ile tip II insektisitlerden cis ve trans permethrin olmak üzere toplam altı insektisit birleşik aksiyon potansiyeli genliğini kontrol grubuna göre %50 oranında düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, bu insektisitleri toksisitetlerine göre; flucythrinate > deltamethrin > fenvalerate > fluvalinate > cis-permethrin > trans-permethrin şeklinde gruplandırmışlardır.

4.2.2. Acetamipridin latans üzerine etkileri

1×10^{-3} , 1×10^{-4} M ve 1×10^{-5} M acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden latansı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120 dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre önemli biçimde arttırdığı gözlemlenirken, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid latansı uygulama süresine bağlı olarak 60 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı şekilde arttırmış fakat, 30.dk ve 90.dakikalarda insektisit etkisine bağlı olarak meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman acetamipridin latans üzerine 60 ve 120. dakikalarda meydana getirdiği artış, 30 ve 90. dakikalardaki artıştan fazla olmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grup ve 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta, uygulama süresine bağlı olarak latansta 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) gruplarına göre önemli biçimde artış gözlemlenirken, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p < 0,05$). 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta ise, uygulama süresine bağlı olarak latansta 30, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı artış gözlemlenirken, 60. dakikada meydana gelen artışın anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 90 ve 120. dakikalarda meydana gelen artış 60. dakikada meydana gelen artıştan fazla olmakla birlikte bu artışın, anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Yaygın olarak kullanılan bir insektisit olan chlorpyrifos(CPF)'un zebra balığı (*Danio rerio*) üzerine toksik etkileri olduğu bildirilmiştir [29]. Bu araştırmacılar 10 ng/mg CPF'nin zebra balığında latansı önemli biçimde arttırdığını gözlemlemişlerdir.

4.2.3. Acetamipridin alan üzerine etkileri

1×10^{-3} , 1×10^{-4} M ve 1×10^{-5} M acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden alanı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre önemli biçimde azaltmış olup, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid alanı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre önemli biçimde azaltmıştır. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman alanda 30 ve 60. dakikalarda 90 ve 120. dakikalara göre anlamlı biçimde azalma meydana gelmiştir ($p < 0,05$). 1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grup), alan uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre önemli biçimde azalmış fakat, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarin, 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarin ve 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulamalarında ise, sinir aksiyon potansiyeli alanı, uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde azalmıştır. Buna karşılık, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p < 0,05$). Nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerine selektif bir etkisi olduğu bilinen yeni bir neonikotinoid insektisit olan clothianidin ve bir neonikotinoid antagonisti olan d-tubokurarinin *Periplaneta americana* afferent nöronları üzerine etkileri çalışılmıştır [28]. Bu çalışmaya göre clothianidin doza ve uygulama süresine bağlı olarak sinir aksiyon potansiyeli genliği ve alanını kontrol grubuna göre azaltmıştır. Aynı çalışmada clothianidin aksiyon potansiyeli üzerine meydana getirdiği bu etkilerin d-tubokurarin tarafından nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinden engellendiği rapor edilmiştir.

4.2.4. Acetamipridin aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri

1×10^{-4} ve 1×10^{-6} M acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli süresini zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde arttırmış fakat uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

1×10^{-3} M acetamiprid aksiyon potansiyeli süresini, zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 60 ve 90. dakikalarda insektisit aksiyon potansiyeli süresi üzerine meydana getirdiği artış 120. dakikada meydana getirdiği artıştan anlamlı şekilde fazla bulunmuştur ($p < 0,05$). 1×10^{-5} M acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli süresini zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır. Uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 30, 90 ve 120. dakikalarda insektisit aksiyon potansiyeli süresi üzerine meydana getirdiği artış 60. dakikada meydana getirdiği artıştan anlamlı şekilde fazla bulunmuştur ($p < 0,05$).

1×10^{-6} M acetamiprid ile 1×10^{-5} M tubokurarin, 1×10^{-5} M acetamiprid ile 1×10^{-4} M tubokurarin ve 1×10^{-3} M acetamiprid ile 1×10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulamalarında ise, sinir aksiyon potansiyeli süresi, uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol (0.dk) grubuna göre anlamlı biçimde artmıştır. Buna karşılık, uygulanma süreleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman süreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$). Neonikotinoid bir insektisit olan imidaclopridin $0.01 \mu\text{M}$ *Tenebrio molitor* (un kurdu) sinir kordonuna *in vitro* olarak uygulandığı çalışmada, kontrol grubuna göre anlamlı biçimde sinir aksiyon potansiyeli genliğinde azalma, süresinde ise artış gözlenmiştir.

Aynı araştırmacılar imidaclopridin $0.1 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ gibi daha yüksek dozlarında respiratuvar motor nöron frekansının dramatik biçimde arttığını, genliğin azaldığını ve aksiyon potansiyeli süresinin arttığını rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada tip II piretroid bir insektisit olan deltamethrinin, sıçan siyatik siniri genliğini kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azalttığı, buna karşılık aksiyon potansiyeli süresini uzattığı gözlenmiştir [30].v Acetamipridin sinir aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkileri, zamana bağlı olarak incelendiğinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar mevcuttur. 10^{-3} - 10^{-6} M arası acetamiprid, dinlenme membran potansiyelinin kontrole göre daha pozitif değerlere çıkmasını sağlayarak, hücre membranının depolarize olmasına neden olmuştur. Bu etki yüksek doz gruplarında düşük doz gruplarına göre daha fazla olup, uygulama süresine bağlı olarak acetamiprid maruziyetinin ilk 30. dakikasından itibaren ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada acetamipridin sinir aksiyon potansiyeli genliğindeki ve süresindeki meydana gelen artış ve latansın azaltmasını nAChR'leri etkilediği düşünülmektedir. Elde edilen elektrofizyolojik veriler doğrultusunda acetamipridin kurbağa siyatik sinirini doza ve uygulama süresine bağlı olarak etkilediği gözlemlenmiştir. Temel olarak hücrenin depolarize olması, hücre içi iyon dengesinin geçici bir süreliğine bozularak, artı yüklü katyonların artması ya da eksi yüklü anyonların azalması ile olmaktadır. nAChR antagonisti olan tubokurarinin acetamipridin depolarize edici bu etkisini kısmen baskıladığı ve hücre içine katyon iyon akışının gerçekleşmesine neden olduğunu düşünülmektedir [23].

4.2.5. Acetamipridin Katalaz Üzerine Etkileri

Rana ridibunda siyatik sinirinin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamiprid ile muamele edilmesi sonucunda, biyokimyasal parametrelerden katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Buna karşılık acetamipridin uygulanan diğer doz grupları katalaz üzerine istatistiksel olarak önemli olmayan değişimler meydana getirmiştir. Aynı zamanda acetamiprid ve tubokurarin kombinasyonu uygulanan grupların katalaz üzerine meydana getirdikleri değişimler de anlamlı bulunmamıştır. Tip II piretroid bir insektisit kullanıldığı çalışmaya göre, deltamethrin ile E vitamininin sıçan siyatik siniri üzerine elektrofizyolojik ve histolojik etkilerinin yanı sıra biyokimyasal etkileri de incelenmiştir [30]. Bu araştırmacılar 1.28 mg/kg deltamethrin ile E vitamini karışımının siyatik sinirde katalaz ve süperoksitdismutaz aktivitesini kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırdığını gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar sıçanlara oral yolla verdikleri 1.28 mg/kg deltamethrinin malondialdehit düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırdığını gözlemişlerdir. Diğer bir araştırmacı organofosforlu ve piretroid insektisitler olan fenitrothion %25, lambda cyhalothrin %2.5 ve piperonyl butoxide'i %6 oranlarında karışım olarak erkek Sprague Dawley ratların beyini üzerine uygulamış ve antioksidan enzim mekanizmaları üzerine etkilerini incelemiştir. Bu araştırmacı, beyin homojenatlarını 0, 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 mM dozlarındaki insektisit karışımı ile 0, 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika inkübe etmiştir. Insektisit karışımı kontrol gruplarına göre thiobarbitürik asit reaktif türevlerini (TBARS) kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırırken, ölçülen

glutasyon S - transferaz (GST), süper oksitdismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde ise 0.1 mM dışındaki tüm konsantrasyonlarda önemli bir azalma gözlenmiştir [31].

4.2.6. Acetamidridin Malondialdehit Üzerine Etkileri

Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamidrid ile muamele edilmesi sonucunda, biyokimyasal parametrelerden malondialdehit düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde yükseldiği bulunmuştur ($p < 0,05$).

Buna karşılık acetamidridin uygulanan diğer doz grupları malondialdehit üzerine istatistiksel olarak önemli olmayan değişimler meydana getirmiştir. Benzer şekilde, acetamidrid ve tubokurarin kombinasyonu uygulanan grupların malondialdehit üzerine meydana getirdikleri değişimler de anlamlı değildir. Tip II piretroid bir insektisit kullanıldığı çalışmaya göre, deltamethrin ile E vitamininin sıçan siyatik siniri üzerine elektrofizyolojik ve histolojik etkilerinin yanı sıra biyokimyasal etkileri de incelenmiştir [30]. Bu araştırmacılar 1.28 mg/kg deltamethrin ile E vitamini karışımının siyatik sinirde katalaz ve süperoksitdismutaz aktivitesini kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırdığını gözlemişlerdir. Aynı araştırmacılar sıçanlara oral yolla verdikleri 1.28 mg/kg deltamethrinin malondialdehit düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırdığını gözlemişlerdir. Diğer bir araştırmacı organofosforlu ve piretroid insektisitler olan fenitrothion %25, lambda cyhalothrin %2.5 ve piperonyl butoxide'i %6 oranlarında karışım olarak erkek Sprague Dawley ratların beyini üzerine uygulamış ve antioksidan enzim mekanizmaları üzerine etkilerini incelemiştir. Bu araştırmacı, beyin homojenatlarını 0, 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 mM dozlarındaki insektisit karışımı ile 0, 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika inkübe etmiştir. İnsektisit karışımı kontrol gruplarına göre, thiobarbitürik asit reaktif türevlerini (TBARS) kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırmıştır [31].

4.2.7. Acetamipridin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkileri

Siyatik sinirin 120 dakika boyunca 1×10^{-3} M (1. grup) acetamiprid ile muamele edilmesi sonucunda, biyokimyasal parametrelerden asetilkolinesteraz düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı bulunmuştur ($p < 0,05$). Öte yandan, acetamipridin uygulanan diğer doz grupları asetilkolinesteraz üzerine istatistiksel olarak önemli olmayan değişimler meydana getirmiştir. Benzer şekilde, acetamiprid ve tubokurarin kombinasyonu uygulanan gruplar, asetilkolinesteraz üzerine önemli olmayan değişimler meydana getirmiştir. Organofosforlu ve piretroid insektisitler olan fenitrothion %25, lambda cyhalothrin %2.5 ve piperonyl butoxide'i %6 oranlarında karışım olarak erkek Sprague Dawley ratların beyini üzerine uygulanan bir çalışmada bu insektisitlerin antioksidan enzim mekanizmaları üzerine etkileri incelenmiştir. Bu araştırmacı, beyin homojenatlarını 0, 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 mM dozlarındaki insektisit karışımı ile 0, 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika inkübe etmiştir. Asetilkolin esteraz (AChE) aktivitesinde ise, uygulanan bütün doz gruplarında zamana göre anlamlı bir şekilde azalma meydana gelmiştir. SOD ve CAT reaktif oksijen türevlerinin toksik etkilerine karşı önemli savunma mekanizmaları arasında yer alır. SOD, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit dönüşümünü katalize ederken CAT hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Bu antioksidan enzimler bu nedenle, ROS toksik etkilerini azaltabilir. İnsektisit uygulanan dokularda SOD ve CAT aktiviteleri önemli ölçüde azaltılmıştır. Uygulanan insektisit CAT ve SOD enzim aktivitelerini azaltması, bu enzimlerin gerek ROS gerekse hidrojen peroksit metabolizmasını etkilediği ve bu enzimlerin süpürücü etkisini azalttığı düşünülmektedir [31]. Diğer bir çalışmada neonikotinoid insektisitlerden thiamethoxamın biyokimyasal parametreler kullanılarak *Apis mellifera* (bal arısı) üzerine toksik etkileri incelenmiştir [32]. Bu araştırmaya göre, thiamethoxamın arılara uygulanan letal ve subletal dozu, asetilkolinesteraz düzeyini kontrol grubuna göre azaltmakla birlikte bu azalma istatistiksel bakımdan önemli değildir. Bununla birlikte, aynı araştırmacılar thiamethoxamın, CAT aktivitesini kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırdığını rapor etmişlerdir. Diğer bir araştırmaya göre, organofosfatlı insektisitlerden malathionun sıçan beyini AChE ve Na^+/K^+ - ATPaz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir [33].

Bu çalışmaya göre, 100 ve 200 mg/kg malathionun oral yolla uygulandığı zaman, sıçan beyni AChE aktivitesi kontrol grubuna göre önemli biçimde azalmıştır.

Aynı araştırmaya göre malathionun, asetilkolinesteraz aktivitesinin yanı sıra, latansı kontrol grubuna göre önemli biçimde düşürdüğü, ratların motor koordinasyonunda, vestibular fonksiyonunda ve kas koordinasyonlarında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir.

4.2.8. Acetamiprid ve Tubokurarinin Siyatik Sinir Üzerine Histolojik Etkileri

Kontrol grubunda miyelin kılıflarda ve aksoplazmada herhangi bir hasar bulgusuna rastlanmamış olup siyatik sinir lifleri normal görünümündedir (Şekil 4.16). Doz gruplarında ise siyatik sinirde farklı düzeylerde hasar bulgularına rastlanmıştır. En büyük hasar, en yüksek doz uygulaması olan 10^{-3} M acetamiprid (1. grup) uygulanan sinirde gözlenmiştir. Bu grupta miyelin kılıflarda yoğun ovoid cisim oluşumu ve fragmantasyon, bazı miyelin kılıflarda düzensizleşme ve kıvrılmalar, ağır hasarlı liflerde aksoplazma kaybı tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Diğer doz gruplarında da siyatik sinirde hasar bulguları gözlenmiştir. 10^{-4} M acetamiprid (2. grup) uygulanan sinirde, miyelin ovoid cisimler bulunmuş olup ayrıca, miyelin kılıflarda fokal ayrılmalar gözlenmiş ve bu ayrılmalara bağlı geniş vakuoler yapılar bulunmuştur (Şekil 4.18). 10^{-5} M acetamiprid (3. grup) uygulanan sinirde de miyelin ovoid cisimler izlenmiş ayrıca, bu grubun miyelin kılıflarında fokal ayrılmaların arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.19). Uygulanan dozlar arasında en düşük doz olan 10^{-6} M acetamiprid (4. grup) uygulanan sinirin liflerinde hafif hasar bulguları tespit edilmiştir. Bu sinirlerin bazı miyelin kılıflarında fokal kayıplar izlenirken seyrek ovoid cisimler de gözlenmiştir (Şekil 4.20)

Acetamiprid ile tubokurarinin kombine olarak uygulandığı gruplarda da siyatik sinirde, farklı düzeylerde hasar bulgularına rastlanmıştır. 10^{-3} M acetamiprid ile 10^{-2} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (5. grup) miyelin kılıflarda ağır dejeneratif değişiklikler izlenmiş, bu kılıflarda kalınlaşma, kıvrılma ve düzensizleşmeyle birlikte kompakt yapının bozulduğu görülmüş ayrıca, aksonlarda ovoid cisimlere rastlanmıştır (Şekil 4.21).

10^{-5} M acetamiprid ile 10^{-4} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (6. grup), miyelin kılıflarda kalınlaşma ve düzensizleşme gözlenmiş olup, bu grupta da ovoid cisimlere rastlanmıştır (Şekil 4.22).

10^{-6} M acetamiprid ile 10^{-5} M tubokurarinin kombine olarak uygulandığı grupta (7. grup) ise, aksoplazma normal görünümde izlenmekle beraber, bu grupta az sayıda miyelin ovoid cisim ve küçük miyelin kılıf ayrılma alanlarına rastlanmıştır (Şekil 4.23).

Pirethroid bir insektisit olan lambda cyhalothrinin intraperitoneal olarak ratlara 0,8, 3,06 ve 6,12 mg/kg olmak üzere üç farklı dozda uygulandığı çalışmada, bu insektisitinin siyatik sinir üzerine elektrofizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin yanı sıra histopatolojik etkileri de incelenmiştir [26]. Bu çalışmaya göre, lambda cyhalothrinin uygulanan üç dozu da siyatik sinirde aksonal plazmada vakuolar değişiklikler, miyelin dejenerasyonu, ovoid cisim oluşumu ve miyelin kılıfta ayrılmalar gibi histopatolojik değişiklikler meydana getirmiştir. Aynı araştırmacılara göre, insektisitinin düşük ve yüksek dozu, sinir fiberlerinin çapını ve miyelin tabaka kalınlığını kontrol grubuna göre önemli biçimde düşürmüştür fakat insektisitinin orta dozu fiber çapını ve miyelin tabaka kalınlığını azaltmakla birlikte bu azalma istatistiksel bakımdan önemli değildir. Diğer bir çalışmaya göre neonikotinoid insektisitlerden imidacloprid 5, 10 ve 20 µg olacak şekilde tavuk yumurtaları üzerine uygulanmış ve embriyo serebellumu üzerindeki histopatolojik etkiler incelenmiştir. Bu çalışmaya göre imidacloprid glial hücreler, nöropil ve nöronlar üzerinde kontrol grubuna göre önemli toksik ve dejeneratif etkiler meydana getirmiştir. Bu etkilerin yanı sıra, imidacloprid embriyo serebellumu üzerinde fokal piknoz ve karyolizis gibi patolojik değişiklikler de meydana getirmiştir [34]. Diğer bir çalışmada organofosfatlı bir insektisit olan chlorpyrifos (CPF) 15 ve 100 mg/kg dozlarında sıçanlara uygulanarak nörotoksik etkiler incelenmiştir. Bu araştırmacılar yapmış oldukları otopsi sonucunda beyinde histopatolojik lezyonlar, dejenerasyona uğramış ve trapezoid sinir hücreleri gözlemiştir. Aynı araştırmacılar, lumbar spinal kordda elipsoid miyelin, servikal spinal kordda ise dejeneratif sinir hücreleri tespit etmişlerdir [35].

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan neonikotinoid bir insektisit olan acetamiprid ve antagonisti tubokurarinin kurbağa *Rana ridibunda* siyatik siniri üzerine etkileri incelenmiştir. Acetamiprid ve d-tubokurarin'in kurbağa siyatik siniri üzerine *in vitro* koşullarda doza ve uygulama süresine bağlı etkileri elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle multidisipliner olarak araştırılmıştır. Acetamipridin bütün doz grupları uygulama süresine bağlı olarak *Rana ridibunda* siyatik sinir aksiyon potansiyeli genliğini kontrol grubuna (0. dk) göre anlamlı biçimde düşürmüştür. Acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden latansı uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde arttırdığı gözlemlendi. Acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden alanı, uygulama süresine bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre önemli biçimde azalttığı gözlemlendi. Acetamiprid sinir aksiyon potansiyeli süresini, zamana bağlı olarak 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır.

nAChR antagonisti olan tubokurarin acetamiprid ile birlikte uygulandığı gruplarda acetamipridin sinir hücrelerinde meydana getirdiği değişiklikleri kısmen ortadan kaldırdığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Farooqui, T. "A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis", *Neurochemistry International*, 62:122-136, (2013).
- [2] Kumargal, D., Çömelekoğlu, Ü., Aşkın, A. "İyon kanallarını hedef alan insektisitler", *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg*, 5(2): 7-13,(2012).
- [3] Vuran, N., "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 659 s., (2005).
- [4] Eddleston, M., Bateman, D.N. "Pesticides", *Specific substances*, 1:147-150, (2011).
- [5] Aliferis, K.A., Jabaji, S. "Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100:105–117, (2011).
- [6] Nauen, R., Kintscher, U.E., Salgado, V.L., Kausmann. M. "Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76:55–69, (2003).
- [7] Scharf, M.E., "Neurological effects of insecticides", *Encyclopedia of Pest Management*, (Editör: Pimental, D.), Marcel-Dekker, New York, 1-5, (2003).
- [8] Bloomquist, J.R. "Ion channels as targets for insecticides", *Ann Rev Entomol*, 41: 163-190, (1996).
- [9] Casida, J. E. and Quistad, G. B. "Golden age of insecticide research: past, present and future", *Ann Rev Entomol*, 43: 1-16, (1998).
- [10] Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., Sattelle, D. B. "Neonicotinoids: insecticides actig on insect nicotinic acetylcholine receptors", *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573-580, (2001).

[11] Soloway, S. B., Hanry, A. C., Kollmeyer, W. D., Padgett, W. M., Powell, J. E., Roman, S. A., Tieman, C. H., Corey, R. A., Horne, C. A., "Nitromethylene insecticides", *Advances in Pesticide Science*, (Editör: Geissbühler, H., Kearney, P. C. And Brooks, G. T.), Pergamon Press, Zurich, 206-217, (1979).

[12] Genper, J. I., Hall, L. M. Sattelle, D. B. "Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action", *Nature*, 276: 188-190, (1978).

[13] Millar, N. S. And Denholm, I. "Nicotinic actylholin receptors: targets for commercially important insecticides", *Invertebrate Neuroscience*, 7(1): 53-66, (2007).

[14] Nauen, R. And Bretschneider, T. "New modes of action insecticides", *Pesticides Outlook*, 13(6): 241-5, (2002).

[15] Farooqui, T. "A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis", *Neurochemistry International*, 62:122–136, (2013).

[16] Barnard, E. A. "Receptor classes and the transmitter-gated ion channels", *Trends Biochem Sci*, 17(10): 368-374, (1992).

[17] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., "Mollecular Biology of The Cell ", Garland Science Taylor, New York, 1463 s., (2002).

[18] Pehlivan, F., "Biyofizik", Feryal Matbaası, Ankara, 412 s., (2004).

[19] Millar, N. S. and Denholm, I. "Nicotonic acetylholin receptors: targets for commercially important insecticides", *Invert Neuroscience*, 7(1): 53-66, (2007).

[20] Arthur, C. And Guyton, M. D., "Tıbbi Fizyoloji, Textbook of Medical Physiology", Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1024 s., (1998).

[21] Özeti, N., Yılmaz, İ., "Türkiye Amfibileri", Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 221 s., (1994).

[22] Demirsoy, A., "Türkiye Omurgalıları-Amfibileri", Meteksan A. Ş., Ankara, 69 s., (1996).

[23] Pehlivan, F., "Biyofizik", Hacettepe T. A. Ş., Ankara, 412 s., (1997).

[24] Freeborn, D. L., McDaniel, K. L., Moser, V. C., Herr, D. W., "Use of electroencephalography (EEG) to assess CNS changes produced by pesticides with different modes of action: Effects of permethrin, deltamethrin, fipronil, imidacloprid, carbaryl, and triadimefon", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282, 184-194, (2014).

[25] Tan, J., Galligan, J. J., Hollingworth, R. M., "Agonist actions of nicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons", *NeuroToxicology*, 829-842, (2007).

[26] Askin, A., Comelekoglu, U., Yilmaz, B. C., Yalin, S., Aktas, S., Mazmanci, B., Camlica, Y., Celik, A., "Neurotoxic actions of lambda-cyhalothrin on rat sciatic nerve", *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(1), 100-107, (2010).

[27] Zafeiridou, G., Theophilidis, G., "The action of the insecticide imidacloprid on the respiratory rhythm of an insect: the beetle *Tenebrio molitor*", *Neuroscience Letters*, 365, 205-209, (2004).

[28] Thany, S. H., "Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion", *NeuroToxicology*, 1045-1052, (2009).

[29] Levin, E. D., Chrysanthis, E., Yacisin, K., Linney, E., "Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination", *Neurotoxicology and Teratology*, 25, 51-57, (2003).

[30] Ballı, E., Yalin, S., Mazmancı, B., Mazmancı, M. A., Söğüt, F., Eroğlu, P., Yetkin D., Korkutan, S., Çömelekoğlu, Ü., "Deltametrinin oluşturduğu periferik sinir hasarları üzerine E vitamininin etkisinin araştırılması", *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), (2014).

[31] F., M., El-Demerdash, "Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides", *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1346-1352, (2011).

[32] Beneteau, A. B., Carvalho, S. M., Brunet, J. L., , Carvalho, G. A., Bulete, A., Giroud, B., Belzunces, L. P., "Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82, 22-31, (2012).

[33] Acker, C. I., Souza, A. C. G., Pinton, S., Rocha J. T., Friggi, C. A., Zanella, R., Nogueira, C. W., "Repeated malathion exposure induces behavioral impairment and AChE activity inhibition in brains of rat pups", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2310-2315, (2011).

[34] Singh, V., Hussein, M., Singh, A. K., Hassan, M. A., Gupta, P., "Histological and immunohistochemical changes in cerebellum of chick embryos after exposure to neonicotinoid insecticide imidacloprid", *Journal of the Anatomical Society of India*, 64, 122-127, (2015).

[35] Mattson J. L., Wilmer J.W., Shankar, M. R., Berdasco, N. M., Crissmas J. W., Maurissen, J. P., Bond, D. M., "Single-dose and 13-Week Repeated-Dose Neurotoxicity Screening Studies of Chlorpyrifos Insecticide", *Food and Chemical Toxicology*, 34, 393-405, (1996).

SALİH CÜFER BEDİZ

Atatürk Mh. 70 sk. Eren Sitesi B blok D:6 Mezitli /MERSİN

Ev: (324)3572372, Cep: (536) 5128460

E-mail: salihbediz@gmail.com

1. Soyadı : BEDİZ
2. Adı : Salih Cüfer
3. Doğum tarihi : 08.11.1986
4. Medeni Hali : Bekar
5. Uyuğu : T.C. – K.K.T.C
6. Ehliyet : B (2004)
7. Doğum yeri : MERSİN
8. Eğitim :

2013-2016 :Mersin Üniversitesi Biyoloji anabilim dalı Toksikoloji Yüksek Lisans

2005-2011 : Mersin Üniversitesi, Biyoloji bölümü lisans öğrenimi

2000-2004 : Mersin Pakize Kokulu Süper Lisesi

1992-1999 : Mersin İleri İlköğretim Okulu

9. Yabancı dil : İleri seviyede ingilizce

10. Bilgisayar : Windows NT, Microsoft Ofis programları, internet.

11. Kurs ve Etkinlikler :

- MEB onaylı Bilgisayar İşletmenlik Kursu (2004)
- Work and Travel bünyesinde 19 Haziran- 29 Eylül 2011 tarihinde A.B.D'de çalıştım.

12.Lisans öğreniminde alınan görevler:

- 2005-2009 :Doğa ve Kültür Varlıklarını Koruma TopluluğuÜyeliği
- 2005-2008 : Mersin Üni. Voleybol Takımı
- 2005-2010 : Mersin Üni. Basketbol Takımı

13. Hobiler: Yüzmek, film izlemek, basketbol, voleybol oynamak

