

**NEONİKOTİNOİD İNSEKTİSİTLERDEN
İMİDACLOPRİD'İN KURBAĞA (*RANA RIDIBUNDA*)
İSKELET KASI ÜZERİNE ELEKTROFİZYOLOJİK
ve HİSTOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DİLEK AKBAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Ali AŞKIN**

**MERSİN
MART – 2014**

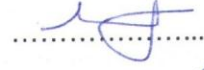
Dilek AKBAŞ tarafından Prof. Dr. Ali AŞKIN danışmanlığında hazırlanan “Neonikotinoid İsektisitlerden İmidacloprid’in Kurbağa (*Rana ridibunda*) İskelet Kası Üzerine Elektrofizyolojik ve Histolojik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

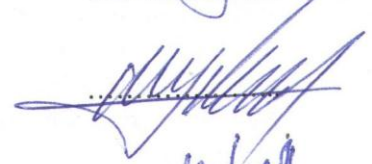
Prof. Dr. Ali AŞKIN



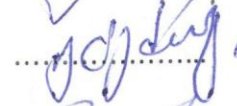
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ



Doç. Dr. Birgül MAZMANCI



Yrd. Doç. Dr. Sevgi GÜNEŞ



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/03/2016 tarih ve 2014.7/235 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



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

NEONİKOTİNOİD İNEKTİSİTLERDEN İMİDACLOPRİD'İN KURBAĞA (*RANA RIDIBUNDA*) İSKELET KASI ÜZERİNE ELEKTROFİZYOLOJİK ve HİSTOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek AKBAŞ

ÖZ

Bu çalışmada bir neonikotinoid insektisit olan imidaclopridin ergin kurbağa iskelet kas hücrelerinin dinlenme membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli genliği, süresi ve latansı üzerine etkileri mikroelektrot yöntemi ve kas hücrelerinin ultrastrüktürel yapısı üzerine etkileri ise transmisyon elektron mikroskobu ile araştırılmıştır.

İmidaclopridin doza bağlı etkilerini araştırabilmek için 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M konsantrasyonlarda beş farklı imidaclopridin doz grubu oluşturulmuştur. Her bir doz grubunda zamana bağlı etkileri araştırabilmek için 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakikalarda ölçümler alınmıştır. 10^{-3} ve 10^{-4} M imidacloprid iskelet kası dinlenme membran potansiyelini uygulamanın ilk 5. dakikasından itibaren, 10^{-5} M imidacloprid uygulamanın 10. dakikasından itibaren istatistiksel olarak arttırmıştır. 10^{-6} M imidacloprid ise dinlenme membran potansiyelini 30. dakikada istatistiksel olarak arttırmıştır. Tekil aksiyon potansiyeli genliği ise 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} M imidacloprid tarafından uygulamanın ilk 5. dakikasından itibaren istatistiksel olarak artmıştır. Tekil aksiyon potansiyeli süresi 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyonunda 25. dakikada istatistiksel olarak artmış diğer doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. Latans 10^{-3} M imidacloprid grubunda uygulamanın ilk 10. dakikasından itibaren, 10^{-4} M imidacloprid grubunda 20 ve 30 dakikalarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bir nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti olan tubokurarin imidaclopridin dinlenme membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli genliği, süresi ve latansında meydana getirdiği etkileri ortadan kaldırmıştır.

İmidacloprid iskelet kas hücrelerinin ultrastrüktürel yapısında bozulmalar meydana getirmiştir. 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M imidacloprid miyofibril dejenerasyonuna ve sarkomer bütünlüğünün bozulmasına, mitokondriyal harasa, sarkoplazmik retikulumda genişlemelere ve miyofibriller arası glikojen birikmesine neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Neonikotinoid İnektisitler, İmidacloprid, Nikotinik Asetilkolin Reseptörü, Tekil Aksiyon Potansiyeli, İskelet Kası Ultrastrüktürel Yapısı.

Danışman: Prof. Dr. Ali AŞKIN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

THE INVESTIGATION OF THE ELECTROPHYSIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL EFFECTS OF A NEONICOTINOID INSECTICIDE IMIDACLOPRID ON SKELETAL MUSCLE OF FROG (RANA RIDIBUNDA)

Dilek AKBAŞ

ABSTRACT

In this study, the effects of neonicotinoid insecticide, imidacloprid on adult frog skeletal muscle cells resting membrane potential, action potential amplitude, duration and latency were investigated by microelectrode method and its effects on the ultrastructure of muscle cells were investigated by transmission electron microscope.

In order to investigate the dose depended effects of imidacloprid, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M concentrations of five different dose groups were formed with imidacloprid. To investigate time depended effects in each dose group, measurements were taken in the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th minutes. 10^{-3} and 10^{-4} M imidacloprid statistically increased skeletal muscle resting membrane potential from the first 5 minutes of application, 10^{-5} imidacloprid statistically increased the resting membrane potential from 10 minutes of application. Also, 10^{-6} M imidacloprid statistically increased the resting membrane potential at 30th minute. Single action potential amplitude was statistically increased by 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M imidacloprid from the first 5 minutes of application. Single action potential duration was statistically increased of 10^{-3} M imidacloprid concentration at 25th minute but other dose groups showed no statistically significant change. Latency was statistically decreased in concentration of 10^{-3} M imidacloprid group from the 10th minute and in concentration of 10^{-4} M imidacloprid group at 20th and 30th minutes. Tubocurarine, a nicotinic acethylcholine receptor antagonist, has reversed the effects of imidacloprid on resting membrane potential, action potential amplitude, duration and latency.

Imidacloprid induced defects in the ultrastructural composition of skeletal muscle cells. On the other hand, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M imidacloprid caused degeneration of myofibrils, disruption of sarcomere integrity, mitochondrial damage, sarcoplasmic reticulum expansion and glycogen accumulation between myofibrils.

Key Words: Neonicotinoids Insecticides, Imidacloprid, Nicotinic Acetylcholine Receptor, Single Action Potential, The Ultrastructure Composition of Skeletal Muscle

Advisor: Prof. Dr. Ali ASKIN, Department of Biology, University of Mersin

TEŐEKKÜR

Tez araştırmamı yönlendiren, çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ali AŞKIN'a teőekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü bilgi, tecrübe, maddi ve manevi yardım ve katkısını esirgemeyen, MEÜ Tıp Fakóltesi Biyofizik Laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, Sayın Hocam Prof. Dr. Ülkü ÖMELEKOęLU'na teőekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, MEÜ Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarlarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Necat YILMAZ'a teőekkür ederim.

Her türlü katkı ve desteğini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyelerinden Sayın Hocam Doç. Dr. Birgül MAZMANCI'ya teőekkür ederim.

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

Tez çalışmama yaptıkları katkıdan ötürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevgi GÜNEŞ'e, Sayın Doç Dr. Ebru BALLI'ya, Arş. Gör. Tuba ÖZCAN'a teőekkür ederim.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi destekleriyle daima bana güç veren sevgili Eşim ve Aileme ve bu süreçte yanımda olan tüm sevdiklerime sonsuz teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŐEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ŐİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŐTIRMALARI	4
2.1. İNEKTİSİTLER.....	4
2.1.1. Neonikotinoidler.....	7
2.1.1.1. İmidacloprid.....	12
2.2. DİNLENİM MEMBRAN POTANSİYELİ.....	13
2.3. İYON KANALLARI.....	14
2.3.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri.....	17
2.4. İMİDACLOPRİDİN BÖCEKLER ÜZERİNE ETKİLERİNE DAİR ÇALIŞMALAR.....	21
2.5. İMİDACLOPRİDİN HEDEF OLMAYAN CANLILAR ÜZERİNE ETKİLERİNE DAİR ÇALIŞMALAR.....	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	28
3.2. KAS DOKULARININ DİSEKSİYONU.....	29
3.3. UYGULANAN KİMYASALLAR.....	29
3.4. DENEY GRUPLARI.....	29
3.5. HÜCRE İÇİ ELEKTROFİZYOLOJİK DENEYLER.....	32
3.5.1. Mikropipetlerin Hazırlanması.....	32
3.5.2. Elektrofizyolojik Kayıt Sistemi.....	33
3.5.3. Dinlenim Membran Potansiyeli Kaydı.....	34

3.5.4. İskelet Kas Hücrelerine Uygulanan Akım Protokolü.....	34
3.6. ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME.....	35
3.7. ANALİZ.....	37
3.8. İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRMELER.....	38
4. BULGULAR ve TARTIşMA.....	40
4.1. HÜCRE İÇİ ELEKTROFİZYOLOJİK BULGULAR.....	40
4.1.1. İmidaclopridin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Zamana Bağlı Etkileri.....	40
4.1.1.1. 10^{-3} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri.....	40
4.1.1.2. 10^{-3} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri.....	41
4.1.1.3. 10^{-4} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri.....	42
4.1.1.4. 10^{-4} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri.....	43
4.1.1.5. 10^{-5} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri.....	44
4.1.1.6. 10^{-5} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri.....	45
4.1.1.7. 10^{-6} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri.....	46
4.1.1.8. 10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri.....	47
4.1.1.9. 10^{-7} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri.....	48
4.1.1.10. 10^{-7} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri.....	49
4.1.2. İmidaclopridin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Doza Bağlı Etkileri.....	50
4.2. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR.....	54
4.2.1. Kontrol Grubu.....	54
4.2.2. 10^{-3} M İmidacloprid Grubu.....	57
4.2.3. 10^{-4} M İmidacloprid Grubu.....	60
4.2.4. 10^{-5} M İmidacloprid Grubu.....	63
4.2.5. 10^{-6} M İmidacloprid Grubu.....	66
4.2.6. 10^{-7} M İmidacloprid Grubu.....	69
4.3. TARTIşMA.....	72
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİş VE ESERLER LİSTESİ.....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Memeli kas hücreleri için yaklaşık iyon konsantrasyonları.....	13
Çizelge 3.1. İmidacloprid deney grupları.....	30
Çizelge 3.2. Antagonist kombinasyon grupları.....	31
Çizelge 3.3. Histolojik inceleme için oluşturulan deney grupları.....	32
Çizelge 4.1. 10^{-3} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	41
Çizelge 4.2. 10^{-3} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	42
Çizelge 4.3. 10^{-4} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	43
Çizelge 4.4. 10^{-4} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	44
Çizelge 4.5. 10^{-5} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	45
Çizelge 4.6. 10^{-5} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	46
Çizelge 4.7. 10^{-6} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	47
Çizelge 4.8. 10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	48
Çizelge 4.9. 10^{-7} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	49
Çizelge 4.10. 10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İnsektisitlerin hücrede etkileşime girdikleri pirimer hedef bölgeler ve etki biçimleri.....	5
Şekil 2.2 Yaygın olarak kullanılan insektisit grupları, organizmada etki ettikleri hedef molekül ve hedef bölgede meydana gelen fonksiyon değişimi.....	7
Şekil 2.3. Nikotinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.4. Kloronikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı.....	9
Şekil 2.5. Thianikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı.....	10
Şekil 2.6. Furanikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı.....	10
Şekil 2.7. Neonikotinoid insektisitlerin öncü molekülü olan nithiazin ve neonikotinoid insektisitlerin kimyasal yapılar.....	11
Şekil 2.8. İmidaclopridin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.9. Kanalı aktif hale getiren uyarı temel alınarak sınıflandırılan iyon Kanalları.....	15
Şekil 2.10. Liganda bağımlı iyon kanallarının şematik gösterimi. A) Herbir alt ünite de bulunan transmembran segmentler. B) Alt ünite sayıları ve dizilimleri temelinde üç ana kategoriye ayrılan liganda bağımlı iyon kanalları.....	16
Şekil 2.11. Heteromerik kassal nAChR'ünün şematik görünüşü. Sol üst; reseptör alt ünitelerinin pentamerik dizilimi, sol alt; reseptörün α alt üniteleri ve asetilkolin bağlanma bölgeleri, sağ üst; α alt ünitesinin dört transmembran segmenti ve asetilkolinin bağlandığı N terminal kısmı...18	
Şekil 2.12. Omurgalı nAChR alt ünitelerinin filogenetik akrabalıkları (solda) ve nöronal ve kassal nAChR'lerinin alt ünite kompozisyonları (sağda). İki alt ünite arasındaki muhtemel agonist bağlanma bölgeleri küçük koyu noktalar ile gösterilmiştir.....	20
Şekil 3.1. Ova kurbağası (<i>Rana ridibunda</i>).....	28
Şekil 3.2. Mikroelektrot yöntemi için kullanılan hücre içi elektrofizyolojik kayıt sistemi.....	33
Şekil 3.3. Akım klamp protokolü.....	35
Şekil 3.4. JEOL JEM-1011 transmisyon elektron mikroskobu (TEM).....	37
Şekil 3.5. Mikroelektrot ölçümlerinde değerlendirilen parametreler.....	38
Şekil 4.1. İskelet kası dinlenme membran potansiyeli üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).....	51
Şekil 4.2. İskelet kası aksiyon potansiyeli genliği üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$), b; 10^{-4} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).....	52

Şekil 4.3. İskelet kası aksiyon potansiyeli süresi üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).....	53
Şekil 4.4. İskelet kası latans üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM).....	53
Şekil 4.5. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü (X6,000).....	54
Şekil 4.6. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondri (Mt), sarkoplazmik retikulum (ok) (X15,000).....	55
Şekil 4.7. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), sarkoplazmik retikulum (ok) (X20,000).....	56
Şekil 4.8. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X6,000).....	57
Şekil 4.9. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibrillerde yoğun dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).....	58
Şekil 4.10. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondrilerde vakuol oluşumu (Mt), miyofibrillerde kopma ve yoğun dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).....	59
Şekil 4.11. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), lipid (L) (X6,000).....	60
Şekil 4.12. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondri (Mt), nukleus (N), lipid (L), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).....	61
Şekil 4.13. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), mitokondri (Mt), miyofibrillerde yoğun dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).....	62
Şekil 4. 14. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X6,000).....	63
Şekil 4.15. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).....	64

Şekil 4.16. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), mitokondri (Mt), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).....	65
Şekil 4.17. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü (X6,000).....	66
Şekil 4. 18. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).....	67
Şekil 4.19. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), glikojen birikimi (G), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).....	68
Şekil 4.20. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibrillerde kopma (ok başı) X6,000.....	69
Şekil 4.21. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde hafif dejenerasyon (ok başı), normal görünümlü sarkoplazmik retikulum sisternası (ok) (X15,000).....	70
Şekil 4.22. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), normal görünümlü sarkoplazmik retikulum sisternası (ok) (X20,000).....	71

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

M	: Molar
mM	: Milimolar
mV	: Milivolt
nA	: Nanoamper
ms	: Milisaniye
mm ³	: Milimetreküp
dk	: Dakika
Na ⁺	: Sodyum İyonu
K ⁺	: Potasyum İyonu
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum İyonu
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
%	: Yüzde
NaCl	: Sodyum klorür
KCl	: Potasyum klorür
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
NaHCO ₃	:Sodyum bikarbonat
Ag/AgCl	: Gümüş/Gümüşklorür
ACh	: Asetilkolin
nAChR	:Nikotinik Asetilkolin Reseptörü

1. GİRİŞ

Birçok farklı alanda zararlıları yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik savaş maddelerine pestisit denir [1]. Pestisitler kullanma yerlerine göre insektisitler (böceklere karşı), herbisitler (yabani otlara karşı), rodentisitler (kemiricilere karşı), akarisitler (uyuz böcekleri ve parazitlere karşı) ve molusisitler (yumuşakçalara karşı) olarak gruplandırılırlar. Günümüzde pestisit kullanımı, gittikçe artan nüfusla birlikte açlık tehlikesiyle karşı karşıya kalmamak için tarımsal alanda ürün veriminin ve kalitesinin arttırılmasında, ayrıca kemiriciler, böcekler ve diğer zararlıların yok edilerek, bu hayvanlarla taşınan vektör hastalıklara karşı savaşılmasında oldukça yaygındır. Kullanımının halk sağlığı ve ekonomisine birçok yararı bulunan pestisitler diğer taraftan, geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarla su, toprak, hava ve besin kirlenmesine neden olarak ekolojik sistemin dengesini bozmaktadırlar. Ayrıca bunların bazıları seçici olarak kullanıldıkları canlı türü için toksik olurken (selektif toksik), bir kısmı da insanlar ve diğer omurgalı hayvanlara zarar verirler. Pestisitlerin bu fayda zarar ilişkisini değerlendirmek oldukça güçtür [1].

İnektisitler genel olarak elde ediliş biçimlerine göre biyolojik kökenli doğal insektisitler ve sentetik insektisitler olarak ikiye ayrılırlar [2]. Kimyasal yapılarına göre ise klorlu hidrokarbonlar, organofosforlu bileşikler, metilkarbamatlar, piretroitler, oksadiazinler, dihidropirozoller, antranilik diamitler ve neonikotinoid insektisitler olmak üzere sekiz gruba ayrılırlar [2, 3].

İnektisitlerin kullanım alanlarının yaygın olması ve kullanılış biçimlerinin farklı olması (püskürtme, suya karıştırma, toprağa serpmeye vs.) nedeniyle sadece hedef canlı olan zararlı böceklere değil, hedef olmayan bitki hayvan ve insanlara da kolayca ulaşabilmelerini sağlamaktadır [1]. İnektisit çeşitliliğinin fazla olması ve her geğen gün yeni insektisitlerin piyasaya sürülmesi, insektisitlerin sadece böcekler değil, diğer canlılar üzerindeki etki mekanizmalarının araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Neonikotinoidler son yıllarda üretilen en önemli sentetik insektisit sınıfıdır. Etkisi ve yapısı kısmen nikotine benzerlik gösteren bu yeni insektisit sınıfı [4], böcek nöral nikotini asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerine kısmi agonist etki gösterir [5, 6, 7, 8, 9]. Neonikotinoidlerin böceklere olan seçici toksisitesi böcek sinir sistemindeki nöral nAChR'lerinin omurgalı sinir sistemindeki nöral nAChR'lerinden yapısal olarak daha farklı olması nedeniyle böcek nAChR'lerine daha yüksek afinite göstermelerinden kaynaklanmaktadır [9, 10]. Böceklerde nAChR'leri yalnız sinir sisteminde bulunurken, omurgalılar ve özellikle memelilerde nAChR'lerinin sinir sistemi, sinir-kas kavşağının yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalar makrofaj, lenfosit, adiposit ve birçok epitel hücrede de bulunduğunu göstermiştir [11, 12, 13, 14]. Bu nedenle neonikotinoidlerin sadece hedef organizma olan böceklerin sinir sisteminde değil, diğer organizmaların sinir sistemi dışındaki dokular üzerine etkisinin de araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. İskelet kası, nAChR'leri bakımından çok zengin bir doku olup, buradaki nAChR'leri sinir-kas kavşağında motor nörondan gelen sinyalin kas lifi boyunca yayılmasında ve kas kasılması gibi birçok fizyolojik işlevin başlamasında ana basamağı oluşturmaktadır [15].

Amfibiler (iki yaşamlılar), sucul ve karasal ekosistemler için önemli organizmalar olup [16], yaşam döngülerinde hem su, hem de karasal faz ve suya yumurtlama gibi evreler olduğundan ekosistemdeki toksik maddelere, özellikle pestisitlere oldukça fazla maruz kalırlar [17]. Bu canlılar, yaşam döngüleri boyunca habitatlarındaki değişikliklere karşı duyarlılık gösterirler, su ve kara ekosistemleri için biyoindikatör olarak kabul edilirler [18, 19, 20]. Günümüzde, dünya çapında amfibi popülasyonlarının giderek azalması, pestisitlerin bu canlılar üzerine olan etkilerinin araştırılmasını zorunlu kılmıştır [21, 22].

Neonikotinoidler sınıfından olan imidaclopridin, hedef olmayan canlıların (omurgalıların) fizyolojik ve yapısal etkilerine ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu tez kapsamında bir neonikotinoid insektisit olan imidaclopridin ergin kurbağa kas hücrelerinde sinyal iletimi üzerine olan etkileri ve kas hücresinin

ince yapısı üzerinde meydana getirdiği değişiklikler zamana ve doza bağlı olarak araştırılmıştır.

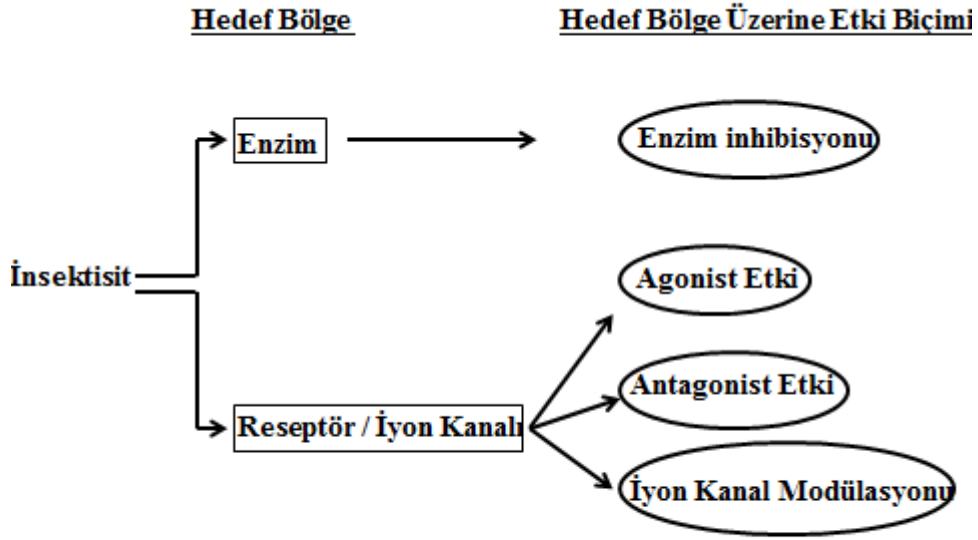
2. KAYNAK ARAŐTIRMALARI

2.1. İNEKTİSİTLER

İnektisitler başta tarım bitkilerini tehdit eden ve bulaşıcı hastalıkları taşıyan böceklerin kontrolünde kullanılan biyolojik veya kimyasal kökenli maddelerdir [2, 23]. Özellikle tarımda 1930'lu yıllara kadar daha çok bitkisel kaynaklı (nikotin gibi) inektisitler kullanılırken, 1930'lu yıllardan itibaren modern sentez kimyasındaki devrim ile birlikte çeşitli sentetik inektisitler üretilmiştir [1].

İnektisitler oldukça geniş bir grup olup, böceklerin gelişim evrelerini doğrudan böceklere özgü yapılar üzerinden etkileyen inektisitler; kitin sentez inhibitörleri, juvenil hormonu taklit eden inektisitler ve ektizon reseptör agonistleri olarak gruplandırılırlar. Bunların dışında kalan inektisit gruplarının çoğu yararlı organizmalar ve insanlara zararlı olup, ekolojik denge üzerinde daha çok olumsuz etkilere sebep olurlar [24].

Böcek gelişimini etkileyen inektisitlerin dışında kalan inektisitlerin neredeyse hepsi nörotoksik maddeler olup; başta böcekler olmak üzere canlıların sinir sistemi üzerine etkilidirler [1]. İnektisitlerin hedef bölgeleri, canlı organizmada inektisit molekülünün etkileşime girerek toksik etkilerini ortaya çıkarabilecekleri spesifik biyokimyasal veya fizyolojik bölgelerdir. İnektisitlerin fiziksel özellikleri, onları etkileşime girecekleri uygun bölgeleri hedef bölge olarak seçmeye zorlar [25]. Nörotoksik inektisitlerin hedef bölgeleri; böcek sinir sistemindeki enzimler, iyon kanalları veya reseptörlerdir [26, 27, 28]. İnektisitlerin hedef bölgeleri üzerine etkileri farklı olup, enzim inhibisyonundan, reseptör (veya iyon kanalı) üzerine agonist (uyarıma) veya antagonist (inhibisyon) etki ve iyon kanal modülasyonuna (iyon kanallarının açılıp-kapanma kinetiklerinin değiştirilmesi) kadar çok çeşitlilik gösterebilir (Şekil 2.1.) [25].



Şekil 2.1. İsektisitlerin hücrede etkileşime girdikleri primer hedef bölgeler ve etki biçimleri.

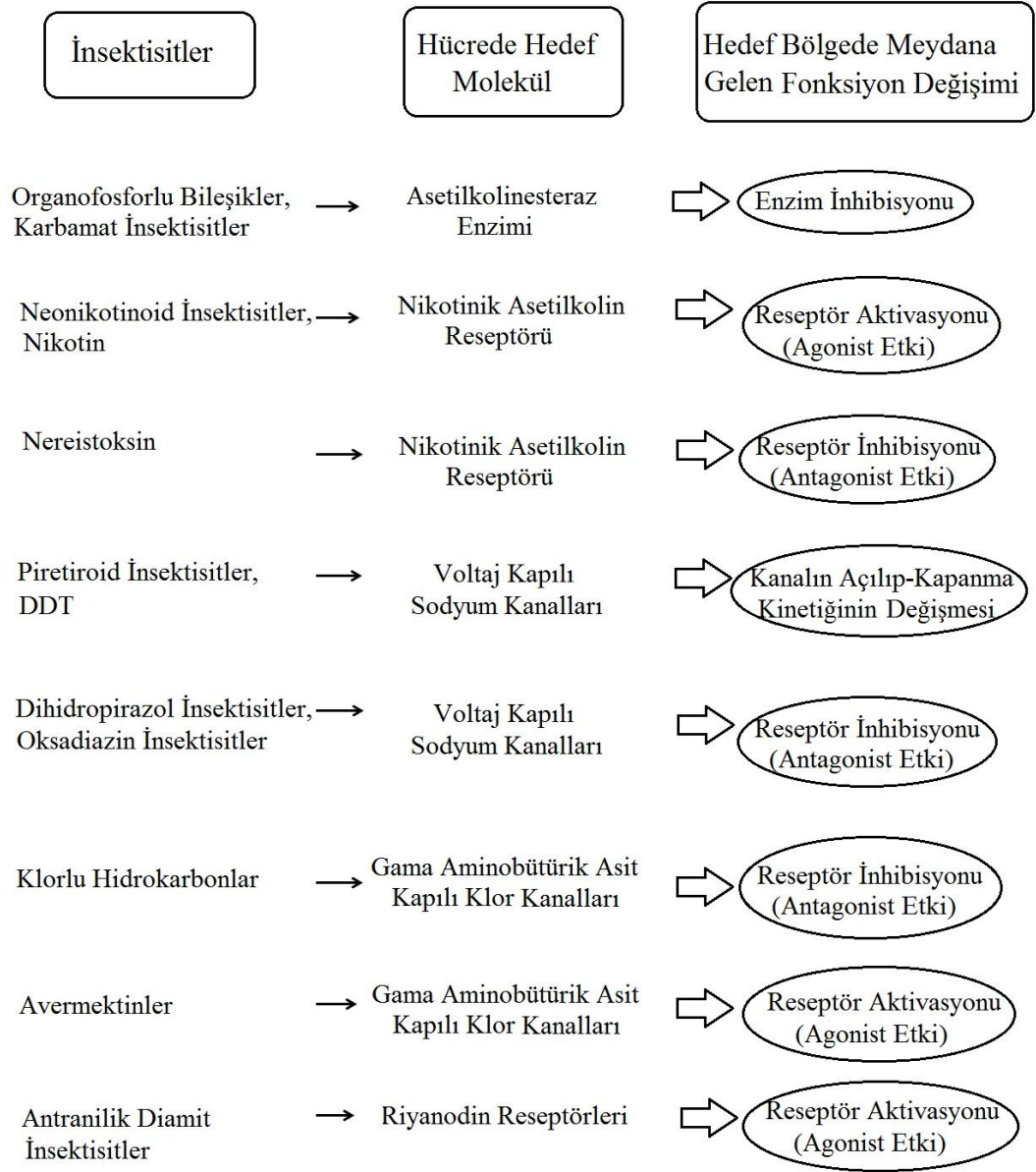
Organofosforlu bileşikler ve karbamat isektisitler asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek, sinir sistemi sinaplarında asetilkolinin postsinaptik reseptöre bağlanma süresini uzatırlar [25, 28]. Organofosforlu bileşikler asetilkolinesteraz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederken, karbamatlar asetilkolinesterazın geri dönüşümlü inhibitörleridir [25]. Sonuç olarak her iki isektisit grubu uzayan nöroeksitasyon nedeniyle organizmanın ölümüne neden olur.

Bir diğer isektisit grubu olan piretroidler, *Chrysanthemum cinerariaefolium* çiçeğinden elde edilen doğal bir isektisit olarak kullanılan piretrinlerin yapay analoglarıdır [29]. Klorlu hidrokarbonlardan DDT, (Dikloro difenil trikloroethan), piretrin ve piretroidlerin hücrede hedef bölgeleri aynı olup, benzer etki biçimlerine sahiptirler. Yapılan çalışmalar piretroidlerin hücre zarındaki sodyum kanallarının aktivasyon kapılarının hem açılmasını sağlayarak, hem de kapanmasını yavaşlatarak hücrede depolarizasyon süresini uzattığını göstermiştir [3]. Bu etki sonucunda uzun süre devam eden sodyum akımı ile özellikle nöronal işlevselliğin bozulması ve aşırı nöroeksitasyon meydana gelir. Diğer isektisitlerden

farklı olarak piretroid, piretrin ve DDT, hücre zarındaki sodyum iyon kanallarının açılıp kapanma kinetiklerini değiştirerek etkilerini gösterirler [25]. Öte yandan oksadiazinler ve dihidropirozol insektisitler de hücre zarındaki sodyum iyon kanallarına etkilidirler, fakat her iki insektisit grubu da piretroidlerden farklı olarak sodyum kanalları üzerine antagonist etki ederek, sodyum kanallarını bloke ederler [3, 30].

Klorlu hidrokarbon insektisitlerin çoğu, bir diğer iyon kanalı olan Gama-aminobütirik asit (GABA) kapılı klor kanalları üzerine etkilidirler [2]. GABA kapılı klor kanalları, sinir sistemi ve sinir kas kavşağında hücre içerisine klor iyonlarının akışını sağlayarak, inhibitör sinaptik ilettime aracılık eden ligand kapılı iyon kanalı ailesine ait iyonotropik reseptörlerdir [2]. Siklodienler gibi insektisitler ise GABA-kapılı klor kanallarını inhibe ederek, hücre içerisine inhibitör klor akımlarının bloke edilmesini ve nöroeksitasyonu gerçekleştirirler. Öte yandan avermektin insektisitler, GABA-kapılı klor kanallarının agonisti gibi etki ederek kanalı aktiveleştirir ve sinir hücreleri içerisine klor iyon akışını arttırarak sinirsel iletimin engellenmesine ve paralize olmasına yol açarlar [30].

Bir diğer grup olan, antranilik diamit insektisitler hedef bölgesi rıyanodin reseptörü olan insektisitlerdir [31]. Rıyanodin reseptörler kalp ve iskelet kası başta olmak üzere nöronlar, epitel hücreler, lenfositler gibi birçok hücre zarında bulunan ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum iyonunun sitoplazmaya salınmasını sağlayan voltaja duyarlı olmayan kalsiyum kanallarıdır [32, 33]. Antranilik diamit insektisitlerin bilinen etki mekanizması rıyanodin reseptörlerini aktive ederek hücre içi kalsiyum depolarından sitoplazmaya düzensiz kalsiyum iyon akışının oluşmasını sağlamaktır. Böylece, özellikle iskelet kas hücre sitoplazmasında kalsiyum derişiminin artmasına ve bunun sonucunda kas kontraksiyonu ve kas paralizine neden olurlar [26, 34].



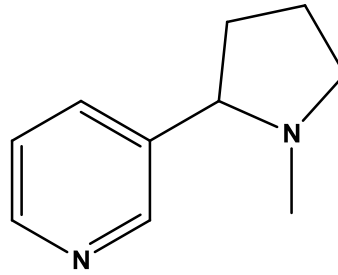
Şekil 2.2 Yaygın olarak kullanılan insektisit grupları, organizmada etki ettikleri hedef molekül ve hedef bölgede meydana gelen fonksiyon değişimi.

2.1.1. Neonikotinoidler

Neonikotinoidler, hem bir nitrometilen ve nitroimin, hem de siyanoimin grubuna sahip yeni sentetik insektisit grubudur [35]. Nitrometilenler ilk olarak 2-(nitrometil)piridin yapısında olan ve zayıf insektisit etkisine sahip bir bileşikten köken almıştır. Bu prototip üzerindeki ilk yapı-aktivite çalışması nithiazinin (2-

(nitrometilen)-tetrahidro-1,3-thiazin) keşfedilmesini sağlamıştır [36]. Nithiazinin insektisit etkisi 2-(nitrometil)piridine göre çok daha iyi olmasına rağmen, ışığa karşı duyarlı olan kararsız yapısından ötürü ticari olarak geliştirilmemiştir. Nithiazinin insektisit aktivitesi geliştirilerek ilk olarak Kagabu tarafından imidacloprid ve daha sonra imidaclopride akraba olan ve fotostabilitesi arttırılan diğer nitroiminler geliştirilmiştir [37, 38]. Ticari olarak önem arz eden imidacloprid, nitenpyram ve acetamiprid gibi neonikotinoidlerin hepsi 6-kloro-3-piridinil kısmına sahip olup, bu nedenle doğal bileşikler olan nikotin ve epibatidine benzerlik gösterirler [35].

Yapısal olarak nikotine benzerlik gösteren neonikotinoidler, etkileri bakımından da nikotine benzer özelliğe sahiptirler (şekil 2.3.). Nikotin yüzlerce yıl geleneksel tarımda doğal bir insektisit olarak kullanılmıştır. Nikotin ile ilgili yapılan radyoligand bağlama ve elektrofizyolojik deneyler, nikotinin böcek nAChR'lerine bağlanarak insektisit etkisini ortaya çıkardığını göstermektedir [39]. Fakat neonikotinoid gibi sentetik olarak üretilen yeni insektisitlerle karşılaştırıldığında nikotin, hedef olmayan canlılara ve özellikle memelilere yüksek toksisite gösterir [40]. Neonikotinoidler yapısal benzerliklerinden ötürü nikotin gibi nAChR'lerine bağlanarak etki ederler [41]. Nikotinin nAChR'leri üzerine güçlü etkisine rağmen ticari bir biyopestisit olarak kullanılmamasının nedeni; sadece böcek nAChR'lerine değil, aynı zamanda diğer hayvanların nAChR'lerine de etki ederek seçicilik göstermemesinden kaynaklanmaktadır [40].



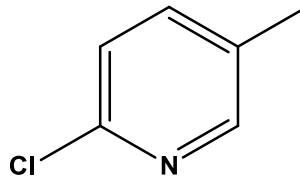
şekil 2.3. Nikotinin kimyasal yapısı [40].

Neonikotinoid bileşiklerin insektisit olarak kullanılmasındaki en önemli etken, böcek nAChR'lerine olan seçicilikleri olarak kabul edilir. Bu bileşiklerin

böcek nAChR'lerine olan seçiciliklerini ise negatif yüklü nitro veya siyano gruplarının böcek nAChR'lerindeki katyonik alt ünite ile etkileşime girerek sağladığı gösterilmiştir [10, 42]. Rekombinant nAChR'leri ile yapılan ileri çalışmalar, neonikotinoid bileşiklerin bağlanma karakteristikleri ve agonist etkilerini ortaya çıkarmaya yönelik olup [7, 8, 43, 44, 45]; radyoligand bağlanma çalışmaları *Drosophila*'dan elde edilen Da1, Da2 ve Da3 alt ünitelerini içeren veya diğer böcek türlerinden elde edilen analog alt üniteleri içeren nAChR'lerine neonikotinoid bileşiklerin yüksek bağlanma afinitesi gösterdiğine dair güçlü veriler elde edilmesini sağlamıştır [44, 46, 47, 48]. Ayrıca alan hedefli mutajenez gibi tekniklerin kullanıldığı çalışmalarda da nAChR alt ünitelerine özgül dizilimli amino asitlere neonikotinoid insektisitlerin seçici olarak bağlandığı gösterilmiştir [49, 50, 51, 52, 53].

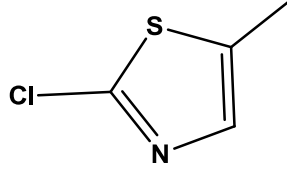
Neonikotinoidler kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle üç ana gruba ayrılırlar;

- i. *Kloronikotinil bileşikler*: Bu grup; imidacloprid, nitenpyram, acetamiprid ve thiacloprid insektisitleri içerir.



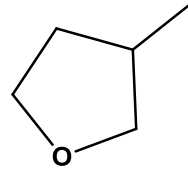
Şekil 2.4. Kloronikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı

- ii. *Thianikotinil bileşikler*: Bu ikinci grup thiamethoxam ve clothianidin insektisitlerinden oluşur.

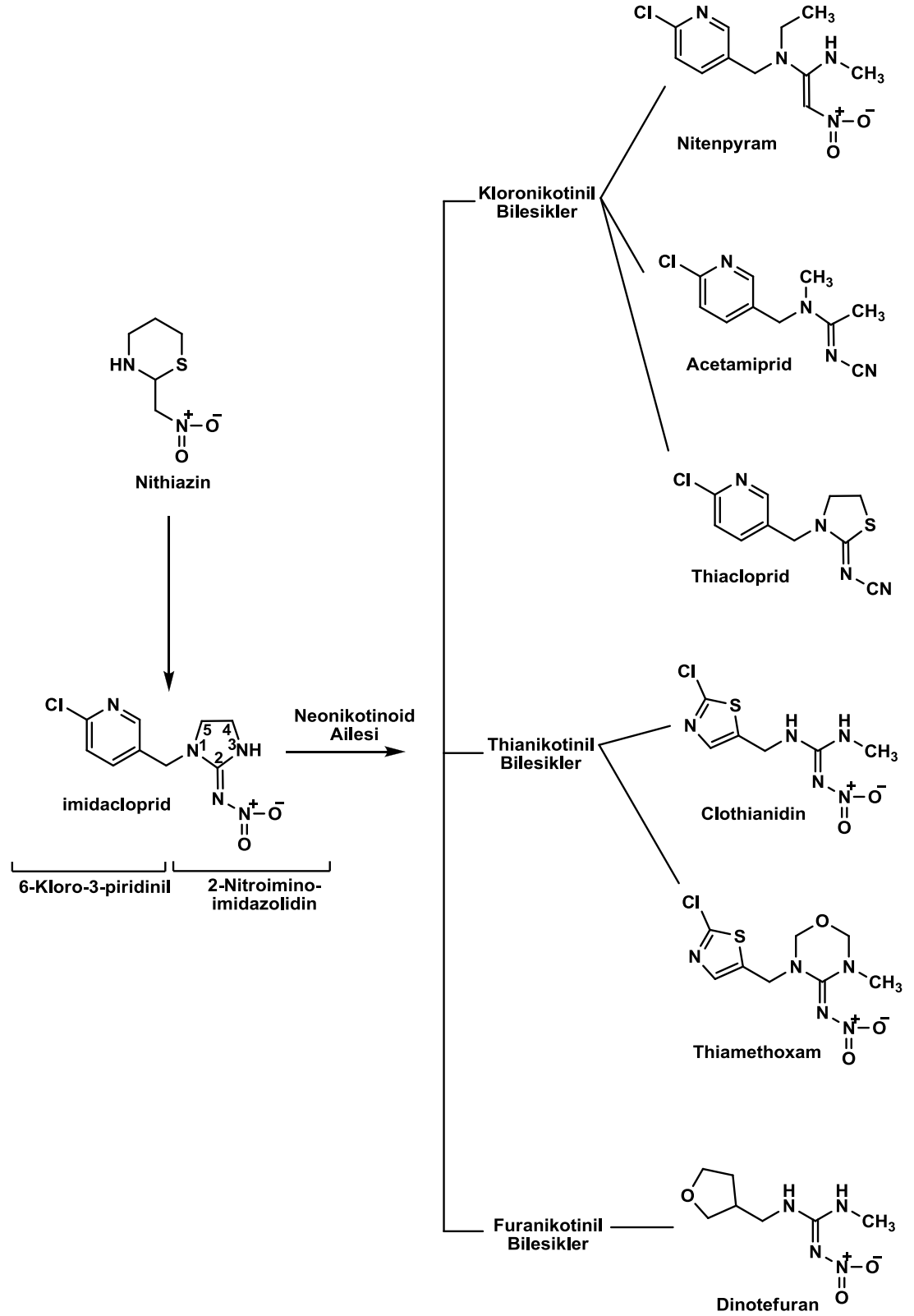


şekil 2.5. Thianikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı

- iii. *Furanikotinil bileşikler*: Bu grubun tek örneği dinotefuran insektisitidir.



şekil 2.6. Furanikotinil bileşiklerde bulunan ortak kimyasal yapı.

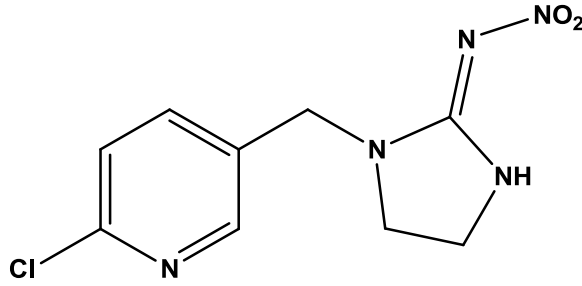


Şekil 2.7. Neonikotinoid insektisitlerin öncü molekülü olan nithiazin ve neonikotinoid insektisitlerin kimyasal yapıları [40].

Günümüzde neonikotinoidler, piretiroidlerden sonra piyasaya sürülen en hızlı büyüyen insektisit sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadır. Neonikotinoidler tarım zararlılarının kontrolü ve hayvan sağlığını koruma çalışmalarında (örneğin kedi ve köpek pirelerine karşı) geniş çaplı bir kullanım alanına sahiptirler [30].

2.1.1.1. İmidacloprid

İmidacloprid (1-((6-kloro-3-pridinil)metil)-N-nitro-2-imidazolidinimin) böcek merkezi sinir sistemini etkileyen bir nörotoksin olarak geliştirilen neonikotinoid insektisitlerin ilki ve en çok kullanılanıdır (Şekil 2.8.) [54].



Şekil 2.8. İmidaclopridin kimyasal yapısı [54].

İmidaclopridin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıdaki gibidir:

Kimyasal Formülü: C₉H₁₀ClN₅O₂

Molekül ağırlığı: 255,66 g/mol

Görünümü: Renksiz kristaller

Erime Noktası: 144-144,5 °C

Suda Çözünürlük: 0,51 g/L (20 °C'de) .

2.2. DİNLENİM MEMBRAN POTANSİYELİ

Dinlenme halindeki bir hücrenin iç tarafı, dışa göre negatif potansiyeldedir. Dinlenme membran potansiyeli olarak adlandırılan bu potansiyel, farklı hücrelerde -20 ile -100 mV arasında değişir [55]. Geleneksel olarak hücre dışı sıvı ortamın voltajı sıfır kabul edilir ve membran potansiyelinin polaritesi (pozitif veya negatif) hücre içindeki aşırı yükün şiddetine göre tarif edilir. Hücre dışı sıvı ortamın başlıca iyonları, sodyum ve klor iyonlarıdır. Hücre içi sıvı ortam ise, yüksek konsantrasyonda potasyum iyonu ve iyonize olmuş difüze olamayan molekülleri, özellikle negatif yüklü proteinleri ve fosfat bileşiklerini bulundurur [56].

Çizelge 2.1. Memeli kas hücreleri için yaklaşık iyon konsantrasyonları [55].

İyon Cinsi		Konsantrasyon	
		Hücrelerarası Sıvı ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Hücre İçi Sıvı ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
Kation	Na^+	145	12
	K^+	4,1	150
	H^+	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$13 \cdot 10^{-5}$
	Ca^{+2}	1,5	10^{-4}
	diğerleri	5	
Anyon	Cl^-	118	3,9
	HCO_3^-	27	12

2.3. İYON KANALLARI

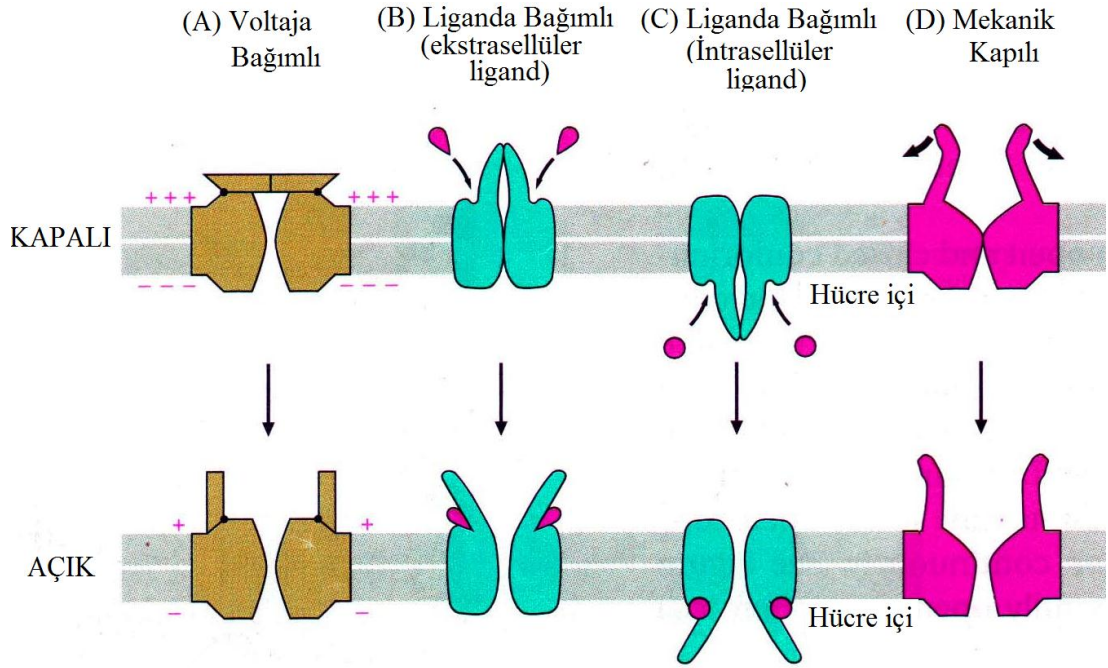
İyon kanalları genellikle kompleks yapılı çoklu alt ünitelere sahip transmembran proteinlerdir [57, 58, 59]. Bu protein yapıdaki kanallar, içi su dolu porlar şeklinde olup, uygun büyüklük ve elektrik yüküne sahip iyonların geçişine izin verirler. Protein yapıdaki bu iyon kanallarının çok az bir kısmı, her koşulda açık bulunabilir ve pasif veya kapısız kanal olarak adlandırılır. Aktif veya kapılı kanal olarak adlandırılan diğer çoğu protein yapıdaki iyon kanalları ise, özel kapıları tarafından açılıp kapanırlar. İyon kanalları, çok kısa süre için açılan ve derhal kapanan özel kapılara sahip olmaları nedeniyle membrandaki diğer protein oluşumlardan ayrılırlar. İyon kanallarının işlevi, spesifik inorganik iyonların (Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} vs. gibi), hücre zarında lipid çift tabaka boyunca elektrokimyasal gradientlerinin düşük olduğu yöne doğru hızlıca difüzyona uğramalarını sağlamaktır [55, 60].

İyon kanallarından geen iyon akışı, birçok hücre fonksiyonu için önemlidir. Özellikle sinir ve kas hücreleri, iyon kanallarını kullanabilme ile özelleşmişlerdir. Yaşamımızı sürdürecekt bütün fizyolojik oluşumlar (kalp atışı, kas kasılması, yüksek düzeyde kavrama vs. gibi) ile ilgili süreçler, büyük oranda bu kanalların işlevlerine bağlıdır [55, 60]. Ayrıca uyarılmayan hücrelerde (epitel hücreleri gibi) salgılama, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, osmotik basıncın düzenlenmesi gibi çok farklı süreçlerde iyon kanalları ana fonksiyona sahiptirler [61].

Hücre membranında farklı birçok iyon kanalı bulunur. İyon kanallarını sınıflandırmada en sık kullanılan yöntem; kanalı aktif hale getiren uyarı ve kanalın seçici geçirgenliği ön planda tutularak yapılan sınıflandırmadır [15, 55].

İyon kanalları, temel olarak liganda bağımlı iyon kanalları, voltaja bağımlı iyon kanalları ve mekanik kapılı iyon kanalları olarak sınıflandırılabilirler. 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 şiddetinin belirlenmesi,

dinlenme membran potansiyelinin kontrolü ve nörotransmitter salınımında doğrudan sorumludurlar [55]. Mekanik kapılı iyon kanalları, hücre membranındaki gerilmeye aktif veya inaktifleşen iyon kanallarıdır [62]. Liganda bağımlı iyon kanalları ise, kanala özgü bir ligandın kanala bağlanmasıyla aktive olan kanallardır. Liganda bağımlı bazı iyon kanalları, hücre dışından gelen bir ligand ile aktive olurken, diğer liganda bağımlı iyon kanalları hücre içinden gelen ligandlarla aktive olurlar [60].

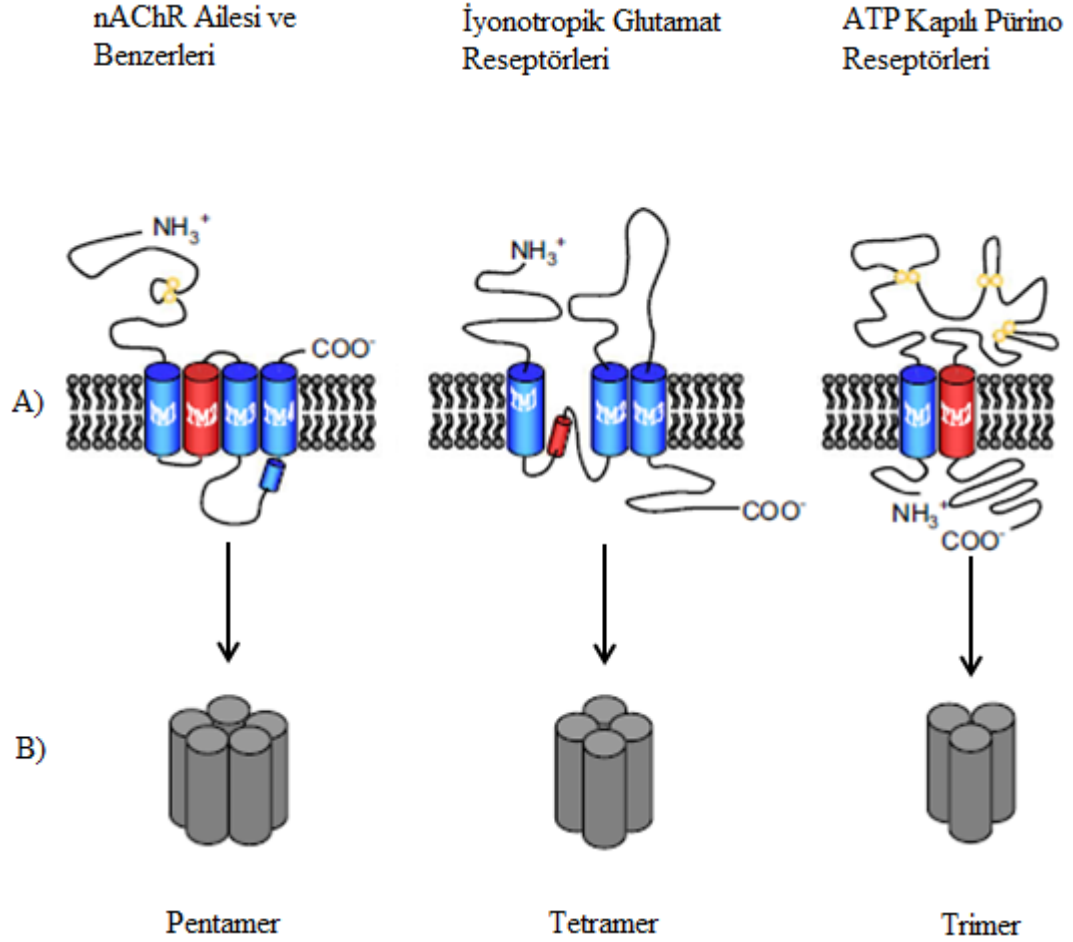


Şekil 2.9. Kanalı aktif hale getiren uyarı temel alınarak sınıflandırılan iyon kanalları [60].

Liganda bağımlı iyon kanallarının çoğu, nörotransmitter kapılı iyon kanallarındır ve bunlar iyonotropik reseptörler olarak da adlandırılırlar. Reseptör alt ünitelerinin amino asit dizilimlerinin benzerliği göz önünde bulundurularak yapılan sınıflandırmada, liganda bağımlı iyon kanalları üç ana gruba ayrılırlar;

- i. Nikotinik asetilkolin reseptörlerine benzer yapılı liganda bağımlı iyon kanalları; glisin reseptörleri (GlyR), gama aminobütirik asit

- reseptörleri ($GABA_A R$), nikotinic asetilkolin reseptörleri (nAChR) ve bazı serotonin reseptörleri ($5-HT_3 R$).
- ii. İyonotropik glutamat reseptörleri (GluR).
 - iii. ATP kapılı pürino reseptörleri (P2X) [63].



Şekil 2.10. Liganda bağımlı iyon kanallarının şematik gösterimi. A) Herbir alt ünite de bulunan transmembran segmentler. B) Alt ünite sayıları ve dizilimleri temelinde üç ana kategoriye ayrılan liganda bağımlı iyon kanalları [64].

Günümüzde yapılan özellikle fizyoloji temelli çalışmalar, hücre membranında bulunan ve sinyal iletiminde görev alan spesifik reseptör veya iyon kanallarının en çok kullanılan ticari insektisitlerin hedef bölgeleri olduğunu göstermektedir [3].

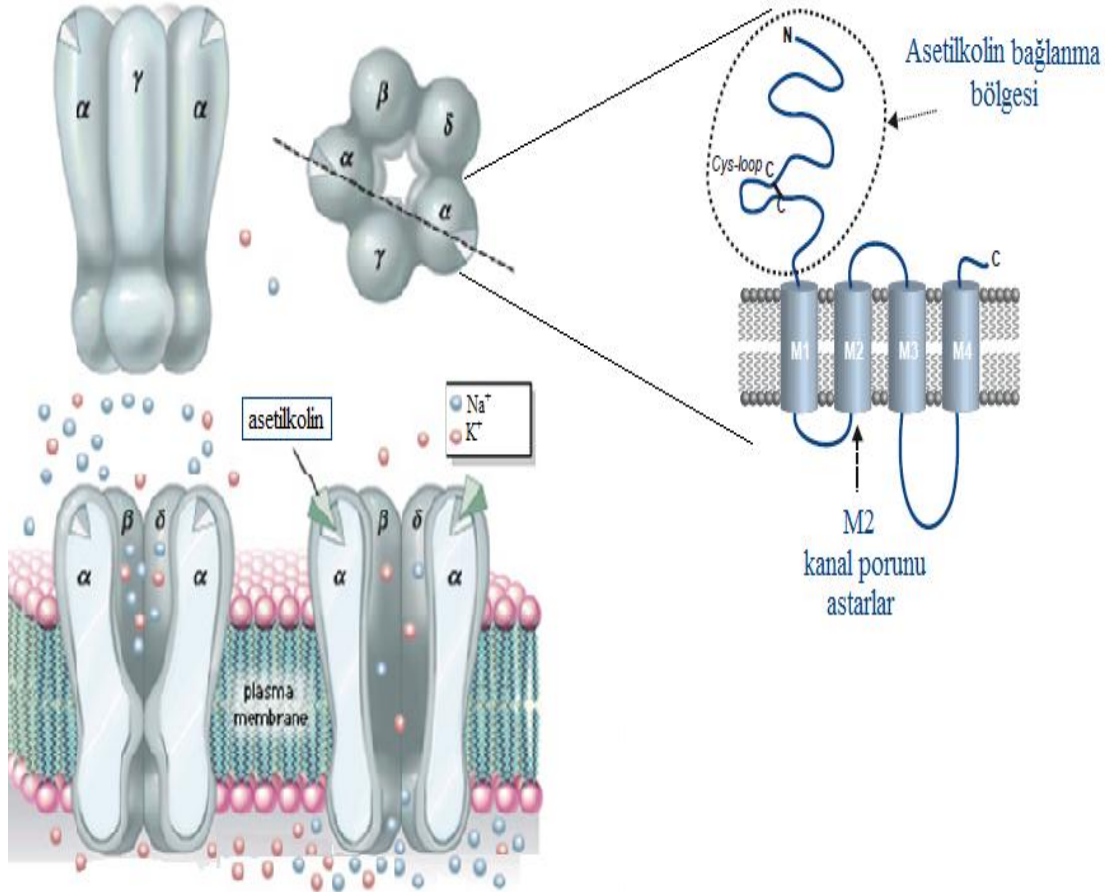
2.3.1. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) hem omurgalı, hem de omurgasızlarda eksitatör bir nörotransmitter olan asetilkoline duyarlı ligand kapılı iyon kanallarıdır [40]. Nikotinik asetilkolin reseptörleri, merkezinde genişliği $0,65 \times 0,65 = 0,40 \text{ nm}^2$ olduğu tahmin edilen içi su dolu bir kanala sahiptir. Bu genişlikteki bir kanaldan sodyum ve potasyumdan başka kalsiyum iyonları, bir ve iki değerlikli birçok katyon geçebilmektedir. Ancak, bu kanallar negatif yüklü anyonlara geçirgen değillerdir. Yapılan araştırmalar; kanalın ağzındaki negatif yüklü amino asitlerin $0,65 \text{ nm}$ 'den küçük pozitif yüklü iyonların geçişine izin verirken, negatif yüklü iyonların geçişini engellediklerini ortaya koymuştur. Katyonların arasındaki çok az seçicilik nedeniyle kanaldan geçişleri, başta hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonlarına ve elektrokimyasal sürüklenme güçlerine bağlıdır. Kas hücresi, dinlenim durumunda olduğu zaman, potasyumun net sürüklenme gücü sıfırdır çünkü voltaj gradienti zarın her iki yanında hemen hemen potasyum konsantrasyonu ile ayarlanır. Diğer yandan, sodyum için voltaj ve konsantrasyon gradientlerinin her ikisi de hücreye iyon girişi için aynı yönde faaliyet gösterir. Bu yüzden asetilkolin reseptörü oldukça fazla sodyum girişine müsaade eder (her milisaniyede bir kanaldan 30 000 iyon). Bu giriş, membran depolarizasyonuna neden olur. Bu olay kalsiyum iyonu için de aynıdır fakat kalsiyumun hücre dışı konsantrasyonu sodyuma nazaran çok düşüktür [55].

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 içersine hızla girişi gerçekleşir. Bu şekilde hücre membranında oluşan depolarizasyon, kas lifi membranında son plak potansiyeli denilen lokal bir potansiyel değişikliği oluşturur. Son plak potansiyeli daha sonra kas membranı boyunca yayılan aksiyon potansiyelini başlatır ve böylece kolinerjik iletim gerçekleşmiş olur [15].

nAChR'leri, her biri yaklaşık 500 amino asit bulunduran hücre membranını dört α -sarmal halinde kat eden (M1-M4), beş homolog polipeptit alt üniteden oluşur

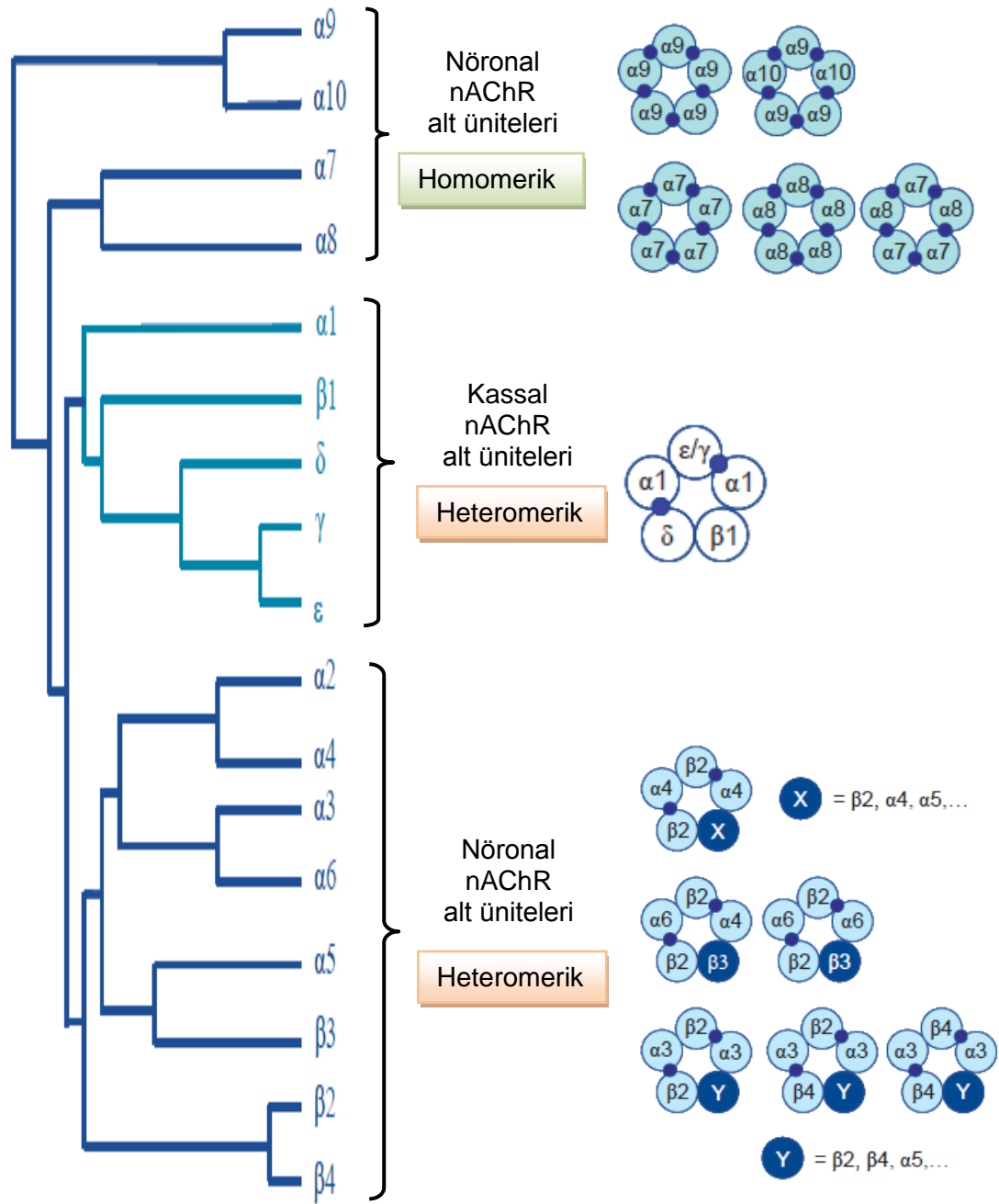
[55, 65, 66]. Bir alt ünitedeki M1 transmembran segmenti geniş bir ekstrasellüler N teminal kısmına sahip iken (asetilkolinin bağladığı bölge), M2 transmembran segmenti kanal porunu astarlar. M3 ve M4 transmembran segmentleri ise reseptör fonksiyonunun düzenlenmesinde görev alırlar ve M4 transmembran segmenti ekstrasellüler C terminali ile sonlanır (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Heteromerik kassal nAChR'ünün şematik görünüşü. Sol üst; reseptör alt ünitelerinin pentamerik dizilimi, sol alt; reseptörün α alt üniteleri ve asetilkolin bağlanma bölgeleri, sağ üst; α alt ünitesinin dört transmembran segmenti ve asetilkolinin bağlandığı N terminal kısmı [67, 68].

Alt üniteler, genel olarak asetilkolinin bağlandığı α -alt üniteleri ve yapısal alt üniteler olarak adlandırılırlar. Asetilkolinin bağlandığı alt üniteler ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) 192 ve 193. pozisyonda bulunan komşu iki sisteinin varlığıyla karakterize edilirler. Yapısal alt üniteler bu sisteinleri bulundurmazlar ve kassal nAChR'lerinde β , γ (ϵ), δ ,

nöronal nAChR'lerde ise $\beta 2 - \beta 4$ olarak adlandırılırlar [69, 70, 71]. Kasta bulunan nAChR'leri, amino asit dizilimleri belirlenen ve yama kenetleme yöntemiyle işlevi incelenen ilk iyon kanalıdır [65]. Yapılan çalışmalar, sinir hücrelerinde de nAChR'lerinin varlığını ortaya koymuş, fakat alt ünite kompozisyonlarının farklılığına bağlı olarak kassal ve nöral nAChR'lerinin farklı farmakolojik ve fonksiyonel özellikleri olduğu gösterilmiştir [72, 73, 74]. Kassal nAChR'leri $\alpha 1, \beta 1, \gamma (\epsilon) 1, \delta 1$ alt üniteleri olan heteromerik reseptörler olup, nöral nAChR'leri $\alpha 2-\alpha 6$ ve $\beta 2-\beta 4$ alt ünitelerinin farklı kombinasyonlarından oluşan heteromerik ve $\alpha 7-\alpha 10$ alt ünitelerinden oluşan homomerik reseptörleri kapsamaktadır (Şekil 2.12.) [69, 71, 73].



Şekil 2.12. Omurgalı nAChR alt ünitelerinin filogenetik akrabalıkları (solda) ve nöronal ve kassal nAChR'lerinin alt ünite kompozisyonları (sağda). İki alt ünite arasındaki muhtemel agonist bağlanma bölgeleri küçük koyu noktalar ile gösterilmiştir [68].

Omurgasız (özellikle böcekler) ve omurgalı nAChR'leri arasındaki en büyük farklılık, böceklerde nAChR'lerinin en bol bulunan eksitatör postsinaptik reseptör oluşudur. Bunun nedeni, böcek sinir sisteminde temel eksitatör nörotransmitterin asetilkolin; memeli merkezi sinir sisteminde ise glutamatın ana eksitatör nörotransmitter oluşudur [75]. Ayrıca omurgalılarda sinir-kas kavşağındaki iletim, kolinerjik iken; böceklerin sinir-kas kavşağındaki iletim, glutamaterjiktir [76]. Bu nedenle böcek sinir sistemi, nAChR'leri bakımından en zengin dokudur [11, 77]. Buna bağlı olarak imidacloprid gibi birçok nörotoksik insektisit hedef bölgesi böcek sinir sistemindeki nAChR'leridir [40].

2.4. İMİDACLOPRİDİN BÖCEKLER ÜZERİNE ETKİLERİNE DAİR ÇALIŞMALAR

İmidaclopridin insektisit aktivitesi nedeniyle, canlı dokuları üzerine etkilerine dair yapılan ilk çalışmalar, böcekler üzerinedir. Yapılan çalışmalar imidaclopridin farklı birçok böcek türünden elde edilen hem doğal nAChR'lerine [78, 79, 80, 81, 82], hem de rekombinant nAChR'lerine bağlandığını göstermiştir [43, 46, 47, 48, 82, 83].

İmidaclopridin böceklerdeki bu hedef bölge üzerine etkilerini araştırmak için yapılan elektrofizyolojik çalışmalar, imidaclopridin hem doğal hem de rekombinant böcek nAChR'lerine agonist etkisinin olabileceğini göstermiştir [6, 84, 85].

Buckingham ve ark. [86] hamamböceği *Periplaneta americana*, terminal abdominal gangliyonlarından izole dorsal nöron gövdelerinde (DUM) ve dev internöronlarında tüm hücre akım-klamp yöntemiyle imidaclopridin, doza bağlı olarak depolarizasyon meydana getirdiğini, bu depolarizasyonun atropine duyarsız olduğunu, fakat nAChR antagonisti olan mecamlanın tarafından ortadan kaldırıldığını göstermişlerdir. Benzer biçimde DUM nöronlarında imidacloprid depolarizasyon meydana getirmiş ve bu depolarizasyonlar mecamlamin tarafından bloke edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında imidaclopridin farklı farmakolojik

özelliklere sahip nAChR'leri üzerine etkili olurken, muskarinik asetilkolin reseptörleri üzerine etkili olmadığını göstermişlerdir.

Bir diğer çalışmada Courjaret ve Lapied [87] patch-klamp yöntemi ile imidaclopridin hamamböceği *Periplaneta americana* terminal abdominal gangliyonlarından izole edilen dorsal nöronlarındaki (DUM) iyonik akımlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Doğal nöronal nAChR'lerinde imidaclopridin doza bağlı olarak artan içeri doğru geçici akımlar oluşturduğunu ve böylece nAChR'lerine olan agonist etkisini göstermişlerdir.

Nauen ve ark. [88] işçi arıların (*Apis mellifera*), antennal lobundan izole nöronlarda tüm hücre voltaj klamp tekniğini kullanarak imidaclopridin, asetilkolin gibi içeri doğru akımlar yaratarak nAChR'lerine neredeyse asetilkolin kadar tam agonist etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Apis mellifera ile yapılan bir başka çalışmada Deglise ve ark. [6] arıların koku duyusuna ait öğrenme gibi yüksek düzeydeki nöral süreçlerde görev alan Kenyon hücrelerinde patch klamp tekniğini kullanarak imidaclopridin, asetilkolinin yarattığı içeri akımların %36'sını oluşturduğunu ve bu akımların bir nAChR antagonisti olan α -bungarotoksin tarafından geri dönüşümlü olarak bloke edildiğini tespit etmişlerdir. Böylece imidaclopridin arıların Kenyon hücrelerindeki nAChR'lerine kısmi agonist etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Öte yandan Palmer ve ark. [89] arılardaki Kenyon hücrelerinde patch klamp tekniğini kullanarak imidaclopridin sürekli bir depolarizasyon yarattığını ve bu depolarizasyonun nAChR antagonisti olan d-tubokurarin tarafından bloke edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca imidacloprid tonik içeri akımlar meydana getirerek Kenyon hücrelerindeki nAChR'lerini sürekli olarak aktivasyonuna ve bunun sonucunda duyarsızlaşmasına neden olmuştur.

Zafeiridou ve Theophilidis [90] ekstrasellüler elektrofizyolojik kayıt tekniği ile *Tenebrio molitor* böceğinin solunum merkezi üzerine imidaclopridin etkisini

araştırmışlardır. İmidacloprid 0,001 ve 0,010 μM konsantrasyonlarda etki göstermezken, 0,1 μM imidacloprid konsantrasyonu solunum motor nörönlarının aktivite frekansını şiddetli bir şekilde arttırmış, 1,00 μM solunum motor nörönlarında önce temporal hipereksitasyon yaratıp, hemen arkasından dikensi potansiyellerin şiddetli bir biçimde düşüşü kaydedilmiştir.

İhara ve ark. [91] yaptıkları çalışmada neonikotinoidlerin etkilerini Amerikan hamamböceği terminal abdominal gangliyon nörönlarında tüm hücre patch klamp tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Yaptıkları araştırmada siklik-guanidin tipte olan neonikotinoidlerin ve özellikle imidaclopridin diğer neonikotinoidlerle karşılaştırıldığında nAChR'leri üzerine düşük agonist etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada, Brown ve ark. [92] *Drosophila* larvalarının nörön membranlarında asetilkolinin oluşturduğu içeri akımların %10-14 kadarını imidaclopridin oluşturduğu ve bir nAChR antagonisti olan mecamylamin tarafından bu akımların bloke edildiğini gözlemlemişlerdir. Böylece araştırmacılar imidaclopridin böcek nöral nAChR'lerine kısmi agonist etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Nguyen ve ark. [93] imidaclopridin yaprak biti merkezi sinir sistemine olan etkisini ekstrasellüler spontan nöronal aktiviteyi ölçerek test etmişlerdir. İmidaclopridin spontan dikensi potansiyel oluşum aktivitesini, potansiyellerin oluşum frekansını yükselterek bloke ettiğini göstermişlerdir. Böylece imidaclopridin böcek kolinerjik sinapslarındaki postsinaptik membranlarda depolarizasyon yarattığını ve ilk olarak agonist etki gösterdiğini, sinir dokuda artan imidacloprid konsantrasyonu ile reseptör duyarsızlaşması meydana geldiğini savunmuşlardır.

Ayrıca, böceklerde imidaclopridin etkisini rekombinant nAChR'lerini kullanarak araştıran çok sayıda araştırma mevcuttur. Bu çalışmaların amacı imidaclopridin böcek nAChR'lerindeki hangi alt ünitelere daha çok ilgisinin

olduğunu ve ilgi gösterdikleri bu alt üniteler üzerine etki biçimlerini ortaya çıkarmaktır.

Matsuda ve ark. [7] imidaclopridin etkisini tavuk rekombinant nöronal $\alpha 4/\beta 2$ nAChR, meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) rekombinant nöronal D $\alpha 2$ ve tavuk $\beta 2$ hibrid nAChR'lerini kurbağa *Xenopus laevis* oositlerinde tanımlayarak, bu reseptörler üzerine iki elektrotlu voltaj klamp tekniği ile araştırmışlardır. Çalışmalarında imidacloprid her iki reseptöre kısmen agonist etki gösterirken, D $\alpha 2/\beta 2$ hibrid reseptörüne, $\alpha 4/\beta 2$ reseptöründen daha yüksek affinite göstermiştir.

Nishiwaki ve ark. [84] *Xenopus laevis* oositlerinde tanımladıkları *Drosophila* D $\alpha 2$ ve tavuk $\beta 2$ hibrid nAChR'leri üzerine imidaclopridin elektrofizyolojik etkilerini iki elektrotlu voltaj klamp tekniğini kullanarak, ayrıca reseptöre bağlanma ve insektisit etkisi ile ilişkilendirerek açıklamaya çalışmışlardır. İmidaclopridin hibrid D $\alpha 2/\beta 2$ reseptörüne bağlanma aktivitesinin agonist etkisi ve insektisit etkisi ile ilişkili olduğunu ve nAChR'lerini aktive ederek içeri akımlar oluşturduğunu göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada Ihara ve ark. [8] imidaclopridin etkisini *Xenopus laevis* oositlerinde tanımladıkları tavuk nöronal homomerik $\alpha 7$, tavuk nöronal heteromerik $\alpha 4\beta 2$ ve hibrid *Drosophila melanogaster*/tavuk D $\alpha 2/\beta 2$ ve ALS/ $\beta 2$ heteromerik reseptörleri üzerinde voltaj klamp tekniği ile araştırmışlardır. İmidaclopridin nitroimino-imidazolidin kısmının α alt ünitesi ile etkileşime girerek kısmen agonist etki sergilediğini göstermişlerdir.

Öte yandan Ihara ve ark. [94] iki imidacloprid birimine sahip olan HK-13 bileşiğini Amerikan hamamböçeği, *Periplaneta americana*'nın terminal abdominal gangliyonları üzerine etkisini tüm hücre patch klamp tekniği kullanarak araştırmışlardır. Asetilkolin ile oluşturulan membran akımlarının HK-13 tarafından azaltıldığını ve imidaclopridin güçlü antagonist etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

İmidaclopridin böcek dokuları üzerine yapısal etkilerine dair çok az çalışma mevcuttur. Mehlhorn ve ark. [95, 96] bir kedi piresi türü olan *Ctenocephalides felis* türünün hem ergin, hem de larva formları üzerinde imidaclopridin etkisini araştırmışlardır. Uygulamanın ilk dakikalarından itibaren kas kontraksiyonları ve oluşan hiperaktivite nedeniyle geri dönüşümsüz bir şekilde kas ve sinir doku hasarı tespit etmişlerdir.

Mehlhorn ve ark. [97] başka bir böcek türü olan, koyun bit sineği, *Melophagus ovinus* üzerine yaptıkları çalışmada imidaclopridin yapısal olarak sinir kas dokuyu nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Gangliyon, sinir kordu ve bu dokularla ilişkili olan iskelet kas fibrilinde ölümcül yıkımlar meydana geldiğini elektron mikroskobu ile göstermişlerdir.

2.5. İMİDACLOPRİDİN HEDEF OLMAYAN CANLILAR ÜZERİNE ETKİLERİNE DAİR ÇALIşMALAR

İnektisitler tarafından hedef olmayan canlıların büyük çoğunluğunu omurgalılar oluşurmaktadır. İmidaclopridin omurgalıların farklı dokulardaki etkilerine dair yapılmış olan çalışmalar başta karaciğer, beyin ve üreme organları üzerine olup, oldukça sınırlı sayıdadır.

İmidaclopridin, dişi sıçanların ve erkek farelerin karaciğer ve beyinlerindeki antioksidan enzim sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri nedeniyle oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir [98, 99, 100, 101, 102]. İmidaclopridin sıçan kemik iliği ve insan lenfosit hücre kültüründe sitogenetik ve genotoksik etkilerinin olduğu [103, 104] ve benzer şekilde kurbağa eritrosit DNA'larında da genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir [105]. Ayrıca erkek sıçanların üreme organlarının sperm parametrelerinde bozulmalara neden olduğu [106], dişi sıçanların ovaryumlarındaki dişilik hormonları ve antioksidan enzim seviyelerinde anlamlı değişimler meydana getirdiği ve ovaryum morfolojisinde histopatolojik etkilerinin olduğu gösterilmiştir [107]. İmidaclopride maruz kalmış anne sıçanların yavrularının beyin dokusunda özellikle, motor korteks ve hipokampus bölgelerinde gliar fibrilar

asidik protein seviyesini arttırdığı, dişi sıçanların beyincisinde granüler tabakadaki granüllerin ve dendritlerin kaybolmasına neden olarak anlamlı histopatolojik değişimler meydana getirirdiği, sıçan karaciğerinde sentral ven ve hepatositler arasındaki sinüzoidlerde genişlemeler oluşturarak hem histopatolojik, hem de karaciğer aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz enzimlerini arttırarak hepatatoksik etki göstermiştir [108, 109]. Öte yandan imidaclopridin adiposit, karaciğer ve kas hücre kültüründe insülin sinyal kaskadını etkileyerek insülin direncini arttırabileceği [110], lipid metabolizmasını etkileyerek adipositlerde yağ birikmesine neden olduğu gösterilmiştir [111]. İmidaclopridin farelerde ve sıçanlarda humoral ve hücresele immün yanıtı baskılayarak immünotoksik ve dalak ve karaciğerde histopatolojik etki oluşturduğu gösterilmiştir [112, 113].

İmidaclopridin hedef olmayan organizmalar üzerine elektrofizyolojik etkilerine dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Öte yandan imidaclopridin iskelet kas sistemi üzerine etkilerine dair kapsamlı bir çalışma mevcut değildir.

Nagata ve ark. [85] imidaclopridin nAChR'leri üzerine etkisini klonlanmış sıçan PC12 (adrenal bez tümör hücreleri) hücrelerinde tek kanal patch klamp yöntemini kullanarak araştırmışlardır. İmidaclopridin çoğunlukla nAChR'lerinde yarı iletim durumundayken, akımlar meydana getirdiğini, asetilkolinin ise çoğunlukla nAChR'lerinde ana iletim durumundayken akımlar meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Böylece imidaclopridin nAChR'leri üzerine kısmi agonist etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Nagata ve ark. [114] imidaclopridin nAChR'leri üzerine olan etkisini klonlanmış sıçan PC12 hücrelerinde tüm hücre ve tek kanal patch klamp metodunu kullanarak araştırmışlardır. İmidaclopridin karbakol tarafından oluşturulan akımları baskıladığı, fakat tek başına uygulandığında küçük akımlar yarattığı, imidacloprid uygulamasında ise nAChR'lerinin açık kalma sürelerinin asetilkolin uygulamasına göre daha kısa olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle imidaclopridin nöral nAChR'lerine hem agonist, hem de antagonist etkisinin olabileceğini bildirmişlerdir.

Li ve ark. [115] *Xenopus* cinsi kurbağaların oositlerinde tanımladıkları insan $\alpha 4\beta 2$ nAChR'leri üzerine imidaclopridin etkisini tek kanal patch klamp yöntemiyle araştırmışlardır. İmidaclopridin bu reseptörlerde asetilkolin tarafından oluşturulan akımları inhibe ettiği gösterilmiştir.

Diğer taraftan, Bal ve ark. [116] tüm hücre patch klamp yöntemini kullanarak, fare beyninin koklear nukleusundaki satellit hücreler üzerine imidaclopridin etkisini araştırmışlardır. İmidaclopridin membran potansiyelini depolarize edici yönde etkilediği, içeri akımlar oluşturduğu ve aksiyon potansiyeli frekansında artış meydana getirdiği gösterilmiştir.

Seifert ve Stollberg [117] imidaclopridin kurbağa embriyonik kas hücrelerindeki nAChR'leri üzerine etkilerini hücre kontraksiyonunu inceleyerek araştırmışlardır. İmidaclopridin tek başına uygulandığında hücre kontraksiyonuna neden olmadığını, fakat nikotin veya asetilkolin tarafından oluşturulan hücre kontraksiyonunu engellediğini göstermişlerdir. Bu nedenle imidaclopridin embriyonik kas hücrelerindeki nAChR'leri üzerine antagonist etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları çalışmada imidaclopridin tavuk embriyolarında kasların farklılaşmasında gelişimsel yetersizlik oluşturduğunu göstermişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI

DeneYler Mersin Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) onayı ile gerçekleştirilmiştir. DeneYlerde Sasu Adana Su ve Tarım Ürünleri iftliğinden temin edilen 50±5 gr ağırlığındaki, *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) türünden olan ova kurbağaları kullanılmıştır.

Ova kurbağalarının vücut boyu 15 cm kadar, kulak zarı bariz, derileri genellikle pürtüklüdür. Sırt tarafı yeşil, gri, açık veya koyu kahverengi olabilir. Bazen sırt ortasında boyuna uzanan açık renkli bir şerit bulunur (şekil 3.1.). Karın tarafı genellikle kirlili beyaz veya sarımsı ekseriyetle küçük lekelidir. Erkeklerde dış ses kesesi mevcuttur [118].



şekil 3.1. Ova kurbağası (*Rana ridibunda*) [118].

Genellikle ovalar olmak üzere, bol bitkili havuz, göl ve ağır akan sularda yaşar, sudan fazla ayrılmazlar. Göz ve burun delikleri suyun dışında kalacak şekilde su içerisine gizlenirler. Dağlık bölgelerde az bulunmalarına karşın 2250 m'ye kadar yayıldıkları olur. Çiftleşme Mayıs-Haziran aylarında gerçekleşir. Üreme mevsiminde dişi, yaklaşık 5000-10000 yumurta bırakabilme yeteneğindedir. Larva

evresi sıcaklığa bağlı olarak 3-4 ay sürer. Eğeyssel olgunluğa 3 yıl sonra ulaşılır. Kuzey Afrika, Orta ve Güney Avrupa, Batı Asya ve ülkemizde ise uygun olan her yerde bulunurlar [118, 119, 120].

3.2. KAS DOKULARININ DİSEKSİYONU

Kurbağalar kulak zarlarının arkasından kesilerek spinal hale getirildi. İnce bir tel ile hassas bir şekilde vertebral kolona girilerek omurilik (medulla spinalis) tahrip edildi. Bu şekilde herhangi bir anestetik madde kullanmadan refleks merkezleri ortadan kaldırılmış ve kurbağalar hareketsiz hale getirilmiş oldu. Her kurbağadan iskelet kas dokusu olarak iki adet gastrokinemius kası izole edildi. İzole edilen kaslar, soğuk kanlı hayvanlardan alınan dokuları canlı olarak muhafaza edebilmek için hazırlanmış Ringer çözeltilisine konuldu. Ringer çözeltilisi kasların canlılığını uzun süre muhafaza edebilmek için %95 O₂ ve %5 CO₂'den oluşan karbojen ile sürekli olarak muamele edildi. Kaslar 20 dakika Ringer çözeltilisi içerisinde inkübasyona bırakıldı.

3.3. UYGULANAN KİMYASALLAR

Deneylerde bir neonikotinoid insektisit olan imidaclopridin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Ayrıca insektisit'in etki mekanizmasını aydınlatmak için bir nikotinic asetilkolin reseptör antagonisti olan tubokurarin kullanılmıştır. Kimyasallar istenen konsantrasyonlarda Ringer çözeltilisi içerisinde çözünenek uygulanmıştır. Ringer çözeltilisi; 111,87 mM NaCl; 2,47 mM KCl; 1,08 mM CaCl₂; ve 2,38 mM NaHCO₃'den oluşmaktadır (pH=7.2).

3.4. DENEY GRUPLARI

Elektrofizyolojik deneylerde imidacloprid ve imidacloprid ile kombine halde nAChR antagonistinin uygulandığı on farklı deney grubu oluşturuldu. İmidaclopridin yalnız uygulandığı elektrofizyolojik deneyler için farklı imidacloprid konsantrasyonlarının çalışıldığı beş deney grubu oluşturuldu. Birinci deney

grubunda 10^{-3} M imidacloprid (n=8), ikinci deney grubunda 10^{-4} M imidacloprid (n=8), üçüncü deney grubunda 10^{-5} M imidacloprid (n=8), dördüncü deney grubunda 10^{-6} M imidacloprid (n=8) ve beşinci deney grubunda 10^{-7} M imidacloprid (n=8) konsantrasyonu uygulandı. Her bir deney grubunda örneklerden beşer dakikalık aralıklarla toplam otuz dakika ölçüm alındı. Sıfırncı dakika iskelet kas preparatı Ringer içerisindeyken alınan ölçüm olup, preparatın kendi kontrolüne karşılık gelmektedir. Sıfırncı dakikadaki ölçümden sonra ortama istenen konsantrasyonda imidacloprid eklenmiş ve uygulamanın beşinci dakikasından itibaren insektisit etkisi araştırılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. İmidacloprid deney grupları.

Deney Grupları	Kontrol Grubu	Uygulama Süresi (dakika)					
		5.	10.	15.	20.	25.	30.
10^{-3} M İmidacloprid (n=8)	0. dk.	5. dk.	10. dk.	15. dk.	20. dk.	25. dk.	30. dk.
10^{-4} M İmidacloprid (n=8)							
10^{-5} M İmidacloprid (n=8)							
10^{-6} M İmidacloprid (n=8)							
10^{-7} M İmidacloprid (n=8)							

Bu çalışmada imidaclopridin etkisinin elektrofizyolojik olarak ortadan kaldırılıp kaldırılmadığını test edebilmek için antagonist kombinasyon grupları oluşturuldu. Antagonistin iskelet kas preparatına etkisinin olup olmadığını araştırabilmek için yapılan ön deneylerde antagonistin tek başına uygulandığı 10^{-7} M tubokurarin konsantrasyon grubu oluşturularak preparatlardan beşer dakikalık aralıklarla otuz dakika boyunca ölçüm alındı. Elde edilen ön deney sonuçlarında 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kasında elektrofizyolojik olarak anlamlı bir değişim meydana getirmediği bir konsantrasyon olması nedeniyle, bu konsantrasyon, kombinasyon grupları için uygun görüldü. Bu şekilde antagonist konsantrasyonu olarak 10^{-7} M tubokurarin ve yukarıda belirlenen farklı imidacloprid konsantrasyonları kombine halde çalışılarak beş farklı kombinasyon grubu

oluşturuldu (Çizelge 3.2.). Sıfırncı dakika, iskelet kas preparatı Ringer içerisindeyken alınan ölçüm olup, preparatın kendi kontrolüne karşılık gelmektedir. Sıfırncı dakikadaki ölçümden sonra ortama belirlenen konsantrasyonda imidacloprid + tubokurarin eklenmiş ve uygulamanın beşinci dakikasından itibaren insektisit ile birlikte antagonistin etkisi araştırılmıştır.

Çizelge 3.2. Antagonist kombinasyon grupları.

Deney Grupları	Kontrol Grubu	Uygulama Süresi (dakika)					
10^{-3} M İmidacloprid + 10^{-7} M Tubokurarin (n=8)	0. dk.	5. dk.	10. dk.	15. dk.	20. dk.	25. dk.	30. dk.
10^{-4} M İmidacloprid + 10^{-7} M Tubokurarin (n=8)							
10^{-5} M İmidacloprid + 10^{-7} M Tubokurarin (n=8)							
10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M Tubokurarin (n=8)							
10^{-7} M İmidacloprid + 10^{-7} M Tubokurarin (n=8)							

İmidaclopridin iskelet kasındaki ince yapı üzerine etkisinin toksik olup olmadığını test etmek için histolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma için transmisyon elektron mikroskobu kullanılmıştır. Kas dokuları aynı dozlarda otuz dakika boyunca imidaclopride maruz bırakılmıştır. Otuz dakika Ringer çözeltisi içerisinde bekletilen kontrol deney grubu ile birlikte altı farklı histolojik deney grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Histolojik inceleme için oluşturulan deney grupları.

Deney Grupları	Uygulama Süresi
Kontrol Grubu	30 dakika
10^{-3} M İmidacloprid Grubu (n=6)	
10^{-4} M İmidacloprid Grubu (n=6)	
10^{-5} M İmidacloprid Grubu (n=6)	
10^{-6} M İmidacloprid Grubu (n=6)	
10^{-7} M İmidacloprid Grubu (n=6)	

3.5. HÜCRE İÇİ ELEKTROFİZYOLOJİK DENEYLER

Elektrofizyolojik deneylerde iskelet kas hücrelerine mikroelektrotla girilerek tek elektrotlu akım klamp yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. Mikropipetlerin Hazırlanması

Mikroelektrot kayıtları için dış çapı 1,5 ve iç çapı 1,12 mm olan, World Precision Instruments (ABD) markalı borosilikattan yapılmış filamentli pipetler kullanılmıştır. Pipetlerden ince uçlu mikropipet elde edebilmek için PULL 1 World Precision Instruments (ABD) markalı pipet çekici kullanıldı. Pipet çekici ile ince uçlu hale getirilen mikropipetlerin uç çapı 0,5-1 μ m olacak şekilde ayarlandı. Mikropipetlerde iletkenliğin sağlanabilmesi için pipet 3M KCl çözeltisi ile dolduruldu. Mikroelektrot kayıtlar için pipet dirençleri 6-14 M Ω olan pipetler tercih edildi.

3.5.2. Elektrofizyolojik Kayıt Sistemi

İskelet kas hücrelerinden membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli ölçümleri için mikroelettrot yöntemi kullanılmıştır. Hücre içi sinyaller, iki kanallı ve bilgisayar kontrollü Multiclamp 700B (Axon Instruments, ABD) amplifikatörü ile yükseltgendi. Amplifikatör ile uyumlu olan Digidata 1322A sayısal çevirici (Axon Instruments, ABD) kullanıldı. Amplifikatör bilgisayarda kurulu olan Multiclamp 700B Commander (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile yönlendirildi. Hazırlanan mikropipetler CV-7B (Axon Instruments, ABD) model potansiyel takibi yapan bir operasyonel amplifikatörün pipet tutucu kısmına takılarak Multiclamp 700B amplifikatörü ile bağlantısı sağlandı. Pipet direncinin takibi, akım klamp protokolünün hücreye uygulanabilmesi ve dinlenim membran potansiyeli ve tekil hücre aksiyon potansiyeli kayıtlarının yapılabilmesi için bilgisayarda Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı kullanıldı. Elde edilen kayıtlar bilgisayarda Clampfit 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edildi (Şekil 3.2.).



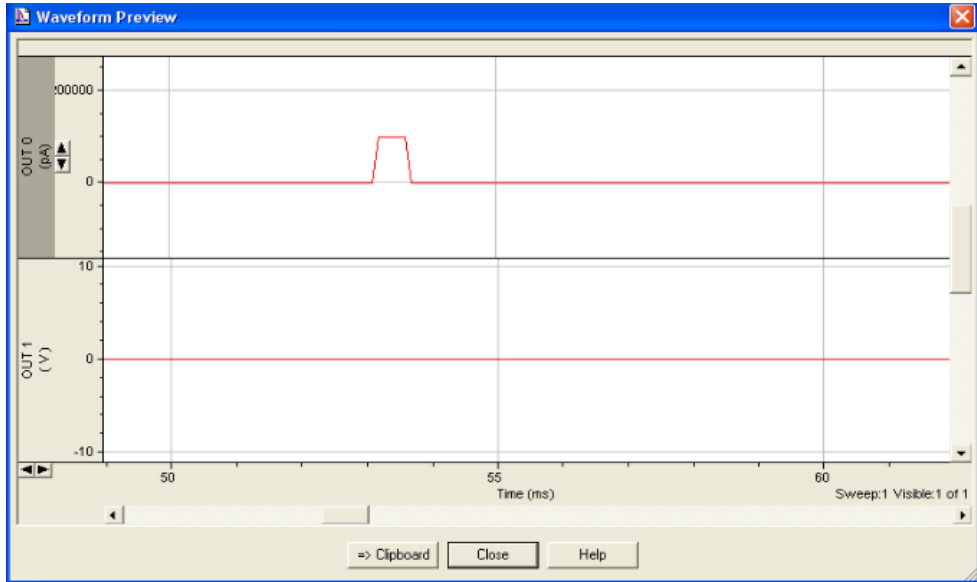
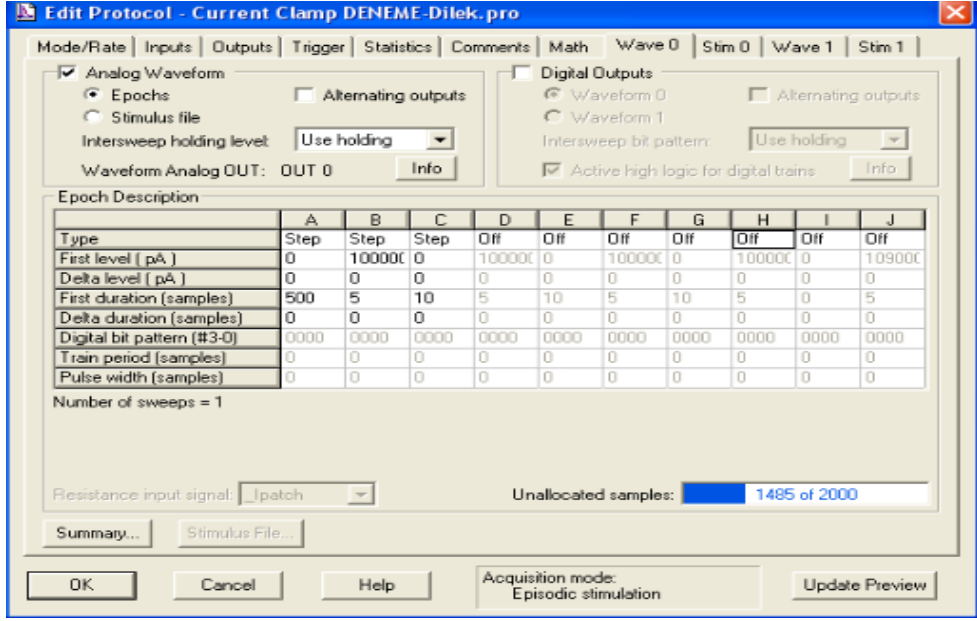
Şekil 3.2. Mikroelettrot yöntemi için kullanılan hücre içi elektrofizyolojik kayıt sistemi.

3.5.3. Dinlenim Membran Potansiyeli Kaydı

İzole edilen kurbağa iskelet kasları, içerisinde soğukkanlılar için hazırlanan Ringer özeltisinin bulunduğu kayıtlama odacığındaki parafin üzerine tendonlarından iğne yardımıyla fikse edilmiştir. İçersinde 3M KCl pipet çözeltisi bulunan mikropipetlerden kaydedilen potansiyel değer, pipet kayıtlama odacığındaki Ringer solüsyonuna daldırıldıktan sonra sıfırlanmıştır. Mikropipetlerin Ringer solüsyonu içerisinde, mikropipet manipülatör yardımı ile x, y ve z düzlemlerinde hassas bir şekilde hareket edilerek iskelet kas hücresine girişi ve penetrasyonu sağlanmıştır. Kaslar ideal gerginlikte iken hücreye girildiği, sistemde membran potansiyelinin ani düşüşü ile tespit edilmiştir. Hücreye girildiğinde -60 mV ve -100 mV arasında membran potansiyeli değerlerini veren ve bu değerlerin en az on dakika değişmediği hücreler sağlıklı hücreler olup bu hücreler üzerinde çalışmaya devam edilmiştir. Kayıtlarda referans elektrodu olarak ise doku odacığı içerisine yerleştirilen Ag/AgCl pellet elektrot kullanılmıştır.

3.5.4. İskelet Kas Hücrelerine Uygulanan Akım Protokolü

İskelet kas hücrelerinden hücre içi tekil aksiyon potansiyeli kaydı için, bütün kas hücrelerine aynı akım klamp protokolü uygulanmıştır. Hazırlanan protokolde uygulanan akım, kare puls şeklinde bir uyarın olup, şiddeti 100 nA ve süresi 0,5 ms olarak belirlendi (şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Akım klamp protokolü.

3.6. ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME

Tez çalışması kapsamında elektrofizyolojik deneyler için oluşturulan insektisit doz grupları histolojik çalışma için de oluşturulmuştur (Çizelge 3.3.). Kurbağalardan izole edilen gastrokinemius kasları petri kabında otuz dakika istenilen konsantrasyonda imidaclopride maruz bırakıldıktan sonra doku takibine alınmıştır.

Elektron mikroskopik inceleme için alınan gastrokinemius kası, 1 mm³'lük parçalara bölündü ve 6 saat %2,5'luk glutraldehit solüsyonunda bekletildi. Fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra elektron mikroskopik incelemeler için doku takip işlemleri Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Viyana, AVUSTURYA) cihazı kullanılarak aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

1. % 1' lik osmium tetraoksit 1saat
2. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 15 dk
3. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu 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+resin (2+1)
16. Propilen oksit+resin (1+1)
17. Propilen oksit+resin (1+2)
18. Saf rezin 12 saat
19. Resin içine gömme işlemleri
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

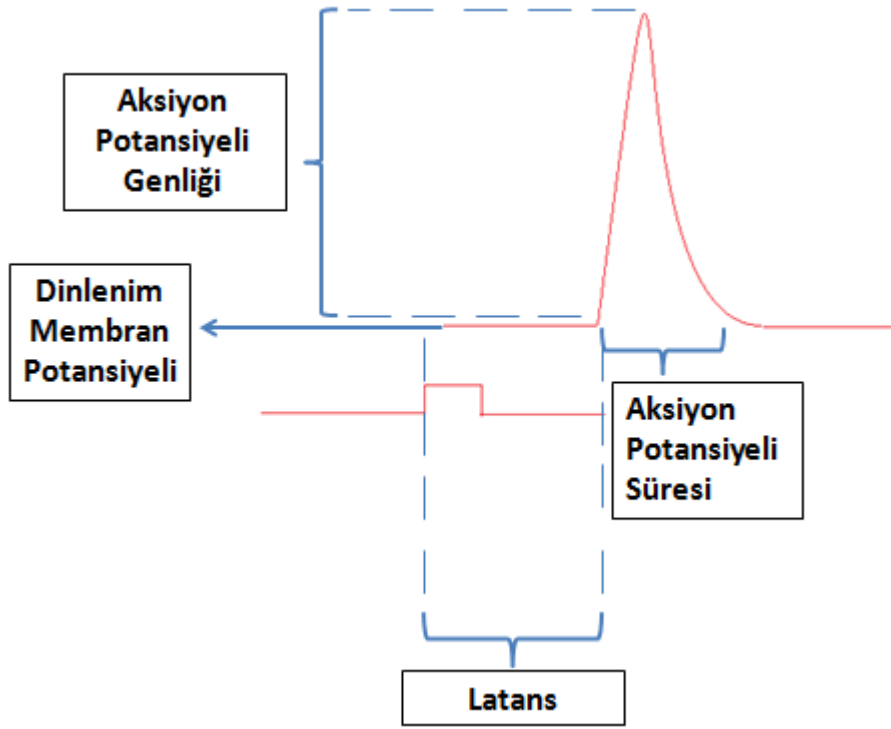
mikroskobuna (JEOL Ltd. Tokyo-JAPONYA) eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflandı (şekil 3.4.). Bütün grupların kas örnekleri elektron mikroskobunda küçük, orta ve büyük olmak üzere sırasıyla 6000, 15 000 ve 20 000 büyütmede fotoğraflandı.



şekil 3.4. JEOL JEM-1011 transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

3.7. ANALİZ

Mikroelektrot ölçümlerinde iskelet kas hücresi dinlenme durumundayken dinlenme membran potansiyeli ve uyarandan sonra kaydedilen iskelet kası tekil aksiyon potansiyeli parametrelerinden aksiyon potansiyeli genliği, aksiyon potansiyeli süresi ve latans değerleri analiz edildi (şekil 3.5.).



şekil 3.5. Mikroelektrot ölçümlerinde değerlendirilen parametreler.

Elektron mikroskopik inceleme ile iskelet kas hücrelerinin ince yapısındaki değişimler incelenmiş olup, mitokondriyal hasar oluşumu, miyofibrillerde kopma ve miyofilament dizilimindeki düzensizleşmeye bağlı olarak oluşan hasarlar, miyofilamentler arası glikojen birikimi ve sarkoplazmik retikulum morfolojisindeki değişimler değerlendirildi.

3.8. İSTATİSTİKSEL DEğERLENDİRMELER

Verilerin değerlendirilmesi ve grafiklerin çiziminde SPSS 11.5 ve GraphPad Prism 3.0 paket programları kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılım gösterdiği Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak tespit edildi. İstatistiksel anlamlılığın sınırı $p < 0.05$ olarak değerlendirildi.

İmidacloprid ve tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli, tekil aksiyon potansiyeli genliği, süresi ve latans üzerine zamana bağlı etkileri

tekrarlayan ölçümlü varyans analizi yöntemi kullanılarak belirlendi. Doza bağlı etkileri belirlemek için gruplar arası karşılaştırmada tek faktörlü varyans analizi (One-way Anova) kullanıldı ve gruplar arası farkı değerlendirmek için çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uyumlu verilerin özetlenmesinde ortalama \pm standart sapma verilirken, doza bağlı grafiklerde ortalama \pm standart hata değerleri gösterilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIşMA

4.1. HÜCRE İÇİ ELEKTROFİZYOLOJİK BULGULAR

4.1.1. İmidaclopridin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Zamana Bağlı Etkileri

4.1.1.1. 10^{-3} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri

Yapılan zamana bağlı ölçümlerde, 10^{-3} M imidaclopridin iskelet kasına uyaran verilmeden dinlenim membran potansiyelini, uygulamanın 5. dakikasında % 13, 10. dakikasında %16 arttırmıştır. Uygulamanın 15, 20 ve 25. dakikalarında bu artış yaklaşık %20, 30. dakikada %25 olmuştur. Dinlenim membran potansiyelindeki bu artış tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). İskelet kasına uyaran verildikten sonra tekil aksiyon potansiyeli genliği uygulamanın 5. dakikasında iki katı kadar (%118) 10, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarda ise 0. dakikaya göre yaklaşık iki buçuk katı kadar (\approx %150) artmıştır. Aksiyon potansiyeli genliğindeki bu artış tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tekil aksiyon potansiyeli süresi ise 5. dakikada %10, 10, 15 ve 20. dakikada %20, 25. dakikada %40 ve 30. dakikada % 25 artış göstermiştir. Bu artış sadece 25. dakikada istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Latans tüm zaman dilimlerinde yaklaşık % 3 azalmış olup, bu azalma 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. 10^{-3} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-97±11	104±3,5	2,0±0,4	2,6±0,04
<u>5</u>	-84±16*	227±70*	2,2±0,3	2,5±0,14
<u>10</u>	-81±12*	240±62*	2,4±0,3	2,5±0,09*
<u>15</u>	-76±14*	248±59*	2,4±0,3	2,5±0,05*
<u>20</u>	-77±13*	247±62*	2,4±0,4	2,5±0,09*
<u>25</u>	-77±14*	251±61*	2,8±0,9*	2,5±0,0*
<u>30</u>	-73±6*	265±65*	2,5±0,7	2,5±0,08

* Ölçümler 0. dakikaya göre $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (ortalama±standart sapma).

4.1.1.2. 10^{-3} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri

10^{-3} M İmidaclopridin, 10^{-7} M tubokurarın ile beraber uygulandığı kombinasyon grubunda tubokurarın, imidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyelini 5. dakikada %94, 10. dakikada % 89 ve 15, 20, 25 ve 30. dakikalarda ise yaklaşık olarak %85 oranında geri dönuştürmüştür. Tubokurarın, kasa uyaran verildikten sonra oluşan tekil aksiyon potansiyeli genliğini uygulamanın 5. dakikasında %94, 10. dakikasında %90, 15. dakikasında %84, 20, 25 ve 30. dakikasında ise yaklaşık olarak %80 geri dönuştürmüştür. Tubokurarın aksiyon potansiyeli süresi üzerine imidaclopridin etkisini ise 5. ve 30. dakikalarda %84, 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda ortalama %70 geri dönuştürmüştür. Tubokurarın, imidaclopridin latans üzerine olan etkisini tüm zaman dilimlerinde %99 oranında geri dönuştürmüştür (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. 10^{-3} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-87±11	105±17	1,8±0,5	2,6±0,05
<u>5</u>	-81±10	112±23	2,1±0,4	2,6±0,05
<u>10</u>	-77±13	116±16	2,3±0,4	2,6±0,05
<u>15</u>	-75±12	122±15	2,3±0,6	2,6±0,05
<u>20</u>	-74±9	124±16	2,5±0,6	2,6±0,05
<u>25</u>	-73±5*	124±16	2,3±0,6	2,6±0,04
<u>30</u>	-75±2	125±14	2,1±0,2	2,6±0,05

* Ölçümler 0. dakikaya göre $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (ortalama±standart sapma).

4.1.1.3. 10^{-4} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri

10^{-4} M İmidacloprid iskelet kası dinlenim membran potansiyelini 5, 10, 15 ve 20. dakikada yaklaşık %10 arttırırken, bu artış 25. dakikada %15 ve 30. dakikada ise %18 kadardır. Dinlenim membran potansiyelindeki bu artış tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tekil aksiyon potansiyeli genliği ise, uygulamanın 5. dakikasında %42, diğer zaman dilimlerinde ise %52 artmıştır. Tekil aksiyon potansiyeli genliğindeki bu artış tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Aksiyon potansiyeli süresi 5, 10 ve 25. dakikalarda herhangi bir değişim göstermezken, 15 ve 20. dakikalarda %12, 30. dakikada ise %6 artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Latans 5, 15 ve 25. dakikalarda herhangi bir değişim göstermemiş,

10, 20 ve 30. dakikada %3 azalmıştır. Latanstaki bu azalma 20 ve 30. dakikalarda istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. 10^{-4} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
0	-77±11	95±14	1,6±0,2	2,6±0,05
5	-69±10*	135±18*	1,6±0,1	2,6±0,09
10	-70±9*	145±11*	1,6±0,2	2,5±0,12
15	-68±11*	145±15*	1,8±1,0	2,6±0,07
20	-68±13*	144±15*	1,8±0,7	2,5±0,04*
25	-65±10*	145±15*	1,6±0,2	2,6±0,05
30	-63±9*	145±14*	1,7±0,1	2,5±0,05*

* Ölçümler 0. dakikaya göre $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (ortalama±standart sapma).

4.1.1.4. 10^{-4} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri

10^{-4} M İmidaclopridin 10^{-7} M tubokurarin ile beraber uygulandığı kombinasyon grubunda tubokurarin, imidaclopridin dinlenim membran potansiyeli üzerine olan etkisini 5. dakikada %95, 10. dakikada %90, 15 ve 25. dakikalarda %97, 20. dakikada %94, 30. dakikada %99 geri dönüştürmüştür. İmidaclopridin aksiyon potansiyeli genliği üzerine olan etkisi tubokurarin tarafından uygulamanın 5. dakikasında %91, diğer zaman dilimlerinde ise yaklaşık %88 geri dönüştürmüştür. Aksiyon potansiyeli süresinde ve latansta ise tubokurarin, imidaclopridin etkisini yaklaşık %98 oranında geri dönüştürmüştür (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. 10^{-4} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-77±6	98±5	1,8±0,1	2,6±0,04
<u>5</u>	-73±2	107±12	1,8±0,1	2,6±0,04
<u>10</u>	-69±2	110±12	1,8±0,1	2,5±0,08
<u>15</u>	-74±3	110±12	1,8±0,1	2,6±0,00
<u>20</u>	-72±2	108±12	1,9±0,1	2,6±0,05
<u>25</u>	-74±3	110±12	1,8±0,1	2,6±0,10
<u>30</u>	-76±3	108±12	1,7±0,1	2,6±0,05

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.1.5 10^{-5} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri

10^{-5} M İmidacloprid iskelet kası dinlenim membran potansiyelini uygulamanın 5. dakikasında %11, 10. dakikasında %17 arttırmış, 15, 20, 25 ve 30. dakikalarda ise ortalama %24 arttırmıştır. Bu artış 10. dakikadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aksiyon potansiyeli genliği 5, 10, 15. dakikalarda %25 artarken, bu artış 20, 25 ve 30. dakikalarda %15 düzeyindedir. Bu artış 5. dakikadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı olup, sadece 25. dakikada istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Aksiyon potansiyeli süresi 10 ve 15. dakikalarda %20, 20 ve 30. dakikalarda ise %6 artmış, diğer uygulama zamanlarında herhangi bir değişim göstermemiştir. Aksiyon potansiyeli süresinde meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Latans uygulamanın 5, 10 ve 15. dakikasında %3

artmış, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer zaman dilimlerinde herhangi bir değişim göstermemiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. 10^{-5} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenme membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenme Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
0	-87±11	99±10	1,5±0,4	2,6±0,11
5	-77±14	124±23*	1,5±0,2	2,5±0,11
10	-72±11*	125±26*	1,8±0,4	2,5±0,07
15	-67±8*	123±25*	1,8±0,2	2,5±0,13
20	-66±6*	115±22*	1,6±0,4	2,6±0,09
25	-66±8*	114±23	1,5±0,2	2,6±0,03
30	-64±6*	114±22*	1,6±0,5	2,6±0,09

* ölçümler 0. dakikaya göre $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir.

4.1.1.6. 10^{-5} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri

10^{-5} M İmidacloprid ve 10^{-7} M tubokurarinin beraber uygulandığı kombinasyon grubunda tubokurarin, imidaclopridin iskelet kası dinlenme membran potansiyeli üzerine olan etkisini uygulamanın 5, 10, 15, 20 ve 25. dakikasında %98, 30. dakikasında %94 oranında geri dönüştürmüştür. Tubokurarin, imidaclopridin iskelet kası tekil aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkisini ise uygulamanın 5. dakikasından itibaren tüm zaman dilimlerinde ortalama %95 geri dönüştürmüştür. Tubokurarin, tüm zaman dilimlerinde aksiyon potansiyeli süresini ortalama %95, latansı %98 oranında geri dönüştürmüştür (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. 10^{-5} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-74±3	100±4	1,8±0,1	2,5±0,07
<u>5</u>	-72±2	103±8	1,9±0,1	2,5±0,08
<u>10</u>	-70±2	104±7	1,8±0,1	2,5±0,08
<u>15</u>	-73±2	106±9	1,7±0,1	2,6±0,00
<u>20</u>	-72±1	106±9	1,9±0,1	2,5±0,05
<u>25</u>	-72±1	106±11	1,8±0,1	2,5±0,09
<u>30</u>	-79±4	104±8	1,6±0,08	2,6±0,05

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.1.7. 10^{-6} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri

10^{-6} M İmidacloprid iskelet kası dinlenim membran potansiyelinde uygulamanın 5, 10, 15, 20 ve 25. dakikalarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim meydana getirmezken, 30. dakikasında istatistiksel olarak anlamlı %13'lük bir artış oluşturmuştur. Aksiyon potansiyeli genliği uygulamanın 5, 10, 15 ve 20. dakikalarında ortalama %20, 25. dakikasında %26, 30. dakikasında ise %29 artmıştır. Aksiyon potansiyeli genliğinde meydana gelen bu artış tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Aksiyon potansiyeli süresi uygulamanın 5. ve 10. dakikalarında ortalama %10, 20 ve 30. dakikalarda ortalama %5 azalmış, 15 ve 25. dakikalarda herhangi bir değişim sergilememiştir. Aksiyon potansiyeli süresinde meydana gelen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Latans tüm zaman dilimlerinde %3 azalmıştır fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. 10^{-6} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
0	-95±9	93±13	1,9±0,4	2,7±0,10
5	-95±11	112±19*	1,6±0,4	2,6±0,10
10	-95±9	110±17*	1,7±0,4	2,6±0,10
15	-94±10	111±15*	1,9±0,3	2,6±0,11
20	-93±11	114±17*	1,8±0,3	2,6±0,10
25	-93±12	118±20*	1,9±0,3	2,6±0,10
30	-83±6*	120±22*	1,8±0,2	2,6±0,05

* ölçümler 0. dakikaya göre $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir.

4.1.1.8. 10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri

10^{-6} M İmidaclopridin 10^{-7} M tubokurarini ile beraber uygulandığı grupta tubokurarini, imidaclopridin iskelet kas hücreleri dinlenim membran potansiyeli üzerine etkisini uygulamanın 5, 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda %99, 30. dakikada ise %93 oranında geri dönüştürmüştür. Tubokurarini, imidaclopridin aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkisini 10, 15, 20 ve 25. dakikalarda ortalama %95 geri dönüştürmüştür. Tüm zaman dilimlerinde tubokurarini, imidaclopridin aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkisini ortalama %95, latansı %99 oranında geri dönüştürmüştür (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. 10^{-6} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-80±6	101±3	1,8±0,1	2,6±0,05
<u>5</u>	-78±6	102±6	1,9±0,1	2,6±0,07
<u>10</u>	-79±5	105±8	1,9±0,1	2,6±0,07
<u>15</u>	-81±4	108±10	1,8±0,1	2,6±0,06
<u>20</u>	-81±3	107±9	1,8±0,1	2,6±0,06
<u>25</u>	-80±3	108±10	1,9±0,08	2,6±0,06
<u>30</u>	-86±4	101±9	1,7±0,05	2,6±0,04

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.1.9. 10^{-7} M İmidaclopridin zamana bağlı etkileri

10^{-7} M İmidacloprid iskelet kası dinlenim membran potansiyeli uygulamanın tüm zaman dilimlerinde ortalama %3 artmıştır. Aksiyon potansiyeli genliği uygulamanın tüm zaman dilimlerinde ortalama %4 artmıştır. Dinlenim membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli genliğindeki bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aksiyon potansiyeli süresi ve latansta istatistiksel olarak anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.9. 10^{-7} M İmidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-84±11	87±8	1,6±0,5	2,6±0,03
<u>5</u>	-80±12	91±11	1,7±0,3	2,6±0,07
<u>10</u>	-82±13	89±12	1,6±0,4	2,5±0,11
<u>15</u>	-83±11	90±11	1,7±0,2	2,6±0,06
<u>20</u>	-82±9	90±12	1,5±0,3	2,5±0,04
<u>25</u>	-83±11	91±12	1,7±0,4	2,6±0,03
<u>30</u>	-82±11	90±11	1,5±0,3	2,6±0,07

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.1.10. 10^{-7} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin zamana bağlı etkileri

10^{-7} M İmidaclopridin 10^{-7} M tubokurarın ile beraber uygulandığı kombinasyon grubunda tubokurarın, imidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli üzerine etkisini tüm zaman dilimlerinde ortalama %96 oranında geri dönuştürmüştür. Tubokurarın, imidaclopridin aksiyon potansiyeli genliği üzerine etkisini ise uygulamanın tüm zaman dilimlerinde ortalama %97 geri dönuştürmüştür. Tubokurarın aksiyon potansiyeli süresi ve latans üzerine imidaclopridin etkisini %99 oranında geri dönuştürmüştür (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. 10^{-7} M İmidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine zamana bağlı etkileri.

Değişken Zaman (dakika)	Dinlenim Membran Potansiyeli (mV)	Aksiyon Potansiyeli Genliği (mV)	Aksiyon Potansiyeli Süresi (ms)	Latans (ms)
<u>0</u>	-84±5	101±4	1,8±0,1	2,6±0,07
<u>5</u>	-82±7	103±8	1,8±0,1	2,5±0,08
<u>10</u>	-81±7	105±8	1,8±0,1	2,5±0,08
<u>15</u>	-84±8	106±8	1,8±0,1	2,5±0,04
<u>20</u>	-83±6	105±9	1,8±0,1	2,5±0,05
<u>25</u>	-82±7	105±10	1,8±0,1	2,5±0,05
<u>30</u>	-88±4	103±9	1,6±0,1	2,6±0,04

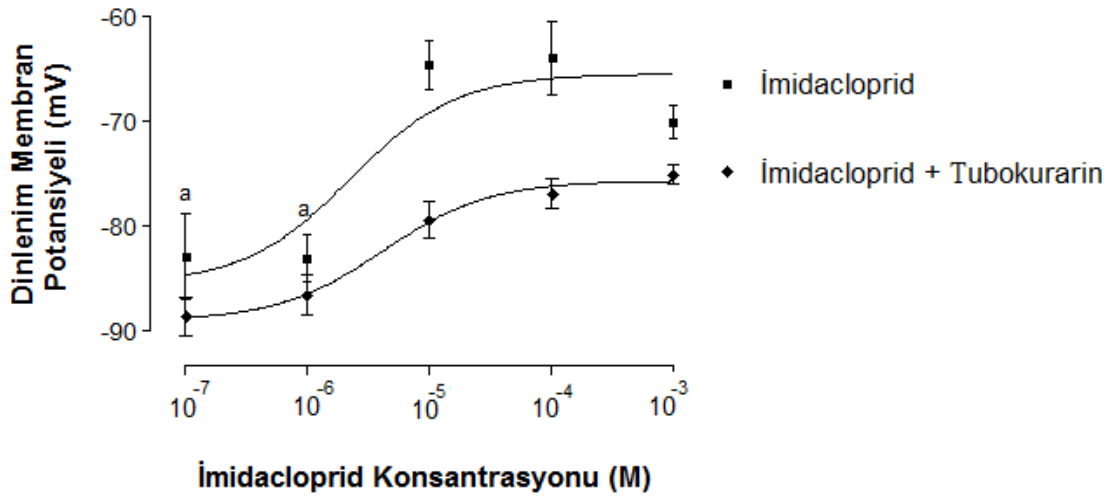
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.2. İmidaclopridin Tek Başına veya Kombinasyon Halinde Doza Bağlı Etkileri

İmidaclopridin iskelet kas hücresi dinlenim membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine doza bağlı etkisi uygulamanın 30. dakikasına göre araştırılmış ve doz yanıt eğrileri çizilmiştir.

Dinlenim membran potansiyeli 10^{-3} M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M imidacloprid konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Şekil 4.1.). Fakat bu üç konsantrasyon grubu ile 10^{-6} M ve 10^{-7} M imidacloprid konsantrasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Yüksek konsantrasyonlarki imidacloprid (10^{-3} M, 10^{-4} M ve 10^{-5} M) iskelet kası dinlenim membran potansiyelini düşük konsantrasyondaki gruplarına göre (10^{-6} M ve 10^{-7} M) daha pozitif değerlere yükseltmiştir (Şekil 4.1.). Öte yandan farklı

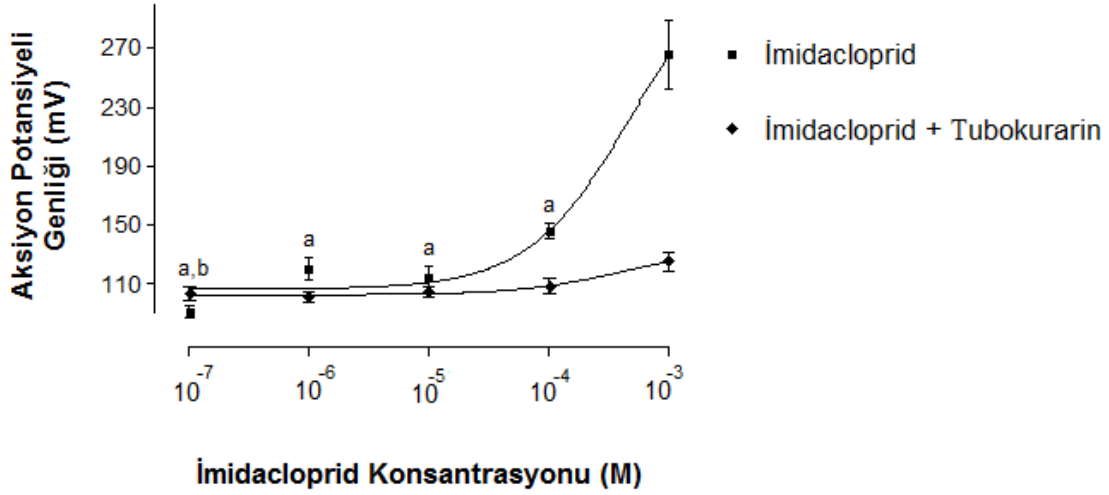
imidacloprid konsantrasyonlarıyla kombine halde uygulanan tubokurarin özellikle yüksek imidacloprid konsantrasyonlarının dinlenim membran potansiyeli üzerine depolarize edici etkisini azaltmıştır. Tubokurarin dinlenim membran potansiyeli üzerine 10^{-3} M imidaclopridin etkisini %4, 10^{-4} M imidaclopridin etkisini %20, 10^{-5} M imidaclopridin etkisini %23, 10^{-6} M imidaclopridin etkisini %4, 10^{-7} M imidaclopridin etkisini %7 oranında geri dönuştürmüştür (şekil 4.1.).



şekil 4.1. İskelet kası dinlenim membran potansiyeli üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında (p<0,05).

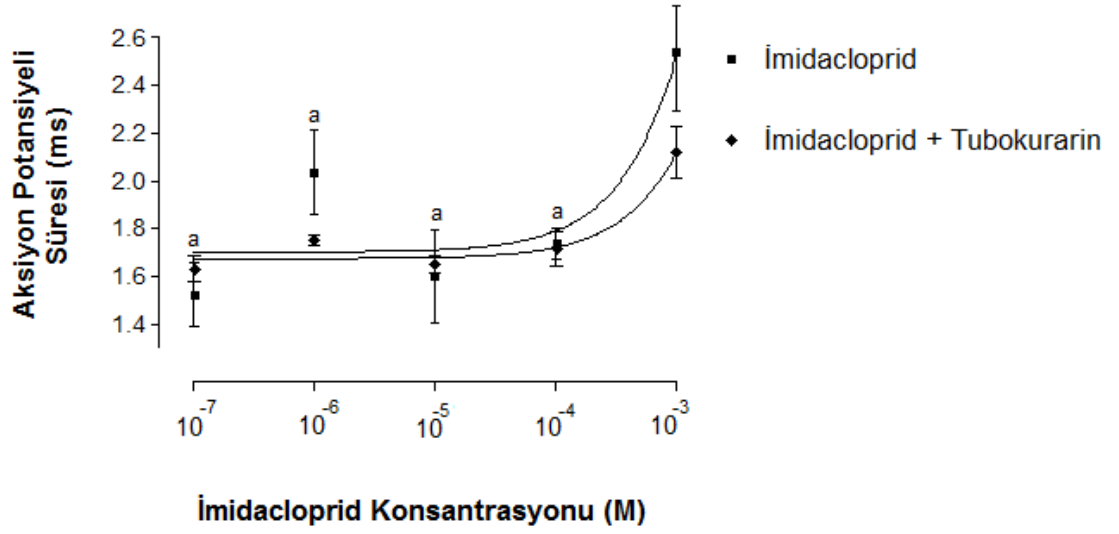
İmidacloprid aksiyon potansiyeli genliğini bütün konsantrasyon gruplarında arttırmıştır. Aksiyon potansiyeli genliği üzerine imidaclopridin meydana getirdiği bu artış 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyon grubunda en fazla olup, 10^{-3} M imidacloprid grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur (p<0,05). Ayrıca 10^{-4} M imidacloprid konsantrasyon grubu ile 10^{-7} M imidacloprid konsantrasyon grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (şekil 4.2.). Tubokurarin, imidaclopridin aksiyon potansiyeli genliğinde meydana getirdiği bu artışı geri dönuştüren bir etki sergilemiştir. Tubokurarin aksiyon potansiyeli genliği üzerine 10^{-3} M imidaclopridin etkisini %54, 10^{-4} M

imidaclopridin etkisini %26, 10^{-5} M imidaclopridin etkisini %10, 10^{-6} M ve 10^{-7} M imidaclopridin etkisini %15, oranında geri dönuştürmüştür (Şekil 4.2.).



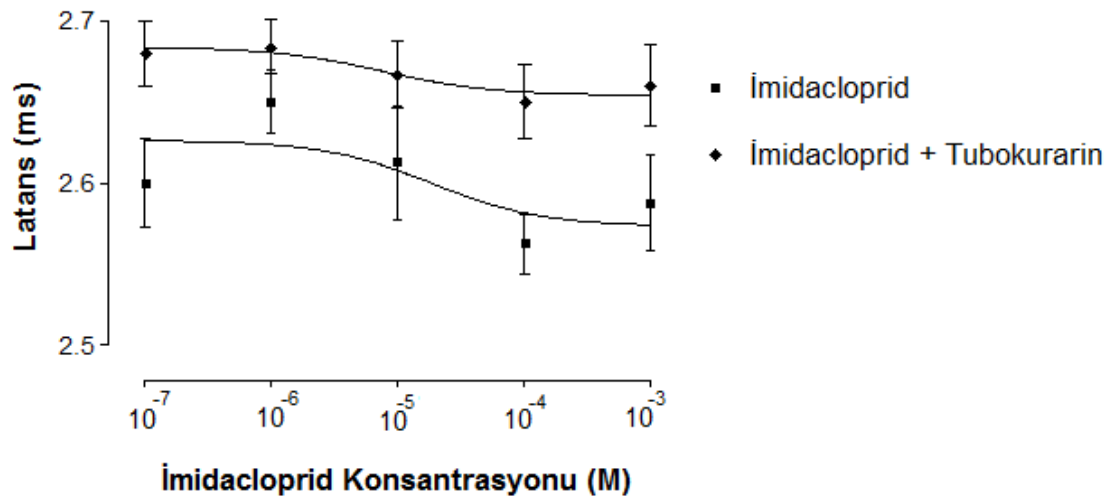
Şekil 4.2. İskelet kası aksiyon potansiyeli genişliği üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$), b; 10^{-4} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

Aksiyon potansiyeli süresindeki en büyük değişim, en yüksek doz grubu olan 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyon grubunda meydana gelmiştir. Aksiyon potansiyeli süresindeki bu değişim artış yönünde olup, 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyon grubuyla diğer konsantrasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.3.). Tubokurarin, en yüksek konsantrasyon grubu olan 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyon grubunda meydana gelen bu artışı %20 oranında geri dönuştürmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. İskelet kası aksiyon potansiyeli süresi üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM). a; 10^{-3} M imidacloprid ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$).

Latans 10^{-3} M ve 10^{-4} M imidacloprid konsantrasyon gruplarında azalan yönde bir değişim göstermiş fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 10^{-3} M ve 10^{-4} M imidacloprid konsantrasyon grupları ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.4.).



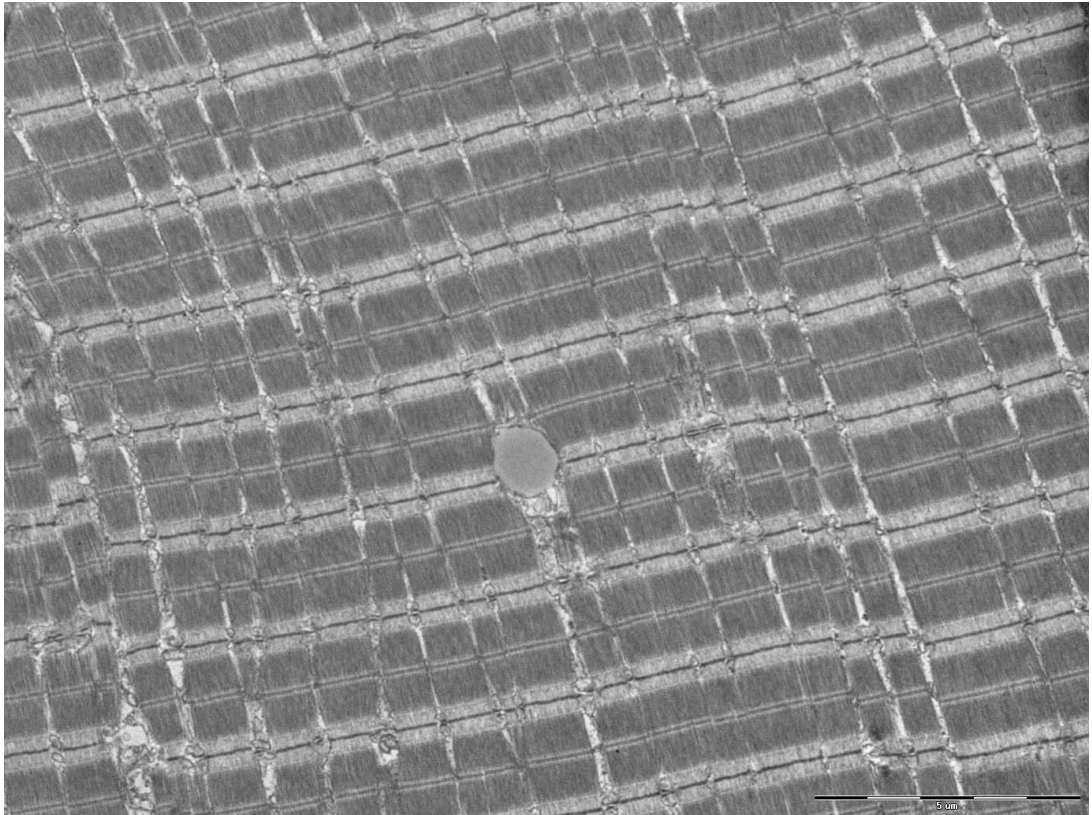
Şekil 4.4. İskelet kası latans üzerine imidaclopridin ve imidacloprid + 10^{-7} M tubokurarinin doz-yanıt eğrileri (ortalama \pm SEM).

4.2. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

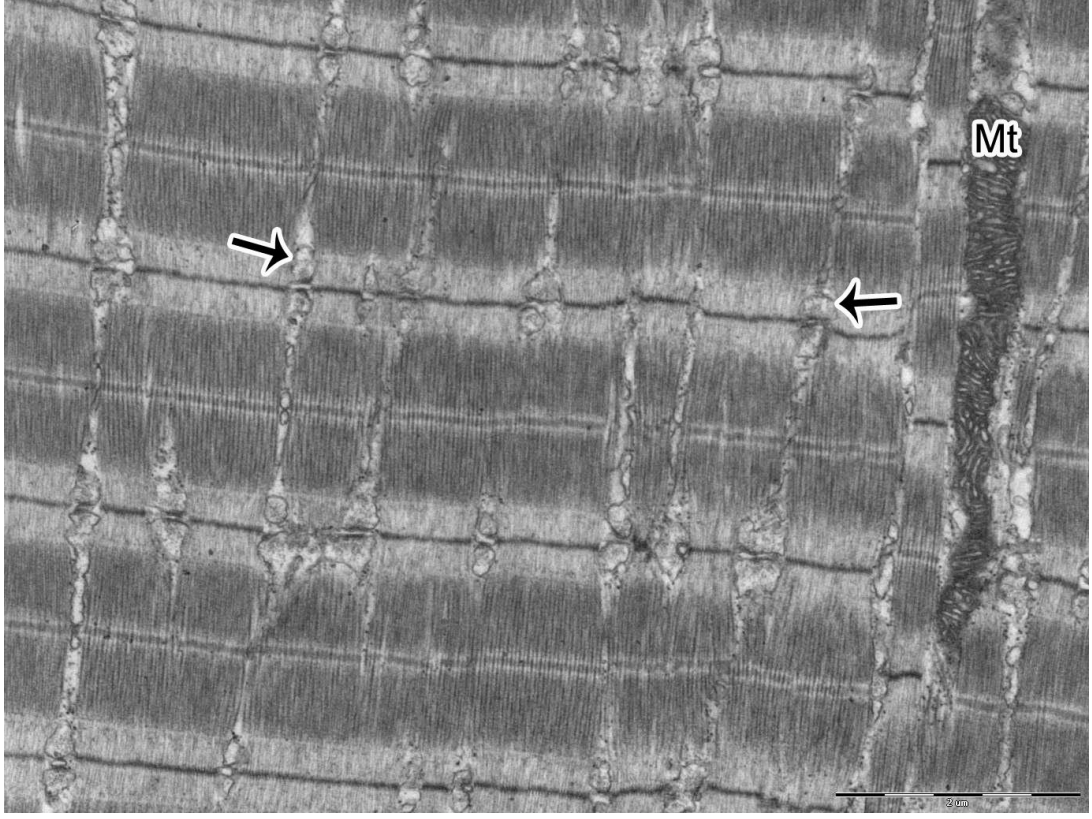
Çalışmadaki bütün grupların iskelet kas örnekleri transmisyon elektron mikroskopunda X6,000, X15,000 ve X20,000 olmak üzere küçük, orta ve büyük büyütmede incelenmiştir.

4.2.1. Kontrol Grubu

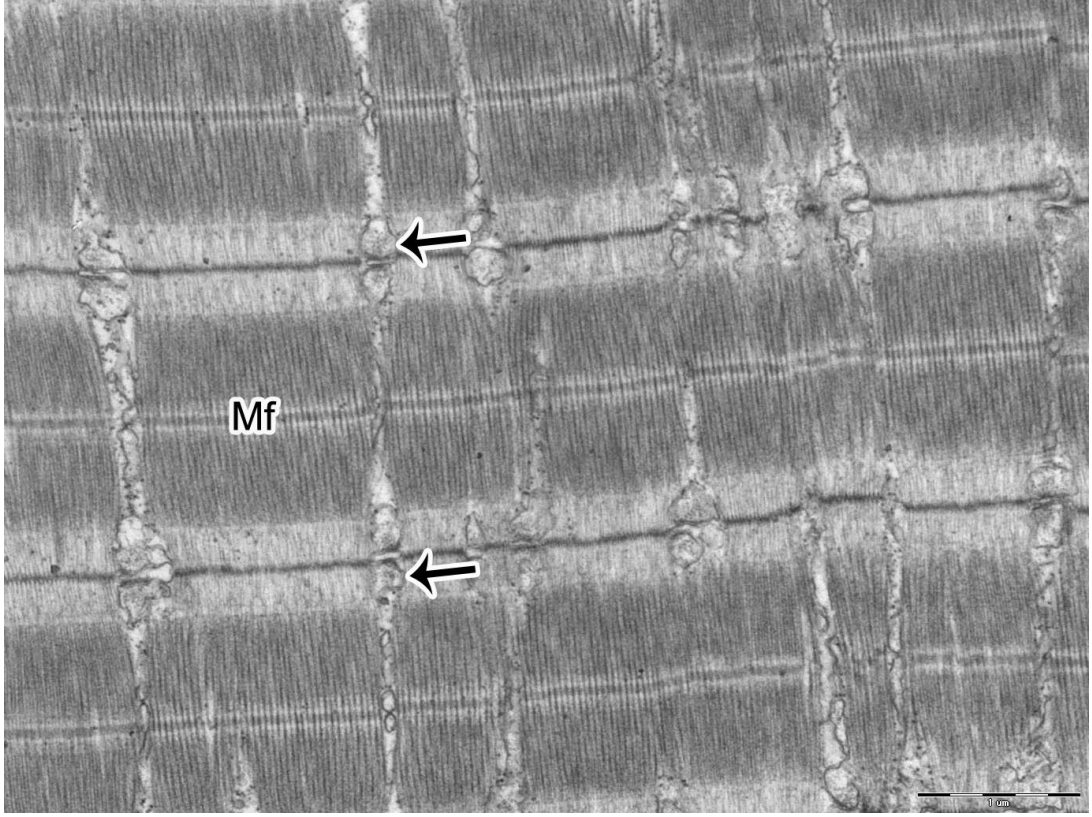
Kontrol grubuna ait örneklerde kas hücrelerinin normal morfolojik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan incelemede kontrol grubu kas hücrelerinin sarkoplazmasında bulunan miyofibrillerin düzgün bir dizilim gösterdiği, iki Z çizgisi arasında kalan ve kasılma birimi olan sarkomerin yapısının korunduğu tespit edilmiştir. Miyofibriller arasında bulunan mitokondriyonların krista ve matriks görünümünün, sarkoplazmik retikulum sisternalarının ve diğer organellerin normal yapıda olduğu izlenmiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.).



Şekil 4.5. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü (X6,000).



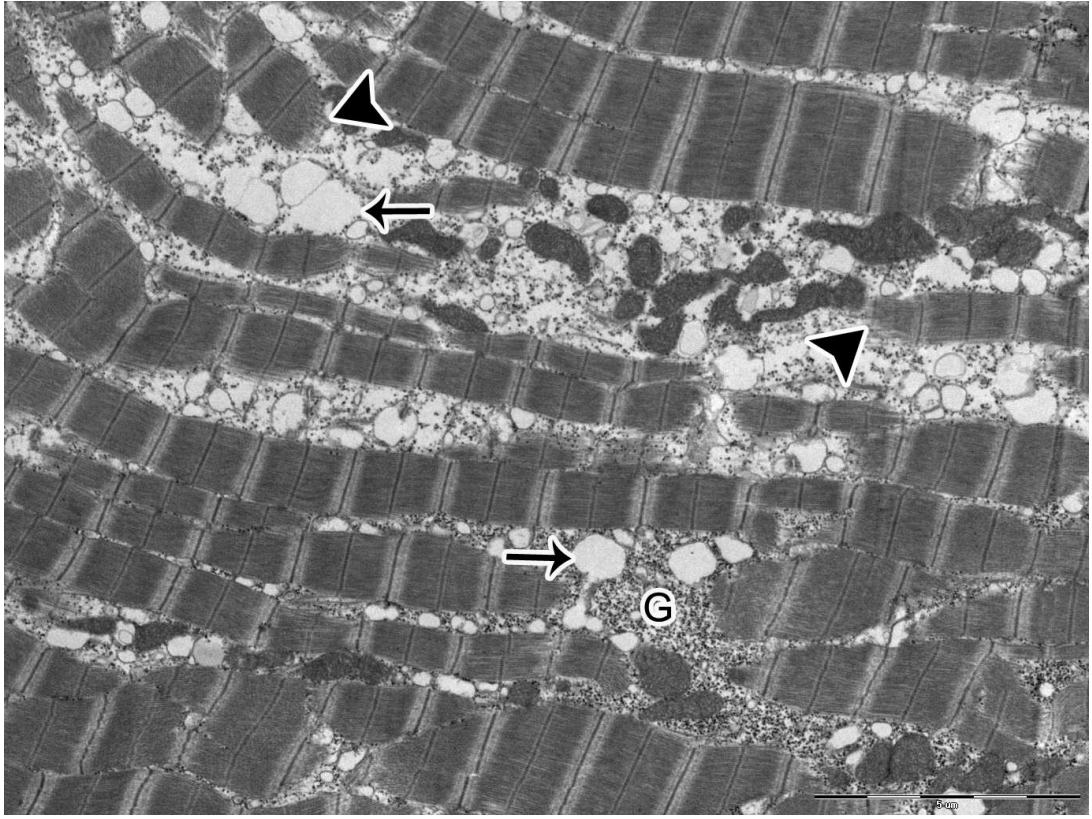
şekil 4.6. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondriyon (Mt), sarkoplazmik retikulum (ok) (X15,000).



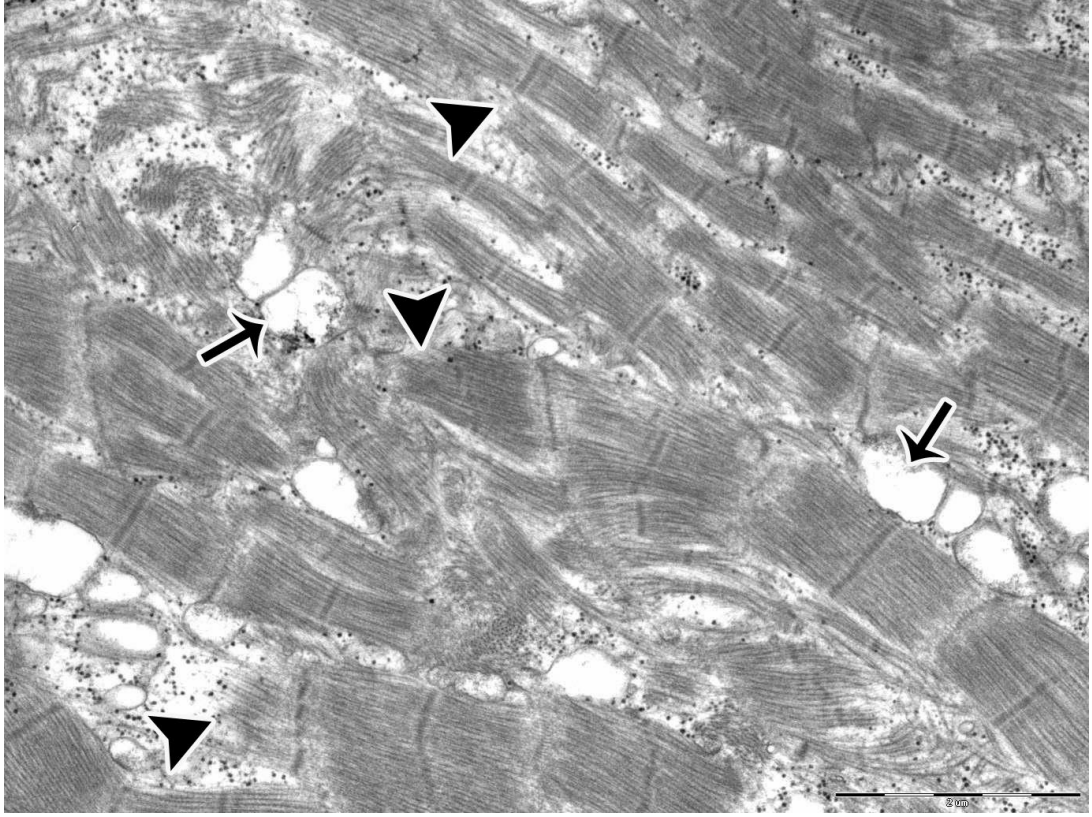
şekil 4.7. Kontrol grubu iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), sarkoplazmik retikulum (ok) (X20,000).

4.2.2. 10^{-3} M İmidacloprid Grubu

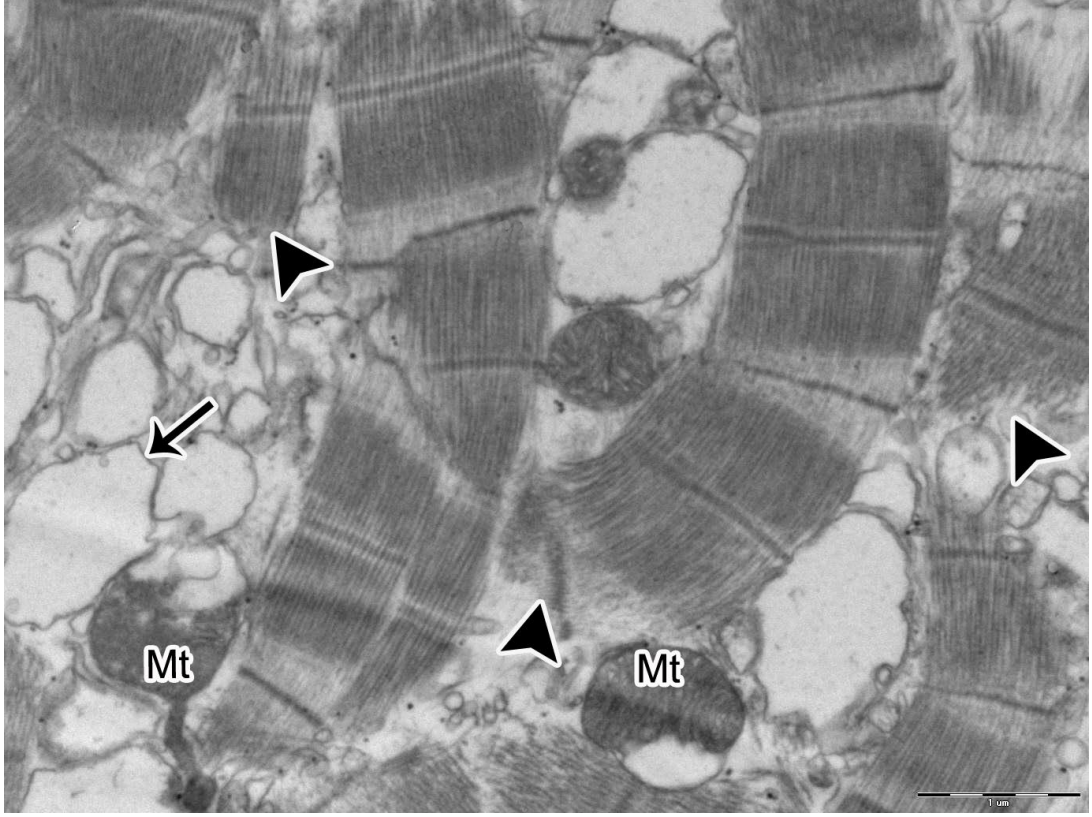
10^{-3} M imidaclopride maruz bırakılmış iskelet kas hücrelerinde miyofibril düzenlenmesinde ve sarkomer yapısında bozulmalara rastlanmıştır. Bazı bölgelerde miyofibrillerde kopmalar, incelmeler ve miyofibriller arası genişlemeler mevcuttur. Mitokondriyonlarda vakuol oluşumu ve sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler görölmüştür. Ayrıca bazı bölgelerde miyofibriller arasında yoğun glikojen birikimi mevcuttur (şekil 4.8., şekil 4.9., şekil 4.10.).



şekil 4.8. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X6,000).



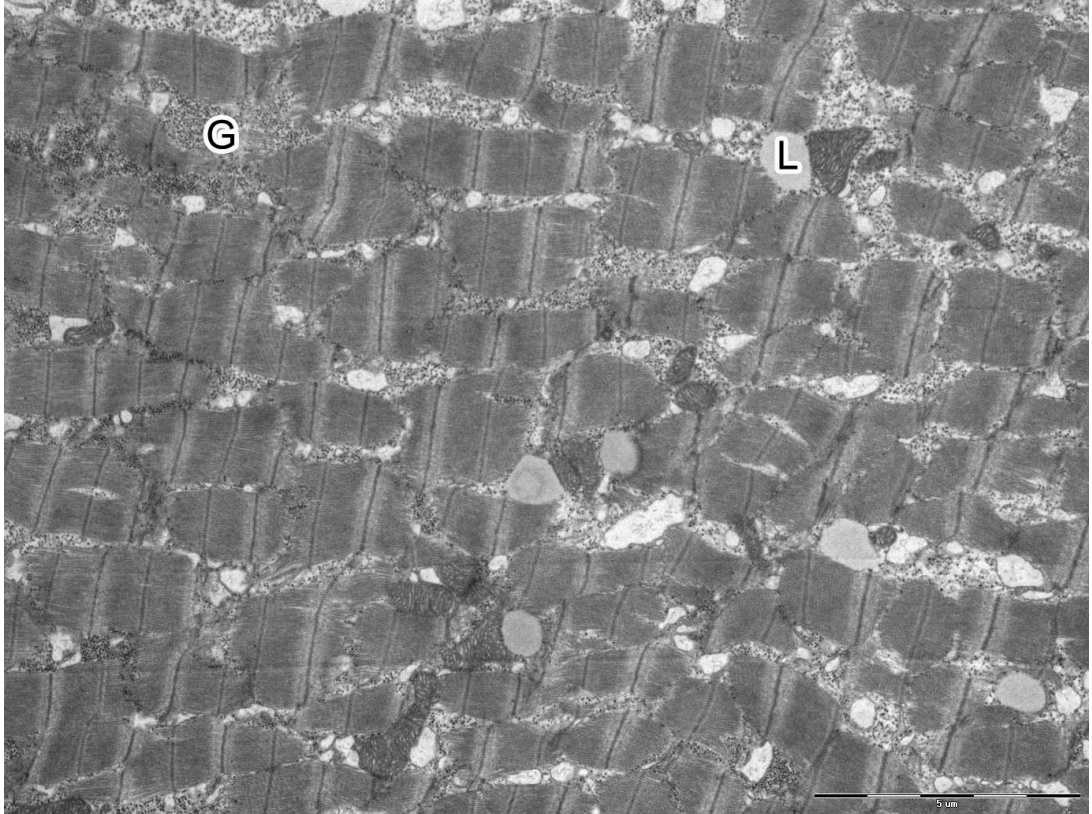
şekil 4.9. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibrillerde yoğun dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).



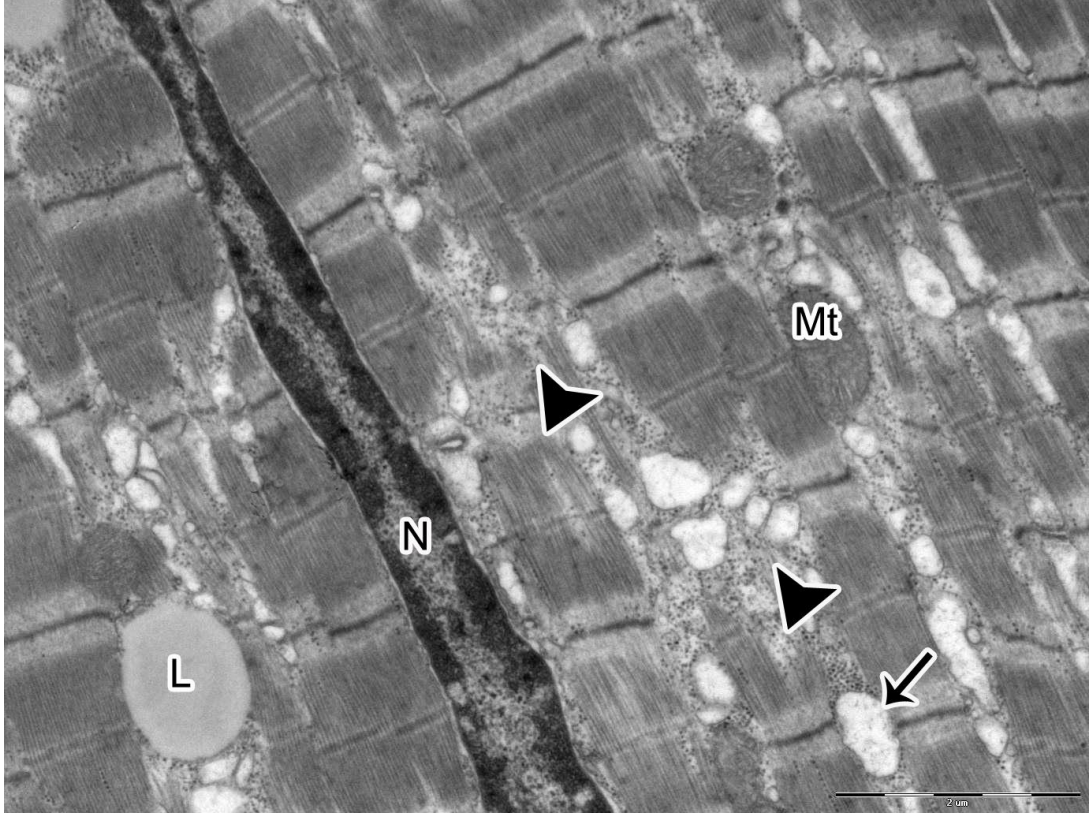
şekil 4.10. 10^{-3} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondriyonlarda vakuol oluşumu (Mt), miyofibrillerde kopma ve yoğun dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).

4.2.3. 10^{-4} M İmidacloprid Grubu

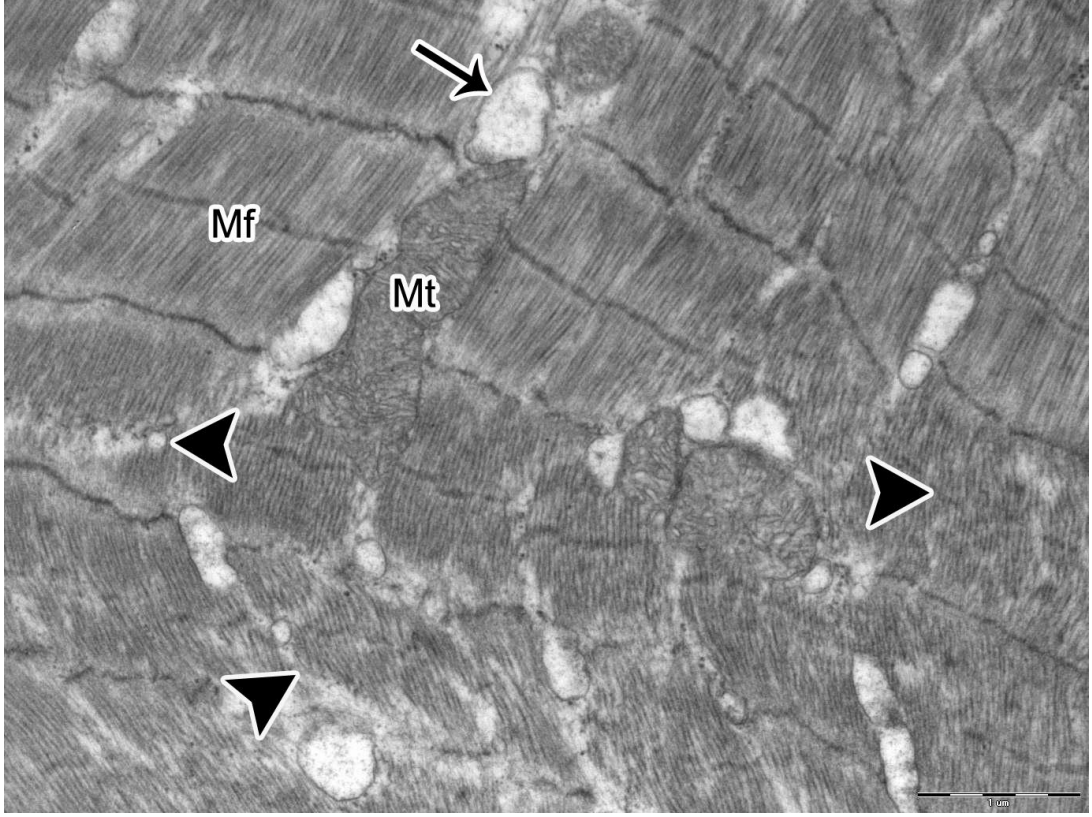
10^{-4} M imidaclopride maruz bırakılmış iskelet kas hücrelerinde miyofibril düzenlenmesinde dejenerasyon, Z bantlarının düzensizliğine bağlı olarak sarkomer bütünlüğünde bozulmalar, mitokondriyonlarda hasar oluşumu, sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme ve sarkoplazmada yer yer glikojen birikimi gözlenmiştir (şekil 4.11., şekil 4.12., şekil 4.13.).



şekil 4.11. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), lipid (L) (X6,000).



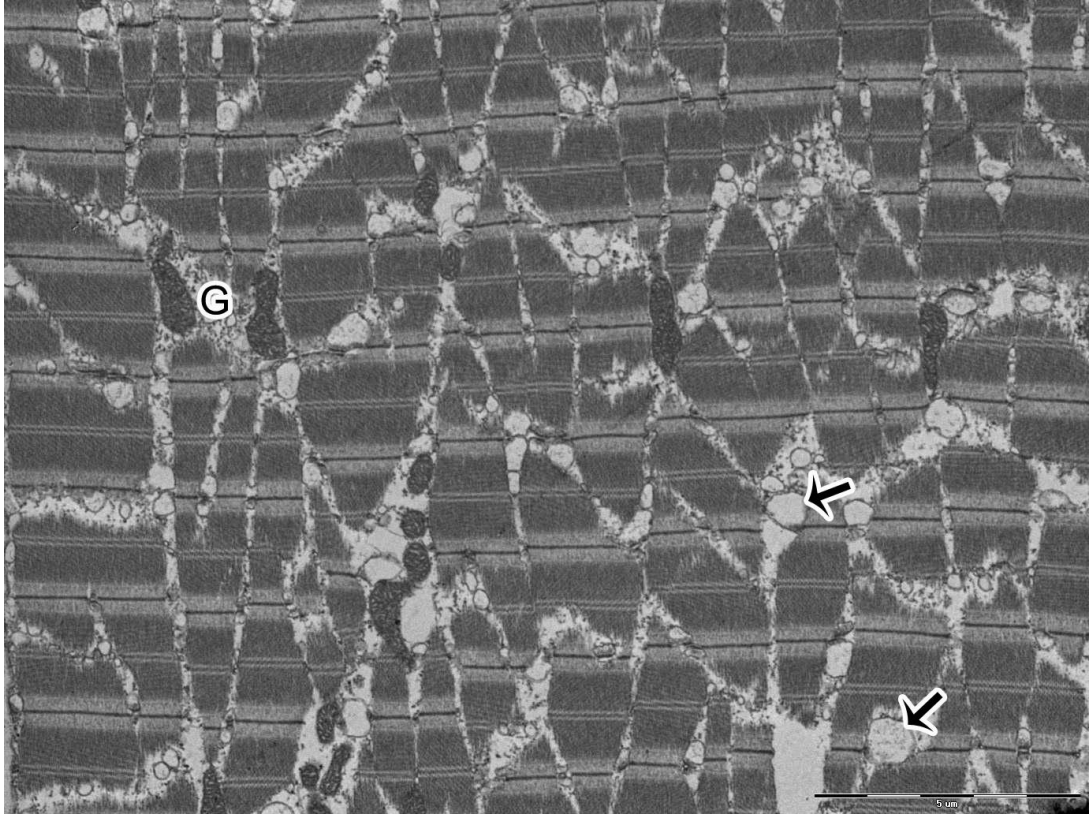
Şekil 4.12. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Mitokondriyon (Mt), nukleus (N), lipid (L), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).



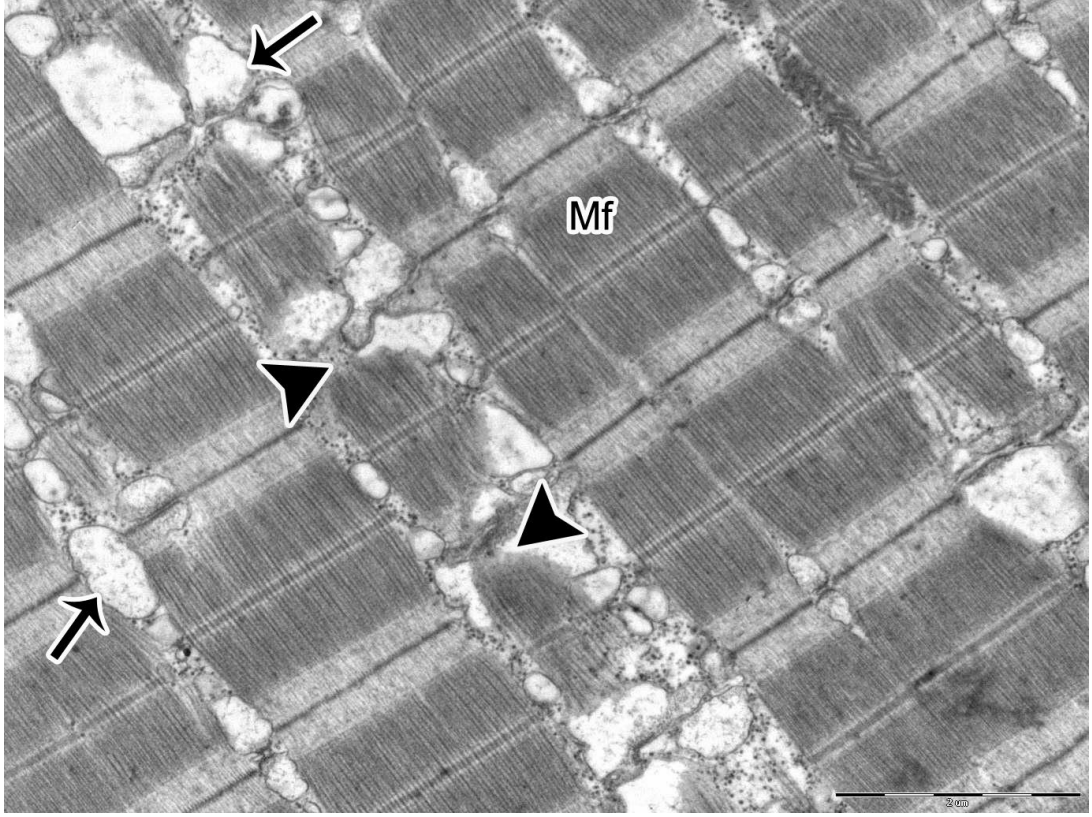
şekil 4.13. 10^{-4} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), mitokondriyon (Mt), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).

4.2.4. 10^{-5} M İmidacloprid Grubu

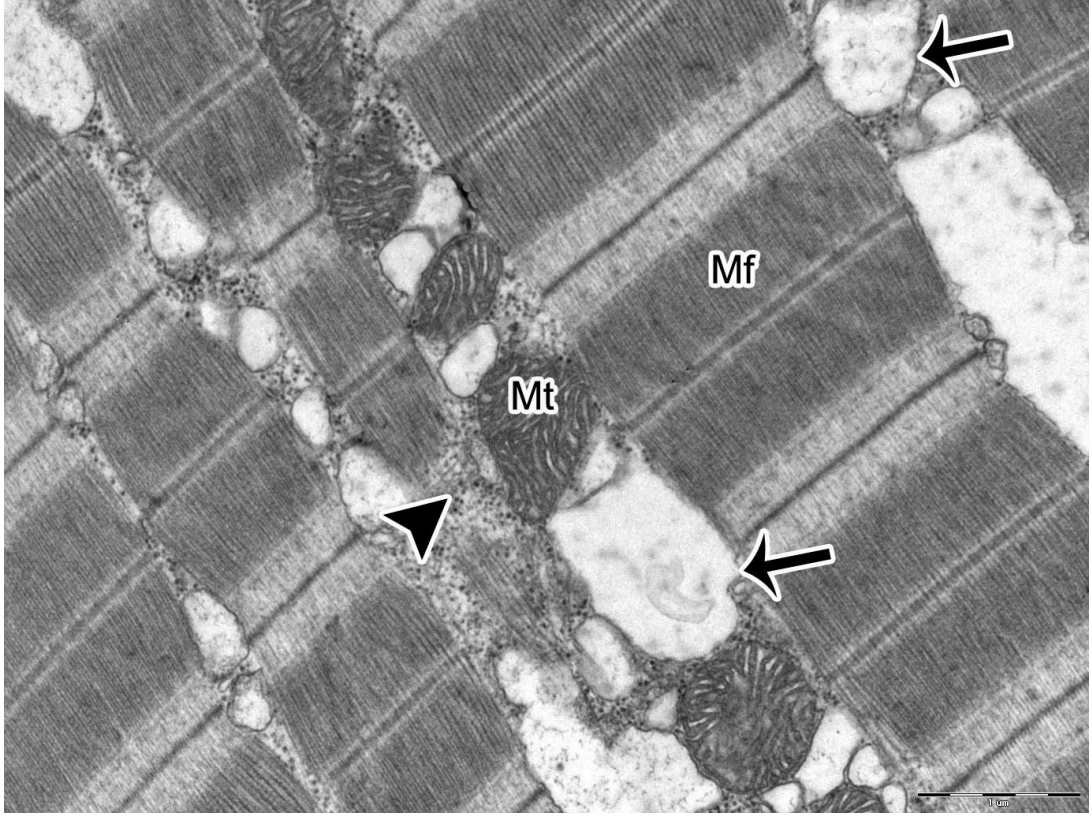
10^{-5} M imidaclopride maruz bırakılmış iskelet kas hücrelerinde miyofibril dizilimi 10^{-3} M ve 10^{-4} M imidaclopridin uygulandığı yüksek doz gruplarına göre daha düzgündü. Miyofibriller arası genişlemeler, glikojen birikimi ve miyofibrillerde yer yer kopmalar, sarkoplazmik retikulumda genişlemeler mevcuttu (şekil 4.14., şekil 4.15., şekil 4.16.).



şekil 4.14. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Glikojen birikimi (G), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X6,000).



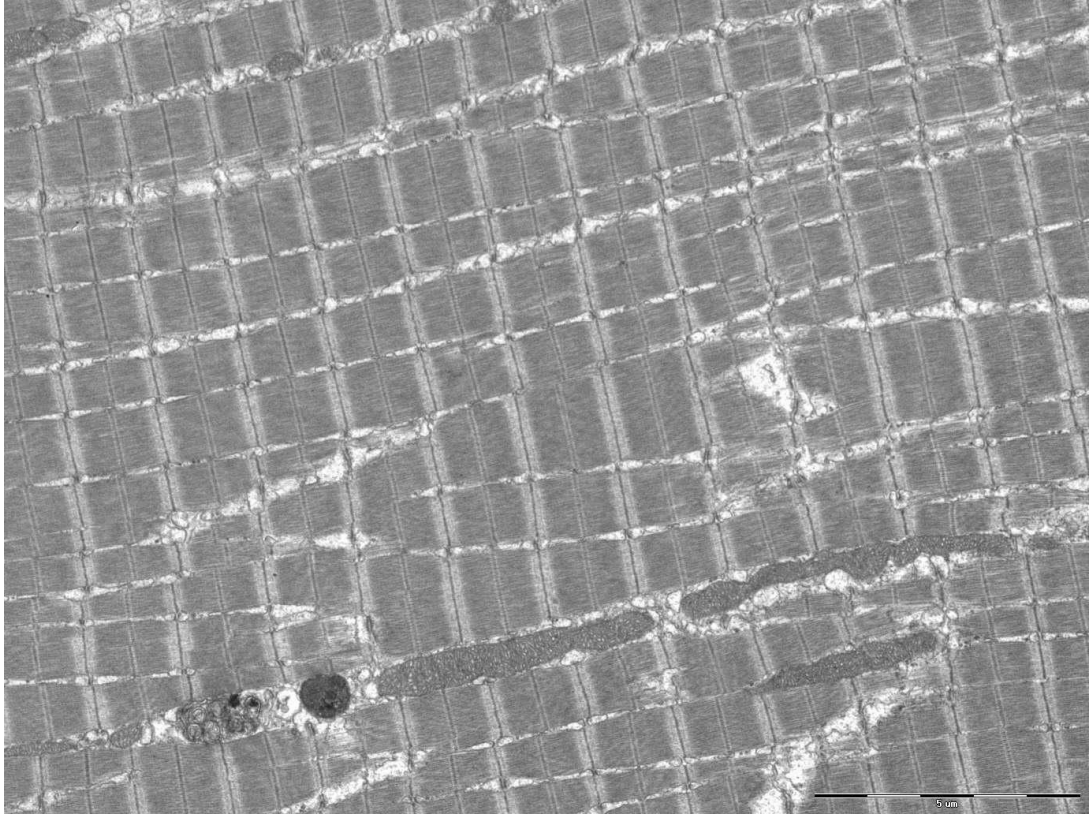
Şekil 4.15. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).



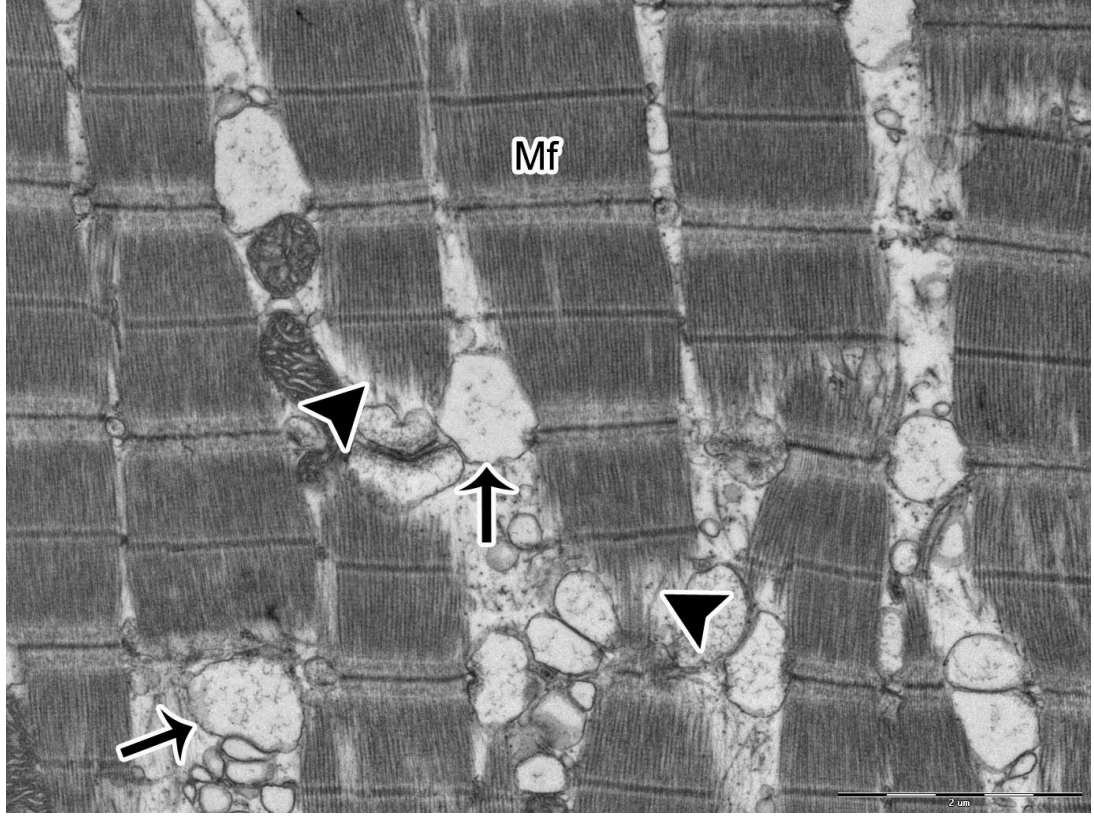
Şekil 4.16. 10^{-5} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), mitokondriyon (Mt), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).

4.2.5. 10^{-6} M İmidacloprid Grubu

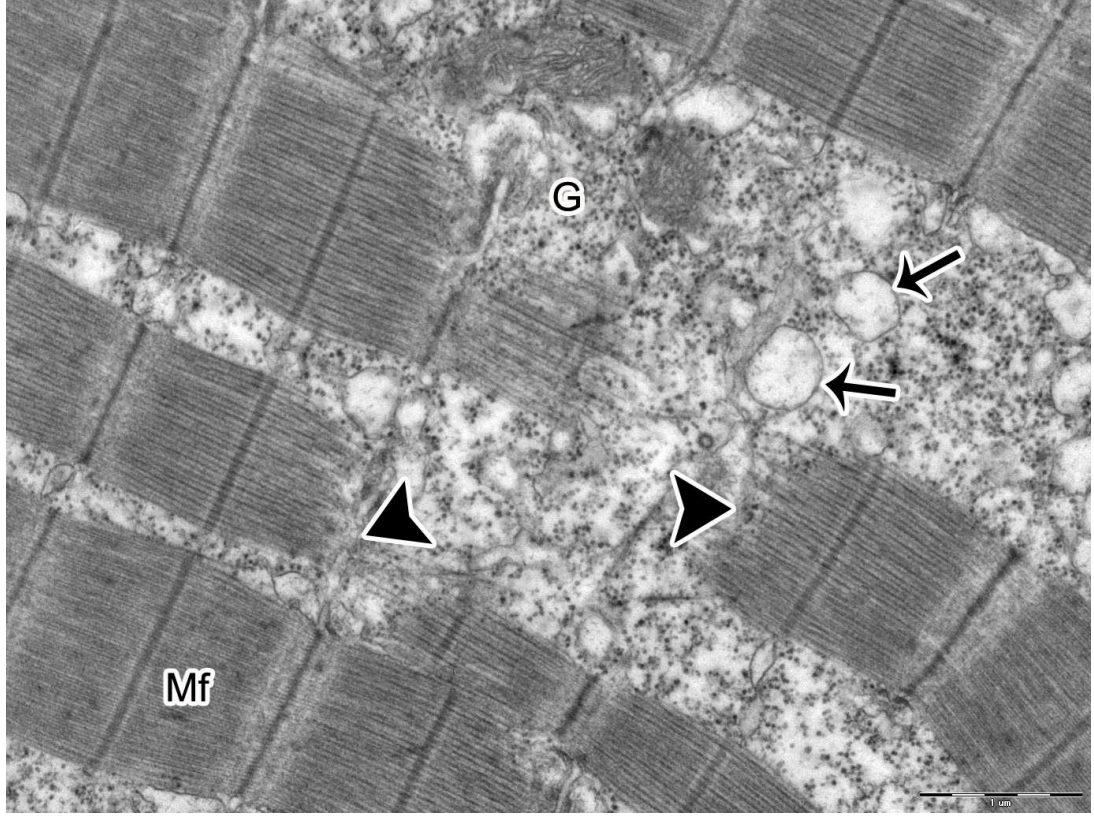
10^{-6} M imidaclopride maruz bırakılmış iskelet kas hücrelerinde sarkomer yapısının korunmasına rağmen, miyofibrillerde yer yer kopmalar mevcuttu. Miyofibriller arasında yer yer glikojen birikimi tespit edilmiş olup, sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler izlenmekteydi (şekil 4.17., şekil 4.18., şekil 4.19.).



şekil 4.17. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü (X6,000).



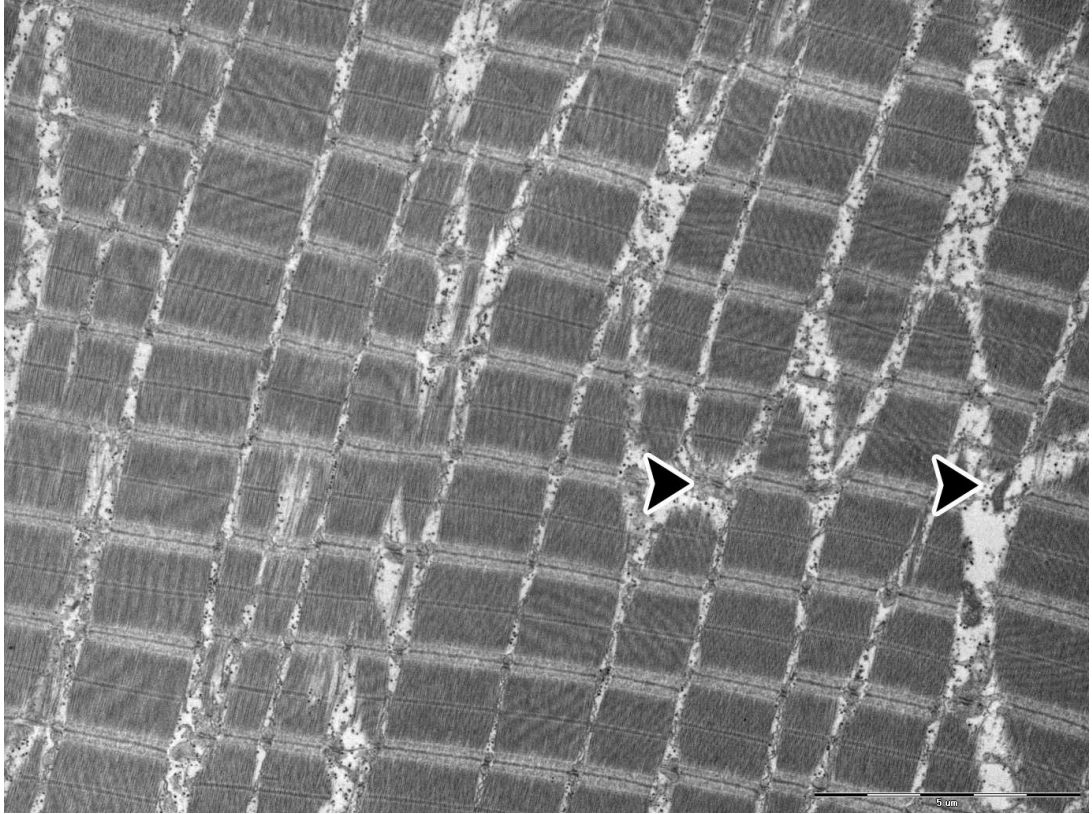
şekil 4.18. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X15,000).



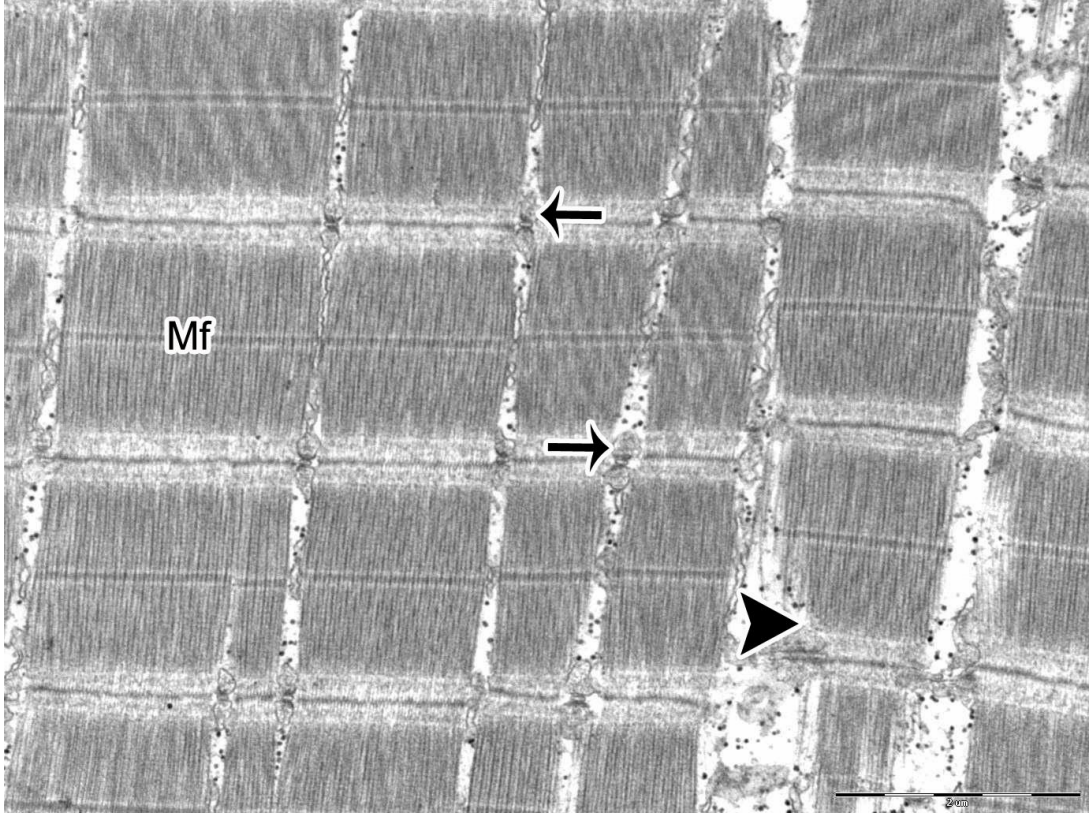
şekil 4.19. 10^{-6} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görünüşü. Miyofibril (Mf), glikojen birikimi (G), miyofibrillerde dejenerasyon (ok başı), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (ok) (X20,000).

4.2.6. 10^{-7} M İmidacloprid Grubu

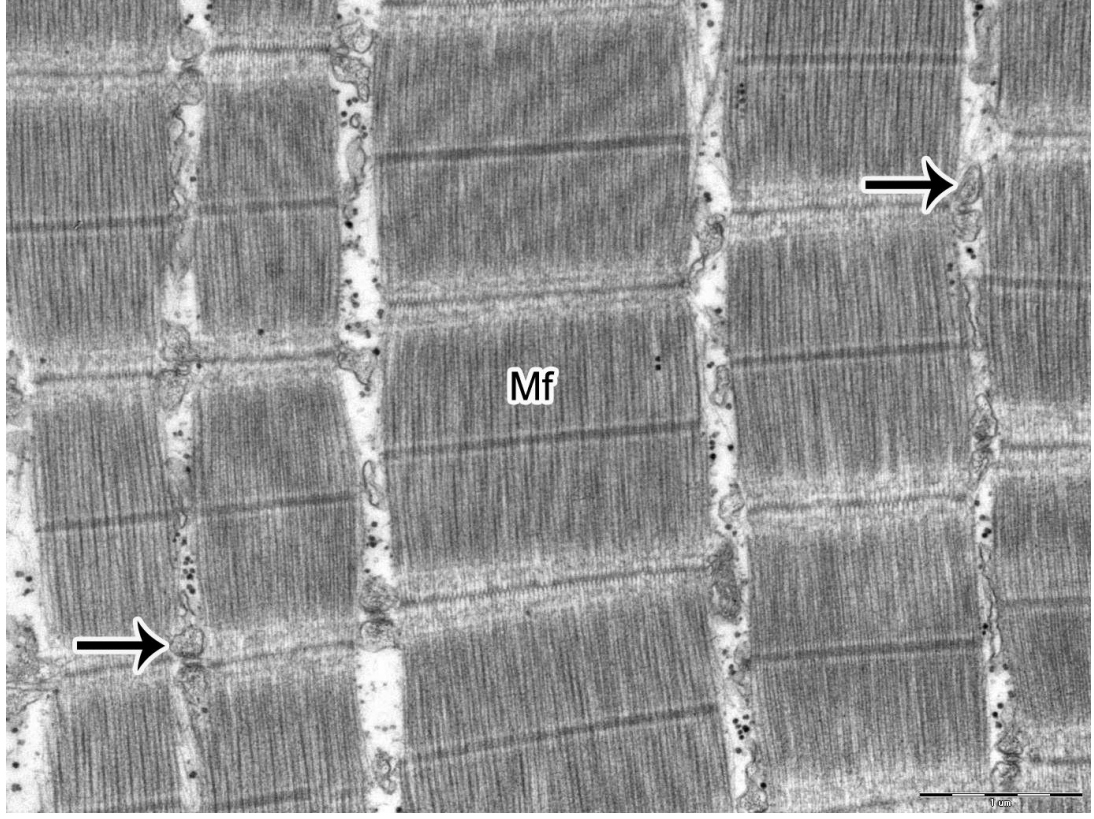
10^{-7} M imidacloprid grubunda miyofibril düzenlenmesi ve sarkomer yapısı ile mitokondriyonlar ve sarkoplazmik retikulum sisternaları normal görünümdeydi. Fakat miyofibriller arası genişlemeler ve yer yer kopmalar diğer gruplarla kıyaslandığında daha az olmasına rağmen en düşük doz grubu olan 10^{-7} M imidacloprid grubunda da izlenmiştir. Miyofibriller arası glikojen birikimi diğer doz gruplarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22.).



Şekil 4.20. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görüntüsü. Miyofibrillerde kopma (ok başı) (X6,000).



şekil 4.21. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görünüşü. Miyofibril (Mf), miyofibrillerde hafif dejenerasyon (ok başı), normal görünümlü sarkoplazmik retikulum sisternası (ok) (X15,000).



Şekil 4.22. 10^{-7} M İmidacloprid grubuna ait iskelet kas liflerinin genel görünüşü. Miyofibril (Mf), normal görünümlü sarkoplazmik retikulum sisternası (ok) (X20,000).

4.3. TARTIŞMA

Bu çalışmada neonikotinoid insektisitlerin ilki ve en çok kullanılan üyesi olan imidacloprid ve bir nAChR antagonisti olan tubokurarinin omurgalı iskelet kas hücresi dinlenim membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine etkileri hem zamana, hem de doza bağlı olarak hücre içi elektrofizyolojik tekniklerle araştırılmıştır. Ayrıca imidaclopridin iskelet kas hücresinin ince yapısı üzerinde meydana getirdiği değişimler transmisyon elektron mikroskobu yardımıyla incelenmiştir. Yapılan literatür araştırması sonucu neonikotinoidlerin ergin omurgalı iskelet kas hücreleri üzerine elektrofizyolojik ve yapısal etkilerini inceleyen kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bulgular, insektisitlerin hedef olmayan organizmaların iskelet kas sistemleri üzerine etkilerine dair yeni bilgiler elde etmemizi sağlamıştır. 10^{-3} - 10^{-7} M arası imidacloprid, iskelet kası dinlenim 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, zamana bağlı olarak imidacloprid maruziyetinin ilk 5. dakikasından itibaren ortaya çıkmıştır. İmidacloprid iskelet kası tekil aksiyon potansiyeli genliğini en yüksek doz olan 10^{-3} M konsantrasyonda kontrole göre dramatik olarak yaklaşık iki buçuk kat kadar yükseltmiş ve bu yükseliş diğer konsantrasyon gruplarında nispeten daha az olmak üzere devam etmiştir. Aksiyon potansiyeli genliğindeki yükseliş, imidacloprid maruziyetinin ilk 5. dakikasında ortaya çıkmış ve tüm zaman dilimlerinde devam etmiştir. Öte yandan aksiyon potansiyeli süresi, 10^{-3} M imidacloprid grubunda diğer konsantrasyon gruplarıyla kıyaslandığında uzamıştır. Bu uzama zamana bağlı olarak imidacloprid maruziyetinin 25. dakikasında istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Diğer konsantrasyon gruplarında aksiyon potansiyeli süresinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Diğer bir parametre olan latans ise tüm konsantrasyon gruplarında kısalma eğilimi göstermiş, fakat bu kısalma imidacloprid konsantrasyon grupları arasında doza bağlı olarak istatistiksel bir anlamlılık göstermemiştir. Zamana bağlı olarak latans, sadece 10^{-3} M ve 10^{-4} M imidacloprid konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı kısalmıştır. Latanstaki

bu kısalma, 10^{-3} M imidacloprid konsantrasyonunda 5. dakikadan, 10^{-4} M imidacloprid konsantrasyonunda ise 10. dakikadan itibaren meydana gelmiştir.

Bir nAChR antagonisti olan tubokurarin, imidaclopridin iskelet kası dinlenim membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli genliği ve süresinde meydana getirdiği artışı ve latensta meydana getirdiği kısalmayı baskılamıştır.

Elde edilen elektrofizyolojik bulgular, imidaclopridin omurgalı iskelet kas hücrelerini, hem dinlenim durumunda, hem de sinyal iletimi durumunda etkilediğini ve bu etkinin doza bağlı olarak arttığını göstermektedir. İmidaclopridin, hücre dinlenim durumundayken, dinlenim membran potansiyelini daha pozitif değerlere yükseltmesi ve iletim durumundayken aksiyon potansiyeli genliğini arttırması, iskelet kas hücreleri üzerine depolarize edici etkisinin olduğunu göstermektedir. Temel olarak, hücrenin depolarize olması, hücre içi iyon dengesinin geçici bir süreliğine bozularak, artı yüklü katyonların artışı veya eksi yüklü anyonların azalışı ile sağlanır. nAChR antagonisti olan tubokurarinin imidaclopridin depolarize edici bu etkisini kısmen de olsa baskılaması, imidaclopridin nAChR'lerine bağlanarak membrandaki bu reseptörlerden hücre içerisine katyon iyon akışının geręekleşmesine neden olduğunu ve nAChR agonisti olarak görev yaptığını düşündürmektedir.

Öte yandan imidacloprid iskelet kası aksiyon potansiyeli süresini doza bağlı olarak uzatmıştır. Tubokurarinin, imidaclopridin aksiyon potansiyeli süresi üzerine etkisini geri çevirmesi, aksiyon potansiyeli üzerindeki uzamanın, imidaclopridin yine nAChR'lerini etkilemesinden kaynaklandığı sonucunu desteklemektedir. İmidacloprid, nAChR'lerine bağlanarak sadece agonist etki değil, aynı zamanda kanal modülatörü olarak da görev yapıyor olabilir. İmidacloprid, nAChR'lerinin açılmasını sağlayarak agonist etki gösterirken, açıldıktan sonra kanalın normalden daha yavaş kapanmasını sağlayarak aksiyon potansiyeli süresini uzatmış olabilir. Ayrıca, iskelet kas hücrelerinde aksiyon potansiyeli oluşumunu tetikleyen ana unsur nAChR'lerinden geręekleşen sodyum iyon girişi iken, kas membranında bulunan voltaja bağımlı sodyum ve potasyum kanalları, membrandaki depolarizasyondan etkilenerak aksiyon potansiyeli oluşumuna katkıda bulunurlar. İmidacloprid sadece

nAChR'lerini değil, aynı zamanda voltaja bağımlı sodyum kanallarının aktivasyon sürelerini uzatarak veya inaktivasyonunu geciktirerek, yada repolarizasyondan sorumlu potasyum kanallarının aktivasyonunu geciktirerek aksiyon potansiyeli süresi üzerinde uzama meydana getirmiş olabilir. Literatürde bu bulguyu tartışabilecek herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

İmidaclopridin, latansı doza bağlı olarak kısaltması, depolarize edici etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Bu veri, yüksek konsantrasyon gruplarında imidaclopridin iskelet kas lifinde iletimi arttırdığının göstergesidir. Aksiyon potansiyeli genliğindeki yükseliş ile beraber artan iletim hızı iskelet kas lifinde aşırı uyarılmışlık (hipereksitabilite) meydana getirmiştir.

İmidaclopridin böcek sinir sisteminde içeri doğru pozitif yüklü akımlar ve nöron membranlarında depolarizasyon meydana getirdiği ve bu depolarizasyonların nAChR antagonistleri tarafından ortadan kaldırıldığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [86, 90, 91, 92, 93]. Her ne kadar böcek ve omurgalı nAChR'leri arasında yapısal farklılıklar olsa da bulgularımız, imidaclopridin omurgalı nAChR'lerini benzer mekanizmayla etkileyebileceğini göstermektedir.

İmidaclopridin, omurgalı nAChR'leri üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıdaki çalışmalarda ise farklı etkiler söz konusudur. Bu çalışmaya benzer bulgular elde eden Bal ve ark. [116] 10 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda imidaclopridin fare beyni koklear nukleusundaki satellit hücrelerinde dinlenim membran potansiyelini ortalama 6 mV kadar depolarize ettiğini, içeri doğru akımlar meydana getirdiğini ve ayrıca aksiyon potansiyeli frekansında artış oluşturarak nöron membranlarının uyarılabilirliğini arttırdığını göstermişlerdir. Öte yandan 50 µM tubokurarinin, imidaclopridin membran potansiyeli, içeri doğru akımlar ve aksiyon potansiyeli frekansındaki artışı bloke ettiğini göstermişlerdir.

İmidaclopridin, omurgalıların hem homomerik, hem de heteromerik nAChR'leri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, Ihara ve ark [8] tavuk α7 homomerik ve tavuk α4β2 heteromerik nAChR'lerini, *Xenopus laevis* oositlerinde

tanımlamışlar ve imidaclopridin reseptör akımları üzerine etkisini voltaj klamp tekniği ile araştırmışlardır. 1 mM imidaclopridin, homomerik $\alpha 7$ nAChR'lerinde içeri doğru akımlar meydana getirerek agonist etkisinin olduğunu ve heteromerik $\alpha 4\beta 2$ nAChR'leri üzerine çok az etki göstererek, zayıf agonist etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. İmidaclopridin, asıl etki ettiği nAChR alt ünitesinin α alt ünitesi olduğunu belirten araştırmacılar, bu etkinin heteromerik reseptörlerde daha az olduğunu göstermişlerdir. Farklı olarak iskelet kaslarında bulunan nAChR'leri heteromerik reseptörler olup bu tez çalışmasında, reseptörlerin imidaclopride olan duyarlılığı oldukça fazla gibi görünmektedir. Araştırmacıların model olarak kullandığı heteromerik reseptörler, sadece α ve β gibi iki tip alt ünite içermektedir. Tez çalışmasında kullanılan doğal kas lifi membranlarındaki heteromerik nAChR'lerin α , β , δ , γ olmak üzere dört farklı alt üniteye sahip olduğu bilinmektedir. Kullanılan elektrofizyolojik tekniğin farklı olması nedeniyle birebir kıyaslama gibi durum çok sağlıklı olmasa da tez çalışmasında elde edilen bulgular, imidaclopridin kas lifi membranları üzerine güçlü depolarize edici etkisinin Ihara ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sonuçlar, imidaclopridin reseptör üzerine etki gücünün heteromerik nAChR'lerinin içerdikleri alt unitelerin çeşitliliğine göre değişebileceğini düşündürmektedir.

Farklı bir preparat kullanan Nagata ve ark. [85] yaptıkları çalışmada sıçanların adrenal bez tümör hücreleri üzerindeki nAChR'lerine 10 μ M imidaclopridin ve asetilkolinin etkisini tek kanal patch klamp yöntemi ile araştırmışlardır. Asetilkolinin nAChR'leri ana iletim durumundayken, içeri akımlar meydana getirirken, imidaclopridin ise nAChR'leri yarı iletim durumundayken içeri doğru akımlar meydana getirdiğini göstermişlerdir. Bu nedenle, imidaclopridin kısmi agonist olarak etki ettiğini ileri sürmüşlerdir. Diğer bir çalışmada, Nagata ve ark. [114] aynı preparatı kullanmışlar ve bu çalışmalarında 30 μ M imidaclopridin bir nAChR agonisti olan 100 μ M karbakol tarafından oluşturulan akımları baskıladığını, aynı Şekilde 10 μ M imidaclopridin 10 μ M asetilkolin tarafından oluşturulan akımları baskıladığını fakat 10 μ M imidaclopridin tek başına uygulandığında küçük akımlar oluşturduğunu ve imidaclopridin hem agonist hem de antagonist gibi çoklu etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

İmidaclopridin omurgalı nAChR'leri üzerine bu çoklu etkisine bir örnek ise Li ve ark. [115] yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada 300 µM imidaclopridin *Xenopus* cinsi kurbağaların oositlerinde tanımladıkları insan $\alpha 4\beta 2$ nAChR'leri üzerine zayıf agonist olarak etki ettiğini fakat 1 mM asetilkolin ile beraber uygulanan 300 µM imidaclopridin asetilkolin tarafından oluşturulan akımların bloke ederek antagonist etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

İmidaclopridin omurgalı iskelet kasları üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada Seifert ve Stollberg [117] embriyonik kurbağa kas hücrelerinde imidaclopridin etkisini bizim çalışmamızdan farklı olarak kas kontraksiyonunu inceleyerek araştırmışlardır. İmidaclopridin tek başına kas kontraksiyonu oluşturmadığını fakat $3,3 \times 10^{-6}$ M imidaclopridin nikotin ve asetilkolin tarafından oluşturulan kas kontraksiyonunu engellediğini ve bu nedenle embriyonik kurbağa kas nAChR'leri üzerine bizim çalışmamızdan farklı olarak antagonist etkisinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. İmidaclopridin embriyonik kas hücreleri üzerine olan bu farklı etki, imidaclopridin çoklu etkisinden kaynaklanabileceği gibi, kassal nAChR'leri ile nöronal nAChR'lerinin yapısal farklılığından kaynaklanıyor gibi görünse de, imidacloprid benzer dokularda bile farklı etkiler ortaya çıkarabildiği bilinmektedir. Ayrıca kullanılan fizyolojik test sistemlerinin farklı olması bulguları bizim çalışmamızla doğrudan karşılaştırabilme olanağı vermemektedir. İskelet kasında dinlenim membran potansiyeli ve aksiyon potansiyeli parametrelerindeki değişim kas membranındaki iyon kanallarının aktivasyonu ile ilgili bilgi verirken, kas kontraksiyonu kas membranında oluşan aksiyon potansiyelinin t-tübüllerinde yayılmasının ardından sitosoldeki bir dizi hücreyel olayın meydana gelmesi ve nihayetinde hücre içerisindeki miyofilamentlerin birbiri üzerinden kaymasını gerektiren fizyolojik bir fonksiyondur. Ayrıca embriyonik gelişim sırasında kassal nAChR'leri yapısal olarak değişime uğrayarak ergin kassal nAChR'lerini oluştururlar. Embriyonik ve ergin kas nAChR'lerindeki bu yapısal farklılık imidaclopridin etki mekanizmasında da farklılıklar yaratıyor olabilir.

Öte yandan elektron mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen bulgular imidaclopridin farklı konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre iskelet kaslarının ince yapısında doza bağlı olarak hasar meydana getirdiğini göstermektedir. 10^{-3} ve 10^{-4} M imidacloprid, iskelet kasının kasılma birimi olan sarkomer bütünlüğünün bozulmasına ve miyofibril dejenerasyonuna neden olmuştur. Aynı zamanda sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, mitokondriyonlarda vakuol oluşumu ve miyofibriller arasında glikojen birikimi meydana getirmiştir.

10^{-5} ve 10^{-6} M imidaclopridin uygulandığı gruplarda daha yüksek konsantrasyonlardaki imidaclopridin uygulandığı gruplara göre miyofibril dizilimi düzgün olup, sarkomer bütünlüğü korunmaktaydı. Fakat 10^{-5} ve 10^{-6} M imidacloprid yüksek doz gruplarında olduğu gibi miyofibriller arası glikojen birikimi, sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme meydana getirmiştir. Ayrıca miyofibrillerarası genişleme ve miyofibrillerde yer yer kopmalar olmuştur.

En düşük konsantrasyon olan 10^{-7} M imidaclopridin uygulandığı grupta diğer imidacloprid gruplarından farklı olarak sarkomer bütünlüğü korunmuş, miyofibril dizilimi düzgün, mitokondri ve sarkoplazmik retikulum sisternaları normal görünümdeydi. Fakat yine de diğer imidacloprid gruplarından daha az olmak üzere miyofibrillerde kopma meydana gelmiştir.

İmidacloprid iskelet kas hücrelerinde doza bağlı olarak artan bir hasar oluşturmuştur. Bütün imidacloprid konsantrasyonları miyofibril dejenerasyonu meydana getirmiştir. Miyofibril dejenerasyonu, miyofibrillerin ince yapısındaki çeşitli değişimleri ifade eder. İlk olarak görülen veya hafif kabul edilen hasarlar periferel miyofilamentlerin kaybolmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan miyofibril genişliğinin azalması yani miyofibrillerde incelme ile karakterizedir fakat normal sarkomer yapısı korunmaktadır [121]. Elde ettiğimiz bulgular en düşük konsantrasyon olan 10^{-7} M imidaclopridin iskelet kas hücrelerinde hafif nitelikli hasar meydana getirdiğini göstermektedir. Daha şiddetli değişiklikler miyofibrillerde yıkım ve kayıpla, sarkomer boyundaki ve Z çizgisindeki çeşitli değişiklikleri içerir [121]. Yüksek konsantrasyon gruplarında uygulanan 10^{-3} ve 10^{-4} M imidacloprid Z

çizgisinin yapısını ve sarkomer bütünlüğünün bozulmasına, miyofilamentlerde düzensizleşmeye yol açmıştır. İmidaclopridin, omurgalı çizgili kas hücrelerinin ince yapısı üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için miyofibril dejenerasyonu ile ilgili sonuçları doğrudan karşılaştırma olanağı olamamıştır. Fakat Mehlhorn ve ark. [95, 96] bir kedi piresi türü olan *Ctenocephalides felis* türünün hem ergin hem de larva formları üzerinde yaptıkları çalışmada imidaclopridin bir saat sonunda çizgili kas fibrillerinde ayrışma ve geniş çaplı hasar meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Mehlhorn ve ark. [97] başka bir omurgasız olan, koyun bit sineği (*Melophagus ovinus*) üzerine yaptıkları çalışmada imidaclopridin gangliyon, sinir kordu ve bu dokularla ilişkili olan iskelet kas fibrilinde ölümcül yıkımlar meydana getirdiğini elektron mikroskobu ile göstermişlerdir.

İskelet kaslarındaki şiddetli miyofibril dejenerasyonunun sonucu olarak sarkoplazmada görülen çeşitli yapılarda göreceli bir artış meydana gelebilir [121]. Çalışmamızda yüksek imidacloprid konsantrasyonlarında yoğun miyofibril dejenerasyonuna ek olarak miyofibriller arasında glikojen partiküllerinin birikimi tespit edilen önemli bir bulgudur. Ayrıca yüksek imidacloprid konsantrasyonlarında mitokondriyal hasarın mevcut olması bu iki bulgunun birbiri ile ilişkili olduğunu ve mitokondriyal hasara bağlı olarak enerji metabolizmasının bozulması sonucunda miyofibriller arası glikojen birikiminin olduğunu göstermektedir. Enerji metabolizmasındaki bu değişiklik ve glikojen birikimi iki muhtemel durum neticesinde gerçekleşiyor olabilir. İlk olarak glikojen artışı pestisit oluşturduğu strese karşı bir savunma mekanizması olarak glikoneogenez yoluyla glikojen sentezinde bir artış meydana getirmiş olabilir. Kas hücresi hipereksitabilite karşısında gereksinim duyduğu enerjiyi bir yandan glikojen sentezini arttırarak sağlamaya çalışmakta olabilir. Pestisitlerin kas doku üzerinde bu şekilde glikojen birikimine neden olduğu bilinmektedir [122, 123]. İkinci olarak sentezlenen glikojen mitokondriyal hasar neticesinde hücre tarafından kullanılamamakta ve sarkoplazmada birikime neden olabilmektedir. Örnek olarak glikojen depo hastalıklarında olduğu gibi glikojenin yapımı ve yıkımı ile ilgili enzim defekti

nedeniyle glikojen metabolize edilememiş ve sarkoplazmada aşırı glikojen birikimi meydana gelmiş olabilir.

İmidacloprid, 10^{-7} M imidacloprid grubu hariğ diğer bütun konsantrasyonlarda T-tübüllerine bitişik olan sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler meydana getirmiştir. Sarkoplazmik retikulum, iskelet kaslarının kasılma mekanizması için gerekli olan kalsiyum kaynağını oluşturmaktadır [55]. İskelet kas membranlarında oluşan aksiyon potansiyeli T-tübülleri içerisinde yayılarak T-tübüllerine bitişik olan sarkoplazmik retikulum sisternalarının membranlarını depolarize eder ve sarkoplazmik retikulum lümenindeki kalsiyumun riyanodin reseptörleri aracılığıyla sarkoplazma içerisine geçişine izin verir [55, 124]. Bu şekilde iskelet kaslarının kalsiyum aracılı kasılma mekanizması geręekleřiirken, kasılma sonrası sitosoldeki kalsiyum iyonları sarkoplazmik retikulum membranındaki aktif kalsiyum pompaları ile sarkoplazmik retikulum içerisine alınır [55]. Yapılan alışmalar iskelet kaslarındaki ilk hasarın miyofilamentler, T-tübülleri ve sarkoplazmik retikulum yapısının bozulması ile karakterize olup, hücre membranının kimyasal değişimine bağlı olarak intrasellüler kalsiyumun dengesinin bozulmasına neden olduğunu göstermektedir [125, 126, 127]. Sarkoplazmik retikulumdaki genişleme sarkolemmal membranların hasara uğraması ile normal olarak korunan iyonik konsantrasyonda oluşan dengesizliklerin ve iyonik değişimi dengelemek için geręekleřtirilen su alınımının bir sonucu olabilir [128, 129]. Ayrıca sarkoplazmik retikulum membranlarının hasara uğraması miyofibriller arası kalsiyum konsantrasyonunun artmasına ve proteolitik enzimlerin aktive olmasına neden olmuş olabilir [125, 126].

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada dünya çapında yaygın olarak kullanılan neonikotinoid insektisitlerden imidaclopridin hedef olmayan omurgalı canlılardan kurbağa *Rana ridibunda* iskelet kas sistemi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda imidaclopridin doza ve zamana bağlı olarak kurbağa iskelet kas hücrelerinin biyoelektriksel aktivitesi üzerine etkileri kas dinlenim membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli parametrelerinden genlik, aksiyon potansiyeli süresi ve latans ölçülerek belirlenmeye çalışılmıştır. İmidaclopridin kurbağa iskelet kası ince yapısı üzerine etkileri ise histolojik olarak araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda:

1. İmidacloprid, iskelet kası biyoelektriksel özelliklerinden membran potansiyelini doza bağlı olarak daha pozitif değerlere çıkmasına neden olarak hücre membranının depolarize olmasını sağlamıştır.
2. İmidacloprid, iskelet kası aksiyon potansiyeli genliğini doza bağlı olarak yüksek oranda arttırmıştır. Artan aksiyon potansiyeli genliği kas hücrelerinin aşırı uyarılmasına neden olmuştur.
3. İmidacloprid aksiyon potansiyeli süresini yüksek dozlarda arttırmış latansı ise düşürmüştür. Daha düşük dozlarda ise aksiyon potansiyeli süresi ve latansta önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir.
4. Öte yandan bir nAChR antagonisti olan tubokurarin imidacloprid ile kombine uygulandığı gruplarda imidaclopridin kas hücrelerinde meydana getirdiği bu biyoelektriksel değişiklikleri ortadan kaldırmıştır.
5. İmidaclopridin iskelet kası ince yapısında doza bağlı olarak artan hasar meydana getirdiği tespit edilmiştir.
6. Bulgular imidaclopridin iskelet kas hücrelerini depolarize ettiğini ve bu depolarizasyonu hücre membranında bulunan nAChR'lerini aktive ederek ortaya çıkardığı yönünde güçlü deliller elde etmemizi sağlamıştır. İmidaclopridin muhtemel etkisi nAChR'lerine bağlanarak reseptör kanalının açılması sonucunda hücre içerisine bol miktarda artı yüklü sodyum iyonlarının girişi ve bir miktar da potasyum iyon çıkışı ile gerçekleşebilir.

Bunun sonucunda hücre membranı depolarize olmakta ve aşırı depolarizasyon sonucunda aşırı uyarılma oluşmaktadır.

7. İmidaclopridin iskelet kas hücrelerinde meydana getirdiği aşırı uyarılma ve kas hücrelerindeki yoğun deşarjlar uygulamanın sonunda kas hücrelerinin sarkomer yapısında bozulmalara, miyofibril düzenlenmesinde yoğun dejenerasyona, miyofibriller arası genişlemelere, mitokondriyal hasara ve sarkoplazmik retikulumda genişlemelere neden olmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Vural, N., "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 659 s., (2005).
- [2] Kumargal, D., Çömelekoğlu, Ü., Aşkın, A. "İyon kanallarını hedef alan insektisitler", Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg, 5(2): 7-13, (2012).
- [3] Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B. M., Rauh, J. J., Sattelle, D. B. "Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides", *Invert Neurosci*, 5: 119-133, (2005).
- [4] Kollmeyer, W. D., Flattum, R. F., Foster, J. P., Powell, J. E., Schroeder, M. E. and Soloway, S. B., "Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides", *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*, (Editör: Yamamoto, I., Casida, J. E.), Springer, Tokyo, 71-89, (1999).
- [5] Yamamoto, I. and Casida, J. E., "Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptors", Springer-Verlag, Tokyo, 952 s. (1999).
- [6] Deglise, P., Grünewald, B. and Gauthier, M. "The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee kenyon cells", *Neuroscience Letters*, 321: 13-16, (2002).
- [7] Matsuda, K., Buckingham, S. D., Freeman, J. C., Squire, M. D., Baylis, H. A. and Sattelle, D. B. "Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine reseptors", *British Journal of Pharmacology*, 123(3): 518-524, (1998).
- [8] Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V. ve Sattelle D. B. "Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila*-chicken SAD $\beta 2$ and ALS $\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine reseptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes", *Neuropharmacology*, 45(1): 133-144, (2003).
- [9] Liu, G. Y., Ju, X. L., Cheng, J. "Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling", *J Mol Model*, 16: 993-1002, (2010).

- [10] Tomizawa, M., Zhang, N., Durkin, K. A., Olmstead, M. M., Casida, J. E. "The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinoid cation- π interaction model", *Biochemistry*, 42(25): 7819-7827, (2003).
- [11] Breer, H., Sattelle, D. B. "Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors", *J Insect Physiol*, 33: 771-790, (1987).
- [12] Gahring, L. C. and Rogers, S. W. "Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells", *The AAPS Journal*, 7(4): E885-E894, (2006).
- [13] Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., Tzartos, S. J. "Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors structure, function and pathogenicity", *The FEBS Journal*, 274: 3799–3845, (2007).
- [14] Wang, Y., Pereira, E. F. R., Maus, A. D. J., Ostlie, N. S., Navaneetham, D., Lei, S., Albuquerque and Conti-Fine, B. M. "Human bronchial epithelial and endothelial cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors", *Molecular Pharmacology*, 60(6): 1201-1209, (2001).
- [15] Arthur, C. and Guyton, M. D., "Tıbbi Fizyoloji, Textbook of Medical Physiology", Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1024 s., (1998).
- [16] Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P. "Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian *Rana* N. Hallowell", *Chemosphere*, 56: 457-463, (2004).
- [17] Todd, B. D., Bergeron, C. M., Hepner, M. J., Hopkins, W. A. "Aquatic and terrestrial stressors in amphibians: A test of the double jeopardy hypothesis based on maternally and trophically derived contaminants", *Environ Toxicol Chem* 30: 2277–2284 (2011).
- [18] Pollet, I. and Bendell-Young, L.I. "Amphibians as indicators of wetland quality", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2589-2597, (2000).
- [19] Schuytema, G. S. and Nebeker, A. V. "Effects of ammonium nitrate, sodium nitrate and urea on Red-Legged frogs: Pacific treefrogs and African clawed frogs", *Bull Environ Contam Toxicol*, 63: 357-364, (1999).

- [20] Marco, A., Cash, D., Belden, L. K., Blaustein, A. R. "Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species", *Arc Environ Contam Toxicol*, 40: 406-409, (2001).
- [21] Houlihan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., Kuzmin, S. L. "Quantitative evidence for global amphibian population declines", *Nature*, 404: 752–755, (2000).
- [22] Wagner, N. and Lötters, S. "Effects of water contamination on site selection by amphibians: experiences from an arena approach with european frogs and newts", *Arc Environ Contam Toxicol*, 65: 98-104, (2013).
- [23] Perry, T., Batterham, P., Daborn, P. J. "The biology of insecticidal activity and resistance", *Insect Biochemistry and Molecular Biochemistry*, 41: 411-422, (2011).
- [24] Ghanim, M. and Ishaaya, I., "Insecticides with Novel Modes of Action Mechanism and Resistance Management", *Insecticides with Novel Modes of Action Mechanisms and Application*, (Editör: Ishaaya, I., Degheele, D.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (1997).
- [25] Scharf, M.E., "Neurological effects of insecticides", *Encyclopedia of Pest Management*, (Editör: Pimental, D.), Marcel-Dekker, New York, 1-5, (2003).
- [26] Bloomquist, J. R. "Ion channels as targets for insecticides", *Ann Rev Entomol*, 41: 163–190, (1996).
- [27] Narahashi, T. "Neuronal ion channels as the target sites of insecticides", *Pharmacol Toxicol*, 78:1–14, (1996).
- [28] Casida, J. E. and Quistad, G. B. "Golden age of insecticide research: past, present and future", *Ann Rev Entomol*, 43: 1–16, (1998).
- [29] Hitmi, A., Coudret, A., Barthomeuf, C. "The production of pyrethrins by plant cells and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species", *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 35(5): 317–37, (2000).
- [30] Nauen, R. and Bretschneider, T. "New modes of action of insecticides", *Pesticide Outlook*, 13(6): 241-5, (2002).
- [31] Cordova, D., Benner, E. A., Sacher, M. D., Rauh, J. J., Sopa, J. S., Lahm, G. P., Selby, T. P., Stevenson, T. M., Flexner, L., Gutteridge, S., Rhoades, D. F., Wu, L., Smith, R. M., Tao, Y. "Anthranilic diamides: a new class of

- insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84: 196-214, (2006).
- [32] Lahm, G. P, Cordova, D., Barry, J. D. “New and selective ryanodine receptor activators for insect control”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12): 4127–4133, (2009).
- [33] Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., Hamilton, S. L. “Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: 1-21, (2010).
- [34] Dekeyser, M. A. “Acaricide mode of action”, *Pest Manag Sci*, 61(2): 103–10, (2005).
- [35] Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., Sattelle, D. B. “Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors”, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573-580, (2001).
- [36] Soloway, S. B., Henry, 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).
- [37] Mullins, J. W. “Imidacloprid: a new nitroguanidine insecticide”, *American Chemical Society Symposium Series*, 524: 183-198, (1993).
- [38] Kagabu, S. “Chloronicotinyll insecticides-discovery, application and future perspective”, *Reviews in Toxicology.*, 1: 75-129, (1997).
- [39] Gepner, J. I., Hall, L. M. and Sattelle, D. B. “Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action”, *Nature*, 276: 188-190, (1978).
- [40] Millar, N. S. and Denholm, I. “Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides”, *Invert Neuroscience*, 7(1): 53-66, (2007).
- [41] Tomizawa, M., and Casida, J. E. “Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors”, *Annu Rev Entomol*, 48: 339-64, (2003).

- [42] Tomizawa, M., Lee, D. L., Casida, J. E. "Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors", *J Agric Food Chem*, 48: 6016-6024, (2000).
- [43] Lansdell, S. J. and Millar, N. S. "The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity", *Neuropharmacology*, 39: 671-679, (2000).
- [44] Lansdell, S. J. and Millar, N. S. "Molecular characterisation of D α 6 and D α 7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: formation of high-affinity α -bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras", *J Neurochem*, 90: 479-489, (2004).
- [45] Ihara, M., Matsuda, K., Shimomura, M., Sattelle, D. B., Komai, K. "Super agonist actions of clothianidine and related compounds on the SAD β 2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes", *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 761-763, (2004).
- [46] Huang, Y., Williamson, M. S., Devonshire, A. L., Windass, J. D., Lansdell, S. J., Millar, N. S. "Molecular characterisation and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*", *J Neurochem*, 73: 380-389, (1999).
- [47] Liu, Z., Williamson, M. S., Lansdell, S. J., Denholm I., Han, Z., Millar, N. S. "A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper)", *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 8420-8425, (2005).
- [48] Bass, C., Lansdell, S. L., Millar, N. S., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L. M., Williamson, M. S. "Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:Pulicidae)", *Insect Biochem Mol Biol*, 36: 86-96, (2006).
- [49] Matsuda, K., Shimomura, M., Kondo, Y., Ihara, M., Hashigami, K., Yoshida, N., Raymond, V., Mongan, N. P., Freeman, J. C., Komai, K., Sattelle, D. B. "Role of loop D of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids", *Br J Pharmacol*, 130: 981-986, (2000).

- [50] Shimomura, M., Okuda, H., Matsuda, K., Komai, K., Akamatsu, M., Sattelle, D. B. "Effects of mutations of aglutamine residue in loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinic insecticides and related ligands", *Br J Pharmacol*, 137: 162-169, (2002).
- [51] Shimomura, M., Yokota, M., Okumura, M., Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D. B., Komai, K. "Combinatorial mutations in loops D and F strongly influence responses of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to imidacloprid", *Brain Research*, 991: 71-77, (2003).
- [52] Shimomura, M., Yokota, M., Matsuda, K., Sattelle, D. B., Komai, K. "Roles of loop C and loop B-C interval of the nicotinic receptor α subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects", *Neuroscience Letters*, 363: 195-198 (2004).
- [53] Shimomura, M., Satoh, H., Yokota, M., Ihara, M., Matsuda, K., Sattelle, D. B. "Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the N-terminus of the *Drosophila* Da2 subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity", *Neuroscience Letters*, 385: 168-172, (2005).
- [54] Cox, C. "Insecticide factsheet imidacloprid", *Journal of Pesticide Reform*, 21(1): 15-21, (2001).
- [55] Pehlivan, F., "Biyofizik", Feryal Matbaası, Ankara, 412 s., (2004).
- [56] Vander, A., Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K., "Human Physiology: The Mechanism of Body Function", 8th ed. ", The McGraw-Hill Companies, 800 s., (2001).
- [57] Barnard, E. A. "Receptor classes and the transmitter-gated ion channels", *Trends Biochem Sci*, 17(10): 368-374, (1992).
- [58] Unwin, N. "The structure of ion channels in membranes of excitable cells", *Neuron*, 3(6): 665-676, (1989).
- [59] Catterall, W. A. "Structure and function of voltage-gated ion channels", *Trends Neurosci*, 16(12): 500-506, (1993).
- [60] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., "Molecular Biology of The Cell", Garland Science Taylor, New York, 1463 s., (2002).

- [61] Puralı, N., “Hücre Eektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri”, Veri Medikal Yayıncılık, İstanbul, 287 s., (2008).
- [62] Sachs, F. and Morris, C. E. “Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells”, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 132: 1-77, (1998).
- [63] Hucho, F. and Weise, C. “Ligand gated ion channels”, *Angewandte Chemie International Edition*, 40(17): 3100-3116, (2001).
- [64] Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., Spedding, M. “A nomenclature for ligand-gated ion channels”, *Neuropharmacology*, 56: 2-5, (2009).
- [65] Hille, B., “Ion Channels of Excitable Membranes”, Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, 814 s., (2001).
- [66] Karlin, A. “Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors”, *Nature Rev Neuroscience*, 3(2): 102–14, (2002).
- [67] Britannica Online, “Nicotinic Acetylcholine Receptor”, <http://global.britannica.com/EBchecked/media/138258/The-nicotinic-acetylcholine-receptor-is-an-example-of-a-ligand> (04.02.2014).
- [68] Wonnacott, S. and Barik, J. “Nicotinic Ach Receptors”, *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 28: 1-20, (2007).
- [69] Gotti, C., Fornasari, D., Clementi F. “Human neuronal nicotinic receptors”, *Prog Neurobiol*, 53(2): 199-237, (1997).
- [70] Le Novere, N. and Changeux, J. P. “Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example for multigene family in excitable cells”, *J Mol Evol*, 40: 155-172, (1995).
- [71] Sargent, P. B. “The diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors”, *Annu Rev Neurosci*, 16: 403-443, (1993).
- [72] Lukas, R. J. “Diversity and patterns of regulation of nicotinic receptor subtypes”, *Ann NY Acad Sci*, 757: 153-168, (1991).
- [73] Mcgehee, D. B. and Role, L. W. “Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons”, *Annu Rev Physiol*, 57: 521-546, (1995).
- [74] Papke, R. L. “The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity”, *Prog Neurobiol*, 41: 509-531, (1993).

- [75] Sattelle, D. B. "Acetylcholine receptors of insects", *Adv Insect Physiol*, 15: 215-315, (1980).
- [76] Usherwood, P. N. R. "Insect glutamate receptors", *Adv Insect Physiol*, 24: 309-341, (1994).
- [77] Dudai, Y. "Properties of an α -bungarotoxin binding cholinergic nicotinic receptor from *Drosophila melanogaster*", *Biochem Biophys Acta*, 539: 505-517, (1978).
- [78] Liu, M-Y, Casida, J. E. "High affinity binding of [³H]imidacloprid in the insect acetylcholine receptor", *Pestic Biochem Physiol*, 40: 40-46, (1993).
- [79] Lind, R. L., Clough, M. S., Reynolds, S. E., Earley, F. G. P. "[³H]imidacloprid labels high- and low- affinity nicotinic acetylcholine receptor-like binding sites in the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)", *Pestic Biochem Physiol*, 62: 3-14, (1998).
- [80] Wiesner, P. Kayser, H. "Characterisation of nicotinic acetylcholine receptors from the insect *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoriaby* radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action", *J Biochem Mol Toxicol*, 14: 221-230, (2000).
- [81] Zhang, A., Kayser, H., Maienfisch, P., Casida, J. E. "Insect nicotinic acetylcholine receptor: conserved neonicotinoid specificity of [³H]imidacloprid binding site", *Journal of Neurochemistry*, 75: 1294-1303, (2000).
- [82] Tomizawa, M. and Casida, J. E. "Neonicotinoid insecticide toxicity: mechanisms of selective action", *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 247-268, (2005).
- [83] Nishiwaki, H., Nakagawa, Y., Kuwamura, M., Sato, K., Akamatsu, M., Matsuda, K., Komai, K., Miyagawa, H. "Corelations of the electrophysiological activity of neonicotinoids with their binding and insecticidal activities", *Pest Manag Sci*, 59: 1023-1030, (2003).
- [84] Bai, D., Lummis, S. C. R., Leicht, W., Breer H., Sattelle, D. B. "Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone", *Pesticide Science*, 33: 197-204, (1991).

- [85] Nagata, K., Iwanaga, Y., Shono, T., Narahashi, T. "Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel by imidacloprid and cartap", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59: 119-128, (1997).
- [86] Buckingham, S. D., Lapied, B., Le Corrionc, H., Grolleau, F., Sattelle, D. B. "Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors", *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2685-2692, (1997).
- [87] Courjaret, R. and Lapied, B. "Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons)", *Molecular pharmacology*, 60: 80-91, (2001).
- [88] Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R. "Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)", *Pest Management Science*, 57: 577-586, (2001).
- [89] Palmer, M. J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G. A., Connolly, C. N. "Cholinergic pesticide cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees", *Nature Communications*, 4(1634): 1-8, (2013).
- [90] Zafeiridou, G. and 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).
- [91] Ihara, M., Brown, L. A., Ishida, C., Okuda, H., Sattelle, D. B., Matsuda, K. "Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency", *J Pestic Sci*, 31(1): 35-40, (2006).
- [92] Brown, L. A., Ihara, M., Buckingham, S. D., Matsuda, K., Sattelle, D. B. "Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors", *Journal of Neurochemistry*, 99: 608-615, (2006).
- [93] Nguyen, D. T. T., Blacker, M. J., Goodchild, J. A. "Spontaneous electrical activity recorded from the aphid central nervous system", *Invert Neurosci*, 12: 139-146, (2012).

- [94] Ihara, M., Hirata, K., Ishida, C., Kagabu, S., Matsuda, K. "Blocking actions of alkylene-tethered bis-neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by terminal abdominal ganglion neurons of *Periplaneta americana*", *Neuroscience Letters*, 425: 137-140, (2007).
- [95] Mehlhorn, H., Mencke, N., Hansen, O. "Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light and electron-microscopy study", *Parasitol Res*, 85: 625-637, (1999).
- [96] Mehlhorn, H., Mencke, N., Hansen, O. "Comparative study on the effects of three insecticides (fipronil, imidacloprid, selamectin) on developmental stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouche 1835): a light and electron microscopic analysis of in vivo and in vitro experiments", *Parasitol Res*, 87:198-207, (2001).
- [97] Mehlhorn, H., D'Haese, J., Mencke, N., Hansen, O. "In vivo and in vitro effects of imidacloprid on sheep keds (*Melophagus ovinus*): a light and electronmicroscopy study", *Parasitol Res*, 87: 331-336, (2001).
- [98] Kapoor, U., Srivastava, M. K., Bhardwaj, S. Srivastava, L. P. "Effect of Imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its no observed effect level", *J Toxicol Sci*, 35(4): 577-581, (2010).
- [99] EL-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., El-Sebae, A. K. H. "The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid", *Food and Chemical Toxicology*, 48: 215-221, (2010).
- [100] Duzguner, V. and Erdogan S. "Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 13-18, (2010).
- [101] Duzguner, V. and Erdogan S. "Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver and central nervous system of rats", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104: 58-64, (2012).
- [102] Swenson, T. L. and Casida, J. E. "Aldehyde oxidase importance in vivo in xenobiotic metabolism: imidacloprid nitroreduction in mice", *Toxicological Sciences*, 133(1): 22-28, (2013).

- [103] Karabay, N. U. and Oguz, M. G. "Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos", *Genetics and Molecular Research*, 4(4): 653-662, (2005).
- [104] Demia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., Matthopoulos, D. P. "Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow", *Mutation Research*, 634: 32-39, (2007).
- [105] Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P. "Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*", *Chemosphere*, 56: 457-463, (2004).
- [106] Bal, R., Türk, G., Tuzcu, M., Yilmaz, O., Kuloglu, T., Gundogdu, R., Gür, S., Agca, A., Ulas, M., Çambay, Z., Tuzcu, Z., Gencoglu, H., Guvenc, M., Ozsahin, A. D., Kocaman, N., Aslan, A., Etem, E. "Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats", *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47: 434-444, (2012).
- [107] Kapoor, U., Srivastava, M. K., Srivastava, L. P. "Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats", *Food and Chemical Toxicology*, 49: 3086-3089, (2011).
- [108] Abou-Donia, M., Goldstein, L. B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W. A., Dechkovskaia, A. M., Abdel-Rahman, A. A. "Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71: 119-130, (2008).
- [109] Bhardwaj, S., Srivastava, M. K., Kapoor, U., Srivastava, L. P. "A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations", *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1185-1190, (2010).
- [110] Kim, J., Park, Y., Yoon, K. S., Clark, J. M., Park, Y. "Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, induces insulin resistance", *J Toxicol Sci*, 38(5): 655-660, (2013).

- [111] Park, Y., Kim, Y., Kim, J., Yoon, K. S., Clark, J., Lee, Park, Y.. "Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, potentiates adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 255-259, (2013).
- [112] Badgujar, P. C., Jain, S. K., Singh, A., Punia, J. S., Gupta, R. P., Chandratre, G. A. "Immuotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice", 35: 408-418, (2013).
- [113] Gawade, L., Dadarkar, S. S., Husain, R., Gatne, M. "A detailed study of developmental immunotoxicity of imidacloprid in Wistar rats", *Food and Chemical Toxicology*, 51: 61-70, (2013).
- [114] Nagata, K., Song, J. H., Shono, T., Narahashi T. "Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285(2): 731-738, (1998).
- [115] Li, P., Ann, J., Akk, G. "Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid", *Journal of Neuroscience Research*, 89: 1295-1301, (2011).
- [116] Bal, R., Erdogan, S., Theophilidis, G., Baydas, G., Naziroglu, M. "Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording", *NeuroToxicology*, 31: 113-120, (2010).
- [117] Seifert, J. and Stollberg, J. "Antagonism of a neonicotinoid insecticide imidacloprid at neoromuscular receptors", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 18-22, (2005).
- [118] Baran, İ., "Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri", TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Ankara, 165 s., (2008).
- [119] Demirsoy, A., "Yaşamın Temel Kuralları-Omurgalılar-Anamniyota, Cilt III, Kısım I", Meteksan A.Ş., Ankara, 684 s., (1993).
- [120] Özeti, N., Yılmaz, İ., "Türkiye Amfibileri", Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 221 s., (1994).
- [121] Ghadially, F. N., "Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, 4th ed.", Butterworth-Heinemann, Boston, 1414 s., (1997).

- [122] Özkan, F., Emre, İ. "Malathion ve dieldrin'in *Tilapia zilli* Gervais, 1848 kas ve karaciğer dokularında glikojen düzeyi üzerine etkileri", F Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 15(1): 117-121, (2003).
- [123] Sastry, K. V., Siddiqui, A., Sing, S. K. "Alteration in some Biochemical and Enzymological Parameters in Snake Head *Channa punctatus*, Exposed Chronically to Quinalphos", Chemosphere, 11: 1211-1215, (1982).
- [124] Capes, E. M., Loaiza, R., Valdivia, H. H. "Ryanodine receptors", Skeletal Muscle, 1: 1-13, (2011).
- [125] Armstrong, R. B., Warren, G. L., Warren, J. A. "Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury", Sports Med, 12: 184-207, (1991).
- [126] Morgan, D. L. and Allen, D. G. "Early events in stretch-induced muscle damage", J Appl Physiol, 87: 2007-2015, (1999).
- [127] Yeung, E. W., Balnave, C. D., Ballard, H. J., Bourreau, J. P., Allen, D. G. "Development of T-tubular vacuoles in eccentrically damaged mouse muscle fibres", J Physiol, 540: 581-592, (2002).
- [128] Byrd, S. K. "Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage", Med Sci Sports Exerc, 24: 531-536, (1992).
- [129] McCutcheon, L. J., Byrd, S. K., Hodgson, D. R. "Ultrastructural changes in skeletal muscle after fatiguing exercise", J Appl Physiol, 72: 1111-1117, (1992).

ÖZGEÇMİŐ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Dilek AKBAŞ (KUMARGAL)

Doğum Tarihi: 08/03/1983

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	YDAL/Sayısal	Hacı Sabancı Lisesi	1996-2000
Lisans	Biyoloji	Gazi Üniversitesi	2000-2004
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2004-2007
Doktora	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2008-

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006-2014

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

Makaleler

1. Dilek Akbaş, Ali Aşkın, Ülkü Çömelekoğlu "Influence of Neurotransmission in Frog Peripheral Nerve by the Neonicotinoid Insecticide, Imidacloprid : An Electrophysiological Study", Fresenius Environmental Bulletin, 23(7), (2014) (Basımda).
2. Dilek Kumargal, Ülkü Çömelekoğlu, Ali Aşkın "İyon Kanallarını Hedef Alan İnektisit Bileşikler", Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(2):7-13, (2012).

3. Dilek Kumargal, Ülkü Çömelekoğlu, Ali Aşkın “Nikotin ve Antagonisti Mecamylaminin Kurbağa (Rana ridibunda) İskelet Kası Üzerine Etkileri”, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(3):14-20, (2008).

Uluslararası Bildiriler

1. Dilek Kumargal, Ali Aşkın “Nicotine Derived Synthetic Pesticides”, International Conference on Environmental Science and Technology, 18-21 Haziran 2013, Nevşehir.
2. Dilek Kumargal, Ülkü Çömelekoğlu, Ali Aşkın “Acute Electrophysiological Effects of Low Dose Imidacloprid on Single Skeletal Muscle Fiber”, International Conference on Environmental Science and Technology, 18-21 Haziran 2013, Nevşehir.
3. Dilek Kumargal, Fatma Söğüt, Ali Aşkın, Ülkü Çömelekoğlu “Specific Mechanical Properties of Rana ridibunda Integument; A Study Depending on Species and Sex”, The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP and 21st National Biophysics Congress, 5-9 Ekim 2009, Diyarbakır, Turkey.

Ulusal Bildiriler

1. Dilek Kumargal, Ülkü Çömelekoğlu, Ali Aşkın “Chlorantraniliprol'un Kurbağa (Rana ridibunda) İskelet Kas Hücresi Dinlenim Zar Potansiyeli ve Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkisi”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, İzmir.
2. Dilek Kumargal, Ali Aşkın, Ülkü Çömelekoğlu “Nikotinin Kurbağa (Rana ridibunda) Periferik Sinirleri Üzerine Elektrofizyolojik Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Araştırılması”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, , 23-27 Haziran 2008, Trabzon.

3. Dilek Kumargal, Ali Aşkın, Ülkü Çömelekoğlu “İmidacloprid ve Alfa-Bungarotoksinin Kurbağa (Rana ridibunda) Siyatik Siniri Üzerine Elektrofizyolojik Etkilerinin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Araştırılması”, VI. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi, 16-20 Nisan 2008, Adana.