

### Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in *Rana ridibunda* kas dokusu üzerine toksik etkilerinin elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesi

Esra Pekoğlu<sup>1</sup>, Yusuf Çamlıca<sup>1</sup>, Ülkü Çömelekoğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mersin

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, neonikotinoid bir insektisit olan tiyakloprid ve antagonisti d-tubokurarin'in kurbağa gastrokinemius kası mekanik aktivite parametreleri üzerine etkilerinin doza ve uygulama süresine bağlı olarak araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** Çalışmada  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M derişimlerde tiyakloprid,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonu olmak üzere 6 deney grubu oluşturulmuştur. Tüm deney gruplarında agonist ve antagonistin etkileri eşit sayıda denek üzerinde çalışılmıştır ( $N=8$ ). Ölçümler 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikada alınmış ve 0. dakikada alınan ölçümler kontrol değeri olarak kabul edilmiştir. İskelet kası mekanik aktivitesini kayıtlamak için, BIOPAC MP 100 Acqisition sistemi kullanılmıştır ve bu kayıtlardan kasılma kuvveti, kasılma süresi ve gevşeme süresi ölçülmüştür. **Bulgular:** Elde edilen bulgularda, tiyakloprid kontrol gruplarına göre, kasılma kuvvetini %35-97, kasılma süresini %18-75, gevşeme süresini %33-71 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaltmıştır ( $p<0.05$ ). Benzer şekilde, tiyakloprid ve d-tubokurarin karışımı kontrol gruplarına göre, kasılma kuvvetini %57-94, kasılma süresini %23-59, gevşeme süresini ise %34-70 oranlarında anlamlı biçimde azaltmıştır ( $p<0.05$ ). **Sonuç:** Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in gastrokinemius kasının kasılma kuvvetini, kasılma ve gevşeme sürelerini anlamlı biçimde düşürmesi, bu insektisit ve antagonistinin çizgili kaslar üzerinde toksik etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Tiyakloprid, d-tubokurarin, gastrokinemius, kasılma kuvveti

### Electrophysiological evaluation of the toxic effects of thiacloprid and d-tubocurarine on *Rana ridibunda* muscle tissue

#### Abstract

**Aim:** In this study, we aimed to investigate the effects of thiacloprid and d-tubocurarine, a neonicotinoid insecticide and its antagonist, on the mechanical activity parameters of frog gastrocnemius muscle depending on the dose and duration. **Method:** The study was composed of six experimental groups;  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-6}$  M thiacloprid,  $1 \times 10^{-5}$  M thiacloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubocurarine and  $1 \times 10^{-6}$  M thiacloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubocurarine combination.

---

**Yazının geliş tarihi:** 25.03.2016 **Yazının kabul tarihi:** 31.05.2016

**Yazışma adresi:** Yusuf Çamlıca, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mersin. Tlf: 0324 3610001/4601, 0505 5985186, E-posta: ycamlica@mersin.edu.tr, ycamlica@yahoo.com

The agonist and antagonist effects were studied on an equal number of subjects in the experimental groups ( $N=8$ ). Measurements were taken at 0<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup> and 120<sup>th</sup> minutes and measurements taken at 0<sup>th</sup> minute were designated as the control value. Skeletal muscle mechanical activity recordings were obtained by BIOPAC MP 100 Acquisition system and contraction force, time and relaxation time were measured based on these recordings. **Result:** According to the findings, thiacloprid significantly decreased the contraction force (35-97%), time (18-75%) and the relaxation time (33-71%) ( $p<0.05$ ) as compared to the control groups. Similarly, thiacloprid and d-tubocurarine mixture comparing to the control groups significantly decreased the contraction force (57-94%), time (23-59%) and the relaxation time (34-70%) ( $p<0.05$ ). **Conclusion:** Significant reduction in contraction force, time and relaxation time of the gastrocnemius muscle after the thiacloprid and d-tubocurarine exposure suggests that that this insecticide and its antagonist may have a toxic effect on skeletal muscles.

**Keywords:** Thiacloprid, d-tubocurarine, gastrocnemius, contraction force

## Giriş

Pestisitler, çeşitli alanlarda ürün zararlılarını öldüren ya da uzaklaştıran kimyasal maddelerdir.<sup>1</sup> Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Bundan dolayı, hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülebilmektedir. Pestisitler, kontrolünü sağladıkları zararlı tipine göre fungusitler, algisitler, herbisitler, insektisitler, nematositler ve mollusitler olarak sınıflandırılırlar.<sup>2</sup>

İnsektisitler, böceklerin kontrolünde kullanılan biyolojik ya da kimyasal orjinli ajanlardır.<sup>3</sup> Bunların birçoğu nörotoksik özelliindedir ve etkilerini özellikle böceklerin sinir sistemini tahrip ederek gösterirler. İnsektisitler; klorlu hidrokarbonlular, organofosforlu bileşikler, metilkarbamatlar, piretroidler ve neonikotinoid insektisitler olmak üzere beş ana gruba ayrılırlar.<sup>4</sup> Neonikotinoid insektisitler, bitki ve hayvanlar üzerindeki zararlı böcekleri kontrol altında tutan, son yıllarda üretilmiş en önemli yeni sentetik insektisit sınıfıdır.<sup>5</sup> Tiyakloprid, neonikotinoid bileşikler sınıfına ait yeni bir pestisittir. Işığa dayanıklılığının iyi olması<sup>6,7</sup> ve omurgalılara göre böcekler üzerine yüksek seçici toksisite göstermesi bu insektisit dnyaya çapında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır.<sup>8</sup> Neonikotinoidler, hem memelilerde hem de böceklerde postsinaptik membranda nikotinik asetilkolin reseptörüne (nAChR)

bağlanırlar ve agonist olarak etki gösterirler. Neonikotinoidlerin postsinaptik nAChR'lere bağlanması, kolinerjik sinapslarda başlangıçta yanlış sinyallerin artışına, daha sonra sinir uyarılarının tamamen bloke edilmesine neden olur. Tiyakloprid, neonikotinoid teriminden de anlaşılacağı gibi, nikotine yapısal benzerliği olan ve aynı etkiyi gösteren bir bileşiktir.<sup>9</sup>

İnsan lenfositlerinde tiyakloprid'in genotoksik etkileri kromozom aberasyonu (CA), kardeş kromatid değişikliği (SCE) ve mikronukleus (MN) testi ile araştırılmış, eksojen metabolik aktivatör (S9 mix) varlığında ve yokluğunda tiyakloprid'in kromozom ve SCE'leri belirgin ölçüde artırdığı, S9 yokluğunda nükleoplazmik köprü oluşumlarını ve MN'de önemli bir artışı indüklediği, aynı zamanda S9 varlığında ve yokluğunda mitotik indeksi düşürdüğü bildirilmiştir.<sup>10</sup> Sıçanlarda tiyakloprid ve deltametrin'in sıçan serumunda tiroid hormon seviyesi üzerine etkileri ayrı ayrı ve birlikte çalışılmış (Deltametrin 15 mg/kg, tiyakloprid 112,5 mg/kg ve deltametrin + tiyakloprid [15 + 112,5 mg/kg] 24 saat akut uygulama, deltametrin 3 mg/kg, tiyakloprid 22,5 mg/kg ve deltametrin + tiyakloprid [3 + 22,5 mg/kg] 30 gün subakut uygulama), 30 gün boyunca deltametrin'in tiyakloprid ile birlikte ve yalnızca tiyakloprid uygulanan sıçanların serum hormon seviyesinde, serbest FT3 ve FT4 düzeyinde artış olduğu bildirilmiş olup, insanlarda bu insektisitlerin potansiyel sağlık risklerinin ve endokrin bozucu etkilerinin belirlenmesi gerektiği önerilmiştir.<sup>11</sup>

Pestisitlerin, hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkisi ve ekosisteme olan etkileri dünya çapında ilgilenilen bir konudur.<sup>12</sup> Kullanılan pestisitler, gün geçtikçe yaygınlaşmakta ve pestisitlerin hedef olmayan canlılar üzerindeki, potansiyel toksik risk değerlerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, su ve tarım ekosistemlerindeki hedef olmayan organizmalar üzerine olan etkileri tamamen anlaşılmış değildir.<sup>13</sup> Bundan dolayı, yeni üretilen bir insektisit olan tiyakloprid'in de hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkilerini araştıran çalışmalar henüz yetersizdir.

Bu çalışmanın amacı insan sağlığı, veterinerlik ve tarımsal verimliliği koruma gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan neonikotinoid bir insektisit olan tiyakloprid'in farklı derişimlerinin *in vitro* koşullarda, kurbağa iskelet kası üzerine etkilerinin elektrofizyolojik yöntemlerle belirlenmesidir. Ayrıca, tiyakloprid ile nAChR'leri antagonistliği etkisine sahip d-tubokurarin karışımının, analiz edilen parametreler üzerine etkisinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi de amaçlanmıştır. Bu çalışmanın, yeni üretilen bir insektisit olan tiyakloprid'in hedef olmayan *Rana ridibunda* iskelet kası üzerine etkisini ortaya çıkararak, doğal yaşama olumsuz etkisini en aza indirecek yeni uygulamaların gerçekleştirilmesine katkı sunması beklenmektedir.

## Gereç ve Yöntemler

### Deney Hayvanlarının Sağlanması

Deneylerde, ağırlıkları 50-60 g arasında değişen 48 adet *Rana ridibunda* türünden kurbağa kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları için, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 27.03.2014 tarih ve 2014/9 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır. Kurbağalara yapılan tüm işlemlerde National Institutes of Health (NIH) tarafından hazırlanan laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım rehberinde belirtilen kriterler uygulanmıştır. Kurbağalar  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,

$1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M derişimlerde tiyakloprid,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı olmak üzere her grupta 8 kurbağa olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır.

### Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde, nAChR'lerin bir agonisti olan tiyakloprid ( $C_{10}H_9ClN_4S$ ) (Calypso OD 240, Bayer) ile nAChR'lerin antagonisti d-tubokurarin ( $C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6 \cdot 5H_2O$ ) (T2379, Sigma) kullanılmıştır. Tiyakloprid ve d-tubokurarin, Ringer çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır.

### Elektrofizyolojik Kayıtlar

Spinal hale getirilen kurbağaların sağ arka bacağındaki gastrokinemius kası izole edildikten sonra izole kaslar, fizyolojik ortamın sağlanması için kullanılan Ringer çözeltisine alınmıştır. Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in zamana bağlı etkilerini belirleyebilmek için aynı kasta 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kayıtlar alınmıştır. Sıfırıncı dakika kayıtları, kaslar Ringer çözeltisi içerisindeyken alınan kayıtlar olup, her bir kas preparatının kontrol değerine karşılık gelmektedir. Kontrol ölçümü yapıldıktan sonra

1. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-3}$  M tiyakloprid,
2. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-4}$  M tiyakloprid,
3. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid,
4. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid,
5. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı ve
6. gruptaki kaslar  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı içeren çözeltilere alınmıştır.

Aynı preparattan 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kasın mekanik aktivitesi kayıtlanmıştır. Kayıt için BIOPAC MP100 Kayıt Sistemi kullanılmıştır. Kasın bir ucu tespit edilip, diğer ucu izometrik kuvvet transduserine (MAY, FDT-10) bağlanmış ve kasa 2 g ön gerim uygulanmıştır. Daha sonra, BIOPAC stimülatöre bağlı gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrotlar kullanılarak, 0.5 ms süreli ve her kas için ayrı ayrı belirlenen şiddetlerde supramaksimal pulsla kas uyarılmıştır. Kas

aktivitesi, genel amaçlı diferansiyel amplifikatörle yükseltilerek ve 16 bitlik A/D çevirici kullanılarak, daha sonra analiz edilmek üzere bilgisayara aktarılmıştır. Elde edilen kasılma eğrileri BIOPAC Acknowledge 100 W5.7 analiz programı ile analiz edilerek kasılma kuvveti (g), kasılma süresi (ms) ve gevşeme süresi (ms) ölçülmüştür.

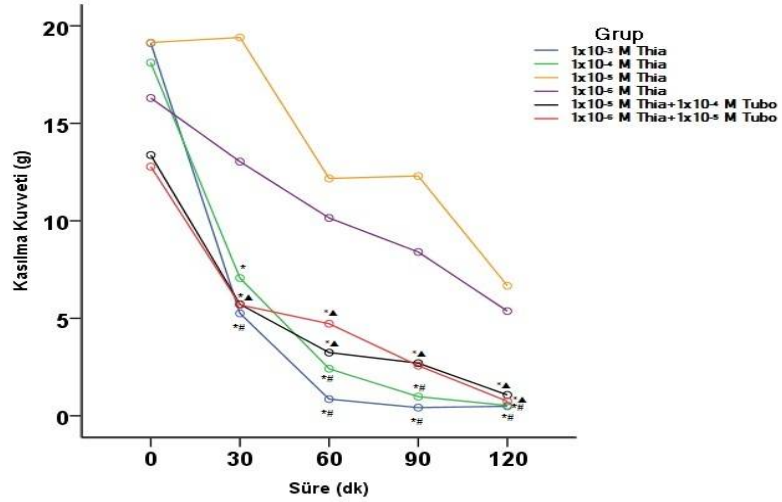
#### İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi bilgisayar ortamında yapılmıştır. Her bir gruba ait doz ve zamana bağlı farklılıklar tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ile incelenmiştir. Gruplardaki istatistiksel anlamlılık, ANOVA veya Kruskal-Wallis testleri kullanılarak belirlenmiş ve anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğu Bonferroni ve Dunn testleri uygulanarak saptanmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılık olarak  $P<0.05$  alınmıştır.

#### Bulgular

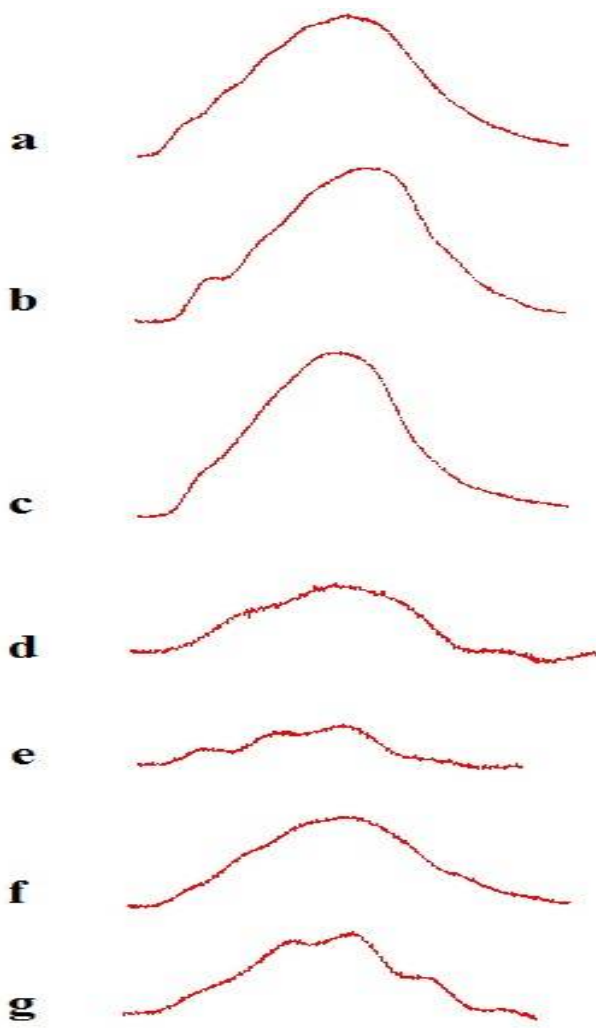
##### Tiyakloprid ve D-Tubokurarin'in Kasılma Kuvveti Üzerine Etkileri

Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in kasılma kuvveti üzerine etkileri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir.  $1 \times 10^{-3}$  M tiyakloprid *Rana ridibunda* gastrokinemius kası kasılma kuvvetini uygulama süresine bağlı olarak, kontrol değerine (0. dakika) göre 60. dakikada %95, 90. ve 120. dakikada %97,  $1 \times 10^{-4}$  M tiyakloprid 60. dakikada %86, 90. dakikada %94 ve 120. dakikada %97,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid 120. dakikada %65,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid 120. dakikada %67 oranında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır ( $P<0.05$ ).  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma kuvvetinin 30. dakikada %57, 60. dakikada %75, 90. dakikada %80 ve 120. dakikada %92,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda 30. dakikada %55, 60. dakikada %63, 90. dakikada %80 ve 120. dakikada %94 oranında anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $P<0.05$ ) (Şekil 1).

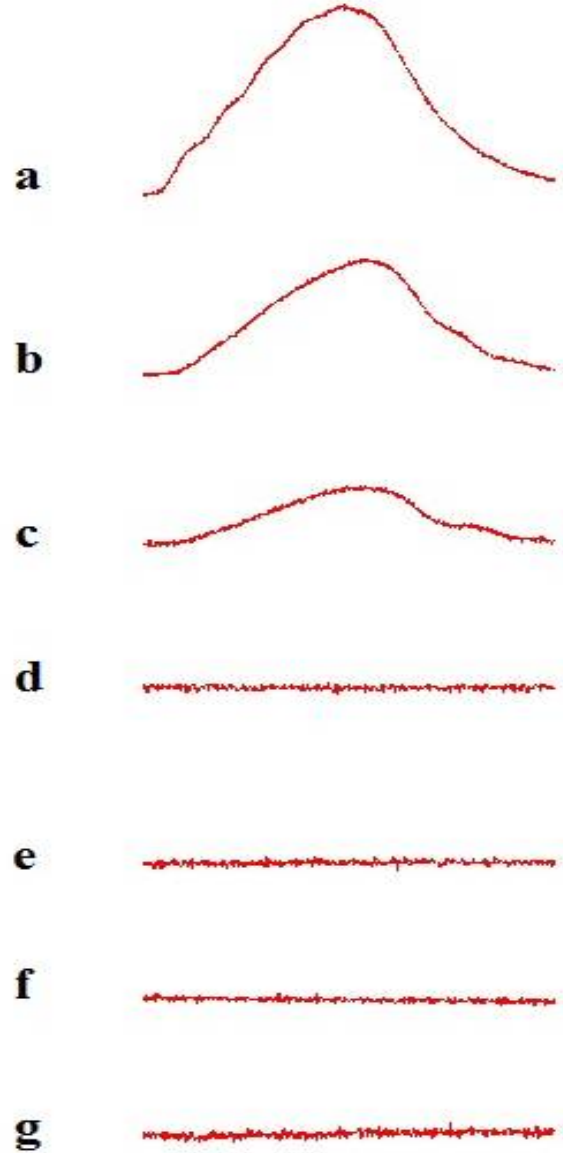


**Şekil 1.** Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in *Rana ridibunda* iskelet kası kasılma kuvveti üzerine etkileri. \*:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P<0.001$ ), #:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P<0.001$ ), ▲:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P<0.05$ ). (Thia: tiyakloprid; Tubo: d-tubokurarin).

$1 \times 10^{-3}$  M tiyakloprid, kasılma kuvvetini doza bağlı olarak,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid gruplarına göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ( $P<0.05$ ).  $1 \times 10^{-4}$  M tiyakloprid ise,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid grubuna göre kasılma kuvvetini 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda önemli biçimde azaltmıştır. Ayrıca,  $1 \times 10^{-4}$  M tiyakloprid,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubuna göre, kasılma kuvvetini 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır.  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda kasılma kuvveti,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azalmıştır ( $P<0.001$ ).  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı kasılma kuvvetini,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde azaltmıştır ( $P<0.05$ ).  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma kuvvetinin  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid grubuna göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $P<0.001$ ). Ayrıca  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubuna göre kasılma kuvvetini 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaltmıştır ( $P<0.05$ ). (Şekil 2) (Şekil 3).



**Şekil 2.** Tiyaklopid ve d-tubokurarin'in iskelet kası mekanik aktivitesi üzerine 30. dakikadaki etkileri. a: Kontrol, b:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid, c:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid, d:  $1 \times 10^{-4}$  M tiyaklopid, e:  $1 \times 10^{-3}$  M tiyaklopid, f:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı, g:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı.



**Şekil 3.** Tiyaklopid ve d-tubokurarin'in iskelet kası mekanik aktivitesi üzerine 120. dakikadaki etkileri. a: Kontrol, b:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid, c:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid, d:  $1 \times 10^{-4}$  M tiyaklopid, e:  $1 \times 10^{-3}$  M tiyaklopid, f:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı, g:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı.

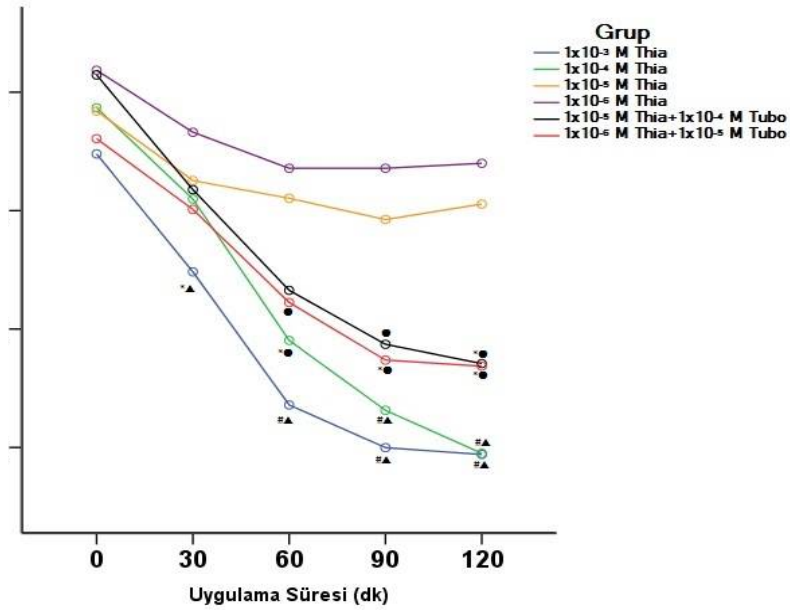
## Tiyaklopid ve D-Tubokurarin'in Kasılma Süresi Üzerine Etkileri

Tiyaklopid ve tiyaklopid ile d-tubokurarin kombinasyonlarının kurbağa gastrokinemius kası kasılma süresi üzerine doza ve zamana bağlı etkileri Şekil 4'te gösterilmiştir.  $1 \times 10^{-3}$  M tiyaklopid, kasılma süresini zamana bağlı olarak, kontrol değerine göre 60. dakikada %56, 90. dakikada %71, 120. dakikada %73,  $1 \times 10^{-4}$  M tiyaklopid 30. dakikada %20, 60. dakikada %51, 90. dakikada %66, 120. dakikada %75 oranında azaltmıştır. Diğer taraftan,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid kasılma süresini 60. dakikada %19, 120. dakikada %20,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid ise 60. ve 90. dakikada %20, 120. dakikada %19 oranında azaltmıştır.  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, kasılma süresinin 30. dakikada %23, 60. dakikada %44, 90. dakikada %55, 120. dakikada %59,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda ise, 60. dakikada %38, 90. dakikada %52, 120. dakikada %53 oranında azaldığı görülmüştür ( $P < 0.05$ ).

$1 \times 10^{-3}$  M tiyaklopid kasılma süresini doza bağlı olarak,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid gruplarına göre 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır ( $P < 0.001$ ).  $1 \times 10^{-4}$  M tiyaklopid,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid gruplarına göre kasılma süresini 60. dakikada ( $P < 0.05$ ), 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaltmıştır ( $P < 0.001$ ).  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda kasılma süresi,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid grubuna göre 120. dakikada anlamlı olarak azalmıştır.  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı kasılma süresini,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid grubuna göre, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı şekilde azaltmıştır.  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda ise, kasılma süresinin  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid gruplarına göre 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $P < 0.05$ ). (Şekil 4).

## Tiyaklopid ve D-Tubokurarin'in Gevşeme Süresi Üzerine Etkileri

Tiyaklopid ve tiyaklopid ile d-tubokurarin kombinasyonlarının kurbağa gastrokinemius kası gevşeme süresi üzerine doza ve zamana bağlı etkileri Şekil 5'te gösterilmiştir.  $1 \times 10^{-3}$  M tiyaklopid, gevşeme süresini zamana bağlı olarak, kontrol değerine göre 30. dakikada %40, 60. dakikada %62, 90. ve 120. dakikalarda %71,  $1 \times 10^{-4}$  M tiyaklopid 30. dakikada %19, 60. dakikada %56, 90. dakikada %69, 120. dakikada %70 oranında azaltmıştır.



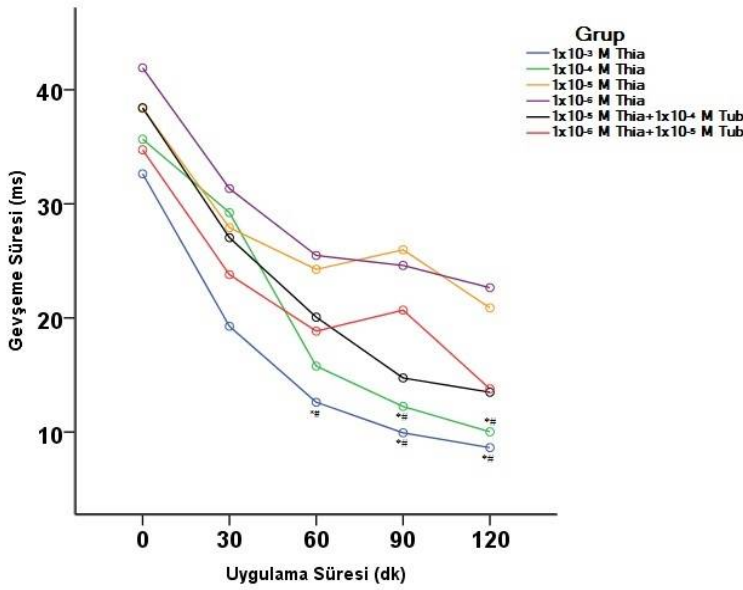
**Şekil 4.** Tiyaklopid ve d-tubokurarin'in *Rana ridibunda* iskelet kası kasılma süresi üzerine etkileri. \*:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P < 0.05$ ), #:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P < 0.001$ ), ▲:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P < 0.001$ ), ●:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P < 0.05$ ). (Thia: tiyaklopid; Tubo: d-tubokurarin).

Diğer yandan,  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid gevşeme süresini 30. dakikada %29, 60. dakikada %39, 90. dakikada %33, 120. dakikada %52,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid ise 60. dakikada %47, 90. dakikada %40, 120. dakikada ise %51 oranında azaltmıştır.  $1 \times 10^{-5}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda, gevşeme süresinin 60. dakikada %49, 90. dakikada %66, 120. dakikada %70,  $1 \times 10^{-6}$  M tiyaklopid +  $1 \times 10^{-5}$

<sup>5</sup> M d-tubokurarin kombinasyonu ile yapılan deney grubunda ise, 30. dakikada %34, 60. dakikada %49, 120. dakikada %67 oranında azaldığı gözlenmiştir ( $P<0.05$ ).

$1 \times 10^{-3}$  M tiyakloprid gevşeme süresini doza bağlı olarak,  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid gruplarına göre 60, 90 ve 120. dakikalarda anlamlı olarak azaltmıştır.  $1 \times 10^{-4}$  M tiyakloprid, gevşeme süresini  $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid gruplarına göre 90 ve 120. dakikalarda anlamlı biçimde azaltmıştır ( $P<0.05$ ).

$1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin kombinasyonları ile yapılan deney grupları, diğer gruplarla karşılaştırıldığında ise, gevşeme sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Tiyakloprid ve d-tubokurarin'in *Rana ridibunda* iskelet kası gevşeme süresi üzerine etkileri. \*:  $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P<0.05$ ), #:  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid grubu ile karşılaştırıldığında ( $P<0.05$ ). (Thia: tiyakloprid; Tubo: d-tubokurarin).

## Tartışma

Bu çalışmada, neonicotinoid bir insektisit olan tiyakloprid ve antagonisti d-tubokurarin'in *Rana ridibunda* iskelet kası (gastrokinemius kası) mekanik aktivite

parametreleri üzerine etkileri doza ve uygulama süresine bağlı olarak araştırılmıştır. Bu kapsamda, tiyakloprid'in etki mekanizmasının kas nAChR'leri üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koyabilmek için nAChR antagonisti olan d-tubokurarin kullanılmıştır. Çalışmamızda, tiyakloprid'in iskelet kasının mekanik aktivitesi üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve meydana gelebilecek herhangi bir etkinin, iskelet kaslarının kasılabilmesi için gerçekleşmesi gereken mekanizmanın hangi basamağında etkili olduğu yorumlanmaya çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre, tiyakloprid ve d-tubokurarin kasılma yanıtını etkilemiştir.  $1 \times 10^{-3}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M gibi tiyakloprid'in yüksek dozları, uygulama süresine bağlı olarak kasılma kuvveti, kasılma süresi ve gevşeme süresini hem kontrol gruplarına göre, hem de düşük doz gruplarına ( $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid) göre anlamlı biçimde azaltmıştır. Yapılan bir çalışmada, D-tubokurarin'in kasılma yanıtını inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>14</sup> Thany<sup>15</sup> yapmış olduğu bir çalışmada, neonicotinoid bir insektisit olan clothianidin, hamamböceğinin 6. ganglionunda eksprese olan sinaptik ve ekstrasinaptik nAChR'leri üzerindeki agonist etkilerini incelemiştir. Aynı araştırmacı, clothianidin'in etkilerini nikotinik antagonistlerden  $\alpha$ -bungarotoksin, mecamlamin ve d-tubokurarin ile birlikte çalışmıştır. Bu araştırmacı, clothianidin akımlarının d-tubokurarin ile bloke edildiğini ve clothianidin'in nAChR'nin alt tiplerinden olan, imidacloprid duyarlı nAChR1 ve imidacloprid duyarlı nAChR2'nin agonisti olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda da tiyakloprid ile birlikte kombinasyon halinde uygulanan d-tubokurarin ( $1 \times 10^{-5}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-4}$  M d-tubokurarin karışımı ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid +  $1 \times 10^{-5}$  M d-tubokurarin karışımı) kasılma yanıtını, tiyakloprid'in tek başına uygulandığı gruplara göre ( $1 \times 10^{-5}$  ve  $1 \times 10^{-6}$  M tiyakloprid) inhibe etmiştir. Tiyakloprid ile birlikte d-tubokurarin uygulamasının, tiyakloprid'in tek başına düşük doz gruplarında kasılma kuvveti ve kasılma süresi gibi mekanik aktivite parametreleri üzerinde artışa yol açtığı etkiyi inhibe ettiği gözlenmiştir.

Akbaş yaptığı bir çalışmada  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlardaki imidacloprid'in kurbağa iskelet kas hücrelerinin dinlenme membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli genliği, süresi ve latansı üzerine etkilerini incelemiştir. Bu araştırmacı,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M imidacloprid'in iskelet kası dinlenme membran potansiyeli ve tekil aksiyon potansiyeli genliğini istatistiksel olarak arttırdığını gözlemiştir. Aynı araştırmacı,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  M imidacloprid'in latansı anlamlı biçimde azalttığını, d-tubokurarin uygulamasının ise, imidacloprid'in bu parametreler üzerinde meydana getirdiği etkileri ortadan kaldırdığını tespit etmiştir.<sup>16</sup> D-tubokurarin'in inhibe edici etkisi, asetilkolinin (ACh) yarışmalı inhibitörü olmasından kaynaklanmaktadır.<sup>17</sup> Bu nedenle, tiyakloprid'in etkisinin nAChR üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya çıkarma olanağı olmamıştır. Çalışmamızda uygulanan d-tubokurarin dozları, tiyakloprid'in kasılma yanıtları üzerindeki azaltıcı etkilerini düzeltmek için yeterli olmamış olabilir. Bu nedenle tiyakloprid'in nAChR'leri üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı dozlarda tiyakloprid ile d-tubokurarin kombinasyonları uygulanabilir. Tiyakloprid'in toksik etkisi, nikotinik kolinerjik sinir sisteminde sinaptik iletimde görülmektedir. Tiyakloprid, böceklerin merkezi sinir sisteminin  $\alpha_4\beta_2$  nAChR için spesifiktir. Tiyakloprid, böcek ve omurgalıların kas sinir kavşağında nAChR'ye bağlanır. nAChR, uyarıcı ACh nörotransmitterinin endojen agonisti olan bir iyon kanalıdır. Reseptör normalde kapalı durumda olup, ancak üzerine ACh bağlanınca kompleksin poru açılır ve kanal katyonlara geçirgen hale gelir. ACh daha sonra hızla asetilkolin esteraz (AChE) enzimi ile yıkılır. nAChR'ye bağlanan tiyakloprid ise, oldukça yavaş inaktif hale gelir ve böylece tiyakloprid nAChR'nin aktivasyon süresini uzatır. nAChR'nin uzun süre aktive olması reseptörün duyarsızlaşması ve bloke olmasına neden olurken, sonuçta paraliz ve ölüm meydana gelir.<sup>18,19</sup>

Yapılan analizler sonucunda, yüksek dozlardaki tiyakloprid ( $1 \times 10^{-3}$  ve  $1 \times 10^{-4}$  M) uygulamasının 30. dakikasında, kasılma kuvvetinde herhangi bir değişiklik görülmezken 60, 90 ve 120. dakikalarda kasılma kuvvetinde kontrole göre önemli bir azalma gözlenmiştir. İlk 30. dakikada kasılma kuvvetinde önemli bir azalma olmaması tiyakloprid'in ACh benzeri etkisi ile kas liflerinde depolarizasyona yol açması ve kasın normal kasılma fonksiyonunu yerine getirmesine neden olmasındandır. Uygulamadan 60, 90 ve 120 dakika sonra yapılan ölçümlerde ise, kasılma kuvvetinin azalması, kas lifi membranında bulunan nAChR'lerin inaktif hale gelmesi ya da reseptör yapımının azalmasıyla ilişkili olabilir. Aktif reseptör sayısının azalması, hedef dokunun kimyasal maddeye karşı duyarlılığını azaltır.<sup>20</sup> Kasın kasılma yanıtındaki azalmanın bir başka mekanizması, kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) ile ilişkili olabilir. Kasılmada,  $Ca^{+2}$  önemli bir role sahiptir. Sarkoplazmik retikulumdan (SR) salınan  $Ca^{+2}$ , aktin ve miyozin arasındaki etkileşimi başlatır. Tiyakloprid'in kas liflerinde oluşturduğu sürekli depolarizasyon, SR'den  $Ca^{+2}$  serbestleme mekanizmasını bozmuş ve bu da kasılma kuvvetinde azalmaya yol açmış olabilir. Mullin ve arkadaşları<sup>21</sup> tiyakloprid'in, neonikotinoid sınıfındaki diğer insektisitlerden 150 kat daha fazla toksik etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Vehovszky ve arkadaşları<sup>22</sup> yaptıkları bir çalışmada, bir yumuşakça olan *Lymnaea stagnalis*'in merkezi sinir sisteminde bulunan VD4 ve RPeD1 nöronları üzerine neonikotinoid insektisitlerden 0.01 mg/mL tiyakloprid ve 0.1 mg/mL thiamethoxam uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, tiyakloprid'in eksitator postsinaptik potansiyelleri %90 bloke ettiği, thiamethoxam'ın ise sinaptik yanıtları %15 azalttığı görülmüştür. Kumargal ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, kurbağa gastrokinemius kası üzerine  $10^{-4}$  M nikotin,  $10^{-4}$  M mecamlamin ve  $10^{-4}$  M nikotin +  $10^{-4}$  M mecamlamin karışımı uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, nikotin ve mecamlamin'in ayrı ayrı uygulandığı deney gruplarında, her iki maddenin kasılma kuvvetini kontrole göre uygulamanın 120. dakikasında sırasıyla



%48 ve %81 oranında azalttığı görülmüştür.<sup>23</sup> Salahdeen ve Fagbohun<sup>24</sup> Afrika kara kurbağası *Bufo regularis* türünün siyatik sinir-gastrokinemius kas preparatı üzerinde yaptıkları bir çalışmada, maksimum kasılma kuvvetinin 0.8 mg/mL nikotin dozunda kontrol grubuna göre arttığını, 10-14 mg/mL nikotin dozlarında ise azaldığını göstermişlerdir. Piretroid insektisitlerden permetrin ve sipermetrinin, kurbağa iskelet kası potasyum kanalları üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaya göre, her iki piretroid insektisit için hiperpolarizasyon genliğinde ilk 15 dakika ortaya çıkan ve sonraki 45 dakikada etkisini sürdüren daha negatif yönde bir artış olduğu bulunmuştur.<sup>25</sup>

Sonuç olarak, tiyakloprid ve d-tubokurarın'ın gastrokinemius kasının kasılma yanıtını inhibe etmesi, bu insektisit ve antagonistinin çizgili kaslar üzerine toksik etki meydana getirdiğini göstermektedir.

## Teşekkür

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerindeki katkılarından dolayı, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.D. Öğr. Gör. Çağatay Han TÜRKSEVEN'e teşekkür ederiz. Bu çalışma, BAP-FBE BB (EP) 2014-2 YL koduyla Mersin Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Bu çalışma, 12.02.2016 tarihinde kabul edilen "Thiacloprid ve D-Tubocurarine'nin *Rana ridibunda* İskelet Kası Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli tez çalışmasından hazırlanmıştır.

## Kaynaklar

1. Vural N. Çevremizde ve endüstride bulunan önemli toksik maddeler, Toksikoloji, 2. baskı, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi, 2005:344.
2. Stenersen J. Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology, Florida, CRC Press, 2004:276.
3. Ware GW, Whitacre DM. An Introduction to Insecticides, The Pesticide Book, 6<sup>th</sup> ed, Willoughby, Ohio, Meister Media Worldwide, 2004:488.

4. Lu FC, Kacew S. Basic Toxicology, 3<sup>th</sup> ed, Washington, Taylor&Francis Press, 1996:358.
5. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 2003;48:339-364.
6. Mullins JW. Imidacloprid: a new nitroguanidine insecticide. American Chemical Society Symposium Series 1993;524:183-198.
7. Kagabu S, Medej S. Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions and to oxygen. *Biosci Biotech and Bioch* 1995;59(6):980-985.
8. Nauen R. Behaviour modifying effects of low systemic concentrations of imidacloprid on *Myzus persicae* with special reference to an antifeeding response. *Pest Sci* 1995;44(2):145-153.
9. Tomizawa W, Yamamoto I. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. *J Pestic Sci* 1993;18(1):91-98.
10. Kocaman AY, Rencüzoğulları E, Topaktaş M. In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol* 2012;29(6):631-41.
11. Şekeroğlu V, Şekeroğlu ZA, Demirhan E. Effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on thyroid hormone levels in rat serum. *Toxicol Ind Health* 2014;30(1):40-46.
12. Pimentel D, Greiner A, Bashore T. Economic and Environmental Costs of Pesticide Use. J. Rose (ed), Environmental Toxicology: Current Developments, Gordon and Breach Science Publisher, London, UK, 1998:121-187.
13. Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian *Rana* N. Hallowell. *Chemosphere* 2004;56:457-463.

14. Shima T, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Sano Y, Shimizu Y. Does the capsaicin-sensitive local neural circuit constitutively regulate vagally evoked esophageal striated muscle contraction in rats? *J Physiol Sci* 2015;66(2):105-111.
15. Thany SH. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 2009;30:1045-1052.
16. Akbaş D. Neonikotinoid insektisitlerden imidacloprid'in kurbağa (*Rana ridibunda*) iskelet kası üzerine elektrofizyolojik ve histolojik etkilerinin araştırılması. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 2014, 109 s.
17. Jonsson FM, Dabrowski M, Eriksson LI. Pharmacological characteristics of the inhibition of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at human adult muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Anesthesiology* 2009;110:1244-1252.
18. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:573-580.
19. Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69(8):1442-1452.
20. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. (Çev: Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ.) Onbirinci Basım, Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007;87-89.
21. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *Plos One* 2010;5(3):e9754.
22. Vehovszky A, Farkas A, Ács A, Stoliar O, Székács A, Mörtl M, Györi J. Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquat Toxicol* 2015;167:172-179.
23. Kumargal D, Çömelekoğlu Ü, Aşkın A. Nikotin ve antagonisti mecamlaminin kurbağa (*Rana ridibunda*) iskelet kası üzerine etkileri. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2008;1(3):14-20.
24. Salahdeen HM, Fagbohun TR. Effects of cow urine concoction and nicotine on the nerve-muscle preparation in common African toad *Bufo regularis*. *Biomed Res* 2005;16(3):205-211.
25. Söğüt F, Çömelekoğlu Ü. Piretroid insektisitlerin kurbağa iskelet kası potasyum kanalları üzerine etkisi. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2013;6(2):9-15.