

**Araştırma Makalesi**

## **Piretroid İnsektisitlerin Kurbağa İskelet Kası Potasyum Kanalları Üzerine Etkisi**

### **Influence of Pyrethroid Insecticides on the Potassium Channels of Frog Skeletal Muscle**

**Fatma SÖĞÜT<sup>1</sup>, Ülkü ÇÖMELEKOĞLU<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

#### **Özet**

**Amaç:** Piretroid insektisitler, tarım alanlarında zararlılarla mücadele amacıyla oldukça yaygın kullanılmakta ve hedef organizmalar kadar hedef olmayan canlıları da etkilemektedir. Bu çalışmada Mersin ili tarım alanlarında kullanılan iki tip piretroid insektisit (permetrin, sipermetrin) kurbağa iskelet kası potasyum kanalları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmada *Rana ridibunda* türünde kurbağaların sartorius kası kullanılmıştır. Uygulama grupları her iki insektisit için de  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M'lık konsantrasyon değerlerine göre belirlenmiştir. İntrasellüler olarak mikroelektrot yöntemiyle membran potansiyelleri ve ekstrasellüler olarak aksiyon potansiyelleri kayıtları alınmıştır. Aksiyon potansiyeli kayıtlarında aksiyon potansiyelinin süresi, repolarizasyon süresi ve hiperpolarizasyon genliği ölçülmüştür. Kayıtlar 0. dakika (kontrol), 15. dakika, 30. dakika 45. dakika ve 60. dakika alınarak zamana bağlı etkiler de incelenmiştir.

**Bulgular:** Yapılan istatistiksel analiz sonucunda doza ve süreye bağlı olarak permetrin ve sipermetrinin aksiyon potansiyelinin toplam süresi üzerine önemli bir etkisi bulunmamıştır. Ancak her iki piretroid insektisit için hiperpolarizasyon genliğinde ilk 15 dakikada ortaya çıkan ve sonraki 45 dakikada etkisini sürdüren daha negatif yönde bir artış olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Membran potansiyeli ölçümlerinde ise istatistiksel olarak her iki piretroid insektisit de sadece  $10^{-3}$  M grubunda zamana bağlı anlamlı bir etki oluştururken, 15., 30., 45. ve 60. dakika ölçümlerinde ise doza bağlı etkiler oluşturmuşlardır ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Elde edilen bulguların değerlendirilmesiyle, çalışmamızda kullanılan iki piretroid türevi insektisit potasyum kanalları üzerinde hem doza hem de zamana bağlı olarak etki göstererek hücrenin elektrofizyolojik parametrelerini değiştirdikleri sonucuna varılmıştır. Permetrin ve sipermetrin arasında etki bakımından fark olmadığı saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** aksiyon potansiyeli; membran potansiyeli; permetrin; potasyum kanalı; sipermetrin

*Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2013;6(2):9-15*

Geliş Tarihi : 07.12.2013

Kabul tarihi : 13.02.2014

Yazışma adresi : Arş.Gör.Fatma SÖĞÜT, Mersin Üniversitesi  
Çiflikköy Kampüsü, Tıp Fakültesi Biyofizik  
Anabilim Dalı, Mersin

Tel : 0324 3610684-1108

Faks : 0324 3412400

E-posta : fatmasogut@gmail.com, ucomelek@yahoo.com

#### **Abstract**

**Aim:** Pyrethroid insecticides are widely used to control the pests in agricultural areas and influence both target and non-target organisms. The aim of this study is to investigate the effects of two pyrethroid insecticides (permethrin, cypermethrin), that are widely used for the agricultural areas in Mersin, on potassium channel of frog skeletal muscle.

**Method:** The sartorius muscle of *Rana ridibunda* frogs were used in the study. Groups were composed at three different concentrations ( $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M) for both permethrin and cypermethrin (n=8). Membrane potentials were recorded intracellularly and action potentials were recorded extracellularly. The recordings of action potentials were analyzed with respect to duration, repolarization times and hyperpolarization amplitudes. Time dependent profile of data was investigated at predetermined time intervals (i.e. 0<sup>th</sup> (control), 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes) of recording.

**Results:** Statistical analyses have shown that both two insecticides had no effect on the duration and repolarization time of action potential depending on the dose and time. But hyperpolarization amplitudes shifted towards to negative values within the first 15<sup>th</sup> minutes and then, continued through the next 45<sup>th</sup> minutes ( $p<0.05$ ). Both insecticides had significant time-dependent effect on membrane potentials only in the group treated at the concentration level of  $10^{-3}$  M whereas their influence was dose-dependent at the 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Based on data interpretation, it can be concluded that both pyrethroid derivative insecticides used in this study alters cellular electrophysiological parameters by influencing potassium channels with both dose and time dependent manner. No difference was found between permethrin and cypermethrin with this respect.

**Keywords:** action potential; membran potential; permethrin; potassium channel; cypermethrin

\*25.06.2007 tarihinde kabul edilen "Pyrethroid İnsektisitlerin İskelet Kası Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkileri" tezinden hazırlanmıştır.

\*Çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından "BAP-SBE TTB (FS) 2005-3 YL" numaralı proje olarak desteklenmiştir.

\*2010 yılında Aydın'da yapılan 22. Ulusal Biyofizik Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

## Giriş

İyon kanalları, hücre zarlarından iyonların geçişinde rol oynayan integral zar proteinleridir. Sodyum ( $\text{Na}^+$ ), potasyum ( $\text{K}^+$ ), kalsiyum ( $\text{Ca}^{++}$ ) ve klor ( $\text{Cl}^-$ ) gibi iyonlar, zar potansiyelinin sürdürülmesinde, hücre sinyallerinin regülasyonunda ve hücrenin birçok işlevinin yerine getirilmesinde önemli rol oynarlar. Bu iyonların hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonlarının değişmesi hücrede birçok patolojik olayın ortaya çıkmasına neden olur. Hücre içi ve dışında iyon konsantrasyonu düzeylerinin sabit tutulmasında iyon kanalları ve aktif pompaların önemi büyüktür (1). İyon kanalları açılma kinetiklerine ve aktivasyon biçimlerine göre sınıflandırılırlar. İyon kanallarında aktivasyon voltaj değişimleri, bir ligandın bağlanmasıyla, siklik nükleotidler gibi intrasellüler ikinci haberci sistemleriyle, germe ve basınç değişikliğiyle gerçekleşebilir (2). Dinlenme kanalları olarak da isimlendirilen sızıntı kanalları ise sürekli açıktır.

Piretrinler; *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisi ve alt türlerinden elde edilen esterlerdir. Doğal piretrinler yüksek toksik etkiye sahiptirler, ultraviyole ışığı, gün ışığı, asit ve bazlar tarafından kolaylıkla bozulurlar. Bu doğal formların yerini 1945'li yıllardan sonra daha ucuza mal olan ve daha kararlı organik klorlu, organik fosforlu ve karbamatlı insektisitler almıştır. Ancak 1970'lerden itibaren organik klorlu, organik fosforlu ve karbamatlı insektisitlerin, hedef canlılar dışında memeliler, kuşlar ve balıklara da zarar vermeleri nedeniyle piretrinler yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Doğal piretrinlerin yapılarının kolayca bozulması ve maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle, doğal formların yapısında bulunan karbon, hidrojen ve oksijen moleküllerine azot, sülfür ve halojen grupları eklenerek etkileri ve stabiliteyi artırılmış ve sentetik piretrinler elde edilmiştir. Bu sentetik piretrinlerin türevlerine piretroidler adı verilmektedir (3,4). Memeliler için toksik etkilerinin az olması nedeniyle piretroid insektisitler tarımda, veterinerlikte ve halk sağlığında yaygın olarak kullanılmaktadır (3,5). Piretroidler iki büyük gruba ayrılarak incelenebilir (6,7). Tip I piretroidler (alletrin, permetrin, piretrin)  $\alpha$ -siyano grubu içermeyen piretroid esterleridir. Tip II piretroidler (deltametrin, sipermetrin) ise  $\alpha$  siyano grubu içerirler. Tip I piretroidler canlılarda hareketsiz kalma, koordinasyon bozukluğu, aşırı yorgunluk, felç olma, agresif davranışlar ve tüm vücutta tremora yol açarlar (4,8,9). Tip II piretroidler ise hiperaktivite, tükürük salgısında artma, kontrolsüz davranışlar, kasılma ve titreme nöbetlerine yol açarlar (8,9).

Piretroid insektisitler etkilerini  $\text{Na}^+$  kanallarını etkileyerek gösterirler. Membrani depolarize ederek  $\text{Na}^+$  akımını artırırlar (10). Tip I piretroidler  $\text{Na}^+$  kanallarının milisaniyeler düzeyinde açık kalmasına neden olurken, Tip II piretroidler  $\text{Na}^+$  kanallarının saniyeler düzeyinde açık kalmasına yol açarlar (11). Piretroidlerin etkilediği

diğer bir iyon kanal türü  $\text{Ca}^{++}$  kanallarıdır. Böceklerin  $\text{Ca}^{++}$  kanalları piretroidlere memeli  $\text{Ca}^{++}$  kanallarından daha duyarlıdır. Özellikle tip II piretroidler N tipi  $\text{Ca}^{++}$  kanallarını etkileyerek nörotransmitter salımında değişiklikler oluştururlar (12). Tip II esterlerinin yüksek konsantrasyonlarda memeli beyinlerindeki GABA kapılı  $\text{Cl}^-$  kanallarını da etkilediği bildirilmiştir. Sinir dokusunda voltaj duyarlı  $\text{Ca}^{++}$  bağımsız  $\text{Cl}^-$  kanalları hücre eksitabilitesini kontrol eden kanallardandır ve bunların çeşitli tipleri vardır. Piretroid esterleri bunlardan yüksek iletkenlikli klor kanal tipine duyarlıdır.  $\text{Cl}^-$  iyon akımında piretroidlerin yol açtığı azalma hücre eksitabilitesinde artışla sonuçlanır. Bu etki  $\text{Na}^+$ 'un etkisi ile sinerji gösterir. Sadece Tip II esterleri  $\text{Cl}^-$  kanallarını etkilemektedir (3,10,11-18).

Tip I ve tip II piretroidlerin  $\text{K}^+$  kanalları üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar çok sınırlıdır ve bu insektisitlerin oluşturdukları toksik etkiye  $\text{K}^+$  iyonlarının etkisi açık değildir (19). Yapılan kaynak taramasında piretroidlerin iskelet kasındaki  $\text{K}^+$  iyon geçişlerini ve buna bağlı olarak kas liflerindeki iletimi nasıl etkilediğine dair bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Mersin ili tarım alanlarında kullanılan farklı dozlardaki tip I (permetrin) ve tip II (sipermetrin) piretroid insektisitlerin iskelet kası  $\text{K}^+$  iyon geçişleri üzerine olası etkilerini biyofiziksel yöntemler kullanarak incelemeyi amaçladık.

## Gereç ve Yöntemler

Araştırmada ağırlıkları 50-60 g arasında değişen *Rana ridibunda* türünden kurbağalar kullanıldı. Kurbağalar dere suyu içeren bir akvaryuma alındı. Akvaryumdaki suyun sıcaklığı 20-24 °C'de tutuldu ve gün aşırı değiştirildi. Deneylerde 48 kurbağa kullanıldı. Kurbağalar her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele 6 gruba bölündü. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi: Grup 1:  $10^{-5}$  M permetrin; Grup 2:  $10^{-4}$  M permetrin; Grup 3:  $10^{-3}$  M permetrin; Grup 4:  $10^{-5}$  sipermetrin; Grup 5:  $10^{-4}$  M sipermetrin; Grup 6:  $10^{-3}$  M sipermetrin. Her grupta hayvanların sağ ve sol sartorius kasları izole edilerek Ringer çözeltisi ( $\text{NaCl}$ , 111.87 mM;  $\text{KCl}$ , 2.47 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 1.08 mM ve  $\text{NaHCO}_3$ , 2.38 mM (pH=7.2)) içine alındı. Sağ bacak sartorius kası dinlenme zar potansiyeli, sol bacak sartorius kası ise hücre dışı aksiyon potansiyelinin kayıtlanması için kullanıldı. Uygulanacak dozu belirlemek için ön biyofiziksel deneyler yapıldı. Ön deneylerde permetrin ve sipermetrinin  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M olmak üzere 6 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Membran potansiyeli ve aksiyon potansiyelinin kayıtlanacağı ön deneyler sonucunda çalışmada  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Tüm deneyler Ulusal Sağlık Araştırmaları Kurumu (NIH) "Laboratuar Hayvanları Bakım ve Kullanım Rehberi"ne uygun olarak yapıldı.

Piretroid insektisitlerin doza bağlı etkilerinin yanı sıra zamana bağlı etkilerini de inceleyebilmek için tüm preparatlarda insektisit uygulanmadan önce (0. dakika), insektisit uygulandıktan 15, 30, 45 ve 60 dakika sonra ölçüm yapıldı. 0. dakika ölçümleri her preparatın kendi kontrolüne karşılık geldiği için ayrıca bir kontrol grubu oluşturulmadı.

#### Hücre Dışı Kayıtlar

Permetrin ve sipermetrinin izole bileşik kas aksiyon potansiyeli üzerine etkileri hücre dışı kayıt sistemi kullanılarak incelendi. İzole sartorius kası, içerisine parafin dökülen bir petri kutusuna monte edildikten sonra elektriksel olarak uyarıldı. Kası uyarmak ve aksiyon potansiyelini kayıtlamak için Ag/AgCl elektrotlar kullanıldı. Uyarın şiddeti 0.2 V, süresi 0.5 ms olarak seçildi. Kayıtlar elektrofizyolojik kayıt sistemi (BIOPAC MP100, USA) kullanılarak yapıldı. Aksiyon potansiyelleri amplifikatörde (BIOPAC, ERS100, USA) yükseltildikten sonra 16 bitlik bir analog/dijital çevirici aracılığıyla daha sonra analiz edilmek üzere bilgisayara aktarıldı. Örneklemme hızı 15.000 örnek/saniye olarak belirlendi.

#### Hücre İçi Kayıtlar

Hücre içi kayıt sistemiyle izole kaslarda, permetrin ve sipermetrinin farklı konsantrasyonları için cam mikroelektrotlar kullanılarak dinlenme zar potansiyelleri ölçüldü. Dış çapı 1.5 mm olan filamentli cam pipetler (World Precision Instruments, GLASS THINW W/FILL 1,5 MM 4 IN, USA) yatay mikroelektrot çekici (World Precision Instruments, PUL 1, USA) ile çekilerek hazırlandı. Mikropipetlerin içi 3 M KCl çözeltisi ile dolduruldu. Pipet direnci 5-10 Mohm olarak ölçüldü. Pipet direncini ve dinlenme membran potansiyelini ölçmek için MultiClamp 700 B bilgisayar kontrollü mikroelektrot amplifikatörü (Axon Instruments, Inc, USA) kullanıldı. Mikroelektrotlar mikromanüplatör yardımıyla kasın içine doğru ilerletildi ve banyo ortamına konan bir agar referans elektrotu aracılığıyla dinlenme membran potansiyeli ölçüldü (Şekil 1).

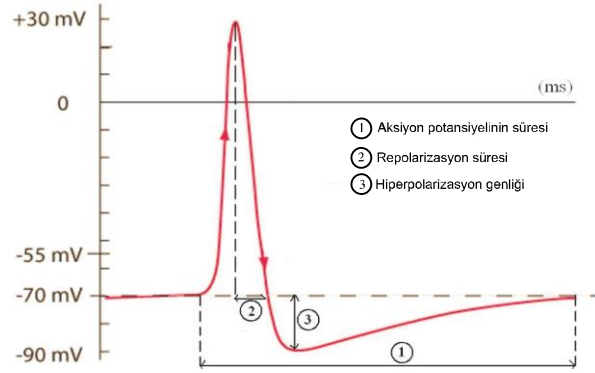


Şekil 1. Hücre içi kayıt sistemi.

#### Analiz

Hücre dışı kayıt yöntemiyle kaydedilen bileşik kas aksiyon potansiyelleri BIOPAC Acknowledge Analysis Software (ACK 100 W 5.7 version, USA) kullanılarak analiz edildi. Bu kayıtlardan  $K^+$  iyon geçişleri ile ilgili ipuçları veren aksiyon potansiyelinin süresi (ms), repolarizasyon süresi (ms) ve hiperpolarizasyon genliği (mV) değişkenleri ölçüldü (Şekil 2).

Dinlenme zar potansiyeli hücre içi kayıt tekniği ile ölçüldü. Permetrin ve sipermetrinin etkilerinin konsantrasyona, zamana ve piretroid türüne göre değişip değişmediği istatistiksel analiz yapılarak saptandı. Permetrin ve sipermetrinin zamana ve doza bağlı etkileri (grup içi) her bir doz grubu için tekrarlanan ölçümlü varyans analizi kullanılarak belirlendi. Gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için ise tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey testinden yararlanıldı. İstatistiksel anlamlılığın sınırı  $p < 0.05$  olarak belirlendi.



Şekil 2. Aksiyon potansiyelinde ölçülen değişkenler.

## Bulgular

#### Sipermetrinin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Doza ve Zamana Bağlı Etkileri

Sipermetrinin aksiyon potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo 1'den görüldüğü gibi sipermetrinin, tüm dozlarda aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresi üzerine uygulama süresine bağlı olarak önemli bir etkisi bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Ancak dinlenme membran potansiyeli altında kalan genliği temsil eden hiperpolarizasyon genliği  $10^{-3}$  M sipermetrin,  $10^{-4}$  M sipermetrin ve  $10^{-5}$  M sipermetrin gruplarında uygulama zamanına bağlı olarak daha negatif değerlere kaymıştır. İnsektisit, hiperpolarizasyon genliği üzerine etkisini uygulamadan 15 dakika sonra göstermeye başlamış ve bu etki toplam ölçüm süresi olan 60 dakika boyunca devam etmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-5}$  M sipermetrin konsantrasyonu için 15, 30, 45 ve 60. dakikadaki hiperpolarizasyon genlik değerleri ile kontrol genlik değeri (0. dk) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sipermetrinin doza bağlı etkisi

incelendiğinde aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresi üzerine önemli bir etki olmadığı ( $p>0.05$ ) saptanmıştır. Hiperpolarizasyon genlik değeri üzerine doza bağlı etkileri incelendiğinde uygulamanın ilk 45 dakikasında ölçülen değişkenler açısından doza bağlı istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ( $p>0.05$ ) ancak 60. dakika ölçümlerinde dozlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu ( $p<0.05$ ) saptanmıştır.

#### *Sipermetrinin Dinlenme Membran Potansiyeli Üzerine Zamana ve Doza Bağlı Etkileri*

Sipermetrinin zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileri ile ilgili bulgular Tablo 1'de gösterilmiştir. Sipermetrin uygulanması kurbağa iskelet kası dinlenme membran potansiyelini sadece  $10^{-3}$  M sipermetrin grubunda zamana bağlı olarak etkilemiştir. 0. dk ölçümleriyle karşılaştırıldığında  $10^{-3}$  M sipermetrin grubunda insektisit uygulanması 15. dakikadan itibaren

**Tablo 1.** Farklı dozlardaki sipermetrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, hiperpolarizasyon genliği ve dinlenme zar potansiyeli üzerine zamana bağlı değişimini gösteren değerler.

Doz	Değişken	0. (kontrol)	15. dk	30. dk	45. dk	60. dk
$10^{-5}$ M	Toplam süre (ms)	6.35±0.51	6.18±0.15	6.21±0.65	6.11±0.26	6.23±0.14
	Repolarizasyon süresi (ms)	1.75±0.11	1.68±0.48	1.73±0.22	1.71±0.47	1.67±0.66
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-1.5±0.19	-2.84±0.46*	-2.90±0.43*	-3.05±0.49*	-3.47±0.36*
	Dinlenme zar potansiyeli	-51.78±3.77	-51.61±3.08 <sup>+</sup>	-51.28±13.17 <sup>+</sup>	-51.25±2.97 <sup>+</sup>	-51.80±3.43 <sup>+</sup>
$10^{-4}$ M	Toplam süre (ms)	5.91±0.21	6.15±0.75	6.13±0.47	6.06±0.39	6.14±0.45
	Repolarizasyon süresi (ms)	1.70±0.13	1.74±0.19	1.74±0.19	1.74±0.17	1.76±0.22
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-1.83±0.37	-2.71±0.28*	-2.84±0.41*	-2.72±0.2*	-2.90±0.44*
	Dinlenme zar potansiyeli (mV)	-52.23±4.02	-49.98±5.30 <sup>+</sup>	-51.67±7.10 <sup>+</sup>	-49.92±5.11 <sup>+</sup>	-50.63±4.67 <sup>+</sup>
$10^{-3}$ M	Toplam süre (ms)	6.22±0.14	6.30±0.86	6.20±0.63	6.18±0.41	6.16±0.32
	Repolarizasyon süresi (ms)	1.66±0.53	1.60±0.04	1.65±0.061	1.66±0.72	1.66±0.65
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-1.96±0.68	-2.95±0.13*	-2.92±0.1*	-2.95±0.18*	-3.05±0.19*
	Dinlenme zar potansiyeli (mV)	-54.51±3.77	-75.84±7.92*	-76.25±7.81*	-76.04±7.59*	-75.70±7.52*

dinlenme zar potansiyelinde etkisini göstermiş, zar hiperpolarize olmuştur. Benzer etki 30, 45 ve 60. dakikalarda da gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu etkinin ölçüm yapılan tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Ancak sipermetrinin 15 dakika ya da 60 dakika uygulanması arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Diğer doz gruplarında uygulama zamanına bağlı olarak dinlenme zar potansiyelinde kontrol değerlerine göre önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Sipermetrinin dinlenme zar potansiyeli üzerine doza bağlı etkileri incelendiğinde 0. dakikada dinlenme potansiyelleri arasında fark olmadığı ancak 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda dinlenme potansiyelleri açısından gruplar arasında önemli fark olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). 0. dakika dışında ölçüm yapılan her zaman diliminde zar potansiyeli  $10^{-4}$  M sipermetrin ve  $10^{-5}$  M sipermetrin gruplarında  $10^{-3}$  M sipermetrin grubuna göre önemli miktarda daha pozitif bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

#### *Permetrinin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Zamana ve Doza Bağlı Etkileri*

Permetrinin aksiyon potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular Tablo 2'de gösterilmiştir. Permetrinin incelenen tüm dozlarda aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisi

bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak dinlenme potansiyeli altında kalan genliği temsil eden hiperpolarizasyon genliği değerleri  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-5}$  M permetrin gruplarında insektisit uygulama zamanına bağlı olarak daha negatif değerlere kaymıştır. İnsektisit, hiperpolarizasyon genliği üzerine etkisini uygulamadan 15 dakika sonra göstermeye başlamış ve bu etki toplam ölçüm süresi olan 60 dakika boyunca devam etmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda her üç grup için 15, 30, 45 ve 60. dakikadaki hiperpolarizasyon genlik değerleri ile kontrol değeri (0. dk) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Permetrinin aksiyon potansiyelinin toplam süresi, repolarizasyon süresi ve hiperpolarizasyon genliği üzerine doza bağlı olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $p>0.05$ ) saptanmıştır.

#### *Permetrinin Dinlenme Zar Potansiyeli Üzerine Zamana ve Doza Bağlı Etkileri*

Permetrinin dinlenme zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular Tablo 2'de gösterilmiştir. Permetrin uygulanması kurbağa iskelet kası dinlenme zar potansiyelinde sadece  $10^{-3}$  M permetrin grubunda zamana bağlı etkilere yol açmıştır. 0. dk ölçümleriyle karşılaştırıldığında  $10^{-3}$  M permetrin grubunda insektisit 15. dakikadan itibaren dinlenme zar potansiyelinde etkisini göstermiş, zar hiperpolarize olmuştur. Benzer etki 30, 45 ve 60. dakikalarda da gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu

**Tablo 2.** Farklı dozlardaki permetrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, hiperpolarizasyon genliği ve dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana bağlı değişimini gösteren değerler

Doz	Değişken	0. (kontrol)	15. dk	30. dk	45. dk	60. dk
$10^{-5}$ M	Toplam süre (ms)	7.15±1.22	6.94±0.92	6.81±0.79	7.1±1.12	6.96±0.86
	Repolarizasyon süresi (ms)	2.05±0.12	1.97±0.65	1.97±0.66	1.95±0.10	1.98±0.07
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-1.23±0.44	-2.75±0.63*	-2.74±0.46*	-2.92±0.45*	-3.16±0.81*
	Dinlenim zar potansiyeli (mV)	-53.04±2.47	-52.95±3.85 <sup>+</sup>	-52.41±4.17 <sup>+</sup>	-52.01±3.85 <sup>+</sup>	-52.07±4.34 <sup>+</sup>
$10^{-4}$ M	Toplam süre (ms)	6.90±0.62	6.93±0.89	6.84±0.90	7±0.80	6.90±0.79
	Repolarizasyon süresi (ms)	1.88±0.31	1.90±0.26	1.91±0.25	1.86±0.24	1.89±0.22
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-1.61±0.44	-2.77±0.48*	-3.01±0.59*	-2.81±0.55*	-2.85±0.37*
	Dinlenim zar potansiyeli (mV)	-52.90±3.451	-51.01±4.18 <sup>+</sup>	-50.81±3.75 <sup>+</sup>	-50.77±3.62 <sup>+</sup>	-51.47±4.13 <sup>+</sup>
$10^{-3}$ M	Toplam süre (ms)	7.68±0.84	7.45±0.69	7.32±0.67	7.57±0.72	7.38±0.82
	Repolarizasyon süresi (ms)	1.91±0.26	1.84±0.20	1.86±0.17	1.84±0.19	1.85±0.19
	Hiperpolarizasyon genliği (mV)	-2.11±0.59	-2.92±0.10*	-2.95±0.11*	-2.91±0.13*	-3.08±0.07*
	Dinlenim zar potansiyeli (mV)	-55.10±4.74	-64.46±3.48 <sup>+</sup>	-65.78±3.91 <sup>+</sup>	-64.70±3.24 <sup>+</sup>	-65.10±3.60 <sup>+</sup>

\*  $p < 0.05$ , Karşılaştırmalar zamana bağlı olarak, 0. dk'ya göre yapılmıştır.

<sup>+</sup>  $p < 0.05$ , Karşılaştırmalar doza bağlı olarak,  $10^{-3}$  M permetrin grubuna göre yapılmıştır.

etkinin ölçüm yapılan tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Ancak permetrinin 15 dakika ya da 60 dakika uygulanması arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Diğer doz gruplarında zamana bağlı olarak dinlenim zar potansiyelinde kontrol değerlerine göre önemli bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Permetrinin dinlenim zar potansiyeli üzerine doza bağlı etkileri incelendiğinde 15, 30, 45 ve 60 dakikalarda  $10^{-5}$  M permetrin ve  $10^{-4}$  M permetrin gruplarında dinlenim membran potansiyellerinin  $10^{-3}$  M permetrin grubundan önemli oranda farklı olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

## Tartışma

Bu çalışmada Mersin ve çevresi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan ve piretroid insektisit grubundan olan sipermetrin ve permetrinin iskelet kası hücre zarı  $K^+$  iyon geçişleri üzerine etkileri incelenmiş ve bu insektisitlerin hücre zarında sadece  $Na^+$  kanallarını değil, aynı zamanda  $K^+$  kanallarını da etkilediği düşünülmüştür.

Piretroid insektisitlerin  $K^+$  kanal kinetikleri üzerine etkilerini belirlemek için hücre dışı ve hücre içi kayıt teknikleri kullanılmıştır. Hücre dışı kayıt tekniği bileşik kas aksiyon potansiyelini, hücre içi kayıt tekniği ise dinlenim zar potansiyelini kayıtlamak için kullanılmıştır. Canlılarda sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde bilgi iletimi aksiyon potansiyeli aracılığı ile olur. Tüm hücreler dinlenim zar potansiyeline sahiptir. Ancak sinir ve kas hücreleri gibi hücreler uyarıldığında hücre zarı depolarize olur ve zar potansiyeli negatif değerlerden pozitif değerlere doğru kayar. Potansiyel belli bir tepe değerine ulaştıktan sonra tekrar dinlenim evresindeki değerine döner. Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon

evresinden sinir hücrelerinde ve iskelet kas hücrelerinde  $Na^+$  iyonları sorumluyken repolarizasyon evresinden  $K^+$  iyonları sorumludur (20). Aksiyon potansiyelinin genliğinin, süresinin, latansının ve iletim hızının ölçülmesi hücre zarının  $Na^+$  ve  $K^+$  geçirgenliği hakkında bilgi verir. Aksiyon potansiyelinin maksimum genliği, iletim hızı, depolarizasyon süresi ve toplam süresi  $Na^+$  akımları ile ilgili bilgi verirken, repolarizasyon süresi, toplam süre ve hiperpolarizasyon genliği  $K^+$  akımları ile ilgili bilgi verir (21).

Piretroid insektisitlerin iskelet kası  $K^+$  kanalları üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflendiğinden aksiyon potansiyelinde  $K^+$  akımlarının sorumlu olduğu repolarizasyon süresi, hiperpolarizasyon genliği ve toplam süre değerlendirmeye alınmıştır. Tip II piretroidleri temsil eden sipermetrinin izole kurbağa sartorius kasında aksiyon potansiyelinin toplam süresini ve repolarizasyon süresini etkilemediği ancak hiperpolarizasyon genliğini istatistiksel olarak önemli miktarda etkilediği gözlenmiştir. Benzer etki tip I piretroidleri temsil eden permetrin için de bulunmuştur. İskelet kaslarında dinlenim evresinin sürdürülmesinden sorumlu olan iyon akımı  $K^+$  akımıdır. Bu çalışmada elde edilen bulgular her iki tip piretroid insektisin daha çok  $K^+$  iyonunun hücre dışına çıkmasını sağlayarak hiperpolarizasyonu arttırdığını düşündürmektedir. Benzer bulgular mikroelektrot kullanılarak kaydedilen dinlenim zar potansiyeli ölçümlerinden de elde edilmiştir. Permetrin ve sipermetrin uygulanması dinlenim zar potansiyelinin daha negatif değerlere kaymasına neden olmuştur. Yani permetrin ve sipermetrin zarın hiperpolarize olmasına neden olmuştur. Ancak bu etki her iki insektisit için sadece  $10^{-3}$  M dozunda gözlenmiştir. Daha düşük dozlarda böyle bir etki ortaya çıkmamıştır.

Piretroid insektisitler böceklerde ve memelilerde

etkilerini sinir membranındaki Na<sup>+</sup> kanallarının inaktivasyonunu yavaşlatarak gösterdiklerinden bu insektisitlerle ilgili çalışmalar daha çok sinir sistemi ve Na<sup>+</sup> kanalları üzerine yoğunlaşmıştır (22-25). Literatürde piretroid insektisitlerin iskelet kaslarında K<sup>+</sup> iyon geçişleri üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçlarımızı doğrudan karşılaştırma olanağı olmamıştır. Piretroidlerin K<sup>+</sup> akımları üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışmadan biri olan de La Cerda ve ark. (26) tarafından kedi kalp kası hücrelerinde yapılan çalışmada izole hücrelere tip II piretroidlerden deltametrin 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda uygulanmış, tüm hücre ve perfore patch clamp yöntemleri kullanılarak içeri doğrultucu ve gecikmiş doğrultucu K<sup>-</sup> akımları ölçülmüştür. Uygulanan konsantrasyonlardaki deltametrinin içeri doğrultucu K<sup>+</sup> akımı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada izole kedi kalbi hücrelerine deltametrinin 1 ve 10 µM konsantrasyonları uygulanmış ve gecikmiş doğrultucu K<sup>+</sup> akımları kaydedilmiştir. Bu kayıtlarda 1 µM deltametrinin gecikmiş doğrultucu akımlarda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenirken 10 µM konsantrasyonda bu akımın önemli miktarda azaldığı gözlenmiştir. Piretroid insektisit-K<sup>+</sup> akımı ilişkisini inceleyen bir başka çalışma örneği Wang ve arkadaşları (27) tarafından *Helicoverpa Armigera* (pamuğa zarar veren bir böcek türü)'nin merkezi sinir sistemi hücrelerinde yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada sinir hücrelerine piretroid insektisitlerden cyhalotrin 10<sup>-5</sup> mmol/L ve 10<sup>-7</sup> mmol/L dozlarında uygulanmış ve bu dozlardaki cyhalotrinin geçici dışarı K<sup>-</sup> akımları üzerine etkileri incelenmiştir. Uygulama sonucunda 10<sup>-7</sup> mmol/L cyhalotrinin geçici dışarı K<sup>+</sup> akımı üzerine herhangi bir etkisi olmazken 10<sup>-5</sup> mmol/L de bu akımlar bir miktar inhibe olmuştur. Ancak inhibisyon istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Haverinen and Vornanen (28) tarafından alabalıkta yapılan çalışmada tip II piretroid insektisitlerden deltametrinin kalp kası hücreleri kalsiyum akımı, içeri doğrultucu potasyum akımı ve gecikmiş doğrultucu potasyum akımı üzerine etkileri incelenmiştir. 10 µM deltametrinin bu akımlarda kontrol değerlerine göre önemli bir değişiklik yapmadığı gözlenmiştir. Fu ve ark. (29) tarafından sıçan hipokampus CA3 sinir hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada beta-sipermetrinin geçici dışarı ve gecikmiş doğrultucu potasyum akımları üzerine etkisi incelenmiş ve bu insektisit her iki kanalın aktivitesini değiştirdiği bulunmuştur.

Daha önce belirtildiği gibi piretroid insektisitlerin K<sup>-</sup> kanalları üzerine etkilerine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan bu çalışma ve La Cerda ve Wang (30)'ın çalışması piretroid türevi insektisitlerin yüksek dozlarının hedef ve hedef olmayan organizmalarda K<sup>+</sup> kanallarını da etkileyebileceği konusunda ipuçları vermektedir. Bilindiği gibi iyon kanalları içerisinde en

fazla çeşitliliğe sahip iyon kanalı K<sup>+</sup> kanallarıdır ve şimdiye kadar 150 den fazla K<sup>+</sup> kanal tanımlanmıştır. Bu alanda hem patch klamp yöntemini kullanarak hem de sayıları her geçen gün artan K<sup>+</sup> kanal blokerlerinden yararlanarak piretroid insektisitlerin farklı K<sup>+</sup> kanalları üzerine etkilerinin ayrıntılı olarak çalışılmasına gereksinim vardır. Bu çalışmalar ülkemizde ve ilimizde tarım üretimini arttırmak adına oldukça yoğun ve bilinçsizce kullanılan insektisitlerin etkileriyle ilgili bilgi birikimini arttıracak ve bunların tüketimiyle ilgili daha fazla önlem alınmasına katkı sağlayacaktır.

### Kaynaklar

1. Ashcroft FM. How Ion Channels Work. Ion Channels and Disease, California: Academic Press 1999:21-41.
2. Terlau H, Stühmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* 1998;85(9):437-44.
3. Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrance LJ. Mechanisms of selective action pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:413-38.
4. Valentine MW. Toxicology of selected pesticides, drug and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Vet Clin North Ame Small Anim Prac* 1990;20(2):375-81.
5. Hossain MM, Awal MA, Kobayashi H, Talukder MH. Therapeutic evaluation of cypermethrin against ticks and lice with their haemato biochemical changes in cattle. *Bangladesh Vet* 2001;35:39-43.
6. Miyamoto J, Kaneko H, Tsuji R, Okuno Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be Assessed. *Toxicol Lett* 1995;82-83:933-40.
7. Gassner B, Wuthrich A, Scholtysik G, Solioz M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J Pharmacol Exp The* 1997;281(2):855-60.
8. Gray AJ. Pyrethroid structure-toxicity relationships in mammals. *Neurotoxicology* 1985;6(2):127-37.
9. Vijverberg HP, van den Bercken J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit Rev Toxicol* 1990;21(2):105-26.
10. Narahashi T. Cellular and molecular mechanism of action of insecticides: neurophysiological approach. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1982;4(6):753-58.
11. Ecobichon DJ, Davies JE, Doull J, Ehrlich M, Joy R, Mc Millan D, MacPhail R, Reiter LW, Slikker W, Tilson H. Neurotoxic effects of pesticides. In: SR Baker, Wilkinson CF Eds. The effect of pesticides on Human Health, New Jersey: Princeton Scientific Publishing Co INC, 1990:131-99.

12. Wakeling EN, Neal AP, Atchison WD. Pyrethroids and their effects on ion channels In: R.P. Soundararajan Eds. Pesticides-Advances in Chemical and Botanical Pesticides (Electronic Book), Intech, 2012:50-5. Erişim: [Http://www.intechopen.com/books/pesticides-advances-in-chemical-and-botanical-pesticides/pyrethroids-and-their-effects-on-ion-channels](http://www.intechopen.com/books/pesticides-advances-in-chemical-and-botanical-pesticides/pyrethroids-and-their-effects-on-ion-channels). Erişim Tarihi: 10.02.2014.
13. Condes-Lara M, Graff-Guerrero A, Vega-Riveroll L. Effects of cypermethrin on the electroencephalographic activity of the rat: a model of chemically induced seizures. *Neurotoxicol Teratol* 1999;21(3):293-98.
14. Desi I, Dobronyi I, Varga L. Immuno, neuro and general toxicologic animal studies on a synthetic pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol Environ Saf* 1986;12(3):220-32.
15. Gammon DW. Correlations between in vitro and in vivo mechanisms of pyrethroid insecticide action. *Fundam Appl Toxicol* 1985;5(1):9-23.
16. Gordon T, Amdur MO. Responses of the respiratory system to toxic agents. In: Amdur MO, Daull J, Curtis Eds. Caserett and Daull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Toronto: Mc Graw Hill Company Pergamon Press, 1991:383-407.
17. Lawrance LJ, Casida JE. Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma aminobutyric acid receptor ionophore complex. *Science* 1983;221(4618): 1399 - 401.
18. Narahashi T. Effects of toxic agents on neural membranes. In: Lowndes HE, Boca Raton FL. Eds. Electrophysiology and Neurotoxicology, Philadelphia: CRC Press, 1987:23.
19. Rao GV, Rao KSJ. Modulation of K<sup>+</sup> transport across synaptosomes of rat brain by synthetic pyrethroids. *Journal of the Neurological Sciences* 1997;147(2):127-33.
20. Koester J, Siegelbaum SA. Propagated signaling: the action potentials. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM Eds. Principles of neuronal sciences, New York: Mc Graw Hill, 2000:151-70.
21. Daube JR. Basics of Neurophysiology. In: Daube JR Eds. Clinical Neurophysiology. F.A. Davis Company, Philadelphia 1996:60-80.
22. Kaneko H, Miyamoto J. Pyrethroid chemistry and metabolism. In: Krieger R, Doull J, Ecobichon D, Eds. Handbook of Pesticide Toxicology, Vol 2: Agents San Diego: Academic Press, 2001:1263-88.
23. Ray DE. Pyrethroid insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, paresthesia, and therapy. In: Krieger R, Doull J, Ecobichon D, Eds. Handbook of Pesticide Toxicology: Vol 2: Agents. San Diego: Academic Press, 2001:1289-303.
24. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 2002;171(1):3-59.
25. Motomura H, Narahashi T. Interaction of tetramethrin and deltamethrin at the single sodium channel in rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology* 2001;22(3):329-39.
26. de la Cerda E, Navarro-Polanco RA, Sánchez-Chapula JA. Modulation of cardiac action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin. *Arch Med Res* 2002;33(5):448-54.
27. Wang Y, He BJ, Zhao Q, Liang Z, Liu AX. Effects of cyalothrin on the transient outward potassium current in central neurons of *Helicoverpa armigera*. *Insect Science* 2006;13(1):13-7.
28. Haverinen J, Vornanen M. Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014;159:1-9.
29. Fu ZY, Du CY, Yao Y, Liu CW, Tian YT, He BJ Zhang T, Yang Z. Effects of beta-cypermethrin on voltage-gated potassium channels in rat hippocampal CA3 neuron. *Acta physiologica Sinica* 2007;59(1):63-70
30. Korn SJ, Trapani JG. Potassium channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 2005;4(1):21-33.