

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**PYRETHROİD İNSEKTİSİTLERİN İSKELET KASI  
POTASYUM KANAL KİNETİKLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

Fatma SÖĞÜT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

MERSİN-2007

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

# **PYRETHROİD İNSEKTİSİTLERİN İSKELET KASI POTASYUM KANAL KİNETİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Fatma SÖĞÜT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından BAP-SBE TTB  
(FS) 2005-3 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN-2007

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Pyrethroid insektisitlerin iskelet kası potasyum kanal kinetikleri üzerine etkileri” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25 /Haziran/ 2007

Prof. Dr. Nurten ERDAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Aynur AVCI ÖZGE  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü  
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Nurten ERDAL'a, Doç. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuarda birlikte çalıştığım arkadaşlarımın hepsine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan sevgili eşim Kenan SÖĞÜT'e, aileme ve hayatıma kattığı anlamdan ve sıcacık gülüşlerinden dolayı kızım Zeynep SÖĞÜT'e teşekkür ederim

Saygılarımla  
Fatma SÖĞÜT

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÖZET</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Hücre Zarı Ve İyon Kanalları.....	3
2.1.1. Potasyum Kanalları.....	4
2.1.1.1. Yapısal Sınıflandırma.....	4
2.1.1.2. İşlevsel Sınıflandırma.....	7
2.1.1.3. Voltaj Bağımlı Potasyum Kanalları (Kv).....	8
2.1.1.4. Gecikmiş Doğrultucu Potasyum Kanal İletkenliği İçin Hodgkin-Huxley Modeli.....	9
2.1.1.5. Kalsiyumla Aktive Olan Potasyum Kanalları.....	11
2.1.1.6. İçeri Doğrultucu Potasyum Kanalları.....	12
2.2 Pyrethroid İnektisitler.....	12
2.2.1. Pyrethroidler ve İyon Kanalları.....	13
2.2.2. Permethrin.....	13
2.2.3. Cypermethrin.....	14
<b>3. GEREÇ Ve YÖNTEM</b> .....	15
3.1. Deney Hayvanı.....	15
3.2. Preparat.....	15
3.3. İnektisit Seçimi.....	15
3.4. Uygulanacak Dozun Belirlenmesi.....	16

3.5. Deney Grupları.....	16
3.6. Çözeltiler.....	18
3.7. Elektrofizyolojik Kayıtlar.....	18
3.7.1. Hücre Dışı Kayıtlar.....	18
3.7.2. Hücre İçi Kayıtlar.....	19
3.8. Analiz.....	21
3.8.1. Hücre Dışı Kayıtlar.....	21
3.8.2. Hücre İçi Kayıtlar.....	21
3.9. İstatistiksel Analiz.....	22
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
4.1. Cypermethrin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Doza ve Zamana Bağlı Etkileri.....	23
4.2. Cypermethrinin Dinlenme Zar Potansiyeli Üzerine Etkileri.....	27
4.3. Permethrinin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Zamana ve Doza Bağlı Etkileri.....	29
4.4. Permethrinin Dinlenme Zar Potansiyeli Üzerine Zamana ve Doza Bağlı Etkileri.....	33
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>40</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>41</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>45</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Hücre zarının temel yapısı.....	3
Şekil 2.2: Açılma kinetiklerine göre kanal tipleri.....	4
Şekil 2.3: Potasyum kanallarının alfa altbiriminin yapısal bileşenleri.....	5
Şekil 2.4: Potasyum kanalında voltaj değişimi sonucunda S4 bölgesindeki değişim.....	6
Şekil 2.5: Potasyum kanalının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.6: İçeri doğrultucu potasyum kanalının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.7: 2P potasyum kanalları.....	7
Şekil 2.8: Gecikmiş doğrultucu potasyum kanal iletkenliği.....	9
Şekil 2.9: Hızlı inaktive olan potasyum kanal akımı.....	9
Şekil 2.10: (A) Hız sabitleri $\alpha$ v $\beta$ 'nin zar potansiyellerine bağlı değişimleri.....	11
(B) $n_{\infty}$ ve $n_{\infty}^4$ ün zar potansiyeline bağlı değişimleri.....	11
Şekil 2.11: Permethrinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.12: Cypermethrinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 3.1: Kurbağa sartorius kası izolasyonu.....	15
Şekil 3.2: İğne elektrotlarla hücre dışı kayıt alımı.....	18
Şekil 3.3: Hücre dışı kayıt alım sistemi.....	19
Şekil 3.4: Yatay mikroelektrot çekici.....	20
Şekil 3.5: Mikroelektrot ile hücre içi kayıt alımı.....	20
Şekil 3.6: Hücre içi kayıt alım sistemi.....	20
Şekil 3.7: Aksiyon potansiyeli.....	21
Şekil 4.1: Cypermethrin gruplarından elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları.....	23
Şekil 4.2: Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin toplam süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	25
Şekil 4.3: Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	26
Şekil 4.4: Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin minimum genliğinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	27
Şekil 4.5: Cypermethrin için zar potansiyelinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	29

<b>Şekil 4.6:</b> Permethrin gruplarından elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları.....	31
<b>Şekil 4.7:</b> Permethrin için aksiyon potansiyelinin toplam süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	31
<b>Şekil 4.8:</b> Permethrin için aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	32
<b>Şekil 4.9:</b> Permethrin için aksiyon potansiyelinin minimum genliğinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	33
<b>Şekil 4.10:</b> Permethrin için zar potansiyelinin doza ve zamana bağlı değişimleri.....	35



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1:</b> Araştırma kapsamındaki grupların özeti.....	17
<b>Çizelge 4.1:</b> Cypermethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, ve minimum genliğin zamana ve doza bağlı değerleri.....	24
<b>Çizelge 4.2:</b> Cypermethrinin dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı değerleri.....	28
<b>Çizelge 4.3:</b> Permethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, ve minimum genliğin zamana ve doza bağlı değerleri.....	30
<b>Çizelge 4.4:</b> Permethrinin dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı değerleri.....	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha_n$	: n partiküllerinin kapalı konumdan açık konuma geçerken hız sabiti
<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>AgCl</b>	: Gümüşklorür
$\beta_n$	: n partiküllerinin açık konumdan kapalı konuma geçerken hız sabiti
<b>BK</b>	: Büyük iletkenliğe sahip kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları
<b>C</b>	: Karboksil terminal ucu
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyumklorür
<b>C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub></b>	: Permethrin
<b>C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>NCl<sub>2</sub></b>	: Cypermethrin
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>Cyp</b>	: Cypermethrin
<b>CTX</b>	: Charbydotoksin
<b>dk</b>	: Dakika
<b>g</b>	: Gram
<b>G<sub>K</sub></b>	: Tüm kanallar açık olduğunda kanal iletkenliği
<b>G<sub>KMAX</sub></b>	: Maksimum potasyum kanal iletkenliği
<b>GABA</b>	: Gama aminobütirik asit
<b>hd</b>	: Hücre dışı
<b>hi</b>	: Hücre içi
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>K-ATPase</b>	: Potasyumun aktive ettiği adenozin trifosfat
<b>KCl</b>	: Potasyumklorür
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>K<sub>v</sub></b>	: Voltaja bağlı potasyum kanalları
<b>L</b>	: Litre
<b>LD<sub>50</sub></b>	: Bir popülasyonun % 50'sinin ölümüne neden olacak letal doz
<b>M</b>	: Molar

<b>M1, M2</b>	: İçeri doğrultucu potasyum kanallarının transmembran bölgelerinden herbiri
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>Mohm</b>	: Megaohm
<b>ms</b>	: Milisaniye
<b>mS</b>	: Milisiemens
<b>mV</b>	: Milivolt
<b>n</b>	: n partiküllerinin açık olma olasılıkları
<b>N</b>	: Amino terminal ucu
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>Na, K-ATPase</b>	: Sodyum ve potasyumun aktive ettiği adenozin trifosfat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	: Sodyum bikarbonat
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>NMR</b>	: Nükleer magnetik rezonans
<b>Per</b>	: Permethrin
<b>s</b>	: Saniye
<b>S1, S2, S3, S4, S5, S6</b>	: Potasyum kanallarının transmembran bölgelerinden herbiri
<b>SK</b>	: Küçük iletkenliğe sahip kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları
<b>SPSS</b>	: İstatistik paket programı (Statistical Package for Social Sciences)
<b>SS</b>	: Standart sapma
<b><math>\tau_n</math></b>	: Zaman sabiti
<b>TEA</b>	: Tetraetilamonyum
<b>V</b>	: volt

## ÖZET

### Pyrethroid İnsektisitlerin İskelet Kası Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkileri

Pyrethroid insektisitler zararlılarla savaşmada sıklıkla kullanılan böcek ilaçlarıdır. İnsektisitler genellikle hedef veya hedef olmayan canlılarda, nörotoksik etkiler gösterirler ve sinir sisteminde hasara yol açarlar.

Bu çalışmada iki farklı pyrethroid insektisit olan permethrin (tip I) ve cypermethrin'in (tipII) kurbağaların iskelet kası potasyum kanal kinetiklerine etkisi incelenmiştir. Hem permethrin hem de cypermethrin için eşit sayıda grup oluşturulmuş ve her iki insektisit için de üç farklı doz ( $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M) için 0. dakikada (kontrol), 15. dakikada, 30. dakikada, 45. dakikada ve 60. dakikada ölçümler alınmış, böylece hem doza hem de süreye bağlı veriler elde edilmiştir. Çalışmada *Rana ridubunda* türündeki kurbağaların sartorius kası kullanılmış, yapılan ölçümlerde hem hücre içi hem de hücre dışı eleterofizyolojik kayıtlar alınmıştır. Hücre içi kayıtlar Multiclamp 700 B sistemi ile elde edilen membran potansiyelleri, hücre dışı kayıtlar ise BIOPAC MP 100Acquisition sistemi kullanılarak elde edilen aksiyon potansiyelleridir. Hücre dışı kayıtlardan elde edilen aksiyon potansiyelinden yararlanarak toplam süre, repolarizasyon süresi ve minimum genlik değerleri incelenmiştir. Elde edilen bulgularda cypermethrin ve permetrinin, kullanılan doz ve sürelerde aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresini değiştirmedeği gözlenirken, minimum genlikte konsantrasyona ve zamana bağlı olarak önemli fark bulunmuştur. Membran potansiyeli için ise sadece  $10^{-3}$  M grubunda zamana bağlı önemli bir fark bulunurken diğer dozlarda bulunamamıştır.

Çalışmada kullanılan pyrethroid insektisitler kurbağa iskelet kası potasyum kanallarını doza bağlı olarak etkilerken, uygulama süresi ve insektisit türü bu etkiyi değiştirmemiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Potasyum kanalları, pyrethroid insektisitler, cypermethrin, permethrin, iskelet kası.

## ABSTRACT

### The Effects of Pyrethroid Insecticides on Potassium Channel Kinetics of Skeletal Muscle

Pyrethroid insecticides are chemicals that are frequently used for insect warfare. Insecticides generally show neurotoxic effects to the target and non target organisms and give harm to their nervous system.

In this study, the effects of two different pyrethroid insecticides, permethrin (type I) and cypermethrin (type II), on frog potassium channel kinetics of skeletal muscle were investigated. Same number of groups were composed for both permethrin and cypermethrin, and the measurements were taken on the 0<sup>th</sup> (control), 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes for three different doses ( $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M) for each insecticide, and in this way the data depending on both dose and time were obtained. In the study, the sartorius muscle of *Rana ridibunda* frog was used and in the measurements both intracellular and extracellular electrophysiological records were taken. Intracellular measurements were the membrane potentials that were obtained by Multiclamp 700 B system and extracellular records were the action potentials obtained by BIOPAC MP 100 Acquisition system. Making use of the action potential that was obtained from the extracellular records; the values of the total time, repolarization time and minimum amplitude were investigated. It was observed from the obtained results that both cypermethrin and permethrin did not change total time and repolarization time of the action potential, but for the minimum amplitude a significant difference depending on the concentration and time was occurred. For the membrane potential measurements, the only significant difference was for the  $10^{-3}$  M group. No differences were found for the rest.

The pyrethroid insecticides used in the study effected the frog skeletal muscle by depending on doses, but exposition time and type of pyrethroid did not changed this effect.

**Key Words:** Potassium channels, pyrethroid insecticides, cypermethrin, permethrin, skeletal muscle.

## 1. GİRİŞ

Ülkemiz tarım alanlarında çok sayıda tarım ilacı bilinçsiz bir biçimde kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde tarım ilacı uygulayan kişiler gerekli koruyucu önlemleri alırken, ülkemizde bu konuya gereken önem verilmediği gözlenmiştir. Uygulayıcılar, ilacı uygularken hiçbir koruyucu önlem almadıkları için tarım ilaçlarının akut ve kronik toksik etkisiyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Tarım ilaçlarının bu etkisi sadece uygulayıcılarla sınırlı kalmamakta rüzgarın etkisiyle çevre alanlara taşınmakta ve buralardaki hedef olmayan canlıları olumsuz etkilemektedir. Yine bu ilaçlar gereğinden fazla kullanıldıkları için sebze ve meyvelerin üzerinde oldukça yüksek miktarlarda kalmakta ve bu kalıntılar da insan sağlığını tehdit etmektedir. Son yıllarda fazla tarım ilacı kalıntısı içeren ürünler ihraç edildikleri ülkeler tarafından kabul edilmeyip ülkemize iade edilmektedir. Polikültür tarım yapılmasına bağlı olarak İçel ili ülkemizde tarım ilaçlarının en yoğun kullanıldığı illerden biridir. Bu nedenle tarım ilaçlarının hedef olmayan canlılar üzerindeki etkilerinin incelenmesi insan ve çevre sağlığı açısından önemlidir.

Potasyum ( $K^+$ ) ve sodyum ( $Na^+$ ) iyonları, membran 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  $Na^+$  ve  $K^+$  düzeylerinin sabit tutulmasında iyon kanalları ve aktif pompalar önemli rol oynar. Hücre zarındaki  $K^+$  akımları K-ATPase, Na, K-ATPase ve  $K^+$  kanalları tarafından düzenlenir. K-ATPase  $K^+$  transportunda temel rol oynar. Na, K-ATPase ise hem  $Na^+$  hem de  $K^+$  bağlama özelliğine sahiptir. Bu pompa 3  $Na^+$  iyonunu hücre dışına atarken 2  $K^+$  iyonunu hücre içine alır.  $K^+$  kanalları ise hücre zarında bulunan kompleks proteinlerdir. Uyarılabilir hücrelerde ve bezlerde 30 dan fazla farklı özelliğe sahip  $K^+$  kanalı tanımlanmıştır (1).

İnsektisitlerin sinir membranlarındaki  $K^+$  akımlarını önemli miktarda etkilediği bilinmektedir. Pyrethroid insektisitler en yaygın kullanılan insektisit türlerinden biridir. Böceklerde oldukça toksik olmalarına rağmen memeli ve kuşlarda kolayca biyodegradasyona uğramaları nedeniyle organik klorlu ve organik fosforlu insektisitlerden

daha fazla kullanılmaktadır. Buna rağmen diğere insektisit türlerinde olduğu gibi hedef organizmaların yanısıra hedef olmayan canlılarda da toksik etkileri saptanmıştır (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

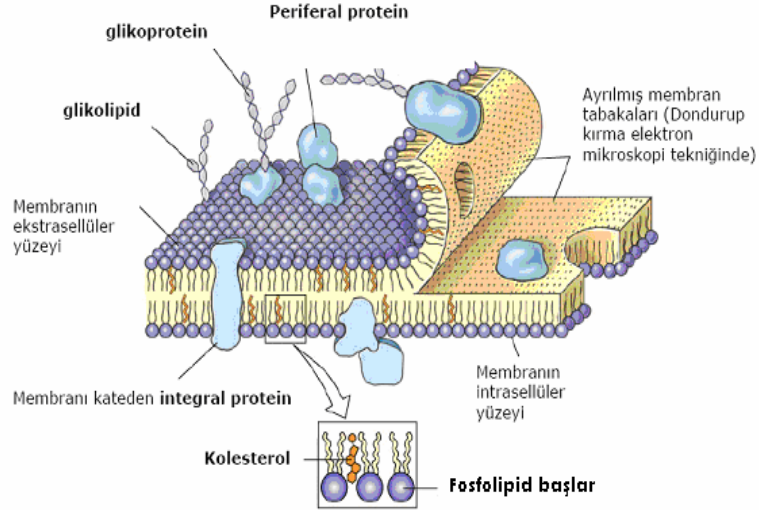
Tip I ve tip II pyrethroidlerin  $K^+$  kanalları üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar çok sınırlıdır (1) ve bu insektisitlerin oluşturdukları toksik etkiye  $K^+$  akımlarının etkisi açık değildir. Bu sınırlı çalışmalar da sinir hücre membranında gerçekleştirilmiştir. Pyrethroidlerin iskelet kasındaki  $K^+$  akımlarını ve buna bağılı olarak da kasılma mekanizmasını nasıl etkilediğine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında ilimizdeki tarım alanlarında hiçbir koruyucu önlem alınmadan yaygın olarak kullanılan Tip I ve Tip II pyrethroid insektisitlerin iskelet kası membranındaki  $K^+$  kanalları üzerine olası etkilerinin elektrofizyolojik ve biyofiziksel yöntemler kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar tartışılarak bu konudaki bilgilere katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 . HÜCRE ZARI ve İYON KANALLARI

Hücrenin tüm organelleri temel olarak lipid ve proteinlerden oluşan bir zarla çevrilmiştir. Hücreyi saran zar 7.5-10 nm kalınlığında ince elastik bir yapıdır. Zarın % 55' i protein, % 25'i fosfolipid, % 13'ü kolesterol, %4'ü diğer lipidler ve % 3'ü karbohidrattan oluşmuştur. Hücre zarının temel yapısı bir lipid çift katlı tabakadır. Lipid çift katlı tabakayı boydan boya geçen integral proteinler iyonların ekstrasellüler sıvı ile intrasellüler sıvı arasında hızlı ve seçici geçişlerini sağlayan iyon kanallarını oluştururlar (12, 13)(Şekil 2.1).

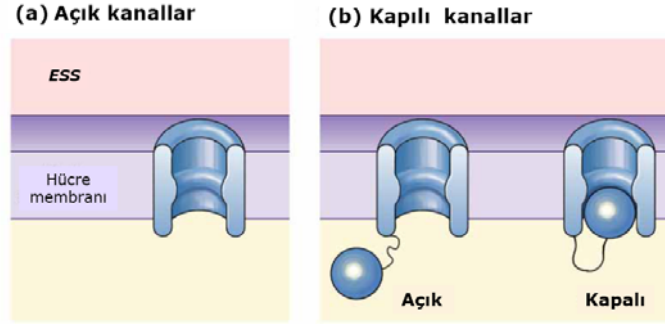


Şekil 2.1: Hücre zarının temel yapısı (14).

İyon kanallarının amfifilik karakterleri ve boyutlarının büyük olması bu proteinlerin yapılarının X ışınları kristallografi yöntemiyle ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleriyle ortaya konmasında güçlükler neden olmuştur. Bu nedenle iyon kanallarının yapılarıyla ilgili ilk veriler elektron mikroskop teknikleri kullanılarak elde edilmiştir (15, 16). Bu moleküllerin alt gruplarının ayrıntıları ise son yıllarda NMR teknikleri kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır (17). İyon kanallarının işlevlerini ortaya çıkarmak için ise başta patch klamp olmak üzere, voltaj klamp, akım klamp, ekstrasellüler kayıt teknikleri ve intrasellüler kayıt tekniklerinden yararlanılmaktadır (18). İyon kanalları açılma



kinetiklerine ve aktivasyon biçimlerine göre sınıflandırılırlar. İyon kanallarında bu aktivasyon voltaj değişimleriyle, bir ligandın bağlanmasıyla, siklik nükleotidler gibi intrasellüler ikinci haberci sistemleriyle, germeyle, basınç değişikliğiyle gerçekleşebilir (12) (Şekil 2.2). Dinlenme kanalları olarak da isimlendirilen sızıntı kanalları ise sürekli açıktır.



Şekil 2.2: Açılma kinetiklerine göre kanal tipleri (14).

İyon kanalları hücrelerde elektriksel sinyallerin oluşumunda kilit rol oynarlar. Bu nedenle yaşamsal öneme sahiptirler (12).

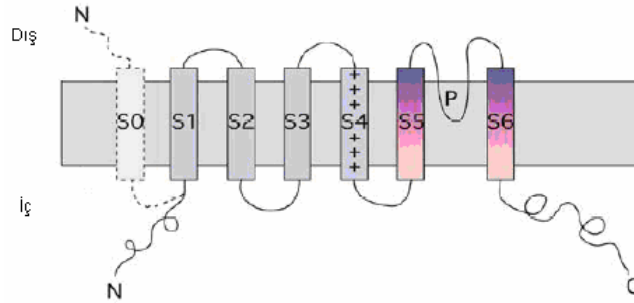
## 2.1.1 Potasyum Kanalları

### 2.1.1.1 Yapısal Sınıflandırma

Potasyum kanalları membrandaki elektriksel olayların büyük kısmından sorumludur. Potasyum akımları hemen daima hiperpolarize edicidir ve aksiyon potansiyelinin süresini, biçimini ve ateşleme voltajını kontrol eder. Buna ek olarak potasyum akımları dinlenme membran potansiyelinin sürdürülmesinde ve stabilizasyonunda rol oynar (19). Potasyum kanalları diğer iyon kanalları gibi iyon seçicidirler ve büyük oranda potasyum iyonlarına geçirgendirler.

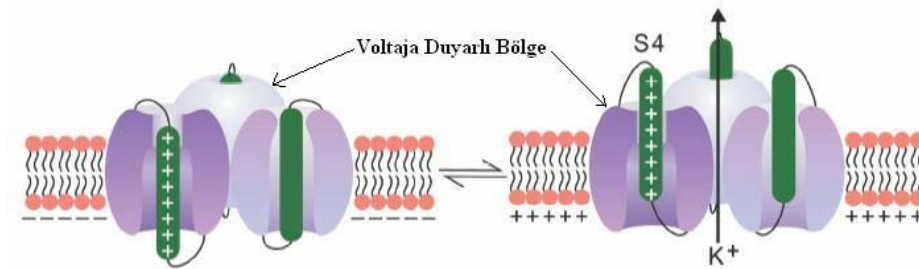
Potasyum kanallarının kristal yapısı ilk olarak 1998 yılında ortaya konmuştur (20). Bu kanallar alfa ve beta altbirimlerini içerirler. Kanalın temel yapıtaşı alfa altbirimidir. Beta

altbiriminin düzenleyici rolü vardır. Şekil 2.3 potasyum kanallarının alfa altbiriminin yapısal bileşenleri göstermektedir. Voltaj bağımlı potasyum kanalı 4 alfa altbiriminden oluşmuştur. Bu dört altbirim potasyum kanallarının tetramer yapısını oluşturur. Her bir altbirim zarı enlemesine geçen altı transmembran bölge içerir. Bu bölgeler S1, S2, S3, S4, S5 ve S6 olarak isimlendirilir. Altı transmembran bölgenin amino (N) ve karboksil (C) son uçları sitoplazmada bulunur.



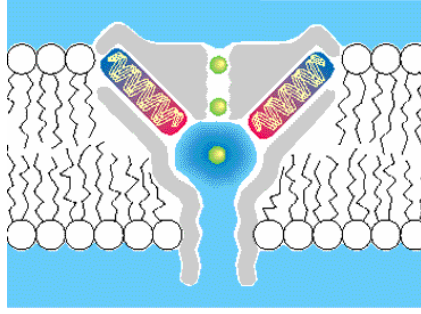
Şekil 2.3: Potasyum kanallarının alfa altbiriminin yapısal bileşenleri (19).

S4 bölgesi büyük çoğunluğunu argininin oluşturduğu pozitif yüklü amino asit rezidülerinin tekrarıyla oluşmuştur. Bu bölge kanalın voltaj duyarlı bölümünü oluşturur. Depolarizasyonla birlikte S4 bölgesi dışarı doğru hareket eder. Bu hareket sonucunda iyon kanalı açılır ve iyon akışı gerçekleşir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Potasyum kanalında voltaj değişimi sonucunda S4 bölgesindeki değişim (21).

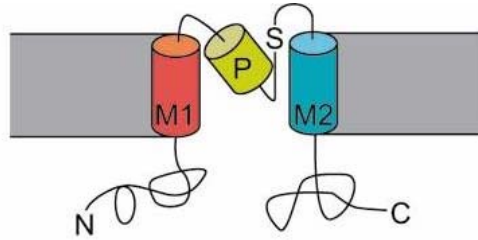
S5 ve S6 bölgeleri bir P halkası ile bağlıdır. P halkası kanalın seçici filtresini oluşturarak iyon kanalının K iyonlarına diğer tek valanslı iyonlardan, örneğin sodyum iyonundan daha geçirgen olmasını sağlar (şekil 2.5)



Şekil 2.5: Potasyum kanalının şematik gösterimi (22).

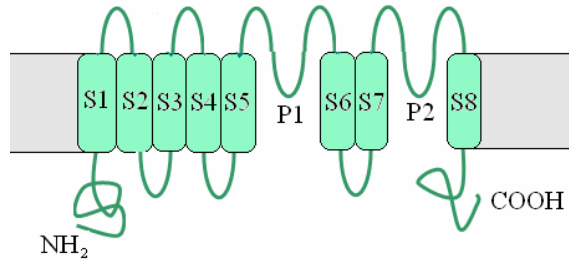
Kalsiyumla (Ca) aktive olan potasyum kanalları S0 olarak adlandırılan yedinci bir transmembran bölgeye sahiptir. Bu bölgenin amino ucu zarın dış tarafında bulunurken karboksil ucu zarın iç tarafında bulunur (Şekil 2.3).

İçeri doğrultucu potasyum kanalları ise M1 ve M2 olmak üzere iki transmembran bölgeye sahiptir. Bunların N ve C terminal uçları sitoplazmadadır. M1 ve M2 voltaj bağımlı potasyum kanallarındaki S5 ve S6 bölgesine karşılık gelir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: İçeri doğrultucu potasyum kanalının şematik gösterimi (21).

2 P potasyum kanalları sekiz transmembran bölgeden oluşmuştur ve ikinci bir P halka bölgesi daha içerir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: 2P potasyum kanalları.

### 2.1.1.2 İşlevsel Sınıflandırma

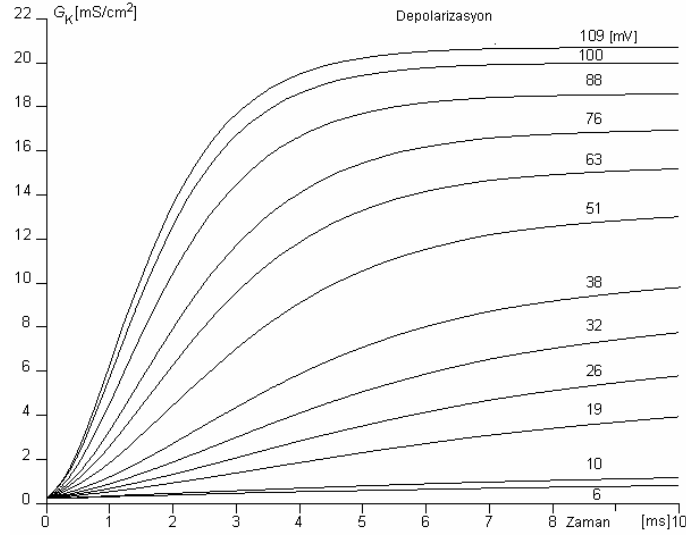
Farklı uyaranlarla aktive olan, farklı modülatörler tarafından düzenlenen, farklı kinetik özelliklere sahip 150'nin üzerinde K kanal tipi tanımlanmıştır. K kanalları voltaj bağımlı potasyum kanalları, kalsiyum bağımlı potasyum kanalları, içeri doğrultucu potasyum kanalları ve sızıntı potasyum kanalları olmak üzere dört grup olarak sınıflandırılabilir. Tüm bu kanallarda daha önce değinildiği gibi alfa altbirimi kanalın temel yapısını oluşturur. Beta altbirimi alfa altbiriminin işlevlerinin düzenlenmesine katkıda bulunur (17, 19).

### 2.1.1.3 Voltaj Bağımlı Potasyum Kanalları ( $K_v$ )

Voltaj bağımlı potasyum kanallarının  $K_{v1}$ ,  $K_{v2}$ ,  $K_{v3}$  ve  $K_{v4}$  olmak üzere dört ana grubu vardır. Her bir grupta da sayıları 2 ve 9 arasında değişen alt gruplar vardır.  $K_v$  kanalları depolarizasyonla aktive olur ve temel olarak aksiyon potansiyelinin süresini, şeklini ve ateşleme frekansını kontrol ederler. Hodgkin ve Huxley mürekkep balığı dev aksonunda yaptıkları çalışmada voltaj bağımlı  $K^+$  kanallarını gecikmiş doğrultucu olarak tanımlamışlardır. Bu kanalların gecikmiş olarak isimlendirilmesinin temel nedeni kanal aktivasyonunun sodyum kanallarına oranla oldukça yavaş olması, doğrultucu olarak nitelendirilmesinin nedeni ise bir yöndeki akımı, diğer yöndeki akıma göre daha kolay geçirmesidir. Bu akımlarda uyarı devam ettiği sürece inaktivasyon gözlenmez (23). Mürekkep balığı dev aksonundaki ve diğer uyarılabilir dokulardaki bu gecikmiş doğrultucu potasyum kanallarına ek olarak depolarizasyonla aktive olan ancak hızlı inaktivasyon gösteren  $K^+$  akımları da kaydedilmiştir. Bunlar hızlı inaktive olan  $K^+$  akımları veya A akımları olarak isimlendirilmiştir. Gecikmiş doğrultucu tip potasyum kanalları tetraetilamonyum (TEA) ile bloke olurken, hızlı inaktive olan potasyum kanalları 4-aminopiridine daha duyarlıdır (Şekil 2.8-9).

Bu kadar çok çeşitliliğe sahip potasyum kanallarının işlevlerinin ne olduğu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Gecikmiş doğrultucu potasyum akımları hemen hemen tüm uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresinden sorumludur.

Hızlı inaktive olan potasyum akımları ise farklı role sahiptir. Bunlar daha çok sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini düzenlerler (23).



Şekil 2.8: Gecikmiş doğrultucu potasyum kanal iletkenliği (24).



Şekil 2.9: Hızlı inaktive olan potasyum kanal akımı (24).

#### 2.1.1.4 Gecikmiş Doğrultucu Potasyum Kanal İletkenliği İçin Hodgkin-Huxley Modeli

Hodgkin-Huxley modelinde  $K^+$  kanallarının açılması ve kapanmasının zara bağlı dört adet  $n$  partikülü adı verilen partiküllerin hareketiyle kontrol edildiği varsayılmıştır (25). Kanalin açık konumdan kapalı konuma geçişleri alfa ve beta hız sabitleri tarafından kontrol edilir. Bu geçişler birinci derece reaksiyon kinetikleriyle denklem 2.1' deki gibi ifade edilebilir.

$$n \xrightleftharpoons[\beta_n]{\alpha_n} (1-n) \quad (2.1)$$

Burada;

$\alpha_n$  : n partiküllerinin kapalı konumdan açık konuma geçerken hız sabiti

$\beta_n$  : n partiküllerinin açık konumdan kapalı konuma geçerken hız sabiti

$n$  : n partiküllerinin açık konumda olma olasılıkları

$1-n$  : n partiküllerinin kapalı konumda olma olasılıklarına karşılık gelmektedir.

n partiküllerinin birim zamandaki hareketleri birinci derece diferansiyel denklemle

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n \quad (2.2)$$

şeklinde denklem 2.2 ile ifade edilebilir. Bu denklemin çözümü denklem 2.3' ü verir.

$$n(t) = n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0)e^{-t/\tau_n} \quad (2.3)$$

Burada;

$$n_{\infty} = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (2.4)$$

olup n'in kararlı durum değerine karşılık gelir (Şekil 2.10).

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (2.5)$$

ise zaman sabitidir.

Birim alandaki tüm potasyum kanallarının açık olduğu varsayıldığında potasyum kanal iletkenliği  $n^4$  ile orantılı olur ve

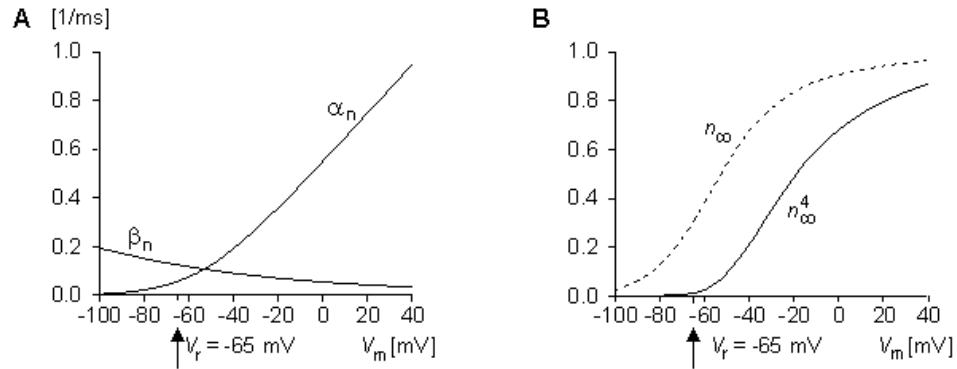
$$G_K = G_{K_{max}} n^4 \quad (2.6)$$

bağıntısı ile ifade edilir.

Bu bağıntıda:

$G_K$  : Tüm kanallar açık olduğunda potasyum kanal iletkenliği

$G_{K \max}$  :Maksimum potasyum kanal iletkenliği [ $mS/cm^2$ ] dir.



**Şekil 2.10:** (A) Hız sabitleri  $\alpha$  v  $\beta$ 'nın zar potansiyellerine bağlı değişimleri (24).  
(B)  $n_{\infty}$  ve  $n_{\infty}^4$  ün zar potansiyeline bağlı değişimleri (24).

### 2.1.1.5 Kalsiyumla Aktive Olan Potasyum Kanalları

Kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının varlığı ilk kez Meech ve Strumwasser tarafından 1970 yılında gösterilmiştir. Bu araştırmacılar aplysia nöronlarına Ca enjekte edildiğinde membranın hiperpolarize olduğunu ve direncin azaldığını gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda farklı niteliklerde kalsiyumla aktive olan  $K^+$  akımlarının varlığı gösterilmiştir. Bunların oldukça büyük iletkenliğe sahip kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları (BK) ile daha düşük derecede iletkenliğe sahip kalsiyumla aktive olan  $K^+$  kanallarıdır (SK). Kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının işlevleri voltaj bağımlı potasyum kanallarına benzer. Bu kanallar hücre depolarize olduğu zaman aktive olur ve potasyum iyonları hücre dışına çıkar. Depolarizasyon voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonunu arttırdığı için depolarizasyonla birlikte hücre içi Ca konsantrasyonu artar. Böylece Ca ile aktive olan  $K^+$  kanalları aktif hale gelmiş olur. Ca ile aktive olan  $K^+$  akımları aksiyon potansiyelinin oluşumundan sonra gelişen yavaş hiperpolarizasyondan sorumludur. Bu kanallar charbydotoksin (CTX) tarafından bloke edilirler (23).

### 2.1.1.6 İçeri Doğrultucu Potasyum Kanalları

Potasyum kanallarının bu türü diğer potasyum kanallarından farklı olarak depolarizasyonla değil hiperpolarizasyonla aktive olurlar. Bu nedenle bu tür  $K^+$  kanallarına anormal doğrultucu potasyum kanalları da denir. İçeri doğrultucu potasyum kanallarının temel işlevi dinlenim zar potansiyelini stabilize etmektir.

## 2.2 PYRETHROID İNSEKTİSİTLER

Tarım ilaçlarının böcek öldürücü türlerine insektisit adı verilir. İsektisitler tarım ilaçlarının en yaygın kullanılan grubunu oluştururlar. İsektisitlerin büyük çoğunluğu nörotoksik etkiye sahiptirler ve etkilerini böceklerin sinir sisteminde hasar oluşturarak gösterirler.

Piretrinler; *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisi ve akraba türlerinden elde edilen esterlerdir. Doğal piretrinler yüksek toksik etkiye sahiptirler, ultraviyole ışık, gün ışığı, asit ve bazlar tarafından kolaylıkla bozulurlar. Bu doğal formların yerini 1945’li yıllardan sonra daha ucuza mal olan ve daha stabil 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, halojen grupları eklenerek etkileri ve stabiliteleri artırılmış ve sentetik piretrinler elde edilmiştir. Bu sentetik piretrinlerin türevlerine pyretroidler adı verilir (2, 26, 27, 28, 29, 30).

Memeliler için toksik etkilerinin az olması nedeniyle pyrethroid insektisitler tarımsal savaşında, veterinerlikte ve halk sağlığında yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 31). Pyrethroidler iki büyük gruba ayrılarak incelenebilir (32, 33). Tip I pyrethroidler (alletrin, permethrin, piretrin) alfa–cyano grubu içermeyen pyrethroid esterleridir. Tip II pyrethroidler (deltametrin, cypermethrin) ise alfa cyano grubu içerirler. Tip I pyrethroidler canlılarda hareketsiz kalma, koordinasyon bozukluğu, aşırı yorgunluk, felç olma, agresif



davranışlar ve tüm vücutta tremora yol açarlar. (34, 30, 35, 36, 37). Tip II pyrethroidler ise hiperaktivite, tükrük salgısında artma, kontrolsüz davranışlar, kasılma ve titreme nöbetlerine yol açar (34, 35).

### 2.2.1 Pyrethroidler ve İyon Kanalları

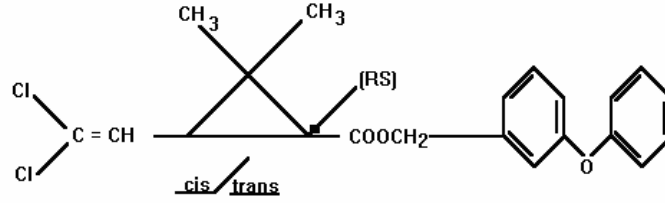
Pyrethroid insektisitler etkilerini  $\text{Na}^+$  kanallarını etkileyerek gösterirler. Membranı depolarize ederek sodyum akımını artırırlar (10, 38). Tip I pyrethroidler sodyum kanallarının ms düzeyinde açık kalmasına neden olurken, Tip II pyrethroidler  $\text{Na}^+$  kanallarının saniyeler düzeyinde açık kalmasına yol açarlar (5).

Pyrethroidlerin diğer etki yerlerinden birinin kalsiyum kanalları olduğu bildirilmiştir. Tip II esterlerinin yüksek konsantrasyonlarda memeli beyinlerindeki GABA kapılı klorür kanallarını da etkilediği bildirilmiştir. Ancak diğer bazı çalışmalarda pyrethroid insektisitlerin GABA için antagonistik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Sinir dokusunda voltaj duyarlı kalsiyum bağımsız klorür kanalları hücre eksitabilitesini kontrol eden kanallardandır ve bunların çeşitli tipleri vardır. Pyrethroid esterleri bunlardan maxi-chlorid kanal tipine duyarlıdır. Klorür iyon akımında pyrethroidlerin yol açtığı azalma hücre eksitabilitesinde artışla sonuçlanır. Bu etki sodyumun etkisi ile sinerji gösterir. Sadece Tip II esterleri klorür kanallarını etkilemektedir (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,).

### 2.2.2 Permethrin

Kimyasal adı 3-phenoxybenzyl(1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate olup rengi sarımsı kahverenginden, kahverengine kadar değişir. Genelde sıvı haldedir. Bazen oda sıcaklığında kristal halini alabilir. Sıcaklığa karşı stabildir. 50 °C' de 2 yıl dayanır. Molekül formülü  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3$ , molekül ağırlığı 391.29 g'dır. Akut  $\text{LD}_{50}$  dozu sıçanlarda ağız yolu ile 430-4000 mg/kg; deri yolu ile >4000 mg/kg dır. Permethrin pamuk, tütün, lahana, salatalık, domates ve soya fasulyesi yetiştiriciliğinde birçok zararlıya karşı kullanılan tip I pyrethroid grubundan güçlü bir insektisittir. Diğer tüm pyrethroidler gibi güçlü bir nörotoksik etkiye sahiptir. Canlılarda tremor, koordinasyon

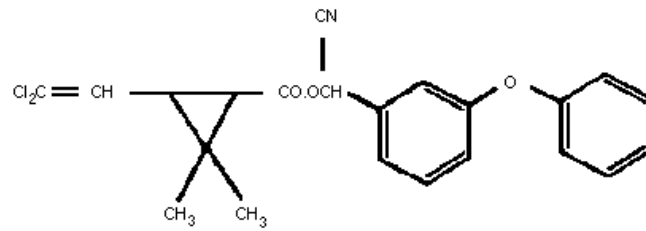
bozukluğu, öğrenme bozukluğu, vücut sıcaklığında değişiklikler gibi etkilere yol açar. Çocuklarda yetişkinlere oranla toksik etkisi daha fazladır (39).



Şekil 2.11: Permethrinin kimyasal yapısı.

### 2.2.3 Cypermethrin

Kimyasal adı Cyano-3-Phenoxybenzyl (+ Cis, trans) 3-(2,2-Dichlorovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropone carboxylate olan cypermethrin tip I pyrethroid insektisitlerin önemli bir temsilcisidir. Molekül formülü C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>NCl<sub>2</sub>, molekül ağırlığı 416.3 g dir. Akut LD<sub>50</sub> dozu farelerde ağız yolu ile 303-4123 mg/kg dır. Ülkemizde ve ilimizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her türlü sebze ve meyve yetiştiriciliğine kullanımı yoğundur. Diğer insektisitler gibi cypermethrin de hedef canlılar kadar hedef olmayan organizmaları etkilemektedir ve temel etki yeri sinir sistemidir (3, 4, 25, 40, 41, 42, 43, 44).



Şekil 2.12: Cypermethrinin kimyasal yapısı.

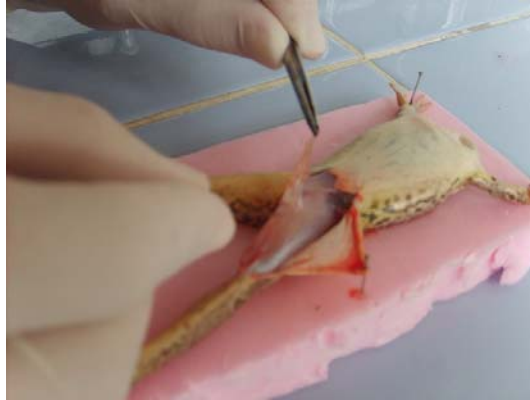
### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Deney Hayvanı

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. Akvaryumun suyu gün aşırı değiştirildi.

#### 3.2 Preparat

Deneyle izole kurbağa *sartorius* kasında yapıldı (Şekil 3.1). Kurbağalar dekapite edildikten sonra sartorius kasları izole edildi ve fizyolojik Ringer çözeltisi içine alındı. Deneyle 128 preparat kullanıldı.



Şekil 3.1: Kurbağa sartorius kası izolasyonu.

#### 3.3 İsektisit Seçimi

Araştırmaya başlamadan önce Tarım İl Müdürlüğü, zirai ilaç satan bayiler ve çiftçilerle görüşülerek ilimizde en yoğun kullanılan pyrethroidlerin isimleri belirlendi. Deltamethrin, permethrin cypermethrin ve cyhalotrin etken maddelerini içeren pyrethroid insektisitlerin bölgede yaygın olarak kullanıldığı saptandı. Bu araştırmada kullanılmak üzere permethrin (tip I) ve cypermethrin (tip II) seçildi.

### 3.4 Uygulanacak Dozun Belirlenmesi

Uygulanacak dozu belirlemek için ön elektrofizyolojik deneyler yapıldı. Ön deneylerde permethrin ve cypermethrinin  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M olmak üzere 6 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Yapılan ön deneylerde  $10^{-5}$  M'dan düşük konsantrasyonlarda etki gözlenmezken  $10^{-2}$  M'lık konsantrasyonda hemen blokaj olduğu için, çalışmada  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

### 3.5 Deney Grupları

Pyrethroid insektisitlerin  $K^+$  kanallarının kinetik özellikleri üzerine etkilerini belirlemek için elektrofizyolojik kayıt tekniklerinden yararlanıldı. Bu amaçla hem intrasellüler hem de ekstrasellüler kayıt teknikleri kullanıldı. Tüm deneyler  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de gerçekleştirildi. Deneylerde iki farklı insektisit, iki farklı elektrofizyolojik kayıt tekniği ve üç farklı konsantrasyon kullanıldığı için toplam oniki grup oluşturuldu. Deney grupları etkisi araştırılacak pyrethroid insektisitlerin konsantrasyonları ve kullanılan kayıt teknikleri göz önüne alınarak aşağıdaki şekilde düzenlendi:

1. Per, $10^{-5}$ , hd grubu:  $10^{-5}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)
2. Per, $10^{-4}$ , hd grubu:  $10^{-4}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)
3. Per, $10^{-3}$ , hd grubu:  $10^{-3}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)
4. Per, $10^{-5}$ , hi grubu:  $10^{-5}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)
5. Per, $10^{-4}$ , hi grubu:  $10^{-4}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)
6. Per, $10^{-3}$ , hi grubu:  $10^{-3}$  M permethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)
7. Cyp, $10^{-5}$ , hd grubu:  $10^{-5}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)
8. Cyp, $10^{-4}$ , hd grubu:  $10^{-4}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)

9. Cyp, $10^{-3}$ , hd grubu:  $10^{-3}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre dışı kayıtlar (n=8)
10. Cyp, $10^{-5}$ , hi grubu:  $10^{-5}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)
11. Cyp, $10^{-4}$ , hi grubu:  $10^{-4}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)
12. Cyp, $10^{-3}$  hi grubu:  $10^{-3}$  M cypermethrin içeren solüsyondan alınan hücre içi kayıtlar (n=8)

Pyrethroid insektisitlerin doza bağlı etkilerinin yanı sıra zamana bağlı etkilerini de inceleyebilmek için tüm preparatlarda insektisit uygulanmadan önce (0. dakika), insektisit uygulandıktan 15 dakika sonra (15. dakika), 30 dakika sonra (30. dakika), 45 dakika sonra (45. dakika) ve 60 dakika sonra (60. dakika) ölçüm yapılmıştır. 0. dakika ölçümleri her preparatın kendi kontrolüne karşılık geldiği için ayrıca bir kontrol grubu oluşturulmamıştır. Grupların özellikleri aşağıdaki çizelge 3.1 de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.1:** Araştırma kapsamındaki grupların özeti

<b>Grup</b>	<b>İnsektisit</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Kayıt Tekniği</b>
Per, $10^{-5}$ , hd	Permethrin	$10^{-5}$ M	Hücre dışı
Per, $10^{-4}$ hd	Permethrin	$10^{-4}$ M	Hücre dışı
Per, $10^{-3}$ , hd	Permethrin	$10^{-3}$ M	Hücre dışı
Per, $10^{-5}$ , hi	Permethrin	$10^{-5}$ M	Hücre içi
Per, $10^{-4}$ , hi	Permethrin	$10^{-4}$ M	Hücre içi
Per, $10^{-3}$ , hi	Permethrin	$10^{-3}$ M	Hücre içi
Cyp, $10^{-5}$ , hd	Cypermethrin	$10^{-5}$ M	Hücre dışı
Cyp, $10^{-4}$ hd	Cypermethrin	$10^{-4}$ M	Hücre dışı
Cyp, $10^{-3}$ , hd	Cypermethrin	$10^{-3}$ M	Hücre dışı
Cyp, $10^{-5}$ , hi	Cypermethrin	$10^{-5}$ M	Hücre içi
Cyp, $10^{-4}$ , hi	Cypermethrin	$10^{-4}$ M	Hücre içi
Cyp, $10^{-3}$ , hi	Cypermethrin	$10^{-3}$ M	Hücre içi

### 3.6 Çözeltiler

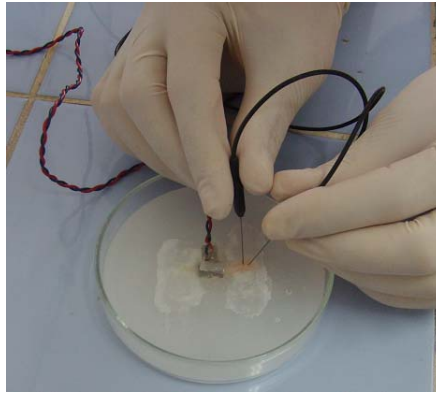
Ringer Çözeltisi: NaCl, 111.87 mM; KCl, 2.47 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.08 mM; ve NaHCO<sub>3</sub>, 2.38 mM (pH=7.2)

Pipet Çözeltisi: 3 M KCl

### 3.7 Elektrofizyolojik Kayıtlar

#### 3.7.1 Hücre Dışı Kayıtlar

Permethrin ve cypermethrinin izole bileşik kas aksiyon potansiyeli üzerine etkileri hücre dışı kayıt sistemi kullanılarak incelendi (Şekil 3.2). İzole kas, 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 BIOPAC MP 100 elektrofizyolojik kayıt sistemi kullanılarak yapıldı. Aksiyon potansiyelleri ERS 100 amplifikatörde yükseltildikten sonra 16 bitlik bir analog/dijital çevirici aracılığıyla daha sonra analiz edilmek üzere bilgisayara aktarıldı. Örnekleme hızı 15.000 örnek/saniye olarak belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.2: İğne elektrotlarla hücre dışı kayıt alımı.



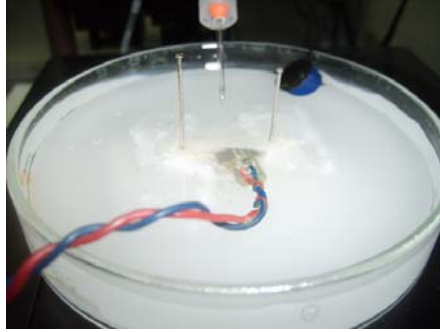
**Şekil 3.3:** Hücre dışı kayıt alım sistemi.

### 3.7.2 Hücre İçi Kayıtlar

Hücre içi kayıt sistemiyle izole kaslarda, permethrin ve cypermethrinin farklı konsantrasyonları için cam mikroeletrotlar kullanılarak dinlenim 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 mikroeletrot çekici (World Precision Instruments, PUL 1, USA) ile çekilerek hazırlandı (Şekil 3.4). Mikropipetlerin içi 3 M KCl çözeltisi ile dolduruldu. Pipet direnci 5-10 Mohm olarak ölçüldü. Pipet direncini ve dinlenim membran potansiyelini ölçmek için MultiClamp 700 B bilgisayar kontrollü mikroeletrot amplifikatörü (Axon Instruments, Inc, USA) kullanıldı. Mikroeletrotlar mikromanüplatör yardımıyla kasın içine doğru ilerletildi ve banyo ortamına konan bir agar referans elektrotu aracılığıyla dinlenim membran potansiyeli ölçüldü (Şekil 3.5-6)



Şekil 3.4: Yatay mikroelektrot çekici.



Şekil 3.5: Mikroelektrot ile hücre içi kayıt alımı.



Şekil 3.6: Hücre içi kayıt alım sistemi.



### 3.8 Analiz

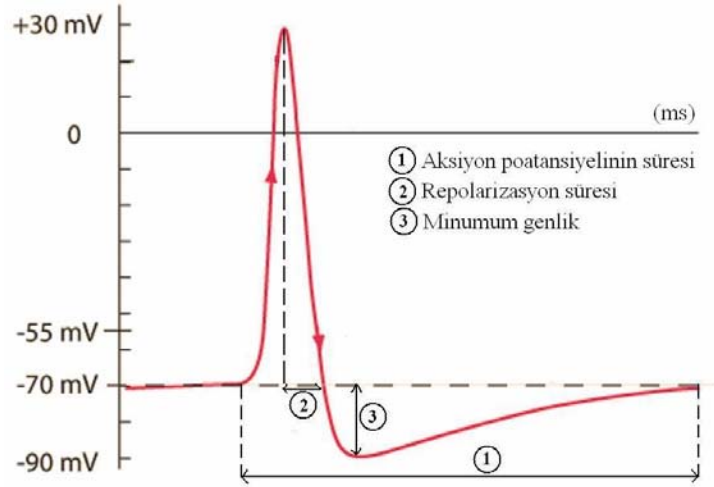
#### 3.8.1 Hücre Dışı Kayıtlar

Kaydedilen bileşik kas aksiyon potansiyelleri BIOPAC Acknowledge Analysis Software (ACK 100 W 5.7 version, USA) kullanılarak analiz edildi. Bu kayıtlardan aşağıdaki değişkenler değerlendirildi (Şekil 3.7):

**Aksiyon potansiyelinin süresi (ms):** Aksiyon potansiyelinin başladığı andan, dinlenme zar potansiyeline kadar geçen süre.

**Repolarizasyon süresi (ms):** Aksiyon potansiyelinin tepe değerinden dinlenme zar potansiyeline kadar geçen süre.

**Minimum genlik (mV):** Dinlenme zar potansiyeli ile aksiyon potansiyelinin minimum değeri arasındaki potansiyel değeri.



Şekil 3.7: Aksiyon potansiyeli.

#### 3.8.2 Hücre İçi Kayıtlar

Hücre içi kayıtlarda dinlenme zar potansiyeli ölçüldü.

**Dinlenme zar potansiyeli:** Kas hücresi dinlenme durumunda iken kayıtlanan potansiyel.

### 3.9 İstatistiksel Analiz

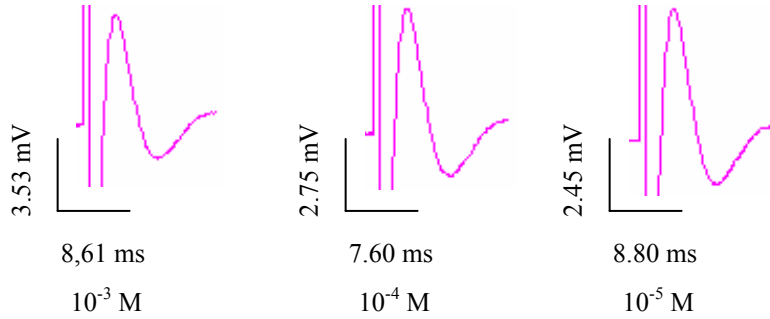
Verileri istatistiksel olarak SPSS 11.5 paket programı kullanılarak analiz edildi. Grafiklerin çiziminde ise STATISTICA 6.0 paket programından yararlanıldı. Değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı.

Cypermethrin ve permethrinin iskelet kası aksiyon potansiyeli ve dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileri tekrarlayan ölçümlü varyans analizi yöntemi kullanılarak saptandı. Gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılığın sınırı  $p < 0.05$  olarak belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Cypermethrin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Doza Ve Zamana Bağlı Etkileri

Cypermethrinin aksiyon potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Şekil 4.2-4 ise aynı bulguların grafik gösterimine karşılık gelmektedir. Çizelge ve grafiklerden görüldüğü gibi cypermethrinin, etkisi incelenen tüm dozlarında aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisi bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak 0 çizgisi altında kalan genliği temsil eden minimum genlik değerleri Cyp, $10^{-3}$ , hd ve Cyp, $10^{-4}$ , hd ve Cyp, $10^{-5}$ , hd gruplarında insektisit uygulama zamanına bağlı olarak daha negatif değerlere kaymıştır. İnsektisit, minimum genlik 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 iki konsantrasyon için 15, 30, 45 ve 60. dakikadaki minimum genlik değerleri ile kontrol değerleri (0. dk) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Cypermethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süresi ve repolarizasyon süresi üzerine doza bağlı olarak da önemli bir etkisinin olmadığı ( $p>0.05$ ) saptanmıştır. Minimum 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.



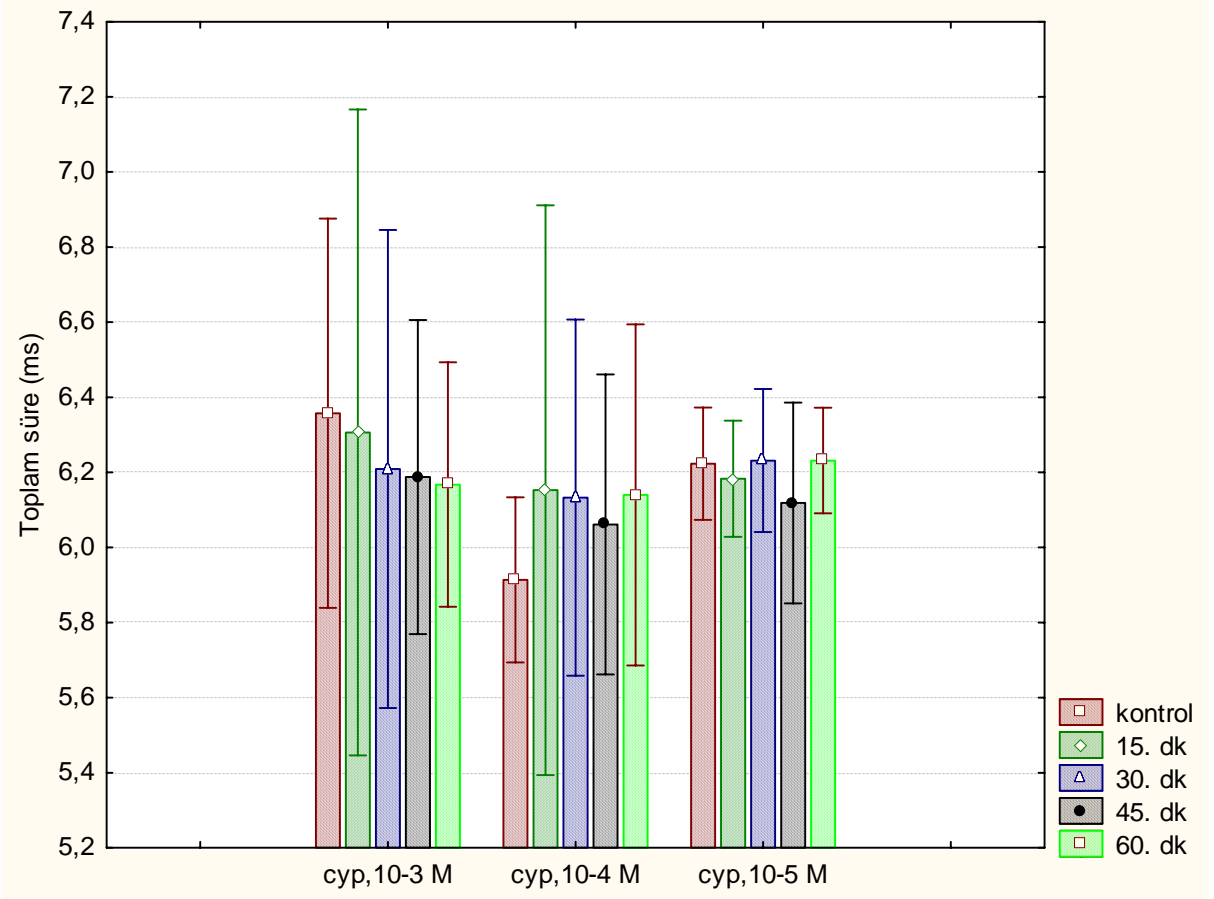
Şekil 4.1: Cypermethrin gruplarından elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları.

**Çizelge 4.1:** Cypermethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, ve minimum genliğin zamana ve doza bağlı değerleri.

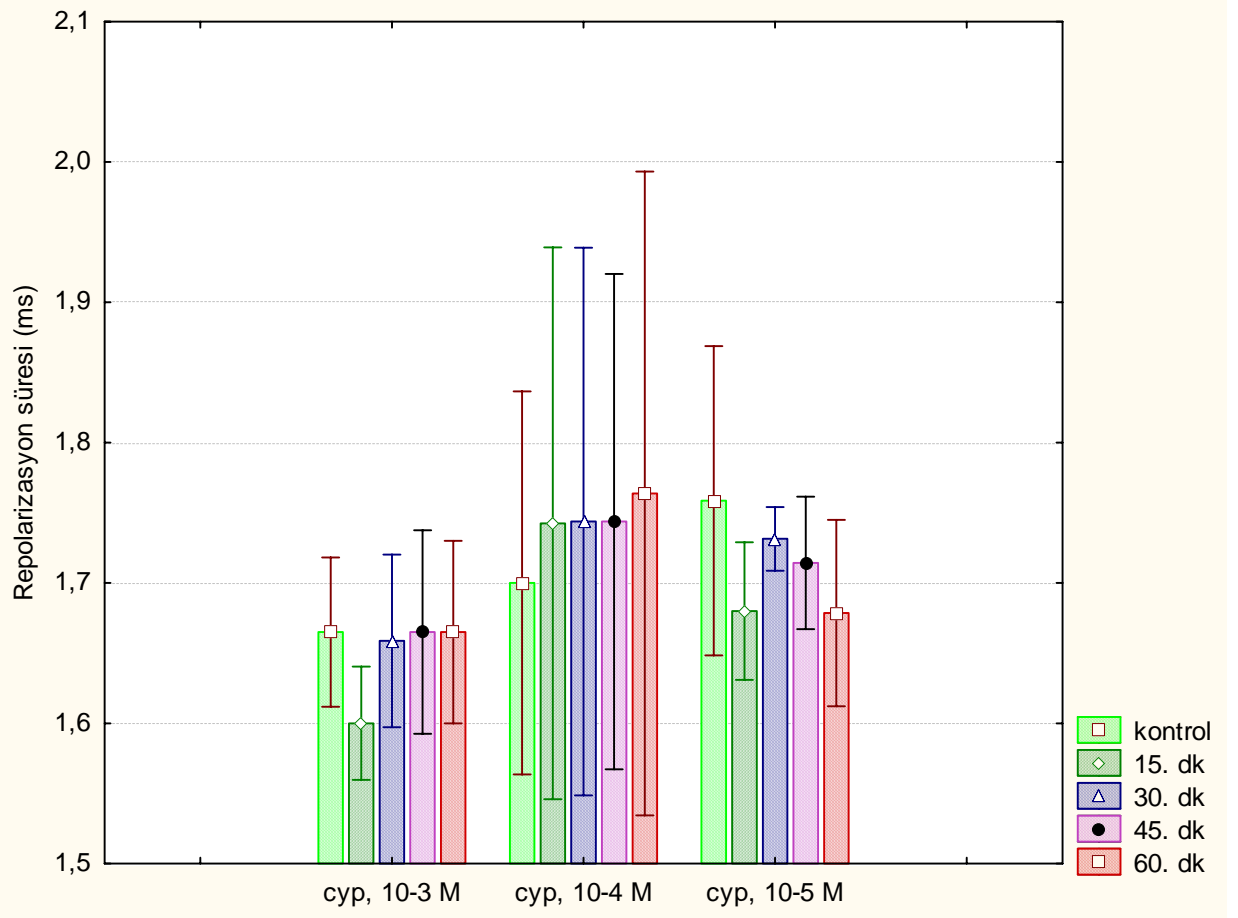
Zaman (dk)	Değişken	Cyp,10 <sup>-3</sup> , hd (n=8)	Cyp,10 <sup>-4</sup> , hd (n=8)	Cyp,10 <sup>-5</sup> , hd (n=8)
0	Toplam süre (ms)	6,22±0,14	5,91±0,21	6,35±0,51
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,66±0,53	1,70±0,13	1,75±0,11
	Minimum genlik (mV)	-1,96±0,68	-1,83±0,37	-1,5±0,19
15	Toplam süre (ms)	6,30±0,86	6,15±0,75	6,18±0,15
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,60±0,04	1,74±0,19	1,68±0,48
	Minimum genlik (mV)	-2,95±0,13*	-2,71±0,28*	-2,84±0,46*
30	Toplam süre (ms)	6,20±0,63	6,13±0,47	6,21±0,65
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,65±0,061	1,74±0,19	1,73±0,22
	Minimum genlik (mV)	-2,92±0,1*	-2,84±0,41*	-2,90±0,43*
45	Toplam süre (ms)	6,18±0,41	6,06±0,39	6,11±0,26
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,66±0,72	1,74±0,17	1,71±0,47
	Minimum genlik (mV)	-2,95±0,18*	-2,72±0,2*	-3,05±0,49
60	Toplam süre (ms)	6,16±0,32	6,14±0,45	6,23±0,14
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,66±0,65	1,76±0,22	1,67±0,66
	Minimum genlik (mV)	-2,87±0,19*	-2,90±0,44*+	-3,47±0,36*+

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

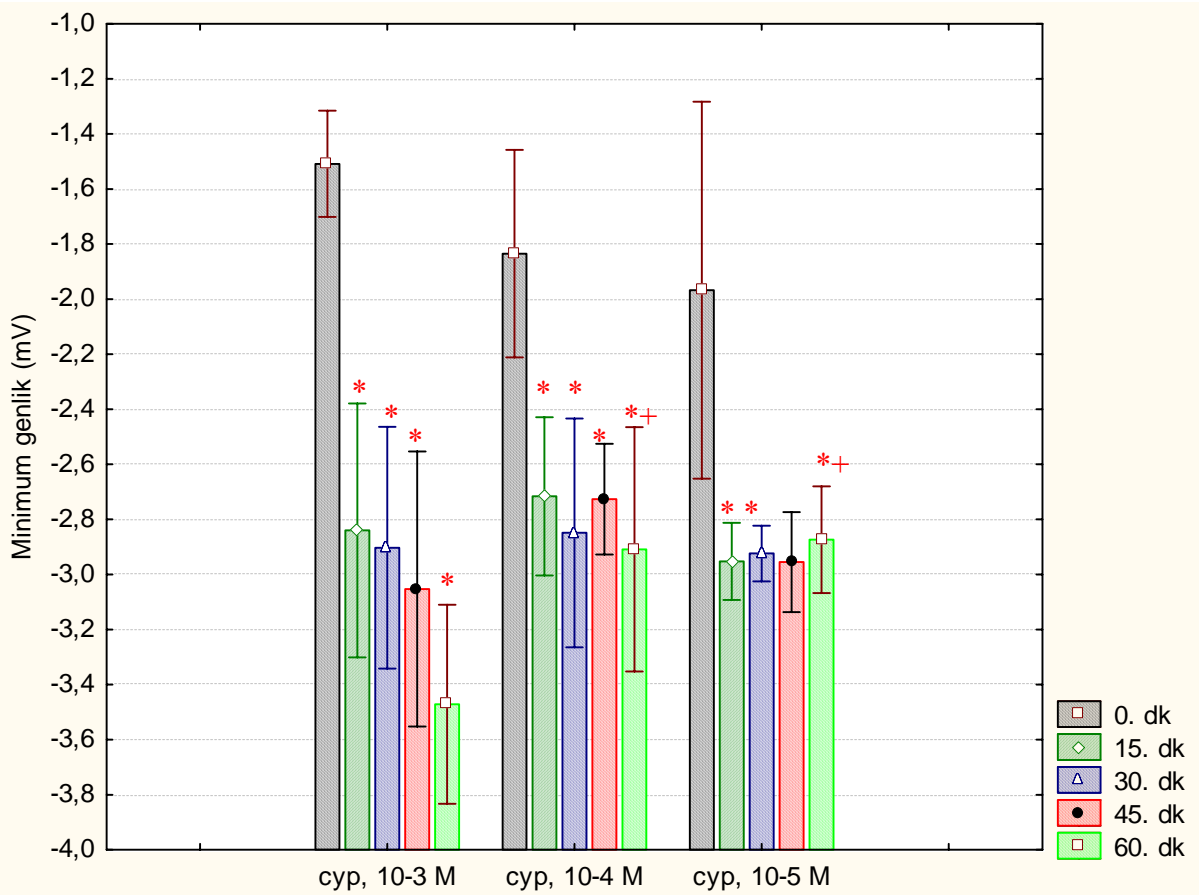
+ p<0.05 Karşılaştırmalar doza bağlı olarak, Cyp,10<sup>-3</sup>, hd grubuna göre yapılmıştır.



**Şekil 4.2:** Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin toplam süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS (standart sapma) olarak verilmiştir.



**Şekil 4.3:** Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.



**Şekil 4.4:** Cypermethrin için aksiyon potansiyelinin minimum genliğinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.

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

+ p<0.05 Karşılaştırmalar doza bağlı olarak, Cyp,10<sup>-3</sup>, hd grubuna göre yapılmıştır.

## 4.2 Cypermethrinin dinlenme zar potansiyeli üzerine etkileri

Cypermethrinin zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileri ile ilgili bulgular çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Şekil 4.5 ise aynı bulguların grafik gösterimine karşılık gelmektedir. Çizelgeden ve grafiklerden de görüldüğü gibi cypermethrinin dinlenme membran potansiyeli üzerine etkileri zamana ve doza ve bağlı olarak analiz edilmiştir. Cypermethrin uygulanması kurbağa iskelet kası dinlenme membran potansiyelini sadece Cyp,10<sup>-3</sup>, hi grubunda zamana bağlı olarak etkilemiştir. 0. dk ölçümleriyle karşılaştırıldığında Cyp,10<sup>-3</sup>, hi grubunda cypermethrin 15. dakikadan itibaren dinlenme membran 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 cypermethrinin 15 dakika ya da 60 dakika uygulanması arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Diğer doz gruplarında uygulama zamanına bağlı olarak dinlenim membran potansiyelinde kontrol değerlerine göre önemli bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Cypermethrinin dinlenim membran potansiyeli üzerine doza bağlı etkileri incelendiğinde 0. dakikada dinlenim potansiyelleri arasında fark olmadığı ancak 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda dinlenim potansiyelleri açısından gruplar arasında önemli fark olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). 0.dakika dışında ölçüm yapılan her zaman diliminde Cyp, $10^{-3}$ , hi grubunda zar potansiyeli Cyp, $10^{-4}$ , hi ve Cyp, $10^{-5}$ , hi gruplarına göre önemli miktarda daha negatif bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

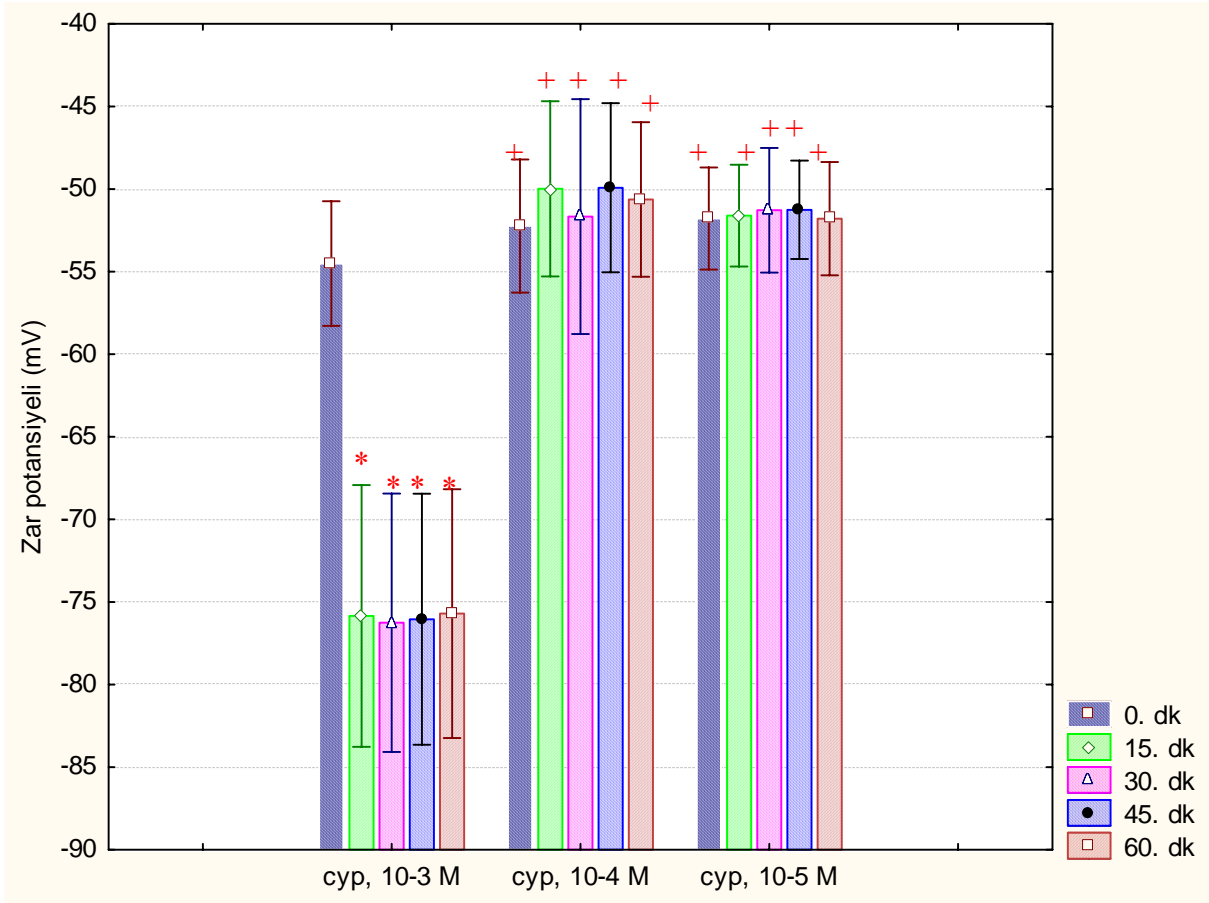
**Çizelge 4.2:** Cypermethrinin dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı değerleri.

Zaman (dk)	Değişken	Cyp, $10^{-3}$ , hi (n=8)	Cyp, $10^{-4}$ , hi (n=8)	Cyp, $10^{-5}$ , hi (n=8)
0	Zar potansiyeli (mV)	-54,51+3,77	-52,23+4,02 <sup>+</sup>	-51,78+3,77 <sup>+</sup>
15	Zar potansiyeli (mV)	-75,84+7,92*	-49,98+5,30 <sup>+</sup>	-51,61+3,08 <sup>+</sup>
30	Zar potansiyeli (mV)	-76,25+7,81*	-51,67+7,10 <sup>+</sup>	-51,28+13,17 <sup>+</sup>
45	Zar potansiyeli (mV)	-76,04+7,59*	-49,92+5,11 <sup>+</sup>	-51,25+2,97 <sup>+</sup>
60	Zar potansiyeli (mV)	-75,70+7,52*	-50,63+4,67 <sup>+</sup>	-51,80+3,43 <sup>+</sup>

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

+  $p<0.05$  Karşılaştırmalar doza bağlı olarak, Cyp, $10^{-3}$ , hi grubuna göre yapılmıştır.





**Şekil 4.5:** Cypermethrin için dinlenme zar potansiyelinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.

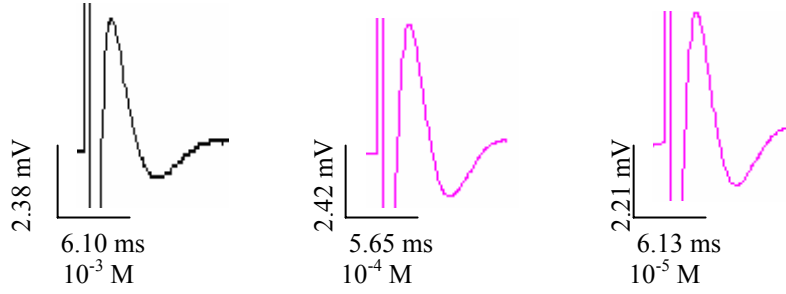
\*  $p < 0.05$ . Karşılaştırmalar zamana bağlı olarak, 0. dk'ya göre yapılmıştır.

+  $p < 0.05$  Karşılaştırmalar doza bağlı olarak, Cyp,  $10^{-3}$ , hi grubuna göre yapılmıştır.

### 4.3 Permethrinin Aksiyon Potansiyeli Üzerine Zamana Ve Doza Bağlı Etkileri

Permethrinin aksiyon potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Şekil 4.7-9 ise aynı bulguların grafik gösterimine karşılık gelmektedir. Çizelge ve grafiklerden görüldüğü gibi permethrinin 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 minimum genlik değerleri Per,  $10^{-3}$ , hd; Per,  $10^{-4}$ , hd ve Per,  $10^{-5}$ , hd grubunda insektisit uygulama zamanına bağlı olarak daha negatif değerlere kaymıştır. Insektisit, minimum genlik 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 minimum genlik değerleri ile kontrol değeri (0. dk) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Permethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süresi, repolarizasyon süresi ve minimum genliği üzerine doza bağlı olarak önemli bir etkisinin olmadığı ( $p > 0.05$ ) saptanmıştır.

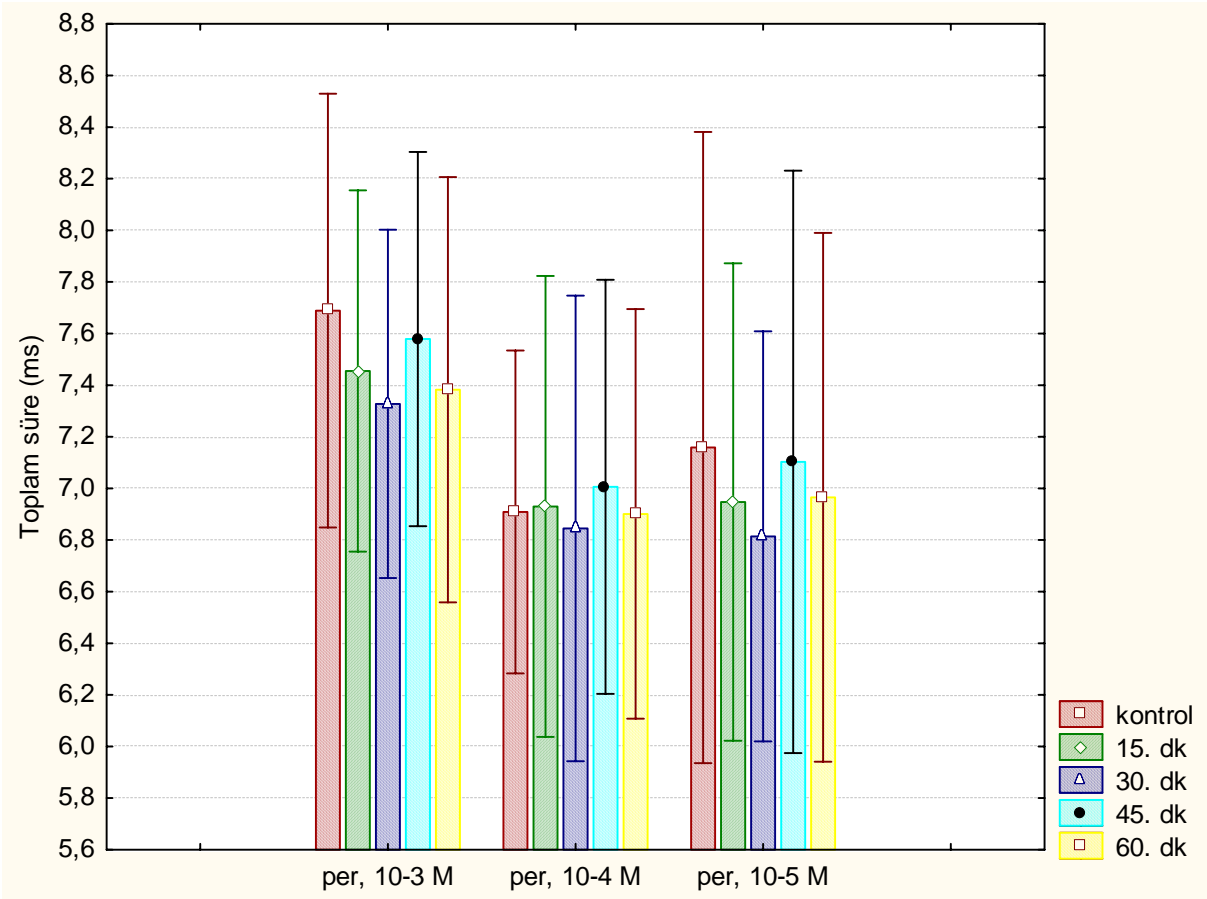


**Şekil 4.6:** Permethrin gruplarından elde edilen aksiyon potansiyeli kayıtları.

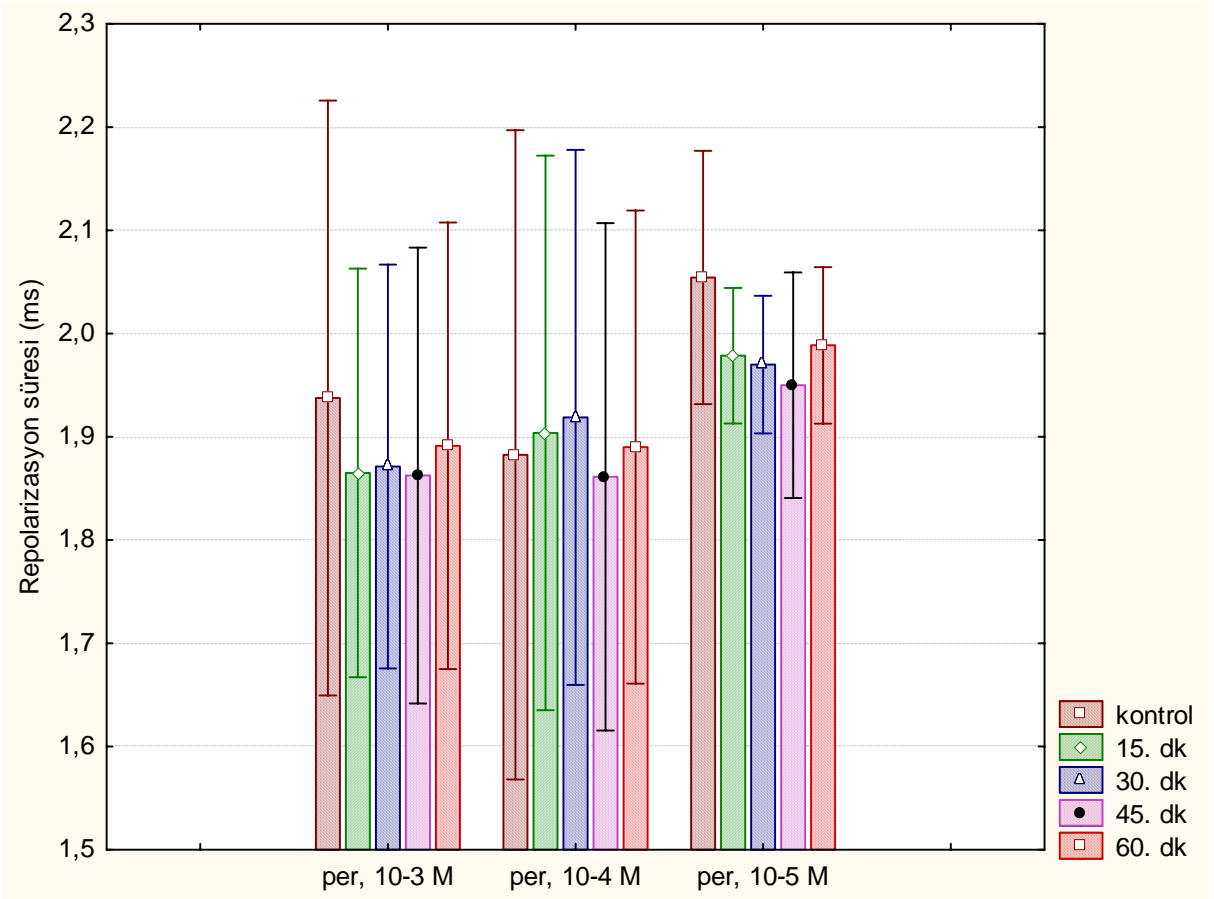
**Çizelge 4.3:** Permethrinin aksiyon potansiyelinin toplam süre, repolarizasyon süresi, ve minimum genliğin zamana ve doza bağlı değerleri.

Zaman (dk)	Değişken	Per,10 <sup>-3</sup> , hd (n=8)	Per,10 <sup>-4</sup> , hd (n=8)	Per,10 <sup>-5</sup> , hd (n=8)
0	Toplam süre (ms)	7,68±0,84	6,90±0,62	7,15±1,22
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,91±0,26	1,88±0,31	2,05±0,12
	Minimum genlik (mV)	-2,11±0,59	-1,61±0,44	-1,23±0,44
15	Toplam süre (ms)	7,45±0,69	6,93±0,89	6,94±0,92
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,84±0,20	1,90±0,26	1,97±0,65
	Minimum genlik (mV)	-2,92±0,10*	-2,77±0,48*	-2,75±0,63*
30	Toplam süre (ms)	7,32±0,67	6,84±0,90	6,81±0,79
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,86±0,17	1,91±0,25	1,97±0,66
	Minimum genlik (mV)	-2,95±0,11*	-3,01±0,59*	-2,74±0,46*
45	Toplam süre (ms)	7,57±0,72	7±0,80	7,1±1,12
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,84±0,19	1,86±0,24	1,95±0,10
	Minimum genlik (mV)	-2,91±0,13*	-2,81±0,55*	-2,92±0,45*
60	Toplam süre (ms)	7,38±0,82	6,90±0,79	6,96±0,86
	Repolarizasyon süresi (ms)	1,85±0,19	1,89±0,22	1,98±0,07
	Minimum genlik (mV)	-3,08±0,07*	-2,85±0,37*	-3,16±0,81*

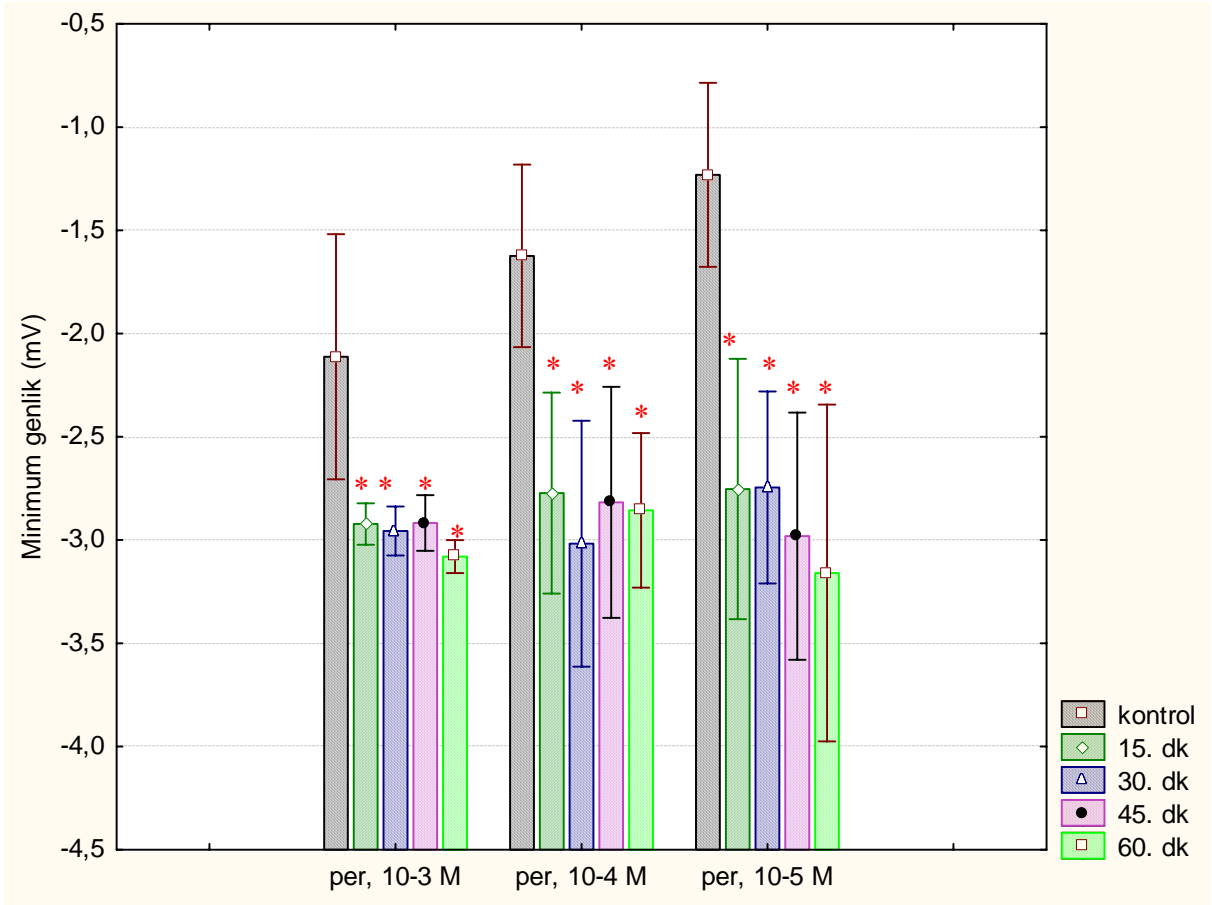
\* p<0.05. Karşılaştırmalar zamana bağlı olarak, 0. dk'ya göre yapılmıştır.



**Şekil 4.7:** Permethrin için aksiyon potansiyelinin toplam süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.



**Şekil 4.8:** Permethrin için aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.



**Şekil 4.9:** Permethrin için aksiyon potansiyelinin minimum genliğinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.

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

#### 4.4 Permethrinin Dinlenim Zar Potansiyeli Üzerine Zamana Ve Doza Bağlı Etkileri

Permethrinin dinlenim zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı etkileriyle ilgili bulgular çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Şekil 4.10 ise aynı bulguların grafik gösterimine karşılık gelmektedir.

Çizelgeden ve grafiklerden de görüldüğü gibi permethrinin dinlenim membran potansiyeli üzerine etkileri zamana ve doza ve bağlı olarak analiz edilmiştir. Permethrin uygulanması kurbağa iskelet kası dinlenim membran potansiyelini sadece Per,10<sup>-3</sup>, hi grubunda zamana bağlı etkilere yol açmıştır. 0. dk ölçümleriyle karşılaştırıldığında Per,10<sup>-3</sup>, hi grubunda permethrin 15. dakikadan itibaren dinlenim membran potansiyelinde etkisini

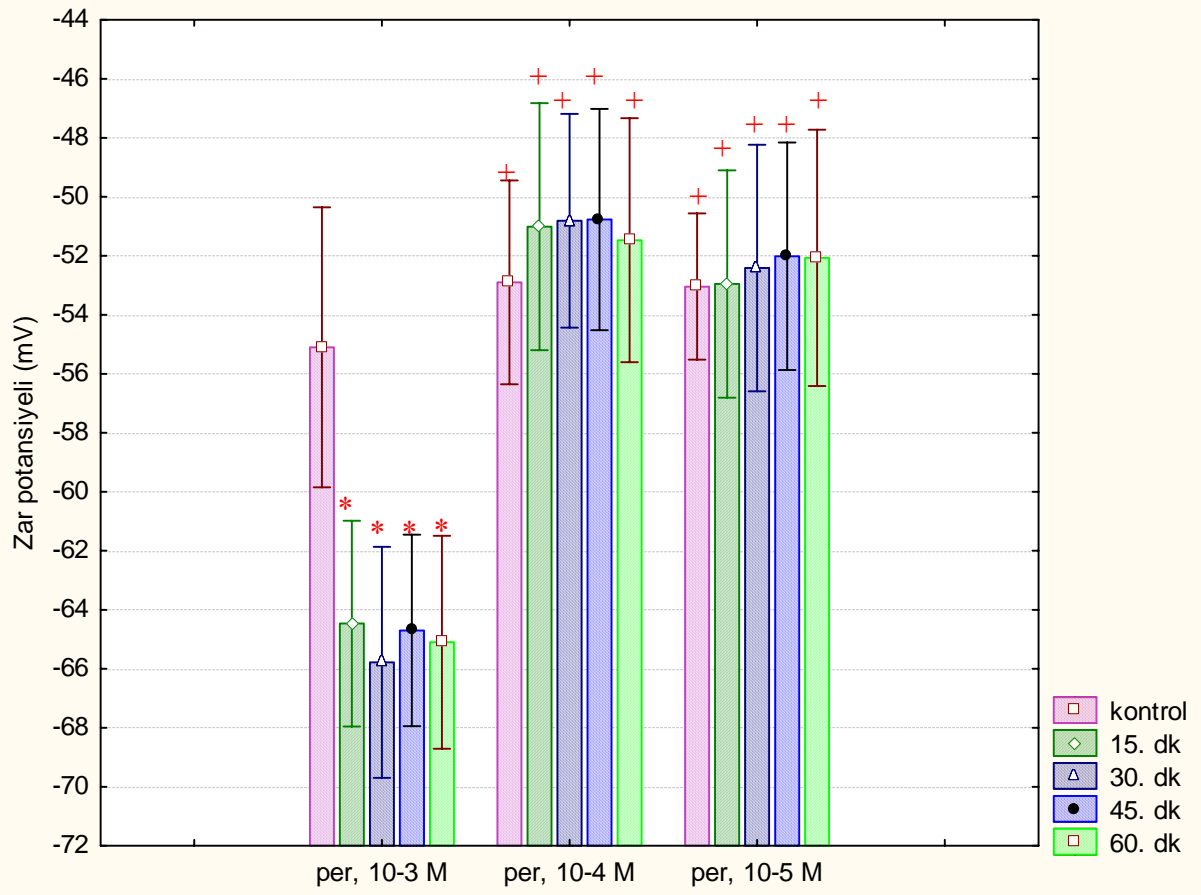
göstermiş, zar hiperpolarize olmuştur. Benzer etki 30, 45 ve 60. dakikalarda da gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu etkinin ölçüm yapılan tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Ancak permethrinin 15 dakika ya da 60 dakika uygulanması arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Diğer doz gruplarında zamana bağlı olarak dinlenme membran potansiyelinde kontrol değerlerine göre önemli bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Permethrinin dinlenme membran potansiyeli üzerine doza bağlı etkileri incelendiğinde 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda Per, $10^{-4}$ , hi ve Per, $10^{-5}$ , hi gruplarında dinlenme membran potansiyellerinin Per, $10^{-3}$ , hi grubundan önemli oranda farklı olduğu saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

**Çizelge 4.4:** Permethrinin dinlenme zar potansiyeli üzerine zamana ve doza bağlı değerleri.

Zaman (dk)	Değişken	Per, $10^{-3}$ , hi (n=8)	Per, $10^{-4}$ , hi (n=8)	Per, $10^{-5}$ , hi (n=8)
0	Zar potansiyeli (mV)	-55,10+4,74	-52,90+3,45 <sup>+</sup>	-53,04+2,47 <sup>+</sup>
15	Zar potansiyeli (mV)	-64,46+3,48 <sup>*</sup>	-51,01+4,18 <sup>+</sup>	-52,95+3,85 <sup>+</sup>
30	Zar potansiyeli (mV)	-65,78+3,91 <sup>*</sup>	-50,81+3,75 <sup>+</sup>	-52,41+4,17 <sup>+</sup>
45	Zar potansiyeli (mV)	-64,70+3,24 <sup>*</sup>	-50,77+3,62 <sup>+</sup>	-52,01+3,85 <sup>+</sup>
60	Zar potansiyeli (mV)	-65,10+3,60 <sup>*</sup>	-51,47+4,13 <sup>+</sup>	-52,07+4,34 <sup>+</sup>

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

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



**Şekil 4.10:** Permethrin için zar potansiyelinin doza ve zamana bağlı değişimleri. Veriler ortalama+SS olarak verilmiştir.

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

+ p<0.05 Karşılaştırmalar doza bağlı olarak, per,10<sup>-3</sup>, hi grubuna göre yapılmıştır.



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Mersin ve çevresi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan ve pyrethroid insektisit grubundan olan cypermethrin ve permethrinin iskelet kası potasyum kanal kinetikleri üzerine etkileri incelenmiş ve bu insektisitlerin hücre zarında sadece sodyum kanallarını değil, potasyum kanallarını da etkilediği düşünülmüştür.

Kanal kinetiklerini incelemek için günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem patch klamp yöntemidir. Ancak patch klamp yöntemine ek olarak hücre içi ve hücre dışı kayıt teknikleri kullanılarak da kanal kinetikleriyle ilgili bilgiler edinilebilir (18). Bu çalışmada pyrethroid insektisitlerin potasyum kanal kinetikleri üzerine etkilerini belirlemek için hücre dışı ve hücre içi kayıt teknikleri kullanılmıştır. Hücre dışı kayıt tekniği bileşik kas aksiyon potansiyelini kayıtlamak için kullanılırken, hücre içi kayıt tekniği dinlenme zar potansiyelini kayıtlamak için kullanılmıştır. Canlılarda sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde bilgi iletimi aksiyon potansiyeli aracılığı ile olur. Tüm hücreler dinlenme 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 dinlenme evresindeki değerine döner. Aksiyon potansiyelinin yükselme evresine depolarizasyon, düşme evresine ise repolarizasyon adı verilir. Depolarizasyon evresinden sinir hücrelerinde ve iskelet kas hücrelerinde sodyum iyonları sorumluyken repolarizasyon evresinden potasyum iyonları sorumludur (45). Aksiyon potansiyelinin genliğinin, süresinin, latansının ve iletim hızının ölçülmesi bize sodyum ve potasyum akımları hakkında bilgi verir. Aksiyon potansiyelinin maksimum genliği, iletim hızı ve depolarizasyon süresi ve toplam süresi, bize sodyum akımları ile ilgili bilgi verirken, repolarizasyon süresi, toplam süre ve başlangıç değerinin altında kalan genlik (minimum genlik) potasyum akımları ile ilgili bilgi verir (46).

Bu çalışmada pyrethroid insektisitlerin iskelet kası  $K^+$  kanalları üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflendiğinden aksiyon potansiyelinde  $K^+$  akımlarının sorumlu olduğu repolarizasyon süresi, minimum genlik ve toplam süre değerlendirmeye alınmıştır. Tip II pyrethroidleri temsil eden cypermethrinin izole kurbağa sartorius kasına uygulanması aksiyon potansiyelinin toplam süresini ve repolarizasyon süresini etkilemediği ancak

minimum genliği istatistiksel olarak önemli miktarda etkilediği gözlenmiştir. Benzer etki tip I pyrethroidleri temsil eden permethrin için de bulunmuştur. Aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresi açısından kontrol değerleri ile doz ve uygulama süresi grupları arasında istatistiksel olarak bir fark olmaması izole kurbağa iskelet kasında permethrin ve cypermethrinin bu evreden sorumlu olan gecikmiş doğrultucu tip potasyum kanallarını etkilemediğini düşündürmektedir. Bilindiği gibi uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresinden sorumlu olan iyon kanalı gecikmiş doğrultucu potasyum kanallarıdır (8, 47, 48). Bu kanallar voltaj bağımlıdır. Kaydedilen aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresi ve toplam süresi istatistiksel olarak önemli miktarda değişmemesine rağmen minimum tepe noktası daha negatif değerlere kaymıştır. Repolarizasyon evresinde olduğu gibi, dinlenim evresinin sürdürülmesinden sorumlu olan iyon akımı yine potasyum akımıdır. Ancak burada gecikmiş doğrultucu potasyum akımlarından çok içeri doğrultucu, ya da anormal doğrultucu adı verilen potasyum kanalları önemli rol oynamaktadır. İçeri doğrultucu potasyum kanalları diğer potasyum kanallarından farklı olarak depolarizasyonla değil, hiperpolarizasyonla aktive olur. Bu nedenle bu tip potasyum kanalları anormal doğrultucu potasyum kanalları olarak isimlendirilirler(48). Bu çalışmada permethrin ve cypermethrin uygulanması minimum genliğin daha negatif değerlere kaymasına neden olmuştur. Bu sonuç her iki pyrethroid insektisin içeri doğrultucu potasyum kanallarını etkilediği ve daha çok potasyum iyonunun hücre dışına çıkarak hiperpolarizasyonu arttırdığını düşündürmektedir. Benzer bulgular mikroeletrot kullanılarak kaydedilen dinlenim zar potansiyeli ölçümlerinden de elde edilmiştir. Permethrin ve cypermethrin uygulanması dinlenim zar potansiyelinin daha negatif değerlere kaymasına neden olmuştur. Yani permethrin ve cypermethrin zarın hiperpolarize olmasına neden olmuştur. Ancak bu etki her iki insektisit için sadece  $10^{-3}$  M konsantrasyonda gözlenmiştir.  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  M'lık konsantrasyonlarda zar potansiyelinde kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p>0.05$ ). Kurbağa sartorius kasında hem hücre dışı hem de hücre içi kayıt teknikleri kullanılarak yapılan ölçümlerde birbirini destekleyen bulguların elde edilmesi her iki pyrethroid insektisitinin içeri doğrultucu potasyum kanallarını etkileyerek daha fazla potasyum iyonunun hücre dışına çıkmasına yol açtığı bulgumuzu güçlendirmektedir. Ancak

elimizdeki bulgularla daha fazla potasyum iyonunun dışarı çıkması uygulanan insektisitlerin kanalın kinetik özelliklerini hızlandırmalarından mı yoksa kanalın daha uzun süre açık kalmasına yol açmalarından mı kaynaklanmaktadır? sorularının yanıtını vermek biraz güç olacaktır. Bunun için ek çalışmalara gereksinim vardır.

Pyrethroid insektisitler böceklerde ve memelilerde etkilerini sinir membranındaki sodyum kanallarının aktivasyonu ve inaktivasyonunu yavaşlatarak gösterdiklerinden bu insektisitlerle ilgili çalışmalar daha çok sinir sistemi ve sodyum kanalları üzerine yoğunlaşmıştır (49, 50, 51, 52). Literatürde pyrethroid insektisitlerin iskelet kaslarında potasyum kanal kinetikleri üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sonuçlarımızı doğrudan karşılaştırma olanağı olmamıştır. Yapılan literatür taramasında pyrethroidlerin potasyum akımları üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. de La Cerda ve arkadaşları tarafından kedi kalp kası hücrelerinde yapılan bu çalışmada izole hücrelere tip II pyrethroidlerden deltametrin 1  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanmış, tüm hücre ve perfore patch clamp yöntemleri kullanılarak içeri doğrultucu ve gecikmiş doğrultucu potasyum akımları ölçülmüştür (53). Uygulanan konsantrasyonlardaki deltametrinin içeri doğrultucu potasyum akımı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada izole kedi kalbi hücrelerine deltametrinin 1 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları uygulanmış ve gecikmiş doğrultucu potasyum akımları kaydedilmiştir. Bu kayıtlarda 1  $\mu\text{M}$  deltametrinin gecikmiş doğrultucu akımlarda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenirken 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda bu akımın önemli miktarda azaldığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda kurbağa iskelet kası aksiyon potansiyeli ve dinlenim zar potansiyeli ölçümlerinden yaptığımız çıkarımlar sonucunda cypermethrin ve permethrinin gecikmiş doğrultucu potasyum akımlarını etkilemediği, içeri doğrultucu potasyum akımlarında ise bir artışa neden olduğunu düşündük. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın nedenlerinden biri kullanılan preparatların farklılığı olabilir. İki çalışmada kullanılan preparatlar hem tür açısından hem de doku açısından farklılık göstermektedir. Biz çalışmamızda pyrethroidlerin etkisini göstermek için kurbağa iskelet kasını kullanırken de La Cerda ve arkadaşları kedi kalp kası hücrelerini kullanmışlardır.

Pyrethroid insektisit-potasyum akımı ilişkisini inceleyen bir başka çalışma örneği Wang ve arkadaşları tarafından *Helicoverpa Armigera* (pamuğa zarar veren bir böcek türü)'

nın merkezi sinir sistemi hücrelerinde yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada sinir hücrelerine pyrethroid insektisitlerden cyhalotrin  $10^{-5}$  mmol/L ve  $10^{-7}$  mmol/L dozlarında uygulanmış ve bu dozlardaki cyhalotrinin geçici dışarı potasyum akımları üzerine etkileri incelenmiştir (54). Uygulama sonucunda  $10^{-7}$  mmol/L cyhalotrinin geçici dışarı potasyum akımı üzerine herhangi bir etkisi olmazken  $10^{-5}$  mmol/L de bu akımlar bir miktar inhibe olmuştur. Ancak inhibisyon istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Burada sunulduğu gibi pyrethroid insektisitlerin potasyum kanalları üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bizim çalışmamızla birlikte de La Cerda ve Wang'ın çalışmaları bu insektisitlerin hedef ve hedef olmayan organizmalarda sodyum kanalları üzerine etkilerine ek olarak potasyum kanallarını da etkileyebileceği konusunda ipuçları vermektedir. Bilindiği gibi iyon kanalları içerisinde en fazla çeşitliliğe sahip iyon kanalı potasyum kanallarıdır ve şimdiye kadar 150 den fazla potasyum kanal geni tanımlanmıştır (19). Bu alanda hem patch klamp yöntemini kullanarak hem de sayıları her geçen gün artan potasyum kanal blokerlerinden yararlanarak pyrethroid insektisitlerin farklı potasyum kanalları üzerine etkilerinin ayrıntılı olarak çalışılmasına gereksinim vardır. Bu çalışmalar ülkemizde ve ilimizde üretimi arttırmak adına oldukça yoğun ve bilinçsizce kullanılan insektisitlerin etkileriyle ilgili bilgi birikimini arttıracak ve bunların tüketimiyle ilgili daha fazla önlem alınmasına katkı sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Mersin ili ve çevresi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan pyrethroid insektisitlerden cypermethrin (tip II) ve permethrinin (II) kurbağa iskelet kası potasyum kanal kinetikleri üzerine doza ve zamana bağlı etkileri, hücre dışı ve hücre içi kayıt yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

Çalışma sonucunda:

1. Cypermethrin ve permethrinin kurbağa iskelet kası potasyum kanallarını etkilediğine dair ipuçları elde edilmiştir.
2. Bu etkiler dozdaki artışa bağlı olarak artmıştır.
3. Uygulama süresinin artması insektisit etkisini değiştirmemiştir.
4. Kurbağa iskelet kası potasyum kanallarını etkileme dereceleri açısından her iki insektisit arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Pyrethroid insektisitlerin potasyum kanalları üzerine etkilerinin belirlenmesi bir çok nedenden dolayı önemlidir. Potasyum iyonları zarda çok çeşitli potasyum kanalları üzerinden taşınmaktadır. Bu taşınımı etkileyecek herhangi bir faktör potasyum kanal akımlarını etkileyecek, bu da vücutta potasyum iyonlarının sorumlu olduğu işlevlerin bozulmasına neden olacaktır. Bu nedenle bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz ipuçları ile ilgili daha ayrıntılı bilgi edinilmesine gereksinim vardır. Bu konudaki çalışmalara patch klamp tekniği kullanılarak ve insektisit-potasyum akımı ilişkisi kantitatif olarak incelenerek devam edilmesi planlanmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **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): 127-133.
2. **Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrance LJ.** Mechanisms of selective action pyrethroid insecticides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1983**; 23:413-438.
3. **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):293-298.
4. **Desi I, Dobronyi I, Varga L.** Immuno, neuro and general toxicologic animal studies on a synthetic pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol Environ Saf*, **1986**; 12(3): 220-232.
5. **Ecobichon DJ, Davies JE, Doull J, Ehrich 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**: 131-199.
6. **Eldefrawi AT, Eldefrawi ME.** Receptors for gama aminobutyric acid and voltage dependent chloride channels as target for drugs and toxicants. *FASEB J*, **1987**; 1:262-271.
7. **Gammon DW.** Correlations between in vitro and in vivo mechanisms of pyrethroid insecticide action. *Fundam Appl Toxicol*. **1985**; 5(1): 9-23.
8. **Gordon T, Amdur MO.** Responses of the respiratory system to toxic agents. In: Amdur MO, Daull J, Curtis Eds. *Casarett and Daull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Toronto: Mc Graw Hill Company Pergamon Press, **1991**: 383- 407.
9. **Lawrance LJ, Casida JE.** Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gama aminobutyric acid receptor ionophore complex. *Science* **221**, **1983**; 1399-1401.
10. **Narahashi T.** Cellular and molecular mechanism of action of insecticides: neurophysiological approach. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **1982**; 4(6):753-758.
11. **Narahashi T.** Effects of toxic agents on neural membranes. In Lowndes HE, Boca Raton FL. Eds. *Electrophysiology and Neurotoxicology*, Philadelphia: CRC Press, **1987**: 23.
12. **Terlau H, Stühmer W.** Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Naturwissenschaften*, **1998**; 85, 437-444.
13. **Guyton AC, Hall JE.** *Tıbbi Fizyoloji (Textbook of Medical Physiology)*, 10. Baskı İstanbul: Yüce Yayınları A.Ş. – Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti, **2001**: 9-10
14. Membran Dinamikleri. Erişim:  
[http://www.baskent.edu.tr/~scanan/dersler2005/donem1/03\\_zar\\_dinamik.pdf](http://www.baskent.edu.tr/~scanan/dersler2005/donem1/03_zar_dinamik.pdf) Erişim tarihi: 15. 05. 2007.
15. **Unwin N.** Nicotinic acetylcholine receptor at 9Å resolution. *J Mol Bio*, **1993**; 229 :1101.
16. **Li M, Unwin N, Stauffer KA, Jan YN, Jan LY.** Images of purified Shaker potassium channels. *Curr Biol*, **1994**; 4 :110.

17. **Antz C, Geyer M, Fakler B, Schott MK, Guy HR, Frank R, Ruppersberg JP, Kalbitzer HR.** NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature*, **1997**; 385:272.
18. Methods for study of ion channel. Erişim: [www2.montana.edu/cftr/IonChannelPrimers/methods\\_to\\_study\\_ion\\_channels.htm](http://www2.montana.edu/cftr/IonChannelPrimers/methods_to_study_ion_channels.htm) Erişim Tarihi: 20.05.2007
19. **Korn SJ, Trapani JG.** Potassium channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, **2005**; 4(1): 21-33.
20. **Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R.** The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, **1998**; 280: 69-77.
21. **Cristopher M.** An overview of the potassium channel family Erişim: <http://genomebiology.com/2000/1/4/reviews/0004.1> Erişim Tarihi: 20.05.2007
22. Voltage-Gated Calcium Channels. Erişim: <http://calcium.ion.ucl.ac.uk/3d-structure.html> Erişim Tarihi:15.05.2007
23. **Fain GL.** *Molecular and Cellular Physiology of Neurons*. London: Harvard University Press, **1999**: 213-237
24. Bioelectromagnetism. Erişim: <http://butler.cc.tut.fi/~malmivuo/bem/bembook/> Erişim tarihi:15. 05. 2007.
25. **Hodgkin AL, Huxley AF.** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, **1952**; 117: 500-44.
26. **Valentine MW.** Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, **1990**; 20(2): 375-381
27. **Casida JE.** Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*, **1980**; 34: 189-202
28. **Elliot M.** Established pyrethroid insecticides. *Pestic Sci*, **1980**; 11: 119-128
29. **Lawrence LJ, Casida JE.** Pyrethroid toxicology: Mouse intracerebral structure-toxicity Relationship. *Pestic Biochem Physiol*, **1982**; 18:9-14
30. **Verschoyle RD, Aldridge WN.** Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.*, **1980**; 45: 325-329.
31. **Hossain MM, Awal MA, Kobayashi H, Talukder MH.** Therapeutic evaluation of cypermethrin against ticks and lice with their haematobiochemical changes in cattle. *Bangladesh Vet J*, **2001**; 35: 39-43.
32. **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: 933-940.
33. **Gassner B, Wuthrich A, Scholtysik G, Solioz M.** The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J Pharmacol Exp Ther*, **1997**; 281:855-860.
34. **Gray AJ.** Pyrethroid structure-toxicity relationships in mammals. *Neurotoxicology*, **1985**; 6:127-37.
35. **Vijverberg HP, van den Bercken J.** Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit Rev Toxicol*, **1990**; 21: 105-126.

36. **Narahashi T.** Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. *Neurotoxicology*, **1985**; 6(2):3-22.
37. **Vijverberg HP, de Weille JR.** The interaction of pyrethroids with voltage-dependent on Na channels. *Neurotoxicology*. **1985**; 6: 23-34.
38. **Narahashi T.** Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* **1996**; 78: 1-14.
39. Permethrin. Erişim: <http://www.pesticide.org/Permethrin.pdf> Erişim Tarihi: 15.05.2007
40. **Greulich K, Pflugmacher S.** Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in embryos and tadpoles of amphibians. *Arch Environ Con Tox*, **2004**; 47: 489-495.
41. **Lajmanovich R, Lorenzatti E, de la Sierra P, Marino F, Stringhini G, Peltzer P.** Reduction in the mortality of tadpoles (*physalaemus bigillonigerus*; amphibia: leptodactylidae) exposed to cypermethrin in presence of aquatic ferns. *Fresen Environ Bul*, **2003**; 12: 1558-1561.
42. **Khan MZ, Tabassum R, Rahila N.** Effect of cypermethrin and permethrin on cholinesterase activity and protein contents in *Rana tigrina* (amphibia). *Turk J Zool*, **2003**; 27: 243-246.
43. **Shakoori AR, Ali SS, Saleem MA.** Effects of six months feeding of cypermethrin on the blood and liver of albino rats. *J Biochem Toxicol*, **1988**; 3: 59-71.
44. **Cömelekoglu U, Ozge A, Coşkun B.** Mode of acute action of cypermethrin on peripheral nerves. *J Appl Toxicol*, **2002**; 22(6):445-7.
45. **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
46. **Daube JR,** Clinical Neurophysiology. Philadelphia: F.A. Davis, **1996**: 60-80.
47. **Ascroft FM,** *Ion channels and Disease*, Toronto: Academic press, **2000**: 97-107,
48. **Hille B.** *Ionic Channels of excitable Membranes*. Massachusetts: Sinauer Associates. **1992**: 115-139
49. **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**: 1263-1288.
50. **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**: 1289-1303.
51. **Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D.** Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, **2002**;171:3-59.
52. **Motomura H, Narahashi T.** Interaction of tetramethrin and deltamethrin at the single sodium channel in rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology*, **2001**; 22(3): 329-39.
53. **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.



54. **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: 13-17

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Fatma Söğüt  
**Doğum Tarihi** : 22 / 08 / 1978  
**Doğum Yeri** : İzmir  
**Medeni Hali** : Evli  
**İletişim** : fatmasogut@gmail.com  
**Telefon** : 0 505 801 76 55  
**Adres** : Palmiye Mah.  
1203 S. No: 6/5 Söğüt Apt.  
Mersin

### Eğitim:

Yıl		Kurum	Aldığı Derece
Başlama	Mezuniyet		
1995	2000	Ege Üniversitesi Fizik Bölümü	Lisans
2003	-	Mersin Üniversitesi Biyofizik A.D.	Yük. Lis. Devam Ediyor.

**Araştırma Alanı:** Biyofizik

**Bildiği Yabancı Dil:** İngilizce