

İndoksakarb'ın İzole Kurbağa İskelet Kası Üzerine Etkisi

Effect of Indoxacarb on Isolated Frog Skeletal Muscle

Ülkü ÇÖMELEKOĞLU,^a
Ebru BALLI,^b
Serap YALIN,^c
Fatma SÖĞÜT,^d
Selma YAMAN,^e
Pelin EROĞLU,^f
Mehmet BERKÖZ^g

^aBiyofizik AD,

^bHistoloji-Embriyoloji AD,
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,

^cBiyokimya AD,
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,

^dPerfüzyon AD,
Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu,
Mersin

^eBiyofizik AD,
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Kahramanmaraş
^fKimya Bölümü,
Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,
Mersin

^gFarmasötik Teknoloji AD,
Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi,
Van

Geliş Tarihi/Received: 23.05.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 23.06.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:

Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyofizik AD, Mersin,
TÜRKİYE/TURKEY
ucomelek@yahoo.com

Bu çalışmanın bir bölümü 19. Ulusal Biyofizik Kongresi (5-7 Eylül 2007, Konya)'nde poster olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: Sodyum kanal blokleri insektisitlerden indoksakarb, tarım alanlarında böceklerin kontrolünde yaygın olarak kullanılır ve böceklerde beslenmeyi durdurup, koordinasyonu bozarak, felç ve ölüme yol açarak etkisini gösterir. Bu çalışmada, indoksakarbin kurbağa iskelet kası üzerine etkisinin biyofiziksel, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** On altı Rana ridibunda türü kurbağa kontrol ve deney olmak üzere iki gruba bölünmüş (her grupta n=8) ve sartorius kasları izole edilmiştir. Deney grubundaki izole kaslar 1 saat 10 µM indoksakarb ile inkübe edilmiştir. Her bir grupta bileşik kas aksiyon potansiyeli ve kas kontraksiyonu kayıt edilmiş, katalaz (CAT) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyi ölçülmüş ve kas örnekleri transmisyon elektron mikroskop ile incelenmiştir. **Bulgular:** Aksiyon potansiyelinin genliği ve kontraksiyon kuvveti deney grubunda kontrole göre düşük bulunur iken (p<0,05), aksiyon potansiyelinin süresi deney grubunda kontrole göre daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Kontraksiyon süresi açısından deney grubu ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir (p>0,05). CAT ve MDA düzeyleri deney grubunda kontrole göre önemli miktarda artmıştır (p<0,05). Elektron mikroskopik olarak deney hem de kontrol grubundaki kas liflerinde normal morfolojik özellikler gözlenmiştir. **Sonuç:** Bu sonuçlar indoksakarbin hedef olmayan canlılarda iskelet kasında toksik etkiye yol açabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kas lifleri, iskeletsel; indoksakarb; aksiyon potansiyelleri; oksidatif stres

ABSTRACT Objective: Indoxacarb which is the sodium channel blocker insecticide, causes cessation of feeding, poor coordination, paralysis and death in wide range of agriculturally important pests. The aim of this study to investigate the effects of indoxacarb on frog skeletal muscle by using biophysical, biochemical and histological techniques. **Material and Methods:** Six-teen Rana ridibunda frogs were divided into two groups [control and experimental (n=8 for each group)] and sartorius muscles were isolated. Isolated muscles in the experimental group were treated with the indoxacarb at the dose of 10 µM for an hour. In each group, compound muscle action potential and muscle contraction were recorded. Catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) level were measured. Muscle samples were examined at transmission electron microscopic level. **Results:** Amplitude of action potential and contraction force was significantly lower than in the control group (p<0.05). Duration of action potential was significantly higher than in the control group (p<0.05). There was no significant difference between control and experimental groups for contraction time (p>0.05). CAT and MDA levels significantly increased in the experimental group as compared with control group (p<0.05). Ultrastructurally, the sartorius muscle cells have normal morphological features in control and experimental group. **Conclusion:** This results thought that indoxacarb may cause myotoxic effects in non target organisms.

Key Words: Muscle fibers, skeletal; indoxacarb; action potentials; oxidative stress

Türkiye Klinikleri J Lab Anim 2017;1(1):13-9

İndoksakarb (S)-methyl 7-chloro-2,5-dihydro-2-[[[(methoxycarbonyl) [4-(trifluoromethoxy) phenyl]amino]carbonyl] indeno[1,2-e][1,3,4]oxadiazine-4a(3H) carboxylate) oksadiyazin grubundan bir insektisit olup domates, pamuk, fındık ve elma üreticiliğinde verimi artırmak için kulla-

nılmaktadır. Böcek öldürme gücünün yüksek, hedef olmayan organizmalardaki toksik etkisinin ise düşük olduğu bildirilmiştir. Etkisini hem böceklerin hem de memelilerin voltaj duyarlı sodyum kanallarını bloke etmesiyle göstermektedir.¹ İndoksakarbin böceklerin yanı sıra hedef olmayan organizmaların sodyum kanallarını etkilemesi bu canlılarda da toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu bileşik, hiperpolarize membran potansiyelini etkilememekte, ancak depolarize membranlarda geri dönüşümsüz blokajlara neden olmaktadır.²⁻⁶

Voltaj bağımlı sodyum kanalları sinir ve kas gibi uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlamasından sorumludur. Sodyum kanal proteini alfa ve beta alt birimlerinden oluşmaktadır. Alfa alt birimi kanalın temel yapısını oluştururken, beta alt birimi düzenleyici olarak rol oynamaktadır. Alfa alt birimi birbirine identik dört alt birimden (I-IV) oluşmaktadır. Her alt birim hücre zarını enlemesine geçen altı (S1-S6) transmembran segmenti içermektedir. S4 segmenti voltaj sensörü olarak görev yapar iken, S5 ve S6 segmentleri kanal porunu şekillendirmek üzere birbirlerine P halkasıyla bağlanmaktadır. S4 segmenti yüklü aminoasitlerden oluşmuştur. Depolarizasyona bağlı olarak bu yükler etkilenmekte ve segment yer değiştirerek kanal porunun açılmasını sağlamaktadır.⁷ Bu kanallar anestezi maddeler, doğal ve sentetik toksinler ve insektisitler için önemli bir hedeftir.⁸ Sodyum kanal blokeri insektisitler son yıllarda tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır ve indoksakarbin bu grubun ticari olarak kullanılmaya başlanan ilk üyesidir.⁶ Ülkemizde kullanılan tarım ilaçlarının yaklaşık %30'u örtü altı üreticiliğin yaygın olduğu Adana ve Mersin bölgesinde tüketilmektedir. Kullanılan bu ilaçlar bir taraftan uygulayıcılar, yöre halkı ve tüketicilere zarar verirken diğer taraftan su kaynakları, toprak, hava gibi ekosistemin diğer unsurlarını da kirleterek diğer canlılar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturmaktadır.⁹ Bu nedenle bu insektisitlerin diğer insektisitler gibi hedef olmayan canlılardaki etkilerinin kapsamlı olarak araştırılması hem insan sağlığı açısından hem de ekolojik dengenin daha fazla bozulmasının önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

İndoksakarbin hedef olmayan canlılardaki toksik etkilerine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. İnsanlarda en sık görülen etkisi methemoglobinemidir.^{10,11} Ayrıca Viswanathan ve ark. tarafından sunulan bir olguda indoksakarbin zehirlenmesinin solunum sıkıntısının da eşlik ettiği periferik nöropati ve turuncu idrar bulgularının da ortaya çıktığı bildirilmiştir.¹² Tsurubuchi ve Kono ile Zhao ve ark. tarafından sıçan dorsal kök ganglion hücrelerinde yapılmış iki çalışmada, indoksakarbin bu hücrelerde voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke ettiği bulunmuştur.^{4,13} Yine Zhao ve ark.'nın 1999 yılında yaptığı bir başka çalışmada ise indoksakarbin memeli sinir hücrelerinde nikotinik asetilkolin reseptörlerini etkilediği gösterilmiştir.¹⁴ Bilgilerimize göre, literatürde indoksakarbin insektisitinin hedef olmayan canlıların iskelet kası üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, indoksakarbin kurbağa sartorius kas modelinde bileşik kas aksiyon potansiyeli, kasılma aktivitesi, antioksidan sistemi ve morfolojisi üzerine akut etkisi elektrofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KİMYASALLAR

Deneylerde indoksakarbin "STEWART" isimli ticari preparatı kullanıldı (DuPont Türkiye Kimyasal Ürünler San. ve Tic. A.Ş.; CAS-No: 173584-44-6). Uygulama dozunun seçiminde literatür temel alındı.^{2,11}

PREPARAT HAZIRLAMA

Bu çalışmada, ortalama ağırlıkları 52,34±4,79 g olan 16 adet *Rana ridibunda* türü kurbağa kullanıldı. Kurbağalar her grupta sekiz hayvan olacak şekilde, kontrol grubu ve deney grubu olarak rastgele iki gruba bölündü. Her iki gruptaki hayvanların sartorius kasları izole edildi. Deney grubundaki kaslar 1 saat 10 µM indoksakarbin ile inkübe edildi.

KASIN ELEKTRİKSEL VE MEKANİK AKTİVİTESİNİN KAYITLANMASI

Kontrol grubunda kasın mekanik aktivitesini kayıtlamak için izole kurbağa sartorius kasları, içinde Ringer çözeltisi bulunan (mM: 111,87 NaCl, 2,47

KCl, 1,08 CaCl₂, 2,38 NaCaHCO₃) ve %95 O₂+%5 CO₂ ile gazlandırılmış olan 10 mL hacminde organ banyosuna alındı. Çözeltinin pH'si 7,2'ye ayarlandı. Kasın bir ucu organ banyosundaki sabit bir noktaya, diğer ucu kuvvet transducerine (MAY, FDT-10) izometrik olarak asıldı. Kas organ banyosunda 1 saat bekletildikten sonra kayıtlar alındı. Kası uyarmak için uyaran şiddeti 0,2 V, süresi 0,5 ms olarak seçildi. Kayıtlar BIOPAC MP 100 (versiyon 3.5.7 Santa Barbara, ABD) elektrofizyolojik kayıt sistemi kullanılarak yapıldı. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) monopolar iğne elektrotları (BIOPAC EL400) kullanılarak kayıt edildi. BKAP ve kasılma yanıtları amplifikatörde yükseltildikten sonra 16 bitlik bir analog/dijital çevirici aracılığıyla daha sonra analiz edilmek üzere bilgisayara aktarıldı. BKAP için örnekleme hızı 10.000 örnek/s, kasılma yanıtları için ise 200 örnek/s olarak belirlendi. Kontrol grubu kayıtları tamamlandıktan sonra, organ banyosundaki Ringer çözeltisi boşaltıldı ve yerine 10 µM indoksakarb içeren Ringer çözeltisi dolduruldu. Deney grubundaki kaslar çözeltide 1 saat bekletildi ve 1 saat sonunda kayıt alındı. Elde edilen BKAP kayıtları ve kasılma eğrileri BIOPAC Acknowledge 100 W 5.7 programı ile analiz edilerek; BKAP kayıtlarından BKAP genliği ve süresi, kasılma eğrilerinden ise kasılma kuvveti ve kasılma süresi ölçüldü. Tüm kayıtlar oda sıcaklığında alındı. Araştırma, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı. Deneyler Ulusal Sağlık Araştırmaları Kurumu [National Institutes of Health (NIH)] "Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Rehberi"ne uygun olarak yapıldı.

KATALAZ AKTİVİTESİ, MALONDIALDEHİT VE PROTEİN DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜMÜ

Kas katalaz (CAT) aktivitesi "Aebi" yöntemiyle ölçüldü.¹⁵ Bu yöntemde deney ortamına eklenen H₂O₂ CAT tarafından su ve oksijene dönüşmektedir. Dönüşüm sırasında H₂O₂'nin absorbans azalması 240 nm'de izlenerek CAT aktivitesi saptandı. Spesifik aktivite ünite/mg protein cinsinden hesaplandı.

Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın ti-

yobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart olarak kullanılarak yoğunluk-absorbans grafiği çizildi. Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki MDA yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak mmol/mg protein cinsinden ifade edildi.¹⁶

Total protein tayin yönteminin prensibi alkali çözeltide oluşan bakır-protein kompleksinin fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (folin-ciocalteusphenol reaktifi) redüklemesi ve oluşan koyu mavi rengin 750 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.¹⁷ Her bir örnek için protein miktarı, bovin serum albumin (BSA) standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı mg olarak bulundu.

ELEKTRON MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Diseke edilen kas dokusu örnekleri, 1 mm³'lük parçalara bölündü ve yaklaşık 4-6 saat %2,5'lik glutraldehit solüsyonunda fikse edildi. Ardından %1'lik OsO₄ ile post fiksasyon yapıldı. Daha sonra dehidratasyon işlemi yükselen derecelerde alkol kullanılarak gerçekleştirildi. Propilen oksitle şeffaflandırma ve resine alıştırma aşamalarından sonra, dokular resine (EMBed-812 Embedding Kit) gömüldü. Yirmi dört saatlik polimerizasyon işleminden sonra, bloklardan ultramikrotom (Leica Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana) ile öncelikle 1 µm kalınlığında yarı ince, sonra da 50-70 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi ve hangi alandan ince kesit alınacağı belirlendi. Daha sonra alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Kontrastlanmış kesitler transmisyon elektron mikroskobu (Jeol JEM1011, Tokyo, Japonya) ile incelendi ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Almanya) ile fotoğrafları çekildi.

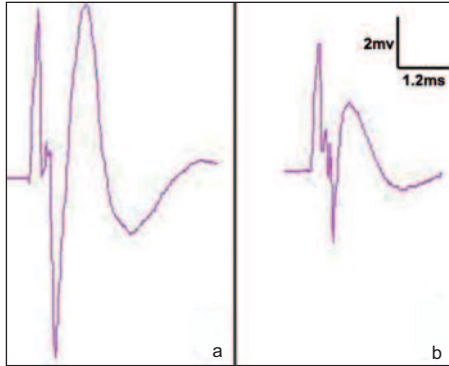
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov testiyle belirlendi. Ölçülen tüm değişkenlerinin normal dağılıma uygunluğu saptandıktan sonra, deney ve kontrol grupları arasında fark olup olmadığı student-t testi kullanılarak belirlendi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılığın sınırı $p<0,05$ olarak kabul edildi.

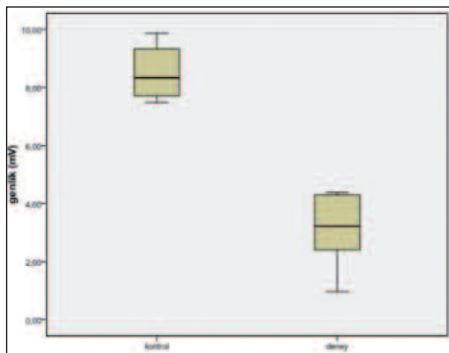
BULGULAR

ELEKTRİKSEL VE MEKANİK AKTİVİTE BULGULARI

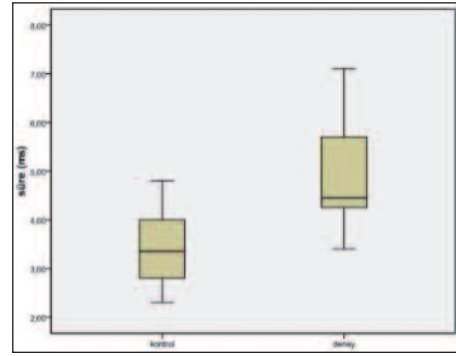
Kayıtlanan aksiyon potansiyeli eğrilerinden genlik ve süre değerleri ölçüldü (Şekil 1a,b-2). Aksiyon potansiyeli genliği kontrol grubunda ortalama $8,51\pm 0,93$ mV, deney grubunda $3,14\pm 1,23$ mV olarak belirlendi. Deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p=0,001$). Aksiyon potansiyeli kayıtlarından genliğe ek olarak aksiyon potansiyeli süresi de ölçüldü



ŞEKİL 1: Kontrol (a) ve deney (b) grubunda aksiyon potansiyeli kayıtları.



ŞEKİL 2: Kontrol ve deney grubunda ortalama bileşik kas aksiyon potansiyeli genliği.



ŞEKİL 3: Kontrol ve deney grubunda ortalama bileşik kas aksiyon potansiyeli süresi.

(Şekil 3). Aksiyon potansiyelinin süresi kontrol grubunda $3,42\pm 0,82$ ms, deney grubunda ise $4,91\pm 1,17$ ms olarak saptandı. Süre açısından kontrol grubu ile deney grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark gözlemlendi ($p=0,011$).

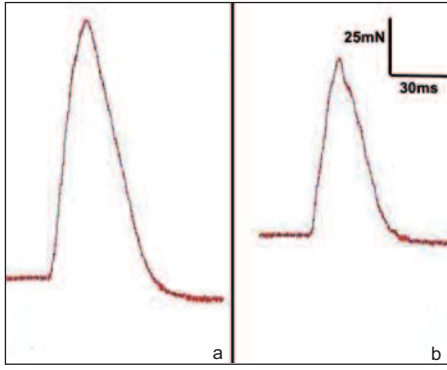
Kas kasılma eğrilerinden kasılma kuvveti ve kasılma süresi elde edildi (Şekil 4-6). Kontrol grubunda kasılma kuvveti $155,89\pm 8,76$ mN iken, deney grubunda bu değer $108,78\pm 14,19$ mN olarak saptandı (Şekil 5). Kas kasılma kuvveti açısından deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulundu ($p=0,001$). Kontraksiyon süresi kontrol grubunda $80,28\pm 12,94$ ms olarak ölçülür iken deney grubunda bu süre $76,31\pm 5,86$ ms olarak bulundu (Şekil 6). Kontraksiyon süresi açısından deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,414$).

KATALAZ VE MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

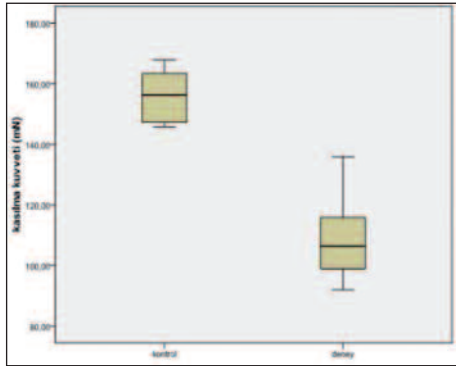
Kontrol ve deney gruplarında CAT ve MDA düzeylerine ilişkin bulgular Tablo 1'de görülmektedir. Tablodan da görüldüğü gibi, CAT aktivitesi kontrol grubunda $2,47\pm 0,35$ U/mg protein, deney grubunda ise 14,5 kat artarak $35,84\pm 12,68$ U/mg proteine ulaşmıştır. CAT aktivitesi açısından deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,008$). MDA düzeyi kontrol grubunda $3,42\pm 0,53$ nmol/mg protein iken, deney grubunda bu değer 1,78 kat artarak $6,10\pm 2,28$ nmol/mg protein olmuştur. MDA değeri açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p=0,014$).

ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

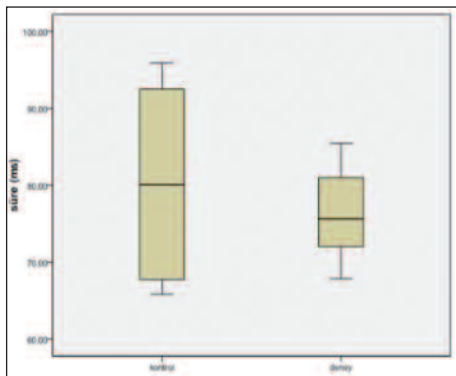
Kontrol ve deney grubuna ait örneklerde kas hücrelerinin normal morfolojik özelliklere sahip olduğu saptandı. Sarkoplazmada bulunan miyofibrillerin düzenli bir dizilim gösterdiği, sarkomer yapısının korunduğu, miyofibriller arasında bulunan mitokondriyonların, sarkoplazmik retikülüm sisternalarının ve diğer organellerin normal yapıda olduğu izlendi (Resim 1a-d).



ŞEKİL 4: Kontrol ve deney grubunda kasılma eğrisi.



ŞEKİL 5: Kontrol ve deney grubunda ortalama kasılma kuvveti.



ŞEKİL 6: Kontrol ve deney grubunda ortalama kasılma süresi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, voltaj bağımlı sodyum kanal inhibitörü insektisitler grubundan indoksakarbin kurbağa iskelet kası mekanik aktivitesi, CAT ve MDA düzeyleri ve ultra yapısı üzerine etkileri araştırılmıştır. 10 µm indoksakarbla 1 saat inkübe edilen kurbağa iskelet kasında BKAP genliği ve kasılma kuvveti azalmış, süresi uzamış, CAT ve MDA düzeyleri yükselmiş, ancak kasın ultra yapısal özelliklerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çalışmamızda, 10 µm indoksakarbla 1 saatlik inkübasyon kas aksiyon potansiyelinin genliği %64 azaltılmıştır. Yapılan literatür incelemesinde, indoksakarbin iskelet kası aksiyon potansiyeli ve sodyum kanalları üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmalar böceklerin sinir sisteminde yoğunlaşmıştır. Memeli sinir sisteminde ise sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların birinde Tusurubuchi ve ark., sıçan dorsal kök ganglionlarında 0,2, 1 ve 10 µm dozlarındaki indoksakarbin sodyum akımları üzerine etkisini incelemişlerdir.¹¹ 0,2 µm indoksakarbin sodyum akımlarını etkilemediği, 1 µm'in akımı %4,4 ve 10 µm'in ise %46,6 oranında azalttığı belirlenmiştir. Zhao ve ark., izole hamam böceği dorsal kök nöronlarında tüm hücre "patch clamp" tekniğini kullanarak indoksakarbin ve metaboliti DCJW'nin Tip I ve Tip II sodyum akımları üzerine etkisini araştırmışlardır. Her iki akım sodyum kanal blokleri tetrodotoksine dirençli olmasına rağmen, indoksakarbin ve metaboliti tarafından bloke edilmiştir. Ancak, DCJW'nin bloke edici etkisi indoksakarba göre 10 kat daha fazladır.³ Hücre dışı kayıt tekniğini kullanarak elde ettiğimiz BKAP genliğindeki azalmanın, indoksakarbin sadece sinir sistemindeki voltaj bağımlı sodyum kanallarını (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 ve Nav1.6) değil, iskelet kaslarındaki voltaj bağımlı sodyum kanallarını (Nav1.4) da etkilediği düşünülmektedir. Silver ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *Xenopus* oositlerinde Nav1.2a, Nav1.4, Nav1.5 ve Nav1.8 sodyum kanalları eksprese edilmiş ve bu kanal akımları üzerine indoksakarbin ve DCJW'nin etkisi incelenmiştir.² 10 µm dozundaki insektisitler 15

TABLO 1: Kontrol grubu ve deney gruplarında CAT ve MDA düzeyleri. Değerler ortalama+standart sapma olarak verilmiştir.

Değişkenler	Kontrol grubu (n=8)	Deney grubu (n=8)
CAT (U/mg protein)	2,47±0,35	35,84±12,68 ^a
MDA (nmol/mg protein)	3,42±0,53	6,10±2,28 ^a

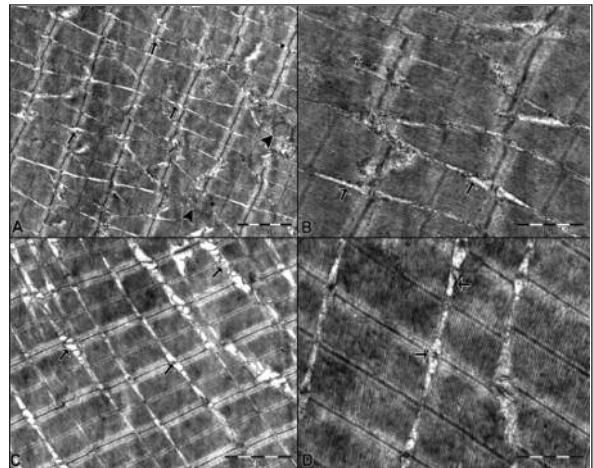
^a: Deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

CAT: Katalaz; MDA: Malondialdehit.

dk uygulanmış ve 15 dk boyunca sodyum kanal akımları kayıt edilmiştir. Çalışma sonunda indoksakarb metaboliti DCJW Nav1.4 akımını önemli oranda bloke ederken, indoksakarbın Nav1.4 akımı üzerine etkisinin sınırlı olduğu bulunmuştur. İskelet kası liflerinde yapılan bu çalışmada, BKAP genliğinin azalması Nav1.4'ün önemli oranda etkilendiğini düşündürmüştür. İndoksakarbın Na⁺ akımlarını bloke edici etkisine ek olarak, BKAP oluşumuna katkıda bulunan miyofibrillerde hasara yol açıp açmadığını belirlemek için bu çalışmada elektron mikroskopik teknikler kullanılarak kas liflerinin ultra yapısı incelenmiş, ancak deney ve kontrol grupları arasında kas liflerinin morfolojik yapısı açısından herhangi bir fark olmadığı gözlenmiştir.

İskelet kaslarında uyarılma kasılma çiftlenimi ryanodin reseptörleri (RyR1) ve transverse (T) tübül membranında bulunan ve dihidropiridin (DHP) reseptörü olarak da adlandırılan L-tipi kalsiyum kanalları arasındaki protein-protein etkileşimi ile gerçekleşir. Aksiyon potansiyelinin T-tübül membranında bulunan voltaj duyarlı L-tipi kalsiyum kanallarını aktive etmesi sonucunda bu kanallarla sarkoplazmik retikülüm membranında bulunan RyR1 reseptörleri aktif hale gelir ve sitoplazmaya kalsiyum salınımı tetiklenir. Sitoplazmada kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla kas kasılması başlar.¹⁸ Çalışmamızda, BKAP'a ilişkin bir başka bulgu da aksiyon potansiyelinin süresinin uzamasıdır. Sürenin uzaması iletimin yavaşladığının göstergesi olarak kabul edilmektedir.¹⁹ İletimin yavaşlaması kasta uyarılmanın T-tübüllerine daha geç iletilmesine ve uyarılma- kasılma çiftleniminin gerçekleşmesinde bozulmalara yol açar. Çalışmamızda kasın kasılma aktivitesine ilişkin bulgular da elde edilmiştir. 10 µm indoksakarb kasılma kuvvetini %30,2 oranında azaltmıştır. Kasılma süresinde ise

kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgu indoksakarbın iskelet kaslarında sadece sodyumla ilgili mekanizmaları değil, kasılmadan sorumlu kalsiyum salınımıyla ilgili mekanizmaları da etkileyebileceği konusunda ipuçları vermektedir. İndoksakarbın bu etkilerinin nasıl gerçekleştiği konusu da henüz tam açık değildir. Oksidatif stresin rolünün olup olmadığını belirlemek amacıyla bu çalışmada antioksidan sistem enzimlerinden CAT ve lipit peroksidasyon ürünü MDA düzeyleri ölçülmüştür. CAT antioksidan sistem enzimlerinden ve hidrojen peroksidi suya indirger.²⁰ Çalışmamızda, CAT aktivitesinin deney grubunda kontrol grubuna göre 14,5 kat artması indoksakarbın kas hücresinde reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit oluşumunu artırdığını, bunu ortamdaki temizlenmesi için ise CAT aktivitesinin indüklenmiş olduğunu düşündürmüştür. MDA düzeyinin deney grubunda kontrol grubuna göre 1,78 kat artması indoksakarbın lipit peroksidasyonunda artışa yol açtığını göstermiştir. Bilgilerimize göre, indoksakarbın iskelet kası antioksidan sistemi üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sonuçlarımızı karşılaştırma olanağı olmamıştır. Fare karaciğerinde yapılan bir çalışmada, günlük 6, 12, 18, 24 mg/kg vücut ağırlığı dozunda indoksakarb 30 gün boyunca uygulanmış ve MDA, protein içeriği, süpe-



RESİM 7: a: Kontrol grubu, x12.000, sarkoplazmik retikülüm sistemaları (ok), mitokondriyonlar (ok başı); b: Kontrol grubu, x30.000, sarkoplazmik retikülüm sistemaları (ok); c: Deney grubu, x15.000, sarkoplazmik retikülüm sistemaları (ok); d: Deney grubu, x30.000, sarkoplazmik retikülüm sistemaları (ok).

roksit dismutaz (SOD), CAT ve glutatyon-S- transferaz (GST) aktivitesi incelenmiştir. Otuz gün sonunda 18 ve 24 mg/kg dozlarında MDA, protein içeriği, SOD ve GST değerlerinde artış gözlenmiş ve indoksarb insektisitinin karaciğerde oksidatif stres oluşturarak toksik etkilere yol açtığı bildirilmiştir.²¹ Benzer şekilde çalışmamızda da indoksarbın iskelet kaslarında oksidatif strese yol açtığı gözlenmiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak 10 µm indoksarb ile 1 saat inkübe edilen kurbağa iskelet kasında sodyum kanallarının bloke olmasına bağlı olarak BKAP genliği ve kasın kasılma aktivitesi azalmış, aksiyon potansiyelinin süresi uzamıştır. Ayrıca kasta oksidatif stres artmıştır. Bu bulgular ülkemiz tarım alanlarında da yaygın olarak kullanılan indoksarbın sadece sinir sistemindeki sodyum kanallarını değil, iskelet kaslarındaki sodyum kanallarını da etkileyerek uyarılma ve kasılma aktivitesini bozduğunu düşündürmüştür. Ultrayapısal incelemede miyofibrillerde hasar gözlenmemesi bu bozulmanın miyofibril hasarıyla ilişkili olmadığını ancak artan oksidatif stresin protein kanalını etkileyerek sodyum akımı-

nın azalmasına yol açmış olabileceğini düşündürmüştür. Mekanizmayı tam olarak açıklayabilmek için iskelet kaslarında iyon kanal akımları, kanal ekspresyonları, oksidatif stres ve kanal etkileşimini de içerecek daha ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma MEÜ. Araştırma Projeleri Birimince desteklenmiştir (Proje No: BAP-TF TTB (Ü.Ç.) 2004-2).

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı; **Tasarım:** Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı; **Denetleme/Danışmanlık:** Ülkü Çömelekoğlu; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı, Fatma Söğüt, Selma Yaman, Pelin Eroğlu, Mehmet Berköz; **Analiz ve/veya yorum:** Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı, Fatma Söğüt, Selma Yaman, Pelin Eroğlu, Mehmet Berköz; **Kaynak Taraması:** Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı, Fatma Söğüt, Selma Yaman, Pelin Eroğlu, Mehmet Berköz; **Ma-kalenin Yazımı:** Ülkü Çömelekoğlu, Serap Yalın, Ebru Ballı, Fatma Söğüt, Selma Yaman, Pelin Eroğlu, Mehmet Berköz.

KAYNAKLAR

- Lapied B, Grolleau F, Sattelle DB. Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Br J Pharmacol* 2001;132(2): 587-95.
- Silver KS, Soderlund DM. Differential sensitivity of rat voltage-sensitive sodium channel isoforms to pyrazoline-type insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;214(2):209-17.
- Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ, Narahashi T. Block of two subtypes of sodium channels in cockroach neurons by indoxacarb insecticides. *Neurotoxicology* 2005;26(3):455-65.
- Zhao X, Ikeda T, Yeh JZ, Narahashi T. Voltage-dependent block of sodium channels in mammalian neurons by the oxadiazine insecticide indoxacarb and its metabolite DCJW. *Neurotoxicology* 2003;24(1):83-96.
- Tillman PG, Hammes GG, Sacher M, Connair M, Brady EA, Wing KD. Toxicity of a formulation of the insecticide indoxacarb to the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), and the big-eyed bug, *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Pest Manag Sci* 2002;58(1):92-100.
- Silver K, Soderlund DM. State-dependent block of rat Nav1.4 sodium channels expressed in xenopus oocytes by pyrazoline-type insecticides. *Neurotoxicology* 2005;26(3): 397-406.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 2011;475(7356):353-8.
- Hille B. Na and K channels of axons. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sunderland: Mass Sinauer Associates Inc; 1992. p.66-7.
- Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S. [The use of pesticides and their risks]. *Erciyes University Journal of Institute of Science and Technology* 2010; 26(2):154-69.
- Park JS, Kim H, Lee SW, Min JH. Successful treatment of methemoglobinemia and acute renal failure after indoxacarb poisoning. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49(8):744-6.
- Lee DK, Kim H, Cha YS. Methaemoglobinaemia in acute indoxacarb poisoning. *Emerg Med Australas* 2015;27(4):376-7.
- Viswanathan S, Kumar S, Kandan B. Indoxacarb-Related ARDS, Neurotoxicity and Orange Urine. *Eurasian J Med* 2013;45(2):135-7.
- Tsurubuchi Y, Kono Y. Modulation of sodium channels by the oxadiazine insecticide indoxacarb and its N-decarbomethoxylated metabolite in rat dorsal root ganglion neurons. *Pest Manag Sci* 2003;59(9):999-1006.
- Zhao X, Nagata K, Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T. Effects of the oxadiazine insecticide indoxacarb, DPX-MP062, on neuronal nicotinic acetylcholine receptors in mammalian neurons. *Neurotoxicology* 1999;20(4): 561-70.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-8.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- Tu MK, Levin JB, Hamilton AM, Borodinsky LN. Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. *Cell Calcium* 2016;59(2-3):91-7.
- Aminoff MJ. *Electromyography in Clinical Practice: Clinical and Electrodiagnostic Aspects of Neuromuscular Disease*. 3rd ed. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 1998. p.630.
- Oshino N, Oshino R, Chance B. The characteristics of "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochem J* 1973;131(3):555-63.
- Mudaraddi TY, Potadar RR, Kalilwal BB. Indoxacarb induces liver oxidative stress in Swiss Albino Mice. *Euro J Exp Bio* 2012; 2(1):180-6.