

Endosülfan'ın İzole Kurbağa Siyatik Siniri Üzerine Etkileri*

Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin - TÜRKİYE

Belgin BÜYÜKAKILLI

Trakya Üniversitesi, Kırklareli Sağlık Yüksekokulu, Kırklareli - TÜRKİYE

Aynur AVCI ÖZGE

Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Mersin - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 03.02.2000

Özet : Organik klorlu bir insektisit olan endosülfanın izole kurbağa siyatik siniri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. İzole sinir 60 dakika 0.5 ppm endosülfana maruz bırakıldıktan sonra 0.1-0.5 ms süreli eşik ve supramaksimal pulslarla uyarılmış ve hücre dışı kayıt yöntemi kullanılarak bileşik aksiyon potansiyelleri kaydedilmiştir (n=30). Elde edilen kayıtlardan latans, genlik, depolarizasyon süresi, repolarizasyon süresi ve eşik değeri ölçülmüştür. İletim hızı her bir sinir için, sinir uzunluğu ve latans kullanılarak hesaplanmıştır. Endosülfan uygulanan sinirlerde, bileşik aksiyon potansiyellerinin genliği ve repolarizasyon süresi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, eşik voltajı azalmıştır (p<0.05).

Anahtar Sözcükler: Endosülfan, aksiyon potansiyeli, siyatik sinir, sinir iletimi

Effects of Endosulfan on the Isolated Sciatic Nerve of the Frog

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effect of endosulfan on the isolated sciatic nerve of the frog. The nerve was exposed to 0.5 ppm endosulfan for 60 min and then compound action potentials were recorded extracellularly. The latencies, amplitudes, durations of depolarization and repolarization and threshold voltage were measured (n=30). Conduction velocities were calculated using the nerve lengths and latency values of each nerve.

It was observed that values of amplitude and duration of repolarization were significantly higher (p<0.05) but threshold voltage was significantly lower (p<0.05) in the exposed group than in the control group.

Key Words: Endosulfan, action potentials, sciatic nerve, nerve conduction

* Bu çalışma : Mersin Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenen FEFB (Ü.Ç) 95-2/1 nolu projenin bir bölümüdür.

Giriş

Endosülfan İçel ili ve çevresi tarım alanlarında bitkisel ürünlerde hastalık ve zararlıların gelişmesini engellemek için yaygın olarak kullanılan organik klorlu bir insektisittir. Organik klorlu insektisidler kimyasal yapı bakımından dichlorodiphenylate, klorlanmış siklodienler ve heksaklorosikloheksanlar olmak üzere üç farklı gruba ayrılır. Endosülfan siklodien grubu klorlu bir insektisittir. Bunlar insektisidler arasında en toksik olanlarıdır (1). Bu gruptaki insektisidlerin çok küçük bir dozunda bile canlıda sinir sistemine ait bir çok bulgu ortaya çıkar (2). Günümüzde kullanılan insektisidlerin büyük bir bölümü nörotoksiktir ve etkilerini hedef organizmaların sinir sistemini etkileyerek gösterirler. İnsektisidler seçici değildirler ve hedef organizmalar kadar hedef olmayan canlıları da etkilerler. Bu ilaçlar böceklerin sinir sisteminde gösterdikleri etkilerin benzerlerini yüksek organizasyonlu canlılarda da gösterirler, hedef dokuları ve etki mekanizmaları bütün türlerde birbirine benzer, ancak etkili oldukları dozlar farklıdır (3). Çeşitli insektisidler Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Cl^- iyonlarının hücre zarı üzerindeki transportunu etkilerler veya sinir uçlarından nörotransmitter maddelerin salınımını inhibe edebilirler (2). Bu bileşikler sinir sisteminde morfolojik değişikliklere de yol açarlar. Yapılan mikroskobik çalışmalar sonucunda organik klorlu bileşiklerin bir çoğunun küçük miyelinli ve miyelinsiz sinirlerin popülasyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda ise bu bileşiklerin Schwan hücrelerinde, aksonlarda ve miyelin kılıfında önemli hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (4). Organik klorlu bileşiklerin canlılarda sinir sisteminin dışında üreme sistemini, kan yapımını, karaciğer, endokrin sistem, boşaltım sistemi ve diğer sistemleri de etkilediğini gösterir çalışmalar da bulunmaktadır (5, 6, 7).

Şimdiye kadar yapılmış olan elektrofizyolojik çalışmalar siklodien grubu klorlu insektisidlerin etki mekanizması ile ilgili olarak kesin bilgi verememektedir. Mevcut çalışmalar bu gruptaki insektisidlerin etki yerlerinin daha çok santral sinir sistemine lokalize olduğunu bildirmektedirler (8, 9). Periferik sinirlerdeki etkileri ile ilgili olarak ise ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada İçel ili tarım alanlarında en fazla kullanılan insektisidlerden biri olan endosülfanın sinir liflerinin elektriksel özelliklerini etkileyip etkilemediğini saptamak amacıyla aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada ortalama ağırlıkları 60 ± 8.45 gram olan su kurbağaları (*Rana camerani*) kullanılmıştır. Kurbağa, makasla gözlerinin hemen üzerinden üst çeneden kesilmiş, bir enjektör iğnesi ile vertebral kolona girilerek medulla spinalis haraplanmış ve kurbağa disseke edilerek 5-6 cm uzunluğundaki siyatik sinir demetleri çıkarılmıştır. Sinir demetinin çevresindeki dokular iyice temizlendikten sonra 115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 2.15 mM Na_2HPO_4 ve 0.95 mM NaH_2PO_4 içeren Ringer çözeltisi içerisine konulmuştur. Ringer çözeltisinin pH sı 7.0 a ayarlanmıştır. Bütün ölçümler 22-25°C oda sıcaklığında yapılmıştır.

Bileşik sinir aksiyon potansiyelleri hücre dışı kayıt yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (10, 11). Ölçümler pleksiglass kullanılarak yapılan ve gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot içeren sinir kutusunda alınmıştır. İzole siniri uyarmak ve aksiyon potansiyelini kayıtlamak için sinir kutusuna monte edilmiş Ag/AgCl elektrotlar kullanılmıştır. Uyarım 0.1-0.5 ms süreli eşik ve supramaksimal kare pulslar kullanılarak sağlanmıştır (Grass S48 stimülatör). Uyarıya yanıt olarak oluşan aksiyon potansiyelleri Kenwood CS-6010 100 MHz Digital Readout osiloskobu kullanılarak kayıtlanmıştır. Kayıt ve gözlem, stimülatörün trig out'undan gelen bir puls ile tetiklenmiştir. Osiloskobun sinyallerin voltaj ve sürelerini sayısal olarak analiz edebilme özelliğinden yararlanılarak kayıtlanan bileşik aksiyon potansiyellerinin latansları, genlikleri, depolarizasyon ve repolarizasyon süreleri ile eşik değerleri ölçülmüştür.

Deneylerde 30 Adet siyatik sinir preparatı kullanılmıştır. Başlangıçta sinir preparatları Ringer çözeltisi içerisinde bir saat bekletilmiş ve daha sonra sinir kutusuna yerleştirilerek 0.1-0.5 ms süreli pulslarla uyarılmış ve bu uyarıya yanıt olarak oluşan aksiyon potansiyelleri kayıtlanarak analizleri yapılmıştır. Daha sonra sinir preparatları 0.5 ppm endosülfan (Hektaş) içeren banyo çözeltisine alınmış ve bu çözeltide de bir saat bekletildikten sonra tekrar aksiyon potansiyelleri kayıtlanmış ve genlik, latans, eşik değer, repolarizasyon ve depolarizasyon süreleri ölçülmüştür.

Endosülfan uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında aksiyon potansiyeli parametreleri açısından anlamlı bir farkın olup olmadığı iki eş arasındaki farkın önemlilik testi kullanılarak saptanmıştır (12). İstatistiksel anlamlılığın sınırı $p<0.05$ olarak belirlenmiştir.

Bulgular

Endosülfan uygulanan (deney grubu) ve uygulanmayan (kontrol grubu) kurbağa siyatik sinir demetlerinden hücre dışı kayıt yöntemi kullanılarak ölçülen aksiyon potansiyeli parametrelerinin değerleri Tablo'da verilmiştir.

Tablo. Kontrol ve deney gruplarına ait bileşik sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinin değerleri.

Parametre	Kontrol Grubu (n=30)	Deney Grubu (n=30)	
Genlik (mV)*	35,6±3.33	48±5.4	p<0.05
Depolarizasyon süresi (ms)*	0.24±0.025	0.22±0.031	A.D.
Repolarizasyon süresi (ms)*	0.36±0.08	0.54±0.1	p<0.05
Eşik voltaj (V)*	0.18±0.05	0.11±0.05	p<0.05
iletim hızı (m/s)*	39,18±6.05	57,16±13.6	A.D.

(*) Ortalama±Standart Sapma, A.D.: Anlamlı değil

Endosülfan ile muamele edilmiş siyatik sinir preparatlarında bileşik sinir aksiyon potansiyelinin genliğinde insektisit uygulanmayan preparatlara oranla anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kontrol grubunda bileşik aksiyon potansiyelinin genliği 35.6 ± 3.33 mV olarak bulunurken deney grubunda bu değer 48 ± 5.4 mV olarak ölçülmüştür. Bileşik sinir aksiyon potansiyellerinde depolarizasyon süresi incelendiğinde deney grubunda depolarizasyon süresinde bir azalma görülmüştür. Ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Kontrol grubunda depolarizasyon süresi 0.24 ± 0.025 ms olarak ölçülürken, deney grubunda bu değer 0.23 ± 0.03 ms olarak bulunmuştur. Repolarizasyon süresinde ise deney grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Repolarizasyon süresi kontrol grubunda 0.36 ± 0.08 ms ve endosülfanla muamele edilmiş sinir demetlerinde 0.54 ± 0.1 ms olarak ölçülmüştür. Her iki grup eşik voltajları açısından karşılaştırıldığında, endosülfanın siyatik sinir demetlerinin eşik voltajlarını anlamlı oranda düşürdüğü görülmüştür ($p < 0.05$). Kontrol grubunda eşik voltajı 0.18 ± 0.05 V, deney grubunda ise 0.11 ± 0.015 V olarak bulunmuştur. Kurbağa bileşik sinir aksiyon potansiyelinin iletim hızı endosülfanın uygulanması ile artmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Aksiyon potansiyeli iletim hızı kontrol grubunda 39.18 ± 6.05 m/s iken deney grubunda bu değer 57.16 ± 13.6 m/s olarak ölçülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada endosülfanın kurbağa bileşik sinir aksiyon potansiyeli parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Canlı organizmada uzak mesafeler arasındaki bilgi iletimi sinir sinyalleri aracılığı ile yapılmaktadır (13, 14, 15). Sinir sinyalleri zar potansiyelindeki hızlı değişimlerden ibaret olan aksiyon potansiyelleri aracılığı ile iletilmektedir. Her aksiyon potansiyeli, zar dinlenim potansiyelinin negatif değerden pozitif bir değere yükselmesiyle başlar ve hemen hemen aynı hızda tekrar negatif potansiyele dönmesiyle oluşur. Aksiyon potansiyeli olduğu noktadan itibaren zayıflamadan sabit genlikle iletilir (15). Aksiyon potansiyeli parametrelerinin ölçülmesi canlıdaki bilgi iletim süreçleri hakkında önemli ipuçları verir.

Kurbağa siyatik sinirinde hücre dışı kayıt yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerde banyo ortamına endosülfan eklenmesiyle bileşik sinir aksiyon potansiyelinin genliğinde artış, repolarizasyon süresinde uzama ve eşik voltajında azalma gözlenmiştir. Bütün bu bulgular endosülfanın siyatik sinir demetlerinin uyarılabilmesinde artışa yol açtığını ve sinirlerde uzun süreli eksitasyonlar oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç, santral sinir sisteminde aktivasyona yol açma şeklinde etki gösteren siklodien grubu organik klorlu insektisidlerin, periferik sinir sisteminde de benzer etkileri gösterebileceklerini ortaya koymaktadır. Ancak sinir sisteminin her iki bölümünde görülen bu etkinin mekanizmaları birbirinden farklıdır. Santral sinir sistemindeki aktivasyon siklodien insektisidlerin GABA salınımını inhibe etmesi ile açıklanmaktadır (2). GABA santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunan inhibitör bir nöromediatördür. Postsinaptik membranda K^+ ve Cl^- gibi iyonlara geçirgenliği artırarak hücrede inhibitör postsinaptik potansiyelin oluşmasına neden olur (9, 15). Bu aktivitenin siklodien grubu insektisidlerle azaltılmasının hiperrefleksi, hipereksitasyon ve konvülsiyona yol açtığı bildirilmiştir (9).

Periferik sinirlerde gözlediğimiz aktivasyondaki artışın olası mekanizması ise endosülfanın membranın Na^+ ve K^+ geçirgenliğini değiştirmeleri ile açıklanabilir. Aksiyon potansiyelinde gözlenen sivri potansiyelden sorumlu olan iyon Na^+ 'dur (13,14,15). Buna bağlı olarak aksiyon potansiyelinin genliğindeki artış endosülfanın sinir hücre membranında daha fazla sodyum kanallarının açılmasına ve hücre içine daha fazla Na^+ iyonu akışına yol açtığı şeklinde yorumlanabilir. Sinir hücre membranının repolarizasyonundan sorumlu olan iyon ise K^+ 'dur (13,14,15). Aksiyon potansiyelinde uzamış bir repolarizasyon fazı büyük oranda membranın potasyum iyonlarına karşı geçirgenliğinin azalmasına bağlıdır (9). Yine siklodien grubu insektisidlerin beyinde özellikle Na^+ - K^+ ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz'ı inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır (2,16). Benzer etki sinir aksonunda da gözlenmiştir. Sinir aksonunda Na^+ - K^+ ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz nöronal repolarizasyonda önemli rol oynamaktadır (17). Bu enzimlerin kısmi inhibisyonu da sinir aksonunun repolarizasyon süresinin uzamasında etkili olabilir. Eşik voltajının düşmesi ise nöronal eksitabilitenin arttığı bir göstergesidir. Endosülfanın bu etkiyi sinir membranında sodyum kanal kapısının açılma kinetiğini etkileyerek oluşturduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak siklodien grubu insektisidlerden olan endosülfanın santral sinir sisteminde GABA salınımını inhibe ederek gösterdiği etkinin benzerini, periferik sinirlerde membranın Na^+ ve K^+ iyonlarına karşı geçirgenliğini değiştirerek ve kanalların açılıp kapanma kinetiklerini etkileyerek gösterdiğini düşünebiliriz.

Kaynaklar

1. Hayes W.J., Jr: Pesticides studies in man. Williams & Wilkins, Baltimore, 1982.
2. Ecobichon, D. J., Toxic effect of pesticides., Casarett and Daull's Toxicology: The basic science of poisons., McGraw-Hill International Editions Medical Science, 1991.
3. O'Brien, R. D. Toxic phosphorus esters. Chemistry, Metabolism and biological effects. Academic Press, New York, 1960.
4. Martinez, A. J., Houff, S. A., and Isaacs, E. R., Kepone poisoning: Cliniconeuropathological study. In Roizin, L., Shiraki, H., and Greevic, N. (eds.): Neurotoxicology. Raven Press, New York, p. 443-456, 1977.
5. Naqvi, S.M.; Vaishnavi, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non target animals. Comp Biochem Physiol. 105(3) p347-361, 1993.
6. Sharma, R. M., Effect of endosulfan on acid and alkaline phosphatase activity in liver, kidney and muscles of Channa gachua. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 443-448, 1990.
7. Gill, T. S., Pande, J. and Tewari, H. Effect of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish, Barbus conchonus Hamilton. Ekotoxicol. Environ. Safety. 21, 80-91, 1991.
8. Eldefrawi, M. E. S. , Sherby, S. M., Abalis, I. M., and Eldefrawi, A. T., Interaction of pyrethroid and cyclodiene insecticides with nicotinic acetylcholine and GABA receptors. Neurotoxicology. 6: 47-62, 1985.
9. Matsumara, F., Toxicology of insecticides. Plenum Press, New York, 1985.
10. Andrew, B.L. Experimental physiology. Churchill Livingstone, London, 1972.

11. Katz, B., Nerve, muscle and synapse, McGraw-Hill Book Company, New York, 1966.
12. Sümbülođlu, K., Sümbülođlu, V., Biyoistatistik, Ankara, 1994, Özdemir yayıncılık.
13. Ganong, W.F. Tıbbi fizyoloji, Barış Kitabevi, 16. Baskı, 1995.
14. Guyton, A.C. Tıbbi Fizyoloji, 1. Baskı, Merck yayıncılık, 1986.
15. Noyan, A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Ankara, 1993, METEKSAN Ltd. Şti., 215-222.
16. Carbett, J.R., The biochemical mode of action of pesticides., Academic Press, London, 1974.
17. Eyzoguirre, C., Fidore, S.J. Physiology of nervous system, 2nd Edition, 1975.