

FABAD Farm. Bil. Der.  
15, 73-77, 1990

FABAD J. Pharm. Sci.  
15,73-77, 1990

## Akut ve Kronik Etanol Uygulamasının Farelerin Beyin ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ ) - ATPaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Meral KEYER-UYSAL (\*)

**Özet:** Akut ve kronik etanol uygulamasının farelerin beyin homojenatlarında ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPaz aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Akut uygulama için etanol (4.5 g/kg) i.p. uygulandı. Kronik uygulama için ise, etanol (4.5 g/kg/gün) 7 gün süre ile i.p. uygulandı. Fareler son enjeksiyondan 16 saat sonra öldürüldüler ve beyin homojenatlarında ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Sonuçlarımız gerek akut ve gerekse kronik etanol uygulamasından sonra farelerin beyin homojenatlarında ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPaz aktivitesinde bir azalma olduğunu gösterdi.

### THE EFFECT OF ACUTE AND CHRONIC ETHANOL ADMINISTRATION ON BRAIN ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase ACTIVITY IN MICE

**Summary:** The effect of acute and chronic ethanol administration on the activity of ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase in mice brain homogenates was investigated. Ethanol (4.5 g/kg) was injected intraperitoneally (acute treatment). For chronic treatment, ethanol (4.5 g/kg/day) was injected intraperitoneally for 7 days. 16 hr after the last injection, the mice were killed and ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-activities in brain homogenates were determined. These results showed that brain ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase activity was decreased in mice following both acute and chronic ethanol treatment.

### GİRİŞ

Etanol santral sinir sistemi üzerinde yaygın bir depresan etki oluşturmaktadır (1, 2, 3). Etanolün bu depresan etkisini nöron zararını

etkileyerek yaptığı bildirilmiştir (2, 4, 5). Etanolün zarlar üzerindeki etkileri değişik biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemlerle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar alkolün düşük

Başvuru Tarihi: 11.7.1989

Kabul Tarihi: 12.1.1990

(\*) M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.B.D., İstanbul

konsantrasyonlarda zar akışkanlığını arttırdığını, buna bağlı olarak zardaki transport olaylarını etkilediğini yüksek konsantrasyonlarda ise zar lipitleri ve proteinleri arasındaki etkileşimleri bozduğunu, zar proteinlerinde şekil değişiklikleri oluşturduğunu göstermiştir (2, 4, 5, 6). Uzun süreli etanol kullanımı ise, etanolün zarda oluşturduğu bu fizikokimyasal değişikliklere karşı bir direnç oluşmasına neden olmakta ve bu durum tolerans gelişimi ile ilgili görülmektedir (5, 6).

Etanolün zar lipid yapısında oluşturduğu bu değişikliklerin zara bağlı enzim aktivitelerini, özellikle,  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktivitesini etkilediği ileri sürülmektedir (2, 5, 7, 8). Yapılan *in vitro* çalışmalarda etanolün  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (9-13). Buna karşılık, *in vivo* koşulda etanolün bu enzim aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir (11, 12, 14, 15, 16). Bu nedenle çalışmamızda akut ve kronik etanol uygulamasının farelerin beyin homojenatlarında  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek istedik.

#### GEREÇ ve YÖNTEM:

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 25 g olan BALB/c fareler kullanıldı. Farelerin seçiminde cinsiyet farklılığı gözlemlenmedi. Fareler akut ve kronik uygulamalar için iki gruba ayrıldı. Akut uygulama için, 4.5 g/kg etanol dozu ikiye bölünerek saat 9.00 ve 18.00'de periton içi uygulandı. Kronik uygulama için ise, günlük 4.5 g/kg etanol dozu, yine ikiye bölünerek saat

9.00 ve 18.00'de periton içi yolla 7 gün süre ile uygulandı. Bu uygulamalar için etanolün serum fizyolojikteki % 40'luk çözeltisi (v/v) hazırlandı. Kontrol deney için, aynı hacim serum fizyolojik aynı koşullarda periton içi uygulandı.

Son enjeksiyonlardan sonra kontrol ve deney grubundaki fareler 16 saat süre ile aç bırakıldılar. Bu süre bitiminde servikal dislokasyon ve dekapitasyonla öldürüldüler. Beyinleri hızla çıkarıldı, damar ve meninkslerinden temizlendi, soğuk % 0.9 NaCl ile yıkandı ve soğuk 0.32 M sükröz çözeltisi ile homojenize edildi (% 2 beyin homojenatı). Enzim aktivitesi, 100 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM  $MgCl_2$  ve 5 mM ATP içeren bir inkübasyon ortamında (toplam 1.5 ml hacim), 1 mM oubainin yokluğunda (TOTAL ATPaz), NaCl ve KCl'ün yokluğu ve oubainin varlığında ( $Mg^{++}$  - ATPaz), ATP'den serbestleşen inorganik fosfor ( $P_i$ ) miktarından hesaplandı. Total ATPaz ve  $Mg^{++}$  - ATPaz aktiviteleri arasındaki fark beyin homojenatlarının  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktivitesini göstermektedir (16, 17). Beyin homojenatlarının protein içerikleri ise Lowry (18) yöntemi ile belirlendi.

#### BULGULAR

Akut ve kronik etanol uygulanan farelerin beyin homojenatlarının  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktiviteleri Tablo 1'de gösterildi. Buna göre, gerek akut ve gerekse kronik etanol uygulamasından sonra farelerin beyin homojenatlarının  $(Na^+ + K^+)$ -ATPaz aktivitesinde

**Tablo 1 - Akut ve kronik etanol uygulanan farelerin beyin homojenatlarında (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPaz aktiviteleri (Ortalama ± SD)**

		(Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> )-ATPaz <sup>a</sup>
KONTROL	(n = 10)	3.59 ± 0.19
AKUT ETANOL	(n = 15)	3.06 ± 0.10*
KONTROL	(n= 10)	3.55 ± 0.17
KRONİK ETANOL	(n= 15)	1.90 ± 0.07*

a μmol Pi/mg protein/1 saat; \* p<0.001 (kontrol değerlere göre)

kontrol değerlere göre, sırasıyla % 14.8 ve % 46.5'lik bir azalma saptandı.

### TARTIŞMA

Akut ve kronik etanol uygulamasının beyin (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPaz aktivitesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. Akut etanol uygulamasından sonra bu enzim aktivitesinin arttığını (19), değişmediğini (14) ve azaldığını (16) bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar kronik etanol uygulamasından sonra beyin (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPaz aktivitesinde artma bulduklarını bildirirlerken (14, 16, 19, 20, 21), diğerleri bir değişiklik bulamadıklarını bildirmişlerdir (5, 11, 12).

Çalışmamızda ise, gerek akut ve gerekse kronik etanol uyguladığımız farelerin beyin homojenatlarında (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPaz aktivitesini azalmış bulduk. Çalışmamızda farelere etanol uygulaması Wing ve arkadaşları (22) tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı. Bu araştırmacılar etanol uygulamasının eritrosit, karaciğer ve sinaptozom plazma zarlarında kolesterol ve fosfolipit düzeylerini etkilememekle

birlikte, fosfolipit fraksiyonlarının yağ asidi kompozisyonunda değişiklikler oluşturduğunu bildirdiler. Bu değişikliğin lipit çift tabakanın özellikle iç yüzündeki fosfolipitleri kapsadığını belirttiler (22). Öte yandan, (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPaz aktivitesinin zar fosfolipitlerine bağımlılık gösterdiği, özellikle zarrın iç yüzündeki fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin düzeylerindeki değişikliklerin bu enzim aktivitesini etkilediği bilinmektedir (7). Bu nedenle, çalışmamızda akut ve kronik etanol uygulamasından sonra beyin (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPaz aktivitesinin azalmasında lipit yapısındaki değişikliklere bağlı olması olası görülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Bowman, W.C. and Rand, M.J. *Textbook of Pharmacology*, Oxford, Blackwell Scientific Publ., p. 42.1-42.25, 1980.
2. Goldstein, D.B., "Alcohol and cellular membranes", Rydberg, U. (Ed), *Alcohol and the Developing Brain*, New York, Raven Press, p. 19-26, 1985.
3. Kayaalp, S.O., *Tıbbi Farmakoloji*,

2. Cilt, 3. Baskı, Ankara, Ulucan Matbaası, 1985.
4. Sun, G.Y. and Sun, A.Y., "Ethanol and membrane lipids", *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 9, 164-180 1985.
5. Topel, H., "Biochemical Basis of Alcoholism: Statements and hypotheses of present research", *Alcohol*, 2, 711-788, 1985.
6. Ledig, M. and Mandel, P., "Alcool at neurochimie", *M/S Med. Sci.*, 6, 352-357, 1988
7. Kimelberg, H.K., "Alterations in phospholipid-dependent ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase activity due to lipid fluidity. Effect of cholesterol and  $\text{Mg}^{2+}$ " *Biochim. Biophys. Acta*, 413, 143-156, 1975.
8. Sun A.Y. and Seaman R.N., "Physicochemical approaches to the alcohol membrane interaction in brain", *Neurochem. Res.*, 5, 537-545, 1980.
9. Israel, Y., Kalant, H. and Laufer, I., "Effects of ethanol on Na, K, Mg-stimulated microsomal ATPase activity", *Biochem. Pharmacol.*, 14: 1803-1814, 1965.
10. Israel, Y. and Salazar, I., "Inhibition of brain microsomal adenosine triphosphatases by general depressants", *Arch. Biochem. Biophys.*, 122, 310-317, 1967.
11. Goldstein, D.S. and Israel, Y., "Effects of ethanol mouse brain ( $\text{Na}+\text{K}$ )-activated adenosine triphosphatase", *Life Sci.*, 11: 957-963, 1972.
12. Akera, T., Rech, R.H., Marquis, W.J., Tobin, T. and Brody, T.M., "Lack of relationship between ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-activated adenosine triphosphatase and the development of tolerance to ethanol in rats", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185, 594-601, 1973.
13. Nhamburo, P.T., Salafsky, B.P., Hoffman, P.L. and Tabakoff, B., "Effects of short-chain alcohols and norepinephrine on brain ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase activity", *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1987-1992, 1986.
14. Sun, A.Y., Seaman, R.N., and Middleton, C.C., "Effects of acute and chronic alcohol administration on brain membrane transport systems", *Adv. Exp. Med. Biol.*, 85 A, 123-138, 1977.
15. Ricci, R.L., Crawford, S.S. and Miner, P.B., "The effect of ethanol on hepatic sodium plus potassium-activated adenosine triphosphatase activity in the rat", *Gastroenterology*, 80, 1445-1451, 1981.
16. Ledig, M., Koop, P. and Mandel, P., "Effect of ethanol on adenosine triphosphatase and enolase activities in rat brain and in cultured nerve cells", *Neurochem. Res.*, 10, 1311-1324, 1985.
17. Svoboda, P. and Mosinger, B., "Catecholamines and the brain microsomal Na, K-adenosinetriphosphatase-1. Protection against lipoperoxidative damage", *Biochem. Pharmacol.*, 30, 427-432, 1981.
18. Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
19. Ranagaraj, N. and Kalant, H., "Effects of ethanol withdrawal, stress and amphetamine on rat brain ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase", *Biochem. Pharmacol.* 27, 1139-1144, 1978.
20. Israel, Y. and Kuriyama, K., "Effects of in vivo ethanol administration on adenosine triphosphatase activity of subcellular

fractions of mouse brain and liver", *Life Sci.*, 10, 591-599, 1971.

21. Beauge, F., Stibler, H., Kalant, H., "Brain synaptosomal ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase activity as an index of tolerance to ethanol", *Pharmacol Biochem Behav.*, 18, 519-524, 1983.

22. Wing, D.R., Harvey, D.J., Belcher, S.J. and Paton, W.D.M., "Changes in membrane lipid content after chronic administration with respect to fatty acly compositions and phospholipid type", *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1625-1632, 1984.