

# Hiperkolesteroleminin Beynin Değişik Bölgelerindeki Na<sup>+</sup> — K<sup>+</sup> ATPase Aktivitesine Etkisi

G. ÖNER

A AĞAR

A ŞERMET

R. TANALP

ON

OF

THE

VARIOUS

THE EFFECT OF HYPERCHOLESTEROLEMIA

ACTIVITY OF Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase ACTIVITY

BRAIN

AREAS

Akdeniz üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ANTALYA

Geliş Tarihi: 21 Haziran 1988

## ÖZET

24 Sıçan üzerinde yapılan araştırmada hiperkolesteroleminin beyin Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aklinesine etkisi kontrol değerleri ile karşılaştırıldı. %1 kolesterol içeren diyetle bir ay beslenen 12 hayvanın kan, total kolesterolü kontrol değeri olan 67,6±5,2 mg/dL den 241,9±59,4 mg/dL'ye yükselmiş bulundu (p<0.001). Plazma LDL kolesterol değerleri ise 40,3±5,5 mg/dL'den 45,2±4,25 mg/dL değere yükselmiş olmasına karşın bu artış önemli bulunmadı. Aorta kolesterolünün 2,18±0,19 mg/g değerinden 7,28±1,39 mg/g'ya ulaşığı (p<0.001) saptandı.

Kan ve aortada belirgin kolesterol artışı yapılan bu hayvanların serebral korleks kolesterol değerleri kontrolden farklı bulunmadı.

Beyin kolesterol değerleri gibi korleks, serebellum, thalamus ve pons Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesi'nde periferik hiperkolesterolemiden etkilenmemiş bulundu.

Plazma kolesterolindeki artışa karşı beyin kendini savunmasının fonksiyonel önemi olabileceği kanısına ulaşıldı.

Anahlar Krliuurlrr: Nu<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, Hiperkolesterolemia

T K İ T İ D B İ L A r » - D e r g i s i C . 6 , S . 6 , 1 9 8 8 . 4 4 1 - 4 4 4

## S İ M M A K Y

In order to study the effect of hypercholesterolemia on brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity, the results of diet induced hypercholesterolemic rats were compared with those of control animals.

24 Swiss albino rats were divided into two groups. 12 animals in control group have been fed with normal laboratory rat food for one month, while other 12 rats have been fed with a diet rich in cholesterol. Hypercholesterolemic diet caused a significant increase in plasma and aorta cholesterol levels, mean plasma total cholesterol level was 67.6±5.2 mg/dL in control rats and 241.9±53.4 mg/dL in experimental group (p<0.001). Aorta cholesterol content increased from 2.18±0.19 mg/g wet weight, to 7.28±1.39 mg/g (p<0.001). Plasma LDL cholesterol levels showed a slight, nonsignificant increase in hypercholesterolemic rats 45.2±4.25 mg/dL vs. 40.3±5.8).

Despite the obvious increase in plasma and aorta cholesterol levels in hypercholesterolemic rats, their brain cholesterol contents were found to be unchanged as well as their brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activities.

The functional significance of this self protection of the brain from plasma cholesterol levels was discussed.

Key Words: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, Hypercholesterolemia.

T J Research Med Sci V. 6. N 3, 1988. 441-444

## GİRİŞ

Hücre membranının lipid iç ve dış katmanının lateral mobilitesi ile membrana gömülü veya onu boydan boya kateden proteinlerin aktivitesi arasında sıkı bir ilişki olduğu pek çok yayında gösterilmiştir. Membran akışkanlığında denen lateral mobiliteyi bozan faktörler hücre cevaplılığında etkilemektedir (3,6,13,14,22,23). Membran akışkan-

lığı membranın içerdiği kolesterol/ fosfolipid oranı ile ters orantılı olarak değişir (19) ve plazma lipid kompozisyonu membran akışkanlığına etki eden önemli faktörler arasında sayılmaktadır (14).

Membrandaki proteinlerin çeşitli enzimler olarak fonksiyonel önemi dikkate alınacak olursa, Plazma

lipidleri ile membrana bağlı enzimlerin aktivitesi arasındaki bu ilişkinin (11,12) fonksiyonel önemi kendiliğinden ortaya çıkacaktır. Literatürdeki verilerin yönlendirmesi bizi hücre fonksiyonlarında çok önemli yeri olan ve membrana bağımlı bir enzim olan Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase'in beyindeki aktivitesinin hiperkolesterolemik şahıslarda değişebileceği görüşüne ulaştırmıştır. Ancak yapılan literatür çalışmaları Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase ile membran kolesterolü arasındaki ilişkiyi inceleyen yayınların sonuçlarının çelişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Eritrosit membran kolesterolü ile Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesi arasında pozitif ilişki olduğunu vurgulayan bir grup çalışma (2,4,5,8,9,14,17, 20) yanında Yeagle (26) Papahadyopolous ve ark. (16) eritrosit membranında kolesterol artışının Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Hiperkolesteroleminin çok sık rastlanan bir klinik sorun olmasına karşın Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase üzerine olan etkisi yeterince bilinmemektedir. Ayrıca hiperkolesterolemi veya benzeri membran akışkanlığını bozan etkenlere karşı beyin Na<sup>+</sup> pompasının davranışı tesbit edebildiğimiz kadarı ile hiç incelenmemiştir.

Hücrenin hayati fonksiyonlarında anahtar role sahip bu enzimin beyindeki aktivitesinin hiperkolesterolemiklerde değişmesinin klinik önemini fazla olacağına inandığımız için, bu konudaki bilinmeyenlerin yanıtını verebilecek deneysel bir çalışma düzenlenerek sonuçları ilişikte sunulmuştur.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalının olanakları kullanılarak yapılan çalışmada 24 adet Swiss Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar eşit sayıda iki gruba ayrılarak kontrol grubunu oluşturan 12 hayvan normal yem ve musluk suyu ile, deney grubundakiler ise bir ay süre ile %1 kolesterol, %0,35 Taurokolik asit, %5 iç yağı, %0,1 Propil triorasit içeren kolesterolden zengin yem ile beslendiler.

Bir ay beslenmeden sonra 16 saat açlığı takiben hayvanlar İ.p. 25 mg/kg. Nembutal (Sodium Pentobarbital) ile anestetize edilerek kardiyak ponksiyon ile kan alındı. Thorax açılarak sol ventrikül yolu ile aortaya yerleştirilen kateter aracılığı ile 37°C serum fizyolojik kullanılarak organların kanı uzaklaştırıldı. Beyinler buz üzerinde kafatası açılarak bütün olarak çıkarıldı. Korteks, Serebellum, Thalamus ve Ponstan örnek alınarak enzim analizi için Sucroz ve Triton X-100 içinde +4°C de homojenize edildiler.

Homojenat +4°C de 30 dakika bekletildikten sonra 60 dakika süre ile +4°C de ve 30.000 xg de santrifüj edilerek süpernatandaki protein miktarı modifiye Lowry (1) yöntemi ile ölçüldü. 100 µg protein 100 µl Tris-HCl (pH 7,4) içinde olacak şekilde dilue edilen deney ve kontrol dokuların süpernatandaki Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesi Stojanovic ve ark. yöntemine göre ölçülüp (24) açığa çıkan inorganik fosfor Fiske ve Subbarow (7) metodu ile değerlendirildi.

Yağ dokusu uzaklaştırılıp yıkanmış aorta ve kandan arındırılmış dokuların lipidi izopropanol: Hexan (3:1) karışımında ekstrakte edildi. Fosfotungstik acid ile çöktürülen plazma süpernatantının ve ekstre edilen dokuların kolesterol içeriğinin ölçülmesinde enzimatik yöntemden yararlanıldı (10).

Ortalama\* Standard hata olarak verilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Student'un "t" testinden yararlanıldı.

## BULGULAR

Kontrol grubundaki 12 hayvanın ortalama total kan kolesterolü 67,6±5,2 mg/dL iken bu değer deney grubunda 241,9±53,4 mg/dL olarak saptandı. İki grup arasındaki fark istatistiksel önem gösteriyordu (p<0.001).

Serum HDL-kolesterol değerleri kontrol grubunda ortalama 40,3±5,8 mg/dL hiperkolesterolemik grupta 45,2±4,25 mg/dL olarak bulundu. Farkın istatistiksel önemi saptanmadı.

**Tablo - 1**

Hiperkolesterolamiye Bağlı Kan ve Doku Değişiklikleri (Ortalama±S.Hata)

	Total		Aorta Kol. (mg/g)	Cortex			
	Kolesterol (mg/dL)	HDL-Kol. (mg/dL)		Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase (µMpi/mg/saat)	Pons (µMpi/mg/saat)	Serebellum (µMpi/mg/saat)	Talamus (µMpi/mg/saat)
Kontrol grubu	67.6±5.2 n=12	40.3±5.8 n=9	2.18±0.19 n=8	16.2±1.06 n=9	22.7 ± 1.45 n=9	19.7 + 1.35 n=7	20.7±1.37 n=9
Hiperkolesterolemik grup	241.9±53.4 n=12	45.2±4.74 n=9	7.28 ± 1.39 n=8	16.98±1.20 n=9	24.65 ± 1.20 n=9	19.24±1.52 n=9	21.00±1.55 n=9
Gruplar Arası Fark	P<0.001	P>0.05	P<0.001	P>0.05	P>0.05	p>0.05	P>0.05

Aorta kolesterol miktarı kontrol grupta 2,18±0,19 mg/dL iken hiperkolesterolemik hayvanlarda çok belirgin artarak 7,28±1,39 mg/dL'ye çıkmış olduğu dikkati çekti (p<0.001).

Kan ve doku ölçümleri ile hiperkolesterolemik olduğu belirlenen sıçanların beyin Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesi kortekste ortalama 16,98±1,2 jM/mg protein; saat bulunduki kontrol değeri olan 16,2±1.06 /mM/mg protein/saat den önemli göstermiyordu.

Beynin Pons bölgesine ait Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase değeri kontrol grubunda 19,72 < 1,35 MMol/mg.gr/saat idi ve hiperkolesterolemik hayvanlarda bu değer kontrolden farksız bulundu (19,24± 1,52 uMol/mg.gr/saat).

Thalamusun enzim aktivitesi ise kontrol grupta 20,73± 1,37 deney grubunda 21.00±1.55 uMol/mg/saat olarak ölçüldü (Tablo I).

Kontrol grubunda beyin dokusunun içerdiği total lipidin % 14,91±1,84 ünü oluşturan kolesterolün miktarı 12,78±0,65 mg/g. yaş doku olarak saptandı.

Hiperkolesterolemik sıçanlarda beyin dokusunun total lipid bileşimindeki kolesterolün payı değişmişti. Total lipid miktarının % 12,96±1,652 sını oluşturan kolesterolün miktarı 13,5±3,01 mg/g. yaş beyin dokusu idi. Böylece plazma kolesterolündeki artışın beyin kolesterol miktarına etkisi önemsiz bulundu.

## TARTIŞMA

Çalışmamızın kontrol grubunda beynin değişik bölgelerindeki Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivite ölçümlerinden elde edilen değerler bu konuda çalışanların sonuçları ile uyum içindedir (15,24). Her ne kadar kan kolesterolü ile beyin Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompası arasındaki ilişkiyi inceleyen başka yayma rastlanmamışsa da, eritrosit membran Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesinin hiperkolesterolemiden etkilendiğini bildiren yayınlar mevcuttur ancak sonuçlar birbiri ile çelişkilidir (2,4,8,9,16,17,20,26).

Kalp hücreleri membranında kolesterol artışının Na<sup>+</sup> pompasını azalttığını bildiren Grant ve Dhalla'nın (9) bu bulgusu, Purkinje liflerinde çalışan ve kolesterolle Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompa aktivitesinin arttığını bildi-

ren Seiler'in sonucu ile ters düşmektedir (21). Literatür bulgularının birbiri ile çelişmesine karşın kesin olan sonuç kan kolesterolünün artışından eritrosit ve kalp kası membranı Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesinin etkilendiğidir.

Bizim çalışmamızda hiperkolesterolemik hayvanlarda beyin Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase edeğerlerinin değişmemiş bulunması ilk bakışta beyin Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasının kalp kası ve eritrosit membranından farklı bir davranış sergilediğini ve kan kolesterolünden etkilenmeyen bir üçüncü hücre grubunun varlığı ortaya çıkıyor izlenimini vermesine karşın doku kolesterollerinde incelenmesi ile bu uyumsuzluk ortadan kaldırılmıştır.

Şöyleki biz gerek serum, gerekse aorta kolesterol ölçümleri ile belirgin olarak hiperkolesterolemik hale getirdiğimiz sıçanların beyin kolesterol değerlerinin artmamış olduğunu saptadık.

Kontrol g grubumuzda ölçülen 12,78±0,65 mg/g. beyin dokusu total kolesterol değeri, Portman ve ark. (18) nın bulgusu olan 12,92 mg/g. yaş doku değeri Wells ve Ditmetr'in (25) 10.7 mg/g. yaş doku sonucu ile tam uyum içindedir.

Hiperkolesterolemiden beyin kolesterolünün nasıl etkilendiğini gösteren başka bir çalışmaya rastlayamamış olmamız bize deney grubumuzun sonuçlarını karşılaştırma olanağı vermiyor ise de bizim sonuçlarımıza göre hiperkolesterolemik sıçanların beyin doku kolesterolü değişmemektedir. Bu bulgu Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase enzim aktivitesinde saptanan normal değerleri kolaylıkla açıklamakta ve membran kolesterolü ile membran Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesi arasındaki yakın ilişkiyi kuvvetle desteklemektedir (2,4,8,9,17,20). Sonuç olarak çalışmamızda Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase aktivitesinde değişmemiştir. Beynin dolaşımdaki kolesterole karşı periferik oranla kendini daha iyi korumasının fizyolojik önemi şüphesiz çok fazla ve üzerinde durulması gereken bir husustur. Bu savunmanın kırıldığı hallerde Nöron fonksiyonlarının ve elektrofizyolojik özelliklerinin bozulması kaçınılmaz bir beklentidir. Böylesine önemli bir konunun daha ileri deneysel çalışmalar ve klinik gözlemlerle desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Ann M, K.Marcheell, S.Haas.: Protein Determination by modified Lowry method. *Methods in Enzymology* 72: 296-303, 1981.
2. Beutler EMD, W.Kuhl and P.Sacks.: Sodium-Potassium ATPase activity influenced by ethnic origin and rat by obesity. *N.Eng. J.Med.* 309:756-760, 1983.
3. Cooper RA, EC.Arner, J.S. Wiley, SJ.Shattil.: Modification of Red Cell Membrane Structure by Cholesterol-Rich Lipid Dispersions. *J.Clin. Invest.* 55:115-126, 1975.
4. Deluise M, GL. Blackburu, JJ Fluor.: Reduced activity of the red cell sodium potassium pump in human obesity. *N.Eng. J.Med.* 503:107-122, 1980.

5. Demise M and JS.Fheri.: Functionally abnormal Na - K pump in erythrocytes of a morbidly obese patient. J.Clin. Invest. 69:38-44, 1982.
6. Edidin M and AW Sessions.: Heterogeneity in the Plasma membrane Lipids of Eukaryotic Cells. Ann NY. Acad.Sci 414:8-18, 1983.
7. Fiske CH and Y Subbarow.: The calorimetric determination of phosphorus. Clinical Chemistry Theory analysis and Correlation ed. by Kaplan L. A, Pesce A.J. Chapter 55, 1984.
8. Giraud F, M.Claret, K.R.Bruckdorfer, B.Chailley.: The effect of membrane lipid order and Cholesterol on the Internal and external Cationic sites of the Na -K In K/ythrocytes. Biochim. Biophys. Acta. 647: 249-258, 1981.
9. Grant NP, S.Dhalla.: Sarcolemmal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity of diabetik rat heart. Amer. J.Physiol. 14(2): 241-247, 1983.
10. Heider GJ, RL, Boyetti.: The picmole determination of free and total cholesterol in cells in culture. J.Lip. Res. 19:514-518, 1978.
11. Flui D.Y and A K. Harmony.: Interaction of Plasma Lipoproteins with Erythrocytes. II Modulation of Membrane Associated Enzymos. Biochim. Biophys. Acta 550: 425-434, 1979.
12. Jackson PA, DB, Morgan.: The relation between the membrane cholesterol content and anion exchange in he erythrocytes of patients with cholestasis. Biochem. Biophys. Acta 693:93-104, 1982.
13. Kroes J R Ostwalt.: Erythrocyte membrane effect of increased cholesterol content on permeability. Biochem. Biophys. Acta 249: 647-650, 1971.
14. Kummerow Fred A.: Modification of Cell membrane Composition by dietary lipids and its implications for Atherosclerosis. Ann N.Y. Acad. Sci. 414: 29-43, 1983.
15. Mandel P, V.Stefanovic, JC. Hermette and A. Ebel.: The (Na -K ) ATPase activity in Brain of Ouaking Mice. Experientia 32 (1): 77-79, 1976.
16. Papahadjopoulos D, M. Cauden, H.Kimelberg.: Role of cholesterol in membranes effects on phospholopid-protein interaction, membrane permeability and enzymatic activity. Biochem. Biophys. Acta 330:8-26, 1973.
17. Peter JB, W.Fiehn.: Diazacholesterol myotenia accumulation of desmosterol and ATPase of sarcolemma Sci. 179:910-912, 1972.
18. Portman OW, M.Alexander, M.Neuringer, M.Novy, R. Ilhngworth, H.uno.: Effects of Perinatal Malnutrition on Lipid Composition of Neural Tissues from Rhesus Monkeys. J.Nutr. 107:2228-2235, 1977.
19. Schachter D, RE. Abbott, H.Cogan, M.Flann.: Lipid Fluidity of the Individual Hemileaflets of Human Erythrocyte Membrane. Ann. N.Y. Acad. Sci. 414:19-28, 1983.
20. Seiler WFD, W.Fiehn.: Influence of altered sterol compositionNa-K ATPase of cardiac sarcolemma. Experimentio 30: 1421-1422, 1974.
21. Seiler WFD.: (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase activity and Sterol Composition of Membranes. Arch. Pharmacol. 297: S 21, 1977.
22. Shiga T, N.Maeda, T.Suda, K.Kon and M.Sekiya.: The decreased membrane fluidity of in vivo aged human erythrocyte a spin label study. Biochem. Biophys. Acta 55:84:95, 1979.
23. Smith AD, DM.Conroy and J.Belin.: Membrane lipid modification and immune function. Proç. Nutr. Society. 44:201-209, 1985.
24. Stojanovic TB, M.Dijuricic and BB. Mrsulja.: The effects of physostigmine on Na -K ATPase activity in different rat brain region. Experientia 36: 1348-1350, 1980.
25. Wells MA, JC.Ditmetr.: A microanalytical technique for the quantitative determination of twenty-four classes of brain lipids Ouantitaive analysis of brain lipids. Vol.5, No.11, 3405-3416, 1966.
26. Yeagle PL.: Cholesterol modulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase ATP hydrolyzing Activity in the Human Erythrocyte. Biochem. Biophys. Acta 727:39-44, 1983.