

## Akciğerin reperfüzyon hasarında L-carnitine'in koruyucu etkisi

M. Cumhuri Sivrikoz<sup>1</sup>, Eser Öz<sup>2</sup>, Velit Halit<sup>3</sup> Aykut Altunkaya<sup>3</sup>, Haşim Üstünsoy<sup>1</sup>, Işık Şenkaya<sup>5</sup>  
Yıldırım İmren<sup>3</sup> Candan Özoğul<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Gaziantep  
<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Göğüs Kalp Damar Cerrahisi ve <sup>4</sup>Histoloji ve  
Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>5</sup>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Bursa

### ÖZET

L-carnitine uzun zincirli yağ asitlerinin hücre membranlarından taşınmasında kolaylaştırıcı, hücrede serbest radikal hasarının gelişmesinde önleyici rolü vardır. İskemi-reperfüzyon hasarında, izole guinea pig kalpleri üzerinde yapılan çalışmalar L-carnitine'in iske mi öncesi dönemde perfüzyon ortamında bulunduğunda etkili olduğunu ortaya koymuştur.

İzole kontrol grubu akciğerleri (n=10) Krebs-Henseleit solüsyonu ile normotermik koşullarda perfüze edildi. Deney grubunda (n=10) Krebs-Henseleit solüsyonuna 10 mmol dozda L-Carnitine ilave edildi. 20 dakikalık perfüzyonun ardından her iki grup akciğerler normotermik koşullarda iskemiye bırakıldı. 3 saatlik iskeminin ardından 20 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. İske mi öncesinde ve reperfüzyon sonrasında doku ve perfüze örnekleri alındı. Doku örneklerinde Malondialdehide (MDA), Glutathione (GSH) ölçümleri ve elektron mikroskopik incelemeler yapıldı. Perfüze örneklerinde MDA ve GSH ölçümleri yapıldı.

L-carnitine'in deney grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeyini perfüze ve doku örneklerinde azalttığı, GSH düzeyini artırdığı saptandı. Elektron mikroskopik incelemede akciğere spesifik doku yapılarını koruduğu görüldü. Sonuç olarak iske mi öncesi perfüzyon solüsyonlarına ilave edilen L-Carnitine dokuyu iske mi reperfüzyon hasarından korumaktadır.

**Anahtar Kelimeler :** L-Carnitine, akciğer, iske mi-reperfüzyon hasarı

✉ Dr. M. Cumhuri Sivrikoz, Gaziantep Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Ana-  
bilim Dalı, 27070, Gaziantep  
e.mail: mcumhurs@ixir.com

### ABSTRACT

#### Prevention of reperfusion induced lung injury by L-carnitine

L-Carnitine plays an important role in the transmembrane transport of long chain fatty acids for it's oxidation and supresses the development of free radical damage. An experimental comparative study isolated guinea pig lungs has been undertaken to determine the probable beneficial effects of adding L-Carnitine to preischemic pulmonary perfusion solutions in lung ischemia-reperfusion.

The isolated lungs (n=10 in control group) previously being perfused by oxygenated Krebs-Henseleit solution were put in normothermic ischemic conditions. 10 mmol of L-Carnitine was added into a Krebs-Henseleit solution in the experimental group (n=10) and after 20 min., perfusion was completed and the lungs were then exposed to normothermic ischemia. After 3 hours of normothermic ischemia, the lungs were perfused with Krebs-Henseleit solution for 20 minutes. Tissue malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and electron microscopic evaluations were held on before the ischemic period and also at the end of reperfusion. MDA and GSH levels of the perfusate were measured before ischemic period and at the end of reperfusion.

L-Carnitine administration reduced MDA levels both in tissues and perfusates. In contrast to glutathione levels which is increased .

According to our data, the addition of L-Carnitine to preischemic pulmonary perfusion solution showed a significant protective effect regarding both ischemic and reperfusion injury.

**Key Words:** L-Carnitine, Lung, Ischemia-reperfusion injury

## GİRİŞ

Akciğer, pulmoner ve bronkial arteriel dolaşımının olması ve alveoler boşluktaki rezidüel oksijen kaynaklarını kullanabilmesi nedeniyle iskemiye dayanıklı bir dokudur (1). Bununla beraber, akciğer dokusunun tek tip yapısı, alveoller içinde kapalı hava ve kan bölgeleri olması diğer solid organlara göre in vitro iskemi-reperfüzyon hasarından korunmasını güçleştirir (2).

Akciğer transplantasyon cerrahisi konusunda yapılan çeşitli çalışmalar, nakledilen dokunun reperfüzyon dönemindeki hasarında çeşitli mekanizmalarla oluşan serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynadığını göstermiştir. Akciğer transplantasyonu'nun klinik başarısı dokunun reperfüzyon hasarından etkili korunmasına bağlıdır (3,4).

L-Carnitine vücutta doğal olarak oluşan bir yapıdır ve serbest yağ asitlerinin metabolizmasında önemli rol oynar.  $\beta$ -oksidasyonun meydana geldiği mitokondrial matrikse sitozoldeki aktive olmuş uzun zincirli yağ açıl ko-enzim A esterlerini taşıyan tek ajandır. L-Carnitine metabolik yollara toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında fonksiyon görür (5).

Hayvanlar üzerindeki laboratuvar çalışmaları ve insanlar üzerindeki klinik çalışmalar, L-carnitine'in tüm akut ve kronik iskemik sendromlar üzerinde düzenleyici potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur (5).

Bu çalışmada, L-Carnitine ilave edilmiş iskemi öncesi pulmoner perfüzyon solüsyonu ile akciğer dokusunun reperfüzyon hasarından korunmasında L-Carnitinin koruyucu rolünü incelemeyi amaçladık.

## MATERYAL VE METOD

### Hayvanlar

Akciğerler, 300-400 gram ağırlığında erkek guinea piglerden elde edildi (n=20). Tüm hayvanlar, Bilimler Akademisi'nin belirlediği laboratuvar hayvanlarında uyulması gereken kurallara uygun olarak Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edildi (Hıfzısıhha Enstitüsü yayınları No.80-23,1978).

Hayvanlar urethane ile uyutuldu ve femoral venden 200 IU heparin verildi. Trakea'ya açık trakeostomi yoluyla 16 numara kanül yerleştirildikten sonra sternotomi uygulandı. Sağ ventrikül yoluyla pulmoner arter kanüle edildikten sonra hızlı bir şekilde kalp ve akciğerler hazırlandı.

### Perfüzyon teknikleri ve solüsyonlar

Akciğerler Modifiye Langerdorf Perfüzyon düzeneğine asıldı. Dokular sabit hızda oda havası (% 21 oksijen) ile havalandırılırken, perfüzyon  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ml/dk sabit hızda %95 oksijen - %5 karbondioksit karışımı ile havalandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu kullanılarak başlatıldı. Kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonunun yapısı şu şekildedir:  $\text{NaHCO}_3$ : 25 mM,  $\text{NaCl}$ : 112 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 1 mM,  $\text{KCl}$ : 5 mM,  $\text{MgCl}_2$ : 0.5 mM,  $\text{CaCl}_2$ : 2.5 mM ve Glukoz 11.5 mM. Krebs-Henseleit solüsyonu kontrol grubunda pulmoner perfüzyonda kullanılmıştır (6). Deney grubunda solüsyona 10 mmol L-Carnitine eklendi (7).

### Protokol

Kontrol grubunda (n=10) ve Krebs-Henseleit solüsyonuna L-Carnitine eklenmiş (10 mmol) çalışma grubunda, perfüzyonun 20. dakikasında malondealdehide (MDA) ve glutathione (GSH) seviyesi bakmak üzere perfüzyon ve doku örnekleri alınmıştır (8,9). Doku örnekleri tüm deneklerde homojeniteyi sağlamak amacıyla sol alt lobdan alınmıştır. 20 dakikalık perfüzyonun tamamlanmasının ardından her iki grup akciğer dokuları iskemi periyodu için  $37^{\circ}\text{C}$ 'de serum fizyolojik içinde 3 saat süreyle saklandı.

3 saatlik iskeminin ardından her iki gruba Krebs-Henseleit solüsyonu kullanarak 20 dakikalık reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon döneminin sonunda her iki grupta MDA ve GSH değerlerini ölçmek için doku ve perfüzyon örnekleri alındı (Resim 1).

İskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası dönemde alınan doku örnekleri elektron mikroskopi için hazırlandı. Doku örnekleri  $1\text{mm}^3$ 'lük fragmanlar halinde kesildi.

Fragmanlar  $40^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süreyle %2 glutraldehit + cocodilate solüsyonunda saklandı. Fiksasyon sonrasında dokular yıkandı ve oda ısısında 2 saat süreyle %2 O804 ile sekonder fiksasyona bırakıldı. Sekonder fiksasyon sonrası dokular alkolle muamele edilerek uranyl acetate ve phosphothungustic asit solüsyonu ile  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 2saat süreyle boyandı. Son dönemde dokular araldite kombinasyonuna yerleştirildi. Doku örnekleri Carl Zeiss 900 elektron mikroskobu ile incelendi.

### İstatistiksel bilgi analizi

Sonuçlar ortalama değerleri alınarak değerlendirildi ( $\pm\text{SEM}$ ). Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

**Tablo 1. İskemi-reperfüzyon injuride L-carnitine'in etkileri\***

	İskemi öncesi	Reperfüzyon sonrası
<i>Doku MDA düzeyi (n.mol/gr)</i>		
Kontrol grubu	83.33±18.76	89.86±11.83
Çalışma grubu	74.03±17.60	64.47±8.02
<i>Perfüzat MDA düzeyi (n.mol/mlt)</i>		
Kontrol grubu	4.80±0.59	5.19±0.51
Çalışma grubu	4.67±0.62	3.92±0.20
<i>Doku GSH düzeyi (μ mol/gr)</i>		
Kontrol grubu	2.11±0.24	2.16±0.14
Çalışma grubu	2.27±0.24	2.50±0.16
<i>Perfüzat GSH düzeyi (n.mol/mlt)</i>		
Kontrol grubu	81.61±17.60	62.39±2.66
Çalışma grubu	82.27±13.12	93.99±10.05

\*Ortalama değerler hesaplanmıştır

## BULGULAR

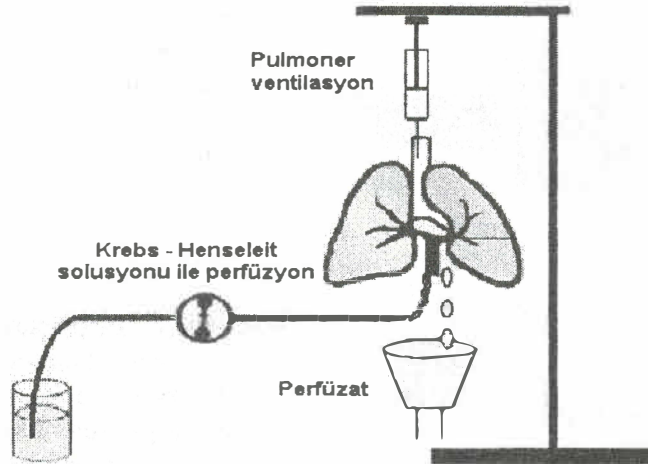
Her iki grupta reperfüzyon sonu doku MDA seviyelerinde ve perfüzat MDA seviyelerinde istatistiksel farklılıklar anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  metindeki sıraya göre)(Tablo 1, Şekil 2 ve 3).

Reperfüzyon dönemi sonunda alınan doku örneklerinde her iki grup GSH seviyelerinde istatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak saptandı. (Tablo 1, Şekil 4)

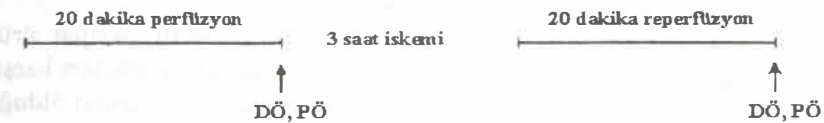
Reperfüzyon dönemi sonunda alınan perfüzat örneklerinde her iki grup GSH seviyelerinde istatistiksel anlamlılık  $p < 0.01$  olarak saptandı. (Tablo 1, Şekil 5)

Preiskemik dönem kontrol grubu ve deney grubu dokularının elektron mikroskopik incelemelerinde alveolokapiller membran ve hücrel yapılar normal olarak değerlendirildi. (Resim 2, 4 metindeki sıraya göre)

Reperfüzyon dönemi sonunda alınan kontrol grubu dokularının incelemelerinde Tip II pnömosit lamellar depolarında bozulmalar olduğu görüldü. (Resim 3).Reperfüzyon dönemi sonunda alınan deney grubu dokularının incelemelerinde Tip II pnömosit lamellar depolarının ve hücrel yapıların normal olduğu görüldü (Resim 5).

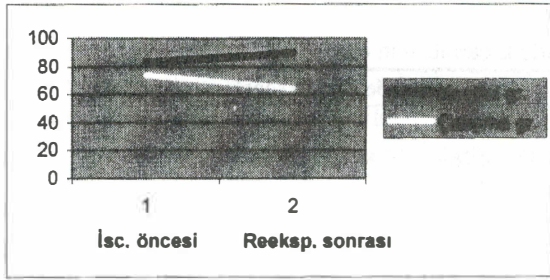


Kontrol grubu ve çalışma grubu perfüzyon protokolü

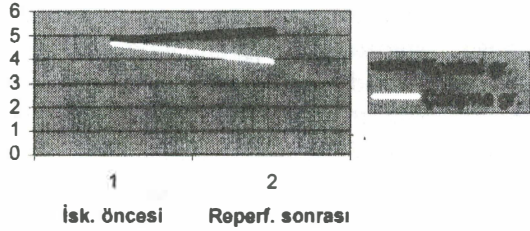


Şekil 1. Deney sistemi. DÖ: Doku örnekleme, PÖ: Perfüzat örnekleme dönemi

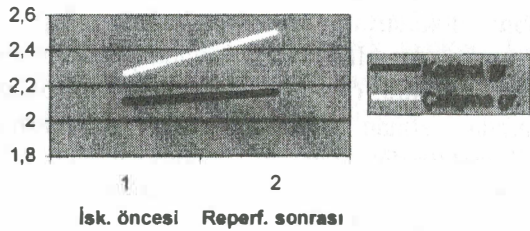




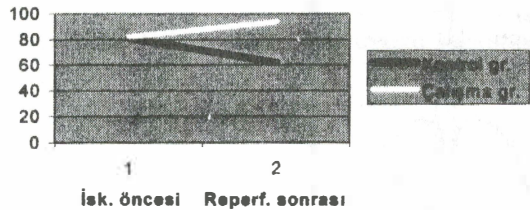
Şekil 2. Doku MDA seviyeleri (nmol/gr).



Şekil 3. Perfüzyon MDA seviyeleri (nmol/mlt).



Şekil 4. Doku GSH seviyeleri (µmol/gr).



Şekil 5. Perfüzyon GSH seviyeleri (nmol/mlt).

## TARTIŞMA

Akciğer diğer organlardan farklı olarak direkt dış çevre ile ilişkilidir ve değişik oksijen basınçlarına ve buna ek olarak toksik ajanlara maruz kalır. Bu ajanlardan bazıları direkt ve indirekt yolla hasar oluşturur. Havadaki ozon ve nitrojen dioksit, sigara dumanındaki karbon ve nitrojenden kaynaklanan serbest radikaller, hücrenin önemli komponentlerinden olan

membran lipidleri ve proteinleri yıkarak direkt pulmoner hasara yol açarlar (10,11).

L-carnitine'in temel fonksiyonu, mitokondrial matrikse stoplazmada bulunan uzun zincirli yağ asitlerini taşımaktır. Mitokondrial matrikse ulaşan uzun zincirli yağ asitleri burada  $\beta$ -oksidasyona uğrar. Bu noktadan hareketle yapılan deneysel çalışmalar L-carnitine'in doku enerji kaybını azalttığını ortaya koymuştur. Ayrıca mitokondrial ara yollardan ortaya çıkan serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırarak dokuyu iskemi-reperfüzyon hasarından korur (7,12,13).

Diğer organlardan farklı olarak L-carnitine'in akciğer metabolizması üzerindeki etkileri konusunda bilinenler sınırlıdır. L-Carnitine, fetal akciğerde fosfolipid sentezini ve Dipalmitol fosfotidil kolin (DPPC) içeriğini artırmaktadır (14). Akciğerde iskemi sırasında alveoler Tip II hücrelerin metabolizmasını ve dolayısıyla sürfaktan seviyesini koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca Tip II hücrelerin mitokondrial matrikslerinde, uzun zincirli yağ asitlerinin transferini artırarak DPPC miktarını artırdığı bilinmektedir (15).

Transplant cerrahisinde iskemi dönemi ve ardından kan akımının restorasyonu ile oluşan reperfüzyon döneminde ortaya çıkan serbest radikaller hedef moleküllerde oksidasyon (lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu) oluşturmaktadır. Doku, GSH gibi kendi savunma mekanizmaları ile bu hasara cevap vermektedir (11,16,17,18,19).

Sushamakumari ve ark. myokard infarktüsü oluşturdukları hayvanlarda L-Carnitine verilen grupta lipid peroksidasyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bu, mitokondrial matriks içinde yağ asidi artışına, peroksid konsantrasyonunun düzenlenmesine ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin artmasına bağlıdır (20).

MDA doku lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Reperfüzyon sonu doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, çalışma grubu örneklerinde kontrol grubu örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Perfüzyon örneklerinde de çalışma grubu lehine anlamlı azalma saptanmıştır ( $p < 0,01$ ). Lipid peroksi-dasyonundaki bu azalma akciğer dokusunun L-carnitine' ile korunduğunun göstergesidir.

GSH'nun reaktif oksijen ürünlerine, serbest radikallere ve toksik etkilere karşı hücre savunma mekanizmasının bir parçası olduğu bilinmektedir





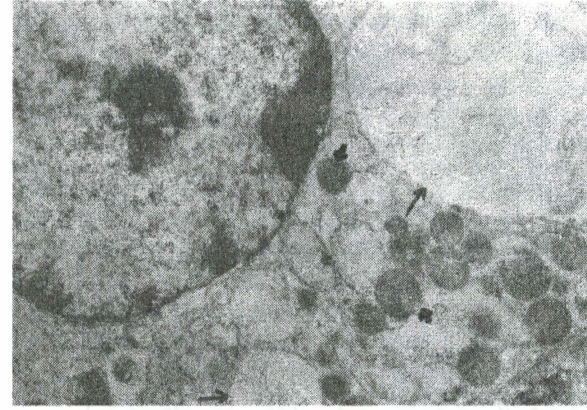
**Resim 1.** İskemi öncesi kontrol grubu. Kalın ok: Mitokondri. İnce ok: Lamellar cisim (Uranyl Acetate, Lead citrate x 13500)



**Resim 2.** İskemi öncesi çalışma grubu. Kalın ok: Mitokondri. İnce ok: Lamellar cisim (Uranyl Acetate, Lead citrate x 13500)



**Resim 3.** Reperfüzyon sonrası kontrol grubu. Kalın ok: Mitokondri. İnce ok: Lamellar cisim (Uranyl Acetate, Lead citrate x 21000)



**Resim 4.** Reperfüzyon sonrası çalışma grubu. Kalın ok: Mitokondri. İnce ok: Lamellar cisim (Uranyl Acetate, Lead citrate x 21000)

(21). L-Carnitine dokuda glutasyon peroksidaz aktivitesini artırmakta olup, çalışmada alınan doku ve perfüzyon örneklerinde, çalışma grubu glutasyon düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış bulunmuştur ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , metin içindeki sırasıyla).

Farklı raporlar akciğerin hipotermik koşullarda 30 saat süreyle saklanabileceğini belirtmektedir (22). Çalışmamızda, laboratuvarımızın çevre koşulları nedeniyle 3 saatlik normotermik iskemiyi modelini kullandık (6).

Elektron mikroskopik incelemelerde çalışma grubunda Tip II pnömositlerin lamellar yapılarının korunduğu görülmüştür. Bu bulgu Klepetko ve ark.'nın çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir (15).

Elde edilen biyokimyasal ve elektron mikroskopik sonuçlar iskemiyi reperfüzyon hasarına karşı L-Carnitine'nin akciğer dokusunu koruyucu özelliğini vurgular niteliktedir.

## KAYNAKLAR

1. Heffner I, Fracica P. Ischemia-reperfusion edema of the lung. In: Nitric oxide and radicals in pulmonary vasculature. Weir EK, Archer SL, Reeves IT (eds). New York, 1996. P. 104
2. Date A, Matsumura A, Manchester JK et al. Changes in alveolar oxygen and carbondioxide

concentration and oxygen consumption during lung preservation. J Thorac Surg 1993; 105: 492-498.

3. Hernandez LA, Granger N. Role of antioxidants in organ preservation and transplantation. Crit Care Med 1998; 16: 542-552.

4. Adkins W, Taylor A: Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2012-2019.
5. Pepine CJ: The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin Therapeutics* 1991; 13: 21-27.
6. Soncul H, Öz E, Kalaycıoğlu S: Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest* 1999; 115(6): 1672-1677.
7. Tatlıcan O, Kalaycıoğlu S, Gökgöz L et al: The dose-dependent effects of L-Carnitine in myocardial protection in normothermic ischemia. *Cardiovasc Surg* 1998; 6(2): 142-148.
8. Kurtel H, Granger DN, Tso P, Grisham MB: Vulnerability of intestinal interstitial fluid the oxidant stress. *Am J Physiol* 1992; 263: 573-578.
9. Casini A, Ferrali M, Pompeja A et al: Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986; 123: 520-531.
10. Smith LL: The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 675-685.
11. Heffner I, Fracica P: Ischemia-reperfusion edema of the lung. In: Nitric oxide and radicals in pulmonary vasculature. Weir EK, Archer SL, Reeves IT (eds) New York, 1996. P. 109.
12. Packer L, Valenza M, Serbinova E: Free radical scavenging is involved in the protective effect of L-propionylcarnitine against ischemia-reperfusion injury of the heart. *Arch Biochem Biophysics* 1991; 288(2): 533-537.
13. Rebouche CJ, Parison JD: Carnitine metabolism and function in humans. *Ann Rev Nutr* 1986; 6: 41-66.
14. Lohninger A, Böck P, Dadak L et al: Effect of carnitine on foetal rat lung dipalmitoyl phosphatidylcholine content and lung morphology. *J Clin Chem Biochem* 1990; 28: 313-318.
15. Klepetko W, Lohninger A, Wisser W et al: Pulmonary surfactant in broncho alveolar lavage after canine lung transplantation: Effect of L-Carnitine application. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 1048-1058.
16. Comporti M: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 593-599.
17. Engler RL: Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 1989; 63: 19-23.
18. Grance PA: Ischemia-reperfusion injury. *British J Surg* 1994; 81: 637-647.
19. Ooiwa H, Janeno DR, Stanley AWH, Downey JM: Examination of two small molecule antiperoxidative agents in a rabbit model of postischemic myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharm* 1991; 17: 761-767.
20. Sushamakumari S, Jayadeep A, Sureshkumar JS, Menan VP: Effect of carnitine on malondialdehyde, taurine and glutathione levels in heart of rats subjected to myocardial stress by isoproterenol. *Indian J Exper Biol* 1989; 27: 137-144.
21. Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ: The in vivo and invitro protective properties of taurine. *Gen Pharm* 1995; 26(3): 457-462.
22. Miyoshi S, Shimokawa S, Schreinemakers H: Comparison of the University of Wisconsin preservation solution and other crystalloid perfusates in a 30 hour rabbit lung preservation model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 27-32.