

## KARNİTİN ve C VİTAMİNİNİN REPERFÜZYON HASARINA OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

### COMPARISON OF EFFECTS OF CARNITIN AND ASCORBIC ACID ON REPERFUSION INJURY

\*Dr. Atilla SARAÇ, \*Dr. Hacı AKAR, \*\*Dr. Levent YILDIZ, \*Dr. Ferişt Kolbakir, \*Dr. Hasan Tahsin KEÇELİGİL

\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, \*\*Patoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

Adres: Yrd. Doç. Dr. Hacı AKAR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 55139 Kurupelit / SAMSUN

#### Özet

Askorbik asit güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı, güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Karnitin ise beta oksidasyonları için uzun zincir yağ asitlerinin mitokondrial matriks içine taşınmasını sağlar ve reperfüzyon döneminde glikoz oksidasyonunu artırır. Bu iki ajanın antioksidan etkisi tavşanda ekstremite iskemisi / reperfüzyon modelinde araştırıldı. Reperfüzyon sonrası tüm deneklerin soleus kasından alınan segmenter kas biyopsisi örnekleri ışık mikroskopunda iskemik hasarın patolojik bulguları olan nekroz, striasyon kaybı, santralizasyon, splitting veya ring formasyonu, fibrozis ve çap farklılıkları açısından değerlendirilerek, gruplar arasında istatistiksel fark olup olmadığı araştırıldı.

Uygulanan deneysel modelde, sodyum askorbat verilen grupta istatistiksel olarak anlamsız, karnitin verilen grupta ise istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere serum fizyolojik verilen kontrol grubuna göre reperfüzyon hasarında azalma görüldü. Karnitin ve sodyum askorbat verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise fibrozis ve çap farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere tüm parametrelerde karnitin iskemik hasarın azaltılmasında daha etkili olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Reperfüzyon hasarı, karnitin, askorbik asit

#### Summary

Because of its reducing effect, ascorbic acid, is a strong antioxidant agent and has the ability of reacting with superoxide anion and hydroxyl ion of oxygen-derived free radicals. Carnitine also can increase the oxidation of glucose during the reperfusion phase by performing transportation of long chain fatty acids to the mitochondrial matrix for the beta oxidation. Antioxidant effects of these substances were studied on rabbits at the basis of extremity ischemia / reperfusion (I/R) model. Following reperfusion biopsies were taken from soleus muscles. All of the biopsy specimens were looked under light microscope from the aspect of histopathologic findings of ischemic injury which were necrosis, loss of striation, centralization, splitting / ring formation, fibrosis and diameter differences, and results were analyzed statistically. Data have showed that both sodium ascorbate and carnitine were effective in reducing the reperfusion injury when compared to the placebo group. Differences were insignificant for sodium ascorbate and significant for carnitine statistically. Compared to

each other, carnitine was superior to sodium ascorbate but the difference was significant statistically only from the aspect of fibrosis and diameter differences.

Keywords: Reperfusion injury, carnitine, sodium ascorbat

#### Giriş

İskelet kası iskemisi, akut arter tıkanması sonucunda sık olarak karşımıza çıkan klinik bir problemdir. Akut iskemik gelişen bir ekstremiteye kan akımı yeniden sağlandığı zaman (reperfüzyon), iskemik periyotta oluşandan daha fazla iskelet kası nekrozu meydana gelebilir. Bu durum etkilenen ekstremitede, ödem, metabolik asidoz ve makroskobik myoglobülin ile kendini gösterir. Reperfüzyon ürünlerinin sistemik etkisi ile bazı vakalarda akut renal yetmezlik, akut solunum yetmezliği, kalpte fonksiyon bozukluğu ve ölüm meydana gelebilir. Klinikte bu durum "myonefropatik metabolik sendrom" olarak bilinir. Bu olaylar sonucu % 15-22' yi bulan oranlarda mortalite ve %30'u bulabilen majör amputasyon söz konusu olabilir [2].

Reperfüzyon hasarının önlenmesi veya azaltılması konusunda, birçok ilaçlar ve metotlar önerilmiştir. Vitamin E [3], lipit peroksidaz inhibitörleri [4], mannitol [5], katalaz, süperoksit dismutaz [6], tromboksan-A2 inhibitörleri [7] ve düşük basınçlı reperfüzyon [8] bunlardan bazılarıdır.

Bu deneysel çalışmada, karnitin ve C vitamininin reperfüzyon hasarını azaltmadaki etkileri araştırıldı.

#### Materyal ve Metod

Çalışma, Etik Kurulu onayı alınarak, Deneysel ve Cerrahi hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda 20 Mart 1999 – 10 Nisan 1999 tarihleri arasında dişi tavşanlar üzerinde gerçekleştirildi.

Hardy ve arkadaşlarının [1] tarif ettiği, akut iskemik reperfüzyon modeline uygun olarak, Yeni Zelanda türü dişi tavşanlar üzerinde akut iskemik reperfüzyon hasarı modeli oluşturuldu. 40 tavşan denek olarak kullanıldı. Tavşanların ağırlığı 2.5 – 3.3 kg arasında ve ortalama 3.1 kg idi. Tüm tavşanların sağ alt ekstremitesinde çalışıldı. Tavşanlar dört gruba ayrıldı. Oda havasında, (20 °C) ketamin HCL (Ketalar) 30 mg / kg ve xylozin hydrochlorur (Rompun) 2 mg / kg sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. Grup I'de (G1) (n=10) sadece anestezi uygulandı ve 6 saat bekleme sonrasında soleus kasından biyopsi alındı. Grup II

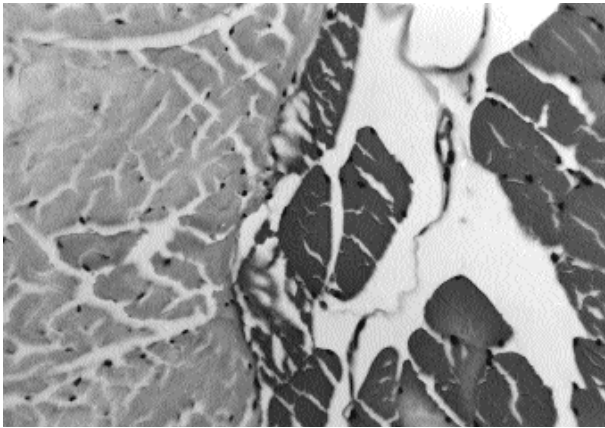
(G2) (n=10), Grup III (G3) (n=10) ve Grup IV' de (G4) (n=10) anestezi verilmesini takiben sağ arka ekstremitte kalça eklemi hizasından arteriyel dolaşımı durduracak şekilde turnike uygulandı. 4 saat sonra turnike açılarak, iki saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Turnike açılmadan hemen önce G2 deneklere 1.5 ml serum fizyolojik ,G3 deneklere 50 mg / kg (yaklaşık volüm 1.5 ml ) sodyum askorbat (Redoxan®), G4 deneklere 100 mg / kg ( yaklaşık volüm 1.5 ml ) Karnitin (Carnitine ®) sol femoral ven yoluyla verildi. Reperfüzyon sonrası tüm deneklerin soleus kasından biyopsi alındı.

Histopatolojik inceleme : Deneklerden çıkartılan segmenter kas biyopsisi örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formolin solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Biyopsi örnekleri rutin doku takibinden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Hazırlanan parafin blokların 4-6 µm'lik H.E kesitleri hazırlandı. Kesitler Nikon optiphot-2 ışık mikroskopunda 200 ve 400'lük büyütmelelerde kas dokusu iskemisinin patolojik bulguları olan nekroz(hücre ölümü), striasyon kaybı (çizgili adalede enine çizilenmenin kaybolması), santralizasyon (sarkolemmal yerleşimli nukleusun merkeze deplase olması), splitting / ring formasyonu (adale lifinde merkezi stoplazmik boşalma sonucu ortaya çıkan yüzük şeklinde veya ortası boşalmış adale lifi şeklinde görünüm), fibrozis (fibroblast ve kollajenlerde artım) ve çap farklılıkları (adale lifleri arasındaki stoplazmik çap farkı) yönünden histopatolojik incelemeye alındı.

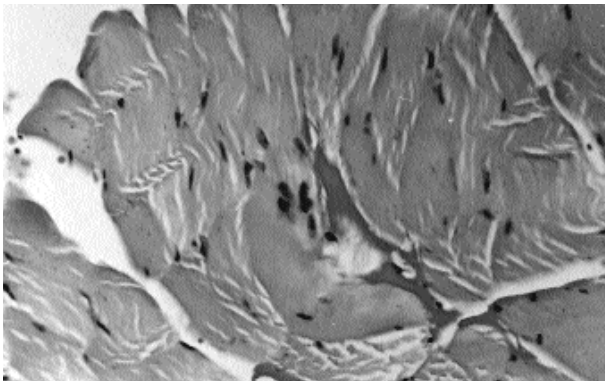
İstatistiksel yöntem:

Reperfüzyon hasarının değerlendirilmesinde kullandığımız yukarıdaki parametreler için, ki-kare Fisher exact istatistiksel test yöntemi uygulanarak gruplar arasında istatistiksel fark olup olmadığı araştırıldı. P<0.05 istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi.

## Sonuçlar



Resim 1: Kas liflerinde %50'yi aşan nekroz görülmektedir. (x200H:E)



Resim 2: Kas liflerinde santralizasyon görülmektedir.

Tüm denekler çalışmayı tamamladı. Dency sırasında mortalite olmadı. Soleus kasındaki iskemik değişiklikler Tablo 1, 2, 3 ve 4'de görülmektedir. Tablolardaki "+" işareti iskemik değişikliğin var olduğunu, "-" işareti ise iskemik değişikliğin olmadığını göstermektedir. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada, nekroz açısından G2 ile G3 (p>0.02) ve G3 ile G4 (p<0.3) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız, diğerleri anlamlı (p<0.05), striasyon kaybı yönünden G1 hariç tutulduğunda diğer gruplar arasındaki fark anlamsız (p>0.05) bulundu. Santralizasyon için gruplar karşılaştırıldığında, G2 ile G3 (P<0.1) ve G3 ile G4 (p<0.5) arasındaki fark anlamsız, diğer gruplar arasındaki farklar anlamlı (p<0.05), splitting ve ring formasyonu açısından G1 hariç tutulduğunda diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p>0.05). Fibrozis açısından yapılan karşılaştırmada G2 ile G3 (p<0.5) ve G2 ile G4 (p<0.08) arasındaki fark anlamsız, G1 ile diğer gruplar ve G3 ile G4 (p<0.03) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Çap farklılıkları için yapılan karşılaştırmada, G1 ile G4 (p<0.3) ve G2 ile G3 (p=0) arasındaki fark anlamsız, diğer gruplar arasındaki anlamlı fark ise anlamlı (p<0.05) bulundu.

## Tartışma

Grup	Nekroz	Striasyon kaybı	Santralizasyon	Splitting/ring formasyonu	Fibrozis	Çap farklılıkları
1	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

Tablo 1: Soleus kasındaki iskemik değişiklikler

Grup 2	Nekroz	Striasyon kaybı	Santralizasyon	Splitting/ring formasyonu	Fibrozis	Çap farklılıkları
1	+	+	+	-	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+

Tablo 2: Soleus kasındaki iskemik değişiklikler

Grup 3	Nekroz	Striasyon kaybı	Santralizasyon	Splitting/ring formasyonu	Fibrozis	Çap farklılıkları
1	+	+	+	-	-	+
2	+	+	-	+	+	+
3	-	+	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+

Tablo 3: Soleus kasındaki iskemik değişiklikler

Grup	Nekroz	Striasyon kaybı	Santralizasyon	Splitting/ring formasyonu	Fibrozis	Çap farklılıkları
1	-	-	-	+	+	+
2	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
5	-	+	-	+	-	-
6	+	-	+	+	-	+
7	-	-	+	-	+	+
8	+	+	-	+	-	-
9	+	+	+	+	-	-
10	-	+	+	-	+	+

Tablo 4: Soleus kasındaki iskemik değişiklikler

Akut iskemiyeye maruz kalan ekstremitelere, reperfüzyon sağlanması, oksijen kaynaklı serbest radikaller oluşturup reperfüzyon hasarına neden olur. Bu da iskemik periyottan daha fazla iskelet kası nekrozu meydana getirir. Aynı durum kalp kası için de geçerlidir. Bazen bu tablo hayatı tehdit eden klinik sendromlara neden olabilir ve yüksek morbidite ve mortalite ile seyredir [2]. İskemi sırasında, hücre biyomembran bütünlüğünü koruyamamakta, Ca ve fosfolipid A2 salınımına neden olmaktadır. Artan biyomembran hasarı, poliansatüre yağ asitlerinin açığa çıkmasına ve yağ asidi radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. İskeminin bu aşamasında oksijenin yeniden ortama girmesiyle yağ asit radikalleri oksijen ile birleşerek lipid peroksidasyon reaksiyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu hem membran geçirgenliğini artırmakta hemde aktive olduklarında serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimler salgılayan lökositler üzerinde kemotaksis oluşturmaktadır. Neticede reperfüzyon ile, iskemi sırasında oluşan doku hasarı daha da artmaktadır. Histopatolojik incelemede bu hasar, nekroz, striasyon kaybı, santralizasyon, splitting/ring formasyonu, fibrozis ve çap farkı olarak görülmektedir, bu parametrelerden birkaç tanesi birlikte ortaya çıkabilmekte, ancak sadece bir tanesinin görülmesi de anlamlı kabul edilmektedir [3]. Reperfüzyon hasarını azaltmak için bir çok ajan ve yöntem kullanılmıştır [4-9].

Askorbik asit (C Vitamini) güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı, güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Karnitin ise beta oksidasyonları için uzun zincir yağ asitlerinin mitokondrial matriks içine taşınmasını sağlar ve reperfüzyon döneminde glikoz oksidasyonunu artırarak antioksidan etki gösterir. Bu iki ajanın antioksidan etkisi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır.

Deneyisel çalışmalarda akut iskemi öncesinde veya sırasında karnitin verilmesinin infarktli ve iskemik miyokard da ATP düzeylerini artırdığı, hemodinamik parametreleri iyileştirdiği, ST segment elevasyonu derecesini azalttığı saptanmıştır [10-13]. Bu bulgular akut miyokard infarktüsü (AMİ) sırasında karnitin tedavisinin nekroz sahasını küçültbileceğini düşündürmektedir. Nebuzzi ve arkadaşlarının [14] çalışmasında AMİ'nin ilk 8 saatinde gelen 12 hastaya 5 gün süreyle 40 mg/kg gün dozunda karnitin tedavisi yapılmış, bu hastalarda kontrol grubuna göre CPK-MB düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

İskemi sonrasında kalbin mekanik fonksiyonunun düzelmesinin, reperfüzyon döneminde kullanılan enerji kaynağı ile ilişkili olduğu gösterilmiş, enerji metabolizmasının yağ asitlerinden glikoz oksidasyonuna kaydırılmasının reperfüzyon döneminde miyokard fonksiyonunun düzelmesine

önemli katkı sağladığı saptanmıştır [15]. Bu amaçla Broderick ve ark. [16] izole çalışan fare kalbi ile oluşturulan iskemi – reperfüzyon modelinde perfüzyon sıvısına 10 mM konsantrasyonunda eklenen karnitin kontrol grubuna göre reperfüzyon döneminde glikoz oksidasyonunu anlamlı derecede arttırdığı göstermişlerdir. Bu çalışmaya dayanarak AMİ geçirenlerde trombolitik tedavi veya acil anjiyoplasti sırasında karnitin tedavisinin, miyokard fonksiyonunu koruması, nekroz sahasını küçültmesi, reperfüzyon aritmilerinin sıklığını azaltması beklenebilir.

Bohles ve arkadaşlarının çalışmasında, 20 hastaya aorto-koroner bypass cerrahisi öncesi 2 gün süreyle 1g /gün dozunda oral karnitin verilmiş, operasyondan önce 0.5 g'lık doz IV uygulanmış, sonuçta karnitin verilen hastalarda kontrol grubuna göre miyokard ATP düzeyinin arttığı ve laktat düzeyinin azaldığı gözlenmiştir [17]. Buna karşılık Demeyere ve arkadaşlarının çalışmasında multipl aorta-koroner bypass yapılan hastalara operasyon öncesi 3 veya 6 g IV karnitin verildiğinde kontrol grubuna göre miyokard ATP ve kreatin fosfat düzeyleri anlamlı farklılık göstermemiştir [18].

Sağdıç ve arkadaşları, kobayların alt ekstremitelerinde, Hardy'nin tarif ettiği akut iskemi reperfüzyon modeline uygun olarak, akut iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmuşlar ve reperfüzyondan hemen önce intravenöz uyguladıkları yüksek doz (75 mg/kg) sodyum askorbatın reperfüzyon hasarını azalttığını göstermişlerdir. [19].

Westhuyzen ve arkadaşları, elektif koroner bypass operasyonuna maruz kalan 76 hasta üzerinde yaptıkları çalışma ile, hastalara operasyondan 12 saat önce antioksidan olarak 1 gm askorbik asit verilmesinin, postoperatif dönemde hemodinamiye anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir [20].

Bushell ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ratların alt ekstremitesinde 4 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon oluşturup, iskemi ve reperfüzyon süresi boyunca deneklere yüksek doz askorbik asit verilmiş, reperfüzyon sonrası anterior tibial kastan alınan biyopside, reperfüzyon hasarında anlamlı azalma tespit edilmiştir [21].

Yukarıdaki klinik çalışmaların bir kısmı, karnitin ve askorbik asidin, iskemiyeye maruz kalmış iskelet kası veya miyokarda reperfüzyon hasarını azalttığını savunurken, bir kısmı da bu ajanların reperfüzyon hasarına olumlu bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise, sodyum askorbat verilen grupta istatistiksel olarak anlamsız, karnitin verilen grupta ise istatistiksel olarak da anlamlı olmak üzere serum fizyolojik verilen kontrol grubuna göre reperfüzyon hasarında azalma görüldü. Karnitin ve sodyum askorbat verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise fibrozis ve çap farkı açısından istatistiksel olarak da anlamlı olmak üzere, tüm parametrelerde karnitin iskemik hasarın azaltılmasında daha etkili olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, şimdiye kadar yapılmış tüm çalışmalar göz önüne alındığında, karnitin ve C vitamininin reperfüzyon hasarına olan etkilerini kesin olarak saptayabilmek için, daha geniş kapsamlı yeni çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

## Kaynaklar

- Hardy SC, Hommer-Vanniasinkam S, Gough MS: The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury : an experimental model with implications for surgery on acutely ischemic lower limb. Eur J Vasc Surg 1990; 4: 351-8.

2. Haimovici H: Metabolic complications of acute arterial occlusions and skeletal muscle ischemia: myoneuropathic – metabolic syndrome. Ascer E, Holier HL, Strandness DE, Towne JB; Haimovici's Vascular Surgery Principles and Techniques, Cambridge, Blackwell Science. 1996;509-30.
3. Ramzi SC, Vinay K, Stanley LR: Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, WB Saunders Company. 1994; 1213-60.
4. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y: Lipid peroxides in mechanism of ischemia / reperfusion injury in skeletal muscle experimental studies. Vasc Surg 1993; 20: 191-201.
5. Homer-Vanniasinkam S, Hardy SC, Gough MS: Reversal of the post ischemic changes in skeletal muscle blood flow and viability by a novel inhibitor of lipid peroxidation. Eur J Vasc Surg 1993; 7: 41-5.
6. Blebea J, Keer JC, Hobson RW, et al: The effect of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. Curr Surg 1987; 44: 396-8.
7. Nishimaki K, Urayama H, Maksuchi M, et al: Free radicals reperfusion injury after acute aortic occlusion. Vasc Surg 1992; 18: 612-617.
8. Homer- Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MS: Role of thromboxane A2 in muscle injury following ischemia. Br J Surg 1994 ; 81: 974-6.
9. Bayersdorf F, Sarai K, Mitreo Z, et al: Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: Controlled limb reperfusion to reduce post ischemic syndrome. Cardiovasc Surg 1993; 1: 330- 6.
10. Shug AL, Thomsen JH, Folts JD, et al: Changes in tissue levels of carnitine and other metabolites during myocardial ischemia and anoxia. Arch Biochem Biophys 1978; 187:25-33.
11. Suziki Y, Kamikawa T, Kobayashi A, et al: Effects of L- carnitine on tissue levels of acyl carnitine, acyl coenzyme A and high energy phosphate in ischemic dog hearts. Jpn Circ J 1981; 45: 687-94.
12. Folts JD, Shug AL, Koke JR, et al: Protection of the ischemic dog myocardium with carnitine. Am J Cardiol 1978;41:1209-14.
13. Thomsen JH, Shug AL, Yap VU, et al: Improved pacing tolerance of the ischemic human myocardium after administration of carnitine. Am J Cardiol 1979; 43:300-6.
14. Nebuzzi AG, Schiavoni G, Amino CM: Beneficial effects of L- carnitine in the reduction of the necrotic area in acute myocardial infarction. Drugs Exptl Clin Res 1984;10:219-23.
15. Lopaschuk GD, Spafford M, Davies NJ, et al: Glucose and palmitate oxidation in isolated working rat hearts reperfused after a period of transient global ischemia. Circ Res 1990;66:546-53.
16. Broderick TL, Quinney HA, Barker CC, et al: Beneficial effect of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused after a transient period global ischemia is accompanied by a stimulation of glucose oxidation. Circulation 1993;87:972-81.
17. Bohles H, Noppeney T, Akcetin Z, et al: The effect of preoperative L-Carnitine supplementation on myocardial metabolism during aorto- coronary bypass surgery. Zeitschrift fur kardiologie. 76 suppl 1987;5:14-8.
18. Demeyere R, Lormans P, Weidler, et al: Cardioprotective effect of carnitine in extensive aortocoronary bypass grafting. Anesthesia & Analgesia. 1990; 71 : 520-8 .
19. Sağdıç K, Ener S, Gür E, et al: İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. Damar Cerrahisi Dergisi 1996 ; 51-7.
20. Westhuyzen J, Cochrane AD, Tesar PJ, et al: Effect of preoperative supplementation with ascorbic acid on myocardial injury in patients undergoing cardiac operations. J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113 : 942-8.
21. Bushell A, Klenerman L, Davies H, et al: Ischemia – reperfusion induced muscle damage. Protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits. Acta Orthop Scand 1996 ; 67: 393-8.