

İskemi ve Reperfüzyona Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Akciğer Hasarını Önlemede Pentoksifilin, Karnitin ve Askorbik Asidin Etkileri

THE EFFECT OF PENTOXIFYLLINE, CARNITINE AND ASCORBID ACID ON IMPROVEMENT OF LUNG INJURY CAUSED BY ISCHEMIA-REPERFUSION

Öcal Berkan, *Esin Yıldız, Feride Güneç, Nurkay Katrancıoğlu, İlhan Günay, Kasım Doğan

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalı, Sivas

*Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı, Sivas

Özet

Amaç: Bu çalışmada, geçici iskemi reperfüzyona (İ/R) bağlı olarak ortaya çıkan akciğer hasarını önlemede pentoksifilin, karnitin ve askorbik asidin etkileri incelendi.

Materyal ve Metod: Çalışmaya alınan 29 adet rat, kontrol grubu (Grup 1), İ/R grubu (Grup 2), askorbik asit verilen grup (Grup 3), karnitin verilen grup (Grup 4), ve pentoksifilin verilen grup (Grup 5) olmak üzere beş gruba ayrıldı. Grup 1'deki ratlara sadece anestezi verildi ve batın açılıp abdominal aorta eksplore edildikten sonra hiçbir girişim yapılmadan tekrar kapatıldı. İkinci grupta batın açıldıktan sonra abdominal aorta eksplore edildi ve infrarenal aortaya klemp konularak batın kapatıldı. Üç saatlik iskemi, 1 saatlik reperfüzyon süresi beklendi. Aynı işlem 3. 4. ve 5. gruplara da uygulandı, ayrıca bu gruplara sırasıyla askorbik asit, karnitin ve pentoksifilin verildi. Yapılan işlem tamamlandıktan sonra ratların akciğerleri çıkartıldı ve histolojik inceleme yapıldı. Büyütme alanı içerisinde bulunan akciğer dokusundaki polimorf nüveli lökositler (PMNL), konjesyon ve interstisyel ödem semikantitatif olarak değerlendirilerek akciğer hasarı tespit edildi.

Bulgular: Kontrol grubuna göre diğer dört grupta daha fazla PMNLbirikimi, ödem ve konjesyon vardı. İkinci grup ile kıyaslandığında ise ilaç tedavisi verilen 3. 4. ve 5. gruplarda PMNLsayısının daha az olduğu görüldü. Semikantitatif değerlendirmede hesaplanan hasar skor puanı kontrol grubunda 0.6, 2. grupta 2.6, 3. grupta 2.16, 4. grupta 2.28 ve 5. grupta 1.83 olarak bulundu.

Sonuç: İnfrarenal aort oklüzyonuna bağlı olarak ortaya çıkan geçici iskemi ve reperfüzyonun akciğer dokusu üzerinde yaptığı hasarı önlemede askorbik asidin, karnitin ve pentoksifilin yararlı etkileri olduğu sonucuna ulaşıldı.

Anahtar kelimeler: İskemi/reperfüzyon, akciğer hasarı, pentoksifilin, karnitin, askorbik asit

Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2002;10:92-95

Summary

Background: In this study, injury in the lungs due to ischemia/reperfusion (I/R) and preventive effect of pentoxifylline, carnitine and ascorbic acid were investigated.

Methods: Twenty-nine rats were randomized into five groups: 1) Control (Group 1); 2) I/R group (Group 2); 3) Animals were pretreated with pentoxifylline (Group 3); 4) Animals were pretreated with carnitine (Group 4); 5) Animals were pretreated with ascorbic acid (Group 5). Rats in the Group 1 were undertaken laparotomy and closed after exploration of abdominal aorta. In the second group, the infrarenal aorta of the rats were clamped for a period of 3 hours. After ischemic period, aortic clamping were removed and waited for 1 hour of reperfusion period. The rats in the 3., 4., and 5. Group were administered pentoxifylline, carnitine and ascorbic acid, respectively. The animals were sacrificed and the histological specimens of the lungs were examined. Lung injury was rated with a semi-quantitative score based on congestion, interstitial edema, and polymorph nuclear leukocyte (PMNL) infiltration.

Results: Edema, congestion and the more prominent accumulation of PMNL were determined in the specimens of other four groups as compared to the control group. The average scores were 0.6 in Group 1; 2.6 in Group 2; 2.16 in Group 3; 2.28 in Group 4; 1.83 in Group 5, respectively.

Conclusions: Pretreatment with pentoxifylline, carnitine and ascorbic acid were found to be beneficial in prevention of lung injury after IR of infrarenal aortic occlusion.

Keywords: Ischemia/reperfusion, lung injury, pentoxifylline, carnitine, ascorbic acid

Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2002;10:92-95

Sunulduğu Kongre: 1. Deneysel Cerrahi Kongresi, 5-6 Ocak 2002, Ankara

Adres: Dr. Öcal Berkan, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalı, 58140 Sivas

e-mail: oberkan@cumhuriyet.edu.tr

Giriş

Abdominal aortanın klemplenmesi sonrasında ortaya çıkan geçici iskemik reperfüzyonun (İ/R) akciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir [1-3]. İskemik reperfüzyon hasarının önlenmesi veya azaltılması için birçok ilaç ve yöntem kullanılmıştır [4-6]. Bu çalışmada, distal aort oklüzyonu sonucu oluşan ve geçici İ/R'ye bağlı olarak ortaya çıkan akciğer hasarını önlemede pentoksifilin, karnitin ve askorbik asidin etkileri incelenmiştir.

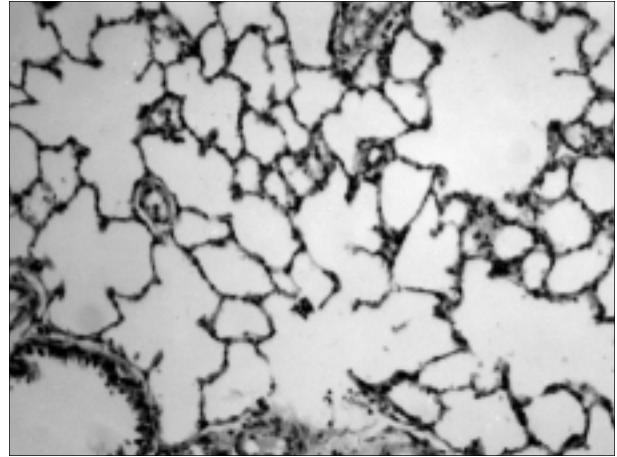
Materyal ve Metod

Aynı ortamda yaşamış, aynı şekilde beslenmiş ve ağırlıkları 230 - 300 g arasında olan 29 adet Wistar albino cinsi beyaz rat çalışmaya alındı. Ratlar kontrol grubu (Grup 1), İ/R grubu (Grup 2), askorbik asit verilen (Grup 3), karnitin verilen (Grup 4), ve pentoksifilin verilen (Grup 5) olmak üzere beş gruba ayrıldılar. Oda havasında, 20°C'de, Ketamine HCl (Ketalar, Eczacıbaşı) 40 mg/kg + xylazine (Rompun, Bayer) 5 mg/kg sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. İşlem boyunca ratlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Anestezi sonrasında batin yaklaşık 4 cm'lik orta hat insizyonla ksifoidin hemen altından pubisin 0.5 cm üzerine kadar açıldı.

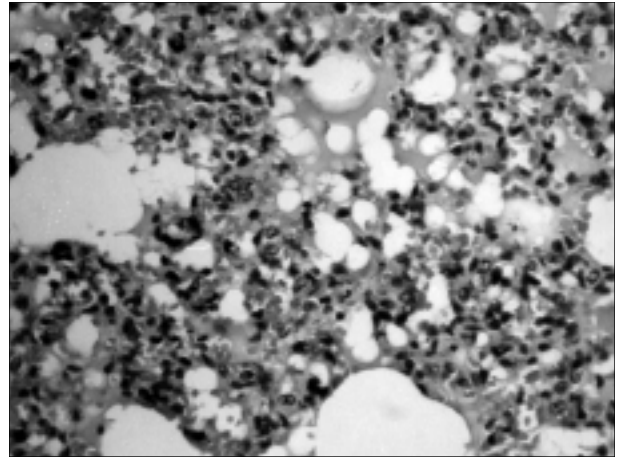
Grup 1'deki (n = 5) ratlara sadece anestezi verildi ve batin açılıp abdominal aort eksplere edildikten sonra hiçbir girişim yapılmadan tekrar kapatıldı. İkinci grupta (n = 5) batin açıldıktan sonra abdominal aort eksplere edildi ve infrarenal aortaya klemp konularak batin kapatıldı. Üç saatlik iskemik süresinin sonunda batin sütürleri alınarak aortadaki klemp kaldırıldı ve batin tekrar kapatılarak 1 saatlik reperfüzyon süresi beklendi. Aynı işlem 3., 4. ve 5. gruplara da uygulandı, ayrıca müdahaleden önce bu gruplara sırasıyla 50 mg/kg askorbik asit (n = 6), 100 mg/kg karnitin (n = 7) ve 50 mg/kg pentoksifilin (n = 6) iv olarak uygulandı. Yapılan işlem tamamlandıktan sonra ratlara yüksek doz anestezi verilerek akciğerleri çıkartıldı ve formalinde fikse edildi. Gözlemler, deneyin ve alınan örneklerin ayrıntılarını bilmeyen tarafsız bir patolog tarafından yapıldı. Alınan doku örneklerinden seri kesitler yapılarak parafin blokler hazırlandı ve bunlar hemotoksilen eosin boyası ile boyandı. Büyütme alanı içerisinde bulunan akciğer dokusundaki polimorf nüveli lökositler (PMNL), konjesyon ve interstisiyel ödem semikantitatif olarak değerlendirildi. Daha önce Tassiopoulos ve arkadaşlarının [3] kullandıkları skorlama sistemi modifiye edilerek akciğerlerde oluşan hasarın miktarı tespit edildi. Buna göre; 0 değişiklik yok; 1+ fokal, göze çarpmayan hafif derecede değişiklikler; 2+ multifokal orta derecedeki değişiklikler; 3+ multifokal ileri derecede ve yoğun değişiklikler olarak puanlama yapıldı. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile diğer gruplar ikişerli olarak kendi aralarında Mann Whitney testi ile karşılaştırıldılar. P değerinin 0.05'in altında olması ($p < 0.05$) anlamlı kabul edildi.

Bulgular

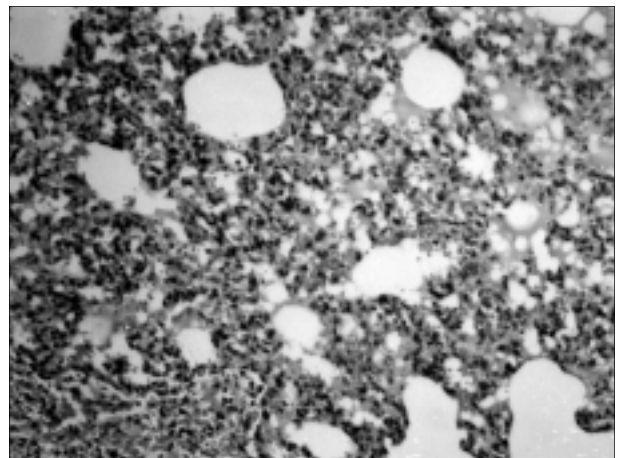
Kontrol grubunda yapılan histopatolojik değerlendirmede normale yakın bir akciğer dokusu görüldü (Resim 1). Kontrol



Resim 1. Normal akciğer dokusu (HE x 150).



Resim 2. Akciğerlerde yoğun ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu (HE x 300).



Resim 3. Akciğerlerde hafif derecede interstisiyel ödem, iltihabi hücre infiltrasyonu ve serbest eritrositler (HE x 150).

grubuna göre diğer dört grupta daha fazla PMNL birikimi, ödem ve konjesyon saptandı (Resim 2). İkinci grup ile kıyaslandığında ise ilaç tedavisi verilen 3. 4. ve 5. gruplarda PMNL sayısının daha az olduğu görüldü. Ayrıca, interstisiyel ödem ve konjesyon bu üç grupta daha azdı (Resim 3). Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede hesaplanan hasar skor puanı en düşük kontrol grubunda görüldü. Kontrol grubunun hasar skor puanı 0.6 olarak bulundu. Bu grubun hasar skor puanı hesaplanırken, ortalaması alınan puan değerleri 0 ile +1 arasında değişmekteydi. Diğer dört grupta ise hasar skor puanı hesaplanırken, ortalaması alınan puan değerleri +1 ile +3 arasındaydı.

Bu değerlere göre hesaplanan 2. grubun hasar skor puanı 2.6 olarak bulundu. Kontrol grubu ile 2. grup karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$).

Üçüncü grubun hasar skor puanı 2.16 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile 3. grup, hasar skor puanları yönünden karşılaştırıldıkları zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0.05$). İkinci ve üçüncü gruptaki ratlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, askorbik asit verilen 3. grubun hasar skor puanı iskemi reperfüzyon uygulanan 2. gruba göre düşük bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Karnitin verilen 4. grubun hasar skor puanı 2.28 olarak bulundu, bu rakam tedavi verilen gruplar arasındaki en yüksek puandı. Hasar skor puanının bu grupta yüksek çıkmasına karşın, İ/R grubu ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$). Pentoksifilin verilen 5. grubun hasar skor puanı ise 1.83 olarak hesaplandı, bu değer kontrol grubu dışındaki en düşük değerd. Bu değer 2., 3., 4. gruplarla karşılaştırıldığı zaman arada anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.05$). İlaç verilen gruplar arasında hasar skor puanı en yüksek 4. grupta bulundu ve bunu sırasıyla 3. ve 5. gruplar takip ettiler.

Tartışma

Alt ekstremitelerde oluşan geçici İ/R hasarı sonucunda diğer hedef organlarda olduğu gibi, akciğerlerde de önemli ölçüde patolojik değişikliklerin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [1-3]. Akciğerlerde oluşan bu patolojik değişikliklere reperfüzyona bağlı olarak lipid peroksidasyonu sonrası gelişen toksik maddelerin neden oldukları ileri sürülmektedir [1,7]. Bu toksik maddelerin ortadan kaldırılmasını da içeren bir çok tedavi yöntemi İ/R'ye bağlı doku hasarını önlemek için kullanılmaktadır [6,8]. Bu çalışmada histolojik doku örnekleri incelenerek, distal aort oklüzyonuna bağlı olarak oluşan geçici İ/R sonrasında meydana gelen akciğerlerdeki hasar ve bu hasarı önlemede askorbik asidin, karnitin ve pentoksifilin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Akut İ/R hasarı sonrasında kompleks bir inflamatuvar döngünün başlaması ile ortaya çıkan inflamatuvar yanıt sonucunda nötrofil aktivasyonu ve sekestrasyonu gelişmektedir [3,9,10]. Akciğerlerde reperfüzyonun yaptığı etkinin ortaya çıkmasında nötrofillerin aktive olmaları önemli rol oynamakta, endotele yapışan nötrofiller, serbest oksijen radikallerinin (SOR) ve proteolitik enzimlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [1,7,11]. Artmış PMNL

aktivitesi, kemoatraksiyonu ve infiltrasyonu PMNL degranülasyonuna neden olmaktadır [11,12]. Degranülasyon sonrasında artan SOR ve proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı olarak artmış pulmoner kapiller permeabiliteye sebep olmaktadır [7,9].

Antioksidan maddelerin, pulmoner mikrovasküler permeabilite artışını ve nötrofil akümüülasyonunu önleyerek, İ/R sonrasında ortaya çıkan uzak doku ve organ hasarını önledikleri bilinmektedir [12,13]. Askorbik asit membran içindeki ve ekstraselüler sıvılardaki lipid peroksidasyonunu önler, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler, böylece hücre içi Ca birikimini ve SOR hasarını baskılayarak reperfüzyon hasarını azaltır [6,13-15]. Çalışmamızda, akciğer hasarı kontrol grubuna göre askorbik asit verilen grupta anlamlı olarak yüksek çıktı ($p < 0.05$). Ancak İ/R uygulanan gruba göre akciğer hasarı düşük bulundu ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Askorbik asidin yararlı etkisini gösteren bu sonuçlar literatürdeki bilgilerle uyumluydu.

L-Karnitin (L-b-hidroroksi-4-N tirimetil aminobutrik asid) miyokard ve kas dokularında yüksek oranda olmak üzere vücutta bulunan ve yağ asitlerinin mitokondrial B-oxidasyonunda yer alan esansiyel bir maddedir [16,17]. Memelilerin L-karnitini sentezleye bildikleri halde, günlük ihtiyacı karşılayabilmek için de eksojen olarak karnitin almaları gerekmektedir [18]. Vücut karnitin deposunun %75'i diyetle karşılanır. Geri kalan %25 karnitin miktarının sağlanması karaciğer ve böbrekte karnitin prekürsörü olan -betaine'den sentezlenerek gerçekleştirilir. Karnitin mitokondrial uzun zincirli yağ asid oksidasyonu ve mitokondrial acil KoA/KoA bileşiklerinin tamponlanmasını sağlar [16,19]. Ayrıca karnitin acil gruplarını ortamdaki temizlenmesine, dallı zincirli aminoasit metabolizmasının düzenlenmesine ve membran stabilizasyonuna katkı sağlar [16,17]. Çalışmamızda karnitin verilen grupta hasar skor puanı, tedavi verilen gruplar arasındaki en yüksek puandı. Ancak, İ/R grubu ile karşılaştırıldığı zaman bu grupta görülen akciğer hasarının anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p < 0.05$). Bu bulgulara göre karnitin İ/R'ye karşı oluşan akciğer hasarını önlemede katkı sağlamaktadır. Ancak bu katkı diğer ilaçlarınkine göre daha azdı.

Bir metilksantin derivativesi olan pentoksifilin, platelet agregasyonunu azaltmakta, yükselmiş fibrinojen seviyelerini, eritrosit akıcılığını ve viskoziteyi azaltmaktadır. Pentoksifilin, fibrinolitik aktivitenin artmasına, kanın antifibrinolitik kapasitesini de azalmasına neden olmaktadır. Pentoksifilin, bu hemoreolojik ve hemostatik etkisi ile iskemi ve reperfüzyon sonucunda ortaya çıkan patolojik değişiklikler üzerinde olumlu yönde etki etmektedir [20]. Ayrıca damar duvarından prostosiklinin sentez ve salınımı ile birlikte platelet c-AMP seviyelerini artırmakta ve böylece artmış olan platelet c-AMP agregatör tromboxan A2 sentezini önlemektedir [21,22]. Çalışmamızda pentoksifilin verilen grubun hasar skor puanı kontrol grubu dışındaki en düşük değerd ve 2., 3., 4. gruplarla karşılaştırıldığı zaman da aralarında anlamlı istatistiksel fark olduğu görüldü ($p < 0.05$). Literatürde pentoksifilin akciğer hasarını azalttığını gösteren değişik çalışmalar bulunmaktadır [22-24]. Bu çalışmada ortaya çıkan İ/R'ye karşı akciğer hasarını korumada pentoksifilin yararlı etkisi olduğu sonucu literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Histopatolojik verilerin değerlendirilmesi sonucunda, distal aortada ortaya çıkan geçici iskemi ve reperfüzyonun akciğer dokusu üzerinde yaptığı hasarı önlemede askorbik asidin, karnitin ve pentoksifilin yararlı etkileri olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu gruplar arasında pentoksifilin etkisinin daha belirgin olduğu gözlemlendi.

Kaynaklar

1. Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: Evidence for a role for oxygen-derived radicals. *Crit Care Med* 1991;19:360-3.
2. İşbir S, Akgün S, Ak K, ve ark. Akut alt ekstremité iskemii/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2000;8:629-31.
3. Tassiopoulos AK, Hakim TS, Finck CM et al. Neutrophil sequestration in the lung following acute aortic occlusion starts during ischaemia and can be attenuated by tumour necrosis factor and nitric oxide blockade. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998;16:36-42.
4. Gianello P, Saliez A, Bufkenz X, et al. EUK 134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic protects rat kidneys from ischemia-reperfusion-induced damage. *Transplantation* 1996;62:1664-6.
5. Hirose J, Yamaga M, Takagi K. Reduced reperfusion injury in muscle. A comparison of the timing of EPC-K1 administration in rats. *Acta Orthop Scand* 1999;70:207-11.
6. Kearns SR, Kelly CJ, Barry M, et al. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:533-6.
7. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil elastase and oxygen radicals: Synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol* 1991;260:1852-6.
8. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung chest. 1999;115:1672-7.
9. Anner H, Kaufman RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surg* 1987;206:162-7.
10. Greame MR. Ischemia/reperfusion inflammatory responses and acute lung injury. *Thorax* 1997;52:841-2.
11. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, et al. Role of beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury following ischemia-reperfusion of rat hind limbs. *Am J Pathol* 1993;143:464-72.
12. Cohen SM, Siddiqi FA, Darakchiev B, Fantini GA, Hariri RJ, Barie PS. Attenuation of acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion injury by butyrolactone anti-inflammatory agent FL1003. *J Trauma* 1997;43:247-52.
13. Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:349-58.
14. Lagerwall K, Madhu B, Daneryd P, Schersten T, Soussi B. Purine nucleotides and phospholipids in ischemic and reperfused rat skeletal muscle: Effect of ascorbate. *Am J Physiol* 1997;272:83-90.
15. Sağdıç K, Ener S, Gür E, ve ark. İskelet kası iskemii reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. *Dam Cer Derg* 1996;2:51-7.
16. Pepine DJ. The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin Ther* 1991;13:2-21.
17. Bhuiyan AK, Jackson S, Turnbull DM, et al. The measurement of carnitine and acyl-carnitines: Application to the investigation of patients with suspected inherited disorders of mitochondrial fatty acid oxidation. *Clin Chim Acta* 1992;207:185-204.
18. Helms RA, Mauer EC, Hay WW Jr, Christensen ML, Storm MC. Effect of intravenous L-carnitine on growth parameters and fat metabolism during parenteral nutrition in neonates. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990;14:448-53.
19. Furuno T, Kanno T, Arita K, et al. Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1037-46.
20. Kishi M, Tanaka H, Seiyama A, et al. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia. *Am J Physiol* 1998;274:435-42.
21. Poggesi L, Scarti L, Boddi M, Masotti G, Sernerri GG. Pentoxifylline treatment in patients with occlusive peripheral arterial disease. Circulatory changes and effects on prostaglandin synthesis. *Angiology* 1985;36:628-37.
22. Coe DA, Freischlag JA, Johnson D, et al. Pentoxifylline prevents endothelial damage due to ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;67:21-5.
23. Sheridan BC, McIntyre RC, Meldrum DR, Fullerton DA. Pentoxifylline treatment attenuates pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury. *J Surg Res* 1997;71:150-4.
24. Shen CY, Hsu K, Wang D, Yan HC. Pentoxifylline attenuates acute lung injury induced by microemboli. *Experientia* 1995;51:956-60.