

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL TIKANMA SARILIĞI MODELİNDE
L-KARNİTİN' İN AKCİĞER HASARINI ÖNLEMEDEKİ
ETKİNLİĞİ**

Dr. Özgür KAYA

**UZMANLIK TEZİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. İbrahim BARUT**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
2749-TU-11 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2012

ÖNSÖZ

Bu tezde, deneysel tıkanma sarılığı modelinde L-Karnitin' in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği araştırılmıştır.

Doğduğum günden bugüne kadar, özveriyle her zaman yanımda olan annem Meral Kaya, babam Alaattin Kaya ve abim Çağdaş Kaya' ya, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında çalışmaya başladığım andan bugüne kadar geçen süre içinde her türlü yardımı benden esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında değerli katkıları olan saygıdeğer hocam Doç. Dr. İbrahim Barut' a, Genel Cerrahi Anabilim Dalındaki çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve tecrübelerini bana aktaran saygıdeğer hocalarım başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Mahmut Bülbül olmak üzere Prof. Dr. Recep Çetin, Prof. Dr. Hasan Erol Eroğlu, Doç. Dr. Ömer Rıdvan Tarhan, Yrd. Doç. Dr. Zafer Sabuncuoğlu' na, bu tezin hazırlanmasında değerli katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Şirin Başpınar' a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Recep Sütçü' ye, Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarından Dr. Firdevs Aylak' a, istatistik çalışmalarım da bilgilerimi benimle paylaşan Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özgür Koşkan ve Halk Sağlığı öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Öztürk' e, asistanlık sürem içinde çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve asistanlık sürem içindeki yoğun çalışma tempomda bana hoşgörü gösteren ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim eşim Zeliha Gözde Kaya ve kızım Yağmur Kaya' ya sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Özgür KAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tıkanma Sarılığı.....	3
2.1.1. Tıkanma Sarılığında Bakteriyel Translokasyon, Endotoksemi ve Akciğer Hasarı	4
2.2. L-Karnitin.....	5
2.2.1. L-Karnitin Yapı ve Biyosentezi	5
2.2.2. L- Karnitinin Farmakokinetiği	7
2.2.3. L-Karnitinin Fizyolojik Etkileri	7
2.3. Tıkanma Sarılığında İnflamatuar Süreçte Yer Alan Sitokinler, Akut Faz Proteinleri ve Antioksidanlar	9
2.3.1. Serbest Radikal Oluşumunu Önleyen Antioksidanlar	10
2.3.2. Sitokinler ve Akut Faz Proteinleri	11
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. Anestezi ve Cerrahi İşlem	13
3.2. Tedavi.....	14
3.3. Örneklemeye	14
3.4. Değerlendirme	15
3.4.1. Biyokimyasal Değerlendirme	15
3.4.2. Patolojik Değerlendirme	15
3.5. İstatistiksel Analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	17
4.1.1. IL-6.....	17
4.1.2. IL-8.....	19

4.1.3. TNF- α	21
4.1.4. C-Reaktif Protein (CRP)	22
4.1.5. Malondialdehit (MDA)	23
4.1.6. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	24
4.1.7. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	25
4.1.8. Katalaz (CAT).....	26
4.1.9. Myeloperoksidaz (MPO).....	27
4.2. Histopatolojik Bulgular	28
6. SONUÇLAR	35
ÖZET.....	36
SUMMARY	37
KAYNAKLAR	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

TS	: Tıkanma sarılığı
ARDS	: Akut Respiratuvar Distres Sendromu
GSH_Px	: Glutasyon peroksidaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehid
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TNF- α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
IFN-γ	: İnterferon gama
NAC	: N-Asetil sistein
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
NK	: Doğal öldürücü hücre
GIS	: Gastrointestinal sistem
AC	: Akciğer
KC	: Karaciğer
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SDÜAF	: Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu
IL-1	: İnterlökin -1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
LPS	: Lipopolisakkarit

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. IL-6, 1. ve 10. gün rank değerleri.....	17
Tablo 2. IL-8, 1. ve 10. gün rank değerleri.....	19
Tablo 3. TNF- α , 1. ve 10. gün rank değerleri.....	21
Tablo 4. CRP, 1. ve 10. gün rank değerleri	22
Tablo 5. MDA, GSH-Px, SOD, CAT, MPO 10. gün rank değerleri.....	28
Tablo 6. 10. günde akciğer dokusundaki hasarın karşılaştırılması.....	29
Tablo 7. Gruplar arası akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karnitin molekülünün kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2. Uzun zincirli yağ asitlerinin L-karnitin ile mitokondrial matrikse taşınması.....	8

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ana safra kanalının disseksiyonu ve bağlanması	13
Resim 2. Postoperatif 10. günde dilate koledok	14
Resim 3. Normal akciğer histolojisi	30
Resim 4. Grade 2 Akciğer histopatolojisi.....	30
Resim 5. Grade 3 Akciğer histopatolojisi.....	31
Resim 6. Grade 4 Akciğer histopatolojisi.....	31

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. IL-6.1; IL-6' nın 1. gün değerlerini, IL-6.2; IL-6'nın 10. gün değerlerini ifade etmektedir.....	18
Grafik 2. IL-8.1; IL-8' in 1. gün değerlerini, IL-8.2; IL-8'in 10. gün değerlerini ifade etmektedir.....	20
Grafik 3. TNF ALFA.1; TNF α ' nın 1. gün değerlerini, TNF ALFA.2; TNF α ' nın 10. gün değerlerini ifade etmektedir.	21
Grafik 4. CRP.1; CRP' nin 1. gün değerlerini, CRP.2; CRP' nin 10. gün değerlerini ifade etmektedir.....	22
Grafik 5. MDA' nın 10. gün değerleri	23
Grafik 6. GSH-Px' ın 10. gün değerleri.....	24
Grafik 7. SOD' ın 10. gün değerleri.....	25
Grafik 8. CAT' ın 10. gün değerleri.....	26
Grafik 9. MPO' ın 10. gün değerleri.....	27

1. GİRİŞ

Tıkanma sarılığı (TS) operatif teknikler ve etkin antibiyotiklerdeki gelişmelere karşın, pek çok sisteme olumsuz yönde etkileri olması, sık görülmesi, yüksek morbidite ve mortalite oranları olması nedeniyle Genel Cerrahi ve Gastroenteroloji' nin en önemli problemlerinden biridir. Kardiyovasküler disfonksiyon, periferik vazokonstriksiyon, gastrointestinal kanama, koagülopati, renal ve hepatik disfonksiyon ve sepsis bu morbidite ve mortaliteye etki eden major komplikasyonlardandır (1).

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılıklı hastalarda oluşan postoperatif komplikasyonlar; portal ve sistemik endotoksemi, bakteriyel translokasyon ve sepsis sendromuna neden olan inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (2).

Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek birçok sitokinlerin üretimini artırır. Böylece kontrol edilemeyen inflamatuvar sürece, multiorgan disfonksiyonuna, respiratuvar distress sendromuna ve ölüme neden olur (3,4,5). Endotokseminin de TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu bilinmektedir. Dolaşımdaki bu sitokinler ROS' un aşırı üretilmesine duyarlıdır.

Tsan-Zon Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tıkanma sarılığında dolaşımdaki proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-6, IL-1'in arttığı gösterilmiştir (6).

Tıkanma sarılıklı hastalarda doku hasarı patogeneziyle lipit peroksidasyonu ilişkili bulunmuştur. Lipit peroksidasyonu hücre membranındaki oksidatif hasarın ve hücre ölümünün önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. Doku hasarı oluşumunda ROS (Serbest O₂ radikalleri) ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik ana nedendir (7). Serbest oksijen radikalleri bu patolojide rol oynar gözükmektedir. Serbest oksijen radikal temizleyicileri tıkanma sarılıklı ratlarda azalır. Böylece oksijen radikallerinin yaptığı organ hasarına duyarlılık artar. Glutasyon, oksijen radikallerine karşı hücrel savunmada büyük rol oynar. Glutasyonun azalmasında direkt olarak glutasyon peroksidaz enzimi rol alır. MDA lipit peroksidasyonunun son

ürünüdür. Oksidatif stres için iyi bir belirteçdir. Lipit peroksidasyonu ile hasarlanan dokuda MDA, MPO düzeyleri artar (6,8).

Ana safra kanalı bağlanmış deney hayvanlarında serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştıran glutatyon, katalaz ve superoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar (9).

Rahman ve MacNee'ye göre aktive olmuş ve küçük hava yollarında birikmiş olan inflamatuvar hücreler reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını artırırken bu radikallerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan faktörleride azaltır. Böylece akciğer hasarını ve fibrozisini gerçekleştirir (10). Erişkin tipi solunum zorluğu sendromunda (ARDS) alveolar epitel hasarı, mikrosirkülasyonu hasar ve alveolar interstisyel ödem önemli özelliklerdir. Erken dönemde nötrofil geç dönemde mononükleer hücre infiltrasyonu sonucunda bu hücrelerden açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ARDS' den sorumlu tutulmaktadır (11).

L- Karnitin, (3-hidroksi-4-N-trimetilammonyobutanoat), memeli metabolizmasında enerji üretiminde, organik asitlerin detoksifikasyonunda ve mitokondri membranından uzun zincirli yağ asitlerinin transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır (12).

Enerji metabolizmasındaki görevleri, detoksifiye edici, doku hasarını engelleyici ve antioksidan özelliklerinden dolayı, tıkanma ikterinde L-Karnitin tedavisi ile akciğer hasarının önlenip ölenemeyeceğinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıkanma Sarılığı

İkter (sarılık) teriminin anlamı vücut dokularının sarıya boyanmasıdır. Böylece deri ve derin dokular sararır. Normalde serbest ve bileşik şekilleri içeren plazma bilirubin konsantrasyonu 0.5 mg/100 ml kadardır. Deri, bilirubin konsantrasyonu normalin üç katına yani, 2 mg/100 ml'ye çıktığı zaman sararmaya başlar. Sarılığın en çok rastlanan iki tipi hemolitik nedenli olan ve obstrüktif nedenli olandır. Tıkanma ikteri, safra kanallarının tıkanması veya karaciğer hücrelerinin haraplanmasıyla normal miktardaki bilirubinin bile gastrointestinal sisteme çıkarılamamasıdır (15).

Karaciğerde safra önce hepatositler tarafından üretilir ve hepatik hücrelerin arasındaki küçük safra kanaliküllerine salgılanır, daha sonra, interlobüler septumlara doğru akar. Burada kanaliküller terminal safra kanallarına dökülür ve daha sonra giderek daha büyük kanallara dökülerek sonunda hepatik kanal ve koledok kanalına ulaşır. Buradan da, ya doğrudan duodenuma, ya da sistik kanal yoluyla safra kesesine yönelir (16).

Karaciğerin safra sekretuar basıncı 120-250 mm H₂O'dur. Safra kesesi kontraksiyonu olduğunda bu basınç 300 mm H₂O' e kadar yükselir. Bu basınç 300 mm H₂O üzerine çıktığında karaciğerden safra salgısı inhibe olur. Basınç yükselince başta kolesterol olmak üzere safra tuzları ve fosfolipidlerin karaciğerden salınımı azalır. Normal bir safra akımının olabilmesi için ekstrahepatik safra yolu basıncının 10-15 cm H₂O olması gerekir (17).

Safra asitleri barsak içindeki endotoksinleri ve bakterileri deterjan etki ile bağlamakta, emilimlerini ve bakterilerin aşırı üremesini engellemektedir (14).

Ekstrahepatik safra yollarının bir nedenle tıkanması sonucu ortaya çıkan, hiperbilirubinemi ve barsakta safra asitlerinin yokluğuyla karakterize olan tıkanma sarılığında safra yolları cerrahisi yüksek mortalite ve morbidite riski taşır (15-18).

2.1.1. Tıkanma Sarılığında Bakteriyel Translokasyon, Endotoksemi ve Akciğer Hasarı

Tıkanma sarılığı olan hastalarda morbidite ve mortaliteden sorumlu olan endotoksemi başlıca iki ana faktör sonucu oluşmaktadır. Bunlardan birincisi; barsak bariyer fonksiyonunda bozukluk, bunun sonucu bakteri ve toksinlerinin portal dolaşıma geçmeleri, ikincisi de mononükleer fagositik fonksiyonda bozukluktur (19).

Retiküloendotelial sistem, doku makrofajları olarak tanımlanır. Başlıca KC, dalak, akciğer ve kemik iliğinde bulunurlar. Bakteri, endotoksin, immun kompleks ve hücre debrisleri gibi partiküler materyallerin temizlenmesinden sorumludurlar (20). KC' deki Kupffer hücreleri retiküloendotelial sistem aktivitesinin %80-90' ından sorumludur. RES fonksiyonu obstüktif sarılık, travma, cerrahi ve sepsis gibi durumlarda deprese olur. RES fonksiyonunun bozulması barsaktan endotoksin absorpsiyonunun artması ile sonuçlanır (20).

Safra tuzlarının luminal akımı antibakteriyel etki ve endotoksinler üzerinde direkt deterjan etkisine sahiptir (21). Deneysel ve klinik çalışmalarda sarılıklı hayvan ve insanlarda oral safra tuzları verilmesinin endotoksin absorpsiyonunu azaltarak postop renal yetmezlikten koruduğu gösterilmiştir (22,23). İntraluminal safra akımının olmaması barsakta değişikliklere ve mukozal hasara yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda enterositlerin bakterilerce invazyonuna karşı safranin inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir.

Sekretuar Ig A eksternal vücut sıvılarındaki predominant Ig'dir. Ig A selektif olarak safra içine verilir (24). Tıkanma sarılığı olan hastalarda endotoksemisinin nedenlerinden biri de bu fonksiyonun bozulmasıdır (19).

Safra yolu tıkanıklığı olan hastalarda kan-safra bariyeri bozulmuştur. Bu da safrada gram (-) bakterisi olan hastalarda endotoksemiye neden olabilmektedir (4).

Tıkanma sarılığı, ratlarda pulmoner intravasküler fagositozu ve endotoksin sensitivitesini artırır. Chang ve Ohara' nın yaptığı bir çalışmada tıkanma sarılığı olan ratların akciğer parankiminde pulmoner kapillerlerde latex partikülü içeren büyük mononükleer makrofaj benzeri hücreler saptanmıştır. Tıkanma sarılığı olan bu ratlarda pulmoner intravasküler fagositozun arttığı, akciğer ödemeine neden olduğu,

bunun da sarılıklı hastalarda sepsis ve ARDS' ye yatkınlığa sebep olduğu bildirilmektedir (26).

Yapılan çalışmalarda tıkanma sarılıklı hastalarda bulunan nötrofillerde oksidatif cevabın arttığı ve buna bağlı olarak dolaşımdaki IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α gibi uyarıcı sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (27,28).

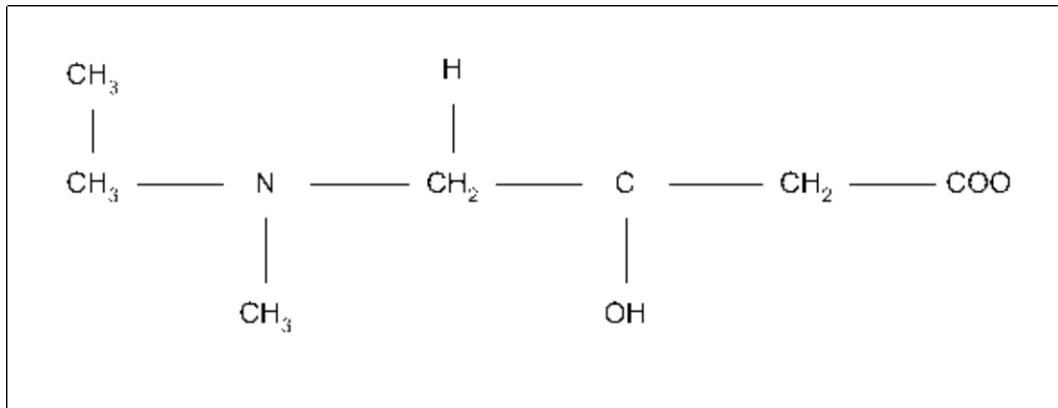
Özdülger ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada; çekum ligasyonu ve ponksiyonu sonrası sepsis modelinde meydana gelen akciğer apoptotik hasarında, bir antioksidan olan NAC (N-Asetil Sistein)' in koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla akciğer dokusunda MPO ve MDA seviyeleri, nitrit /nitrat seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak antioksidan olan NAC' in endotoksemi ve sepsisli ratlarda akciğer dokusunda lipit peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği, akciğer histopatolojisini koruduğu tespit edilmiştir (29). Bu çalışma ve diğerleri rehber alınarak deneysel TS modelinde; L-karnitin enerji metabolizmasındaki görevleri, detoksifiye edici, doku hasarını engelleyici ve antioksidan özelliklerinden dolayı serbest oksijen radikallerine ve endotoksinlere bağlı oluşan akciğer hasarı üzerine etkinliğinin araştırılması için akciğer dokusunda MPO, MDA, Katalaz, SOD, GSH-Px bakılması planlandı.

2.2. L-Karnitin

2.2.1. L-Karnitin Yapı ve Biyosentezi

L-karnitin 1905 yılında iki Rus bilim adamı (Gulewitsch ve Krimberg) tarafından hayvan kas dokusundan izole edilen bir bileşik olarak keşfedilmiştir. Ve bu keşiften sonra, latince et anlamına gelen "carnis" ismi verilmiştir (30).

Karnitinin kimyasal yapısı 1927' de belirlenmiştir. Buna göre karnitin yapı olarak amino asitlere benzeyen, ancak hiçbir proteinin yapısına girmediği için gerçek bir aminoasit olarak kabul edilemeyen, kuartern bir amindir. Açık biyokimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilamino-butirat şeklindedir (31).



Şekil 1. Karnitin molekülünün kimyasal yapısı (31).

Karnitin, doğada sadece L formunda bulunur. D formu ise kimyasal olarak üretilir. Çalışmalardan elde edilen verilere göre; D formu, L-karnitinin yağ asitlerinin taşınmasından (sitoplazmadan mitokondriye) sorumlu karnitin translokaz enzimini inaktif ettiği ve böylece vücutta enerji kaybına yol açtığı belirlenmiştir (30).

1955' de karnitinin karaciğerde yağ asitlerinin oksidasyonunu uyardığı ve asetil koenzim A tarafından geri dönüşümlü bir reaksiyonla asetillendiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda ise, 1959 yılında, karnitinin uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunda gerekli bir madde olduğu gösterilmiştir.

Karnitin, doğada en yüksek oranda kırmızı etlerde ve kümes hayvanlarının etlerinde bulunur. Diyetle alınan karnitin, aktif transport ile duodenum ve jejunumdan emilir. Böbreklerde, glomerüler filtrata geçen bölümünün %90'ından fazlası tübüler reabsorpsiyona uğrar. Çok az bir bölümü feçes ile atılır (32).

Karnitinin %75' i diyetten vücuda alınmaktadır. Ayrıca %25' i vücutta iskelet kası, kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda esansiyel amino asitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenebilmektedir. Karnitin sentezi yapmayan organlar, ihtiyaçlarını kana verilen karnitinden karşılarlar (33). 70 kg' lık yetişkin bir insandaki toplam karnitin deposu 100 mmol kadar olup, bunun yaklaşık %98' i kaslarda, geri kalan bölümü ise karaciğer ve böbreklerde bulunur (34).

Yukarıda da söz edildiği gibi, karnitinin karaciğer ve böbrekteki sentezi için başlıca lizin ve metionin, kofaktör olarak da askorbik asit, nikotinik asit, vitamin B3, B6 ve B12, demir, magnezyum, metionin, betain ve α -ketoglutarat gerekmektedir. Sentez için öncelikle bir transferaz reaksiyonu ile lizine, metioninden metil grupları

transfer edilerek 6-N-trimetil lizin'e dönüştürülür. Daha sonra bu molekül üzerinde hidroksilaz, dehidrojenaz ve aldolaz enzimleri etki göstererek sonuçta karnitin oluşturulur. Sentez, hücrenin hem mitokondriyal, hem de sitozolik fraksiyonunda yürütülmektedir (35).

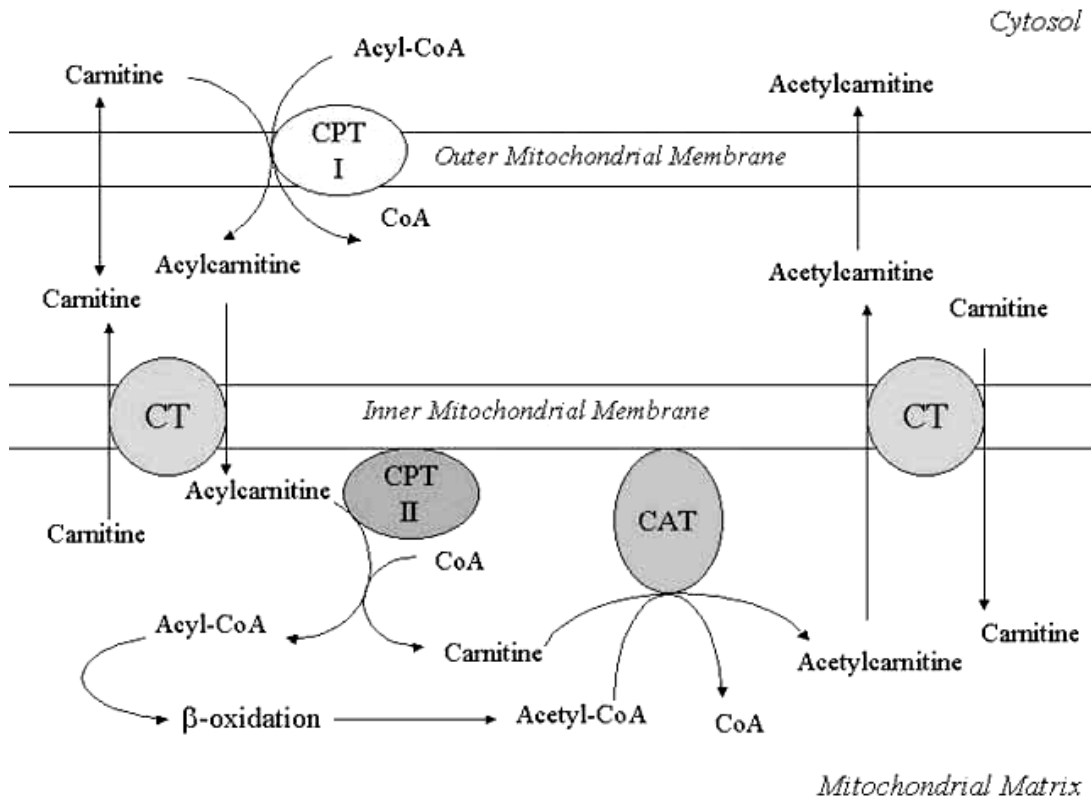
2.2.2. L- Karnitinin Farmakokinetiği

İntravenöz yoldan uygulanan L-karnitin esas olarak renal yoldan atılır. Metabolik bileşen, reversibl olarak L-karnitinin esterlerine dönüşümü dışında tamamen ihmal edilebilir düzeydedir. Buna karşılık oral uygulamayı takiben, L-karnitin bağırsak bakteri florası tarafından trimetilamin ve butirobetain açığa çıkacak şekilde yıkıma uğratılır. Sistemik dolaşıma hiçbir değişime uğramadan geçtiğinden ve ilaç miktarı yaklaşık %10-20 civarında olduğundan, oral yoldan uygulanan bir L-karnitin dozunun yaklaşık %80-90' ının eliminasyonundan bağırsak metabolizmasının sorumlu olduğu düşünülebilir. Karnitinin fizyolojik dağılım hacmi, kaslarda karnitinin depolanmasından dolayı yüksektir (36).

L- karnitinin oral dozu 2 g' dan fazla alınsa dahi bir yarar sağlamamaktadır çünkü karnitinin mukozal absorpsiyonunun 2 g dozda doygunluğa ulaştığı görülmüştür (37).

2.2.3. L-Karnitinin Fizyolojik Etkileri

1. Uzun zincirli yağ asitlerinin, β -oksidasyon yerleri olan, mitokondrial matrikse taşınmalarını sağlar. Mitokondrinin iç membranı uzun zincirli yağ asitlerine karşı geçirgen olmayan bir bariyerdir. Bu bariyeri ancak karnitinle birleşerek geçebilirler. Karnitin bu işlevi karnitin açıl transferaz enzimi aracılığı ile yapar. Mitokondri iç membranının dış yüzeyinde bulunan bu enzim, yağ asidinin KoA ile esterleşmesi yoluyla oluşan, açıl KoA' daki açıl grubunun karnitine aktarılmasını sağlar ve açıl karnitin oluşur. Oluşan açıl karnitin, mitokondri iç membranının dış yüzeyinde bulunan karnitin açıl karnitin translokaz enzimi ile mitokondri iç membranından matrikse iletilir. Bu sırada karnitin ise yeniden mitokondri dışına taşınır (38,30).



Şekil 2. Uzun zincirli yağ asitlerinin L-karnitin ile mitokondrial matrikse taşınması Kısaltmalar: CPT I, carnitine-palmitoyl transferase I; CT, carnitine:acylcarnitine translocase; CPT II, carnitine-palmitoyl transferase II; CAT, carnitine-acetyl transferase; CoA, co enzyme A. (30)

2. Normal şartlarda mitokondri içerisindeki total KoA miktarı sabit kalmalıdır. Serbest KoA, birçok enzimatik reaksiyonda gerekli bir maddedir. Karnitin, KoA-karnitin açıl transferaz enziminin etkisiyle mitokondrial açıl KoA miktarını azaltarak serbest KoA miktarının artmasına neden olur. Serbest KoA miktarının artması, α -ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesini arttırarak Krebs siklüsünü hızlandırır (38,39).

3. Karnitin, açıl gruplarını temizleme sistemi olarak ta görev yapmaktadır; bu yönüyle detoksifiye edici bir ajandır. Açıl grupları mitokondri içinde biriktikleri takdirde, düşük konsantrasyonlarda adenilat translokaz enzimini inhibe ederek mitokondri dışına ATP taşınmasını durdururlar. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre membranlarına deterjan etkiyle hasar verirler. Karnitin, uzun zincirli açıl KoA miktarını azaltarak bu istenmeyen etkilerini engeller (38).

4. Karnitin, organizmaya güçlü toksik etkileri olan, endojen veya eksojen organik asitlerin konjugasyonunda da görev yapmaktadır. Örneğin, artan glutamin ve

amonyağın beyindeki düzeylerini azaltarak amonyak toksisitesinden beyni koruma görevi de üstlenir (35).

5. Dallı zincirli amino asitlerin (valin, lösin, izolösin) metabolizmasında da karnitinin yardımcı rolü vardır (40).

6. İskemik dokularda karnitin rezervi hızla tükenir ve uzun zincirli yağ asitleri okside edilemez, trigliserid sentezi artar, bunun sonucunda da uzun zincirli açıl KoA ve uzun zincirli açıl karnitin esterleri birikir. Çeşitli deneysel iskemi modellerinde, karnitin ile mitokondrilerin metabolik hızı ve oksijen kullanımının arttığı gösterilmiştir (31,35). Doku karnitin seviyesinin normale yükseltilmesiyle uzun zincirli açıl KoA' dan açıl grupları ayrılarak intramitokondrial açıl KoA miktarı normale düşürülür ve yüksek açıl KoA seviyelerinin getirdiği olumsuz etkiler geri çevrilir. Ayrıca aerobik piruvat metabolizması uyarılarak piruvatın laktik aside dönüşmesi baskılanır; bu şekilde hücre içi laktik asit birikimi de önlenir (31,35).

7. Karnitin, membran fosfolipid turnover' ında görev alır. Serbest radikal merkezli lipid peroksidasyonu, hücre membranı ve hücre hasarına neden olur; çünkü hücre membranı özellikle doymamış yağ asidi olan çok fazla lipid içerir (35).

2.3. Tıkanma Sarılığında İnflamatuar Süreçte Yer Alan Sitokinler, Akut Faz Proteinleri ve Antioksidanlar

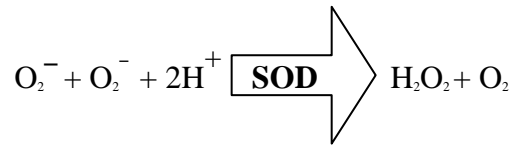
Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek birçok sitokinlerin üretimini artırır. Tıkanma sarılıklı hastalarda bulunan nötrofillerde oksidatif cevabın arttığı ve buna bağlı olarak dolaşımdaki IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α gibi uyarıcı sitokinlerin arttığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir.

Kompleman fragmanları, radikal özellikli bileşikler ve sitokinler gibi uyarıcı ajanlarla aktive olan nötrofillerden; MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimler hücre dışına salınır. Bu enzimlerin olumlu etkilerinin yanında doku hasarını arttırıcı ve serbest radikal oluşturucu etkileri de bulunmaktadır.

Ana safra kanalı bağlanmış deney hayvanlarında serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştıran glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin aktivitesi azalır, böylece serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı doku hasarına duyarlılık artar.

2.3.1. Serbest Radikal Oluşumunu Önleyen Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz, süperoksit serbest radikalini, iki hidrojen iyonu ile reaksiyona sokarak hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür.

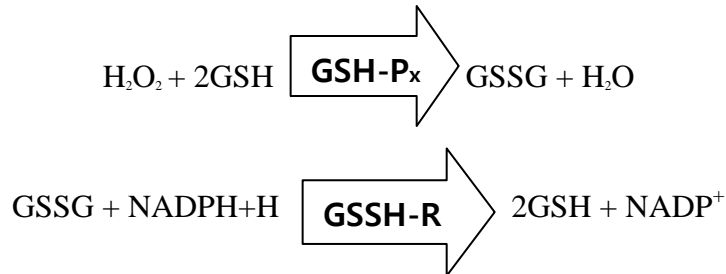


Katalaz, hücre içinde, peroksisomlar içinde yer alan bir antioksidan enzimdir.

Hidrojen peroksidi, su ve oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler.



Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. İntrasellüler lipidleri ve membran lipidlerini peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Tepkime sonucunda okside glutatyon (GSSG) oluşmaktadır. Oluşan okside glutatyon, glutatyon reduktazın (GSSG-R) etkisi ile tekrar glutatyona dönüşür.



2.3.2. Sitokinler ve Akut Faz Proteinleri

Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), sitokin ailesi içerisinde yer alan polipeptid moleküllerdir. İnflamasyon sürecinde mononükleer fagositlerden ve T lenfositlerden sentez edilmektedir. Makrofajlardan sentezlenmesinde en kuvvetli uyaran lipopolisakkaritlerdir. T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler, interferon gama (IFN- γ) salgılayarak TNF - α salınımını artırırlar. TNF - α , inflamasyon bölgesine fagositer hücreleri çeker ve IL-1 salınımını artırır. Endotel hücrelerinden adezyon molekülü sentezini artırır ve kemokin salınımını düzenler. Yarılanma ömrü 15-20 dk.'dır. Koagulan mekanizmaları aktive edici etkisi mevcuttur. Eikozanoidlerin ve PAF' ın salınımını artırır.

IL-6, mononükleer fagositer hücreler, vasküler endotelial hücreler, fibroblastlar ve daha birçok hücre tarafından sentezlenir. IL-1 ve TNF- α ' nın etkisi ile salgılanır ve bu sitokinlerle sinerjistik etkilere sahiptir. IL-6, inflamasyon sürecinde PMNL aktivasyonunu artırır ve PMNL aktivasyonuna sekonder uzak organ hasarını artırır.

IL-8, güçlü bir kemokin ajandır. Başlıca nötrofilleri aktive eder. IL-1 ve TNF- α ' ya cevap olarak aktive olmuş makrofajlardan, endotelden ve fibroblastlardan salınır.

IL-6 ve IL-8 uzak organ hasarında etkili predüktif mediatörlerdir. Dolaşımdaki değerleri, doku hasarı derecesi ile orantılıdır.

C-Reaktif Protein (CRP), akut faz proteinlerinin öncüsüdür. Pnömonöklarin "capsüle" antijenine bağlandığı için CRP adını almıştır. CRP hepatositlerde üretilen ve pek çok stimulustan sorumlu olan akut faz proteindir. Karaciğer fonksiyonu normal olan kişilerde serum düzeyi inflamatuvar aktivasyonu gösteren iyi bir parametredir ve serumdaki konsantrasyonu, IL-6 ve TNF- α seviyeleri ile ilişkilidir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma SDÜ Hayvan Denepleri Laboratuvarı, SDÜ Patoloji A.D. Laboratuvarı ve SDÜ Biyokimya A.D. Laboratuvarı' nda Mayıs 2011 - Ekim 2011 tarihleri arasında yapıldı.

Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu (SDÜAF) tarafından desteklenen (Proje no: **2749-TU-11**) bu çalışmada ağırlıkları ortalama 250-300 g. olan Wistar-Albino tipi ratlar kullanıldı. Hayvanların deney süresince istedikleri kadar standart fare yemi ve çeşme suyu ile beslenmelerine izin verildi. Kafeslerde yedi ve sekiz adet olmak üzere hayvanların laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları beklendikten sonra, rastlantısal olarak gruplara ayrıldılar.

Çalışmamızın ikinci gününde tıkanma sarılığı grubundan 7, tıkanma sarılığı +L-karnitin grubundan 8 ratta erken ölüm meydana gelmesi nedeniyle 15 rat daha çalışmaya eklendi. Ratlar ölen grup elemanları kadar gruplara yerleştirildi ve 2 günlük süre aynı ortam şartları sağlanarak tamamlandı. Bu ratların laparotomi ve örnek alma işlemleri diğer ratlardan 2 gün sonra yapıldı.

Çalışmamızın 4. ve 5. gününde, 3 tane tıkanma sarılığı grubundan 7 tane tıkanma sarılığı + L-karnitin grubundan ratlarımız öldü. Kontrol grubunda rat kaybı olmadı.

Kontrol Grubu (Grup I): (n=8) Laparotomi yapıp koledok mobilize edildi.

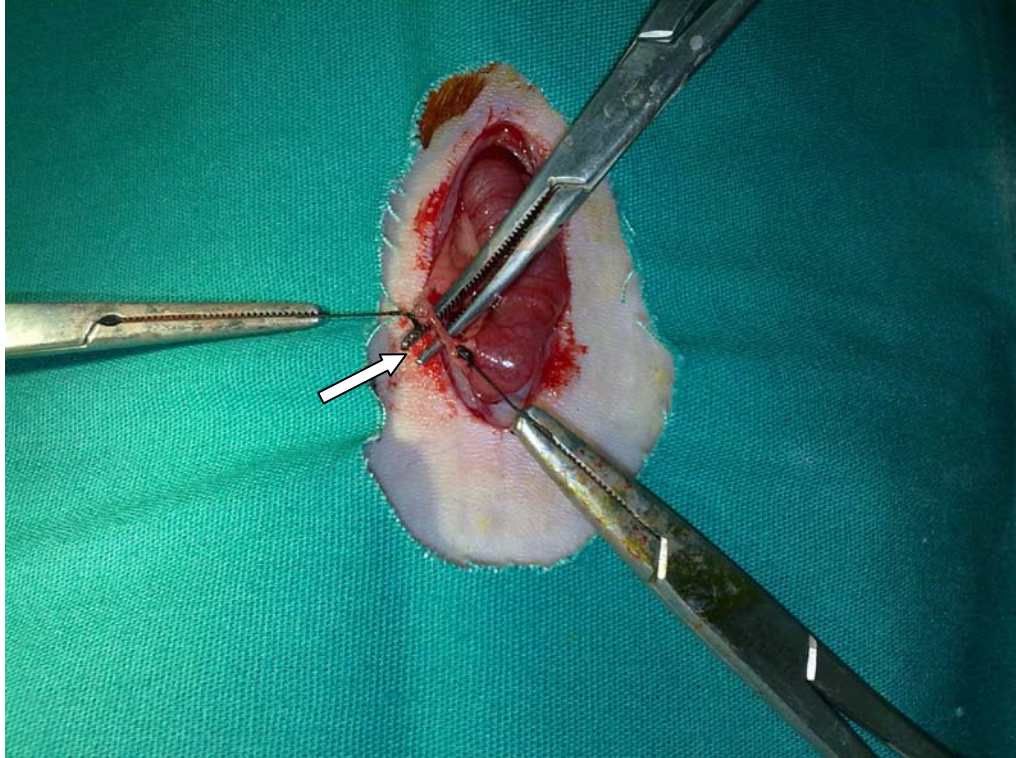
Tıkanma sarılığı grubu (Grup II): (n=15) Laparotomide ortak safra kanalı ligate edilerek tıkanma sarılığı oluşturuldu.

Tıkanma sarılığı + L-Karnitin grubu (Grup III): (n=15) Laparotomide ortak safra kanalı ligate edilerek tıkanma sarılığı oluşturuldu ve tedavi amacıyla 10 gün boyunca, günde 1 kez, 50 mg/kg dozunda L-karnitin kuyruk veninden paranteral yoldan verildi.

3.1. Anestezi ve Cerrahi İşlem

Tüm cerrahi işlemlerde genel anestezi oluşturmak amacı ile 100 mg/kg ketamin HCl (Alfamine 10 cc) ve 25 mg/kg konsantrasyonunda Xylazine HCl (Alfazyne flk 30 cc) ratların sağ arka bacaklarından intramuskuler olarak uygulandı.

Anesteziyi takiben tüm hayvanların karın bölgesi tıraş edildi. %10 povidon iodine ile temizlendikten sonra ratlar supin pozisyonuna getirildi. Yalnızca insizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtüldü. Ksifoid' in hemen altından başlanarak yaklaşık 3 cm' lik orta hat insizyon ile cilt ve cilt altı dokular geçilerek batına ulaşıldı. Kontrol grubunda ana hepatik safra kanalı bulunup yalnızca mobilize edildi. Safra kanalı ligasyonu uygulanan ratlarda porta hepatis bulunarak koledok kanalı izole olarak dissekte edildi. Sonra pankreasın hemen üzerinden 4/0 ipeklerle iki kez bağlandı ve rekanalizasyonu engellemek amacı ile iki düğümün arasından kesildi. Sıvı resüsitasyonu amacı ile batına 1 ml serum fizyolojik bırakıldıktan sonra karın ön duvarı 3/0 ipek, cilt 3/0 ipek ile kapatıldı.



Resim 1. Ana safra kanalının disseksiyonu ve bağlanması

3.2. Tedavi

Bütün grupların örnekleme işlemine kadar istedikleri kadar standart fare yemi ve çeşme suyu almalarına izin verildi. Kontrol grubuna ve tıkanma sarılığı grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Diğer tıkanma sarılığı oluşturulan gruba, operasyondan sonra 10 gün süre ile günde bir kez, sabahlar, 50 mg/kg dozunda L-karnitin kuyruk veninden parantral yoldan verildi.



Resim 2. Postoperatif 10. günde dilate koledok

3.3. Örnekleme

Preoperatif 1. ve 10'uncu günler sonunda tüm gruplarda aynı olmak üzere, anestezi amacı ile 100 mg/kg ketamin HCl (Alfamine 10 cc) ve 25 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne flk 30 cc) ratların sağ arka bacaklarından intramusküler olarak uygulandı. Perioperatif 1. gün tüm gruplardan biyokimyasal analiz için 1 cc kan alınıp, hemodinamiyi bozmamak için 1 cc.'de serum fizyolojik verilir replasman yapıldı. Postoperatif 10. gün anesteziyi takiben tüm hayvanların karın bölgesi %10 povidon iodine ile temizlendikten sonra supin pozisyonuna getirildi. İnsizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtüldü. Laparotomi sonrası safra kanalını ligate ettiğimiz 2 grupta da dilate safra kanalları görüldü. (Resim 2)

Sternotomi yapıp biyokimyasal analiz ve patolojik değerlendirme için akciğer dokusu alındı. Patoloji için alınan akciğer dokusu %10 formol ile fikse edildi. Biyokimyasal inceleme için alınan akciğer dokusu fosfat tamponu içerisine kondu.

Biyokimyasal analiz için ratların aortuna enjektörle girilip yeterli kan alındı. Bütün bu örnekleme işlemi her bir rat için ortalama 5 dakikada tamamlandı.

3.4. Değerlendirme

3.4.1. Biyokimyasal Değerlendirme

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. laboratuvarında preoperatif ve postoperatif 10. günlerde alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere konularak 5000 devir/dk santrifüj edildi. Plazmaları ayrılarak 4 parçaya bölündü ve çalışılncaya kadar -80 °C' de saklandı.

Kan alma işlemi sonrası sakrifiye edilen ratların akciğer dokuları pH 7.4 olan fosfat tamponu ile dolu cam tüplere konuldu.

-80 °C' de saklanan akciğer dokuları işlemden 1 saat önce çıkartılıp homojezine edildi. Akciğer dokusunda, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), PMNL stimülasyonunun indeksi olan myeloperoksidaz (MPO), anahtar antioksidan glutasyonu okside eden glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve yine serbest oksijen radikallerini yok eden katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim seviyesi ölçüldü.

-80 °C' de saklanan preoperatif ve postoperatif 10. günlerde alınan kanların plazma örneklerinden, inflamasyonun göstergesi olarak TNF- α , IL-6, IL-8 ve CRP değerleri çalışıldı.

3.4.2. Patolojik Değerlendirme

Formaldehid solüsyonunda fikse edilen akciğere ait doku örnekleri 5 mm'lik parçalara bölünerek histopatolojik inceleme için, standart laboratuar takiplerinden sonra parafine gömülerek 5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı ve hemotoksilen-eozin ile boyandı. Dokuların histopatolojik incelemesi, örneklerin

hangi gruba ait olduğunu bilmeyen tek bir patolog tarafından yapıldı. Gerek kontrol gerekse tıkanma sarılığına ait preparatlar ışık mikroskopi ile incelendi. Akciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark.'nın yayınında belirtilmiş olduğu şekilde doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanıldı. Bu ölçekte:

Grade 1: Normal akciğer histolojisi,

Grade 2: Hafif derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu,

Grade 3:Orta derecede nötrofil lökosit infiltrasyonu, perivasküler ödem formasyonu akciğer yapısında kısmi destrüksiyon,

Grade 4:Yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu, pulmoner yapıda tam destrüksiyon tanımlar (29).

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada üzerinde durulan IL-8, IL-6, CRP, TNF- α , MDA, MPO, GSH-Px biyokimyasal değerlerinin dağılımlarının Anderson-Darling testi ile normalden uzak ve gruplara göre varyansların Levene's testi ile homojen olmadığı saptanmıştır. Yani parametrik testlerin önşartları yerine gelmemektedir. Bu nedenle parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Bağımsız grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Banferroni-Dunn testi kullanılmıştır. 1. ve 10. günlerin karşılaştırılmasında bağımlı iki grup karşılaştırılmasında kullanılan Wilcoxon testi kullanılmıştır.

Çalışmada 10. gündeki grupların akciğer histopatolojik değerlendirme karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

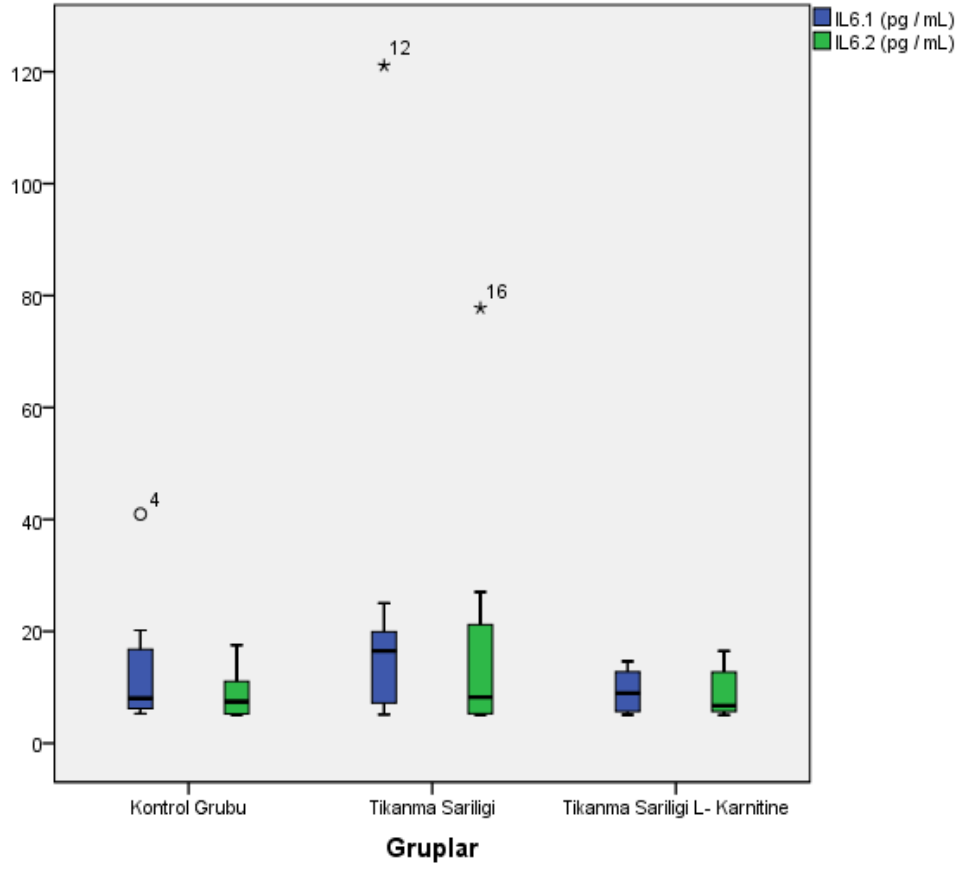
4.1.1. IL-6

IL-6 özelliği bakımından 1. gün ve 10. gün elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında, istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 1. IL-6, 1. ve 10. gün rank değerleri

	Gruplar	N	Mean Rank	P	Banferroni-Dunn Testi
1. gün (pg / mL)	Kontrol Grubu	8	20,19	,760	A
	Tıkanma Sarılığı	15	20,77		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	15	17,87		A
	Total	38			
10. gün pg / mL	Kontrol Grubu	8	13,81	,867	A
	Tıkanma Sarılığı	12	15,46		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	8	13,75		A
	Total	28			

Kontrol, TS, TS+L-karnitin gruplarında ayrı ayrı IL-6 özelliğinin 1. gün ve 10. gün rank ortalamaları arasında, istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.



Grafik 1. IL-6.1; IL-6' nin 1. gün değerlerini, IL-6.2; IL-6' nin 10. gün değerlerini ifade etmektedir

4.1.2. IL-8

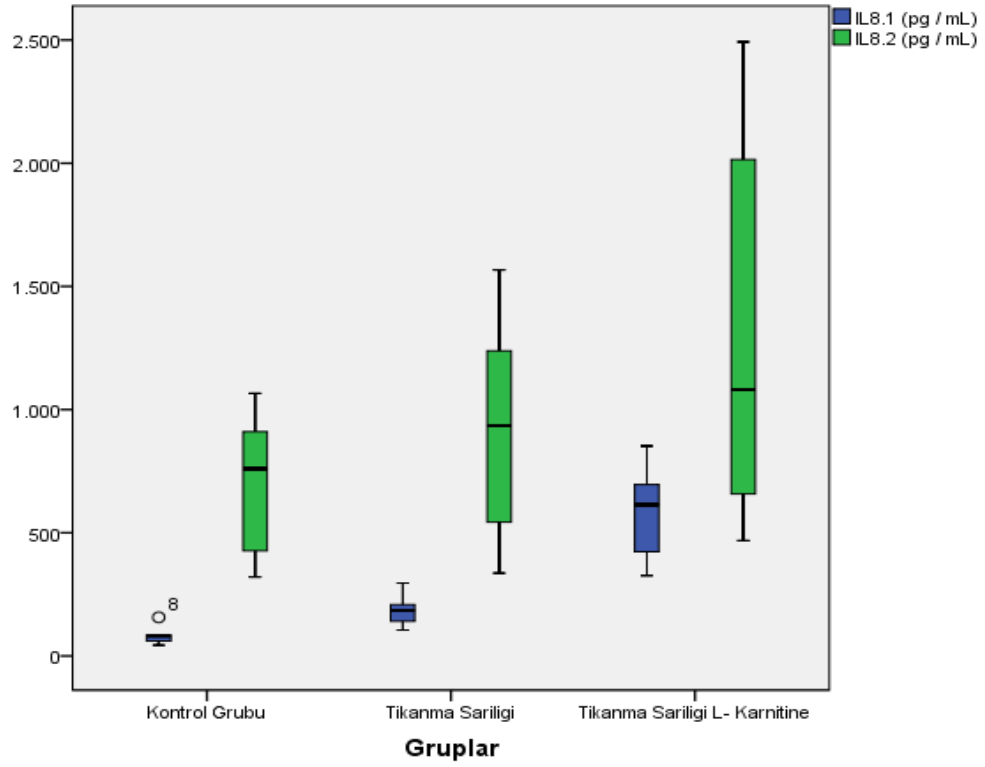
IL-8 özelliği bakımından 1. gün elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlıdır. ($P < 0,01$). 10. gün elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 2. IL-8, 1. ve 10. gün rank değerleri

	Gruplar	N	Mean Rank	P	Banferroni-Dunn Testi
1. gün (pg / mL)	Kontrol Grubu	8	5,50		C
	Tıkanma Sarılığı	15	16,53		B
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	15	29,9	.000	A
	Total	38			
10. gün pg / mL	Kontrol Grubu	8	10,50		A
	Tıkanma Sarılığı	12	14,83	,186	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	8	18,00		A
	Total	28			

* Aynı gündeki gruplar arası rank değerlerinin karşılaştırılmasında Banferroni-Dunn testi kullanılmış ve rank değerlerindeki önemli- önemsiz farklılık harflerle gösterilmiştir.

Kontrol grubunda IL-8'in 1. ve 10. günlerinin rank ortalamaları arasındaki farklar yapılan Wilcoxon testi sonucunda istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu durum TS grubundada istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,01$). Fakat TS + L-karnitin grubunda 1. ve 10. gün rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlı değildir.



Grafik 2. IL-8.1; IL-8' in 1. gün değerlerini, IL-8.2; IL-8'in 10. gün değerlerini ifade etmektedir.

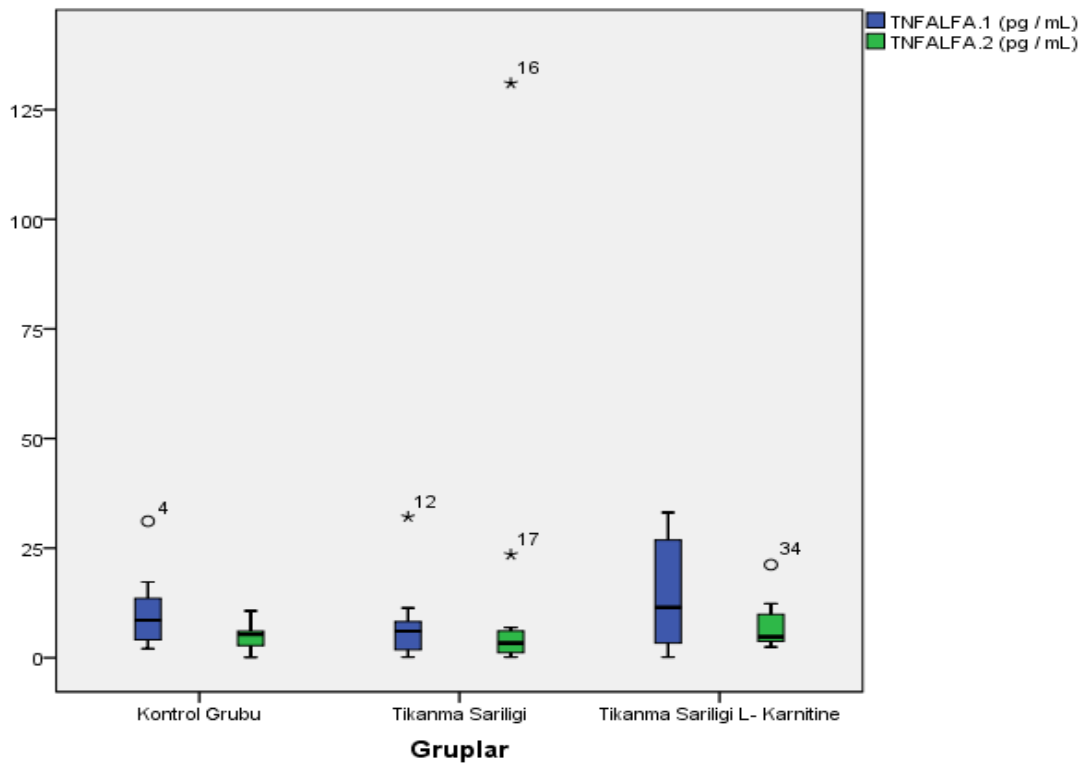
4.1.3. TNF- α

TNF- α özelliği bakımından 1. gün ve 10. gün elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlı değildir.

Tablo 3. TNF- α , 1. ve 10. gün rank değerleri

	Gruplar	N	Mean Rank	P	Banferoni-Dunn Testi
1. gün (pg / mL)	Kontrol Grubu	8	20,69	,548	A
	Tıkanma Sarılığı	15	17,07		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	15	21,30		A
	Total	38			
10. gün pg / mL	Kontrol Grubu	8	14,81	,455	A
	Tıkanma Sarılığı	12	12,50		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	8	17,19		A
	Total	28			

Kontrol, TS, TS+L-karnitin gruplarında ayrı ayrı TNF- α özelliğinin 1. gün ve 10. gün rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlı değildir.



Grafik 3. TNF ALFA.1; TNF α ' nın 1. gün değerlerini, TNF ALFA.2; TNF α ' nın 10. gün değerlerini ifade etmektedir.

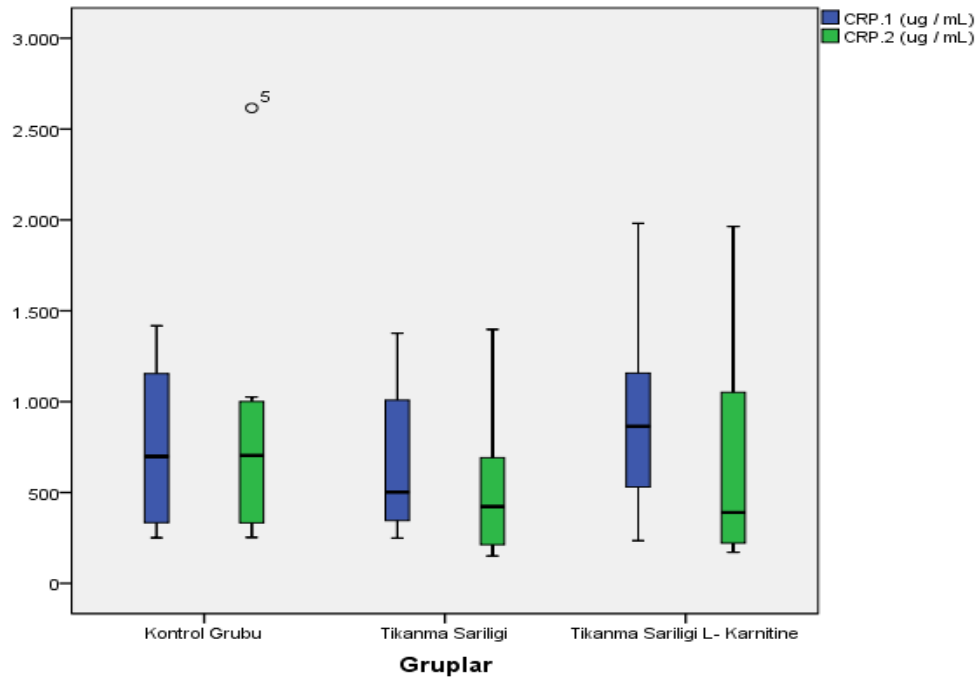
4.1.4. C-Reaktif Protein (CRP)

CRP özelliği bakımından 1. gün ve 10. gün elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlı değildir.

Tablo 4. CRP, 1. ve 10. gün rank değerleri

	Gruplar	N	Mean Rank	P	Banferoni-Dunn Testi
1. gün (ug / mL)	Kontrol Grubu	8	19,56	,819	A
	Tıkanma Sarılığı	15	18,20		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	15	20,77		A
	Total	38			
10. gün (ug / mL)	Kontrol Grubu	8	17,63	,413	A
	Tıkanma Sarılığı	12	12,67		A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin	8	14,13		A
	Total	28			

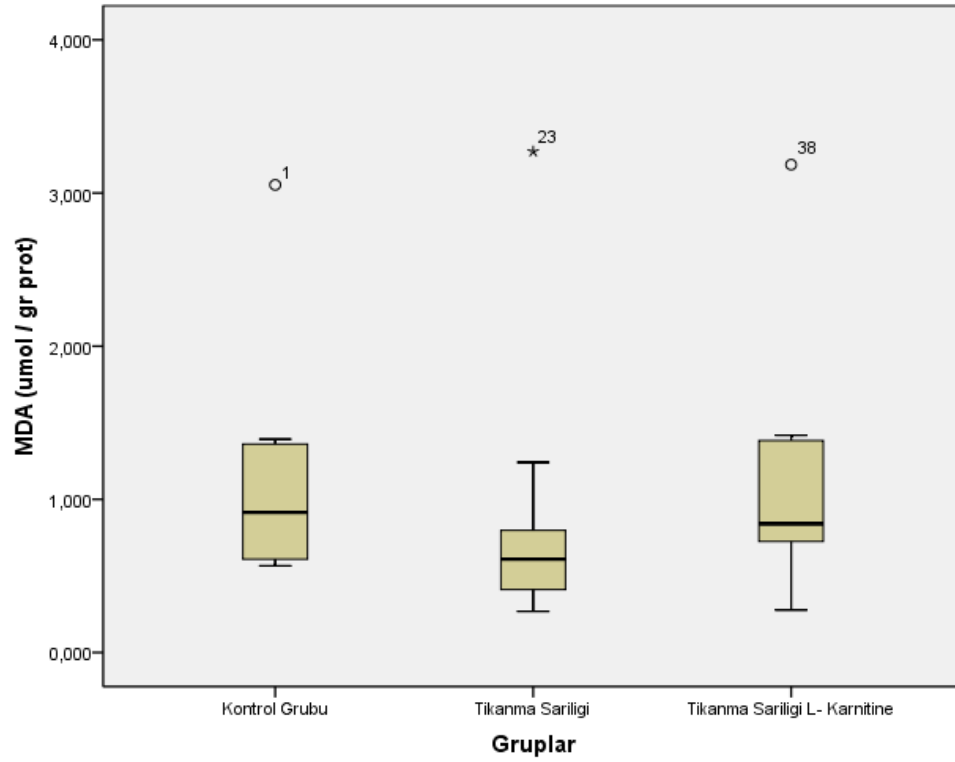
Kontrol, TS, TS+L-karnitin gruplarında ayrı ayrı CRP özelliğinin 1. gün ve 10. gün rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak anlamlı değildir.



Grafik 4. CRP.1; CRP' nin 1. gün değerlerini, CRP.2; CRP' nin 10. gün değerlerini ifade etmektedir

4.1.5. Malondialdehit (MDA)

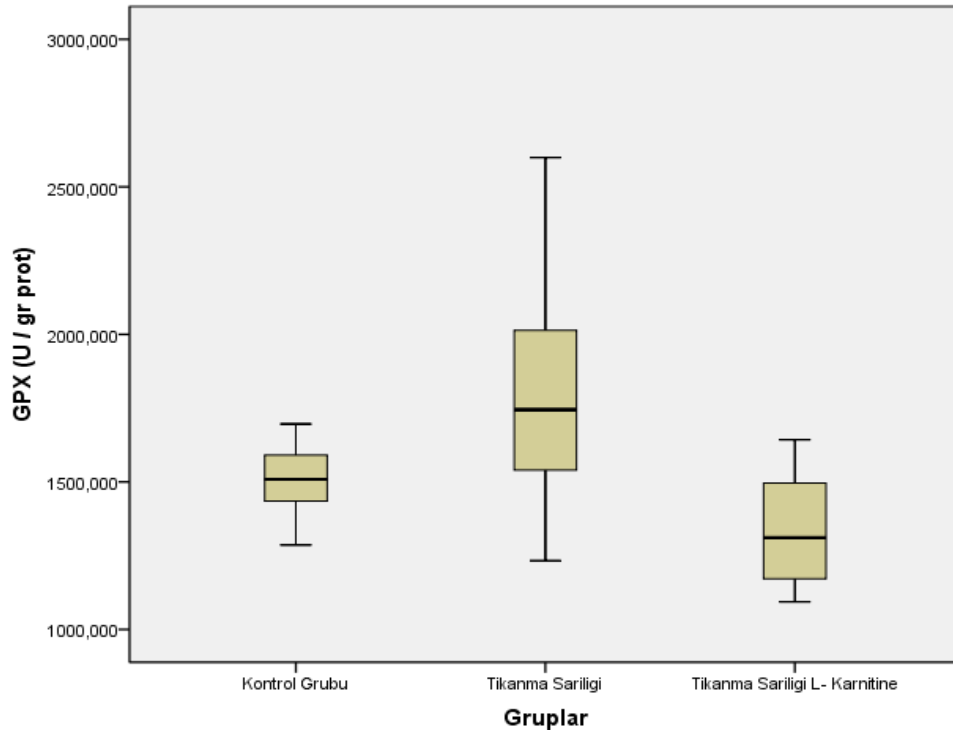
10. gün MDA özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.



Grafik 5. MDA' nın 10. gün değerleri

4.1.6. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

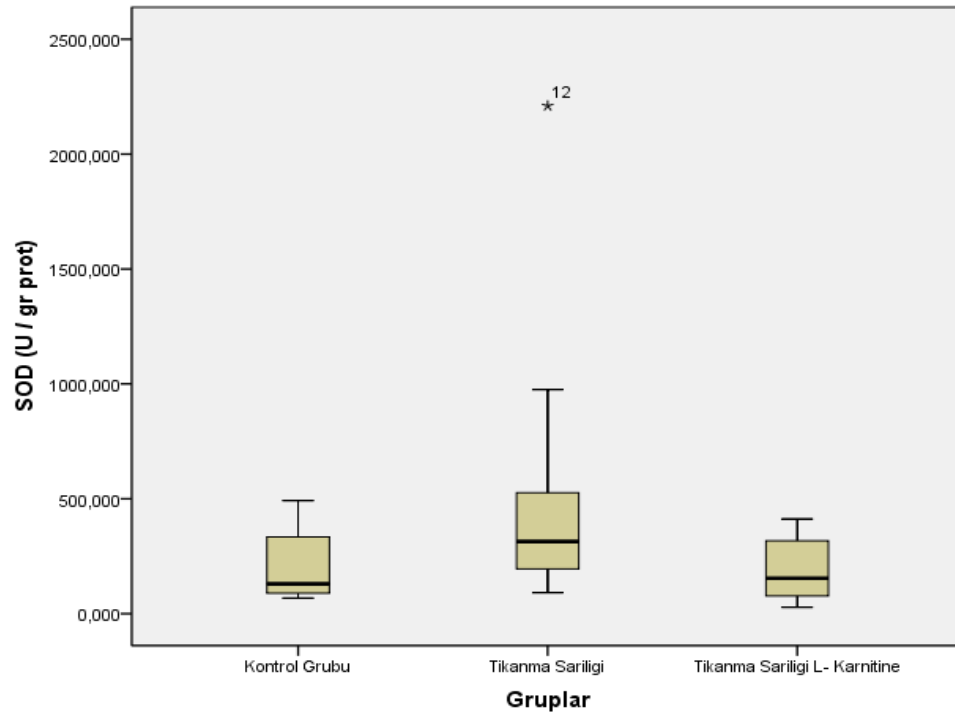
10. gün GSH-Px özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,01$).



Grafik 6. GSH-Px' in 10. gün değerleri

4.1.7. Süperoksit Dismutaz (SOD)

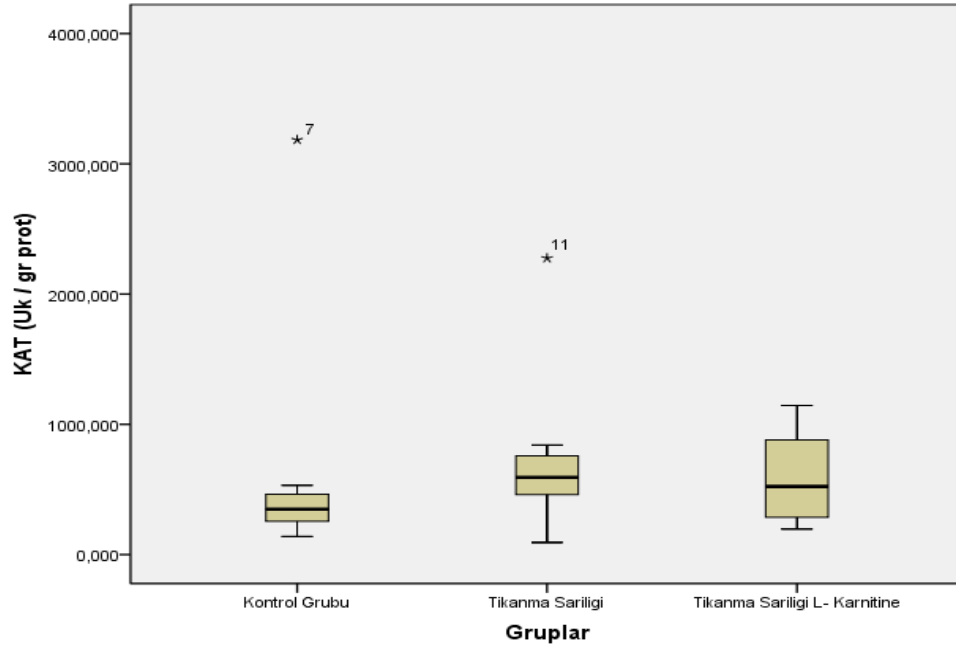
10. gün SOD özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.



Grafik 7. SOD' ın 10. gün değerleri

4.1.8. Katalaz (CAT)

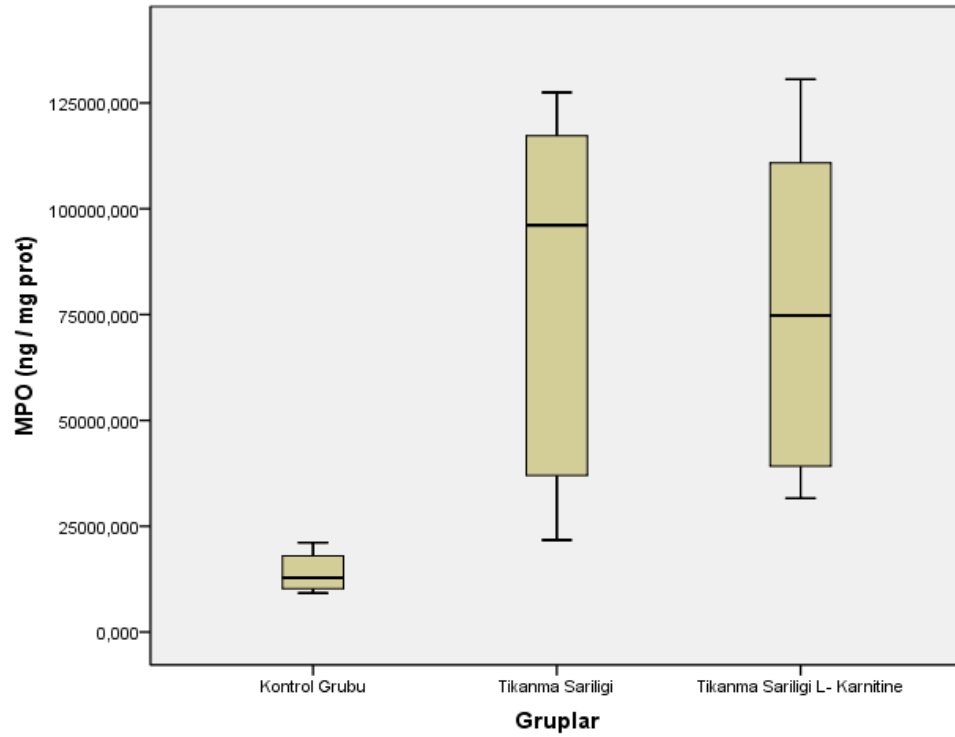
10. gün CAT özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmamıştır.



Grafik 8. CAT' ın 10. gün değerleri

4.1.9. Myeloperoksidaz (MPO)

10. gün MPO özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,01$).



Grafik 9. MPO' ın 10. gün değerleri

Tablo 5. MDA, GSH-Px, SOD, CAT, MPO 10. gün rank değerleri

	Gruplar	P	N	Mean Rank	Banferroni-Dunn Testi
MDA (umol / gr prot)	Kontrol Grubu	,136	8	17,13	A
	Tıkanma Sarılığı		12	10,92	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin		8	17,25	A
	Total		28		
GSH-Px (U / gr prot)	Kontrol Grubu	,006	8	13,25	A,B
	Tıkanma Sarılığı		12	19,75	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin		8	7,88	B
	Total		28		
SOD (U / gr prot)	Kontrol Grubu	,102	8	11,88	A
	Tıkanma Sarılığı		12	18,33	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin		8	11,38	A
	Total		28		
CAT (Uk / gr prot)	Kontrol Grubu	,429	8	11,38	A
	Tıkanma Sarılığı		12	16,17	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin		8	15,13	A
	Total		28		
MPO (ng / mg prot)	Kontrol Grubu	,000	8	4,50	B
	Tıkanma Sarılığı		12	18,83	A
	Tıkanma Sarılığı L-Karnitin		8	18,00	A
	Total		28		

4.2. Histopatolojik Bulgular

Yapılan ki-kare testi sonucunda grupların kontrol, tıkanma sarılığı, tıkanma sarılığı + L-karnitin oluşu Grade 1, 2, 3, 4 akciğer hasarından bağımsız değildir ($P < 0,01$).

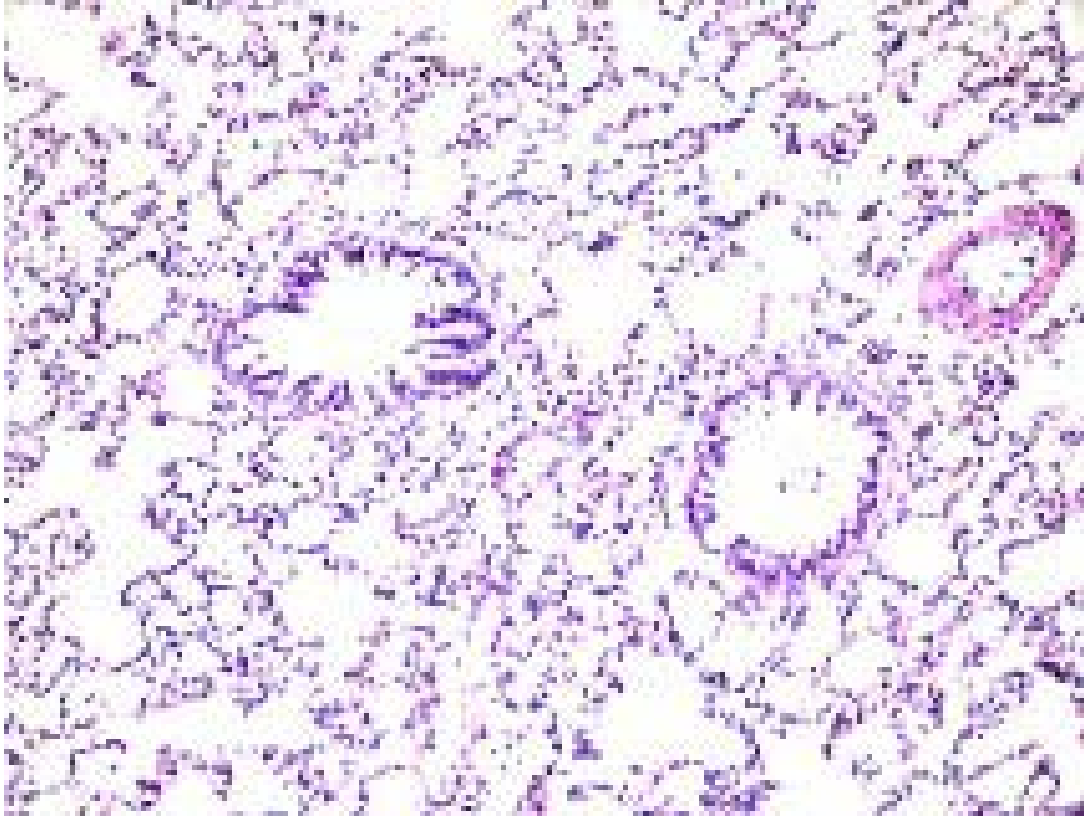
Akciğer hasarına verilen skorlar bakımından grupların karşılaştırılmasında yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($p < 0,01$). Gruplara ait tanıtıcı istatistikler tablo 6' da gösterilmiştir. Tablo 7' de grupların akciğer hasarının derecelendirmesi sayısal olarak ifade edilmiştir.

Tablo 6. 10. günde akciğer dokusundaki hasarın karşılaştırılması

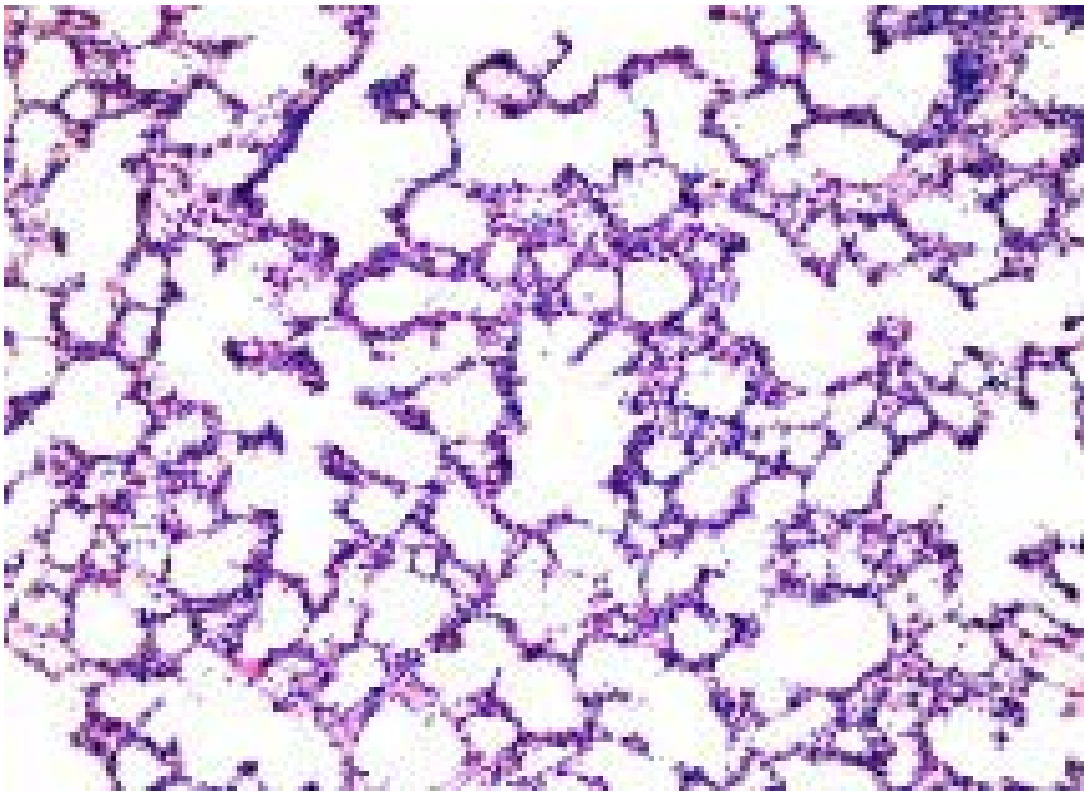
Histopatolojik skorlama	Gruplar	P	N	Mean Rank	Banferroni-Dunn Testi
	Kontrol	,000	8	7,19	B
	Tıkanma Sarılığı		12	21,04	A
	Tıkanma Sarılığı + L-Karnitine		8	12,00	B
	Total		28		

Tablo 7. Gruplar arası akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

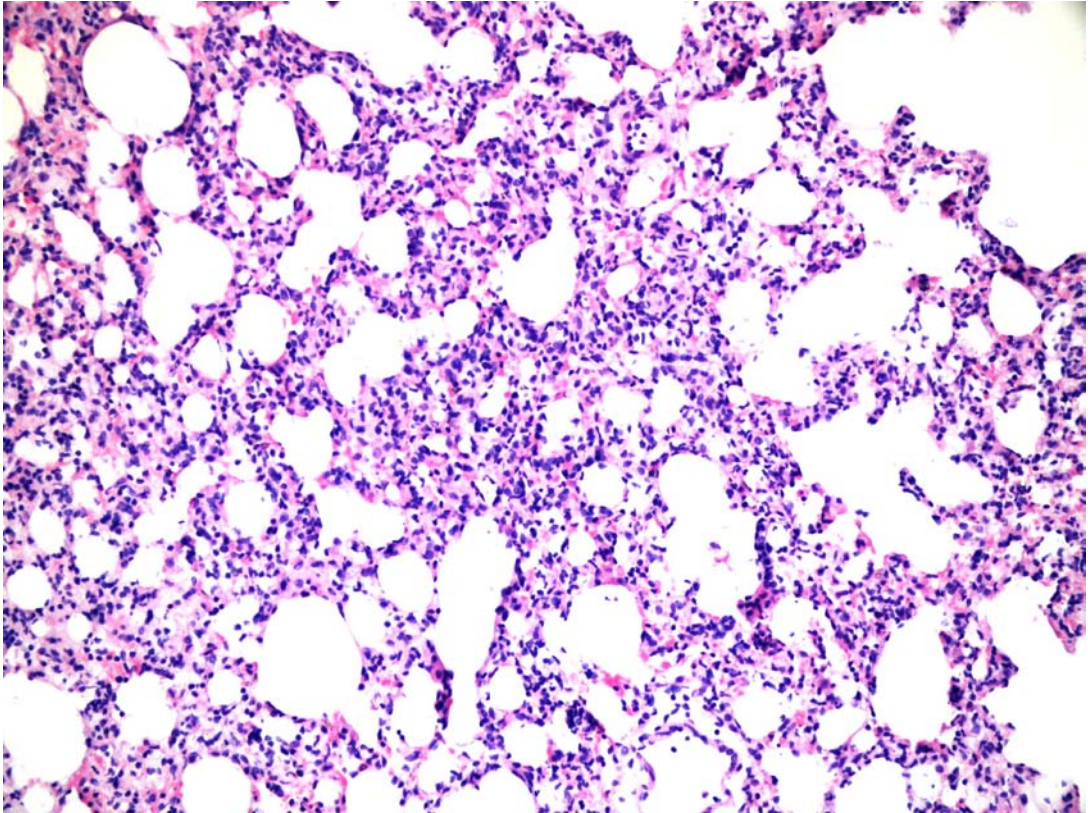
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Kontrol	1	6	1	0
TS	0	0	7	5
TS + L-karnitin	0	4	4	0



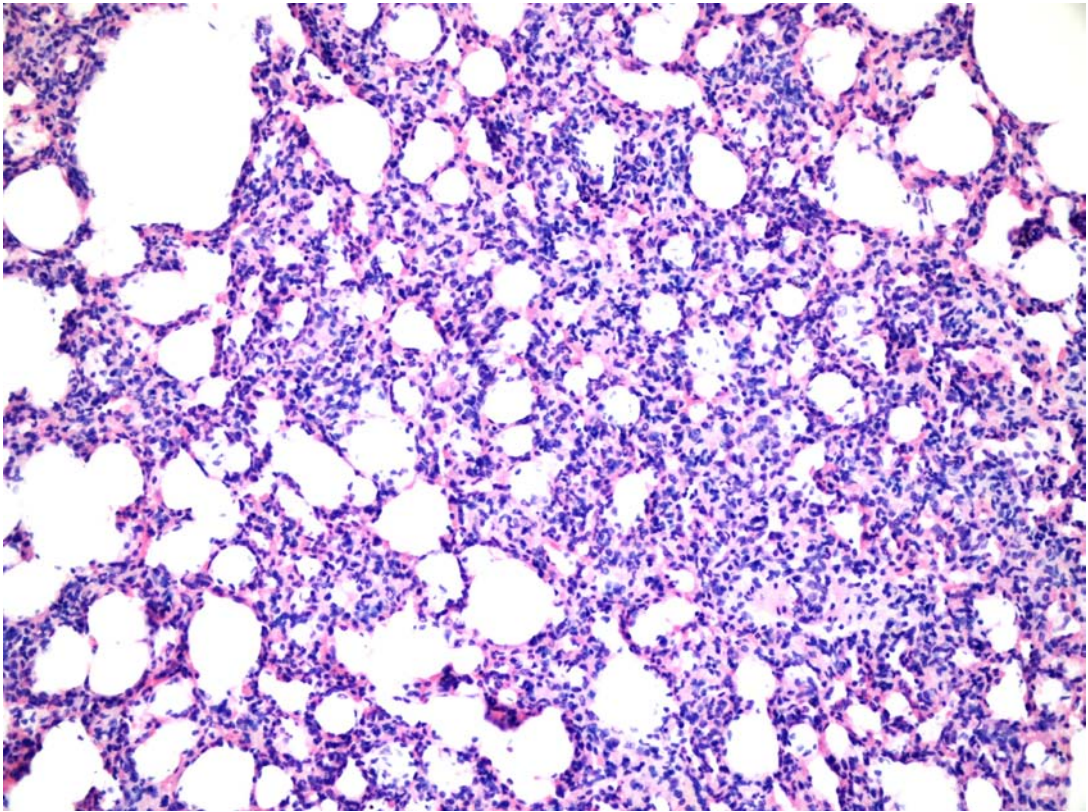
Resim 3. Normal akciğer histolojisi (Grade 1). (x200, HE)



Resim 4. Grade 2 Akciğer histopatolojisi. (x200,HE)



Resim 5. Grade 3 Akciğer histopatolojisi. (x200,HE)



Resim 6. Grade 4 Akciğer histopatolojisi. (x200,HE)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda; tıkanma sarılığında gelişen akciğer hasarını önlemede antioksidan ve antiinflamatuvar özelliği olan L-karnitin' nin histopatolojik etkinliği olduğu, biyokimyasal etkinliğinin ise bazı parametereler açısından etkili olduğunu göstermiştir.

Tıkanma sarılığı modelinin bir sepsis modeli olarak sınıflandırılması gerekir. Tıkanma sarılığındaki fizyopatolojik değişikliklerin oluşmasında önderlik eden endotoksemi; monositler, makrofajlar gibi immün cevapta etkili hücreleri ve endotelial hücreleri aktive ederek birçok sitokinlerin üretimini artırır. Böylece kontrol edilemeyen inflamatuvar sürece, multiorgan disfonksiyonuna, respiratuvar distress sendromuna ve ölüme neden olur (3,4,5).

Jiang ve arkadaşları tıkanma sarılıklı hastalarla yaptıkları klinik bir çalışmada dolaşımdaki nötrofillerin oksidatif cevaplarını ölçmüşler ve oksidatif cevabın kontrol grubuna göre sarılıklı hastalarda arttığını bulmuşlardır. Kanda IL-6, IL-8, TNF- α gibi uyarıcı sitokinler yüksek bulunmuş ve bu sitokinler aracılığıyla nötrofillerin oksidatif cevabının arttığı düşünülmüştür (27).

Endotokseminin TNF- α , IL-6, IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu yapılan birçok araştırma sonucunda bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda TNF- α , IL-6, IL-8 gibi inflamasyon şiddetini gösteren sitokinlerin preop düzeyleriyle, 10. gün düzeyleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldı.

Bizim çalışmamızda;

TNF- α ölçümlerinde; gruplar arasında 1. ve 10. günlerde istatistik olarak anlamlı fark saptamadık.

IL-6 ölçümlerinde; gruplar arasında 1. ve 10. günlerde istatistik olarak anlamlı fark saptamadık.

IL-8 Ölçümlerinde; 1. ve 10. günlerin karşılaştırmasına bakıldığında kontrol grubu ve tıkanma sarılığ grubunda istatistik olarak önemli artış bulunmuştur. Tıkanma sarılığ + L-karnitin grubunda ise 1. ve 10. günlerin karşılaştırmasına bakıldığında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu bize inflamasyon ve uzak organ

hasarının göstergesi olan IL-8 değerinin tıkanma sarılığı + L-karnitin grubunda daha düşük bir düzeyde arttığını göstermiştir.

CRP akut faz proteinlerinin öncüsüdür. CRP serum düzeyi inflamatuvar aktivasyonu gösteren iyi bir parametredir ve serumdaki konsantrasyonu, IL-6 ve TNF- α seviyeleri ile ilişkilidir (41).

Çalışmamızdaki CRP ölçümlerinde; gruplar arasında 1. ve 10.günlerde istatistik olarak anlamlı fark saptamadık.

Sepsis modellerinde akciğer hasarı üzerine yapılan çalışmalar rehber alınarak, deneysel TS modelinde; L-karnitin enerji metabolizmasındaki görevleri, detoksifiye edici, doku hasarını engelleyici ve antioksidan özelliklerinden dolayı, serbest oksijen radikallerine ve endotoksinlere bağlı oluşan akciğer hasarı üzerine etkinliğinin araştırılması için akciğer dokusunda MPO, MDA, Katalaz, SOD, GSH-Px bakıldı (29).

10. gün sonunda grupların Katalaz (CAT), Malondialdehit (MDA) değerleri arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. Süperoksit Dismutaz (SOD) açısından, L-karnitin verilen tıkanma sarılığı grubu ile kontrol grubu değerlerinin aynı, L-karnitin verilmeyen tıkanma sarılığı grubunda değerlerin daha yüksek olduğu görüldü. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı.

Myeloperoksidaz (MPO) değerlerine baktığımızda kontrol grubu ile tıkanma sarılığı oluşturulan gruplar arasında anlamlı fark olmasına karşılık L-karnitin grubu ile diğer tıkanma sarılığı arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı.

Antioksidan etkinliğin en önemli göstergesi olan Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) değerleri açısından L-karnitin verilen grup ile tıkanma sarılığı grubu arasında istatistik olarak anlamlı fark saptandı. L-karnitin grubu ile kontrol grubu arasında fark saptanmadı.

Yapılan birçok çalışmada tıkanma sarılığı modelinin bir sepsis modeli olduğu ve multiple organ hasarı ile sonuçlandığı bilinmektedir. Çalışmamızda L-karnitin tıkanma sarılığında akciğer hasarına etkisini, histopatolojik olarakta değerlendirdik.

Akciğer dokusunda histopatolojik değerlendirme için Özdülger ve ark' nın yayınında belirtilmiş olduğu şekilde doku hasarı değerlendirme ölçeği kullanıldı

(29). Sonuçta; Tıkanma sarılığında akciğer hasarı oluştuğunu ve L-karnitin bu hasarı azalttığını saptadık. Ratlarda oluşan akciğer hasarının kontrol grubu ile L-karnitin grubunda aynı düzeyde olduğu, tedavi verilmeyen tıkanma sarılığı grubunda ise istatistik olarak yüksek olduğunu saptadık.

6. SONUÇLAR

Tıkanma sarılığında L-karnitin' nin akciğer hasarını önlemedeki etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada varılan sonuçlar şöyle özetlenebilir;

1. Tıkanma sarılığında bağı olarak akciğer hasarı oluşmaktadır.
2. Bu akciğer hasarının gelişmesinde; lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve nötrofil migrasyonu etkilidir.
3. L-karnitin, antioksidan etkinliğiyle TS da, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve nötrofil migrasyonunu engeller.
4. Sonuç olarak, L-karnitin TS da AC hasarını histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ışığında önler.

Bu konuda daha önce yapılan klinik çalışma olmadığından, örneklem büyüklüğü geniş ve uzun süreli çalışmaların yapılması, yukarıdaki sonuçlarımızın desteklenmesi ve bu ajanın klinik kullanıma girmesi için önem arz etmektedir.

ÖZET

Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde L-Karnitin' in Akciğer Hasarını Önlemedeki Etkinliği

Tıkanma sarılığı; endotoksemi, inflamuar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu gibi patofizyolojik faktörler aracılığıyla multiorgan hasarına neden olan bir sepsis modelidir. Bu çalışma, ortak safra kanalı ligasyonu yoluyla tıkanma sarılığı geliştirilen bir hayvan modelinde L-karnitin' nin TS da oluşan akciğer hasarını önlemedeki etkinliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Otuz sekiz adet Wister Albino rat, kontrol, tıkanma sarılığı, tıkanma sarılığı + L-karnitin grubu olarak üçe ayrıldılar. I. gruba sadece laparotomi uygulandı. II. gruba ana safra kanalı ligasyonu yapıldı. III. gruba ise ana safra kanalı ligasyonu ve günde 1 kez, 50 mg/kg dozunda L-karnitin 10 gün boyunca iv. şekilde kuyruk veninden verildi. Çalışmanın birinci ve onuncu günlerinde biyokimyasal inceleme için 1 cc kan alındı. Onuncu gün sonunda ratlar sakrifiye edildi. Biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için akciğer dokusu alındı.

Sistemik inflamatuar cevabı değerlendirmek için kanda TNF- α , IL-6, IL-8 ve CRP düzeylerine baktık.

Grup 1 ve 2 de, uzak organ hasarının göstergesi olan IL-8 açısından anlamlı artış saptanırken grup 3 de anlamlı artış saptanmadı. TNF- α , IL-6 ve CRP açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Akciğer dokusunda, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), PMN stimülasyonunun indeksi olan Myeloperoksidaz (MPO), anahtar antioksidan glutatyonu okside eden Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve yine serbest oksijen radikallerini yok eden Katalaz (CAT) ve Süperoksit dismutaz (SOD) enzim seviyeleri araştırıldı.

MDA, CAT değerlerinde, gruplar arasında anlamlı fark saptanmaz iken, antioksidan etkinliğin en önemli göstergesi olan GSH-Px açısından L-karnitin grubunda diğer tıkanma sarılığı grubuna göre anlamlı düşük değer saptandı. Ayrıca L-karnitin' in antioksidan etkisi ile GSH-Px açısından laparotominin etkilerini bile geri çevirdiği görüldü.

MPO' nun ise tıkanma sarılığında arttığı, fakat L-karnitin grubu ile diğer tıkanma sarılığı grubu arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

SOD değerlerine baktığımızda L-karnitin verilen tıkanma sarılıklı grubun değerlerinin kontrol grubuyla aynı, tedavi verilmeyen grupta ise daha yüksek olduğu saptandı. Fakat her üç grup arasındaki SOD değerleri farkı istatistiksel olarak gösterilemedi.

Alınan akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde kullanılan skorlama sistemi sonucunda L-karnitin verilen tıkanma sarılığı grubunda, diğer tıkanma sarılığı grubuna göre anlamlı derecede akciğer hasarı düşük düzeyde bulundu. L-karnitin tıkanma sarılığı grubunu, akciğer hasarı yönünden kontrol grubu düzeyine çekmiştir.

Sonuç olarak, L-karnitin TS da AC hasarını histopatolojik ve biyokimyasal parametreler ışığında önler.

Anahtar Sözcükler: Tıkanma sarılığı, akciğer hasarı, L-karnitin

SUMMARY

The Protective Effect Of L-Carnitine On Obstructive Jaundice, Induced Lung Injury In Experimental Rat Model

Obstructive jaundice is a sepsis model that cause a multi-organ damage through the pathophysiologic factors such as endotoxemia, inflamuar cytokines, reactive oxygen radicals, and lipid peroxidation. This study is prepared to evaluate the efficiency of L-carnytine to prevent lung injury in an animal model with obstructive jaundice which provided by ligation common bile duct.

Thirty-eight Wister albino rats, were divided into three as the control, obstructive jaundice, and obstructive jaundice + L-carnitine group. Group I. was only performed laparotomy. Group II. was applied the main bile duct ligation. Group III. was performed the main bile duct ligation from tail vein shaped the iv., and 50 mg / kg dose of L-carnitine for 10 days 1 times a day. 1 cc of blood were taken for biochemical analysis at the first and tenth days of the study. Rats were sacrificed at the end of the tenth day. Lung tissue were taken for biochemical and histopathological examination.

We looked at TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP levels to assess the systemic inflammatory response in the blood.

In groups 1 and 2, IL-8, as an indicator of the remote organ injury was detected a significant increase, in group 3 wasn't significant increased. In terms of TNF- α , IL-6 and CRP were not significantly different between the groups.

The enzyme levels of malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation, myeloperoxidase (MPO) the index of the PMN stimulation, glutathione peroxidase (GSH-Px) which oxidized the key antioxidant glutathione and catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) that destroy free oxygen radicals were investigated in lung tissue.

While no significant difference values between the groups MDA, CAT was detected, the most important indicator of antioxidant activity of GSH-Px, L-carnitine group value was significantly lower than in other obstructive jaundice. Also, L-carnitine in terms of antioxidant effect of GSH-Px was turned back even if the effects of laparotomy.

MPO increases in the obstructive jaundice, but with L-carnitine group showed no significant difference between the other obstructive jaundice group.

Looking at the values of SOD, given L-carnitine obstructive jaundice with the control groups are the same, the values were higher in the group without treatment. But difference in SOD values between the three groups wasn't statistically showed.

In addition, to histopathologic examination of lung tissue is taken that found a significantly lower level of lung injury between the group of obtructive jaundice compared L-carnitine to other group obstructive jaundice. L-carnitine has taken the obstructive jaundice group to the level of the control group in terms of lung injury.

As a result, L-carnitine prevents obstructive jaundice at the lung injury in the light of histological and biochemical parameters.

Key words: Obstructive jaundice, lung injury, L-carnitine

KAYNAKLAR

1. Su CH, P'eng FK, Lui WY. Factors affecting morbidity and mortality in biliary tract surgery. *World J Surg.* 1992; 16(3):536-40.
2. Kimmings AN, Van Deventer SJH, Obertop H et al. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000; 46, 725-731
3. Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, Polychronidis A, Simopolulos C. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice. *Clin Exp Med.*2003;3(2):124-8.
4. Sakrak O, Akpınar M, Bedirli A, Akyurek N, Arıtas Y. Short and long-term effects of bacterial translocation due to obstructive jaundice on liver damage *Hepatogastroenterology.* 2003;50(53):1542-6.
5. Padillo FJ, Muntane J, Montero JL, Briceno J, Mino G, Solarzano G, Sitges-Serra A, Pera Madzaro C. Effect of internal biliary drainage on plasma levels of endotoxin, cytokines, and C-reactive protein in patients with obstructive jaundice. *World J Surg.* 2002;26(11):1328-32.
6. Liu TZ, Lee KT, Chern CL et al. Free Radical-Triggered Hepatic Injury of Experimental Obstructive Jaundice of Rats Involves Overproduction of Proinflammatory Cytokines and Enhanced Activation of Nuclear Factor B. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2001: 31,383-390
7. Wang P, Gong G, Wei Z et al. Ethyl Pyruvate Prevent Intestinal Inflammatory Response and Oxidative Stress in a Rat Model of Extrahepatic Cholestasis. *Journal of Surgical Research* 2009: 1-8
8. Akca T, Canbaz H, Tataro. İu C vd. The Effect of N-Acetylcysteine on Pulmonary Lipid Peroxidation and Tissue Damage. *Journal of Surgical Research* 2005: 129, 38-45
9. Ogetman Z, Dirlik M, Çağlıkulekci M, Canbaz H, Karabacak T, Yaylak F, Tamer L, Kanik A, Aydın S. The effect of aminoguanidine on blood and tissue lipid peroxidation in jaundiced rats with endotoxemia induced with LPS. *J Invest Surg.* 2006;19(1):19-30.
10. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J.*2000;16(3):534-54
11. Dr.Çavdar C, Dr. Sifil A, Dr. Çamsarı T. Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar 1997;3-4: 96-101.
12. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18:39-61.
13. Andreoli T, Bennett J.C, Carpenter C.J, Plum F, Smith L.H: jaundice. *Cecil Essentials of medicine Türkçesi* 2000; bölüm 6,324-328.
14. Ding JW, Andersson R, Soltész V, Willen R, Bengmark S: The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993;25:11-19.
15. Tontuş O, Coşkun S, Erengül C, Pişkinpafla M. Obstrüktif sarılıklı hastalarda cerrahi morbidite ve mortaliteyi etkileyen risk faktörleri. *Klin Den Cerrahi Derg* 1993;1:228-31.

16. Yüzen Y, Öncel T, Engin S, Aldemir S, Akyıldız A: Tıkanma sarılıklarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen faktörler. *Ulusal Cerrahi Derg* 1993;9:238-43.
17. Guyton A. C. , Hall J. E. *Tıbbi Fizyoloji Bolum 64: 9th de.* 1996; 827-829
18. Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred twenty-nine patient with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1988;75:216-9.
19. Güngör S, Kurultay N, Şener G.A, Er H.H, Çökmez A, Türker M: Deneysel olarak tıkanma ikteri geliştirilen ratlarda bakteriyel translokasyonun Gösterilmesi *Klinik Derg*, Cilt 16, Sayı:3, 2003, s:121-125
20. Kadioğlu M.B Tıkanma Sarılığı Oluşturulan Modelde Ursodeoksikolik Asit ve Glutamin' in Bakteriyel Translokasyon, Karaciğer Fonksiyon Testleri ve Karaciğer Histopatolojisine Olan Etkileri. Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Genel Cerrahi Kliniği, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul-2005 (http://www.istanbul saglik.gov.tr/w/tez/pdf/genel_cerrahi/dr_mehmet_burak_kadioglu.pdf)
21. Erbil Y, Berber E, Ozarmagan S et al: The effects of sodium deoxycholate, lactulose and glutamine on bacterial translocation in common bile duct ligated rats. *Hepatogastroent* 1999; 46: 2791-2798
22. Lorenzo-Zuniga V, Bartoli R, Planas R et al: Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepat* 2003; 37: 551-557
23. Parks RW, Clements WDB, Pope C et al: Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J Anat* 1996; 189: 561-565
24. Ogata Y, Nishi M, Nakayama H, Kuwahara T, Ohnishi Y, Tashiro S: Role of bile in intestinal barrier function and its inhibitory effect on bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *J Surg Res.* 2003;115(1):18-23.
25. Edvard Lin, Steven E. Calvano, Stephen F. Lowry *Schwartz's Principles of Surgery, Eighth Edition* 2008: Bölüm1, syf 8
26. Çelikbaş B Deneysel Tıkanma Sarılığı Modelinde Caffeic Asid Phenethyl Esterin Akciğer Hasarını Önlemedeki Etkinliği. SDÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, Tıpta Uzmanlık Tezi (Tez no: 195066), Isparta- 2007
27. Jiang W.G, Puntis M.C.A, Hallet M.B. Neutrophil priming by cytokines in patients with obstructive jaundice. *HPB Surg.* 1994: 7, 281.289.
28. Puntis M.C.A, Jiang W.G. Monocyte from obstructive Jaundice Patients Show Increased TNF and IL-6 production *Br. J. Surg.* 1992, 79,458
29. Özdülger A, Cinel I, Köksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, Okcu H, Dikmengil M, Oral U. The protective effect of N-Acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. 2003, 336-372.
30. Taşbozan O, Gökçe M.A, L-Karnitin ve Akuakültürde Kullanımı. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Ulusal Su Günleri Sempozyumu 2007, 16-18 Mayıs 2007, Antalya
31. Doğru U, Kontrollü Hemorajik Şok Modelinde L-Karnitinin Akut Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri. SDÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD, Tıpta Uzmanlık tezi, Isparta-2005
32. Siliprandi N, Santorelli L, Climan M. Carnitine metabolism and clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 1989; 183:3-12.

33. Hoppel C. The physiological role of carnitine. In: Ferrari R, Di Mauro S, Sherwood G. L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy. London: Academic Pres; 1992: p.5-19.
34. Bremer J. Carnitine: metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63(4):1420-80.
35. Erkin B, Deneysel Ülser Modellerinde L-Karnitinin Gastrik Mukozayı Koruyucu Etkisi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji AD, Tıpta Uzmanlık Tezi (Tez no: 194466), Edirne-2005
36. Rebouche CJ, Chenard CA. Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites. *J Nutr* 1991;121(4):539-46.
37. Brass EP, Hoppel CL, Hiatt WR. Effect of intravenous L-carnitine on carnitine homeostasis and fuel metabolism during exercise in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55(6):681-92.
38. Saggerson ED and Carpenter CA. Carnitine palmitoyltransferase in liver and five extrahepatic tissues in the rat. *Biochem J* 1986; 236(1):137-41.
39. Rinaudo MT, Curto M, Bruno R, Piccinini M, Marino C. Acid soluble, short chain esterified and free carnitine in the liver, heart, muscle and brain of pre and post hatched chicks. *Int J Biochem* 1991; 23(1):59-65.
40. Platell C, Kong SE, Mc Cauley R, Hall JC. Branched- Chain amino acids. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(7):706-17.
41. Gümüşiş G, Doğanavşargil E : Klinik Romatoloji kitabı 1999:148