

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GÖĞÜS CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

86856

SIÇANDA HİPOKSİK-İSKEMİK AKCİĞER HASARI

SONRASI ALLICIN VE SODYUM NİTROPRUSİT'İN

HEMODİNAMİK VE HİSTOLOJİK ETKİLERİ:

KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA

Dr.Hasan Fevzi Batırel

UZMANLIK TEZİ

T 86856

DANIŞMAN

Doç.Dr.Mustafa Yüksel

İSTANBUL, 1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İÇİNDEKİLER

ÖZET:	3
SUMMARY:	4
GİRİŞ:	5
AKCİĞERİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI:	6
NİTRİK OKSİT VE AKCİĞERDEKİ ROLÜ:	9
Nitrik Oksitin Sentezi ve Atılımı.....	9
Nitrik Oksitin Akciğer Üzerine Etkileri	12
Nitrik Oksitin İmmün Cevap Üzerine Etkileri.....	13
ALLICIN (thio-2-propene-1-sulfinic acid S-allyl ester).....	14
Allicin'in Sentezi ve Fizyolojik Reaksiyonları:	15
Allicin'in In Vitro Etkileri:	15
Allicin'in In Vivo Etkileri:.....	16
Allicin'in Etki Mekanizması:.....	17
SODYUM NİTROPRUSİT VE AKCİĞER ÜZERİNE ETKİLERİ.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM:	19
Cerrahi Model ve Kanülasyonlar:.....	20
Miyeloperoksidaz Analizi	24
Histolojik Analiz.....	25
İstatistiksel Metod.....	26
BULGULAR.....	27
Genel Bulgular.....	27
Pulmoner Arter Kan Akımı	28
Sistemik Arteriyel Basınç.....	33
Kan Gazı Analizi	38
Miyeloperoksidaz Analizi	40
Histolojik İnceleme	41
TARTIŞMA.....	55
SONUÇ	60
REFERANSLAR.....	61

ÖZET:

Allicin sarmısaktan elde edilen sülfürik bir maddedir ve bildirilmiş pulmoner vazodilatör, anti-oksidan ve anti-agregan etkilere sahiptir. Allicin'in sıçanda hipoksik iskemik akciğer hasarı sonrası hemodinamik parametreler ve akciğer histolojisi üzerine etkilerini araştırdık. 36 adet Sprague-Dawley sıçanı kontrol (n=6), Allicin 0.1 mg infüzyonu (n=6), 30 dk iskemi/hipoksi ve 60 dk reperfüzyon (I/R) (n=6), Allicin 0.1 mg infüzyonu ve I/R (n=8), Allicin 0.01mg infüzyonu ve I/R (n=6) ve Sodyum Nitroprusit (SNP) ve I/R (n=4) şeklinde gruplandı. Tüm gruplara anestezi verildikten sonra, toraks açılmış ve heparinizasyon yapılmıştır. İlk iki grup bir saat boyunca izlenmiş, diğer dört grupta ise sol hilus bağlanmış ve daha sonra açılarak sağ hilus bağlanıp reperfüzyona geçilmiştir. Tüm gruplarda pulmoner kan akımıyla (PKA), ortalama kan basıncı (OKB) izlenmiş ve başlangıçta, 30 dk hipoksi/iskemi, sağ hilus ligasyonu, allicin/sodyum nitroprusit infüzyonu sonrası ve 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda ölçümler yapılmıştır. Bu zamanın sonunda arteriyel kan gazı analizi yapılmış ve sol akciğerler miyeloperoksidaz ve histolojik inceleme için saklanmıştır. Allicin 0.1 mg dozunda iskemi reperfüzyon sonrası, hem hemodinamik hem de histolojik düzelmeye neden olmaktadır. Allicin 0.01 mg bu deney modelinde etkisiz kalmıştır. Allicin 0.1 mg iskemi reperfüzyon hasarını sodyum nitroprusitten daha etkili bir şekilde ortadan kaldırmaktadır ve hipotansiyona sebep olmamaktadır. Ayrıca nötrofil ve lenfosit migrasyonlarına engel olmuştur. Allicin, nitrik oksite çok benzer bir şekilde pulmoner histolojiyi, erken dönem pulmoner kan akımını ve sistemik hemodinamiyi düzeltmiş ve akciğerdeki lökosit infiltrasyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlarla ilerideki araştırmaları takiben allicin organ prezervasyon solüsyonlarında ve hipoksik iskemik akciğer hasarının olduğu durumlarda ilaç olarak kullanılabilir.

SUMMARY:

Allicin is a sulfuric compound extracted from garlic, which has reported pulmonary vasodilator, anti-oxidant and anti-aggregatory actions. We investigated the effect of allicin on hemodynamic parameters and lung histology after hypoxic/ischemic lung injury in rats. 36 Sprague-Dawley rats were grouped into a control (n=6), Allicin 0.1 mg infusion (n=6), 20 min ischemia/hypoxia and 60 min reperfusion (I/R) (n=6), Allicin 0.1mg infusion and I/R (n=8), Allicin 0.01mg infusion and I/R (n=8) and Sodium Nitroprusside (SNP) and I/R (n=4) groups. After anesthesia thoracic exposure and heparinization, the first two groups were monitored for one hour, the following groups were subjected to left hilar clamping and then reperfusion with right hilar clamping. Pulmonary blood flow(PBF), mean arterial pressure (MAP) were monitored and measurements were taken at the start, after 30 min of hypoxia/ischemia, right pulmonary artery ligation, allicin/sodium nitroprusside injection, 15, 30, 45 and 60 min of reperfusion. At the end of this period arterial blood gas analysis was done and lung specimens were harvested for myeloperoxidase (MPO) and histologic analysis. After I/R, Allicin 0.1 mg improves both hemodynamics and lung histology. Allicin 0.01 mg is not effective. Allicin 0.1 mg reduces I/R injury better than sodium nitroprusside and does not cause systemic hypotension. Besides it reduces neutrophil and lymphocyte infiltration. Allicin improves early PBF, lung histology and systemic hemodynamics. It can possibly be used as an ingredient in organ preservation solutions and as a selective pulmonary vasodilator after I/R injury.

GİRİŞ:

Akciğerler, diğer organlara göre iskemi ve hipoksiye daha duyarlı organlardır. Bu özelliği de hem tranplantasyon, hem de iskemi ve hipoksinin rol oynadığı diğer hastalıklarda klinik başarıyı çok önemli oranda etkilemektedir. Akciğerlerin azami iskemi zamanı literatürde altı saat olarak bildirilmekle beraber, dört saati aşan iskemi süresi sonucunda akciğer tranplantasyonu sonrası önemli klinik problemler çıkmaktadır . Bu problemlerden en büyüğü erken organ yetmezliği (early graft failure) veya iskemi-reperfüzyon hasarıdır ve yüksek mortalitesi vardır (1,2).

İskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için binlerce çalışma yapılmıştır. 700 civarında bu hadiseyi önleyen madde bulunmuş olmakla beraber, bir iki tanesi hariç bir çoğu klinik kullanımda yer almamaktadır (3-5). Biz de bu amaçla sarmısaktan elde edilen sülfürik bir madde olan, ve daha önceden pulmoner vazodilatör, anti-migratuar, anti-aggregan ve anti-oksidan etkileri gösterilmiş olan Allicin'in sıçanda iskemik-hipoksik akciğer hasarı sonrası etkilerini inceledik (6-9). Bir karşılaştırma olması için yine literatürde akciğerin iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığı ispatlanan ve aynı zamanda vazodilatör etkileri olan nitrik oksit (NO) donörü sodyum nitroprusit'i seçtik (10-12). Bu çalışmada Allicin ve sodyum nitroprusit'in akciğerin iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

AKCİĞERİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI:

Bir organda belirli bir süre kan akımının kesilmesi sonucu iskemik hasar oluşur. Bu hasar çok boyutlu olup patofizyoloji genellikle bütün vücut organları için aynıdır. Fakat bazı organların iskemiye dirençleri farklıdır ve yapısal özellikleri de hadiseye katıldığında nihai tablo farklı olarak kendini gösterir. Akciğerler metabolizması için gerekli oksijeni üç ayrı kaynaktan sağlarlar. Bunlardan en önemli olanı pulmoner arterlerdir. İkinci sırada bronşial arterler ve de eksternal olarak solduğumuz oksijen diffüzyon yoluyla akciğerlerin oksijen kaynaklarını teşkil eder. Akciğerlerin 30 dakika gibi kısa bir süre pulmoner arterlerin klemplenmesi ile iskemiye maruz bırakılması iskemi-reperfüzyon hasarının oluşması için yeterlidir (13-16). İskemi-reperfüzyon hasarını iki bölümde incelemek mümkün olabilir.

İskemi süresince oluşan hasarın derecesini belirleyen en önemli faktörler, iskeminin süresi, organın maruz kaldığı ısı derecesi, havayla dolu bir şekilde kalıp kalmadığı ve özel bir koruma solüsyonuyla yıkanıp yıkanmadığıdır (17-22). Bu süre içerisinde esas olarak hasara uğrayan damar duvarını kaplayan endoteldir. Ayrıca akciğer parenkimini oluşturan düz kas hücreleri ve pnömositler de iskemiden etkilenirler.

Reperfüzyon sırasında dokudaki harabiyetin derecesini etkileyen en önemli etken endotelin durumudur. Zira reperfüzyon sırasında bazı önemli fizyolojik mekanizmalar aktif hale gelir. Süperoksit iyonu ve çok kolay tepkimelere yolaçabilen diğer oksidatif maddeler hem iskemi hem de reperfüzyon sırasında fazla miktarlarda üretilirler ve direkt olarak protein ve lipidlere saldırarak etkilerini gösterirler; nitekim anti-oksidan ajanların bir çoğu reperfüzyon sırasındaki hasarı azaltmaktadır (23-25). Endotelin hasarı sonucu endotel hücrelerini birbirine yapıştıran bağlar hasar görür ve hücreler arasından ekstraselüler bölgeye kaçak olur. Endotelin prostasiklin salımı

bozulur ve reperfüzyon sırasında prostasiklin-tromboksan dengesi bozularak, trombosit aggregasyonu artar. Mikrosirkülasyonda trombosit aggregasyonları sebebiyle tıkanıklıklar oluşur ve doku içerisinde etkin kan dolaşımı sağlanamaz (26-29). Hasara uğramış endotel komplement sistemini aktive eder ve güçlü kemotaktik maddelerden olan C5a endotel yüzeyine yapışarak nötrofilleri hasar bölgesine çağırır (30-32). En önemli hasar ise nötrofillerin gelmesiyle oluşur. Bozulmuş endotelde nötrofilleri kendisine çeken bazı reseptörlerin genetik olarak oluşumu artar. Bunlardan en önemlileri endotel üzerinde yer alan intraselüler adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), p-selektin ve nötrofiller üzerinde yer alan CD11a ve CD18 reseptörleridir. Bu reseptörler nötrofillerin hasar bölgesine gelmelerinden sonra endotele yapışmalarını ve endotel üzerinde kaydıktan sonra açılmış olan hücre aralarından dokuya sızmalarına sebebiyet verirler. Nitekim bu reseptörlere karşı geliştirilmiş olan antikolar akciğer iskemi-reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azaltmaktadır (33-40). Reperfüzyon sırasında endotelden salgılanan NO'nunda büyük önemi vardır. NO nötrofillerin yapışmasını (CD11b ve CD18 üzerinden), birikmesini ve içeriklerini boşaltmalarını inhibe eder. Ayrıca hem trombosit aggregasyonunu engeller, hem de vazodilatasyon yaparak vasküler dengenin korunmasını sağlar. Endotel hücresi, reperfüzyon sırasında NO sentezini sağlayan endotelyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) enziminin genetik ekspresyonunu artırır ve düz kas hücreleri de inducibl nitrik oksit sentetaz (iNOS) enziminin sayısını arttıran genleri aktive ederler ve bu şekilde artmış NO miktarı ile hasarı engellemeye çalışırlar. Fakat bütün bunlara rağmen NO kana karıştığı zaman çok çabuk bir şekilde hemoglobine bağlanarak inaktif olur. Yine nötrofillerden salgılanan süperoksit iyonları ve diğer oksidan maddeler hemen NO ile etkileşime girerler ve NO'nun etkilerini ortadan kaldırır. Hatta fazla miktarlarda NO'nun üretildiği durumlarda, süperoksit iyonları NO ile reaksiyona girerek daha

zararlı bir madde olan peroksinitrit oluşumuna sebep olurlar ve doku hasarını daha da artırırlar (41-47). Diğer bazı sitokinler, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), trombosit aktivasyon faktörü (PAF), interleukin-1 (IL-1) ve interleukin-8 (IL-8) hipoksi esnasında artar ve reperfüzyon sırasında oluşan nötrofil'e bağımlı hasarın düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (48-54).

Akciğer iskemi-reperfüzyon hasarı, klinik olarak akciğer nakillerinden sonra, pulmoner tromboendarrektomi, kollabe akciğerin reekspansiyonunu ve akciğer embolisi sonrası fibrinolizisi takiben ortaya çıkar. Artmış mikrovasküler geçirgenliğe bağlı ödem, artmış pulmoner vasküler rezistans ve gas değişiminin bozulması ile karakterizedir. Akciğer nakillerinden sonra %10 civarında rastlanan bir hadisedir. Çoğunlukla mortal olarak seyreder. Akciğer grafilerinde bilateral yaygın infiltrasyonlarla kendini gösterir ve harabiyetin ciddiyetine göre infiltrasyon kendini belli eder (1).

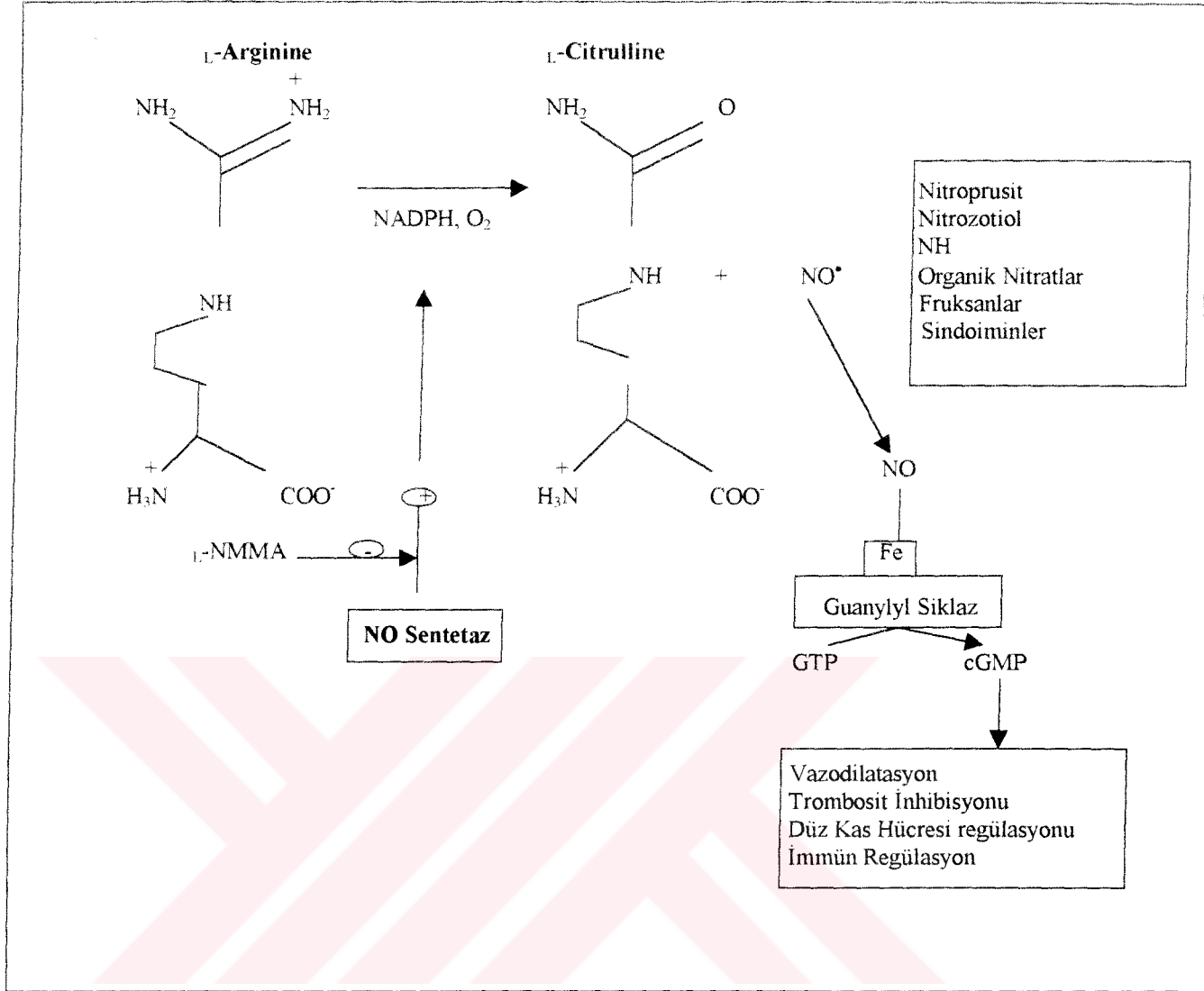
Akciğerin iskemi reperfüzyon hasarı konusunda yayınlanmış binlerce çalışma vardır ve konu en ince ayrıntılarına kadar incelenmiş olmasına rağmen, hala bu karışık patofizyolojik mekanizmanın bir çok yönü aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla, tekil etkenler üzerine odaklanılmış ve klinik kullanımı olmayan, pahalı bir çok madde bulunmuştur. Şu anda yukarıda özetlenen mekanizmanın bir çok evrelerini durduran tek ajan, inhalasyon yoluyla uygulanan NO'dur (42-43).

NİTRİK OKSİT VE AKCIĞERDEKİ ROLÜ:

1987 yılında Moncada ve arkadaşlarının Nature dergisine gönderdikleri yazı ile daha önceden endotelium-derived relaxing factor (EDRF) olarak bilinen maddenin aslında NO olduğunu ortaya koymuşlardır (55). Bu aşamadan sonra yaklaşık 12 yıl içinde 20000'e yakın çalışma yapılmıştır (44).

Nitrik Oksitin Sentezi ve Atılımı

NO, L-Arginine adlı amino asitten sentezlenir ve vücudun bir çok hücresi bu molekülü sentezleme yeteneğine sahiptir. NO özellikle endotel hücrelerinden, epitelyal hücrelerden, makrofajlardan, düz kas hücrelerinden ve sinir hücrelerinden yüksek miktarlarda salgılanır. NO, kardiyopulmoner fizyolojinin düzenlenmesi ve dengesinde, damar içi ve havayolu basınçlarının düzenlenmesinde ve sinir hücrelerinde nörotransmitter olarak gereklidir. NO'yu sentezleyen üç ayrı enzim bilinmektedir (Tablo 1). Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi L-Arginine'i substrat olarak kullanır ve kofaktör olarak nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve tetrahydrobiopterin'e ihtiyaç duyar. Fosforilasyon reaksiyonunun enzimin fonksiyonunu etkilediği belirtilmiştir. NOS enziminin bilinen ve deneysel kullanımı olan iki inhibitörü mevcuttur. Bunlardan L-N^G arginine metilester (L-NAME), daha çok konstitütif NOS (cNOS) ve eNOS enzimlerini inhibe eder, L-N^G monometil arginine (L-NMMA) ise iNOS'u inhibe eder. Bu maddeler NO ve NOS ilişkisini ve fizyolojik etkilerini anlamamıza yardım eder. Mesela L-NMMA pulmoner artere enjekte edildiğinde pulmoner vasküler rezistans artmaktadır. Bu da NOS'un bazal pulmoner vasküler tonusu ve kan akımını düzenlediğini ortaya koymuştur (44,56-58).



Şekil 1. Nitrik oksit sentezi, cGMP üzerinden gösterdiği etkiler ve eksojen nitrik oksit donörleri.

Özellikleri	1.Tip	2.Tip	3.Tip
Adı	cNOS	iNOS	ENOS
Bulunduğu doku	Nöron ve epitel	Makrofajlar ve düz kas hücreleri	Endotel hücreleri
Kalsiyum Bağımlılığı	Gerekli	Gereksiz	Gerekli

Tablo 1: Nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin tipleri ve bulunduğu dokular

NO vücutta çok kolay inaktive olan bir maddedir. Heme grubu ve süperoksit iyonları ile çok çabuk reaksiyona girer. Özellikle süperoksit iyonu ile reaksiyona girdiğinde peroksinitrit olarak bilinen çok toksik bir maddeye dönüşür ve ikincil doku hasarına sebebiyet verir. Glutasyon da NO ile fizyolojik ortamda reaksiyona girerek S-nitrozoglutasyon'u oluşturur ve bu madde bir NO taşıyıcısı olarak görev yapar.

NO etkisini, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden ortaya çıkarır. Endotelde, kalsiyum ile aktive olan NOS, NO sentezini yapar. NO, sitozolik guanilat siklaz enzimi üzerinden guanozin trifosfat'ın (GTP) cGMP'ye çevrilmesini sağlar ve daha sonra bilinmeyen bir mekanizma ile düz kas hücrelerinde relaksasyon oluşturur (Şekil 1) (44,56,57).

Nitrik Oksitin Akciğer Üzerine Etkileri

NO bilinen dengeleyici etkilerinden dolayı akciğerlerde de çok önemli etkilere sahiptir. Havayollarını çevreleyen düz kas hücrelerinde relaksasyona neden olduğu in vitro çalışmalarda görülmüştür. Yine hem insanda hem de hayvanlarda periferik havayolu direncini düşürdüğü gösterilmiştir. NO'nun hava yolu sinir iletiminde bir nörotransmitter olarak önemli görevleri olduğu gösterilmiştir. Guinea piglerde vazoaaktif intestinal peptid (VIP) aracılığıyla veya non-vazoaaktif intestinal peptid aracılığıyla, non-adrenerjik ve non-kolinergik (NANC) bronkodilatasyonda önemli olduğu gösterilmiştir. Transplant yapılan kistik fibroz hastalarında, akciğerlerde sinir innervasyonu ortadan kalktığı için NO bağımlı NANC havayolu cevaplarında belirgin bir azalma görülmüştür (57).

NO'nun en önemli etkisi pulmoner vasküler tonus üzerinedir. Hem arteriyel hem de venöz taraftaki endotel hücreleri NO sentezleyebilme yeteneğine sahiptirler ve asetilkolin veya bradikinin gibi düz kas hücrelerini gevşeten maddelerle uyarıldıklarında NO sentezlerler. NO, katekolaminlerle veya prostaglandin F2a ile arttırılan pulmoner vasküler kasılmayı ve hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonu engeller. Bunların sonucu olarak pulmoner vasküler rezistansı düşürür. NO ayrıca damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını engeller ve bu da NO metabolizmasının bozulması durumunda pulmoner hipertansiyona sebebiyet verir (44-57).

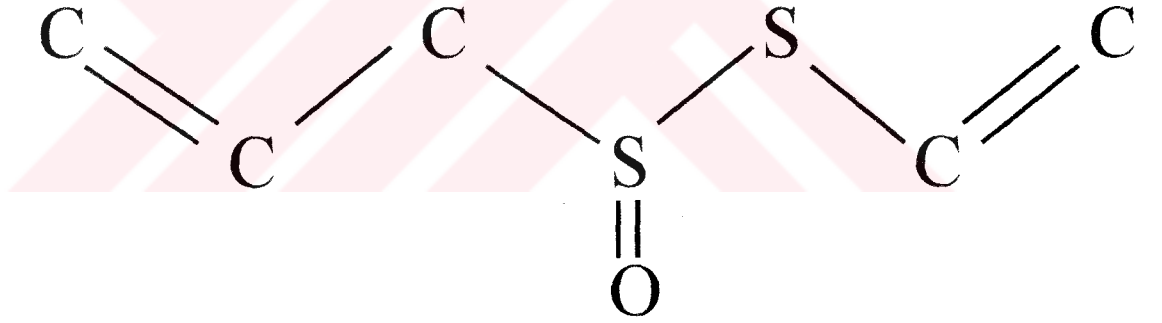
Nitrik Oksitin İmmün Cevap Üzerine Etkileri

NO hem akut hem de kronik doku inflamasyonu üzerinde önemli rollere sahiptir. Özellikle erken dönem doku hasarında endotel-lökosit ilişkisini düzenler. NO üretimi inhibe edildiğinde, lökositlerin P-selektin indüksiyonu ile CD11/CD18 kompleksi üzerinden endotele yapışmaları kolaylaşır. L-NMMA bu hadiselerin oluşmasını hızlandırmıştır. Yine kedilerde mesenterik sirkülasyona enjekte edilen L-NAME çok ani olarak mikrovasküler geçirgenlikte artmaya, protein ve sıvıların dokuya çıkmasına sebebiyet vermiştir. NO'nun inhibisyonu sadece bu sonuçlarla kalmaz ve ayrıca mast hücrelerinin degranülasyonuna da sebebiyet verir (44).

Kronik inflamasyonda ise NO immün cevap düzenleyicisi olarak görev yapar. Düşük miktarlarda NO üretimi maksimal hücre çoğalması için gereklidir, fakat özellikle makrofajlarda iNOS aktivasyonu azalmış lenfosit proliferasyonu ile kendini gösterir. Eğer çok miktarlarda NO üretilirse, alloantijen ile uyarılmış T hücreleri ve antijen-sunucu hücrelerin çoğalması tamamen engellenebilir, bu ise transplant sonrası rejeksiyon ve inflamasyonu ortadan kaldırır (56,57,59).

ALLICIN (thio-2-propene-1-sulfinic acid S-allyl ester)

Allicin sarmısaktan elde edilen iki adet sülfür ve oksijen atomları ihtiva eden bir bileşiktir (Şekil 2). Sarmısak dişlerinin kırılması sonucunda, sarmısak kabuğunda aktive olan alliinase enzimi, Alliin'i Allicin'e çevirir. Yapısındaki sülfür atomları yüzünden keskin bir kokuya sahiptir ve sarmısaka karakteristik kokusunu verir. Orta derecede stabil bir maddedir, oda havasında 24 saat, 4°C'da bir hafta ve -70°C'da iki yıla kadar saflığını korumaktadır (60-62). Bu nedenle ticari olarak üretilmemektedir, fakat 1998'de İsrail'den bir grup yarı sentetik ve daha stabil Allicin'i sentezlemişler ve patent için başvurmuşlardır.



Şekil 2: Allicin'in kimyasal formülü, Ortadaki sülfür atomuna bağlı olan oksijen çok reaktiftir. Allicin'in etkilerinin arkasında sülfür atomlarına sahip olması ve kolaylıkla disülfid bağları oluşturması yatmaktadır.

Allicin'in Sentezi ve Fizyolojik Reaksiyonları:

Allicin'in sentezi ile ilgili bir çok yayın vardır, bunlardan en klasik olanında Allicin ticari olarak bulunabilen Diallyldisülfid maddesinin hidrojen peroksit vasıtasıyla oksidasyonu sonucu sentezlenir ve saflığı high performance liquid chromatography (HPLC) ile belirlenir (6).

Allicin, alliinase enzimi kullanılarak direkt olarak sarmısaktan elde edilebilir, fakat yine saflığının HPLC ile belirlenmesi gerekmektedir. Halihazırda ticari olarak, bitkisel ilaçlar satan aktarlarda ve eczanelerde bulunan sarmısak haplarında belirli bir miktarda Allicin mevcuttur ve prospeküslerinde bu miktar belirtilmektedir, fakat bu tabletlerin suda veya başka bir ortamda çözünmesi sonucu ne kadar Allicin verebilecekleri meçhuldür. Allicin ethanol ve distile suda çözünür. Vücutta kana karıştıktan sonra kısa bir zamanda inaktive olur ve diallyl sülfid'e dönüşür (60, 61).

Allicin'in In Vitro Etkileri:

Allicin üzerine yapılmış elliden fazla çalışma vardır ve ikisi hariç diğerleri in vitro çalışmalardır. Bu in vitro çalışmalarda Allicin'in değişik etkileri tesbit edilmiştir. Önemli anti-oksidan etkisi olduğu ve eksojen olarak üretilen OH iyonlarını etkisiz hale getirebildiği gösterilmiştir (7). Ayrıca dozla direkt orantılı olarak, arakidonik asit, U46619 ve ADP ile uyarılmış trombosit agregasyonuna engel olduğu ve bu etkisini cAMP üzerinden yapmadığı belirlenmiştir. Yine A-23187 ile uyarılmış insan nötrofillerinde lizozomal enzim boşaltımına engel olmuştur (6,9). Yukarıda belirtilen etkiler Allicin'in anti-oksidan, anti-aggregan ve anti-inflammatuar etkilerine bir göstergedir. Yine bakterilerin asetil koenzim-A sentetaz enzimini inhibe ederek, bakterilerin üremesine engel olduğu da tesbit edilmiştir (62). Yapılan çalışmalarda kalsiyum metabolizması üzerinden etki ederek tavşanlarda intraoküler basıncı

düşürdüğü gösterilmiştir (63). Bütün bunların haricinde Allicin adenokarsinom hücre serisinde anti-mutajenik etkiye sahiptir (64). Sarmısak ile ilgili yapılan araştırmalarda sarmısak ekstralarının bir çok tümör hücreleri üzerine büyümelerini engelleyici etkilerinin olduğu ortaya konmuştur, bu etkilerin Allicin vasıtasıyla olma ihtimali yüksektir.

Yine yakın zamanda yapılan iki çalışmada Allicin izole pulmoner arter kesitlerinde fenilefrin ile oluşturulan kasılmayı geri çevirmiş ve bu etkisini bilinmeyen bir mekanizma üzerinden yapmıştır. L-NAME maddesi ile NOS inhibisyonu sağlandığında Allicin'in etkisinin sadece %40'ı inhibe edilebilmiştir (65). Bir diğer önemli çalışma ise Allicin ve Ajoene (Sarmısaktan elde edilen diğer etkili madde) adlı maddelerin lipopolisakkaridler ile uyarılmış makrofajlarda iNOS aktivitesini inhibe ettiklerini ve bu etkilerini iNOS protein ve mRNA sentezini inhibe ederek gösterdiklerini ortaya koymuştur (66).

Allicin'in In Vivo Etkileri:

Allicin ile ilgili yapılmış iki adet in vivo çalışma vardır. Allicin kedilerde mezenterik vasküler yatakta vazodilatasyon yapmıştır ve bu etkisi β -adrenoseptör aktivasyonu veya sikloksijenaz ürünleri üzerinden değildir. Yine kedilerde lobar artere yapılan enjeksiyonlarda Allicin doz orantılı olarak arter basınçlarında düşmeye sebebiyet vermiştir. Sıçanlarda ise ventilatuar hipoksiye bağlı olarak gelişen pulmoner vazokonstriktör cevapta anlamlı olarak düşmeler görülmüştür (8).

1997 yılında yapmış olduğumuz çalışmada ise sıçanda akciğer iskemi-reperfüzyonu modelinde Allicin enjeksiyondan sonra pulmoner vasküler rezistansta anlamlı düşme görülmüştür. İki saatlik reperfüzyon zamanı sonunda hem pulmoner arter kan akımı hem de sağkalım olarak Allicin gruplarında kontrol grubuna oranla önemli farklar elde edilmiştir (67).

Allicin'in Etki Mekanizması:

Allicin'in etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat yapısındaki sülfür grupları dolayısıyla sülfür içeren bütün enzimlerle reaksiyona girmektedir. Vücudumuzdaki bir çok proteaz grubu enzimler sülfür bulundurmaktadır. Ayrıca glutasyon mekanizması sülfür gruplarının oksidasyon ve redüksiyonu ile regüle olmaktadır.

Rabinkov ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Allicin'in esas olarak -SH (thiol) grubu bulunduran enzimlerle reaksiyona girdiğini ve bu enzimlerin etkilerini büyük ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Yine serbest oksijen radikalleriyle direkt olarak reaksiyona girmekte ve etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Sonuç olarak Allicin'in etkisini thiol grubu bulunan enzimlerin aktivitelerini thiol-disülfid dönüşüm reaksiyonlarıyla düzenlediğini öne sürmüşlerdir (68).

Allicin'in iddia edilen diğer etki mekanizması ise, kalsiyum metabolizması üzerindedir. Allicin'in özellikle membran proteinlerini etkileyerek trombosit ve nötrofillerdeki hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu etkileyebileceği iddia edilmiştir (6). Yine literatürde Asetil-KoA sentetaz, früktoz 1-6 bifosfataz, cAMP fosfodiesteraz ve adozin diaminaz gibi enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir. Mekanizma muhtemelen enzimlerde bulunun thiol grupları üzerinden olmuştur. Allicin sistein proteaz grubu enzimleri inhibe etmektedir ve bu enzimler özellikle miyokard, böbrek ve beyin iskemi reperfüzyon deneylerinde çok önemli role sahiptir (69,74,75).

Allicin'in vazodilatör, anti-agregatuar etkileri sikloksijenaz yolu, cAMP veya guanilat siklaz üzerinden değildir. NO inhibitörü olan L-NAME Allicin'in etkisini sadece %30-40 oranında azaltmıştır. Allicin'in iNOS inhibisyonu yaptığını gösteren çalışmada belirtildiği gibi muhtemelen Allicin, mRNA ve mitokondrial seviyede bazı

reaksiyonları inhibe ederek son ürünlerin ve proteinlerin oluşmasını engellemektedir (66).

Bütün bu öne sürülen mekanizmalar değerlendirildiğinde, Allicin'in farklı bir çok yoldan etki ettiği düşünülebilir. Yine muhtemelen Allicin'in etkisini gösterdiği daha bir çok metabolik yol da bilgimiz dışındadır.

SODYUM NİTROPRUSİT VE AKCİĞER ÜZERİNE ETKİLERİ

Sodyum nitroprusit, endotelden bağımsız güçlü bir vazodilatördür. Nitroprusit plazma ile etkileştiğinde direkt olarak NO salar. NO da daha önceden belirttiğimiz etkilerini gösterir. NO donörü olan başka maddeler de vardır. Bunlar nitroglycerin ve organic nitratlardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, akciğerlerin yıkama solüsyonuna katılan sodyum nitroprusitin akciğer iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği, pulmoner vazodilatör etki yaptığı, nötrofil sekestrasyonunu önlediği gösterilmiştir (10-12).

Ayrıca sodyum nitroprusitin trombosit aggregasyonunu engellediği gösterilmiştir. Dolayısıyla sodyum nitroprusit eksojen NO donörü olarak etki etmektedir. Bu çalışmada da sodyum nitroprusit santral yoldan verilerek pulmoner koruyucu etkileri araştırılmış ve Allicin ile karşılaştırılmak istenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu deney Sprague-Dawley cinsi 36 adet sıçan üzerinde yapılmıştır. Cinsiyet farkı gözetilmemiştir, ortalama ağırlık 225-300 gr arasında tutulmuştur. Sıçanlara sol akciğer iskemi reperfüzyon modeli uygulanmış ve 30 dakika boyunca hilusun en-blok olarak bağlanması ile hem hipoksik hemde iskemik hasar oluşturulmuştur. Daha sonra bir saatlik reperfüzyon periyodu süresince ve sonunda hemodinamik, biyokimyasal ve histolojik kriterler değerlendirilmiş ve skorlanmıştır.

Gruplar sırasıyla

- 1. Kontrol Grubu (n=6):** İskemi-reperfüzyon yapılmamış sadece gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış ve denek bir saat süresince izlenmiştir.
- 2. Kontrol + Allicin 0.1 mg Grubu (n=6):** İskemi-reperfüzyon yapılmamış sadece gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış ve 0.1 mg Allicin infüzyonu yapılmıştır. Denek bir saat süresince izlenmiştir.
- 3. İskemi-Reperfüzyon Grubu (n=6):** Gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış, sol akciğer hilusu yarım saat klempe edilmiş ve daha sonra bir saat reperfüzyon süresince denek izlenmiştir.
- 4. İskemi-reperfüzyon + Allicin 0.1 mg Grubu (n=8):** Gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış, sol akciğer hilusu yarım saat klempe edilmiş ve daha sonra bir saat reperfüzyon süresince denek izlenmiştir. Reperfüzyon sırasında 0.1 mg Allicin infüzyonu yapılmıştır.
- 5. İskemi-reperfüzyon + Allicin 0.01 mg Grubu (n=6):** Gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış, sol akciğer hilusu yarım saat klempe edilmiş ve daha sonra bir saat reperfüzyon süresince denek izlenmiştir. Reperfüzyon sırasında 0.01 mg Allicin infüzyonu yapılmıştır.

6. İskemi-reperfüzyon + Sodyum nitroprussit 1mg/kg Grubu (n=4):

Gerekli kanülasyonlar ve cerrahi işlem yapılmış, sol akciğer hilusu yarım saat klempe edilmiş ve daha sonra bir saat reperfüzyon süresince denek izlenmiştir. Reperfüzyon sırasında 1 mg/kg Sodyum Nitroprussit infüzyonu yapılmıştır.

Cerrahi Model ve Kanülasyonlar:

Sıçanlara anestezi için serum fizyolojik ile sulandırılmış 50 mg/kg Ketamine ve 5 mg/kg Xylazine karışımı intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu doz yaklaşık 45 dakika anestezi süresi tanımaktadır ve her 40 dakikada bir üçte bir doz ile anestezinin idamesi sağlanmıştır. Anestezi indüksiyonunu takiben sıçanların ön göğüs ve boyun bölgeleri traş edilmiştir. Sırt üstü yatırılan deneğin dört ekstemitesi de masa üzerine flaster ile sabitlenmiş ve boyun bölgesine vertikal bir insiyon yapılarak cilt altı yağ tabakası aralanmıştır.

Öncelikle paratrakeal ve boyun kasları arasında seyreden internal juguler ven bulunmuş ve künt diseksiyonla subklavyen ven ile birleştiği yere kadar serbestleştirildikten sonra askıya alınmıştır. Venin distal tarafı bağlanmış, proksimal tarafına ise traksiyon uygulanarak ven segmentinin ekspozisyonu sağlanmıştır. Venotomiye takiben ucuna enjektör iğnesi bağlı olan P50 plastik kateter damar içerisine sokulmuştur. Proksimal askı gevşetilerek kateter vena cavaya kadar itilmiş ve daha önceden hazırlanmış olan heparinli serum fizyolojik (2500 IU heparin/100 cc SF) ile kateter yıkanmıştır. Yıkama esnasında verilen maksimum sıvı miktarı 0.2-0.3 cc civarındadır. Daha sonra kateter sabitlenerek bir kenara konulmuş ve paratrakeal kaslar açılmıştır. Paratrakeal ve paravertebral kasların lateralinde derinde seyreden sol common karotid arter bulunarak ince künt diseksiyonla etrafındaki vagus liflerinden ayrılmış, yaklaşık 1-1.2 cmlik bir bölümü serbestleştirilmiştir. Arterin distali

bağlanmış ve proksimaline ise hem askı dikişi geçilmiş, hem de atravmatik vasküler klemp yerleştirilmiştir. Arteriyotomiye takiben P50 plastik kateter damar içerisine sokularak, tesbit dikişleri bağlanmış ve klemp açılarak arteriyel kan pulsasyonu gözlenmiştir. Kateter heparinli SF ile yıkanmış ve daha sonra bir basınç transduseri ile poligrafa (Grass Instruments Inc. Quincy, MA) bağlanarak arteriyel kan basıncı kaydedilmeye başlanmıştır.

Arteriyel ve venöz kateterizasyonları takiben trakea ekspoze edilerek dönülmüş ve dördüncü beşinci kıkırdaklar arasına horizontal bir trakeotomi yapılmıştır. Daha sonra 14 gauge kanül trakeaya yerleştirilmiş ve denek solunum pompasına bağlanmıştır. Kanüllerin hepsi flaster ile deneğin kafasına sarılmak suretiyle tesbit edilmiştir. Solunum pompası 10 ml/kg tidal volüm ve dakikada 100 kez ventile edecek şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca ekshalasyon tüpü bir beher içindeki distile suya 2 cm batırılmış ve 2 cm su basıncı pozitif end ekspiratuar basınç (PEEP) uygulanmıştır.

Trakeal kanülasyon ile kateterizasyonlar bitirilmiştir. Denek sırt üstü pozisyonda yatarken cerrahi işleme geçilmiş ve toraks ortasından başlayarak iki yarımaya şeklinde bilateral anterior torakal insizyonlar (clamshell insizyonu) yapılmıştır. Bu insizyon ortada sternum üzerinde birleştirilmiştir. Toraks üzerini kaplayan süperior cilt flebi diseke edilip kaldırılarak devrilmiş ve her iki hemitoraks kasları anteriordan ekspoze edilmiştir. Önce pektoral kasların sternal birleşim yerleri kesilmiştir ve ardından Latissimus kasları kesilerek tüm anterior toraks ve kotlar ortaya konulmuştur. Her iki tarafta da kotlara yapışan serratus kasları kesilmiş ve diğer kaslarla birlikte süperiora doğru ekarte edilmişlerdir. Kostaların ekspozyonundan sonra 4. İnterkostal aralık belirlenerek bilateral anterior torakotomi yapılmıştır. Toraksa girerken plevra çok nazik bir şekilde açılmış ve akciğerlere bir zarar gelmemesi için azami dikkat sarfedilmiştir. Daha sonra sternuma doğru internal

torasik arterler korunacak şekilde diseksiyonlar yapılmış ve belirtilen damar yapıları sternum ile birlikte gros olarak bağlanarak sternum horizontal bir şekilde kesilmiştir. Sternumun iki ucunu bağlayan ipler kesilmemiş ve traksiyon uygulanarak toraks kavitesi, akciğerler ve kalp geniş bir şekilde ekspozе edilmiştir. Perikard açıldıktan sonra timus bezi diseke edilip pulmoner arter ve aorta ortaya konmuştur. Önce her iki akciğer pulmoner ligamanları künt diseksiyon ile ayrılarak hilus etrafından 0 no ipek askı dikişi geçirilmiştir. Daha sonra ana pulmoner arter etrafındaki dokulardan ve aortadan iyice serbestleştirilmiştir. Bu serbestleştirme sırasında hemodinamik parametrelere özen gösterilmiştir. Ana pulmoner arter ucu eğri bir vasküler penset ile döndürüldükten sonra serbestleştirme yeterli ise, deneğin hemodinamik açıdan bir süre stabilleşmesi beklenmiştir. Daha sonra toplam 0.2 cc olacak şekilde 100 IU/kg heparin juguler ven kanülünden yapılmış ve beş dakika heparinin etkisinin sistemik olarak yayılması beklenmiştir.

Buraya kadar anlatılan cerrahi aşamalar bütün deneklerde uygulanmıştır. Fakat kontrol gruplarında bu aşamadan sonra sadece pulmoner arter etrafına kan akımı ölçen prob (2 SB, Transonics Inc. Ithaca, NY) yerleştirilmiş ve akımölçerde (T106, Transonics Inc. Ithaca, NY) dakikada pulmoner arterden geçen kan miktarı ml/dk olarak ölçülmüştür. Ayrıca aynı esnada sistemik kan basıncı da kaydedilmiştir.

Denekte sol hilusun etrafından geçen ip akciğer ekspiryumu tamamlandığı sırada bağlanmış ve yarım saat süreyle sol akciğer hem iskemi hem de hipoksiye maruz bırakılmıştır. Akciğer sıcak serum fizyolojik ile iskemi süresince ıslatılmış ve ventilatör ayarlarında tidal volüm %60 oranında düşürülmüştür. 30 dakikanın sonunda hilustaki bağ açılmış ve bütün yapıların geçirgenliği kontrol edildikten sonra her iki akciğerin de ventile ve perfüze olması sağlanmıştır. Bu arada ventilatör tekrar normale getirilmiştir. Denek hemodinamik olarak stabil olduktan sonra (genellikle beş

dakika içerisinde) sağ hilus etrafındaki ip bağlanmış ve tidal volüm %50'ye düşülerek sadece iskemik sol akciğerin fonksiyonuna bırakılmıştır. Bu sırada gruplara bir miktar bolus serum fizyolojik, Allicin veya Sodyum nitroprussit enjeksiyonları yapılmış ve belirtilen maddelerin infüzyonuna geçilmiştir. Reperfüzyon ve infüzyon süresi bir saat olarak belirlenmiş ve bu sürenin sonunda sol ventrikülden heparinli enjektöre arteryel kan gazı analizi için kan alınmıştır. Eğer deneğin hemodinamik durumundaki bozulma, bir saatlik reperfüzyon periyodunu tamamlayamadan deneğin öleceğini gösteriyorsa, kan gazı alma kriterimiz pulmoner arter kan akımının 5 ml/dk'nın altına düşmesi olmuştur. Arteryel kan gazı alınmasını takiben sol hilusa klemp yerleştirilmiş ve akciğer kesilerek çıkarılmıştır. Dışarıya çıkarılan akciğer distile su ile yıkandıktan sonra iki parçaya bölünmüştür. Bu parçalardan birisi miyeloperoksidaz analizi için hemen -80°C'lık dondurucuya konulmuş, diğer parça ise %10'luk dengeli formol solüsyonuna konularak histolojik inceleme için ayrılmıştır. Bu işlemleri takiben intravenöz yüksek doz anestezi ajan verilerek ötenazi sağlanmıştır.

Ölçümler aşağıdaki safhalarda alınmıştır:

Birinci bazal ölçümler - Kanülasyonlar ve cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra iskemiye veya herhangi bir madde infüzyonuna başlamadan önce. Bütün gruplar için aynı zaman diliminde alınmıştır.

İkinci bazal ölçümler - İskemi gruplarında, iskemi yapıldıktan sonra sol hilustaki bağ açılır ve hayvanın bir iki dakika süreyle stabil olması beklenir, ardından ölçümler yapılır. İskemi gruplarında bu ölçüm alınmıştır. Kontrol gruplarında ise bu ölçümler birinci bazal ölçümlerden on dakika sonra, heparinizasyonu takiben alınmıştır.

Sağ Pulmoner Hilus Ligasyonu - İskemi sonrası denek sadece sol iskemik akciğerin fonksiyonuna terkedilmektedir. Bu aşamada sağ hilus bağlanmış ve denek

stabil olduktan sonra bu ölçümler alınmıştır. Kontrol gruplarında ise bu ölçümler ikinci bazal ölçümlerden 5 dakika sonra yapılmıştır.

Allicin İnfüzyonu - Sağ akciğer hilusunun klemplenmesini takiben, sol akciğerde oluşabilecek iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla, ilgili gruplarda Allicin ve Sodyum nitroprusit infüzyonu yapılmıştır. Bu infüzyona mukabil kontrol grubu ve sadece iskemi-reperfüzyon grubunda serum fizyolojik infüzyonu yapılmıştır. Toplam dozun yarısı bolus olarak ve 0.1 cc'ye denk gelecek şekilde verilmiştir. Kontrol gruplarında ise sağ pulmoner hilus ligasyonu yapılmamış olmasına rağmen belirtilen sıvı enjeksiyonları yapılmış ve ölçümler alınmıştır.

15. Dakika - Reperfüzyonun 15. dakikasında belirtilen bütün ölçümler yeniden alınmıştır. Kontrol gruplarında da bolus sıvı infüzyonunu takip eden 15. dakikada ölçümler alınmıştır. Reperfüzyon sırasında bolus doza ek olarak toplam 0.1 cc'ye denk gelecek şekilde infüzyon yapılmıştır.

30. Dakika - Reperfüzyonun 30. dakikasında belirtilen bütün ölçümler yeniden alınmıştır. Kontrol gruplarında da bolus sıvı infüzyonunu takip eden 30. dakikada ölçümler alınmıştır.

45. Dakika - Reperfüzyonun 45. dakikasında belirtilen bütün ölçümler yeniden alınmıştır. Kontrol gruplarında da bolus sıvı infüzyonunu takip eden 45. dakikada ölçümler alınmıştır.

60. Dakika - Reperfüzyonun 60. dakikasında belirtilen bütün ölçümler yeniden alınmıştır. Kontrol gruplarında da bolus sıvı infüzyonunu takip eden 60. dakikada ölçümler alınmıştır.

Miyeloperoksidaz Analizi

Miyeloperoksidaz (MPO) düzeylerine daha önce tarif edilen yöntemler kullanılarak bakıldı (70). Doku örnekleri tartılıp 20 mM K₂HPO₄ (pH=7.4)

çözeltisinde 10 kez sulandırıldıktan sonra homojenize edildi. Daha sonra homojenat 4°C'de 12000 devir/dakika, 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra yukarıda kalan sıvı kısım atıldı, pellet eşit hacimde % 0.5 heksadesiltrimetilamonyum (HETAB) ve 10 mM EDTA içeren 50 mM K₂HPO₄ (pH=7.4) çözeltisi ile sulandırılarak tekrar homojenize edildi. MPO aktivitesi 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinin hidrojen perokside bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik olarak saptanması ile ölçüldü.

Histolojik Analiz

Çıkarılan akciğer dokuları %10'luk dengeli formol içerisine konulmuş ve parafin bloklarda takibe alınmışlardır. Daha sonra hematoxylin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopisi ile kesitler incelenmiştir. Akciğer dokuları kodlanmış ve tek bir patolog tarafından kör bir şekilde incelenmiştir.

İncelenen kriterler alveoler ve perivasküler polimorfonükleer ve mononükleer hücre infiltrasyonu, mikroskopik tromboz ve alveoler seviyede ödem olmuştur. Ayrıca genel alveoler yapının bozulması da skorlanmıştır.

Aşağıdaki skorlama sistemi kullanılmıştır:

0 - Hücre infiltrasyonu veya alveoler distorsiyon yok. Normal sayılabilecek akciğer dokusu.

1 - Minimal hücre infiltrasyonu ve alveoler yapıda minimal bozulma, bazı atelektatik ve ödematöz alanlar.

2 - Orta derecede hücre infiltrasyonu ve alveoler yapıda bozulma, atelektatik ve ödematöz alanlar, normal sahalara göre çok daha fazla.

3 - Ağır derecede hücre infiltrasyonu ve alveoler yapı tamamen bozulmuş. Yaygın ödem ile birlikte .

İstatistiksel Metod

Gruplardan elde edilen sonuçlar bir bilgisayarda ticari olarak bulunabilen bir istatistik analiz programında (Instat, Graphpad Software, Louisiana) değerlendirilmiştir.

Gruplardan elde edilen sonuçlar önce ANOVA ile , iki grup arasındaki farklılık ise Student t-test ile değerlendirilmiştir



BULGULAR

Genel Bulgular

Bu tez çalışmasında toplam 36 adet Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. Kontrol gruplarındaki bütün denekler deneyi tamamlamışlardır. İskemi-reperfüzyon ve iskemi-reperfüzyon + Sodyum Nitroprusit grubundaki bütün denekler bir saatlik reperfüzyon süresini tamamlayamadan değişik zamanlarda ölmüşlerdir. İskemi-reperfüzyon + Allicin 0.01 mg grubunda bir denek reperfüzyon periyodunu tamamlamış (%16.7), iskemi-reperfüzyon + Allicin 0.1 mg grubunda ise deneklerden altısı (%75) reperfüzyon süresini tamamlamıştır. Sadece iskemi reperfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). Kontrol gruplarıyla iskemi reperfüzyon grubu karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 2). İskemi- reperfüzyon + Allicin 0.1 mg grubu, iskemi reperfüzyon + Sodyum Nitroprusit grubu ile karşılaştırıldığında sürvi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa çok yakındır ($p=0.06$).

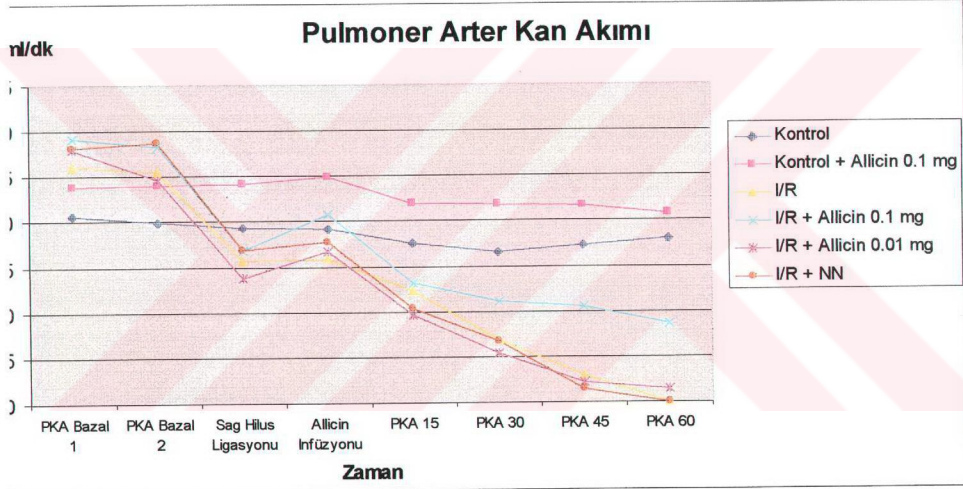
Gruplar	Sağkalım	P değeri (vs I/R grubu)
Kontrol	% 100	0.0022
Kontrol + Allicin 0.1 mg	% 100	0.0022
I/R + Allicin 0.1 mg	% 75	0.0097
I/R + Allicin 0.01 mg	% 16	AD
I/R + Sodyum Nitroprusit	% 0	AD

Tablo 2: İskemi-reperfüzyon grubuna kıyaslandığında diğer deney gruplarının p değerleri. Kontrol, Kontrol + Allicin 0.1 mg ve I/R + Allicin 0.1 mg gruplarında sürvi anlamlı derecede yüksektir. (AD: Anlamlı değil)

Pulmoner Arter Kan Akımı

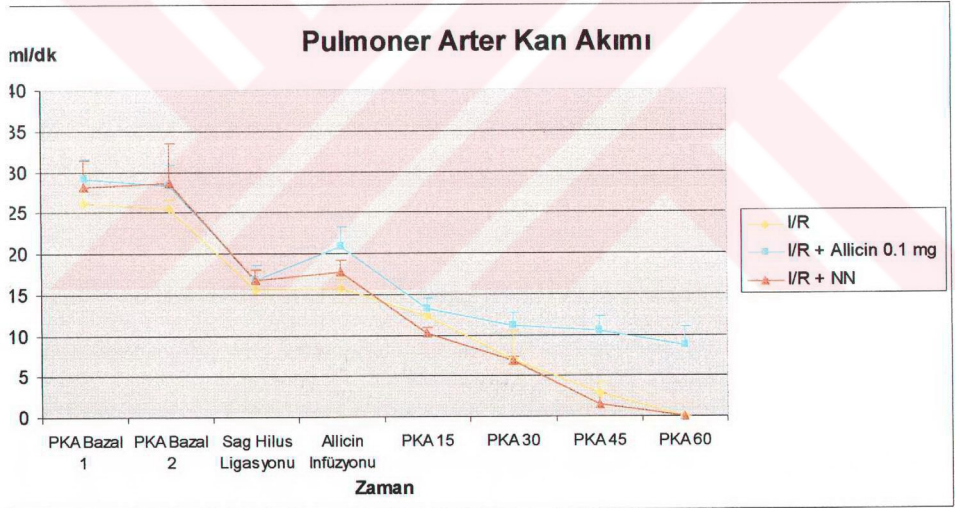
Belirtilen zaman dilimlerinde alınan ölçümler ile deney boyunca pulmoner arter kan akımı ölçülmüştür.

Bazal ölçümlerde (Bazal 1 ve Bazal 2) gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Yine sağ hilus tamamen klempe edildikten hemen sonraki ölçümlerde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (Şekil 3).



Şekil 3. Tüm grupların pulmoner arter kan akımı ölçümleri. PKA, Pulmoner arter kan akımı; I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, Sodyum Nitroprussit. (Ortalama)

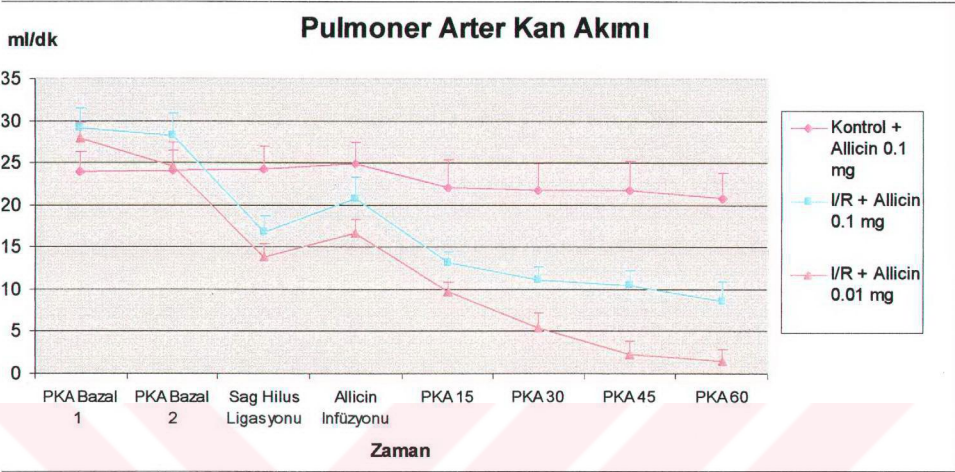
Allicin, sodyum nitroprussit veya serum fizyolojik infüzyonunu takiben yapılan ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber ANOVA testi anlamlılığa çok yakındır ($p=0.0645$). Gruplar teker teker birbirleriyle karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir. Fakat bolus Allicin enjeksiyonunu takiben yapılan ölçümler, sağ pulmoner hilusun bağlanması takip eden ölçümlere göre her iki Allicin grubunda da (I/R + Allicin 0.1 mg, I/R + Allicin 0.01 mg) anlamlı olarak artmıştır ($p<0.01$, $p<0.001$). I/R + Sodyum Nitroprussit grubunda da ilaç enjeksiyonunu takip eden ölçümler, sağ pulmoner hilusun bağlanmasından sonra alınanlara göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4-6).



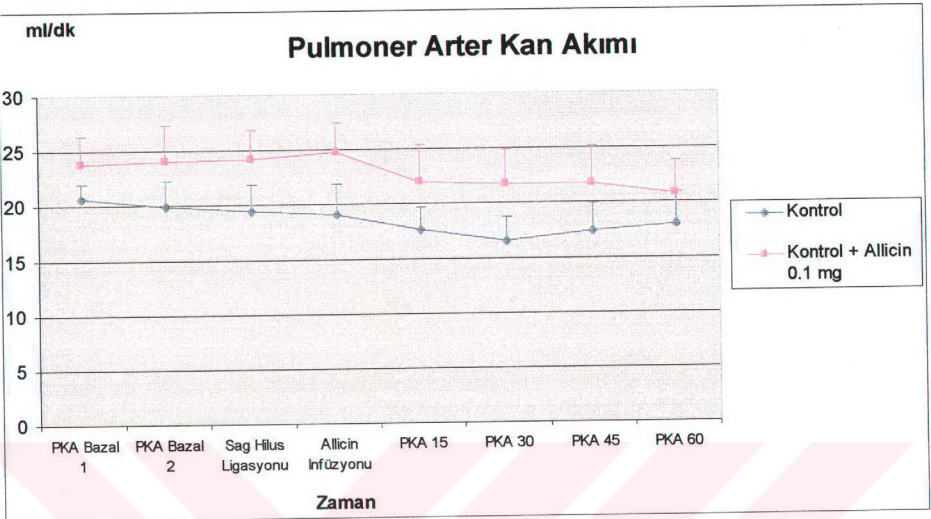
Şekil 4. I/R + Allicin 0.1 mg grubuyla I/R ve I/R + NN grupları karşılaştırılmıştır.

PKA, Pulmoner Arter Kan Akımı; I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit.

(ortalama \pm SEM)



Şekil 5. I/R + Allicin 0.1 mg grubuyla I/R + Allicin 0.01 ve Kontrol + Allicin 0.1 mg grupları karşılaştırılmıştır. PKA, Pulmoner Arter Kan Akımı; I/R, iskemi-reperfüzyon. (ortalama ± SEM)



Şekil 6. Kontrol grubuyla, Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu karşılaştırılmıştır. PKA, Pulmoner Arter Kan Akımı. (ortalama \pm SEM)

Reperfüzyonun 15.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.01$). Kontrol grubu ile I/R + sodyum nitroprussit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ($p < 0.05$), Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.1 mg ve I/R + Allicin 0.01 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). Diğer karşıştırmalarda anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 3).

Reperfüzyonun 30.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). Kontrol grubundaki kan akımı , hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha fazladır ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.1 mg ve

I/R + Allicin 0.01 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.01$, $p<0.001$). I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R + Sodyum Nitroprussit grubu karşılaştırıldığında pulmoner arter kan akımı Allicin grubunda daha fazla görünmektedir ve istatistiksel olarak anlamlılığa çok yakındır ($p=0.079$).

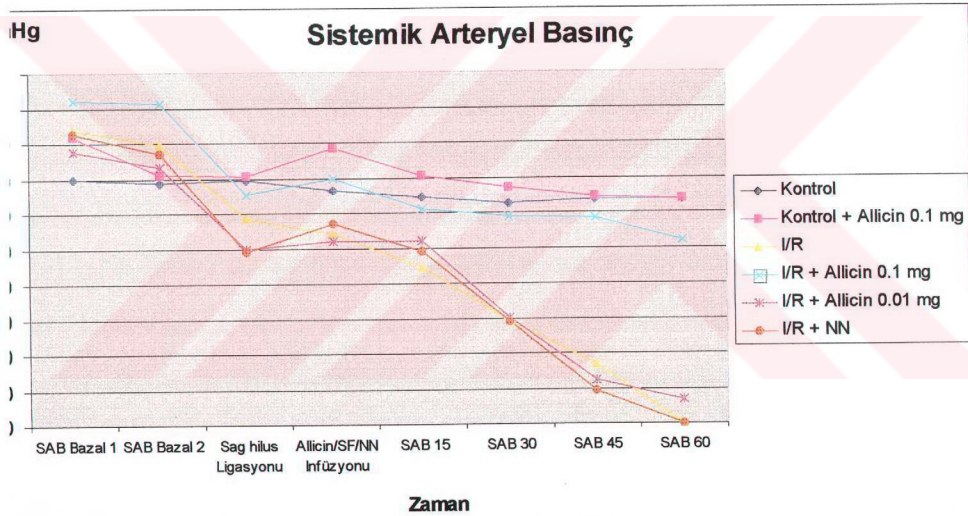
Reperfüzyonun 45.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol grubundaki kan akımı , hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha fazladır ($p<0.001$, $p<0.01$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.1 mg ve I/R + Allicin 0.01 mg grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.01$, $p<0.001$). I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit grubu karşılaştırıldığında Allicin grubundaki kan akımı her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0.01$).

Reperfüzyonun 60.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol grubundaki kan akımı , hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha fazladır ($p<0.0001$, $p<0.01$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.001$), I/R + Allicin 0.1 mg grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit grubu karşılaştırıldığında Allicin grubundaki kan akımı her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0.01$, $p<0.05$).

Sistemik Arteriyel Basınç

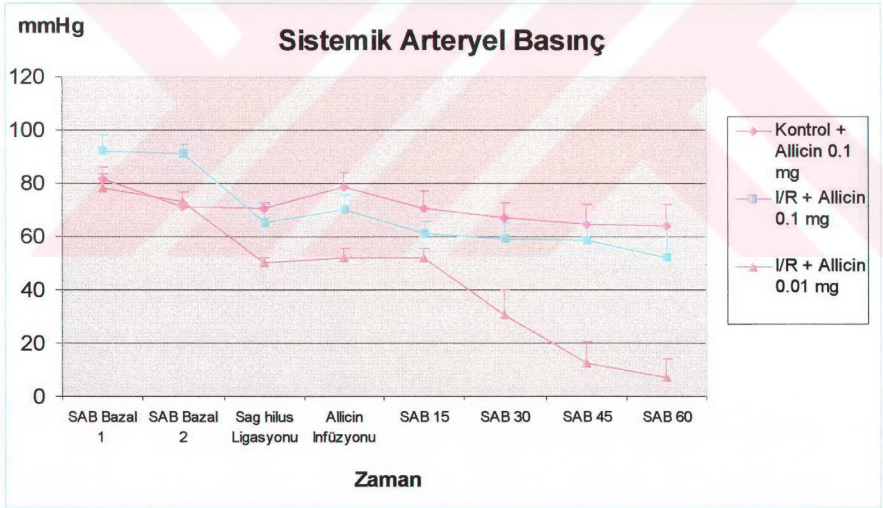
Belirtilen zaman dilimlerinde alınan ölçümler ile deney boyunca sistemik arteriyel basınç ölçülmüştür.

Bazal ölçümlerde (Bazal 1 ve Bazal 2) gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Yine sağ hilus tamamen klempe edildikten hemen sonraki ölçümlerde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 7).

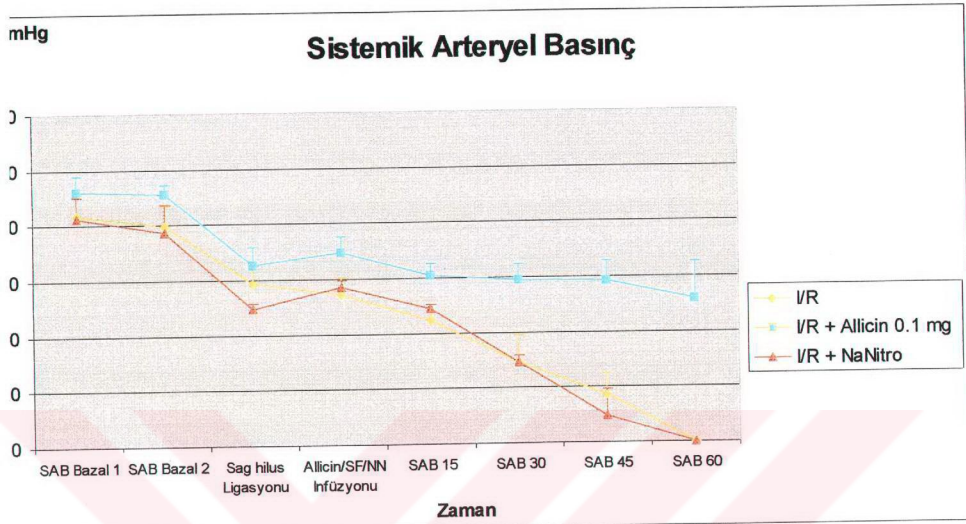


Şekil 7. Tüm grupların sistemik arteriyel basınç ölçümleri. SAB, Sistemik Arteriyel Basınç; I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit. (Ortalama)

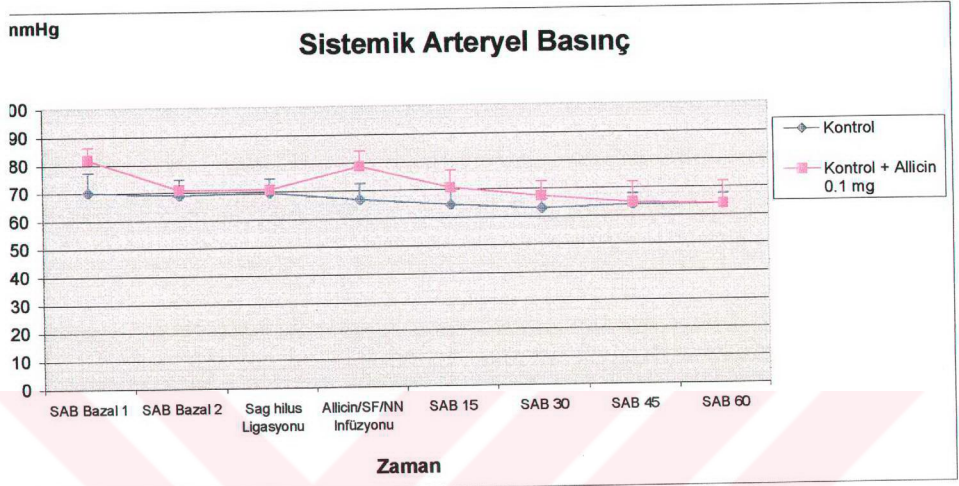
Allicin, sodyum nitroprussit veya serum fizyolojik infüzyonunu takiben yapılan ölçümlerde gruplar arasında ANOVA testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttur ($p<0.01$). Gruplar teker teker birbirleriyle karşılaştırıldıklarında Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.01$). Bolus Allicin enjeksiyonunu takiben yapılan ölçümler, sağ pulmoner hilusun bağlanması takip eden ölçümlere göre, I/R + Allicin 0.01 mg grubunda anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$); I/R + Allicin 0.1 mg grubunda ise anlamlılığa çok yakındır ($p=0.0655$). I/R + Sodyum Nitroprussit grubunda da ilaç enjeksiyonunu takip eden ölçümler, sağ pulmoner hilusun bağlanmasından sonra alınanlara göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 8-10).



Şekil 8. I/R + Allicin 0.1 mg grubuyla, I/R + Allicin 0.01 mg ve Kontrol + Allicin 0.1 mg grupları karşılaştırılmıştır. SAB, Sistemik Arteriyel Basınç; I/R, iskemi-reperfüzyon. (ortalama \pm SEM)



Şekil 9. I/R + Allicin 0.1 mg grubuyla I/R ve I/R + NN gruplarının karşılaştırılması. SAB, Sistemik Arteriyel Basınç; I/R, iskemi-reperfüzyon; SF, serum fizyolojik; NN, sodyum nitroprussit. (ortalama \pm SEM)



Şekil 10. Kontrol grubuyla, Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu karşılaştırılmıştır. SAB, Sistemik Arteriyel Basınç. (ortalama \pm SEM).

Reperfüzyonun 15.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.01$). Kontrol grubu ile I/R ve I/R + sodyum nitroprussit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Yine Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). I/R grubu ile I/R + Allicin 0.1 mg grubu karşılaştırıldığında kan basıncı allicin grubunda anlamlı olarak daha fazladır ($p < 0.05$). Diğer karşıştırmalarda anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Reperfüzyonun 30.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark görülmüştür ($p < 0.001$). Kontrol grubundaki kan basıncı, hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha

fazladır ($p<0.01$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.01$). I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit grupları karşılaştırıldığında sistemik kan basıncı Allicin grubunda daha fazla görünmektedir ve istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ($p<0.05$).

Reperfüzyonun 45.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol grubundaki kan basıncı, hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha fazladır ($p<0.001$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.001$). I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit grubu karşılaştırıldığında Allicin grubundaki kan basıncı her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ($p<0.01$).

Reperfüzyonun 60.dakikasında alınan ölçümlerde bütün gruplar arasında ANOVA testi ile çok anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol grubundaki kan akımı, hem I/R grubuna hem de I/R + Sodyum Nitroprussit grubuna göre daha fazladır ($p<0.0001$). Kontrol + Allicin 0.1 mg grubu ile I/R + Allicin 0.01 mg grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.001$), I/R + Allicin 0.1 mg grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. I/R + Allicin 0.1 mg ile I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit grubu karşılaştırıldığında Allicin grubundaki kan basıncı her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p<0.01$, $p<0.05$).

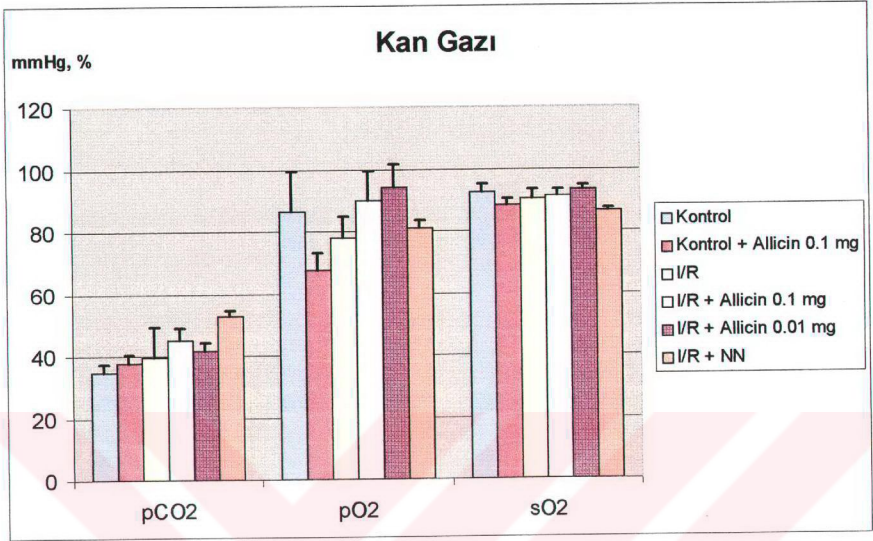
Kan Gazı Analizi

Bütün deneklerden deney sonunda arteryel kan alınmış ve incelenmiştir. Gruplar arasında parsiyel oksijen basıncı (pO_2), parsiyel karbondioksit basıncı (pCO_2) ve saturasyon karşılaştırılmıştır (sO_2) (Şekil 11).

pO_2 incelendiğinde gruplar arasında ANOVA ile istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Gruplar birbirleriyle ayrı ayrı karşılaştırıldığında I/R + Allicin 0.01 mg grubunun sonuçları Kontrol + Allicin 0.1 mg grubuna göre anlamlı derecede daha fazladır ($p<0.05$).

pCO_2 incelendiğinde gruplar arasında ANOVA ile istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Gruplar birbirleriyle ayrı ayrı karşılaştırıldığında I/R + Sodyum Nitroprussit grubunun sonuçları Kontrol ve I/R + Allicin 0.01 mg grubuna göre anlamlı derecede daha fazladır ($p<0.001$, $p<0.05$).

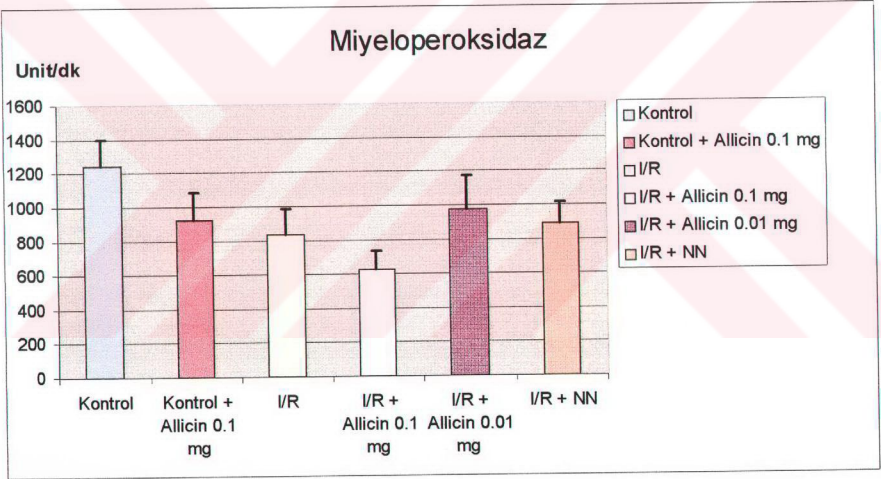
sO_2 incelendiğinde gruplar arasında ANOVA ile istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Gruplar birbirleriyle ayrı ayrı karşılaştırıldığında I/R + Sodyum Nitroprussit grubunun sonuçları I/R + Allicin 0.01 mg grubuna göre anlamlı derecede daha azdır ($p<0.01$).



Şekil 11. Tüm grupların kan gazı ölçümleri. pCO₂, parsiyel karbondioksit basıncı; pO₂, parsiyel oksijen basıncı; sO₂, kandaki oksijen saturasyonu; I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit. (ortalama ± SEM)

Miyeloperoksidaz Analizi

Miyeloperoksidaz sonuçları incelendiğinde gruplar arasında ANOVA anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubu ile I/R + Allicin 0.1 mg grubu arasında anlamlı fark mevcuttur ve Allicin grubunda MPO seviyesi daha düşüktür ($p<0.01$). Yine Kontrol grubu ile I/R grubu arasındaki fark anlamlılığa yakındır ($p=0.086$). Gruplar arasında en düşük MPO seviyesi I/R + Allicin 0.1 mg grubuna aittir. Bütün bu sonuçlar grafikte gösterilmiştir (Şekil 12).

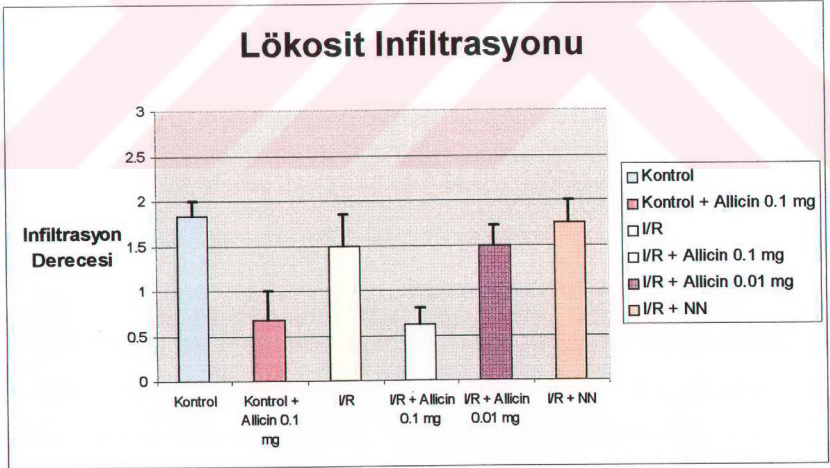


Şekil 12. Tüm grupların miyeloperoksidaz (MPO) ölçümleri gösterilmiştir. I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit. (ortalama ± SEM)

Histolojik İnceleme

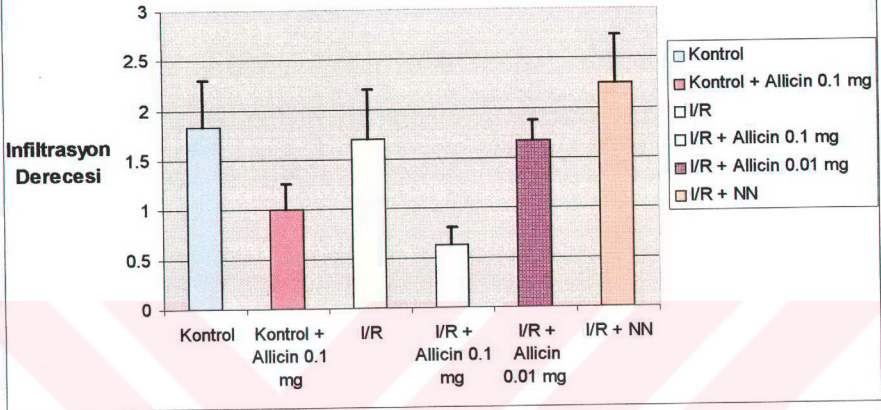
Histolojik inceleme ve karşılaştırma üç ayrı şekilde yapılmıştır. Daha önceden belirtildiği gibi grupların polimorfonükleer lökosit ve lenfosit infiltrasyonları skorlanmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca genel histolojik görünümler arasında kıyaslamalar yapılmıştır.

Polimorfonükleer infiltrasyon gruplar arasında karşılaştırıldığında ANOVA ile tüm gruplar arasında çok anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında I/R + Allicin 0.1 mg grubundaki infiltrasyonun Kontrol, I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit gruplarına göre anlamlı derecede daha az olduğu görülmüştür ($p<0.001$, $p<0.05$, $p<0.01$). Kontrol + Allicin 0.1mg grubundaki infiltrasyonun Kontrol grubundan daha az olduğu da tesbit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Tüm grupların lökosit infiltrasyon sonuçları gösterilmiştir. I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit. (ortalama ± SEM)

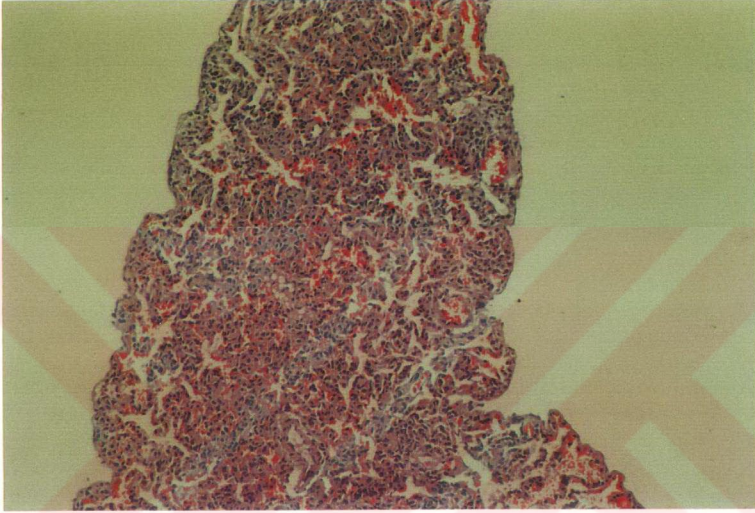
Lenfosit İnfiltrasyonu



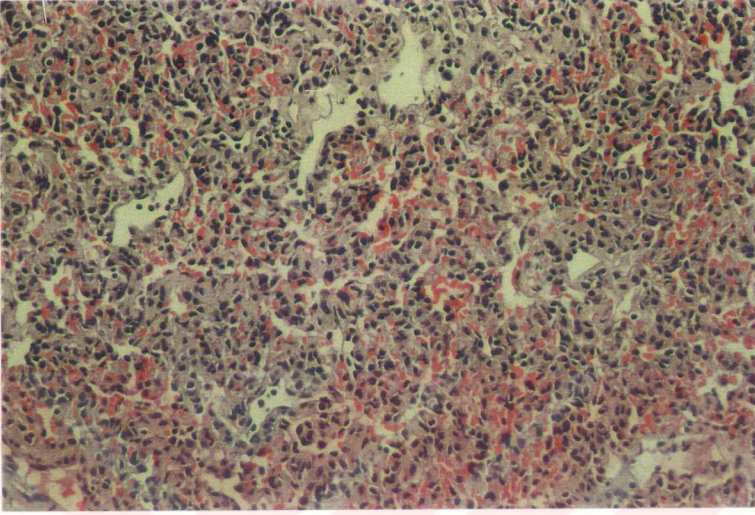
Şekil 14. Tüm grupların lenfosit infiltrasyonu sonuçları gösterilmiştir. I/R, iskemi-reperfüzyon; NN, sodyum nitroprussit. (ortalama ± SEM)

Lenfosit infiltrasyonu gruplar arasında karşılaştırıldığında ANOVA ile tüm gruplar arasında anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında I/R + Allicin 0.1 mg grubundaki infiltrasyonun Kontrol, I/R ve I/R + Sodyum Nitroprussit gruplarına göre anlamlı derecede daha az olduğu tesbit edilmiştir ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Yukarıdaki sonuçlar Şekil 14'de gösterilmiştir.

Histolojik olarak gruplar ayrı ayrı incelendiğinde kontrol grubunda yaygın perivasküler ve alveoler infiltrasyon dikkat çekmiştir. Hem polimorfonükleer, hem de mononükleer infiltrasyon yoğun olarak mevcuttur ve alveoler yapı önemli derecede bozulmuştur (Resim 1-2).



Resim 1. Akciğerde yaygın inflamasyon ve infiltrasyon (100X).

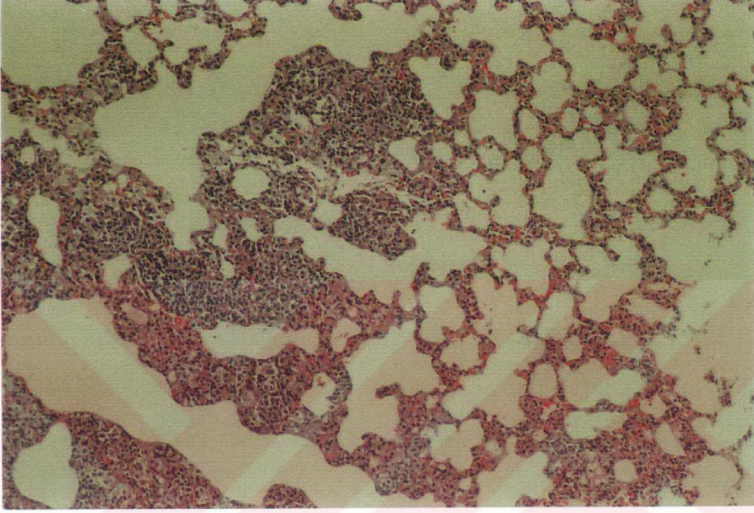


Resim 2. Akciğerde yaygın inflammasyon ve infiltrasyon (200X).

Kontrol + Allicin 0.1 mg grubunda ise kontrol grubuna göre infiltrasyonlar daha sınırlıdır. Yine yaygın perivasküler ve alveoler infiltrasyon mevcut olmakla beraber orta şiddettedir. Alveoler yapı kontrol grubuna göre nisbeten daha çok korunmuştur (Resim 3-4).

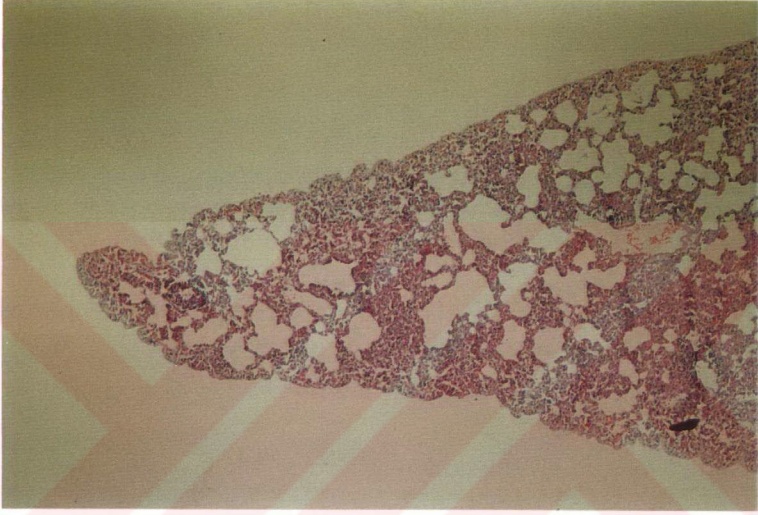


Resim 3. Akciğerde orta şiddette inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon görülüyor (40X).

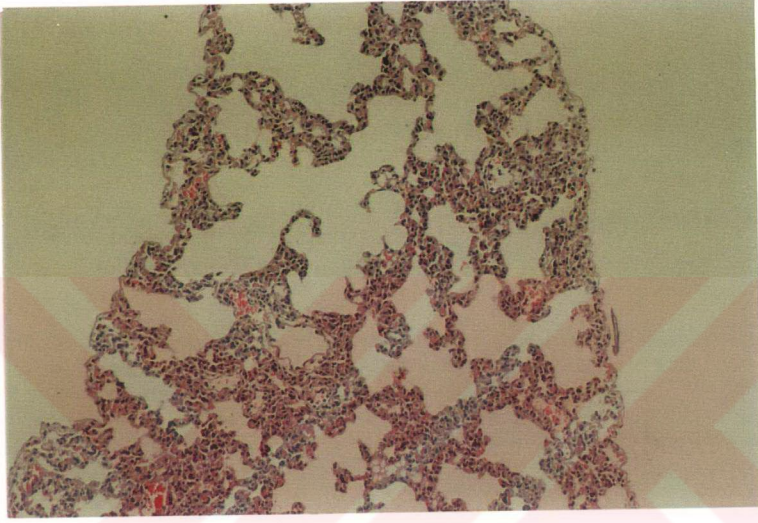


Resim 4. Akciğerde orta şiddette inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon görülüyor (100X).

I/R grubunda ise orta derecede perivasküler ve alveoler infiltrasyon dikkat çekmiştir. Hem polimorfonükleer, hem de mononükleer infiltrasyon mevcuttur ve alveoler yapıda minimal bozulma mevcuttur, bölgesel alveoler ödem ve intraalveoler hemoraji izlenmektedir (Resim 5-6).

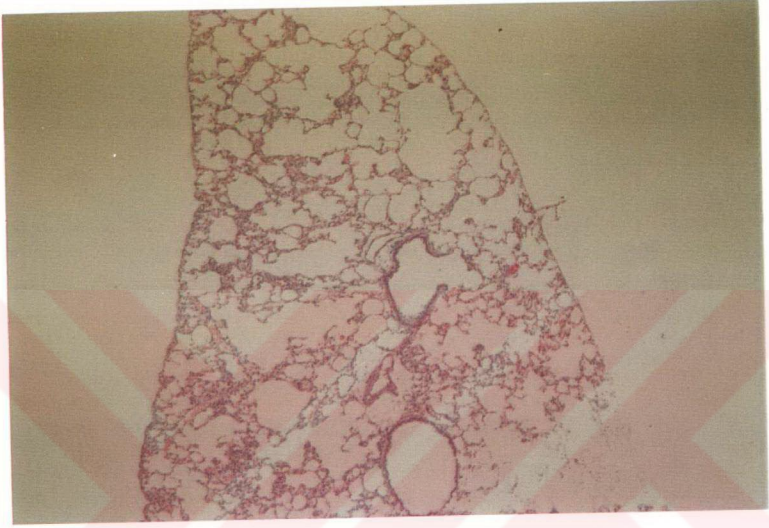


Resim 5. Akciğerde orta şiddette inflammasyon ve perivasküler infiltrasyon görülüyor (40X).

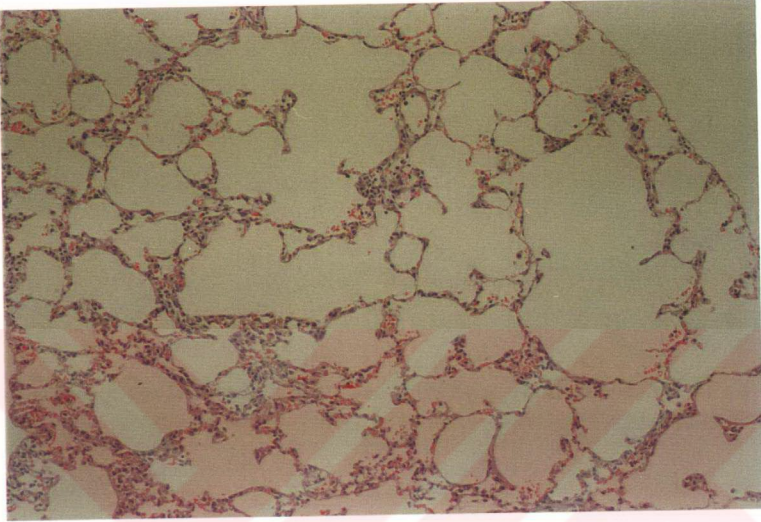


Resim 6. Akciğerde orta şiddette inflamasyon ve perivasküler infiltrasyonla beraber intraalveoler hemoraji görülüyor (100X).

I/R + Allicin 0.1 mg grubunda ise perivasküler ve alveoler infiltrasyon yok denecek kadar azdır ve alveoler yapı normale yakındır (Resim 7-8).

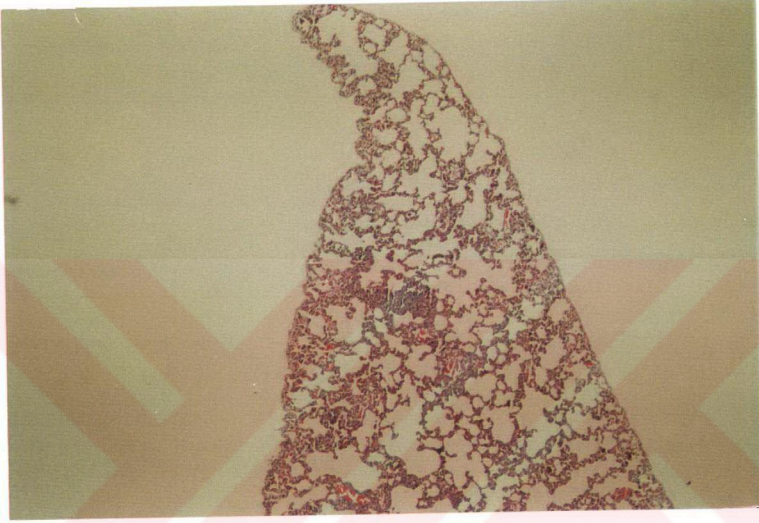


Resim 7. Akciğerler normale yakın görünümündedir. Minimal perivasküler infiltrasyon mevcuttur (40X).

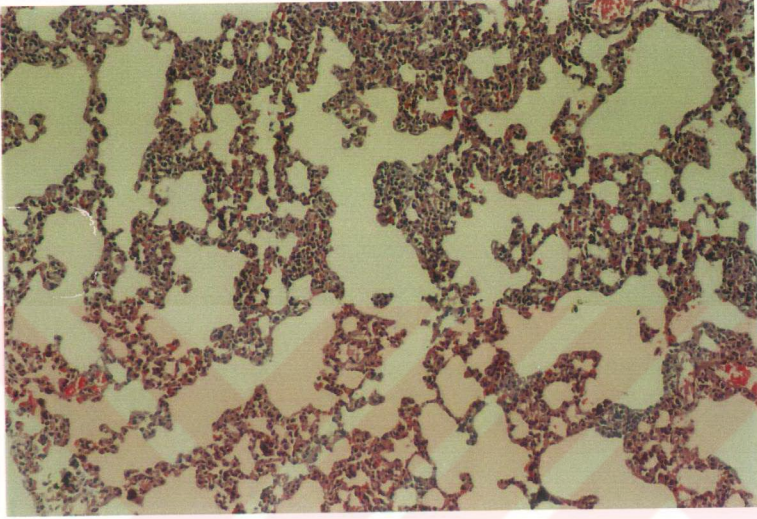


Resim 8. Akciğerler normale yakın görünümündedir. Minimal perivasküler infiltrasyon mevcuttur (100X).

I/R + Alicin 0.01 mg grubunun histolojik özellikleri I/R grubuna çok benzemektedir. Hem polimorfonükleer, hem de mononükleer infiltrasyon mevcuttur ve alveoler yapıda minimal bozulma mevcuttur (Resim 9-10).

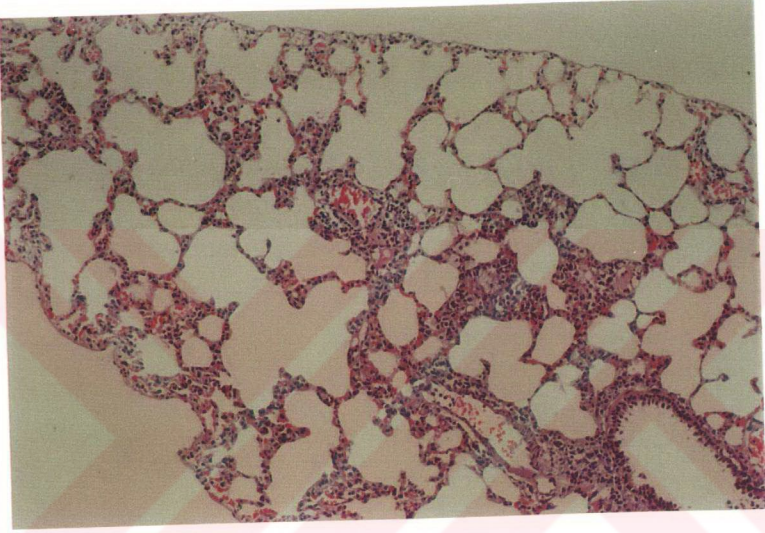


Resim 9. Akciğerlerde orta şiddette inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon mevcuttur (40X).

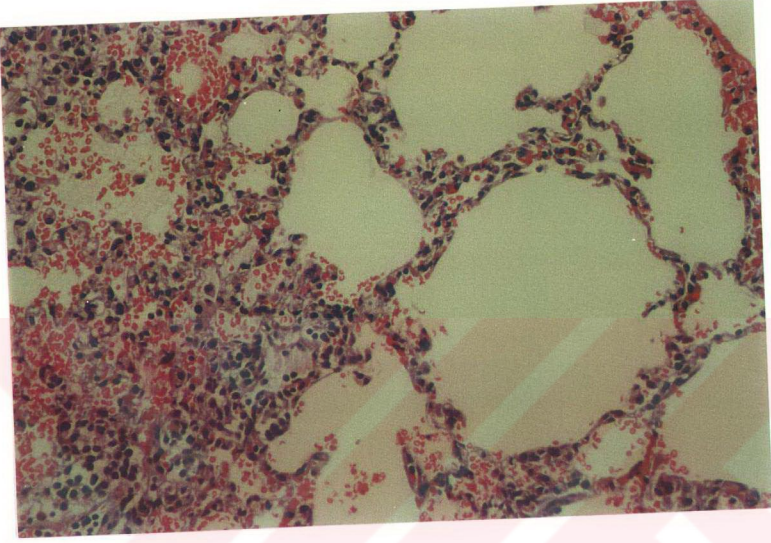


Resim 10. Akciğerlerde orta şiddette inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon mevcuttur (100X).

I/R + Sodyum Nitroprussit grubunda ise yaygın perivasküler ve alveoler infiltrasyon dikkat çekmiştir. Hem polimorfonükleer, hem de mononükleer infiltrasyon yoğun olarak mevcuttur ve alveoler yapı orta derecede bozulmuştur (Resim 11-12).



Resim 11. Akciğerlerde yaygın inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon mevcuttur (40X).



Resim 12. Akciğerlerde yaygın inflamasyon ve perivasküler infiltrasyon mevcuttur (100X).

TARTIŞMA

Akciğerde oluşan hipoksik-iskemik hasarı engelleyebilmek için değişik metod ve maddeler denenmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak bugün akciğerleri yaklaşık 6 saat süreyle vücut dışı ortamda koruyabilen solüsyonlara sahibiz. Ayrıca iskemi ve reperfüzyon sırasında oluşan hasarın mekanizması da bazı detaylarıyla açıklanmaktadır. Fakat bu konudaki bilgi düzeyi hala çok yetersizdir. Bunun en büyük nedeni hücresel bazda, reseptör ve genetik faktörlerin ve biyokimyasal ilişkilerin son derece karmaşık olmasıdır.

Günümüzde tüm dünyada, yılda ortalama 800-1000 adet akciğer nakli yapılmaktadır ve bu rakam yaklaşık 5 yıldır değişmemektedir. Bu seyri değiştirebilmek için verici havuzunun büyütülmesine çalışılmaktadır. En önemli çaba kalbi atmayan vericilerin (Non-heart Beating Donor) organlarını kullanabilmek için harcanmaktadır (24,25,70-72). Eğer bu gerçekleşebilirse yapılan nakil sayısında büyük bir artış olacaktır.

Bu çalışmada etki mekanizması itibariyle iskemi-reperfüzyon hasarındaki bir çok biyokimyasal ve hücresel yolları engellediği gösterilmiş olan Allicin'in kısa süreli hipoksik iskemik akciğer hasarını takiben reperfüzyon ve reekspansiyon sonrasındaki etkilerini araştırdık. Bu etkileri eksojen NO vericisi olan sodyum nitroprussit ile karşılaştırdık. Çalışmamızda baktığımız kriterler Allicin'in koruyucu etkilerini göstermiştir.

Pulmoner arter kan akımı, iskemi ve reperfüzyon hasarı açısından en önemli hemodinamik kriterlerdendir (14). Özellikle kapiller düzeyde endotel hasarını yansıtan ve mikrodolaşımın varlığını gösteren kriterlerden birisidir (28). Erken dönemde akciğerde görülen en önemli değişiklik eksojen olarak normal bir doku görünmekle beraber, kapiller düzeyde endotel hasarının sonucu olarak trombosit ve

lökosit aggregasyonlarının olması ve bunların kan dolaşımını durdurmasıdır. Bu aggregasyonların engellenmesi ancak pulmoner vazodilatasyon ve endotel hücrelerinde başlamış olan hipoksik aktivasyonun, yani anti-oksidan madde oluşumlarının ve artmış lökosit adezyon reseptörlerinin ve azalmış NO oluşumunun geriye döndürülebilmesiyle mümkündür. Bunun için hasarlanmış endotele dış müdahale ile destek gerekmektedir. İnhal nitrik oksit bugün ABD'de rutin olarak kullanılmaktadır ve bu amaçla yapılan çalışmalarda akciğerin iskemi reperfüzyon hasarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (41-44). Bizim çalışmamızda Allicin'in 0.1 ve 0.01 mg dozlarında erken dönemde akciğerlerde pulmoner vazodilatasyona neden olduğu pulmoner arter kan akımında oluşan ani artış ile gösterilmiştir. Aynı artışı istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber daha az etkili olmak üzere sodyum nitroprussit ile de gösterdik. Daha önceden yapmış olduğumuz çalışmada bu ani artış sırasında pulmoner vasküler rezistansda düşme olduğunu göstermiştik (67). Artmış pulmoner kan akımını hem Allicin 0.1 mg hemde 0.01 mg gruplarında belirgin olarak izlemiştik. Oysa bu çalışmamızda yararlı etkiyi sadece Allicin 0.1 mg infüzyonu uygulanan grupta daha belirgin olarak deneyin sonuna kadar izleyebildik. Bu ise daha önceki çalışmamızda uyguladığımız deneysel yöntemin bir sonucudur. Önceki çalışmamızda bir saat boyunca sadece pulmoner arter klemplenmiş ve iki saat reperfüzyon uygulanmıştır. Bu çalışmamızda ise bütün hilus klemplenmiştir. Dolayısıyla deney sırasında akciğere verilen hasar yüksek derecededir. Bu da Allicin'in 0.01 mg dozunda yetersiz kalmasına neden olmuştur.

Allicin'in etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, doğrudan oksidatif iyonlara reaksiyon yoluyla etkisi olduğu ve eNOS aktivasyonu yapabileceği, kalsiyum metabolizması üzerinden hareket edebileceğine ilişkin çalışmalar ve bilgiler vardır (6,68). I/R + Allicin 0.1 mg grubunda deneyin sonuna kadar sağkalım oranı I/R

ve I/R + Sodyum nitroprussit gruplarına göre anlamlı derecede yüksektir. Bu ise Allicin'in hemodinamik etkilerinin ne kadar güçlü olduğunu ortaya koymaktadır. Zira hem I/R, hem de I/R + sodyum nitroprussit gruplarında ölüm nedeni belirgin bir şekilde izlenen akut sağ kalp dilatasyonu olmuştur. Bunun da nedeni kapiller düzeydeki oklüzyonun sonucu olarak gelişen artmış vasküler rezistanstır. Bu bulgular histoloji ve miyeloperoksidaz incelemeleri sonuçlarıyla da desteklenmiştir.

Sistemik kan basıncında ise I/R + Allicin 0.1 mg grubu ve kontrol grupları hariç, tedrici bir düşme meydana gelmiştir. Bunun da ana nedeni bozulan sağ kalp fonksiyon ve morfolojisine sekonder, sol tarafında bundan etkilenmesi ve global bir kalp yetersizliğinin ortaya çıkmasıdır. Sistemik kan basıncının I/R + sodyum nitroprussit grubunda kalp yetmezliğine bağlı olarak düşmesine rağmen, bu düşüş ilacın direkt hipotansif etkisine bağlı olarak gerçekleşmemiştir. İlaç internal juguler ven aracılığıyla verilmiş ve artan NO ihtiyacı ile paralel olarak sol kalbe ulaşmadan akciğerlerde metabolize olmuştur. Sistemik kan basıncı açısından en önemli sonuç, daha önceden literatürde gösterilmiş olan Allicin'in hipotansif etkisinin bu çalışmada görülmemiş olmasıdır (8). Kontrol grubu ile kontrol + Allicin 0.1 mg grupları arasında sistemik kan basıncı açısından hiç bir istatistiksel fark yoktur. Kedilerde yapılmış olan bir çalışmada Allicin 0.1 mg direkt pulmoner artere infüze edilmiş ve daha önceden vazokonstriktör bir madde ile kasılmış olan pulmoner vasküler yatakta vazodilatasyona sebebiyet vermiş ayrıca hipotansiyona neden olmuştur. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ise bu bulguların aksini göstermektedir. 0.1 mg Allicin dozunda, yarısı bolus ve diğer yarısını infüzyon olarak vermemizin bu sonuçlarımızda etkili olduğunu düşünüyoruz.

Kan gazı analizlerinde gruplar arasında önemli bir fark bulunmamakla beraber parsiyel oksijen basıncı ve oksijen saturasyonu I/R + Allicin gruplarında daha yüksek

görülmektedir. Kan gazı sonuçları iskemi reperfüzyon hasarını takiben geç dönemde ve pulmoner arter kan akımının iyice düştüğü zaman bozulur, dolayısıyla bu sonuçları Allicin'in akciğer histolojisini düzeltici etkisinin bir sonucu olarak görebiliriz. Muhtemelen daha uzun süreli reperfüzyon periyodları uygulandığında Allicin'in daha bariz koruyucu ve kan gazlarını düzeltici etkisi ortaya çıkacaktır.

Miyeloperoksidaz (MPO) analizi, bilindiği üzere lökosit migrasyonunu ve akabinde oluşan hasarı yansıtan bir incelemedir. Deneyimizde en düşük MPO seviyesi I/R + Allicin 0.1 mg grubunda gözlenmiştir. Bu ise Allicin'in, iskemi reperfüzyon sonrasında oluşan hasara hem direkt olarak anti-oksidan, hem de anti-migratuar etkilerine bağlıdır. Kontrol gruplarında MPO seviyelerinin yüksek olmasını, diğer gruplara nazaran daha uzun süreli ventilatöre bağlı kalmalarına bağlıyoruz. Zira I/R + Allicin 0.1 mg grubu hariç diğer gruplardaki bütün denekler deneyin erken reperfüzyon safhasında akut sağ kalp dilatasyonu ile ölmüşlerdir. Bu erken ölüm nötrofil migrasyonunun dahi yeterince ortaya çıkmasına engel olmuştur. Literatürde ortaya konan bilgilere göre lökosit migrasyonu 45 ila 60.dakikalarda ortaya çıkmaktadır. MPO sonuçları histoloji ile paralellik arz etmektedir. Kontrol grubu ile kontrol + Allicin 0.1 mg grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamakla beraber, Allicin grubunda sonucun daha düşük olması Allicin'in hasarı daha aza indirgeyici etkisinin bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Histolojik sonuçlar ise, Allicin'in etkisini mikroskopik olarak da ortaya koymuştur. Özellikle Kontrol + Allicin 0.1 mg ve I/R + Allicin 0.1 mg gruplarında hem lökosit hem de lenfosit infiltrasyonu minimaldir. Bulgular kısmında belirtildiği üzere bu infiltrasyon diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür. Kontrol, I/R ve I/R + sodyum nitroprusit gruplarında özellikle perivasküler hem lökosit, hem de lenfosit infiltrasyonu dikkat çekmektedir. I/R + Allicin 0.01 mg grubunda, Allicin'in koruyucu

etkisinin azaldığını görmekteyiz. İnfiltrasyonun fazla olduğu gruplarda doku hasarı da çok belirgindir. Kalınlaşmış alveol duvarları, bozulmuş alveol yapıları ve ödem dikkat çekmektedir. Allicin gruplarındaki bu düzgün sonuçlar, anti-migratuar, anti-oksidan, anti-agregan ve pulmoner vazodilatör etkilerin bir sonucudur.

Bu çalışmada karşılaşılan sorun, cerrahi modelin yeterince stabil olmamasıdır. Bunun sonucu olarakta iskemi-reperfüzyon, iskemi-reperfüzyon + Allicin 0.01 mg ve iskemi reperfüzyon + sodyum nitroprussit gruplarındaki denekler 30 ve 45. dakikalarda ölmüşlerdir. Bu ise istatistiksel karşılaştırmayı zorlaştırmıştır. Fakat sağkalım kriterlerindeki istatistiksel farklılıklar çalışılan maddenin etkinliğinin gösterilmesi açısından çok önemlidir.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir.

- 0.1 mg Allicin verilmesi, iskemi reperfüzyon sonrası, hem hemodinamik hem de histolojik düzelmeye neden olmaktadır.
- 0.01 mg Allicin, bu deney modelinde etkisiz kalmıştır.
- 0.1 mg Allicin, iskemi reperfüzyon hasarını sodyum nitroprusitten daha etkili bir şekilde ortadan kaldırmaktadır.
- 0.1 mg Allicin verilmesi sıçanlarda hipotansiyona sebep olmamaktadır.
- 0.1 mg Allicin verilmesi, nötrofil ve lenfosit migrasyonlarına engel olmuştur ve bu bulgular ilk kez literatürde ortaya konmuştur.

Bu sonuçlara göre Allicin büyük hayvan deneylerinde denendikten ve ticari olarak kullanılabilir hale geldikten sonra bir selektif pulmoner vazodilatör olarak kullanılabilir. Etki mekanizması ve inhiye ettiği biyokimyasal ve moleküler yollar açısından, nitrik oksite çok benzemektedir ve ileride klinik kullanılabilirliği düşünüldüğünde umut vermektedir.

REFERANSLAR

1. Patterson GA, Cooper JC, eds. Lung Transplantation. Chest Surgery Clinics of North America. Philadelphia: Saunders, 1993:3.
2. Siegelman S, Sinha SBP, Veith FJ. Pulmonary reimplantation response. *Ann Surg* 1973;177:30-6.
3. Schmid RA, Yamashita M, Ando K, Tanaka Y, Cooper JD, Patterson GA. Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *Ann Thorac Surg* 1996;61:949-55.
4. Yamashita M, Schmid RA, Okabayashi K, Ando K, Kobayashi J, Cooper JD, Patterson GA. Pentoxifylline in flush solution improves early allograft function. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1055-61.
5. Yamashita M, Schmid RA, Fujino S, Cooper JD, Patterson GA. Nicorandil, a potent adenosine triphosphate-sensitive potassium-channel opener, ameliorates lung allograft reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1307-14.
6. Mayeux PR, Agrawal KC, Tou BT et al. The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. *Agents Actions* 1988;25(1-2):187-96.
7. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 1995;148:183-9.
8. Kaye AD, Nossaman BD, Ibrahim IN et al. Analysis of responses of allicin, a compound from garlic, in the pulmonary vascular bed of the cat and in the rat. *Eur J Pharmacol* 1995;276:21-6.
9. Lawson LD, Ransom DK, Hughes BG. Inhibition of whole blood platelet aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic compounds. *Thromb Res* 1992;65(2):141-56.
10. Yamashita M, Schmid RA, Ando K, Cooper JD, Patterson GA. Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1996;62:791-7.
11. Naka Y, Chowdhury NC, Oz MC, Smith CR, Yano OJ, Michler RE, Rose EA, Stern D. Nitroglycerine maintains graft vascular hemostasis and enhances preservation in an orthotopic rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:1-6.
12. Fujino S, Nagahiro I, Yamashita M, Yano M, Schmid RA, Cooper JD, Patterson GA. Preharvest nitroprusside flush improves posttransplantation lung function. *J Heart Lung Transplant* 1997;16(10):1073-80.
13. Van Raemdonck DEM, Jannis NCP, De Leyn PRJ, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary allografts is limited to 1 hour. *Ann Surg* 1998;228(6):788-96.

14. Paull DE, Keagy BA, Kron EJ, Wilcox BR. Reperfusion injury in the lung preserved for 24 hours. *Ann Thorac Surg* 1989;47:187-92.
15. Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, Baudet B, Detruit H, de Montpreville V, Libert JM, Wartski M, Herve P, Dartevielle P. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1294-300.
16. Seibert AF, Haynes J, Taylor A. Ischemia-Reperfusion injury in the isolated rat lung. Role of flow and endogenous leukocytes. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:270-5.
17. Steen S, Sjöberg T, Massa G, Ericsson L, Lindberg L. Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Ann Thorac Surg* 1993;55:434-40.
18. Date H, Izumi S, Miyade Y, Andou A, Shimizu N, Teramoto S. Successful canine bilateral single-lung transplantation after 21-hour lung preservation. *Ann Thorac Surg* 1995;59:336-41.
19. Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, Lindberg L, Ingemansson R, Massa G. Safe lung preservation for twenty four hours with perfadex. *Ann Thorac Surg* 1994;57:450-7.
20. Christie NA, Smith DE, Decampos KN, Slutsky AS, Patterson GA, Tanswell AK. Lung oxidant injury in a model of lung storage and extended reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1032-7.
21. Schütte H, Hermle G, Seeger W, Grimminger F. Vascular distention and continued ventilation are protective in lung ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:171-7.
22. Watanabe A, Kawaharada N, Kusajima K, Komatsu S, Abe T, Takahashi H. Influence of oxygen in inflation gas during lung ischemia on ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:332-8.
23. Haniuda M, Dresler CM, Mizuta T, Cooper JD, Patterson GA. Free radical-mediated vascular injury in lungs preserved at moderate hypothermia. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1376-81.
24. Egan TM, Ulicny KS, Lambert J, Wilcox BR. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1453-9.
25. Detterbeck FC, Keagy BA, Paull DE, Wilcox BR. Oxygen free radical scavenger injury in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1990;50:204-10.
26. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occur through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol* 1992;262(31):C546-C554.
27. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991;88:1054-7.

28. Miller DA, Roberts AM. Pulmonary artery occlusion and reperfusion causes microvascular constriction in the rabbit lung. *Ann Thorac Surg* 1999;67:323-7.
29. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interaction between platelets and blood-vessel walls. *N Eng J Med* 1990;300(20):1142-7.
30. Rabinovici R, Yeh CG, Hillegass LM, Griswold DE, DiMartino MJ, Vernick J, Fong KL, Feuerstein G. Role of complement in endotoxin/platelet-activating factor-induced lung injury. *J Immun* 1992;149:1744-50.
31. Lindsay TF, Hill J, Ortiz F, Rudolph A, Valeri CR, Hechtman HB, Moore FD. Blockade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1992;216(6):677,83.
32. Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, Oz MC, Pinsky DJ. Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation. *Transplantation* 1997;64(9):1248-55
33. Horgan MJ, Ge M, Gu J, Rothlein R, Malik AB. Role of ICAM-1 in neutrophil-mediated lung vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1991;261(30):H1578-H1584.
34. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, Paulson J, Rosen S, Seed B, Siegelman M, Springer T, Stoolman L, Tedder T, Varki A, Wagner D, Weissmann I, Zimmerman G. Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell* 1991;67:233.
35. Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ. Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(2):757-61.
36. Thomas DD, Sharar SR, Winn RK, Chi EY, Verrier ED, Allen MD, Bishop MJ. CD18-Independent mechanism of neutrophil emigration in the rabbit lung after ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1360-6.
37. Horgan MJ, Wright SD, Malik AB. Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. *Am J Physiol* 1990;259:L315-L319.
38. Uthoff K, Zehr KJ, Lee PC, Low RA, Baumgartner WA, Cameron DE, Stuart RS. Neutrophil modulation results in improved pulmonary function after 12 and 24 hours of preservation. *Ann Thorac Surg* 1995;59:7-13.
39. Kishima H, Takeda S, Miyoshi S, Matsumura A, Minami M, Utsumi T, Omori K, nakahara K, Matsuda H. Microvascular permeability of the non-heart beating rabbit lung after warm ischemia and reperfusion:Role of neutrophil elastase. *Ann Thorac Surg* 1998;65:913-8.

40. Garden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Jackson SR, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998;275:H385-H392.
41. Kourembanas S, McQuillan LP, Ieung GK, Faller DV. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 1993;92:99-104.
42. Adatia I, Lillehei C, Arnold JH, Thompson JE, Palazzo R, Fackler JC, Wessel DL. Inhaled nitric oxide in the treatment of postoperative graft dysfunction after lung transplantation. *Ann thorac Surg* 1994;57:1311-8.
43. Okabayashi K, Triantafillou AN, Yamashita M, Aoe M, DeMeester SR, Cooper JD, Patterson GA. Inhaled nitric oxide improves lung allograft dysfunction after prolonged storage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:293-9.
44. Meyer KC, Love RB, Zimmerman JJ. The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation. *Chest* 1998;113:1360-71.
45. Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, Bolling SF, Deeb GM. Disparate effects of Nitric oxide on lung ischemia reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1169-76.
46. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266(7):4244-50.
47. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. *Chest* (supplement) 1994;105(3):79S-84S.
48. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:765-88.
49. Palace GP, Del Vecchio PJ, Horgan MJ, Malik AB. Release of tumor necrosis factor after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:143-7.
50. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky DJ, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, Rot A, Nowygrod R, Stern D. Hypoxic induction of Interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;93:1564-70.
51. Sekido N, Mukaida N, Harada A, nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993;365:654-6.
52. DeMeester SR, Rolfe MW, Kunkel SL, Swiderski DL, Lincoln PM, Deeb GM, Strieter RM. The bimodal expression of tumor necrosis factor alpha in association with rat lung reimplantation and allograft rejection. *J Immun* 1993;150:2494-505.
53. Rolfe MW, Kunkel SL, DeMeester SR, Swiderski DL, Lincoln PM, Deeb GM, Strieter RM. Expression of Interleukin-6 in association with rat lung reimplantation and allograft rejection. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1010-6.
54. Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K. Contribution of endothelin-1 to warm ischemia/reperfusion injury of the rat lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2105-10.

55. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
56. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric oxide pathway. *N Eng J Med*1993;329(27):2002-10.
57. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S. NO in the lung. *Respir Physiol* 1995;101:109-20.
58. Thomas G, Ramwell PW. Nitric oxide, donors and inhibitors. In: 319-24.
59. Shiraishi T, DeMeester SR, Worrall NK, Ritter JH, Misko TP, Ferguson TB, Cooper JD, Patterson GA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates rat lung allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1449-60.
60. Freeman F, Kodera Y. Garlic chemistry: Stability of *S*-(2-Propenyl) 2-propene-1-sulfinothioate (Allicin) in blood, solvents and simulated physiological fluids. *J Agric Food Chem* 1995;43:2332-8.
61. Lawson LD. Composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch HP, Lawson LD, editors. *Garlic: The science and therapeutic application of Allium Savitum L. and related species*. 2nd ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1996:56-7.
62. Focke M, Feld A, Lichtenthaler HK. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS* 1990;261(1):106-8.
63. Chu TC, Burch JL, Brotto MAP, et al. Elevation of intracellular Ca²⁺ concentration in rabbit nonpigmented ciliary epithelial cells by allicin. *Comp Biochem Physiol* 1996;115C(1):89-94.
64. Shalinsky DR, McNamara D, Agrawal KC. Inhibition of GSH-dependent PGH₂ isomerase in mammary adenocarcinoma cells by allicin. *Prostaglandins* 1989;37(1):135-47.
65. Ku DD, Abdel-Razek TT, Dai J, Fallon MB, Abrams GA. Mechanisms of garlic induced pulmonary vasorelaxation: role of allicin.(Abstract) *Circulation. Supp* 1997;96(8):I-6.
66. Dirsch VM, Kierner AK, Wagner H, Vollmar AM. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 1998;139:333-9.
67. Batirel HF, Naka Y, Kayano K, Okada K, Vural KM, Oz MC. Intravenous allicin (garlic extract) improves pulmonary blood flow and reduces lung ischemia-reperfusion injury in rats. (Abstract) *Circulation Supp* 1998;98(17):I63-I64.
68. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379(2):233-44.
69. Ankri S, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelman D. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteases and cytopathic effects of *Entamoeba Histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(10):2286-8.

70. Ulicny KS, Egan TM, Lambert CJ, Reddick RL, Wilcox BR. Cadaver lung donors: Effect of preharvest ventilation on graft function. *Ann Thorac Surg* 1993;55:1185-91.
71. Buchanan SA, DeLima NF, Binns OAR, Mauney MC, Cope JT, Langenburg SE, Shockey KS, Bianchi JD, Parekh VI, Tribble CG, Kron IL. Pulmonary function after non-heart beating lung donation in a survival model. *Ann Thorac Surg* 1995;60:38-46.
72. Van Raemdonck DEM, Jannis NCP, Rega FRL, De Leyn PRJ, Flameng WJ, Lerut TE. Delay of adenosine triphosphate depletion and hypoxanthine formation in rabbit lung after death. *Ann Thorac Surg* 1996;62:233-41.
73. Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW. Co-localization of cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(4):733-42.
74. Kaushal GP, Singh AB, Shah SU. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):F587-95.

